

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA CONJUGAÇÃO E RADIOMARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL
RITUXIMAB PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA RADIONUCLÍDICA**

ADRIANA VIDAL FERNANDES MASSICANO

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**SÃO PAULO
2011**

Dedico este trabalho àquela que nunca mediu esforços para me ajudar; que muito me ensinou; que sempre acreditou em mim; que fez dos meus sonhos os seus; que sempre faz com que eu me sinta especial.

Àquela que vive em meus pensamentos todo o tempo; àquela que possui mais da metade do meu coração.

Ao meu modelo de pessoa e de ser humano; à minha amiga; à minha super heroína; à minha **VIDA**; à minha **VIDAL**, à minha **MÃE!**

Amo-te mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, autor e consumidor de todas as coisas. Se eu cheguei até aqui, foi por misericórdia dEle. Obrigada Senhor!

À minha família por muitas vezes não gostar, mas compreender o motivo da minha ausência. Em especial, agradeço aos meus pais e ao meu irmão, por tudo, tudo mesmo! Não imagino minha vida sem vocês. Tudo o que sei, tudo o que sonho, tudo o que sou... Tudo veio de vocês, tudo é fruto do nosso amor!

À minha avó, que acha o meu trabalho lindo e diz: “Se tivesse pouca idade também seria farmacêutica”. Lindo é aprender com sua experiência vó, e ver o quanto você é forte e determinada. Obrigada!

Aos mais novos integrantes da nossa família, meu sobrinho Guilherme e meu primo Igor. Espero que vocês e suas gerações usufruam de todas as pesquisas e de todos os avanços da ciência.

Às famílias Massicano e Farina, que são sem dúvida alguma, minha segunda família.

Ao meu esposo, pelo apoio, pela paciência, por trilhar comigo meus caminhos, e permitir-me trilhar também os dele, fazendo dos dois caminhos um só. Obrigada pelo abraço amigo sempre presente, por iluminar meus pensamentos quando tudo parecia obscuro. Obrigada pelos sonhos que sonhamos e re-sonhamos juntos, pelo seu carinho e pelo seu amor!

"Depois de um tempo você aprende que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida." (William Shakespeare)

À Dra. Elaine, pela oportunidade, pelo conhecimento transmitido, pela paciência em esperar que esta árvore desse fruto e que o fruto amadurecesse, pelo incentivo, por acreditar e me fazer acreditar e pela amizade. Obrigada!

À Dra. Tereza que acompanhou todas as etapas deste trabalho e contribuiu ativamente para o aperfeiçoamento de todas elas.

À MSc. Neuza e Dra. Margareth que foram o começo de tudo. Obrigada por deixarem o “bichinho da pesquisa” me morder!

Ao MSc. Jair Mengatti, por sempre ter contribuído no que foi necessário para a realização deste trabalho.

A todos os servidores, bolsistas e terceirizados da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) em especial à equipe do Controle de Qualidade. Aprendi muito com cada um...

Ao Dr. Patrick Jack Spencer do Centro de Biotecnologia (CB), por todas as vezes que me auxiliou prontamente. Ao Dr. Carlos Soares e à Miriam Suzuki pela ajuda no cultivo celular. Na realidade, agradeço a todos os servidores e bolsistas do CB, por serem tão prestativos.

Aos integrantes do nosso maravilhoso grupo de pesquisa: Akin, Camila, Clarice, Josefina, Priscilla, Renata, Tatiane. Aos “abduzidos” pela Garantia: Cícero, Kátia e Laura. Incrível como somos tão diferentes e nos entendemos tão bem! Somos uma família. Uma família que o coração escolheu! Cada um é especial para mim de um jeito... não sei explicar, só tenho a agradecer: muito obrigada por fazerem parte da minha vida.

Priscilla, muito obrigada mesmo! Sem você, metade deste trabalho não teria sido possível!

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em especial a DIRF, pelo provimento dos recursos necessários para o desenvolvimento e divulgação deste trabalho.

Ao Dr. Mather, à Dra. Jane e à Dra. Maggie Cooper do Cancer Imaging Institute (Bart’s and the London School of Medicine and Chemistry) que nos ajudaram no momento mais crítico deste trabalho, fornecendo-nos informações valiosas.

À Neide do Biotério, pelo cuidado com os animais.

À banca examinadora: Dra. Sibila Roberta, Dr. Patrick Jack Spencer, Dra. Regina Célia, Dr. Marcos Moisés e Dra. Maria Tereza.

Aos funcionários da divisão de pós-graduação do IPEN.

Aos demais amigos e familiares de todos os lugares.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Louvai ao Senhor todas as nações, louvai-O todos os povos. Porque Sua benignidade é grande para conosco e a verdade do Senhor é para sempre. Louvai ao Senhor.”

(Salmos 117)

ESTUDO DA CONJUGAÇÃO E RADIOMARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL RITUXIMAB PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA RADIONUCLÍDICA

Adriana Vidal Fernandes Massicano

RESUMO

Linfomas são cânceres provenientes da transformação de um linfócito no sistema linfático, sendo que, o mais comum é o Linfoma Não-Hodgkin (LNH). Avanços na imunologia e na biologia molecular têm auxiliado na detecção desses tumores e aberto caminhos para novas estratégias de tratamento, como a Radioimunoterapia. O rituximab é um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 já utilizado como imunoterápico no tratamento de LNH refratários ou recidivos. O objetivo deste trabalho foi estudar a conjugação deste anticorpo ao quelante bifuncional DOTA-NHS-éster e radiomarcá-lo com o radioisótopo ^{177}Lu , com o objetivo de desenvolver um radioimunoterápico para tratamento de LNH. Estudos de imunoconjugação com diferentes razões molares rituximab:DOTA foram estudadas (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:250, 1:500 e 1:1000) afim de avaliar qual condição conferia maior pureza radioquímica. A estabilidade dos imunoconjugados foi analisada por cromatografia de alta eficiência por até 240 dias em diferentes condições de armazenamento. A estabilidade do imunoconjugado radiomarcado foi avaliada após incubação a 2-8 °C e em soro humano a 37 °C e a ligação às proteínas séricas foi determinada. Estudos de biodistribuição foram realizados em camundongos *Swiss* saudáveis a fim de caracterizar biologicamente o imunoconjugado radiomarcado. Com o objetivo de analisar se os processos de conjugação e de radiomarcagem não danificaram a capacidade de reconhecimento do antígeno (imunorreatividade) deste anticorpo, realizou-se estudos preliminares de ligação às células de LNH (*Raji*). Os imunoconjugados de razão molar baixa (1:5, 1:10 e 1:20) mostraram-se estáveis quando armazenados por até 240 dias em diferentes condições. A

análise em cromatografia em camada delgada e CLAE, revelou que o Acm conjugado na razão molar 1:50 foi radiomarcado com alta pureza radioquímica (superior a 95%) quando purificado em coluna PD-10. Este mesmo radioimunoconjugado apresentou razoável estabilidade a 2-8° C. A análise da estabilidade em soro humano não indicou grande metabolismo pelas enzimas do soro. O radioimunoconjugado apresentou alta ligação às proteínas séricas indicando clareamento sanguíneo lento, o qual foi confirmado pelos estudos *in vivo*. O radioimunoconjugado apresentou alta captação no fígado o que é característico de anticorpos monoclonais. Os estudos preliminares de competição indicaram que o processo de obtenção do radioimunoconjugado não prejudicou sua ligação às células *Raji* sendo esta ligação específica.

STUDY OF CONJUGATION AND RADIOLABELING OF MONOCLONAL ANTIBODY RITUXIMAB FOR USE IN RADIONUCLIDE THERAPY

Adriana Vidal Fernandes Massicano

ABSTRACT

Lymphomas are tumors originated from the transformation of a lymphocyte in the lymphatic system. The most common lymphoma is the Non-Hodgkin Lymphoma (NHL). Advances in immunology and molecular biology have been improving NHL's detection and treatment strategies development, such as Radioimmunotherapy (RIT). Rituximab is an anti-CD20 monoclonal antibody used as immunotherapeutic to treat refractory or relapsed NHL. The goal of the present work was to conjugate this antibody to DOTA-NHS-ester bifunctional chelator and to radiolabel it with ^{177}Lu radioisotope in order to develop a radioimmunotherapeutic agent for NHL's treatment. Different rituximab to DOTA molar ratios (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:250, 1:500 and 1:1000) were evaluated in order to determine the best condition for obtaining the highest radiochemical purity of radioimmunotherapeutic. The stability of the unlabeled immunoconjugated was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) for up to 240 days in different storage conditions. The stability of the labeled preparations was evaluated either after storing at 2-8 °C or incubation in human serum at 37 °C. The binding to serum proteins was also determined. *In vivo* studies were performed in healthy *Swiss* mice, in order to characterize the biological properties of labeled conjugate. Finally, preliminary studies of radioimmunoconjugated competitive binding to CD20 positive Raji cells were carried out in order to analyze if the process of conjugation and radiolabeling compromises the immunoreactivity of the antibody. The conjugation applying lower

antibody to chelator molar ratios (1:5, 1:10 and 1:20) showed high stability when stored for up to 240 days in different conditions. The HPLC analysis showed that the monoclonal antibody conjugated in molar ratio 1:50 was labeled with higher radiochemical purity (> 95%) when purified in PD-10 column. This conjugate showed reasonable stability at 2-8 ° C. The analysis of the stability in human serum did not suggest high metabolic degradation by serum enzymes. The labeled conjugate showed high serum protein binding, suggesting slow blood clearance, which was confirmed by *in vivo* studies. The labeled conjugate presented high uptake in the liver, in accordance to biodistribution pattern of monoclonal antibodies. The preliminary competitive binding studies indicated a specific binding and suggest that the synthesis of ¹⁷⁷Lu-DOTA-rituximab did not compromise its binding to CD20 positive tumor cells.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	19
2.0	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	O Sistema imunológico	24
3.2	Considerações sobre anticorpos	25
3.2.1	Arquitetura do anticorpo	26
3.2.2	Anticorpos policlonais	27
3.2.3	Anticorpos monoclonais	28
3.2.3.1	Tipos de anticorpos monoclonais	29
3.3	Neoplasias	30
3.3.1	Linfomas	33
3.3.1.1	Linfoma de Hodgkin ou Doença de Hodgkin	33
3.3.1.2	Linfoma não-Hodgkin	34
3.4	Imunoterapia	35
3.4.1	Antígeno CD20	35
3.4.2	Rituximab	36
3.5	Radioimunoterapia	39
3.6	Escolha do radioisótopo	42
3.6.1	Lutécio-177 (¹⁷⁷ Lu)	44
3.6.1.1	Métodos de marcação com Lu-177	45
3.6.1.1.1	Quelantes bifuncionais macrocíclicos	46
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Materiais	49
4.1.1	Infraestrutura	49
4.1.2	Reagentes	49
4.1.3	Equipamentos e demais materiais	50
4.1.4	Animais	51
4.1.5	Células <i>Raji</i> de linfoma de Burkitt humano	52

4.2	Métodos	52
4.2.1	Planejamento experimental	52
4.2.2	Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise da pureza radioquímica das radiomarcações.....	54
4.2.3	Troca de tampão do rituximab	55
4.2.4	Imunoconjugação do rituximab ao DOTA.....	56
4.2.4.1	Variação da razão molar rituximab:DOTA	56
4.2.4.2	Determinação do número de grupamentos quelantes acoplados à cadeia do rituximab.....	57
4.2.5	Purificação do imunoconjugado	57
4.2.6	Cálculo da concentração proteica.....	58
4.2.7	Análise da estabilidade da imunoconjugação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	59
4.2.8	Radiomarcação do rituximab-DOTA com lutécio-177	59
4.2.9	Purificação do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em coluna PD-10.....	60
4.2.9.1	Desenvolvimento do perfil cromatográfico em coluna PD-10	61
4.2.10	Análise da pureza radioquímica do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	61
4.2.11	Análise da estabilidade do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu a 2-8 °C	61
4.2.12	Análise da estabilidade do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em soro humano	62
4.2.13	Ligação do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu às proteínas séricas <i>in vitro</i>	62
4.2.14	Estudos de biodistribuição em camundongos <i>Swiss</i>	63
4.2.15	Estudos farmacocinéticos em camundongos <i>Swiss</i> sadios	63
4.2.16	Desenvolvimento de modelo tumoral em camundongos <i>Nude</i>	65
4.2.17	Estudo de ligação às células <i>Raji</i>	65
4.2.18	Análise Estatística	66
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	Desenvolvimento de método de cromatografia em camada delgada (CCD) e em papel Whatman nº 1.....	67
5.2	Desenvolvimento de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..	74
5.3	Método de diálise, purificação e concentração.....	76
5.4	Cálculo da concentração de anticorpo	81
5.5	Desenvolvimento do perfil cromatográfico em coluna PD-10	82
5.6	Estudos de imunoconjugação	84
5.7	Análise da estabilidade da imunoconjugação por CLAE	87

5.8 Radiomarcção do imconjogado com ¹⁷⁷ Lu.....	95
5.9 Variações da massa de rituximab-DOTA e estabilidade do rituximab-DOTA- ¹⁷⁷ Lu.....	104
5.10 Purificação em coluna PD-10	107
5.11 Ligação às proteínas séricas.....	109
5.12 Desenvolvimento de modelo tumoral em camundongos <i>Nude</i>	110
5.13 Estudos de farmacocinética em camundongos <i>Swiss</i> sadios	111
5.14 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>Swiss</i> sadios	113
5.15 Ligação às células <i>Raji</i>	115
6.0 CONCLUSÕES.....	118
7.0 PRÓXIMAS ETAPAS.....	120
ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Anticorpos aprovados pelo FDA para diagnóstico ou tratamento de doenças malignas.	41
TABELA 2 - Propriedades nucleares de alguns radionuclídeos beta-emissores utilizados em terapia radionuclídica.	44
TABELA 3 - Perfil cromatográfico do rituximab-DOTA, $^{177}\text{LuCl}_3$, DTPA- ^{177}Lu e DOTA- ^{177}Lu em diferentes sistemas cromatográficos.	73
TABELA 4 - Número de grupamentos quelantes por anticorpo. Condições de marcação: 1h à 43 °C, 350 rpm (*n =3; **n = 4; ***n = 5)	85
TABELA 5 - Tempo de retenção (TR) do rituximab, DOTA-NHS-éster e rituximab-DOTA (conjugado em diferentes razões molares) em CLAE.	85
TABELA 6 - Estabilidade da conjugação em diferentes condições de armazenamento por até 240 dias (n = 1).....	89
TABELA 7 - Pureza radioquímica do rituximab-DOTA- $^{177}\text{LuCl}_3$. Condições de radiomarcação: 1 mg de rituximab-DOTA, 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, reação ocorreu por 1 hora a 43° C e 350 rpm. (*n = 2; **n = 3) († radiomarcação realizada com 5 mg)..	100
TABELA 8 - Estabilidade do rituximab-DOTA- ^{177}Lu a 2-8 °C. Condições de radiomarcação: 5 mg, 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm (n = 2).....	106
TABELA 9 - Estabilidade do rituximab-DOTA- ^{177}Lu em soro humano (n = 3).....	107
TABELA 10 - Parâmetros farmacocinéticos para o rituximab-DOTA- ^{177}Lu determinados em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas sadias (n=4).....	112
TABELA 11 – Biodistribuição do rituximab-DOTA- ^{177}Lu (0,185 MBq) em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas sadias (n = 4).....	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho esquemático do sistema linfático humano (Sistema Linfático, 2010).	25
FIGURA 2 - Representação estrutural da imunoglobulina. Região em destaque corresponde à região da dobradiça (reproduzido de Walsh, 2003).....	27
FIGURA 3 - Estrutura esquemática dos tipos de anticorpos monoclonais e nomenclatura indicativa da origem (adaptado de Goldsmith, 2010).	30
FIGURA 4 - Células de Reed-Sternberg em destaque (Unicamp, 2010).	34
FIGURA 5 - Antígeno CD20 expresso em linfócitos B e rituximab (adaptado de Pescovitz, 2006).	36
FIGURA 6 - Mecanismos de ação do rituximab (adaptado de Pescovitz, 2006).	37
FIGURA 7 - Estrutura da porção Fab do rituximab (Du et al., 2007).	38
FIGURA 8 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA) (Macrocyclics, 2011).	47
FIGURA 9 - Ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA-NHS-éster) (Macrocyclics, 2011).	48
FIGURA 10 – Esquema do planejamento experimental deste trabalho.	53
FIGURA 11 – Representação química da obtenção do radiofármaco.	60
FIGURA 12 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em água purificada (tratada com resina Chellex 100) e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).	67
FIGURA 13 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).	68
FIGURA 14 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em tampão acetato de amônio 0,4 M pH 5,5 e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).	69
FIGURA 15 - Perfil cromatográfico do DTPA- ^{177}Lu em ITLC-SG (A), papel Whatman nº 1 (B) e TLC-SG (C) utilizando diferentes fases móveis.	70
FIGURA 16 - Perfil cromatográfico do DOTA- ^{177}Lu em ITLC-SG (A), papel Whatman nº 1 (B) e TLC-SG (C) utilizando diferentes fases móveis.	71
FIGURA 17 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ (A), DOTA- ^{177}Lu (B) e DTPA- ^{177}Lu (C), utilizando uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 a um fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por 25 minutos.	75
FIGURA 18 - Cromatograma (UV a 280 nm) do rituximab (A), DOTA-NHS-éster (B) e mistura de rituximab e DOTA-NHS-éster (C), utilizando uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 a um fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por 25 minutos.	76
FIGURA 19 - Perfil da purificação do Acm por coluna de exclusão molecular.	78
FIGURA 20 - Absorbância do ultrafiltrado em cada ciclo de centrifugação. Ciclo:	

centrifugação a 3000 <i>g</i> , por 27 minutos sob refrigeração. Ultrafiltrado lido em espectrofotômetro a 280 nm.	79
FIGURA 21 – Cromatograma do ultrafiltrado obtido por meio da purificação do imunoc conjugado por dispositivo de ultrafiltração de proteína. Em A , 1ª centrifugação, B , 2ª centrifugação C , 3ª centrifugação e em D , 4ª centrifugação.	80
FIGURA 22 - Curva de calibração do rituximab não conjugado.	82
FIGURA 23 - Perfil cromatográfico do rituximab e DOTA-NHS-éster em coluna PD-10.	83
FIGURA 24 - Perfil cromatográfico do ¹⁷⁷ LuCl ₃ em coluna PD-10.	84
FIGURA 25 - Cromatograma do rituximab-DOTA não purificado. Conjugação realizada nas razões molares 1:5 (A), 1:10 (B) e 1:20 (C).	86
FIGURA 26 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA realizado imediatamente após a purificação do conjugado nas seguintes razões molares: (A) 1:5; (B) 1:10 e (C) 1:20.	88
FIGURA 27 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:5 e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C; (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.	90
FIGURA 27.1 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:5 e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.	91
FIGURA 28 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:10 e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C, (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.	92
FIGURA 28.1 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:10 e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.	93
FIGURA 29 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:20 e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C; (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.	94
FIGURA 29.1 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão 1:20 e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.	95
FIGURA 30 - Estabilidade do rituximab-DOTA (1:250) purificado e armazenado em diferentes condições. Condições de radiomarcagem: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de ¹⁷⁷ LuCl ₃ , 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).	96
FIGURA 31 - Estabilidade do rituximab-DOTA (1:500) purificado e armazenado em diferentes condições. Condições de radiomarcagem: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de ¹⁷⁷ LuCl ₃ , 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).	97
FIGURA 32 – Estabilidade do rituximab-DOTA (1:1000) purificado e armazenado em	

diferentes condições. Condições de radiomarcção: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).....	97
FIGURA 33 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:5). Em A , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 37 °C ; 200 µL; 350 rpm. Em B , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 43 °C , 200 µL, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).....	101
FIGURA 34 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:10). Em A , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 37 °C; 200 µL; 350 rpm. Em B , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 43 °C, 200 µL, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).....	102
FIGURA 35 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:20). Em A , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 37 °C ; 200 µL; 350 rpm. Em B , as condições de radiomarcção foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; 1 hora a 43 °C , 200 µL, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).....	103
FIGURA 36 – Influência da temperatura e tempo de radiomarcção. Marcou-se 1 mg de rituximab-DOTA purificado com 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$. Tempo de radiomarcção imediato. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 3 para condição 1 hora a 43 °C e n = 2 para as restantes).....	104
FIGURA 37 - Radiomarcção do Rituximab-DOTA com diferentes massas. Condições de radiomarcção: 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm (n = 2).	105
FIGURA 38 – Perfil cromatográfico do Rituximab-DOTA- ^{177}Lu em TLC-SG após incubação em soro humano a 37 °C.....	107
FIGURA 39 – Radiocromatograma de CLAE do rituximab-DOTA- ^{177}Lu após purificação em coluna PD-10.....	108
FIGURA 40 – Ligação do rituximab-DOTA- ^{177}Lu às proteínas séricas.....	110
FIGURA 40 – Curva de clareamento sanguíneo rituximab-DOTA- ^{177}Lu em camundongos <i>Swiss sadios</i> (n = 4).	111
FIGURA 42 – Biodistribuição (em % de atividade captada pelo tecido) do rituximab-DOTA- ^{177}Lu em camundongos <i>Swiss sadios</i>	114
FIGURA 43 – Biodistribuição (em % de atividade captada por grama de tecido) do rituximab-DOTA- ^{177}Lu em camundongos <i>Swiss sadios</i>	114
FIGURA 44 – Ligação do rituximab-DOTA- ^{177}Lu às células <i>Raji</i> na ausência e presença de competidor (rituximab não conjugado) (n=1).	116

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
Ac	Anticorpo
Acm	Anticorpo monoclonal
Acms	Anticorpos monoclonais
Ag	Antígeno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPM	Contagens por minuto
D	Dias
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético
DOTA-NHS-éster	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA – NHS –éster)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
<i>g</i>	Força centrífuga
h	Horas
Imed.	Imediatamente / Imediato
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Kilo Dalton
K_{el}	Constante de eliminação
L	Litros
kg	Quilo gramas
M	Molar (mol.L^{-1})
min	Minutos
nM	Nanomolar
PBS	Tampão fosfato-salino pH 7,4
PET	Tomografia por emissão de prótons
<i>Raji</i>	Linhagem celular derivada de linfoma de Burkitt humano
R_f	Fator de retenção

RIT	Radioimunoterapia
Rituximab-DOTA	Anticorpo monoclonal conjugado com DOTA-NHS éster
Rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu	Anticorpo monoclonal conjugado com DOTA-NHS éster e radiomarcado com ¹⁷⁷ Lu.
rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
t½	Tempo de meia-vida
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
W1	Papel cromatográfico Whatman nº 1
Vd	Volume de distribuição aparente
% AI	Porcentagem da atividade injetada em um determinado tecido
% AI/g	Porcentagem da atividade injetada em um grama de um determinado tecido
% AI/mL	Porcentagem da atividade injetada em um mililitro de sangue
[Acm]	Concentração de anticorpo monoclonal

1.0 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2010a), os linfomas correspondem ao terceiro tipo de tumor pediátrico mais comum em países desenvolvidos e ocupam o segundo lugar em países em desenvolvimento, ficando atrás, apenas, das leucemias. Estima-se que somente no Brasil haverá 9.580 novos casos em 2011.

Linfoma é um termo genérico para descrever um tumor maligno originado no tecido linfóide (Araújo et al., 2008). Há muitas subclassificações começando com a divisão entre Linfoma Não-Hodgkin (LNH) e doença de Hodgkin que é feita por análise das diferenças histopatológicas (Araújo et al., 2008; Goldsmith, 2010). O LNH é o mais comum e inclui mais de 20 subtipos diferentes. O número de casos praticamente duplicou nos últimos 25 anos, particularmente em pessoas acima de 60 anos, por razões ainda não esclarecidas. Em virtude de sua diversidade, são necessários vários tipos de exames para o diagnóstico adequado como: biópsia, punção, estudos celulares (biologia molecular, citogenética, imunohistoquímica, entre outros) e exames de imagens, dentre eles o mais eficaz é a cintilografia com citrato de Gálio-67 (INCA, 2010b).

O LNH pode ser do tipo indolente (baixo grau) e agressivo (alto grau). Os indolentes, que correspondem a 40% dos diagnósticos, possuem um crescimento relativamente lento com possibilidade de cura menor; já os agressivos, correspondentes a 60% dos diagnósticos, podem levar rapidamente ao óbito se não tratados, mas em geral, são mais curáveis (INCA, 2010b). Tendo em vista a grande possibilidade de cura de LNH, tornou-se interessante pesquisar novas estratégias de tratamento e diagnóstico.

A radioimunoterapia (RIT) tem sido o foco de muitas pesquisas nas últimas duas décadas (Rasaneh et al., 2009). Na RIT um radioisótopo é acoplado a um anticorpo monoclonal (Acm) que é um agente específico para um tipo de tumor; isso permite a entrega seletiva de radiação ao alvo da doença, poupando os tecidos normais adjacentes

(DeNardo et al., 2006; Rasaneh et al., 2009; Goldsmith, 2010). Na célula alvo, a radiação ionizante (partículas α ou β^-) pode danificar componentes celulares e levar à morte celular de forma direta, por quebra do DNA, ou indireta, via radicais livres (OH^\cdot , H^\cdot , O_2^\cdot) formados pela interação da radiação com a água no tecido alvo (Chen et al., 2008). Segundo Zalutsky (2003a), a escolha do radioisótopo e da substância a ser radiomarcada são as principais etapas para o desenvolvimento de radiofármacos para a terapia radionuclídica.

Quelantes bifuncionais são utilizados para ligar radiometais como ^{177}Lu , ^{90}Y e ^{111}In na cadeia do anticorpo, resultando numa ligação estável entre eles. Os mais comuns são os derivados do DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) e DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético). No entanto, estudos mostram que Acms radiomarcados que usam agentes quelantes macrocíclicos como o DOTA, apresentam menor desacoplamento de radioisótopo da estrutura proteica (DeNardo et al., 2006). Complexos metálicos de DOTA também possuem maior estabilidade termodinâmica e uma cinética inerte, quando comparado ao DTPA, mas sua maior desvantagem é que a formação do imunocjugado é lenta e mais complexa. Outro aspecto importante é que para se obter alta eficiência de radiomarcção com os derivados de DOTA, é necessário o aquecimento, que pode causar problemas, em virtude da característica termolábil da proteína (Cooper et al., 2006, Tolmachev, 2010).

A maioria dos anticorpos monoclonais (Acm) utilizados para radiomarcção são de origem murínica porque são gerados de camundongos imunizados. Como consequência, pacientes frequentemente desenvolvem uma resposta imune a estas proteínas murínicas (uma única administração provoca resposta imune em 50-80% dos pacientes), comprometendo sua utilização em certas aplicações. Esta resposta imune à Acm murínicos denomina-se HAMA (do inglês *Human anti-mouse antibodies*) e pode ser detectada dentro de 14 dias após a administração, aumentando significativamente após repetidas administrações. A resposta HAMA destrói os Acm administrados em doses subsequentes e, na prática, a eficácia terapêutica dos Acm murínicos é limitada à primeira ou no máximo à segunda administração (Zalutsky et al., 2003b; Walsh, 2003).

Dois tipos de Acms foram desenvolvidos para minimizar estes problemas:

Acms quiméricos, que são construídos pela combinação de cadeias leves de origem murínica e cadeias pesadas de origem humana e Acms humanizados cuja porção murínica corresponde somente aos resíduos de aminoácidos envolvidos no reconhecimento do antígeno (Zalutsky, 2003b).

Rituximab (Mabthera® - Roche) é um Acm quimérico específico para o antígeno CD20, uma proteína transmembranar hidrofóbica localizada em linfócitos B maduros (Scott, 1998; Pescovitz, 2006; Jalilian et al., 2008). Foi aprovado em 1998 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para imunoterapia de LNH de células B (Schaffland et al., 2004). Rituximab liga-se a 95% das células B e 90% das células B de LNH, promovendo morte celular por três mecanismos diferentes: citotoxicidade complemento-dependente, citotoxicidade celular anticorpo-dependente e pela indução da apoptose (DeNardo et al., 2006; Pescovitz, 2006).

Em razão de sua extraordinária eficácia, Acms anti-CD20 radiomarcados vêm sendo utilizados em Radioimunoterapia (RIT), como forma de tratamento complementar à imunoterapia. Os radiofármacos mais estudados baseados em Acm anti-CD20 são: Bexxar® (que consiste do anticorpo tositumomab e tositumomab-¹³¹I administrados sequencialmente) e Zevalin® (que consiste da administração de rituximab seguido por ibritumomab-tiuxetan-⁹⁰Y) (DeNardo et al., 2006; Jalilian et al., 2008). Bexxar® e Zevalin® são mais eficazes que o uso individual do anticorpo monoclonal não radiomarcado (imunoterapia) no tratamento de LNH de baixo grau e também em formas mais agressivas. Eles são indicados no tratamento de pacientes com recidivas, LNH refratários de baixo grau, LNH de células B modificado, incluindo pacientes com LNH folicular rituximab-resistente. Um ensaio utilizando Zevalin® em pacientes com doença rituximab-resistente, resultou em uma taxa de resposta de 74% (DeNardo et al., 2006; Jacene et al., 2007).

Quando administrado em dose única e como agente único de tratamento a pacientes portadores de linfoma folicular avançado, não tratado previamente, o Bexxar® mostrou-se capaz de induzir uma resposta total de 95% e uma taxa de remissão completa de 74%, apesar do fato de 63% dos pacientes apresentarem comprometimento de medula óssea (DeNardo et al., 2006).

A desvantagem do Zevalin® é o radioisótopo ^{90}Y (energia das partículas β^- de 2,3 MeV), que por ser um emissor beta puro, não permite realizar estudos de dosimetria pré-terapia, sendo necessário também o uso do anticorpo marcado com ^{111}In . Além disso, ^{90}Y deposita muita energia no tumor, o que pode ser vantajoso em grandes tumores, mas para micrometástases a energia é provavelmente muito alta, resultando em maior dose absorvida pelos tecidos adjacentes. O uso do ^{131}I na marcação de Acm anti-CD20, tem como desvantagem a alta emissão de radiação gama (364 KeV, 82%; 637 KeV, 7%), o que pode resultar em hospitalização prolongada do paciente. Adicionalmente, essa característica pode aumentar potencialmente a radiação absorvida pelos trabalhadores do hospital e familiares do paciente (Forrer et al., 2009; Hens et al., 2009). Em contrapartida, a química do ^{131}I é muito mais fácil se comparada a de radiometais como ^{90}Y , ^{177}Lu e ^{111}In , que requerem mais estudos químicos para ligar o radiometal à imunoglobulina, resultando em uma configuração que seja estável em meio biológico (Goldsmith, 2010).

Os critérios de seleção de radionuclídeos para radiomarcador Acm são diferentes para diagnóstico e terapia. Para radioimunoterapia, o objetivo é maximizar a dose no tumor minimizando-a nos tecidos saudáveis (Zalutsky et al., 2003b). O lutécio-177 (^{177}Lu) tem emergido como um promissor agente emissor de partículas β^- para tratamento de tumores de pequeno volume graças ao alcance médio de suas partículas β^- (670 μm) e seu tempo de meia-vida (6,7 dias). A menor energia de suas partículas β^- (498 KeV) poupa os órgãos não alvos do efeito tóxico da radiação. Além disso, devido à emissão concomitante de raios-gama de 208 KeV, moléculas marcadas com esse radioisótopo podem também ser utilizadas como ferramentas no diagnóstico por imagem e dosimetria (Mikolajczak et al., 2003; Forrer et al., 2009; Nir-EI, 2004).

Tendo tudo isso em mente, é interessante para a terapia de LNH o desenvolvimento de um radiofármaco a partir do Acm rituximab que utilize DOTA como quelante bifuncional e ^{177}Lu como radioisótopo.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o acoplamento do quelante bifuncional DOTA-NHS-éster ao anticorpo monoclonal rituximab (conjugação) e otimizar as condições de radiomarcção deste conjugado ao radiometal ^{177}Lu , com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de um radiofármaco para terapia de linfoma não-Hodgkin.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar a reação de conjugação do quelante DOTA-NHS-éster ao Acm rituximab, a fim de obter um protocolo de conjugação reprodutível;
- ✓ Estudar a estabilidade do imunoc conjugado em diferentes condições de armazenamento;
- ✓ Otimizar as condições de radiomarcção do imunoc conjugado com o ^{177}Lu de modo a obter alta pureza radioquímica;
- ✓ Estudar a estabilidade do rituximab-DOTA- ^{177}Lu ;
- ✓ Analisar sua biodistribuição e farmacocinética;
- ✓ Desenvolver um modelo animal de linfoma não-Hodgkin;
- ✓ Analisar a ligação do rituximab-DOTA- ^{177}Lu às células de linfoma não-Hodgkin e às proteínas séricas *in vitro*.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Sistema imunológico

O sistema imunológico é formado por estruturas organizadas, como os linfonodos e baço, e por células livres, como os linfócitos, granulócitos e células do sistema mononuclear fagocitário (ou sistema reticuloendotelial) (Junqueira et al., 2004). A reação imunológica é uma resposta adaptativa complexa que o organismo monta para reconhecer e tentar eliminar do corpo, substâncias estranhas que nele penetram. A reação imune é conhecida como uma resposta a antígenos (Ag) (Pereira, 1998). Os antígenos são estruturas (solúvel, celular ou particulada) que possuem duas propriedades:

a) **Imunogenicidade:** capacidade de induzir uma resposta imune específica;

b) **Antigenicidade:** capacidade de interagir com os anticorpos ou linfócitos T sensibilizados (Vermes, 1988).

O sistema imunológico não reconhece o antígeno como um todo, mas, apenas partes da molécula, denominadas *epítopos* ou *determinantes antigênicos* (Pereira, 1998).

O **sistema linfático** é um importante componente do sistema imunológico e suas principais estruturas, que participam da resposta imune são: o timo, o baço, os linfonodos e os vasos linfáticos (Junqueira et al., 2004). Na FIG. 1 observa-se um desenho esquemático do sistema linfático humano e seus principais componentes.

Toda atividade imune depende da existência de células linfóides que se originam na medula óssea e são sensíveis ao antígeno. Os linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular, completam sua maturação no timo, ao passo que os linfócitos B, responsável pela imunidade humoral, saem da medula já como células maduras (Mota, 1988; Junqueira et al., 2004).

Na **imunidade celular**, células imunocompetentes (células com capacidade de

resposta imune) reagem e destroem os antígenos.

A **imunidade humoral** adquirida depende de anticorpos. Estes reconhecem especificamente os antígenos, neutralizando-os e marcando-os para eliminação pelos vários mecanismos efetores (Junqueira et al, 2004).

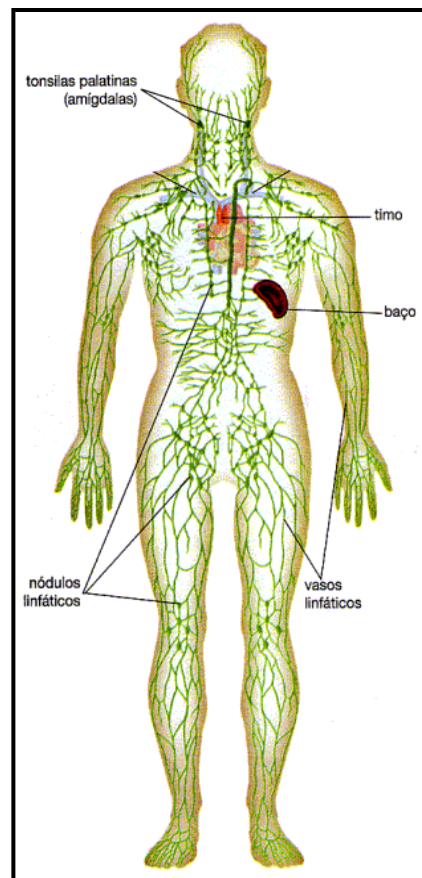


FIGURA 1 - Desenho esquemático do sistema linfático humano (Sistema Linfático, 2010).

3.2 Considerações sobre anticorpos

Anticorpos ou Imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas (proteína que contém um grupo carboidrato) responsáveis pela resposta imunológica humoral. Elas constituem até 30% do total das proteínas do plasma e são produzidas por linfócitos/células B (Nelson et al., 2002).

Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgM, IgG, IgE, IgA e IgD, no entanto,

a grande maioria dos anticorpos de interesse para radioimunodiagnóstico e radioimunoterapia são as IgGs, sendo esta, predominante no sangue (Zalutsky et al., 2003b).

3.2.1 Arquitetura do anticorpo

As IgGs possuem quatro cadeias, sendo duas cadeias polipeptídicas pesadas (H, do inglês *heavy*) idênticas e duas cadeias leves (L, do inglês *light*) também idênticas. Esta estrutura se mantém unida por pontes de dissulfeto e interações não covalentes. As cadeias pesadas possuem peso molecular de aproximadamente 50 kDa e contém cinco domínios: V_H , C_{H1} , região da dobradiça H (do inglês *hinge*), C_{H2} e C_{H3} . As cadeias leves possuem peso molecular de aproximadamente 25 kDa e são compostas pelos domínios V_L e C_L (Walsh, 2003 ; Zalutsky et al., 2003b).

O tratamento com certas enzimas proteolíticas (por exemplo, a papaína) causa quebra da imunoglobulina na região da dobradiça, resultando em dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *antigen-binding fragments*) e um fragmento constante (Fc) (Walsh, 2003).

As porções variáveis (V) controlam a ligação do anticorpo aos seus antígenos, sendo a especificidade dessas reações determinada por apenas alguns aminoácidos presentes nestas regiões. Por outro lado, a porção constante (C) não está envolvida no reconhecimento do antígeno e as sequências de aminoácidos desta região são específicas para cada subclasse de anticorpos. Há quatro subclasses de IgG humano (IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 e IgG_4) que diferem na sequência de aminoácidos de suas regiões Fc (domínios C_{H2} e C_{H3}). Para a IgG_1 , as cadeias pesadas e leves são compostas por 450 e 212 resíduos de aminoácidos, respectivamente (Zalutsky et al., 2003b).

Os fragmentos Fv são formados pelos domínios V_H e V_L (domínios responsáveis pela ligação ao antígeno) e podem ser facilmente produzidos por tecnologia de DNA recombinante.

O grupo carboidrato se liga à cadeia pesada (geralmente no domínio C_{H2}) por

uma ligação N-glicosídica. A remoção do grupo carboidrato não afeta a ligação ao antígeno, mas afeta várias funções efetoras do anticorpo e altera seu tempo de meia-vida no sangue (Walsh, 2003).

Na FIG. 2, observam-se os componentes estruturais da imunoglobulina citados acima.

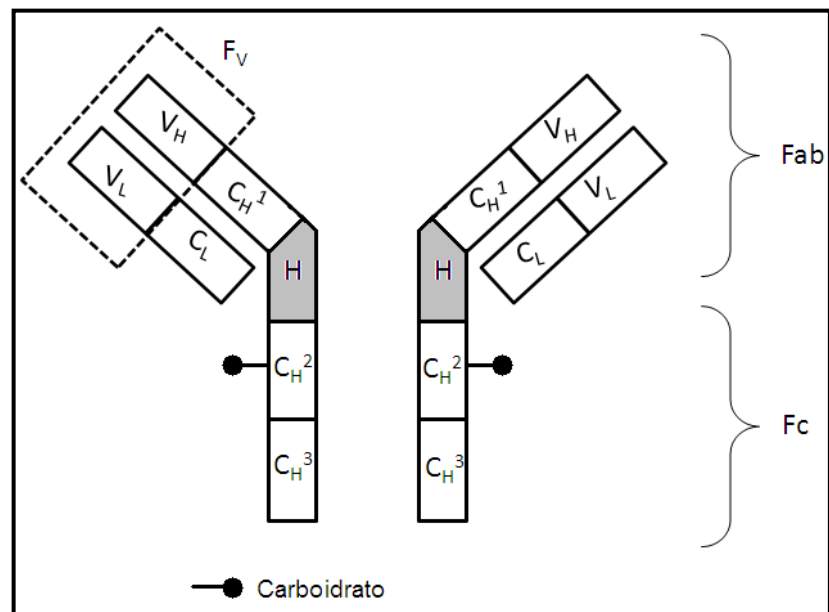


FIGURA 2 - Representação estrutural da imunoglobulina. Região em destaque corresponde à região da dobradiça (reproduzido de Walsh, 2003).

3.2.2 Anticorpos policlonais

Preparações de anticorpos policlonais têm sido usadas por muitas décadas para induzir uma imunização passiva contra agentes infecciosos. Estes anticorpos são administrados geralmente por injeção intravenosa. Enquanto conferem uma proteção imunológica imediata, seu efeito é transitório, geralmente persistindo por somente duas ou três semanas. A imunização passiva pode ser usada profilaticamente ou terapêuticamente, como por exemplo, a administração de anticorpo antiveneno após o indivíduo ser mordido por uma cobra (Walsh, 2003).

Estas preparações de anticorpos podem ser obtidas de origem animal ou humana. Preparações de origem animal são comumente chamadas de antissoros, ao passo que as originadas de humano são chamadas de “preparações imunoglobulínicas” (ou preparações de imunoglobulinas). Nos dois casos, o tipo de anticorpo presente, predominante, é a imunoglobulina G (IgG).

Antissoros são comumente produzidos por imunização de animais sadios (por exemplo, cavalos) com o antígeno apropriado. Pequenas amostras de sangue são retiradas, regularmente, do animal e analisadas quantitativamente para verificar a presença dos anticorpos de interesse. Isso facilita a coleta do sangue nos momentos mais adequados. Animais grandes, como os cavalos, podem suportar a retirada de 1 a 21 L de sangue a cada 10-14 dias e os níveis de anticorpos são geralmente mantidos por administrações subsequentes de antígenos. O sangue é então coletado e a fração do anticorpo é purificada do plasma ou soro (Walsh, 2003).

Embora anticorpos heterólogos sejam de grande importância no tratamento de várias condições médicas, eles podem induzir efeitos indesejáveis. Entre estes efeitos, destaca-se sua habilidade de induzir reações de hipersensibilidade, como a anafilaxia (Walsh, 2003).

3.2.3 Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais (Acm) são produzidos pela imunização de camundongos com o antígeno desejado. A tecnologia de produção destes anticorpos foi desenvolvida em meados de 1970, quando Kohler e Milstein fundiram com sucesso células imortalizadas de mieloma com linfócito B produtor de anticorpo (Walsh, 2003).

Em poucas palavras, quando um antígeno entra em contato com o corpo, produz uma resposta imune. O principal elemento desta resposta implica na ativação do linfócito B produtor de anticorpos capazes de reconhecer o antígeno (resposta imune humoral). O anticorpo se ligará a uma região específica do antígeno, chamada epítipo. Muitos antígenos possuem centenas de milhares de diferentes epítipos. O anticorpo específico para cada epítipo é produzido por um clone de linfócitos B diferente. Se este

linfócito B for isolado e cultivado *in vitro*, têm-se uma fonte produtora de anticorpos monoclonais (monoespecífico). No entanto, linfócitos B morrem quando cultivados *in vitro*.

Para contornar este aspecto, fundem-se os linfócitos B às células transformadas (mieloma). Muitas das células híbridas resultantes imortalizam suas características, enquanto produzem grandes quantidades do anticorpo monoespecífico (Walsh, 2003).

3.2.3.1 Tipos de anticorpos monoclonais

Como citado anteriormente, os Acm são gerados por meio da imunização de camundongos, isto faz com que muitos pacientes desenvolvam uma resposta imunológica a estas proteínas murínicas, comprometendo sua utilização em certas aplicações (Zalutsky, 2003b). Em muitos casos, uma simples administração do Acm murínico pode induzir uma resposta imune em 50 - 80% dos pacientes. Esta resposta imune à Acm murínicos chama-se resposta HAMA (do inglês *Human anti-mouse antibodies*) e pode ser detectada dentro de 14 dias após a administração do Acm aumentando significativamente após repetidas administrações. A resposta HAMA destrói os Acm administrados em doses subsequentes e na prática a eficácia terapêutica dos Acm murínicos é limitada à primeira ou no máximo à segunda administração (Zalutsky et al., 2003b; Walsh, 2003).

Dois tipos de Acm foram desenvolvidos com o intuito de minimizar estes problemas: anticorpos quiméricos e humanizados.

Acms quiméricos são construídos por engenharia genética, combinando-se os domínios V de Acm murínicos com os domínios C de moléculas IgG humanas. Acms humanizados contém somente os resíduos de aminoácidos (de origem murínica) dos domínios V, envolvidos no reconhecimento do antígeno (Zalutsky et al., 2003b).

Com estas modificações houve redução da imunogenicidade, já que somente uma pequena parte destes Acm é de origem murínica. Além disso, a resposta HAMA está

normalmente relacionada à porção Fc, que no caso destes dois Acm são formadas por moléculas de IgG humana (Walsh, 2003).

Embora, estes Acm apresentem menor imunogenicidade, seu tempo de residência na circulação humana é muito maior que seus homólogos murínicos (em virtude de sua porção Fc humana). Por esta razão, o radionuclídeo ideal e o método de radiomarcção podem variar dependendo do tipo do Acm (Zalutsky et al., 2003b).

A nomenclatura padrão para os Acm segue as seguintes regras: o sufixo genérico para nomear um Acm é “mab”. Acm murínicos são “momab”; as moléculas quiméricas são “ximab” e as moléculas humanizadas são “zumab” (FIG. 3). Quando o Acm é direcionado a um antígeno tumoral, utiliza-se a sílaba “tu” antes do sufixo (tumomab, tuximab e tuzumab) (Goldsmith, 2010).

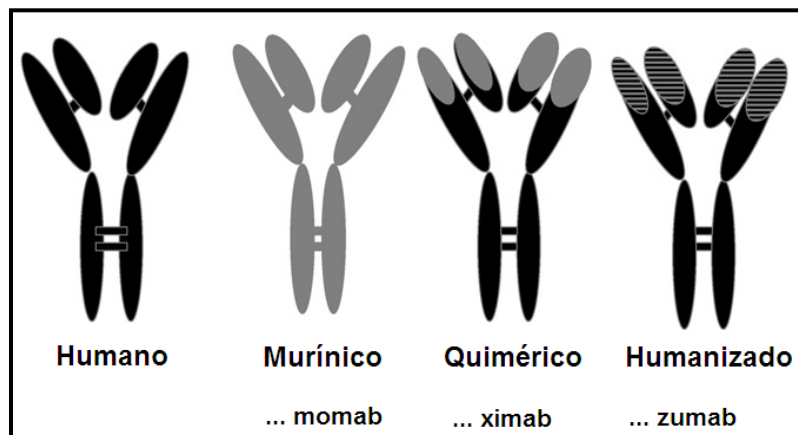


FIGURA 3 - Estrutura esquemática dos tipos de anticorpos monoclonais e nomenclatura indicativa da origem (adaptado de Goldsmith, 2010).

3.3 Neoplasias

Nos organismos multicelulares, a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a sua replicação dentro de estreitos limites que mantém a população normal em níveis homeostáticos. A replicação celular é atividade essencial para o organismo, já que na maioria dos tecidos e órgãos ocorre divisão celular contínua para restaurar as perdas decorrentes do processo de envelhecimento. No entanto, ela deve seguir o controle

rígido imposto ao sistema, pois se feita para mais ou para menos o equilíbrio se quebra. Uma das características principais das células neoplásicas é sua proliferação descontrolada (Robbins, 1969; Brasileiro Filho et al., 1998).

Em geral, existe correlação inversa entre diferenciação e multiplicação celular. Quanto mais avançado ou complexo é o estado de diferenciação, menor é sua taxa de reprodução. Assim se entende que, nas neoplasias, em geral, ocorre paralelamente ao aumento do crescimento, perda da diferenciação celular (Brasileiro Filho et al., 1998).

A proliferação celular, em condições normais, é uma atividade complexa e depende da atuação coordenada dos produtos de vários genes, os quais controlam o processo em resposta aos estímulos internos e externos. Quando a célula neoplásica sofre alteração intrínseca nos seus mecanismos regulatórios de multiplicação, adquire autonomia de crescimento e se torna independente dos controles externos (Robbins, 1969; Brasileiro Filho et al., 1998).

Portanto, as neoplasias podem ser entendidas como proliferações anormais de células que têm crescimento autônomo e tendem a perder sua diferenciação.

O termo neoplasia significa literalmente o processo de um “novo crescimento”. Na prática, as neoplasias são chamadas de *tumores*, que significa qualquer lesão ou intumescimento localizado. O termo *câncer* é a tradução latina da palavra grega carcinoma (*karkinos* = crustáceo, carangueijo). Foi utilizado pela primeira vez para indicar um tumor maligno de mama em que as veias superficiais desse órgão eram túrgidas e ramificadas, lembrando um carangueijo. Hoje, trata-se de um termo comum para todos os tumores malignos (Brasileiro Filho et al., 1998).

Os tumores podem ser classificados de acordo com diversos critérios: (1) pelo comportamento clínico e evolução (benigno ou maligno); (2) pelo aspecto microscópico (critérios histomorfológicos); (3) pela origem da neoplasia (critério histogenético).

Embora as **neoplasias benignas** não representem grandes problemas para seus portadores, possuem grande interesse prático em razão de sua frequência e pelas consequências que podem gerar. Neste tipo de tumor, as células crescem unidas entre si,

não infiltram nos tecidos vizinhos e formam uma massa geralmente esférica. Este crescimento é chamado de expansivo e provoca compressão nas estruturas adjacentes. Por ser um tumor de crescimento lento (baixo índice mitótico), os vasos sanguíneos crescem adequadamente, conferindo boa nutrição às células. Com isso, necroses, degenerações e hemorragias são pouco comuns. O tumor pode ser removido completamente por cirurgia e em geral não recidivam (Robbins, 1969; Brasileiro Filho et al., 1998).

Já as células das **neoplasias malignas** têm propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais diferentes. Como há um alto índice mitótico, seu crescimento é usualmente rápido, ao contrário dos estromas e vasos sanguíneos, isso resulta muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações. Nas células cancerosas há um aumento da relação núcleo/citoplasma e uma hiper cromasia nuclear (cromatina irregular e mais compacta). O citoplasma também se altera, havendo geralmente variações pronunciadas no volume e forma das células (pleomorfismo celular). As células cancerosas apresentam atipias variadas em razão da perda da diferenciação celular. Essas atipias podem ser desde discretas até muito intensas; neste caso perdem seus aspectos morfológicos específicos (Robbins, 1969; Brasileiro Filho et al., 1998).

As células cancerosas apresentam também alterações importantes na membrana plasmática, que as tornam menos aderentes entre si e facilitam seu deslocamento da colônia neoplásica. Com isso, elas podem, tanto movimentarem-se, quanto infiltrarem-se em tecidos adjacentes, penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos e, a partir deles, migrar para locais distantes. Devido ao crescimento infiltrativo, os limites do câncer com as estruturas adjacentes são pouco definidos e, como consequência, a remoção completa do tumor muitas vezes torna-se difícil. Em muitos casos, em torno da lesão principal existem ilhotas ou cordões de células neoplásicas que se proliferam, podendo dar origem a novos tumores. Mesmo retirando-se certa quantidade dos tecidos normais (margem de segurança), ainda assim, o câncer tem tendência à recidiva.

A propriedade mais importante das células malignas é justamente a sua capacidade de invadir localmente, de ganhar uma via de disseminação, de chegar a sítios distantes e de neles originar novos tumores, denominados *metástases*. A formação de

metástases é um processo complexo que depende de inúmeras interações entre células malignas e componentes do hospedeiro. Dele, participam diversos produtos gênicos, sobretudo moléculas de adesão, enzimas hidrolíticas e fatores envolvidos na formação de vasos (Brasileiro Filho et al., 1998).

3.3.1 Linfomas

As transformações neoplásicas dos linfonodos são conhecidas pela designação genérica de linfomas. São morfológicamente divididos em Linfomas de Hodgkin (LH) e Linfoma não-Hodgkin (LNH) (Robbins, 1969; Araújo et al, 2008).

3.3.1.1 Linfoma de Hodgkin ou Doença de Hodgkin

O LH surge em um único gânglio ou cadeia de gânglios e se propaga caracteristicamente aos gânglios vizinhos. Morfológicamente, se caracteriza pela presença de células gigantes, muito típicas, as *células de Reed-Sternberg* (FIG. 4). Estas células possuem aspectos característicos: são binucleadas com nucléolos grandes e eosinófilos, dando o clássico aspecto de olho-de-coruja (Robbins, 1969).

Essa doença apresenta-se em duas faixas de idade, sendo o primeiro pico de incidência na terceira década de vida e o outro, após a quinta década de vida. A incidência nos países subdesenvolvidos é menor que nos países industrializados, mas nota-se uma maior incidência de casos em idade menor que 15 anos nos países subdesenvolvidos. A prevalência é maior nas pessoas de raça branca e do sexo masculino (Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2010).

Vários fatores estão associados à etiologia do LH; a infecção pelo vírus Epstein-Barr (causador da mononucleose), é um desses fatores. Há também uma predisposição genética, demonstrada pela maior tendência dos judeus a desenvolver a doença e pela maior incidência entre filhos e parentes próximos. Alguns fatores de exposição ambiental podem influenciar, não obstante, tais fatores ainda são passíveis de comprovação (Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2010).

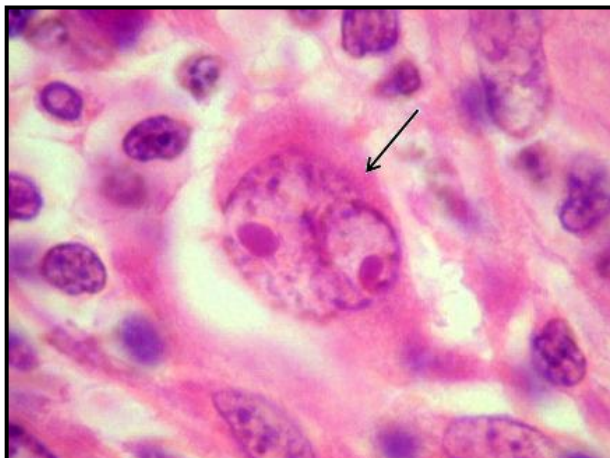


FIGURA 4 - Células de Reed-Sternberg em destaque (Unicamp, 2010).

3.3.1.2 Linfoma não-Hodgkin

Assim como o linfoma de Hodgkin, o NHL geralmente se origina em tecidos linfóides e pode se espalhar para outros órgãos. O NHL, entretanto, é muito menos previsível do que o LH e frequentemente se dissemina a sítios extranodais. O prognóstico depende do tipo histológico, estadiamento e tratamento (National Cancer Institute, 2010).

Os LNH podem ser divididos em indolentes (baixo grau) e agressivos (alto grau). Os indolentes, que correspondem a 40% dos diagnósticos, possuem baixo índice de proliferação celular, células de tamanho pequeno, formação de grandes massas linfonodais, envolvimento frequente de medula óssea e de sítios extranodais. Paradoxalmente, são tumores de baixa agressividade, com sobrevida de anos mesmo sem tratamento específico, mas geralmente são incuráveis. Por outro lado, linfomas de alto grau, que representam 60% dos diagnósticos, apresentam alto índice de proliferação celular, células grandes, linfonodomegalias localizadas e como possuem alta agressividade, levam a óbito rapidamente se não tratados, no entanto, são mais curáveis (Araújo et. al, 2008; National Cancer Institute, 2010; INCA, 2010b).

São considerados LNH de alto grau o linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LNHDGCB), o linfoma folicular pouco diferenciado (grau 3), o linfoma de células

do manto, o linfoma de células T periférico, o linfoma de grandes células anaplásico e o linfoma de Burkitt (Araújo et al., 2008).

Os tipos mais comuns de LNH de baixo grau são: linfoma folicular, linfoma de pequeno linfócito, linfoma múltiplo, linfoma de células do manto e linfomas da zona marginal (MALT) (DeNardo et al., 2010).

3.4 Imunoterapia

O uso de anticorpos monoclonais como agente terapêutico para câncer tem sido amplamente explorado. Diferentemente da quimioterapia (e até certo grau da radioterapia), os Acm se ligam especificamente às células tumorais. Esta especificidade permite a morte de células malignas e preservação dos tecidos normais (Press et al., 2001).

Estes Acm, quando ligados ao antígeno, desencadeiam uma série de mecanismos que levam à morte da célula ou induzem uma resposta imune secundária contra estas células tumorais (Press et al., 2001).

O primeiro uso bem sucedido de anticorpos no tratamento de câncer foi demonstrado em linfoma, e estes agentes têm sido utilizados para beneficiar milhares de pacientes com LNH. Os resultados promissores abriram caminho para a avaliação desta modalidade terapêutica em outros tipos de tumores malignos, incluindo leucemias e tumores sólidos (Press et al., 2001).

A escolha do antígeno é de extrema importância para a imunoterapia. Deseja-se que este alvo esteja presente em grande quantidade nas células tumorais para que a toxicidade seja diminuída nas células normais (Press et al., 2001).

3.4.1 Antígeno CD20

O antígeno CD20 é amplamente utilizado no tratamento de diferentes linfomas. Ele foi descoberto por Nadler e colaboradores em 1981 (Pescovitz, 2006). É uma

fosfoproteína transmembranar hidrofóbica de peso molecular aproximado de 35 kDa, envolvida na ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B e possivelmente funcione como um canal de cálcio. Este antígeno é expresso na maioria das células B de LNH, mas não é encontrado em células tronco, pré-células B, células normais do plasma e em outros tecidos normais. Não é eliminado da superfície da célula e não sofre internalização quando ligado a anticorpos. Sua forma livre não é encontrada na circulação sanguínea; deste modo, uma droga que se ligue a este antígeno, não será neutralizada antes de se ligar à sua célula alvo (Hernandez, et al., 2004; Pescovitz, 2006; Du, et al., 2007; Stigbrand et al., 2010a).

Observa-se na FIG. 5 um esquema da expressão do antígeno CD20 e sua ligação ao anticorpo monoclonal rituximab.

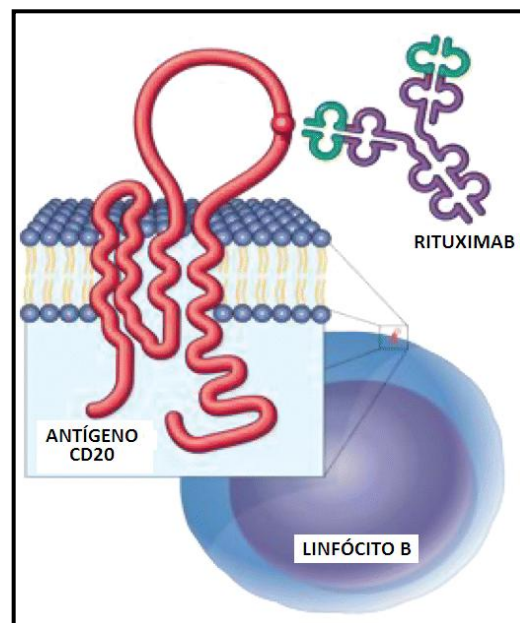


FIGURA 5- Antígeno CD20 expresso em linfócitos B e rituximab (adaptado de Pescovitz, 2006).

3.4.2 Rituximab

Rituximab é um anticorpo monoclonal (IgG₁) anti-CD20 quimérico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de LNH de células B recidivos

ou refratários (resistentes). Ele possui uma afinidade de ligação ao antígeno CD20 de aproximadamente 8 nM, o qual é similar ao anticorpo murínico pai, 2B8 (Pescovitz, 2006).

Este Acm liga-se a 95% das células B e 90% das células B de LNH iniciando reações imunológicas que levam à lise celular (DeNardo et al., 2006; DeNardo et al., 2010). Os possíveis mecanismos de ação para a lise celular são citotoxicidade complemento dependente (CDC), citotoxicidade celular anticorpo dependente (ADCC) e indução da apoptose (FIG. 6) (DeNardo et al., 2006; Pescovitz, 2006).

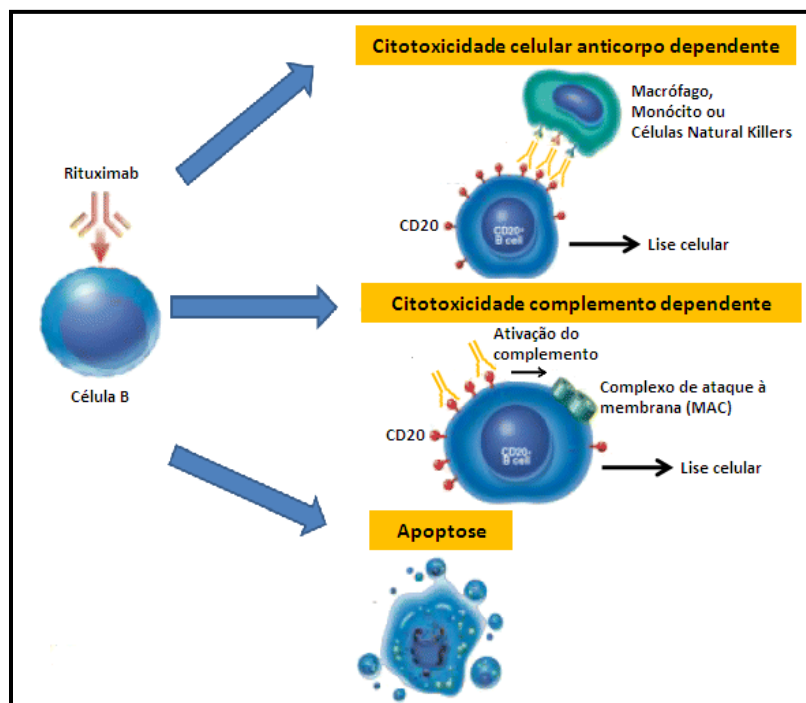


FIGURA 6 - Mecanismos de ação do rituximab (adaptado de Pescovitz, 2006).

A eliminação do Ac é provavelmente pelo sistema reticuloendotelial via fagocitose e metabolismo. A meia vida ($t_{1/2}$) do rituximab aumenta conforme o número de doses administradas; uma dose inicial de 375 mg/m² produz uma $t_{1/2}$ média de 60 horas aumentando para 174 horas após a quarta dose. É possível detectá-lo no soro por 3-6 meses após a última infusão (Schott, 1998; Press et al., 2001).

Um estudo com pacientes portadores de LNH refratário e LNH folicular de baixo grau, recebendo dose de rituximab de 375 mg/m²/semana por 4 semanas,

apresentou taxa de remissão global (TRG) e remissão completa (RC) de 48% e 6% respectivamente.

Em um estudo com 54 pacientes com LNH difuso de grande célula B (muitos sem tratamento prévio), administrou-se rituximab por 8 semanas. Observou-se TRG de 31% e RC de 9%, com tempo médio de evolução de 246 dias. Outro grupo de pacientes portadores de linfoma de células do manto (sem tratamento prévio), apresentou TRG de 34% e RC de 14% e um tempo médio de evolução de 7 meses (Press et al., 2001).

Devido ao seu mecanismo de ação não ser muito diferente dos fármacos quimioterápicos, entendeu-se que o uso combinado do rituximab com a quimioterapia convencional (CHOP – ciclofosfamida, hidroxirubicina, oncovin e prednisona), potencializaria o efeito do tratamento (Press et al., 2001). Isto foi confirmado com diversos estudos; um deles, realizado com pacientes portadores de LNH agressivos, apresentou uma melhora na taxa de sobrevivência destes pacientes e aumento da taxa de RC quando comparado com a quimioterapia convencional (76% contra 63% respectivamente) (DeNardo et al., 2010).

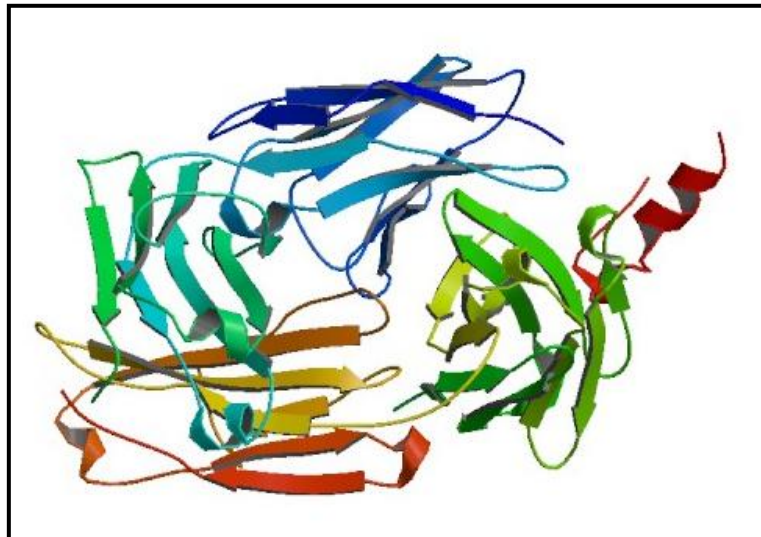


FIGURA 7 - Estrutura da porção Fab do rituximab (Du et al., 2007).

3.5 Radioimunoterapia

Uma forma potente de aumentar o poder citotóxico dos Acms é conjugá-los à radionuclídeos, formando radioimunoconjugados. A esta modalidade médica, dá-se o nome de Radioimunoterapia (RIT) (DeNardo et al., 2006).

RIT usa radionuclídeos diretamente conjugados a anticorpos para se ligar aos antígenos tumor-específico, combinando os princípios do tratamento sistêmico com a deposição da radiação no local de interesse, poupando os tecidos saudáveis (Hernandez et al., 2004; Rasaneh, et al., 2009; Orcutt et al., 2011).

Em virtude da alta radiosensibilidade dos linfomas, a RIT é uma técnica promissora para tratamento de LNH recorrentes e refratários (Hernandez et al., 2004; Kersten, 2011). No entanto, RIT não apresenta muito sucesso no tratamento de tumores sólidos. Isso se deve ao baixo coeficiente de permeabilidade dos anticorpos nestes tumores, sendo necessária uma dose muito maior de Acm para haver penetração nos mesmos (Orcutt et al., 2011).

O primeiro estudo publicado utilizando radioimunoconjugados para tratar LNH foi realizado por Gerald e Sally DeNardo em 1987. Eles radiomarcaram o Acm Lym-1 com ^{131}I e observaram resultados objetivos em aproximadamente metade dos pacientes tratados (DeNardo et al., 1987; Kersten, 2011).

Desde então, inúmeros ensaios clínicos têm sido conduzidos, a maioria mostrando atividade antitumoral em pacientes em diversos estágios da doença (Akanji, 2007).

O FDA aprovou o uso de diversos Acm para diagnóstico e terapia de doenças malignas (TAB. 1) (Stigbrand et al., 2010b). Dentre eles, há dois radioimunoconjugados para tratamento de LNH: tositumomab- ^{131}I (Bexxar®) e ibritumomab tiuxetan- ^{90}Y (Zevalin®), ambos são Acm de origem murínica e se ligam ao antígeno CD20.

Os dois anticorpos radiomarcados promoveram melhora significativa nos pacientes tratados, muitas vezes com remissão completa da doença por muitos meses ou até anos. Esses radiofármacos foram inicialmente utilizados em pacientes com LNH

recidivos ou refratários, apresentando excelentes resultados quando usados como parte inicial de um protocolo de tratamento. A taxa de remissão total foi de 80 a 100% em muitos estudos (Goldsmith, 2010).

A administração tanto do Bexxar[®], quanto do Zevalin[®], requer uma pré-infusão de Acm não radiomarcado (“frio”). É utilizado rituximab no protocolo do Zevalin[®] e tositumomab no protocolo do Bexxar[®]. Muitos estudos pré-clínicos e clínicos mostraram que a pré-dose com Acm não radiomarcado otimiza a subsequente biodistribuição do Acm radiomarcado. Isso porque o Acm frio se liga aos linfócitos B circulante e as células do sistema reticuloendotelial (principalmente no baço). Esse bloqueio dos receptores faz com que haja maior captação tumoral do Acm radiomarcado administrado em seguida, bem como menor captação nos órgãos não-alvo (Hernandez et al., 2004; DeNardo et al., 2006).

Estudos pré-clínicos radiomarcando rituximab com ⁶⁷Ga, ¹⁷⁷Lu via quelante bifuncional DOTA também foram publicados e todos demonstraram resultados promissores (Jalilian et al., 2008; Forrer et al., 2009).

Apesar da RIT apresentar melhores resultados em tumores hematológicos, várias frentes de pesquisa têm estudado a aplicação desta técnica em tumores sólidos. É o caso de Mohsin e colaboradores (2006) que radiomarcaram o Acm CC49, um anti-TAG-72, com diferentes radionuclídeos e observaram uma alta captação tumoral e uma biodistribuição muito favorável em camundongos *Nude* implantados com carcinoma de cólon. Resultados animadores também foram obtidos por Lee e colaboradores (2009) ao radiomarcarem o Acm VEGFR 1 com ¹⁷⁷Lu, afim de obter um traçador molecular de angiogênese.

TABELA 1 – Anticorpos aprovados pelo FDA para diagnóstico ou tratamento de doenças malignas.

Nome genérico	Nome comercial	Tipo/antígeno alvo	Indicação	Aprovação
<i>Não-conjugados</i>				
Rituximab	Rituxan	Quim./Anti-CD20	Linfoma de células B	1997
Trastuzumab	Herceptin	Hum./Anti-HER2	Mama	1998
Alemtuzumab	CamPath	Hum./Anti-CD52	LLC	2001
Cetuximab	Erbix	Quim./Anti-EGFR	Colorectal	2004
Bevacizumab	Avastin	Quim./Anti-VEGF	Cabeça/pescoço	2006
			Colorectal	2006
<i>Radioconjugados</i>				
Satamomab pentedide	OncoScint	Mur./ anti-TAG72- ¹¹¹ In	Colorectal e ovário	1992
Nofetumomab merpentan	Verluma	Mur./ anti-EGP- ^{99m} Tc (Fab)	CPPC	1996
Arcitumomab	CEA-Scan	Mur./ anti-CEA- ^{99m} Tc (Fab)	Colorectal	1996
Capromab pentedide	ProstaScint	Mur./ anti-PSMA- ¹¹¹ In	Próstata	1996
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	Mur./anti-CD20- ⁹⁰ Y	Linfoma de células B	2002
Tositumomab	Bexxar	Mur./anti-CD20- ¹³¹ I	Linfoma de células B	2003
<i>Conjugados com droga</i>				
Gentuzumomab ozogamicina	Mylotard	Hum./Anti-CD33	LMA	2000

LLC = leucemia linfocítica crônica; CPPC = câncer de pulmão pequena célula; LMA = leucemia mielóide aguda; Mur. = anticorpo murínico; Quim. = anticorpo quimérico; Hum. = anticorpo humanizado. (Fonte: Stigbrand et al., 2010b)

Um Acm humanizado muito estudado atualmente é o trastuzumab (Herceptin®) utilizado para tratamento de câncer de mama. Em um dos estudos, pesquisadores o radiomarcaram com ^{177}Lu e obtiveram alta estabilidade do produto, imunorreatividade apropriada para estudos *in vivo*, alta citotoxicidade, quando comparado ao Acm frio e alta captação tumoral. Estes resultados o tornam um forte candidato à estudos clínicos (Rasaneh et al., 2009; Rasaneh et al., 2010a; Rasaneh et al., 2010b).

Wong e colaboradores (2010) por sua vez, radiomarcaram o trastuzumab com ^{111}In com o objetivo de desenvolver um radiofármaco para monitoração terapêutica.

O sucesso da utilização de anticorpos monoclonais radiomarcados é tão grande que dois outros anticorpos possuem aprovação do FDA para uso em diagnóstico médico não oncológico: imicromab-pentetate- ^{111}In (MyoScint®, aprovado em 1996) para infarto do miocárdio e fanolesomab- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (NeuroSpec®, aprovado em 2004) para apendicite (Boswell et al., 2007).

3.6 Escolha do radioisótopo

A seleção do radionuclídeo para uso em RIT é baseada em seu perfil de emissão, energia particulada, penetração média nos tecidos e meia-vida física (Hernandez et al., 2004).

A principal pré-condição para uma radioimunoterapia de sucesso é a entrega de uma alta dose de radiação às células tumorais e uma baixa dose nos tecidos saudáveis. Isto define a principal exigência para um radionuclídeo: a energia emitida durante seu decaimento deve ser depositada localmente, e a irradiação do corpo inteiro deve ser a menor possível. Para atender estas exigências, o radionuclídeo deve ter as seguintes propriedades (Zalutsky et al., 2003b; Tolmachev, 2010):

- ✓ Deve emitir radiação particulada: partículas α ou β , elétrons de conversão e/ou elétrons Auger em abundância suficiente para exercer ação citotóxica;
- ✓ Alta energia gama é indesejável, uma vez que irradia o restante do corpo, no

entanto, baixa abundância de fótons com energia entre 100 – 200 KeV pode ser uma vantagem para dosimetria por imagem e monitoramento da terapia;

- ✓ Uma meia-vida de 1 a 14 dias, dependendo da farmacocinética do agente carreador, tende a ser ótima;

- ✓ Possibilidade de produção do radionuclídeo em quantidade suficientemente alta de radioatividade e com atividade específica adequada;

- ✓ As propriedades químicas do radionuclídeo devem permitir altos rendimentos de marcação de proteínas e peptídeos e fornecer um conjugado que seja estável na circulação sanguínea;

- ✓ Os radiocatabólitos devem ser rapidamente excretados do corpo, sem se acumular em grande quantidade nos tecidos ou órgãos normais (Tolmachev, 2010).

Radionuclídeos que decaem por emissão de partículas β^- foram os primeiros a serem utilizados em pacientes para terapia radionuclídica (Zalutsky, 2003a).

Na TAB. 2 são mostradas as características nucleares dos principais radioisótopos beta-emissores utilizados em terapia.

TABELA 2 - Propriedades nucleares de alguns radionuclídeos beta-emissores utilizados em terapia radionuclídica.

Nuclídeo	Meia-vida (dias)	Energia β média (MeV)	Alcance médio (mm)	Fótons (KeV)
<i>Beta emissores de alta energia</i>				
¹⁸⁸ Re	0,71	0,764	3,5	155 (15%)
¹⁸⁸ Ho	1,1	0,666	3,2	80,5 (6,7%)
⁹⁰ Y	2,7	0,935	3,9	-
⁷⁶ As	1,1	1,0	5,0	599 (45%) 657 (6,2%)
<i>Beta emissores de energia média</i>				
⁷⁷ As	1,6	0,228	1,2	-
¹⁵³ Sm	1,9	0,229	1,2	103 (30%)
¹⁸⁶ Re	3,7	0,362	1,8	137 (9,4%)
<i>Beta emissores de energia baixa</i>				
⁶⁷ Cu	2,6	0,141	0,71	91 (7%) 93 (16%) 185 (49%)
¹³¹ I	8,0	0,181	0,91	364 (82%)
¹⁶¹ Tb	6,9	0,154	0,77	75 (10%)
¹⁷⁷ Lu	6,7	0,133	0,67	113 (6,2%) 208 (10,4%)

Fonte: Tolmachev, 2010.

3.6.1 Lutécio-177 (¹⁷⁷Lu)

O lutécio ocorre na natureza como óxido de lutécio-175. O ¹⁷⁷Lu é o isótopo radioativo produzido em reatores de alto fluxo por meio do bombardeamento de um alvo enriquecido em óxido de lutécio-176 (71%), comercialmente disponível. A produção de ¹⁷⁷Lu livre de carreador também é possível e é recomendável para aplicações médicas que exijam alta atividade específica da molécula a ser radiomarcada. Nesse caso o radioisótopo é produzido a partir da reação ¹⁷⁶Yb(n, γ)¹⁷⁷Yb (T_{1/2} 1,9 h). O ¹⁷⁷Yb decai por emissão de radiação β^- para ¹⁷⁷Lu. A separação desses dois radioisótopos, por sua vez, é feita em duas etapas (Zalutsky, 2003a, Pujatti, 2009).

Recentemente, o ^{177}Lu emergiu como um agente β^- emissor muito promissor para a terapia radioisotópica (Zalutsky, 2003a). Esse crescente uso atribui-se às propriedades físicas e químicas desse radioisótopo (Pujatti, 2009). Ele é um radiolantanídeo com 6,7 dias de meia-vida, possui energia β^- máxima de 498 KeV que fornece um alcance médio de 670 μm , o qual é ideal para destruir pequenos tumores malignos e causar pouco dano às células sadias (Zalutsky, 2003a). Outra vantagem do ^{177}Lu é a baixa exposição aos raios gama, devido à baixa energia de emissão: 112,9 KeV e 208 KeV. Essa emissão gama permite que moléculas marcadas com esse radioisótopo sejam utilizadas como ferramentas no diagnóstico por imagem e dosimetria (Mikolajczak et al., 2003; Nir-El, 2004; Forrer et al., 2009; Hens et al., 2009).

O potencial terapêutico do ^{177}Lu vem sendo avaliado em conjunto com diversas moléculas carreadoras, como é o caso de vários análogos da bombesina que foram radiomarcados com este radioisótopo em um estudo pré-clínico e apresentaram considerável potencial terapêutico (Pujatti et al., 2008).

3.6.1.1 Métodos de marcação com Lu-177

O ^{177}Lu , assim como a maioria dos radionuclídeos, possui uma natureza metálica o que o torna tipicamente incapaz de formar ligações covalentes estáveis com elementos presentes em proteínas e peptídeos. Por esta razão, radiomarcações de proteínas e peptídeos com metais radioativos são realizada com o uso de quelantes, os quais formam compostos não covalentes com o radiometal (Tolmachev, 2010).

Para ser usado para radiomarcação, o quelante deve ser bifuncional, ou seja, conter uma parte quelante, para se ligar ao radiometal, e outra para se ligar ao grupo funcional disponível em proteínas e peptídeos. Muito frequentemente usa-se ligação em grupamentos amino como é o caso dos resíduos de lisina ou por meio de ligação ao grupo tiol das cisteínas (Mäcke et al., 2003, Zalutsky et al., 2003b, Mohsin et al., 2006).

Esta conjugação pode ser feita de duas formas: pré-marcação e pós-marcação. A pós-marcação inclui a conjugação do quelante à proteína ou peptídeo e só então a molécula é radiomarcada. Já na pré-marcação, o quelante é primeiramente radiomarcado

com o radiometal e então conjugado à proteína. A desvantagem desta técnica é o baixo rendimento radioquímico quando comparado com a pós-marcação. Por esta razão ela somente é utilizada quando as condições de quelação são tão severas (como temperaturas altas e pHs extremos) que podem causar danos ao peptídeo ou proteína (Mäcke et al., 2003; Tolmachev, 2010).

3.6.1.1.1 Quelantes bifuncionais macrocíclicos

Há muitas exigências para um quelante bifuncional. Um quelante bifuncional deve formar um quelato com o metal com alta estabilidade termodinâmica, bem como ter uma cinética inerte a pH entre 5 e 7,5. Alta estabilidade termodinâmica é necessária para que não haja perda do radiometal e este cause efeitos indesejáveis por acúmulo em órgãos não-alvo. Isso é particularmente importante quando o radiometal é altamente tóxico, como o ^{177}Lu , ^{90}Y ou ^{153}Sm que se acumulam nos ossos e podem causar danos à medula óssea. Os quelantes bifuncionais competem frequentemente com quelantes naturais presentes na corrente sanguínea, como por exemplo, a transferrina (Mäcke et al., 2003).

Uma cinética inerte é importante porque este fator reflete a razão de dissociação do íon metálico do quelante bifuncional. Uma rápida cinética de dissociação é frequentemente observada em quelantes acíclicos (como o DTPA), levando a uma baixa estabilidade *in vivo*. Complexos baseados em estruturas macrocíclicas geralmente apresentam uma maior estabilidade (Mäcke et al., 2003).

Infelizmente, quelantes bifuncionais macrocíclicos requerem condições de radiomarcção extremas, como alta temperatura, para se obter alto rendimento radioquímico. Temperaturas elevadas podem ser prejudiciais à proteína, devido ao desdobramento da mesma e conseqüente perda da imunorreatividade (Mäcke et al., 2003; Cooper et al., 2006).

Uma das estruturas macrocíclicas mais populares para o desenvolvimento de quelantes bifuncionais é o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético) (FIG. 7).

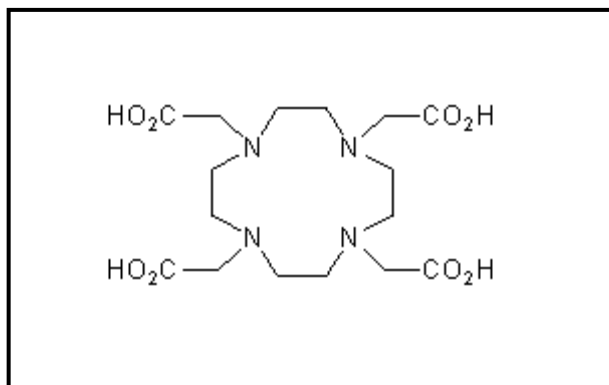


FIGURA 8 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA) (Macrocyclics, 2011).

Sabe-se que o DOTA forma complexos estáveis com muitos radiometais, como o ¹¹¹In, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y ou ¹⁷⁷Lu e por este motivo é usado para radiomarcagem de muitas biomoléculas (Mäcke et al., 2003).

Para a conjugação do quelante à biomolécula é necessária a ativação do grupo carboxílico do quelante via um éster ativo e a reação com uma amina primária das biomoléculas, desta forma se obtêm uma ligação peptídica altamente estável sob condições fisiológicas. Um exemplo popular da ativação do grupo carboxílico é a formação do éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS). Os ésteres do NHS ativados são seletivos para aminas primárias em solução aquosa e pHs ligeiramente básicos, como é o caso das condições da reação de imunoconjugação (Mäcke et al., 2003).

O quelante bifuncional macrocíclico utilizado neste trabalho foi o DOTA-NHS-éster apresentado na FIG. 8.

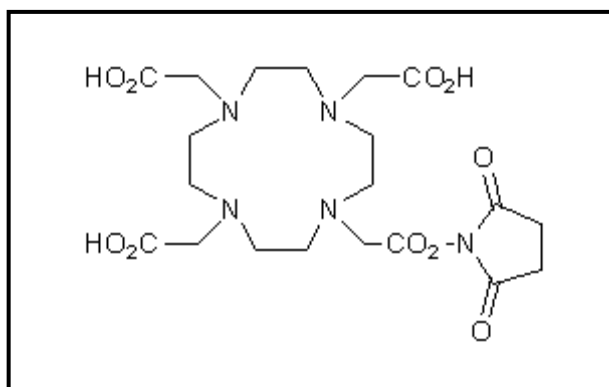


FIGURA 9 - Ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA-NHS-éster) (Macrocyclics, 2011).

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento da Diretoria de Radiofarmácia, no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CB) e no Biotério, sendo todas as dependências sitiadas na área do IPEN. Esses laboratórios forneceram toda a infra-estrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais, respectivamente.

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Rituximab - Anticorpo monoclonal anti-CD20 (Mabthera®) (Roche, Brasil);
- ✓ DOTA-NHS-éster (ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético) (Macrocyclics, EUA);
- ✓ Cloreto de lutécio-177 (IDB, Holanda);
- ✓ Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio trihidratado 99,5% (Sigma, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (Merck, Alemanha);
- ✓ Água purificada - Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- ✓ Bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha);
- ✓ Células *Raji* de linfoma de Burkitt humano (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil);
- ✓ Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- ✓ EDTA (Merck, Alemanha);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);

- ✓ Acetato de sódio anidro (Merck, Alemanha);
- ✓ Fosfato de sódio monobásico hidratado (Merck, Alemanha);
- ✓ Hepes sódico (Sigma, EUA);
- ✓ Hidróxido de sódio lentilhas (Merck, Alemanha)
- ✓ Matrigel alta concentração (BD-Biosciences, EUA).
- ✓ Meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil);
- ✓ Metanol (Merck, Alemanha);
- ✓ Penicilina:estreptomicina (Cultibab, Brasil);
- ✓ Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- ✓ Sephadex G50 (Pharmacia Biotech, Alemanha / Reino Unido);
- ✓ Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- ✓ Tripsina bovina (Cultilab, Brasil).

4.1.3 Equipamentos e demais materiais

Os principais equipamentos e materiais utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Agitador de tubos tipo vortex (Vertex, Brasil);
- ✓ Agitador magnético com aquecimento 725A (Fisatom, Brasil);
- ✓ Agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- ✓ Balança analítica M220 (Denver Instrument, EUA);
- ✓ Balança semi-analítica (Lutron, EUA);
- ✓ Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada Mikro 220 (Hettich, Alemanha);
- ✓ Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) - D5002 cobra II (Packard-Camberra, EUA);
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A₅, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10A e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);
- ✓ Detector radioativo (câmara de cintilação – NaI) do sistema CLAE - Shell Jr. 1000/2000 (Shell, EUA);

- ✓ Espectrofotômetro Evolution 160 (Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Medidor de pH (TecnoPON, Brasil);
- ✓ Cartucho de pré-coluna SEC-S 3000 - 4 x 3,0 mm (Phenomenex, EUA);
- ✓ Coluna BioSep SEC-S 3000 para cromatografia líquida de alta eficiência - 300 x 7,8 mm, 5 µm (Phenomenex, EUA);
- ✓ Coluna Sephadex G25 – PD-10 (Pharmacia Biotech, Alemanha / Reino Unido);
- ✓ Dispositivo de ultrafiltração (Vivaspin®) 30.000 MWCO (Pharmacia Biotech, Alemanha / Reino Unido);
- ✓ GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- ✓ Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
 - ✓ Papel cromatográfico Whatmann nº 1 (Whatmann, Reino Unido);
 - ✓ Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
 - ✓ Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG) (Merck, Alemanha);
 - ✓ Suporte cromatográfico de sílica gel 60 para cromatografia em camada delgada – ITLC-SG (Pall Life Sciences, EUA);
 - ✓ Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos e provetas.

4.1.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *Swiss* e *Nude*, de doze a vinte quatro semanas de idade e 20 a 40 gramas de peso (Biotério – IPEN). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN, conforme parecer constante no ANEXO A (Projeto nº 35/2009) e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.1.5 Células *Raji* de linfoma de Burkitt humano

As células RAJI, derivadas de linfoma de Burkitt humano, foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico. Semearam-se, em suspensão, 1x10⁵ células.mL⁻¹ e ao atingirem 1x10⁶ células.mL⁻¹ foram diluídas em concentrações variadas, conforme o ensaio realizado.

4.2 Métodos

4.2.1 Planejamento experimental

Antes de qualquer ensaio, o rituximab foi submetido à diálise para troca de tampão. Adicionou-se ao anticorpo o quelante bifuncional DOTA-NHS-éster em diferentes razões molares e a reação de imunoconjugação foi conduzida por até 48 horas sob refrigeração. Ao término da reação, uma alíquota foi retirada a fim de determinar o número de grupamentos quelantes acoplados ao anticorpo.

O imunoconjugado (rituximab-DOTA) foi purificado por coluna Sephadex G50 ou dispositivos de ultrafiltração de proteínas. Este imunoconjugado purificado foi armazenado em diferentes condições e a estabilidade foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência.

O rituximab-DOTA foi radiomarcado com ¹⁷⁷Lu em diferentes condições de tempo, temperatura e massa de anticorpo.

Uma vez realizada a radiomarcagem com ¹⁷⁷Lu, fez-se a análise da estabilidade após armazenamento em geladeira (2-8 °C), incubação em soro humano a 37 °C e ligação às proteínas séricas.

Realizados estes estudos, procedeu-se à caracterização biológica do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu. Foram realizados estudos de biodistribuição e farmacocinética em camundongos saudáveis para elucidar quais os órgãos-alvo, a via de excreção, a cinética sanguínea, a retenção e eliminação do radiofármaco do organismo.

Por fim, avaliou-se a influência do processo de conjugação e radiomarcção na ligação do radiofármaco às células tumorais.

Na FIG. 10 apresenta-se um esquema do planejamento experimental deste trabalho.

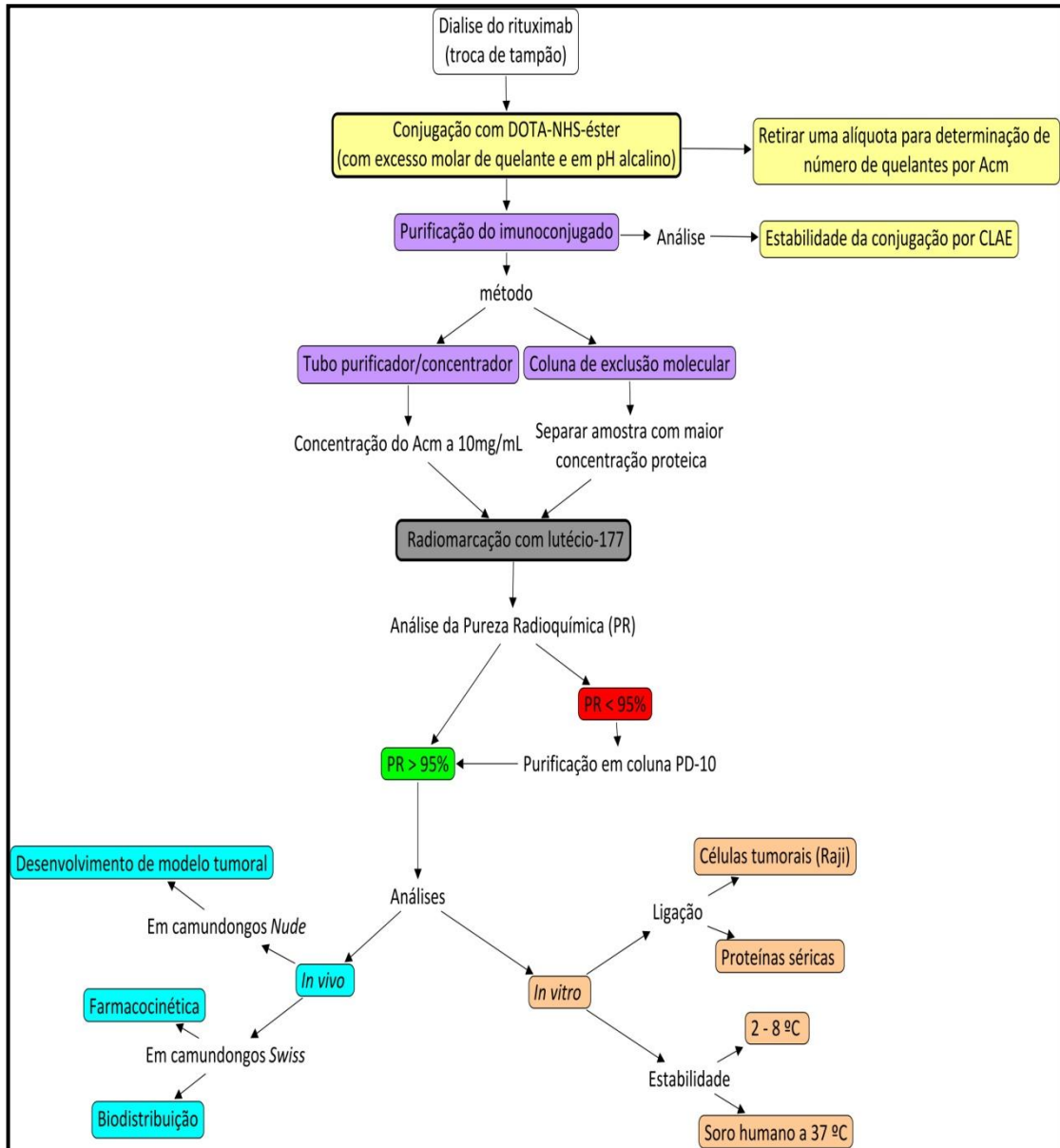


FIGURA 10 – Esquema do planejamento experimental deste trabalho.

4.2.2 Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise da pureza radioquímica das radiomarcações

a) Cromatografia em camada delgada (CCD) e em papel Whatman nº 1

Os perfis cromatográficos do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em água purificada e tratada com resina Chelex 100 (resina retentora de cátions) e nos tampões acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 e acetato de amônio 0,4 M pH 5,5, foram obtidos em diferentes sistemas cromatográficos. Os perfis cromatográficos das espécies $^{177}\text{Lu-DTPA}$ e $^{177}\text{Lu-DOTA-NHS}$, ambas diluídas em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 também foram obtidas nos mesmos sistemas cromatográficos, a saber:

- *Suportes cromatográficos:* papel Whatman nº 1, TLC-SG e ITLC-SG.
- *Solventes:* metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v), NaCl 0,9%, tampão EDTA 10 mM pH 4,5, NaOH 10 mM em NaCl 9%, EDTA 0,2 M e tampão citrato:ácido cítrico 0,1 M pH 5,0.

Aplicou-se uma alíquota da solução de $^{177}\text{LuCl}_3$ ou da mistura de radiomarcação sobre os suportes cromatográficos e procedeu-se a cromatografia com as diferentes fases móveis. Em seguida, as fitas foram cortas em 10 fragmentos de 1 cm e a radioatividade foi determinada em um contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo.

O perfil do Acm conjugado foi obtido nos mesmos sistemas cromatográficos, no entanto por não se tratar de uma espécie radioativa, o seu R_f foi determinado por revelação com vapores de iodo.

b) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi desenvolvida tendo por base metodologias existentes na literatura, salvo algumas adaptações (Lewis et al., 1994, Forrer et al., 2009).

A cromatografia foi desenvolvida em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5

μm), detector de radiação gama (Shell Jr.), detector UV 190 – 300 nm (Shimadzu) e comprimento de onda 280 nm. O fluxo utilizado foi de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando como fase móvel tampão fosfato de sódio pH 7,0 por 15 ou 25 minutos. O ar da sala de equipamentos era estabilizado.

Os perfis cromatográficos do $^{177}\text{LuCl}_3$, do rituximab não conjugado e conjugado ao DOTA e do DOTA-NHS-éster, foram obtidos a fim de se comparar com os perfis do rituximab-DOTA radiomarcado.

4.2.3 Troca de tampão do rituximab

Antes de quaisquer ensaios o anticorpo foi submetido à diálise para a retirada do excesso de estabilizantes e conservantes (Forrer et al., 2009). O procedimento foi realizado por dois métodos:

a) Diálise

Cortou-se aproximadamente 6 cm de membrana para diálise e colou-a num becker com tampão fosfato de sódio 0,2 M por 5 minutos para hidratá-la. Em seguida a parte inferior da membrana foi fechada com auxílio de um barbante; a amostra foi colocada dentro da membrana e a parte superior também foi fechada.

A membrana contendo a amostra foi colocada num becker com aproximadamente 500 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 e mantida sob agitação e refrigeração por 3 horas. Decorrido o tempo, o tampão foi trocado e o processo de agitação repetido. Após esse processo o tampão foi trocado novamente e a amostra ficou sob agitação durante toda a noite.

O anticorpo foi então retirado da membrana e utilizado para o processo de imunoconjugação.

b) Dispositivo de ultrafiltração

Foi utilizado um dispositivo de ultrafiltração de proteínas (Vivaspin®) com tamanho do poro da membrana de $30.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

Adicionou-se a amostra na parte superior do tubo e o volume foi completado para 20 mL com tampão de conjugação. O tubo foi centrifugado a 3000 g por 27 minutos sob refrigeração ($2-8 \text{ }^\circ\text{C}$). Após a centrifugação, o volume foi novamente completado para 20 mL com o mesmo tampão e novamente centrifugado. Para a troca total do tampão foram necessárias três centrifugações.

Em seguida, o Acm foi concentrado até 10 mg.mL^{-1} . Para isso, o mesmo foi centrifugado sob as mesmas condições, sem adicionar tampão, pelo número de vezes necessárias para se obter a concentração desejada (o cálculo da concentração proteica da amostra está descrito no item 4.2.6). A amostra foi então retirada da parte superior do tubo e utilizada no processo de imunoconjugação.

4.2.4 Imunoconjugação do rituximab ao DOTA

O método padrão de imunoconjugação foi adaptado da literatura (Nikula et al., 1995; Cooper et al., 2006; Jalilian et al., 2008; Forrer et al., 2009; Hens et al., 2009). Assim, um volume equivalente a 5 mg ou 10 mg de Acm purificado, foi adicionado ao DOTA-NHS-éster em diferentes razões molares. O pH da reação foi ajustado para 8,0 com auxílio de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 8,0. A mistura permaneceu 1 hora sob agitação leve em temperatura ambiente e depois foi mantida durante toda a noite em geladeira ($2-8 \text{ }^\circ\text{C}$). Decorrido este tempo, duas alíquotas de $50 \text{ } \mu\text{g}$ de Acm foram retiradas para determinação da quantidade de grupamentos quelantes acoplados ao Acm.

4.2.4.1 Variação da razão molar rituximab:DOTA

A reação de conjugação ocorreu com excesso molar de quelante, conforme descrito na literatura (Lewis et al., 1994; Reilly et al., 2004; Forrer et al., 2009; Hens et al., 2009; Rasaneh et al., 2009; Rasaneh et al., 2010a). Desta forma, foram estudadas as

seguintes razões molares rituximab:DOTA: 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:250, 1:500 e 1:1000.

4.2.4.2 Determinação do número de grupamentos quelantes acoplados à cadeia do rituximab

A determinação de grupamentos quelantes acoplados à estrutura proteica, foi realizada conforme descrito por Nikula e colaboradores (1995). Ao término da imunoconjugação e antes da purificação, retirou-se da mistura de reação duas alíquotas de 50 µg de Acm. Adicionou-se a elas 37 MBq (1 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; o pH foi ajustado entre 5,5 – 6,0 e o volume completado para 200 µL com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5. A reação ocorreu sob agitação leve (350 rpm) por 1 hora a 43 °C.

Dois diferentes sistemas cromatográficos foram usados para determinar a porcentagem de ^{177}Lu livre, quelante não conjugado (DOTA- ^{177}Lu) e do produto rituximab-DOTA- ^{177}Lu .

Para separar rituximab-DOTA- ^{177}Lu do radioisótopo livre e do quelante não conjugado, utilizou-se papel Whatman nº 1 como suporte cromatográfico e tampão EDTA 10 mM pH 4,5 como fase móvel. Para determinar a quantidade de DOTA- ^{177}Lu , utilizou-se o mesmo suporte cromatográfico e solução de NaOH 10 mM em NaCl 9% como fase móvel.

A relação DOTA:rituximab foi determinada de acordo com a seguinte equação:

(1)

4.2.5 Purificação do imunoconjugado

Decorrido o tempo de imunoconjugação, o rituximab-DOTA foi purificado

utilizando-se dois métodos, a saber:

a) Exclusão molecular em coluna de Sephadex G50

A coluna foi construída adicionando-se Sephadex G50 previamente hidratado com água purificada dentro de uma coluna de vidro de 20 cm de altura por 1 cm de largura. A coluna pronta foi lavada com 100 mL de água purificada e tratada com resina Chelex 100, em seguida foi vedada e armazenada em geladeira (Jalilian et al., 2008).

O anticorpo imunoconjugado foi adicionado no topo da coluna e eluído com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5. Quarenta tubos de 1 mL foram coletados e lidos em espectrofotômetro a 280 nm. Calculou-se a concentração proteica (mg.mL^{-1}) do *pool* das frações com maior absorvância e este foi utilizado para os demais experimentos.

b) Dispositivo de ultrafiltração

O procedimento de purificação foi semelhante ao de diálise (item 4.2.3), exceto que foram realizadas centrifugações até que a absorvância em 280 nm do ultrafiltrado fosse igual a zero, significando que não havia mais quelante livre no meio (6 a 10 ciclos de centrifugações). Ao final de cada centrifugação, o volume de tampão foi completado para 20 mL.

Em seguida, a amostra foi concentrada até 10 mg.mL^{-1} e utilizada para os demais experimentos (Cooper et al., 2006).

4.2.6 Cálculo da concentração proteica

Uma curva de calibração foi construída com 7 amostras de Acm com concentração conhecida (12,5; 25; 50; 100; 250; 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a absorvância das soluções foram determinadas em 280 nm.

Um gráfico de *Concentração do Acm versus Absorvância* foi construído e com

ele foi obtida a equação da reta. Desta forma, foi possível determinar a concentração das amostras de Acm após os processos de troca do tampão e purificação. Este cálculo foi realizado a partir da leitura da absorbância das amostras e do cálculo da concentração correspondente utilizando-se a equação da reta determinada.

4.2.7 Análise da estabilidade da imunoc conjugação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a reação de conjugação o anticorpo foi purificado conforme descrito no item 4.2.5. A estabilidade da conjugação foi analisada armazenando-se o imunoc conjugado já purificado por 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 240 dias a 2-8 °C e -20 °C. Ao final de cada tempo, deixou-se as amostras chegarem à temperatura ambiente e as mesmas foram analisadas por CLAE, a fim de se avaliar a integridade proteica e o possível desacoplamento do quelante.

4.2.8 Radiomarcção do rituximab-DOTA com lutécio-177

Os primeiros ensaios foram baseados em trabalhos já publicados (Nikula et al., 1995; Cooper et al., 2006; Jalilian et al., 2008; Forrer et al., 2009; Hens et al., 2009; Rasaneh et al., 2009, Rasaneh et al., 2010a e 2010b) em que 1 mg de rituximab-DOTA purificado foi marcado com 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$ em HCl 0,05 N. O tempo de reação foi de 1 hora à 43 °C (Lewis et al., 1994; Mohsin et al., 2006), sob agitação de 350 rpm, pH entre 5,5 e 6,0 e 200 µL de volume final de radiomarcção. Ao final da reação foi adicionado 3,3 µL de DTPA 10 mM e deixou-se reagir por mais 15 minutos à temperatura ambiente.

Todas as soluções utilizadas nas reações foram preparadas com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina Chelex 100 para remoção de íons metálicos.

Buscando otimizar as condições de marcação, variou-se a temperatura de marcação (37 °C e 43 °C) e o tempo de reação (30 e 60 minutos) para a temperatura de 43 °C.

Também foi analisado a influência da variação da massa de imunoconjugado no rendimento de radiomarcção (0,1 a 5 mg de imunoconjugado), para a mesma atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ (148 MBq). As demais condições de radiomarcção foram mantidas conforme condição padrão inicialmente proposta. Na FIG. 11 há a representação química da obtenção do radiofármaco.

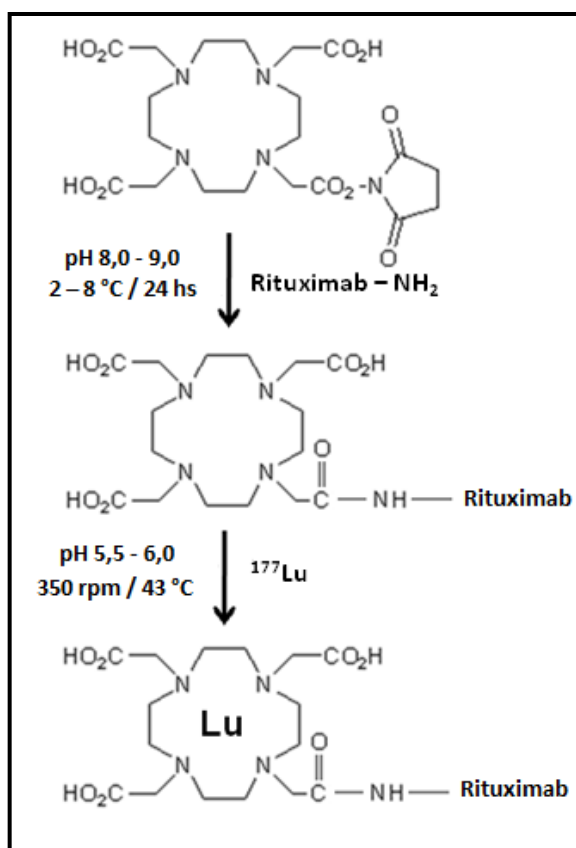


FIGURA 11 – Representação química da obtenção do radiofármaco.

4.2.9 Purificação do rituximab-DOTA- ^{177}Lu em coluna PD-10

Para realizar estudos em animais e em células, o produto radiomarcado deve possuir alta pureza radioquímica (acima de 95%). Para tanto, quando necessário, o rituximab-DOTA- ^{177}Lu foi purificado em coluna PD-10, uma coluna de exclusão molecular.

O produto foi adicionado no topo da coluna e eluído com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5. Vinte tubos de 0,5 mL foram coletados e lidos em um curiômetro calibrado para o radioisótopo. Os tubos correspondentes ao anticorpo radiomarcado, foram submetidos a um controle de qualidade por cromatografia ascendente em papel e

em camada delgada (ver seção 4.2.10). O rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu foi então utilizado para os demais experimentos (Brouwers, et al., 2003; Hens et al., 2009).

4.2.9.1 Desenvolvimento do perfil cromatográfico em coluna PD-10

Para conhecer qual fração correspondia ao rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu, produto de interesse, e as impurezas radioquímicas, foi necessário obter o perfil cromatográfico dessas espécies separadamente.

Assim, o rituximab e o DOTA-NHS-éster foram eluídos em coluna PD-10 com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5. Vinte alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 280 nm.

Para obtenção do perfil do radioisótopo, aplicou-se uma atividade de 37 MBq (1 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃ no topo da coluna e realizou-se a eluição com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5. Foram coletadas 25 alíquotas de 1 mL e uma alíquota de 50 mL, totalizando 75 mL. A atividade das alíquotas foi determinada em curiômetro calibrado para o radioisótopo.

4.2.10 Análise da pureza radioquímica do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu

A pureza radioquímica de um radiofármaco é definida como a porcentagem do total da radioatividade que se encontra na forma química desejada, ou seja, a porcentagem de rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu (Saha, 1998).

O sistema cromatográfico utilizado para determinar a pureza radioquímica do imunoc conjugado radiomarcado, foi definido com base nos estudos de perfis cromatográficos citados na seção 4.2.2. Nesta seção também há o detalhamento do procedimento adotado na realização da cromatografia.

4.2.11 Análise da estabilidade do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu a 2-8 °C

A estabilidade do produto final foi analisada incubando-se a mistura de

radiomarcção em geladeira (2-8 °C) por até 4 dias (96 horas), retirando-se uma alíquota a cada 24 horas para análise da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada, conforme descrito anteriormente (item 4.2.10). Os ensaios foram realizados em triplicata (Pujatti et al., 2008).

4.2.12 Análise da estabilidade do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano

Para obtenção do soro humano, coletou-se 10 mL de sangue sem coagulante de doador sadio, centrifugou-se a 1400 g (1440 rpm) por 10 minutos, separou-se o coágulo de fibrina e centrifugou-se novamente para separação do soro.

Adicionou-se, em triplicata, 1 mL do soro humano a 18,5 MBq do Acm radiomarcado e incubou-se à 37 °C sem agitação por 1, 2, 4 e 24 horas. Decorrido o tempo, uma alíquota das misturas foi retirada para análise por cromatografia em camada delgada, conforme descrito anteriormente (seção 4.2.10) (Lewis et al., 1994; Brouwers et al., 2004; Mohsin et al., 2006) .

4.2.13 Ligação do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu às proteínas séricas *in vitro*

Adicionou-se, em triplicata, 18,5 MBq do Acm radiomarcado a 1 mL de soro humano de doador sadio e incubou-se a 37 °C sem agitação por 1, 4, 24 e 48 horas. Decorrido o tempo, retirou-se uma alíquota das misturas (200 µL) e foi adicionado etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas. A amostra foi centrifugada a 9720 g (10000 rpm) e foi determinada a radioatividade em uma alíquota do sobrenadante e no precipitado, utilizando um contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. A porcentagem de ligação às proteínas séricas (LP) foi determinada pela equação:

4.2.14 Estudos de biodistribuição em camundongos *Swiss*

O método invasivo foi utilizado nos estudos de biodistribuição. Injetou-se por via endovenosa caudal 0,185 MBq (50 μ Ci) do anticorpo radiomarcado diluído em 100 μ L de solução salina 0,9%. Após 1, 4, 24 e 48 horas os animais foram sacrificados, e seus principais órgãos foram retirados e pesados. Por fim foi avaliada a radioatividade de cada órgão em um contador gama tipo poço. Foram calculadas as porcentagens da atividade injetada por órgão (% AI, EQ. 3) e por grama de órgão (% AI/g, EQ. 4) por intermédio da média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada. Os ensaios foram realizados em quadriplicata.

$$\% \text{ AI} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (3)$$

(4)

Para calcular a porcentagem de atividade injetada presente nos músculos, % AI (músculo), e nos ossos, % AI (ossos), dos animais, retirou-se o músculo da coxa e o fêmur dos camundongos e calculou-se a porcentagem de atividade por grama e o peso dos músculos e dos ossos. O peso dos músculos foi assumido como 40% (EQ. 5) e dos ossos como 12% (EQ. 6) do peso total do camundongo (Jiménez, 2007).

(5)

(6)

4.2.15 Estudos farmacocinéticos em camundongos *Swiss* sadios

Farmacocinética é o estudo de fatores que determinam a quantidade da

droga no sítio de ação, em diferentes tempos após a aplicação do fármaco no sistema biológico. Portanto, consiste no estudo quantitativo dos processos metabólicos de absorção, distribuição e eliminação de fármacos (Lara et al, 1979)

A análise da farmacocinética do imunoconjugado radiomarcado foi realizada por método invasivo. Injetou-se por via endovenosa caudal 0,185 MBq (50 μ Ci) do Acm radiomarcado diluído em 100 μ L de solução salina 0,9% e, após diferentes tempos (10 minutos a 48 horas), coletou-se 60 μ L de sangue pelo plexo orbital dos camundongos utilizando um tubo capilar heparinizado.

A radioatividade no sangue foi determinada utilizando-se um padrão da atividade administrada e foi expressa em porcentagem da atividade injetada por mililitro de sangue (% AI/mL sangue, EQ. 7) e em porcentagem da atividade injetada no sangue total (% AI/sangue, EQ. 8). Os ensaios foram realizados em quaduplicata.

$$\%AI/mL = \frac{\text{cpm do sangue coletado}}{\text{cpm do padrão} \times 0,06} \times 100 \quad (7)$$

(8)

A volemia (volume total de sangue) do camundongo foi assumida como 7,78% do seu peso corpóreo (EQ. 9) (Jiménez, 2007).

(9)

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), após o ajuste para um modelo de decaimento monocompartimental.

Com este programa calculou-se a área sob a curva e com este dado foi possível calcular o clareamento sanguíneo (EQ. 10).

(10)

Este programa, também fornece o valor da constante de eliminação (K_{el}) e com este parâmetro calculou-se o volume de distribuição (Vd) em mL do Acm radiomarcado (EQ. 11).

(11)

4.2.16 Desenvolvimento de modelo tumoral em camundongos *Nude*

O modelo tumoral foi proposto anteriormente por Pagel et al. (2007). Cinco camundongos *Nude* foram obtidos do Biotério do IPEN com idade de 4-10 semanas e uma solução de 1×10^7 células *Raji* diluídas em PBS com 30% de Matrigel, foi injetada via subcutânea no dorso dos animais. Os animais foram observados semanalmente a fim de constatar crescimento tumoral.

4.2.17 Estudo de ligação às células *Raji*

A capacidade do anticorpo radiomarcado se ligar às células *Raji* foi avaliada mediante um estudo preliminar de competição.

Foram estruturados três grupos contendo 4 tubos com 1 milhão de células em cada tubo. Ao primeiro grupo não foi adicionado competidor (rituximab não conjugado); ao segundo grupo foi adicionado competidor com um excesso de 10 vezes em relação à massa de anticorpo radiomarcado; ao terceiro grupo foi adicionado competidor com um excesso de 100 vezes em relação à massa de anticorpo radiomarcado.

As células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Ao término deste tempo, uma alíquota correspondente a 20 µg do anticorpo radiomarcado foi adicionada às células e estas foram incubadas por mais 30 minutos a 37 °C.

Em seguida as células foram centrifugadas a 4860 *g* (5000 rpm), o sobrenadante foi retirado e a atividade nas células determinada com o auxílio de um contador gama tipo poço.

4.2.18 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada por intermédio do programa GraphPad Prism 5.00®, utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação entre grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de método de cromatografia em camada delgada (CCD) e em papel Whatman nº 1

O perfil de migração do $^{177}\text{LuCl}_3$ em cromatografia em camada delgada utilizando TLC-SG e Papel Whatman nº 1 como suporte e diferentes fases móveis, foi obtido diluindo-se o radioisótopo em água purificada e tratada com resina Chellex 100 (FIG. 11), em tampão acetato de sódio 0,4 M (FIG. 12) e acetato de amônio 0,4 M ambos tampões em pH 5.5 (FIG. 13).

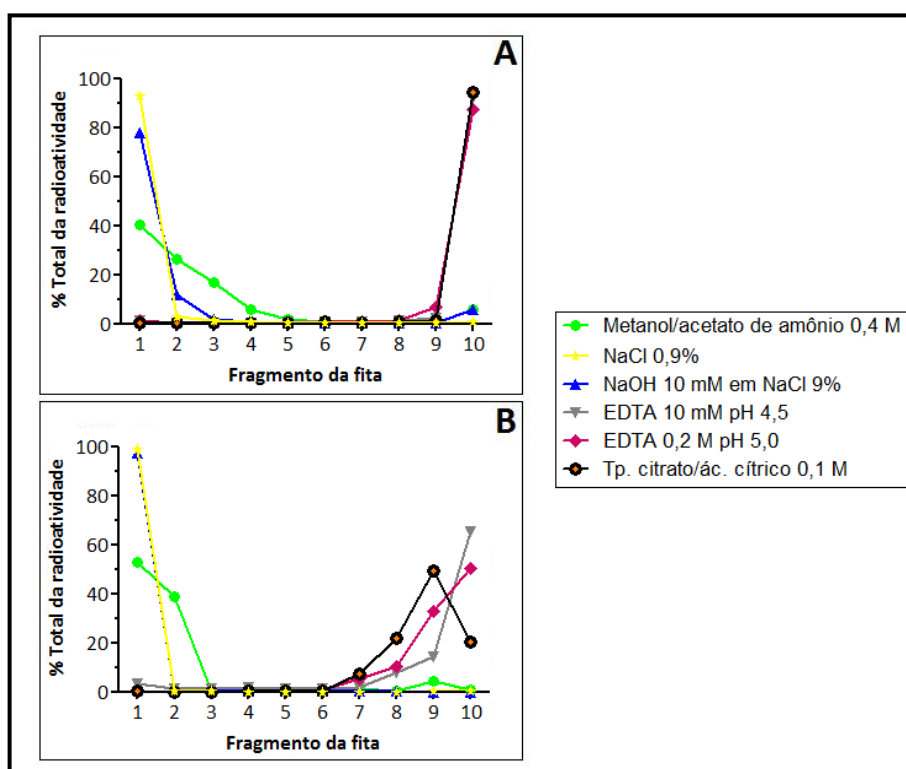


FIGURA 12 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em água purificada (tratada com resina Chellex 100) e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).

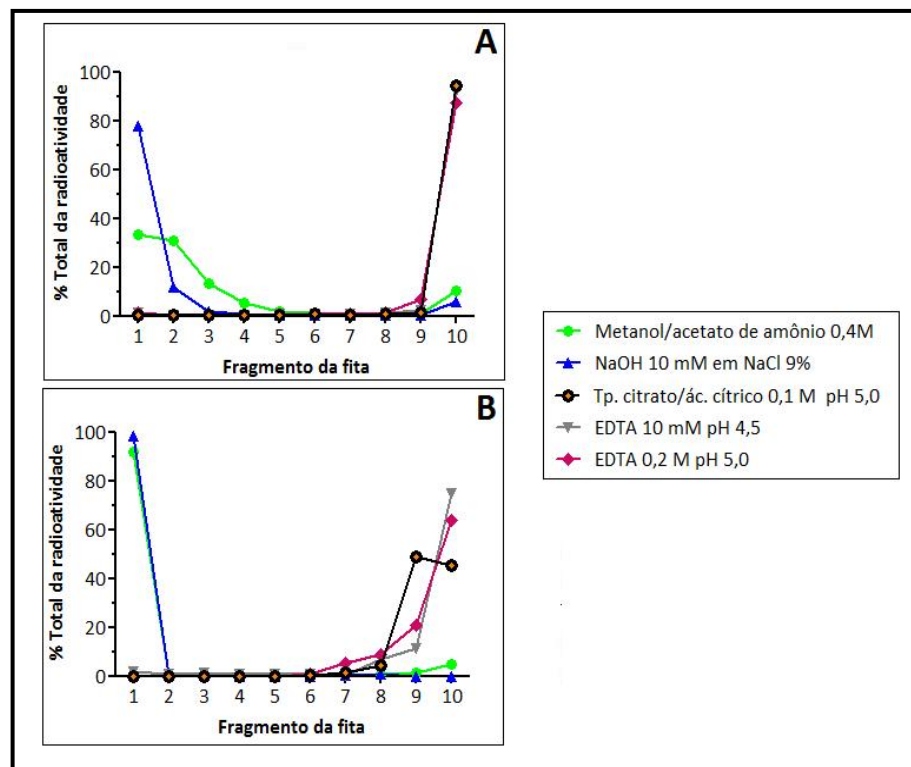


FIGURA 13 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).

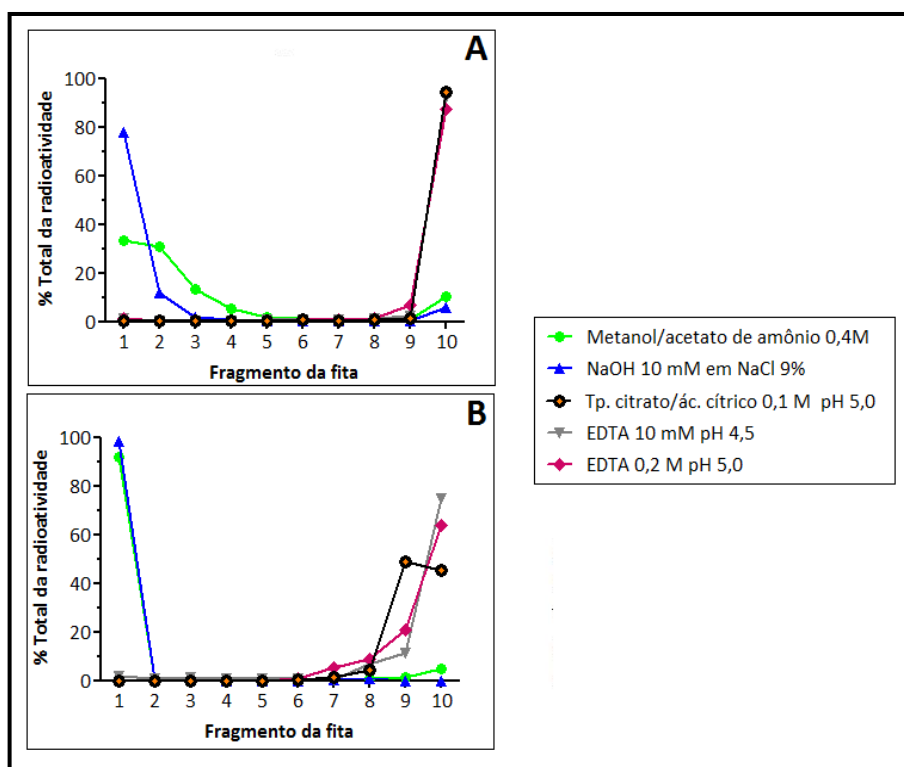


FIGURA 14 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ diluído em tampão acetato de amônio 0,4 M pH 5,5 e desenvolvido em diferentes fases móveis utilizando papel Whatman nº 1 (A) e TLC-SG (B).

Observou-se que não houve alteração significativa no perfil do radioisótopo quando diluído nestes três solventes.

Os perfis de migração do $\text{DOTA-}^{177}\text{Lu}$ e $\text{DTPA-}^{177}\text{Lu}$ também foram obtidos em diferentes fases estacionárias e móveis (FIG. 14 e FIG. 15), e os perfis obtidos nas fitas ITLC-SG e papel Whatman nº 1 foram muito parecidos.

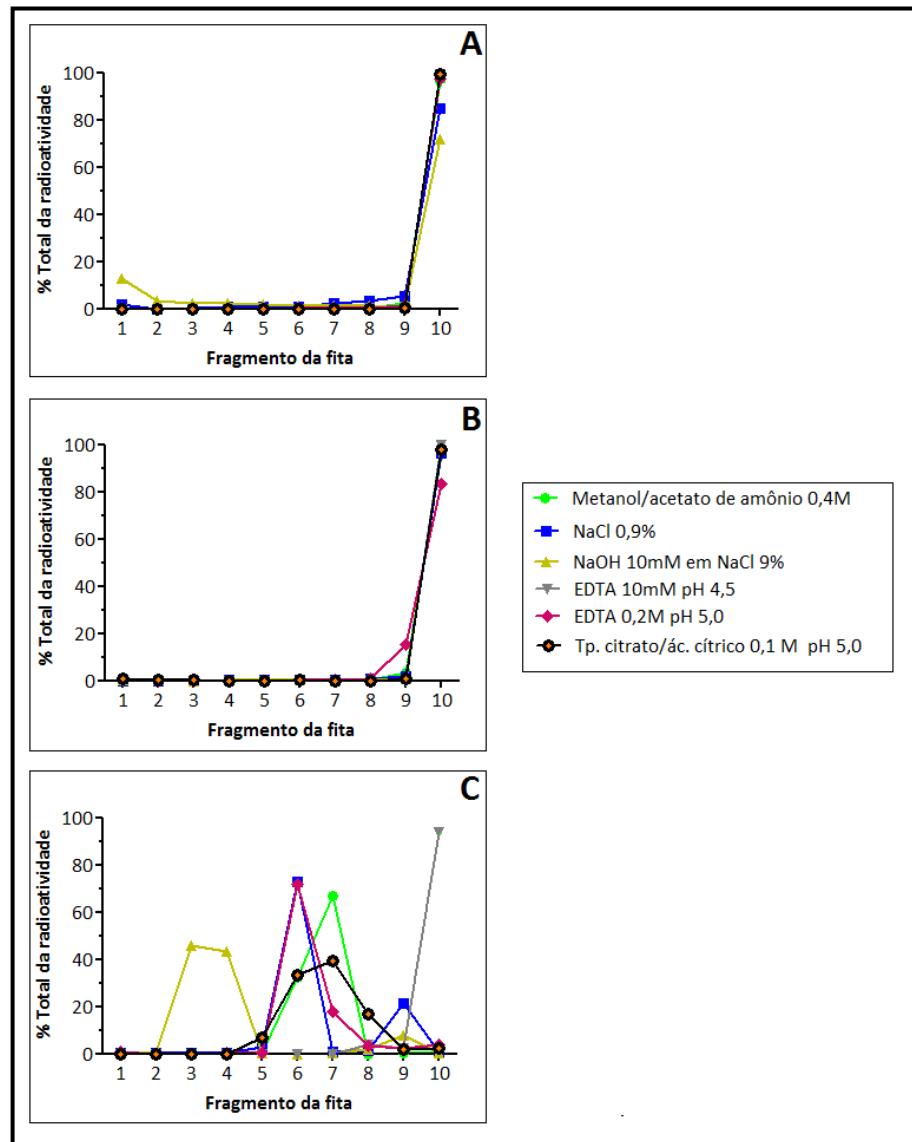


FIGURA 15 - Perfil cromatográfico do DTPA-¹⁷⁷Lu em ITLC-SG (A), papel Whatman nº 1 (B) e TLC-SG (C) utilizando diferentes fases móveis.

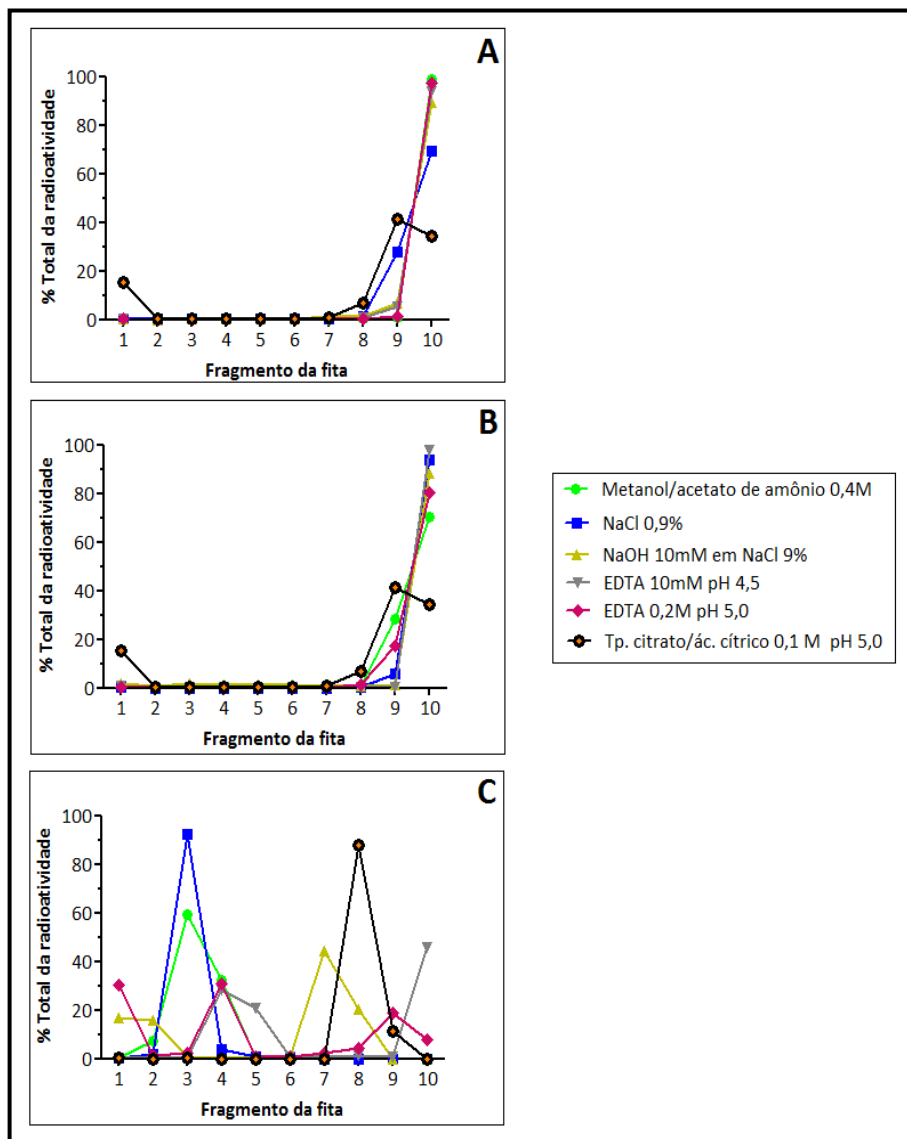


FIGURA 16 - Perfil cromatográfico do DOTA-¹⁷⁷Lu em ITLC-SG (A), papel Whatman nº 1 (B) e TLC-SG (C) utilizando diferentes fases móveis.

Devido a sua alta disponibilidade no mercado e fácil manuseio, optou-se pelo papel Whatman nº 1 como fase estacionária de primeira escolha.

Ao final da radiomarcagem foi adicionado DTPA para sequestrar todo ¹⁷⁷LuCl₃ livre, portanto, as impurezas predominantes são DOTA-¹⁷⁷Lu e DTPA-¹⁷⁷Lu, o que tornou possível a escolha do metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e o tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fases móveis para todos os controles radioquímicos. Além

disso, tratam-se de sistemas já utilizados pelo grupo de pesquisa em radiomarcção de proteínas com ^{177}Lu .

Nestes sistemas, o rituximab-DOTA- ^{177}Lu permanece na origem, ao passo que DOTA- ^{177}Lu , DTPA- ^{177}Lu e ^{177}Lu livre migram com R_f de 0,9 – 1,0.

Os sistemas cromatográficos sugeridos por Nikula e colaboradores (1995) para a determinação do número de quelantes acoplados ao Acm também foram estudados e os perfis de migração obtidos foram idênticos ao da literatura.

Assim, em papel Whatman nº 1 e tampão EDTA 10mM pH 4,5 as espécies DOTA- ^{177}Lu , DTPA- ^{177}Lu e ^{177}Lu livre migram com R_f 1,0 e rituximab-DOTA- ^{177}Lu permanece na origem. Já em NaOH 10 mM em NaCl 9%, o ^{177}Lu livre e rituximab-DOTA- ^{177}Lu permanecem na origem.

O perfil de migração do Acm conjugado também foi estudado nos mesmos sistemas cromatográficos, utilizando a técnica de revelação por vapor de iodo para determinar o R_f da espécie.

Na TAB. 3, apresenta-se um resumo dos perfis cromatográficos de todas as espécies estudadas nos diferentes sistemas cromatográficos.

TABELA 3 - Perfil cromatográfico do rituximab-DOTA, $^{177}\text{LuCl}_3$, DTPA- ^{177}Lu e DOTA- ^{177}Lu em diferentes sistemas cromatográficos (resultados em R_F).

Espécies	Sistemas cromatográficos (fase móvel e fase estacionária)																	
	Metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1)			NaCl 0,9%			NaOH 10 mM em NaCl 9%			Tampão citrato:ácido cítrico 0,1 M pH 5,0			EDTA 10 mM pH 4,5			EDTA 0,2 M pH 5,0		
	ITLC-SG	W1	TLC-SG	ITLC-SG	W1	TLC-SG	ITLC-SG	W1	TLC-SG	ITLC-SG	W1	TLC-SG	ITLC-SG	W1	TLC-SG	ITLC-SG	W1	TLC-SG
Rituximab-DOTA	0	0-0,1	0	0-0,2	0-0,1	0	0	0	0	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0	0-0,2	0-0,2	0-0,1
$^{177}\text{LuCl}_3$ em água Chelex	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0-0,1	0	0-0,1	0-0,1	0	0,9-1	1	0,9-1	1	1	0,8-1	1	1	0,8-1
$^{177}\text{LuCl}_3$ em tampão acetato de amônio	-	0-0,3	0	-	-	-		0-0,1	0	-	1	0,9-1	-	1	0,9-1	-	0,9-1	0,9-1
$^{177}\text{LuCl}_3$ em tampão acetato de sódio	-	0-0,3	0	-	-	-		0-0,1	0	-	1	0,9-1	-	1	0,8-1	-	0,9-1	0,8-1
DTPA-^{177}Lu	1	0,9-1	0,6-0,7	1	1	0,6 e 0,9	1	1	0,2-0,3	1	1	1	1	0,9-1	0,6-0,8	1	0,9-1	0,6-0,7
DOTA-^{177}Lu	1	0,9-1	0,3-0,4	1	1	0,3	1	1	0 e 0,7-0,8	0,9-1	0,9-1	0,8-0,9	1	1	0,4-0,5 e 1	1	0,9-1	0-0,3 e 0,9

5.2 Desenvolvimento de método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os cromatogramas em CLAE do rituximab e DOTA-NHS (UV a 280 nm), $^{177}\text{LuCl}_3$, DOTA- ^{177}Lu e DTPA- ^{177}Lu foram obtidos de acordo com a metodologia citada anteriormente (seção 4.2.2).

No sistema cromatográfico empregado, o tempo de retenção (TR) do $^{177}\text{LuCl}_3$ foi de 10,75 minutos (FIG. 16A), bem próximo do DOTA- ^{177}Lu que foi de 10,77 minutos (FIG. 16B) e DTPA- ^{177}Lu que foi de 10,24 minutos (FIG. 16C), não sendo possível diferenciar as três espécies num radiocromatograma do produto final radiomarcado. No entanto, as três são consideradas impurezas e a simples identificação da presença de um pico neste tempo de retenção é o suficiente para avaliar a pureza radioquímica do rituximab-DOTA- ^{177}Lu .

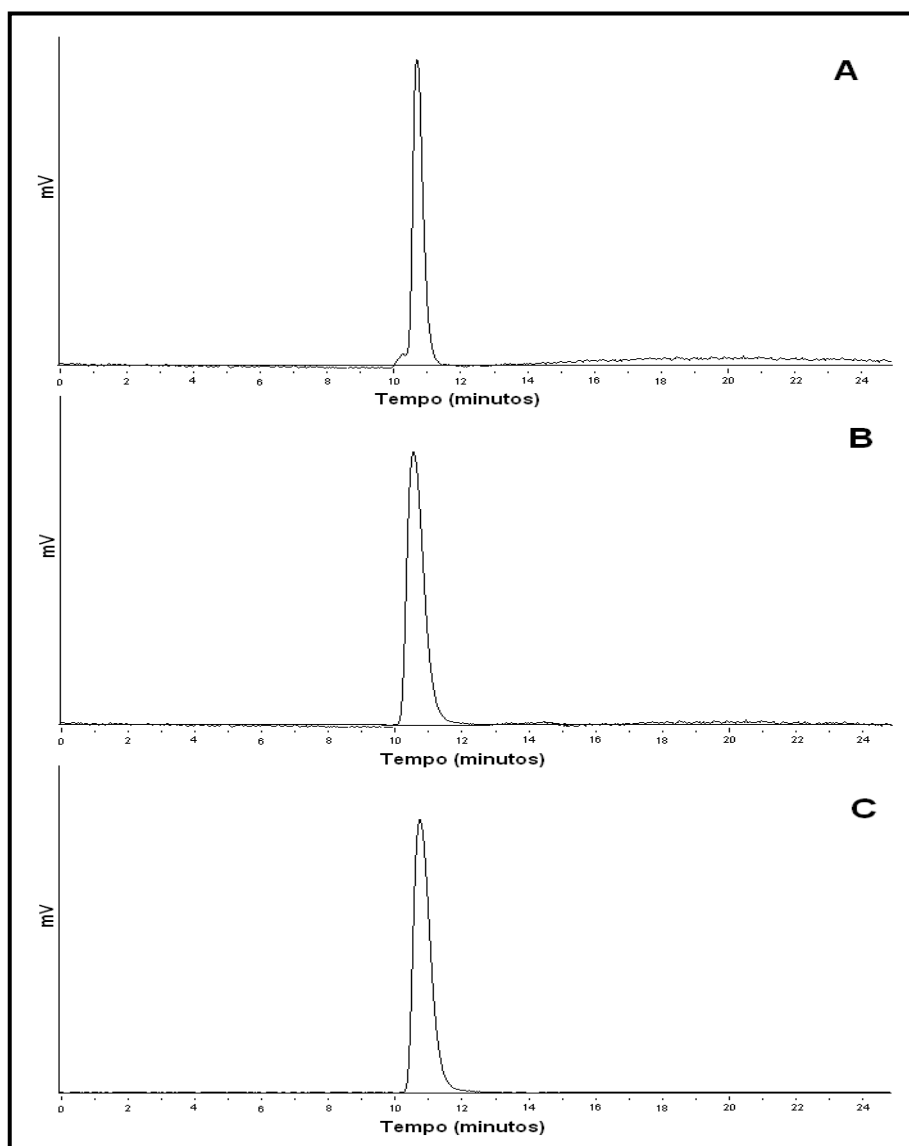


FIGURA 17 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ (A), $\text{DOTA-}^{177}\text{Lu}$ (B) e $\text{DTPA-}^{177}\text{Lu}$ (C), utilizando uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 a um fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por 25 minutos.

Essa sobreposição de picos não ocorreu com o DOTA-NHS-éster e o rituximab no UV (280 nm). Na FIG. 17 é possível observar o perfil em CLAE do rituximab não conjugado (FIG. 17A) com TR = 8,04 minutos, do DOTA-NHS-éster com TR = 10,78 minutos (FIG. 17B) e do rituximab e DOTA-NHS-éster juntos (FIG. 17C), demonstrando que este método separou bem as duas espécies.

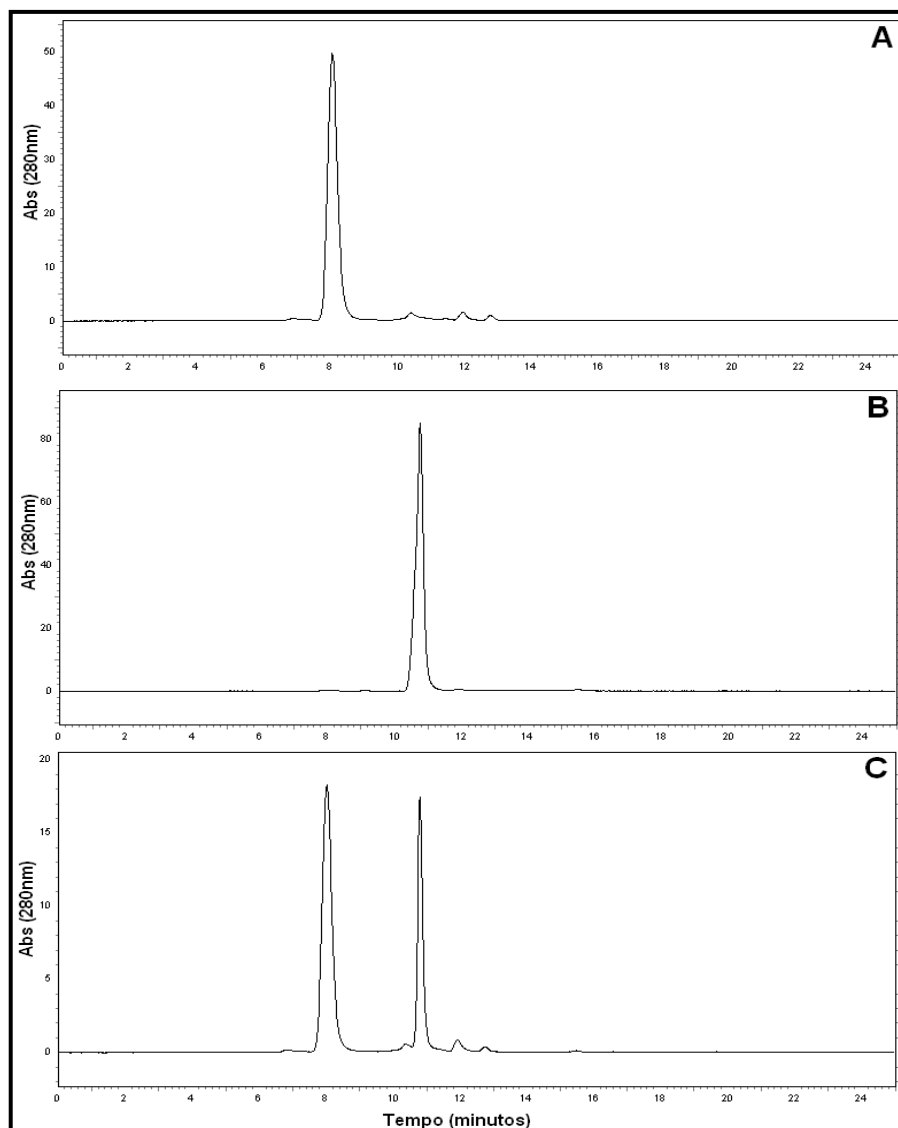


FIGURA 18 - Cromatograma (UV a 280 nm) do rituximab (A), DOTA-NHS-éster (B) e mistura de rituximab e DOTA-NHS-éster (C), utilizando uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 a um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ por 25 minutos.

5.3 Método de diálise, purificação e concentração

a) Troca de tampão do rituximab

A conjugação de Acm à quelantes bifuncionais se faz em pH alcalino (geralmente pH 8,0-9,5) e com excesso do agente quelante. O pH alcalino permite a ativação do grupamento éster do quelante e a redução das cadeias laterais de lisina presente no anticorpo. Desta forma, para que ocorra a conjugação, deve-se primeiramente trocar o tampão do anticorpo. Este procedimento pode ser feito por

diálise, ultrafiltração ou cromatografia por exclusão molecular (Cooper et al., 2006).

Além disso, o rituximab (MabThera®) possui em sua formulação comercial, substâncias indesejáveis para o processo de conjugação, tais como conservantes e estabilizantes (Forrer et al., 2009). O processo de troca do tampão retira estas substâncias e conferem maior rendimento radioquímico.

O método de diálise foi empregado nos primeiros experimentos e o mesmo mostrou-se eficaz na troca de tampão e remoção de conservantes.

Contudo, por ser um método demorado (cerca de 18 horas) e por utilizar uma grande quantidade de tampão (1,5 L), não era viável para um procedimento de produção rotineira do radiofármaco.

Na tentativa de melhorar este processo, foi adquirido um dispositivo de ultrafiltração de proteína (Vivaspin®) que além de fazer a diálise, também pode ser usado para a purificação e concentração do Acm conjugado.

Este dispositivo permitiu a troca de tampão de maneira eficiente, rápida e com menor gasto de tampão.

b) Purificação do rituximab conjugado

Após a conjugação, o excesso de quelante, inicialmente, empregado para favorecer a reação foi retirado. Em outras palavras, o imunocombinado foi purificado.

O método de purificação utilizado nos estudos com altas razões molares foi a purificação por exclusão molecular com coluna Sephadex G50. Este método mostrou-se eficiente para separar o anticorpo conjugado do quelante livre, como visto na FIG. 18, na qual o primeiro pico representa o anticorpo conjugado e o segundo pico representa o quelante remanescente.

O inconveniente encontrado neste método foi o alto volume coletado do imunocombinado (aproximadamente 5 mL), o que dificultou o procedimento de

radiomarcção, prejudicando o rendimento.

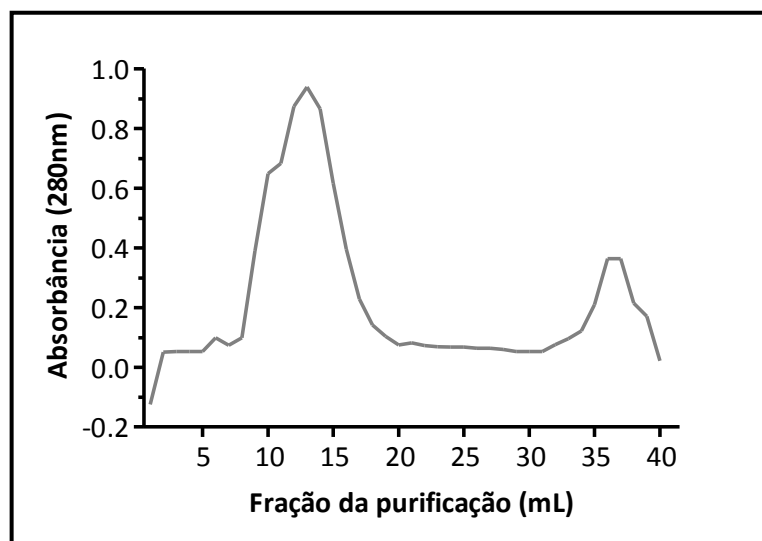


FIGURA 19 - Perfil da purificação do Acm por coluna de exclusão molecular.

Vários autores utilizaram dispositivos concentradores para fazer a purificação do imunocjugado (Nikula et al., 1995; Cooper et al., 2006; Hens et al., 2009; Forrer et al., 2009). Esses tubos possuem uma membrana com tamanho de poro compatível com o peso molecular do Acm, retendo-o, mas permitem a passagem do quelante livre. O dispositivo de ultrafiltração foi usado como método de purificação do imunocjugado nos experimentos utilizando razões molares de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50.

Segundo Cooper e colaboradores (2006), o processo de purificação deve ser repetido até que a absorbância do ultrafiltrado em 280 nm seja igual a zero, significando que não há mais quelante livre na solução.

Foram necessários, em média, oito ciclos de centrifugação para que a absorbância do ultrafiltrado fosse igual a zero (FIG. 19).

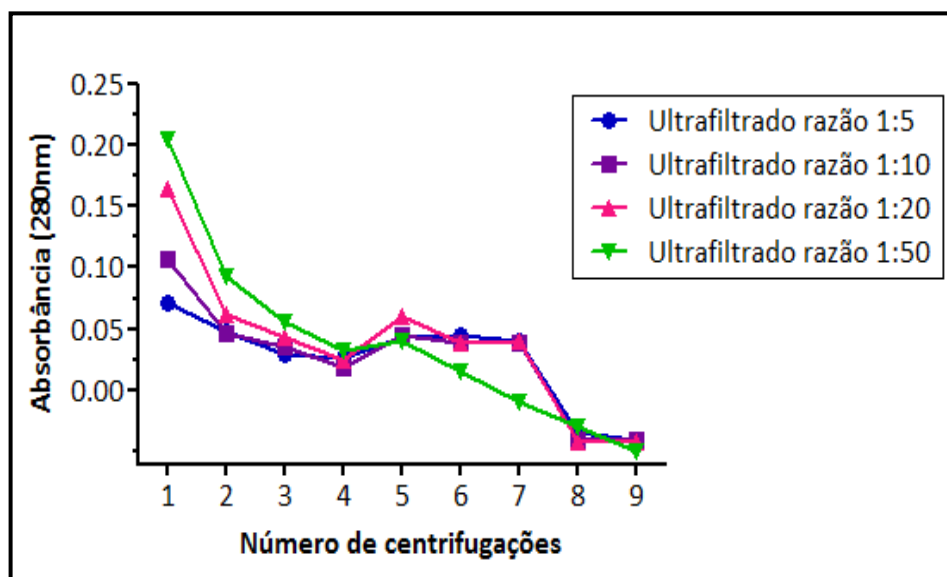


FIGURA 20 - Absorbância do ultrafiltrado em cada ciclo de centrifugação. Ciclo: centrifugação a 3000 *g*, por 27 minutos sob refrigeração. Ultrafiltrado lido em espectrofotômetro a 280 nm.

O uso dos tubos concentradores mostrou-se vantajoso devido ao baixo volume de tampão utilizado e menor tempo de execução (4-6 horas). Outra vantagem foi a obtenção de um imunocombinado concentrado, o que possibilitou realizar os procedimentos de radiomarcagem no Thermomixer® (aparelho com agitação e temperatura controladas, mas com capacidade para tubos tipo eppendorf de 1,5 mL).

Outra vantagem de extrema importância dos tubos concentradores é a possibilidade de utilizar centrífugas refrigeradas em todo o processo, preservando o anticorpo, uma vez que este é termolábil.

O ultrafiltrado coletado também foi analisado por CLAE, a fim de comprovar a segurança do método de Cooper e colaboradores (2006).

Procedeu-se à conjugação de 10 mg do Acm na razão molar rituximab:DOTA de 1:50, nas mesmas condições de conjugação previamente descritas. Foram necessários 7 ciclos de centrifugações para que a Abs no espectrofotômetro fosse igual a zero (FIG. 19). Os cromatogramas mostrados na FIG. 20 e 20.1 revelam que a cada centrifugação a

Abs foi reduzida pela metade, chegando muito próximo a zero na última centrifugação (FIG. 20.1 G).

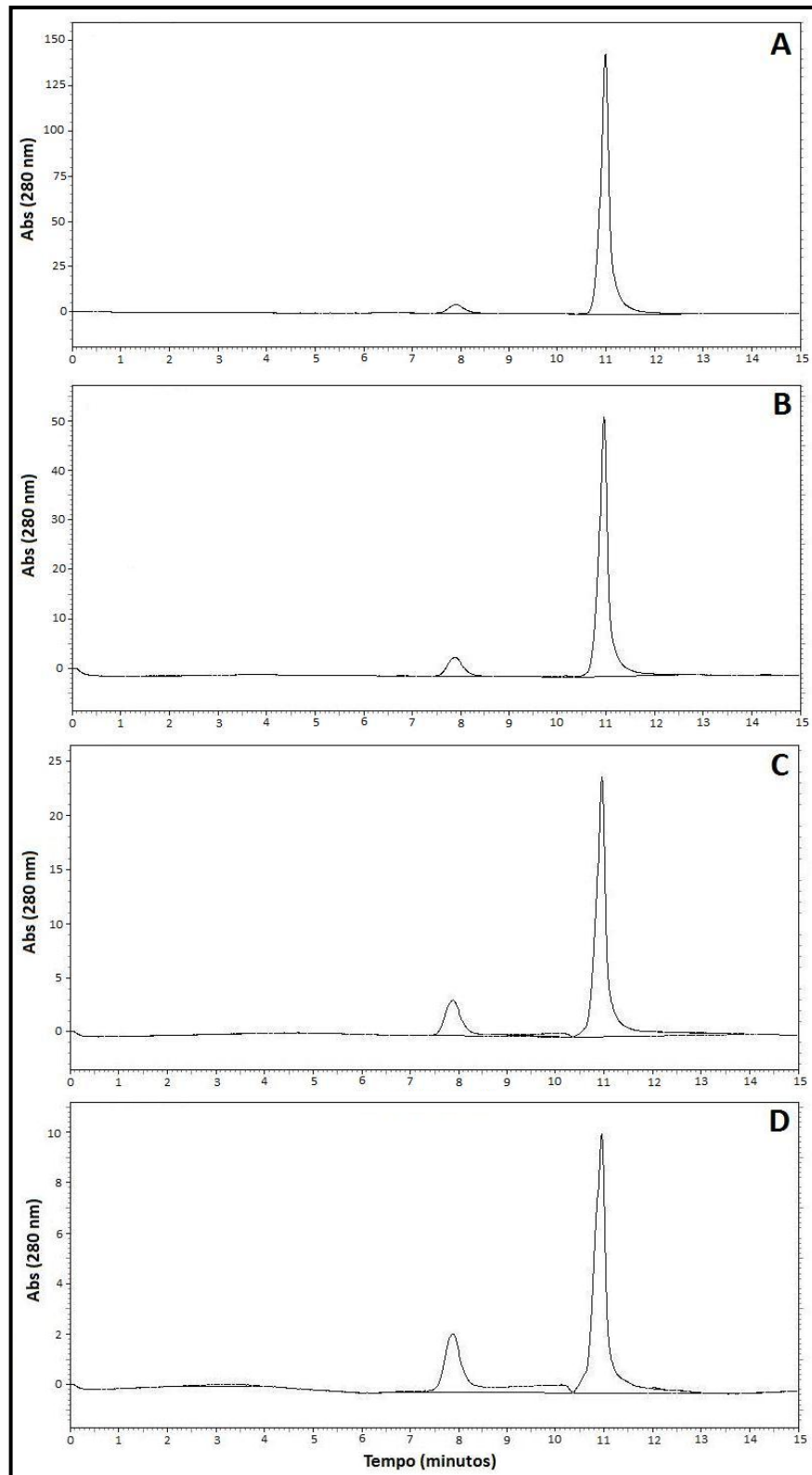


FIGURA 21 – Cromatograma do ultrafiltrado obtido por meio da purificação do imunocombinado por dispositivo de ultrafiltração de proteína. Em **A**, 1ª centrifugação, **B**, 2ª centrifugação **C**, 3ª centrifugação e em **D**, 4ª centrifugação.

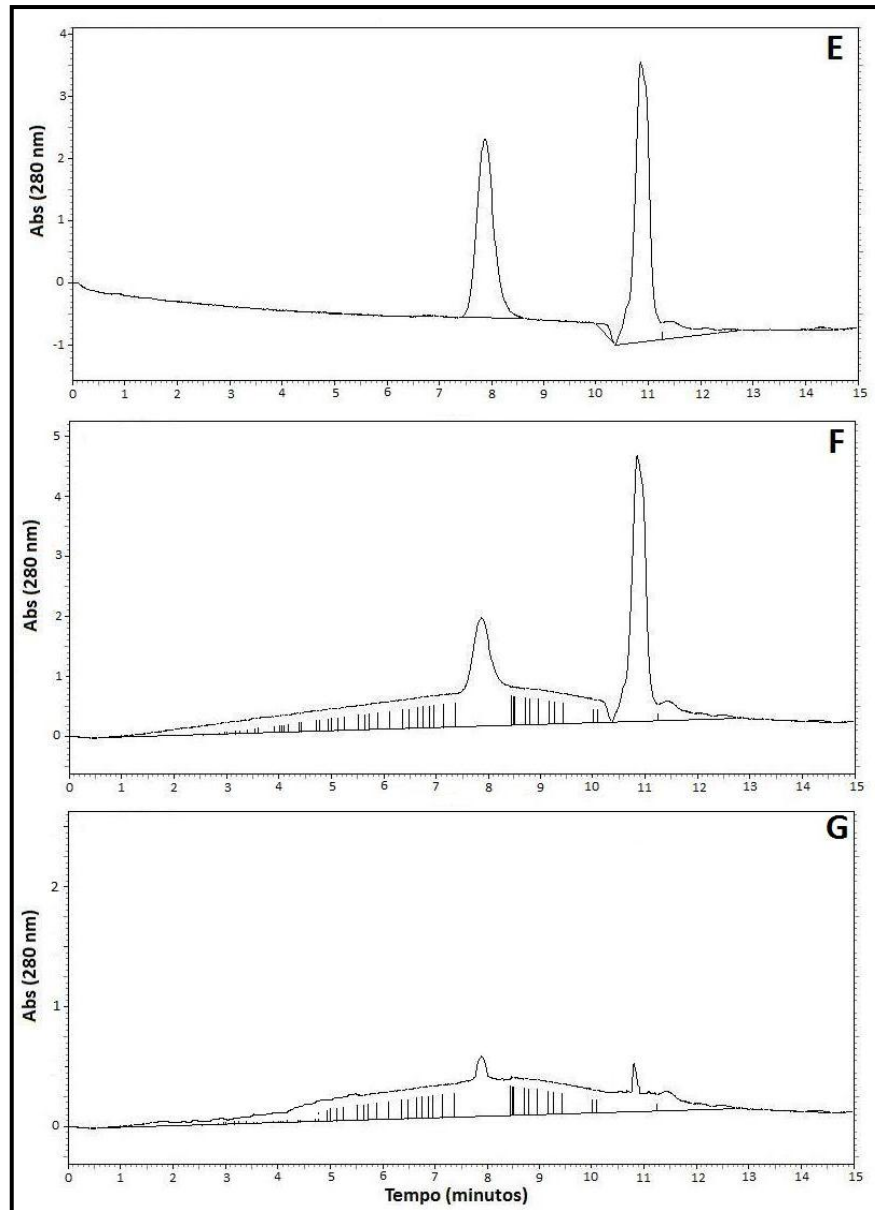


FIGURA 21.1 – Cromatograma do ultrafiltrado obtido por meio da purificação do imunocombinado por dispositivo de ultrafiltração de proteína. Em **E**, 5ª centrifugação, **F**, 6ª centrifugação e em **G**, 7ª centrifugação.

5.4 Cálculo da concentração de anticorpo

Quando o Acm é submetido à purificação antes e após a conjugação, há perda de massa protéica independente do método utilizado.

Para determinar a massa de Acm presente na amostra após estes procedimentos, construiu-se uma curva de calibração com diferentes amostras de Acm

de concentração conhecidas.

Na FIG. 21 observa-se a curva de calibração construída.

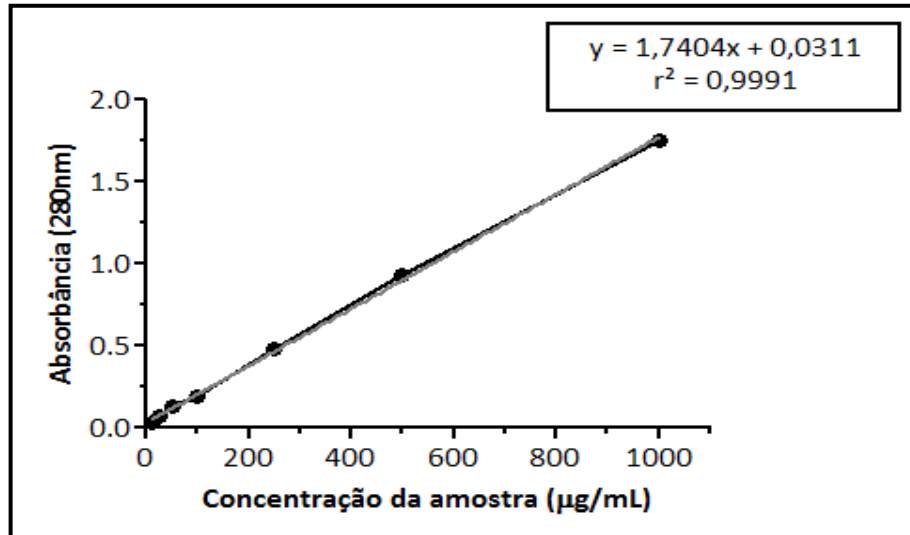


FIGURA 22 - Curva de calibração do rituximab não conjugado.

A equação da reta foi calculada pelo programa GraphPad Prism 5.00. Com este dado desenvolveu-se a EQ. 12, a qual tornou possível o cálculo da concentração de Acm na amostra.

(12)

Em que:

[Acm] é a concentração de rituximab na amostra;

Abs é a absorbância da amostra obtida em espectrofotômetro a 280 nm.

A perda de massa proteica foi inferior a 10% quando foram utilizados tubos concentradores.

5.5 Desenvolvimento do perfil cromatográfico em coluna PD-10

Diversos autores valem-se da purificação do Acm radiomarcado a fim de

obterem produtos radioquimicamente puros, seja ela realizada em aparelhos de CLAE ou colunas de Sephadex G25/G50 (Brouwers, et al., 2003; Mohsin et al., 2006; Jalilian et al., 2008; Hens et al., 2009; Rasaneh et al., 2009; Rasaneh et al., 2010a; Rasaneh et al., 2010b; Audicio et al., 2011).

Para este trabalho, foi utilizado como método de purificação pós-marcação uma coluna de Sephadex G25 com 10 cm de altura (PD-10).

Ao eluir o Acm, o DOTA-NHS-éster e o $^{177}\text{LuCl}_3$ separadamente, foi observado uma ótima separação destas espécies (FIG. 22 e 23).

O rituximab foi coletado nas frações de 5-7 mL e o DOTA-NHS-éster nas frações de 10-13 mL, não havendo sobreposição de picos (FIG. 22).

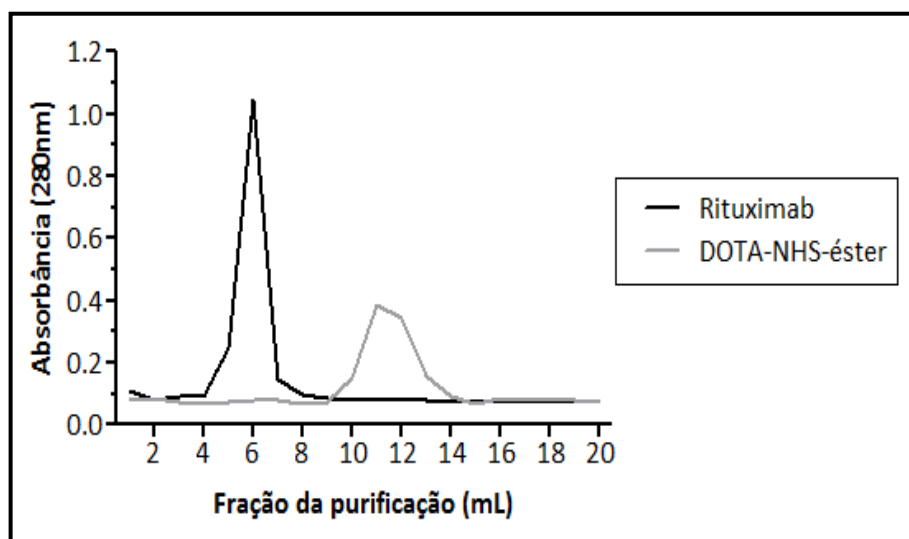


FIGURA 23 - Perfil cromatográfico do rituximab e DOTA-NHS-éster em coluna PD-10.

Já o $^{177}\text{LuCl}_3$ por se tratar de uma espécie de tamanho muito menor que as anteriormente citadas, ficou retido por mais tempo na coluna e foi coletado com muito arraste. A retenção foi tamanha, que após coletar a fração de 24^o mL, ainda restava metade da atividade injetada na coluna. Foi necessário eluir mais 50 mL de tampão para retirar toda a atividade. Estes 50 mL foram coletados em um único frasco, razão pela qual a fração correspondente ao 75^o mL apresentou um pico de 16,6 MBq, como observado na FIG. 23.

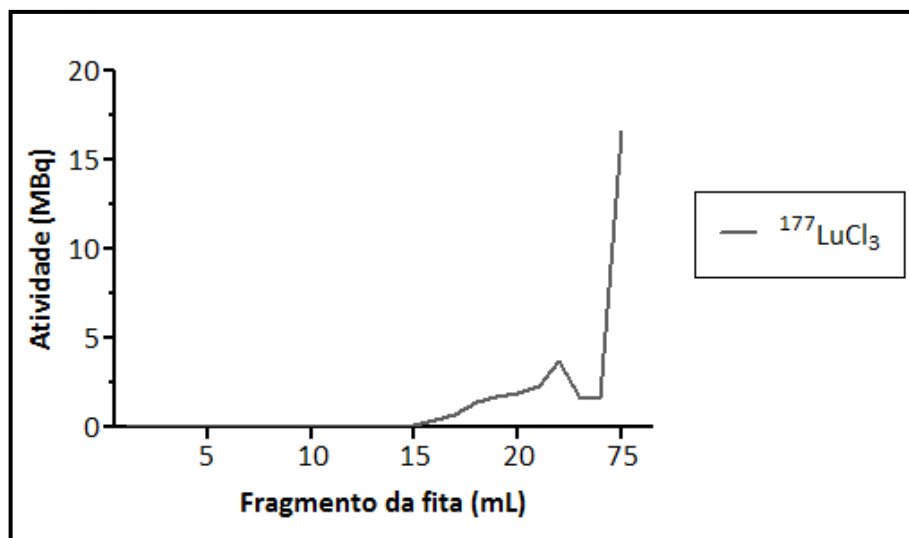


FIGURA 24 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ em coluna PD-10.

5.6 Estudos de imunoconjugação

A determinação de grupamentos quelantes acoplados ao Acm, é um meio de avaliar a eficiência do método de conjugação (Lewis et al., 1994).

Além deste parâmetro, avaliou-se a estabilidade da conjugação perante condições de armazenamento diferentes. O imunoconjugado foi radiomarcado ao final de cada tempo e a pureza radioquímica foi analisada.

A determinação do número de grupamentos quelantes acoplados ao Acm foi feita em várias etapas do processo de conjugação e observou-se que em 1 hora de conjugação a incorporação de quelante foi pequena, especialmente quando foi empregada razões molares menores (TAB. 4).

A incorporação no tempo de 48 horas foi maior que no tempo de 24 horas, no entanto, esses valores não foram reproduzíveis. Com base nestes resultados, o tempo de 24 horas foi escolhido como padrão para o processo de conjugação.

TABELA 4 - Número de grupamentos quelantes por anticorpo. Condições de marcação: 1h à 43 °C, 350 rpm (*n =3; **n = 4; ***n = 5)

Razão molar (rituximab:DOTA)	Condições de imunoconjugação		
	1 h/ temperatura ambiente	24 h/ 2-8 °C	48 h/ 2-8 °C
1:1000*	2,70 – 8,98	3,15 – 39,13	3,04 – 5,28
1:500*	1,49 – 7,76	1,36 – 8,67	7,60 – 13,10
1:250*	1,90 – 4,48	3,37 – 3,58	-
1:50**	-	1,05 – 7,41	-
1:20***	0,77 – 0,15	1,27 – 7,15	-
1:10**	0,06 – 0,99	0,17 – 2,45	-
1:5**	0,07 – 0,16	0,11 – 0,31	-

A eficiência do método padrão de conjugação, que consistiu em submeter a mistura de reação à agitação leve por 1 hora seguido de incubação por toda a noite à 2-8 °C, foi testada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nos cromatogramas de CLAE realizados após a conjugação e antes da purificação, notou-se um deslocamento para a esquerda do pico correspondente ao Acm. Este deslocamento aumentou proporcionalmente com o aumento do excesso molar de quelante empregado na conjugação, indicando o aumento do peso molecular do Acm, já que, foi utilizada uma coluna de exclusão molecular (TAB. 5 e FIG. 23).

Sendo assim, é possível afirmar que o deslocamento do pico correspondente ao Acm indica que houve um aumento de sua massa molecular, fato possível devido à incorporação de grupamentos quelantes à sua estrutura.

TABELA 5 - Tempo de retenção (TR) do rituximab, DOTA-NHS-éster e rituximab-DOTA (conjugado em diferentes razões molares) em CLAE.

Espécie	Tempo de retenção (minutos)
Rituximab	8,04
DOTA-NHS-éster	10,78
Rituximab-DOTA (1:5)	7,95
Rituximab-DOTA (1:10)	7,93
Rituximab-DOTA (1:20)	7,88

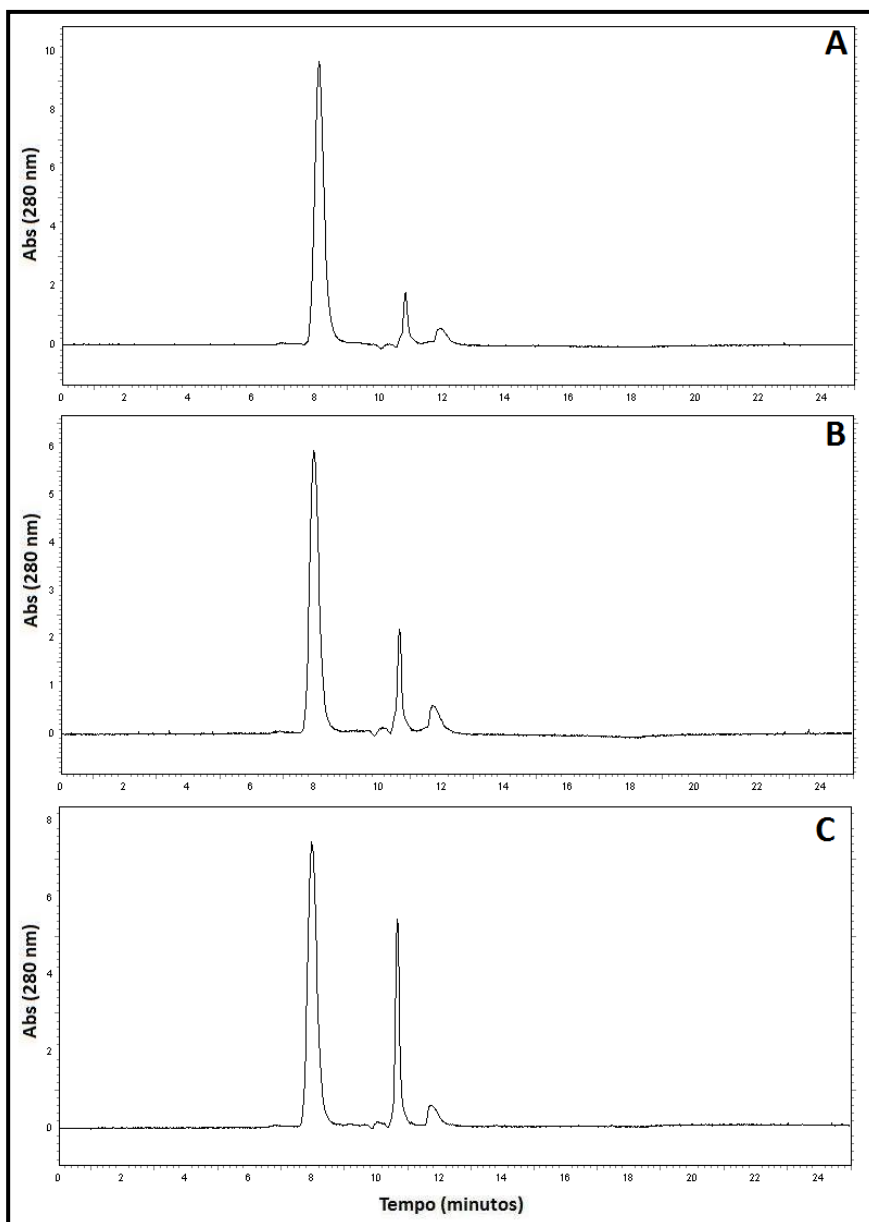


FIGURA 25 - Cromatograma do rituximab-DOTA não purificado. Conjugação realizada nas razões molares 1:5 (A), 1:10 (B) e 1:20 (C).

Os picos correspondentes ao quelante também apresentaram Abs proporcionais ao excesso molar empregado, sendo menor na razão 1:5 (FIG. 24A) e maior na razão 1:20 (FIG. 24C).

Ao realizar a análise dos três cromatogramas, foi observado a existência de um terceiro composto de peso molecular menor do que as espécies principais, apresentando um tempo de retenção de 11,91 minutos.

Segundo a literatura consultada, este pico corresponde a fragmentos protéicos formados durante a reação de conjugação (Ferrer et al., 2009).

5.7 Análise da estabilidade da imunoconjugação por CLAE

Outro meio de avaliar a estabilidade da imunoconjugação foi por cromatografia líquida de alta eficiência, determinando-se a porcentagem dos picos de rituximab-DOTA e DOTA livre. Desta forma, foi possível avaliar se houve um desacoplamento do quelante. A análise por CLAE também foi interessante, pois possibilitou verificar se a proteína sofreu algum dano em virtude do tempo e do meio de armazenamento.

Um cromatograma (UV) por CLAE foi obtido imediatamente após a purificação do imunoconjugado, e este foi considerado como padrão na comparação dos demais perfis (FIG. 25). Este mesmo Acm imunoconjugado e purificado foi armazenado por diferentes tempos em duas temperaturas diferentes (2-8 °C e -20 °C). Ao final de cada tempo, obteve-se um cromatograma (UV) por CLAE e as áreas dos picos do rituximab-DOTA e DOTA livre foram calculadas. Os dados obtidos por até 240 dias estão expressos na TAB. 6.

Até o período de 240 dias a concentração de rituximab-DOTA foi superior a 91%, sugerindo um desacoplamento mínimo do quelante. Estes resultados são confirmados pelos cromatogramas em 280 nm (FIG. 26, 26.1, 27, 27.1, 28 e 28.1). Observou-se uma tendência de desacoplamento do quelante após 30 dias de armazenamento à -20 °C na razão molar 1:5 (FIG. 26F), no entanto este desacoplamento não é significativo, visto que este pico representa apenas 0,96% do pico correspondente ao rituximab-DOTA.

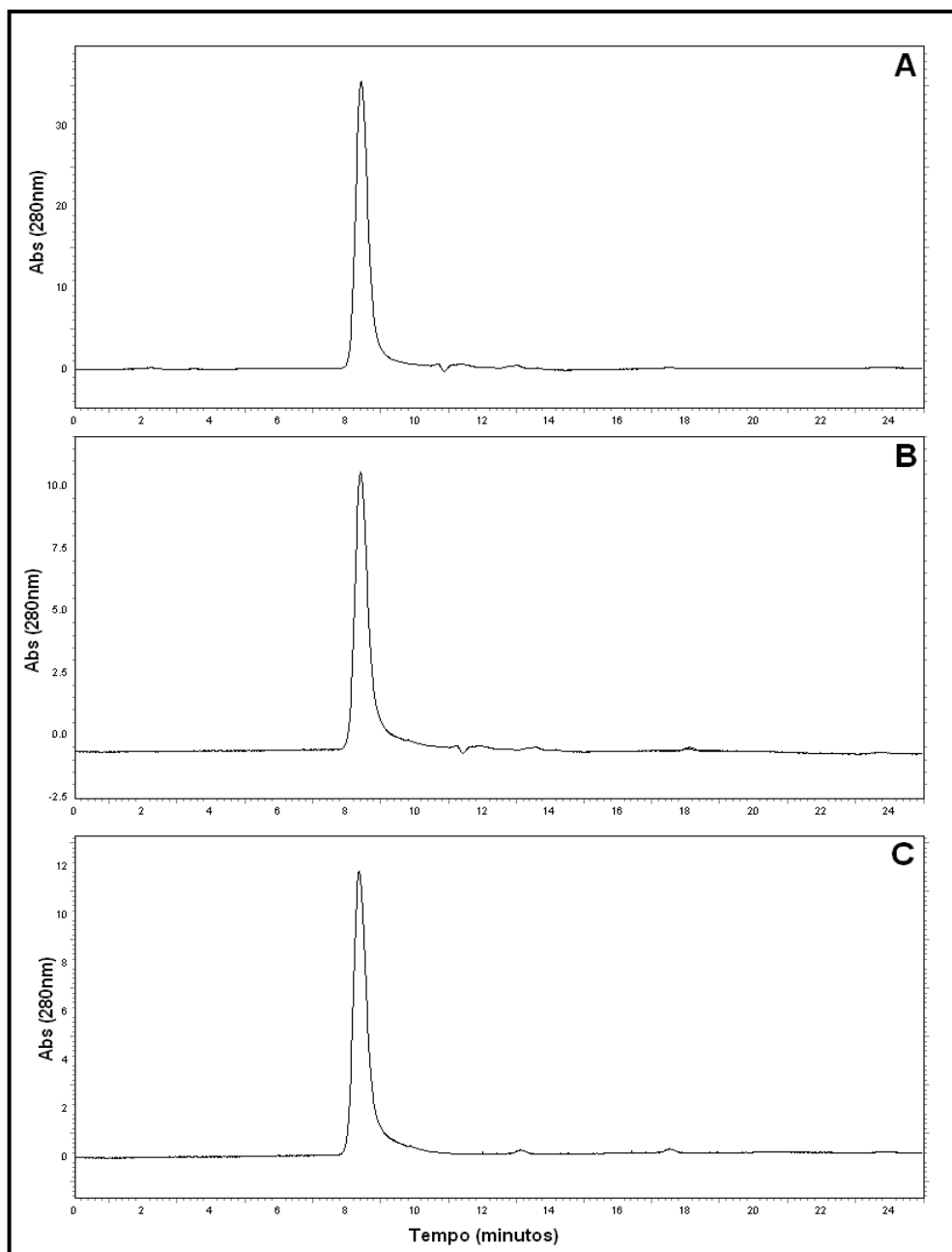


FIGURA 26 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA realizado imediatamente após a purificação do conjugado nas seguintes razões molares: (A) 1:5; (B) 1:10 e (C) 1:20.

TABELA 6 - Estabilidade da conjugação em diferentes condições de armazenamento por até 240 dias (n = 1).

Razão molar (Acm:DOTA)	Espécie	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO															
		Imediato	7 dias		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias		90 dias		240 dias		
			2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	2-8 °C	-20 °C	
1:5	T.R. rituximab-DOTA (min.)	7,95	7,95	7,95	7,94	7,95	7,95	7,93	8,21	8,04	8,07	8,06	8,18	8,06	7,97	8,01	
	T.R. DOTA (min.)	10,71	10,76	10,71	10,81	10,85	10,75	10,78	10,71	10,9	10,83	10,83	10,62	10,61	10,9	10,96	
	% de DOTA- Rituximab	99,38	99,98	99,9	99,8	99,85	99,98	99,04	99,78	99,27	91,02	94,65	99,66	98,69	99,21	98,89	
	% de DOTA	0,62	0,02	0,1	0,2	0,15	0,02	0,96	0,22	0,73	8,98	5,35	0,34	1,31	0,79	1,11	
1:10	T.R. rituximab-DOTA (min.)	7,93	7,93	7,93	7,94	7,94	7,93	7,94	7,94	7,93	8,05	8,05	7,95	7,92	7,97	7,95	
	T.R. DOTA (min.)	10,71	10,77	10,71	10,82	10,77	10,89	10,82	10,8	10,74	10,83	10,83	10,79	10,78	10,8	10,96	
	% de DOTA- Rituximab	99,55	99,99	99,93	99,78	99,89	99,52	99,33	99,9	99,97	93,58	94,51	99,99	99,93	99,75	93,55	
	% de DOTA	0,45	0,01	0,07	0,22	0,11	0,48	0,67	0,1	0,03	6,42	5,49	0,01	0,07	0,25	6,45	
1:20	T.R. rituximab-DOTA (min.)	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,88	7,88	7,98	7,88	8,01	7,99	7,88	7,87	8,01	7,91	
	T.R. DOTA (min.)	11,35	10,75	10,75	10,77	10,72	10,73	10,75	10,7	10,65	10,83	10,82	10,82	10,83	10,99	10,81	
	% de DOTA- Rituximab	98,02	99,86	99,96	99,97	99,96	99,95	99,91	99,99	99,97	95,01	99,47	99,95	99,97	93,44	99,65	
	% de DOTA	1,98	0,14	0,04	0,03	0,04	7,95	7,93	0,01	0,03	4,99	0,53	0,05	0,03	6,56	0,35	

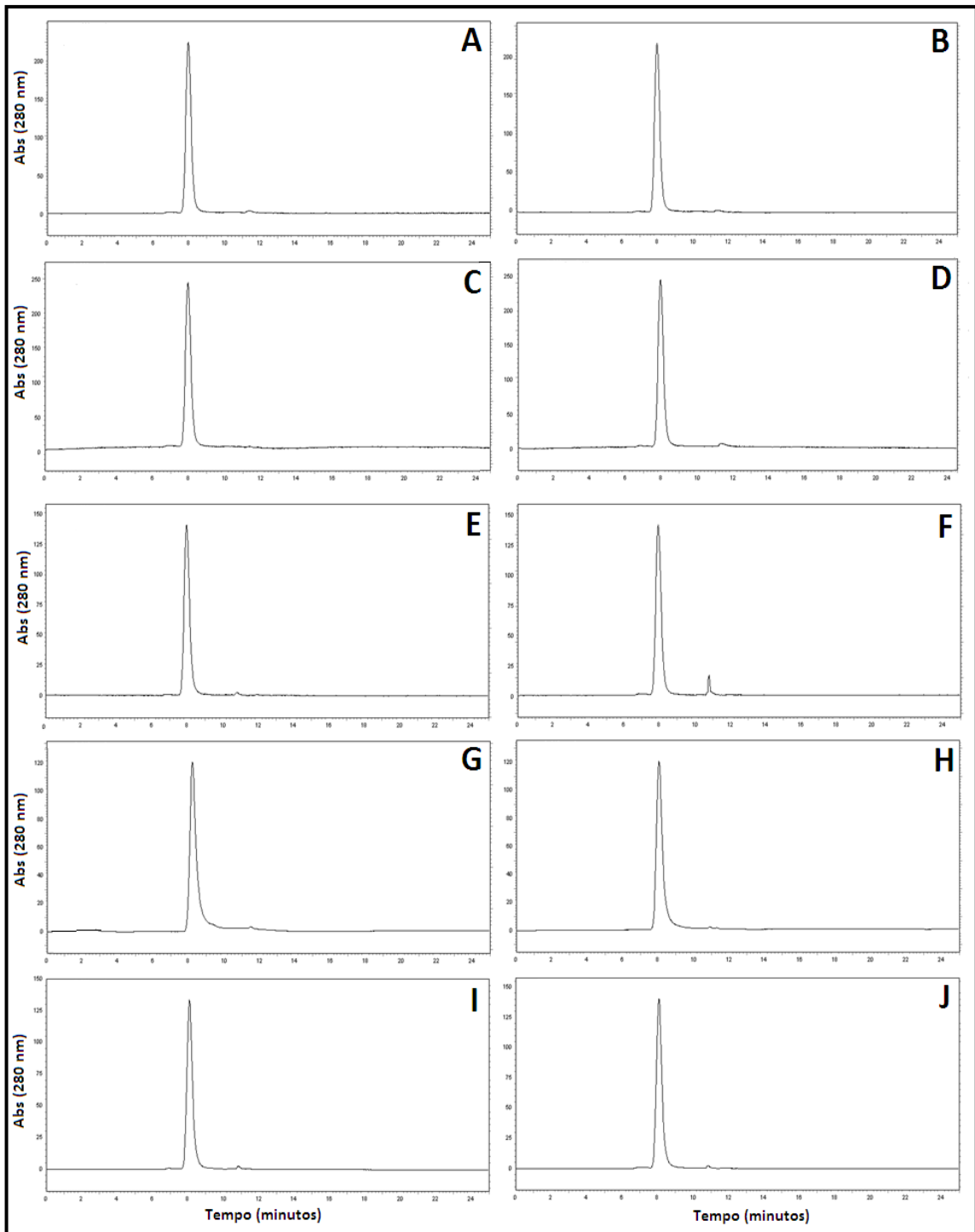


FIGURA 27 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:5** e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C; (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.

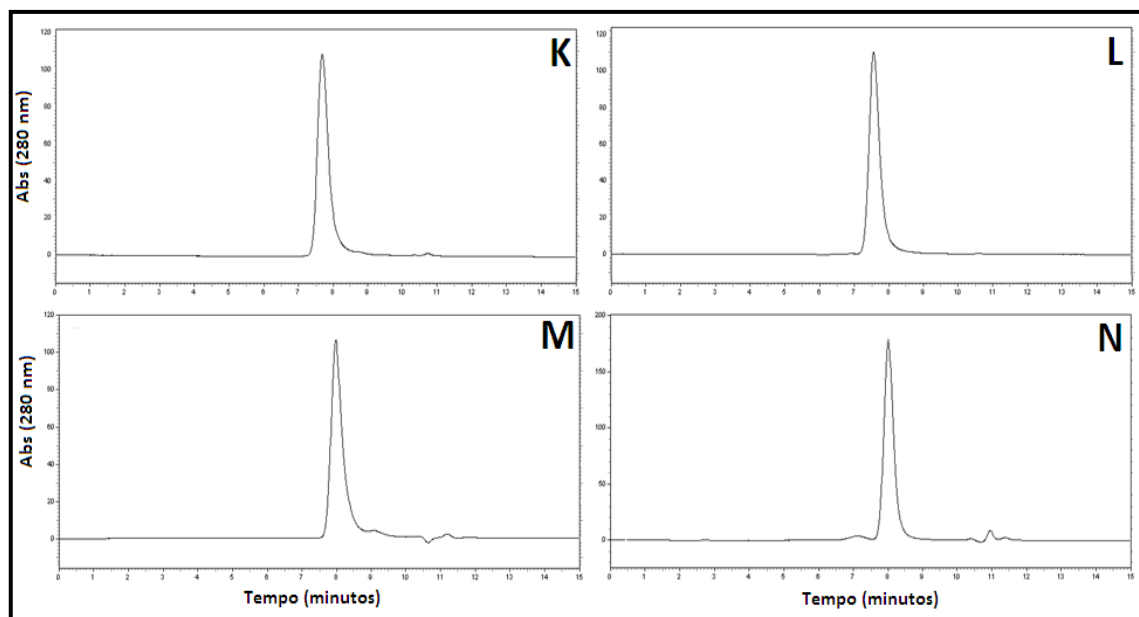


FIGURA 27.1 – Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:5** e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.

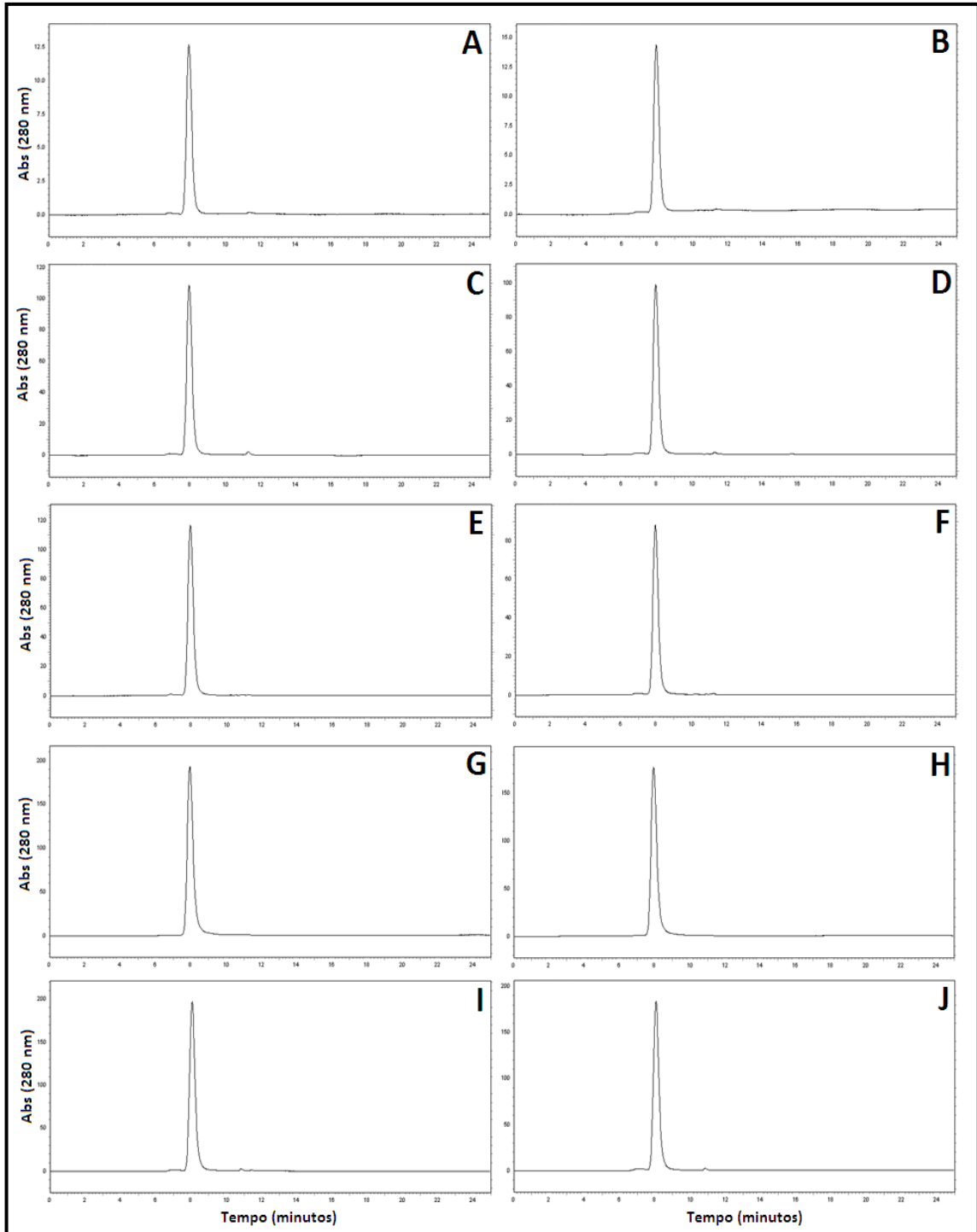


FIGURA 28 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:10** e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C, (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.

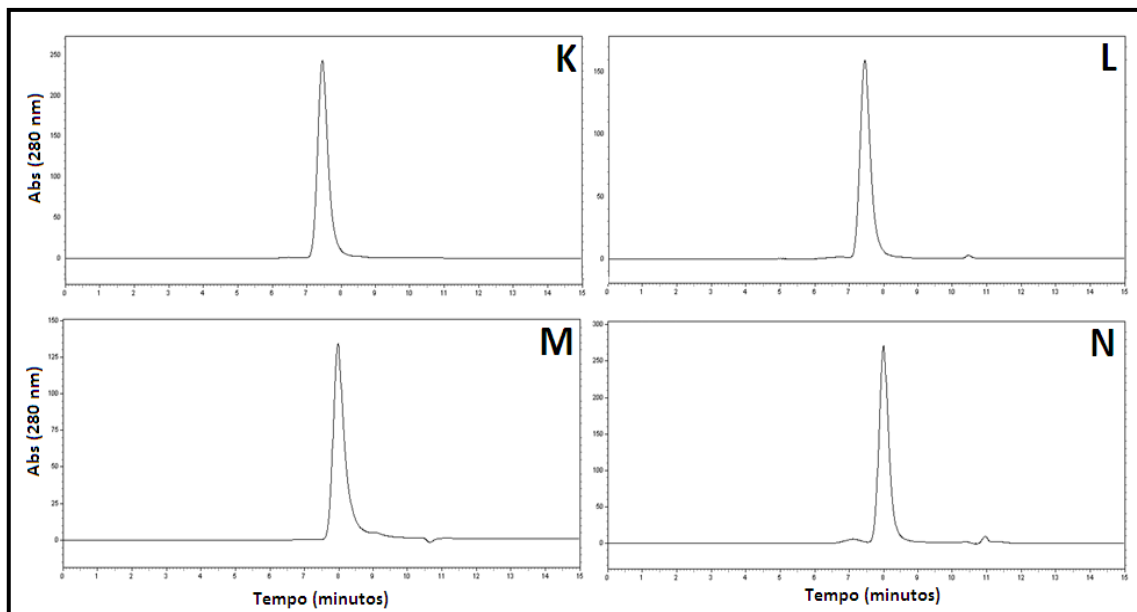


FIGURA 28.1 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:10** e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.

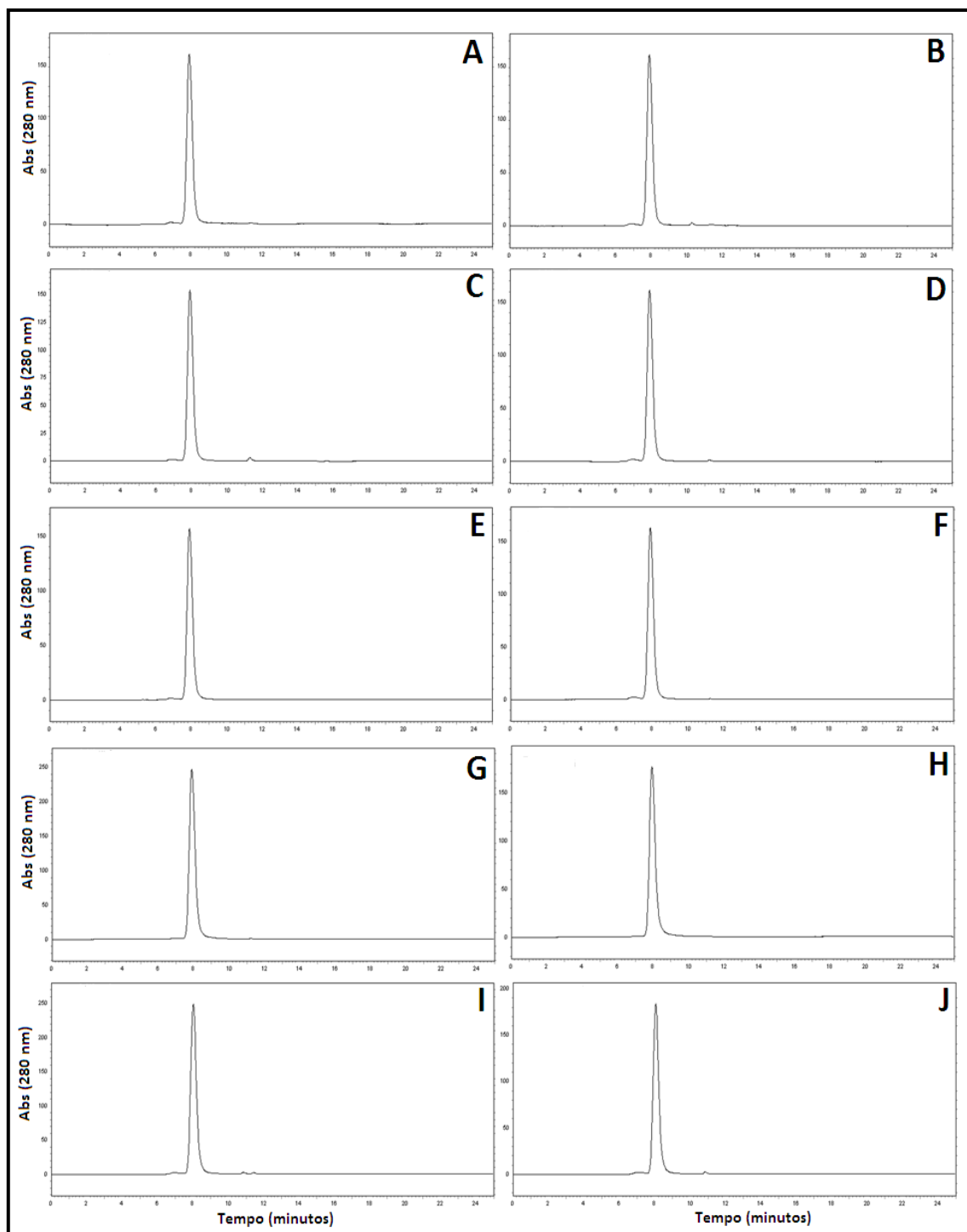


FIGURA 29 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:20** e armazenado por (A) 7 dias à 2-8 °C; (B) 7 dias à -20 °C; (C) 15 dias à 2-8 °C; (D) 15 dias à -20 °C; (E) 30 dias à 2-8 °C; (F) 30 dias à -20 °C; (G) 45 dias à 2-8 °C; (H) 45 dias à -20 °C; (I) 60 dias à 2-8 °C e (J) 60 dias à -20 °C.

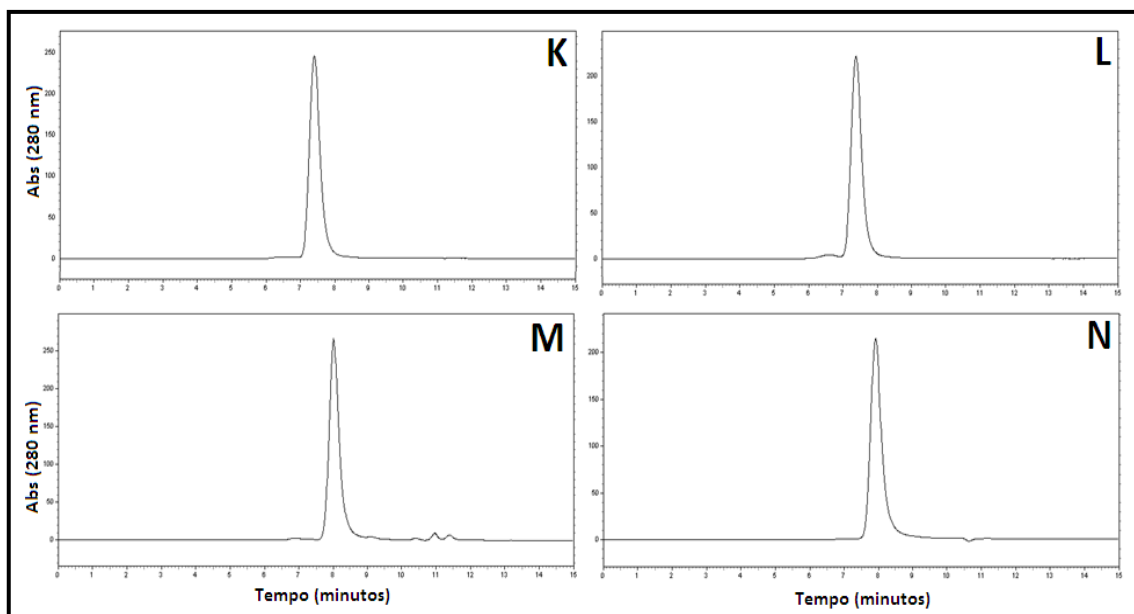


FIGURA 29.1 - Cromatograma de CLAE (UV) do rituximab-DOTA conjugado na razão **1:20** e armazenado por (K) 90 dias à 2-8 °C; (L) 90 dias à -20 °C; (M) 240 dias à 2-8 °C e (N) 240 dias à -20 °C.

Os cromatogramas indicaram que a imuconjugação permaneceu estável por até 240 dias para as duas condições de armazenamento e para as três razões molares diferentes, o que condiz com os dados encontrados na literatura (Jalilian et al., 2008; Audicio et al., 2011).

5.8 Radiomarcção do imuconjugado com ^{177}Lu

A radiomarcção de anticorpos conjugados com DOTA utilizando radiometais trivalentes como ^{111}In e ^{90}Y , são geralmente realizadas por prolongada incubação à temperatura ambiente do imunoconjugado com o radiometal. Exposições do Acm a soluções relativamente concentradas de emissores de energia β^- (como o ^{90}Y e ^{177}Lu) por um longo período resulta em uma significativa radiólise da proteína. Então, uma rápida e eficiente incorporação do radiometal ao Acm-DOTA é desejável (Lewis et al., 1994).

Pensando nisso, o método padrão utilizado para a realização das radiomarcções foi a condição otimizada desenvolvidas por Lewis e colaboradores (1994). Desta forma, a condição padrão foi: 1 hora à 43 °C, pH 5,5 – 6,0, 200 μL de volume final e

agitação constante de 350 rpm.

Os resultados das radiomarcações nestas condições, bem como a estabilidade do imunoc conjugado obtido para as razões molares 1:250, 1:500 e 1:1000 em diferentes condições de armazenamento, estão ilustrados nas FIG. 29, 30 e 31, respectivamente. É possível observar que imediatamente após a purificação, os compostos foram radiomarcados com pureza radioquímica relativamente baixa (inferior a 85%), sugerindo a necessidade de purificação do imunoc conjugado radiomarcado (purificação pós radiomarcação).

Este procedimento não foi avaliado, pois a alta incorporação de grupamentos quelantes ao Acm (TAB. 3), originou ligações rituximab-DOTA instáveis, fato evidenciado pela baixa pureza radioquímica dos compostos radiomarcados após diferentes tempos de armazenamento (FIG. 29, 30 e 31).

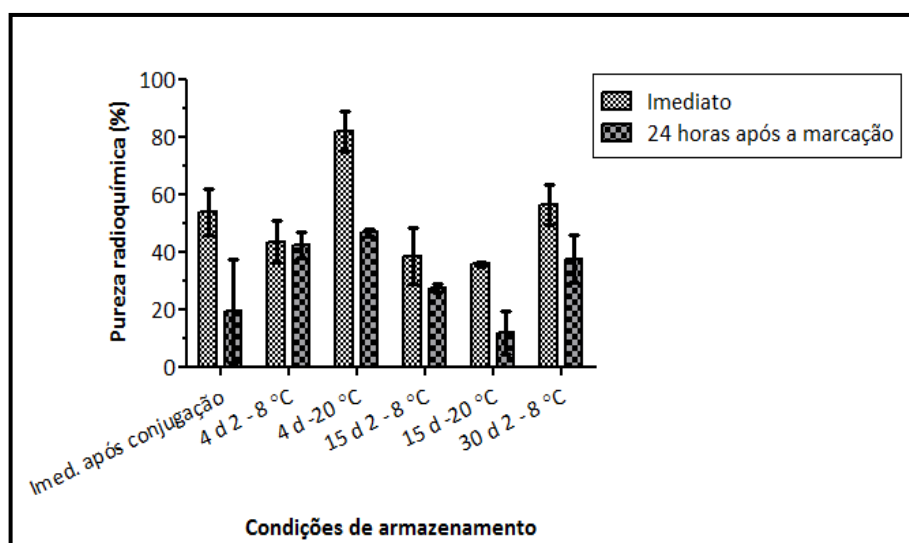


FIGURA 30 - Estabilidade do rituximab-DOTA (**1:250**) purificado e armazenado em diferentes condições. Condições de radiomarcação: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

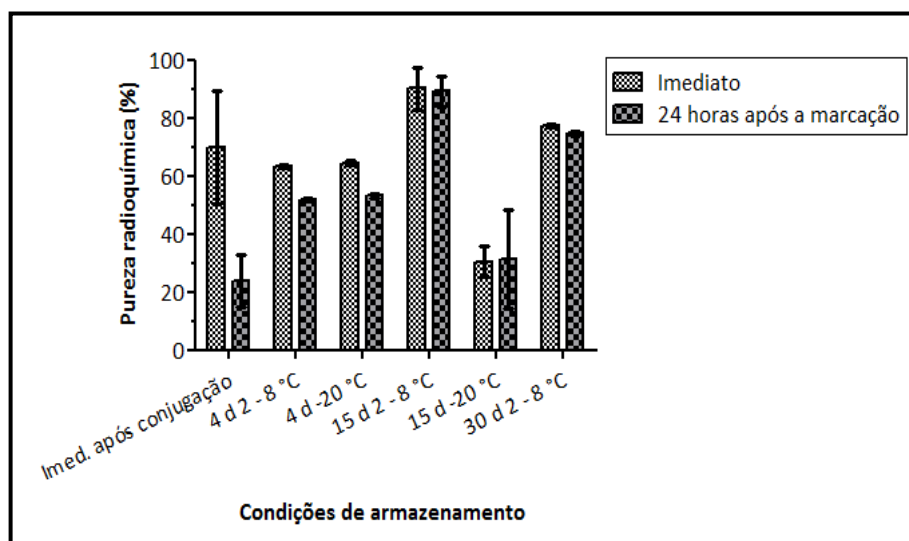


FIGURA 31 - Estabilidade do rituximab-DOTA (**1:500**) purificado e armazenado em diferentes condições. Condições de radiomarcção: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

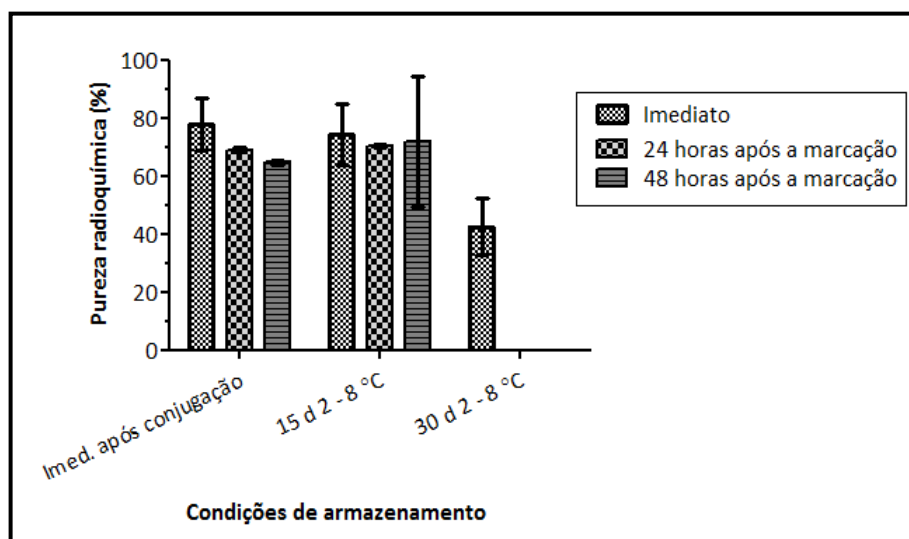


FIGURA 32 – Estabilidade do rituximab-DOTA (**1:1000**) purificado e armazenado em diferentes condições. Condições de radiomarcção: 1mg de rituximab-DOTA purificado, 111-148 MBq (3 - 4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

Os resultados de pureza radioquímica das radiomarcções utilizando-se Acm conjugado nas razões molares altas (1:250, 1:500 e 1:1000) foram semelhantes,

especialmente quando consideradas as radiomarcações realizadas imediatamente após a conjugação, com valores discretamente maiores para o Acm conjugado na razão molar 1:1000. Apesar da pureza radioquímica nesta condição (radiomarcação imediatamente após a purificação) aumentar conforme aumenta a razão molar, estes valores não são estatisticamente diferentes ($p=0,3875$).

Os resultados das marcações realizadas com os imunocorregados armazenados após a conjugação revelaram que a condição de armazenamento em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (congelamento), não contribuiu para a estabilidade do imunocorregado quando radiomarcado, já que melhores resultados foram obtidos com os imunocorregados armazenados sob refrigeração ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Os valores de pureza radioquímica deste estudo oscilaram para melhor e para pior, com valores nem sempre lógicos, quando se esperava obter resultados piores ou pelo menos iguais aos obtidos para a radiomarcação realizada imediatamente após a conjugação. Todos estes resultados incoerentes foram analisados quanto a sua significância em relação ao imunocorregado radiomarcado após a purificação. Os valores de p obtidos foram maiores que 0,07 indicando que esta aparente incoerência na verdade não é significativa.

No entanto, estes resultados podem ser explicados, em parte, pela influência da atividade específica do $^{177}\text{LuCl}_3$ na radiomarcação, tendo em vista que esta propriedade do radionuclídeo variou de 596,2 a 920,3 $\text{GBq}\cdot\text{mg}^{-1}$, conforme informado no certificado de qualidade do fabricante.

A estrutura terciária de uma proteína globular é responsável por sua função biológica e essa conformação é estabilizada, em grande parte, por interações fracas como as pontes de dissulfeto e as ligações não-covalentes (Nelson et al., 2002).

A porção Fab do rituximab é uma estrutura muito complexa (FIG. 7) que possui interações fracas e portanto altamente susceptível à desnaturação.

Sabe-se que o DOTA se complexa ao Acm ligando-se aos grupamentos NH_2 dos resíduos de lisina da proteína (Lewis et al., 1994). Quando muitos destes resíduos são modificados, há uma maior possibilidade de haver ligações em resíduos críticos para a principal função biológica do Ac: o reconhecimento do antígeno. Em outras palavras,

quanto mais grupamentos quelantes se ligarem à estrutura protéica, maior será a probabilidade deste Ac perder sua imunorreatividade (Ferrer et al., 2009).

Este aspecto foi avaliado por Ferrer e colaboradores (2009) que relataram uma perda de imunorreatividade do imunoconjugado quando mais de 8 quelantes se acoplavam ao Acm e sugeriu conjugações com razões molares menores.

Com o objetivo de preservar a função biológica do Acm e seguindo as tendências de trabalhos recentemente publicados, também foram estudadas razões molares mais baixas: 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50 (Reilly et al., 2004; Rasaneh et al., 2009; Hens et al., 2009; Ferrer et al., 2009; Audicio et al., 2011).

Na TAB. 7 apresentam-se os resultados da radiomarcção realizada imediatamente após a purificação do imunoconjugado para todas as razões molares estudadas. Em comparação com as purezas radioquímicas obtidas nos experimentos anteriores, observou-se um aumento significativo nos resultados ($p=0,006$). Os desvios padrões obtidos foram menores, quando comparados aos desvios obtidos nas radiomarcções com razões molares altas, sugerindo uma maior reprodutibilidade do método.

TABELA 7 – Pureza radioquímica do rituximab-DOTA-¹⁷⁷LuCl₃. Condições de radiomarcção: 1 mg de rituximab-DOTA, 148 MBq (4 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃, reação ocorreu por 1 hora a 43° C e 350 rpm. (*n = 2; **n = 3) († radiomarcção realizada com 5 mg).

Razão molar (rituximab:DOTA)	Pureza Radioquímica (%)
1:1000*	77,71 ± 9,07
1:500*	69,93 ± 19,64
1:250*	53,88 ± 8,05
1:50**†	96,12 ± 0,29
1:20**	97,40 ± 0,50
1:10**	96,18 ± 0,70
1:5**	89,92 ± 1,04

A estabilidade do rituximab-DOTA (1:5, 1:10 e 1:20) em diferentes condições de armazenamento é apresentada nas FIG. 32, 33 e 34.

A pureza radioquímica após 30 dias de estocagem, foi maior que 80% para a razão 1:5 (FIG. 32B) e maior que 85% para as razões 1:10 e 1:20 (FIG. 33 e 34).

Os resultados mostraram ainda que as radiomarcções realizadas a 43 °C fornecem resultados mais reprodutíveis. Isto comprova a baixa cinética de radiomarcção de quelantes bifuncionais macrocíclicos como o DOTA-NHS-éster (Mäcke et al., 2003; Cooper et al., 2006).

Com exceção à razão molar 1:5, representada na FIG. 32A, não foi possível definir qual o melhor método de armazenamento para o imunoc conjugado, visto que as purezas radioquímicas obtidas para ambas as condições (30 dias à 2-8 °C e 30 dias à -20 °C) não foram estatisticamente diferentes ($p=0,078$ para razão molar 1:10 e $p=0,091$ para razão molar 1:20).

Dado que, a principal característica dos anticorpos é sua capacidade de unir-se de forma extremamente seletiva ao antígeno; é importante determinar se o anticorpo, uma vez armazenado nestas condições, conserva suas propriedades imunorreativas (Konishi et al., 2004; Dias, 2005).

Este estudo será realizado posteriormente e tornará possível concluir o melhor método de armazenamento do imunocorjugado.

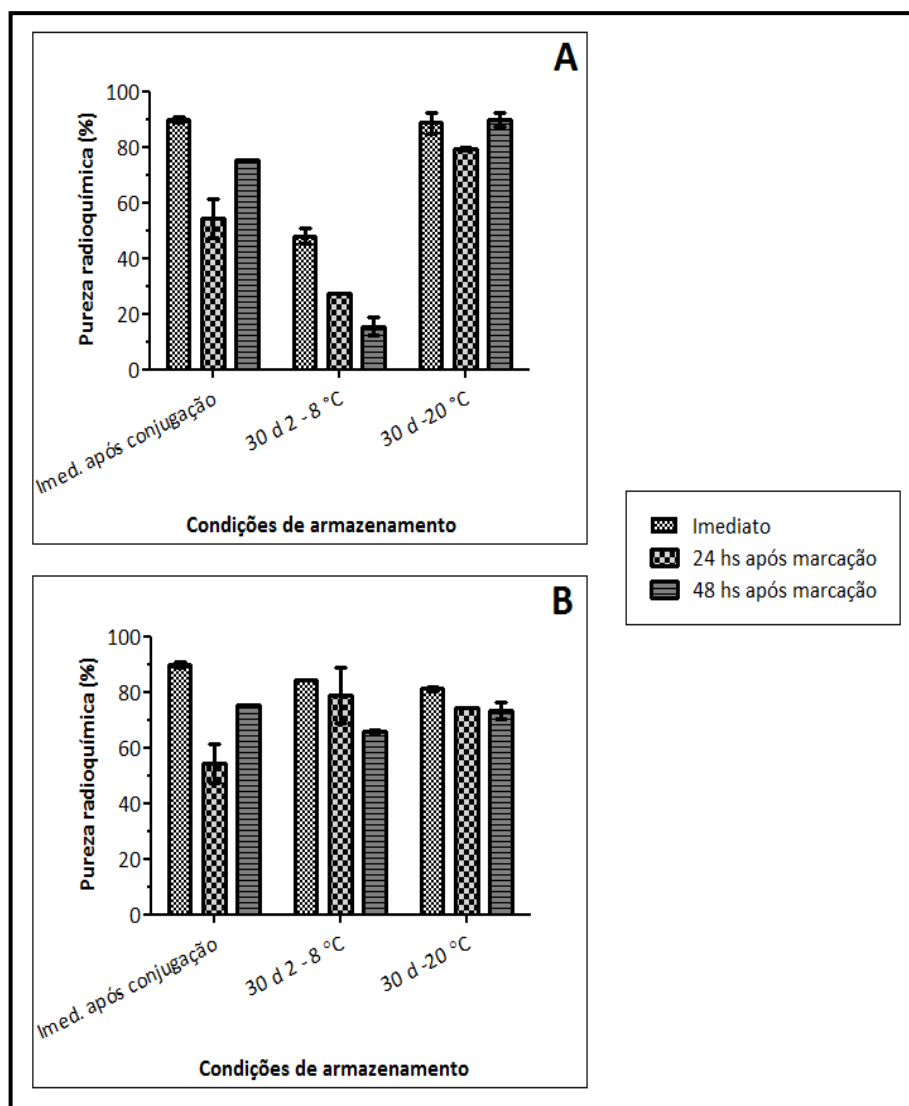


FIGURA 33 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:5). Em **A**, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 37 °C**; 200 μL ; 350 rpm. Em **B**, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 43 °C**, 200 μL , 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

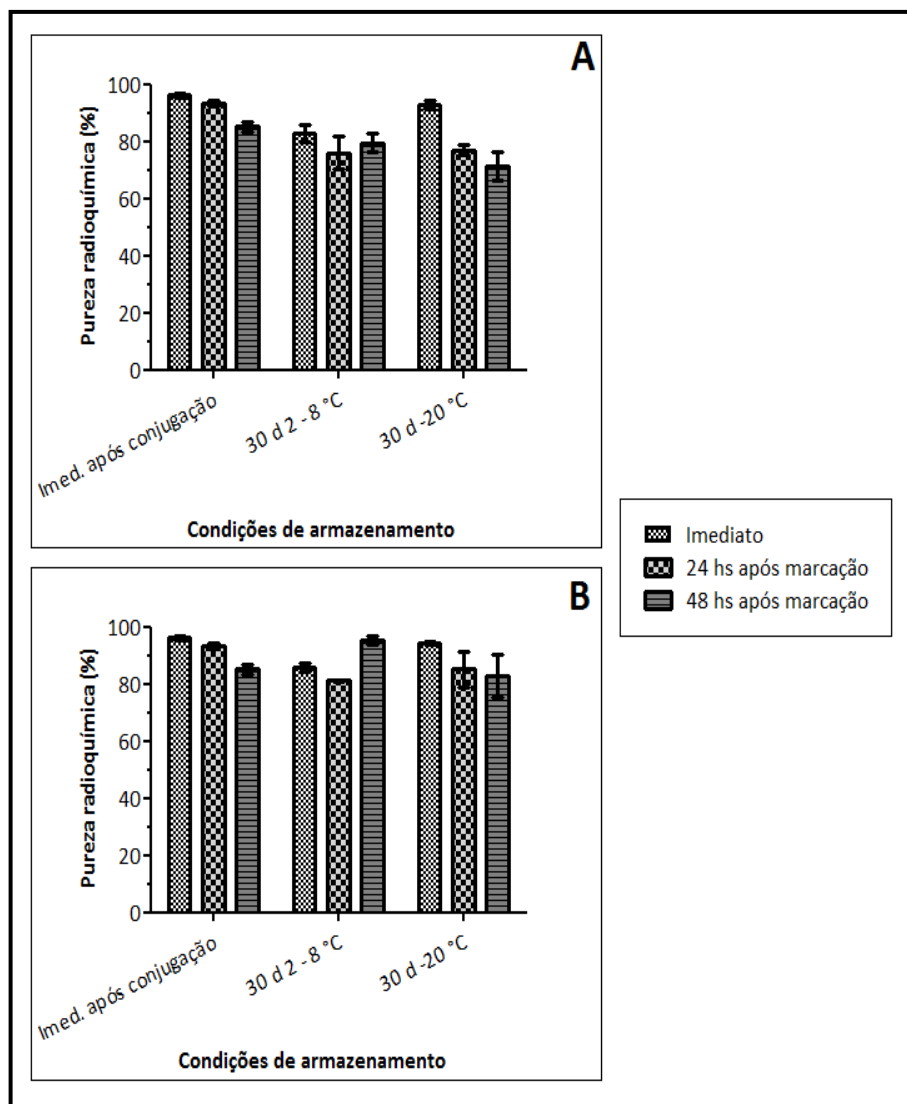


FIGURA 34 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:10). Em A, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 37 °C**; 200 μL ; 350 rpm. Em B, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 43 °C**, 200 μL , 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

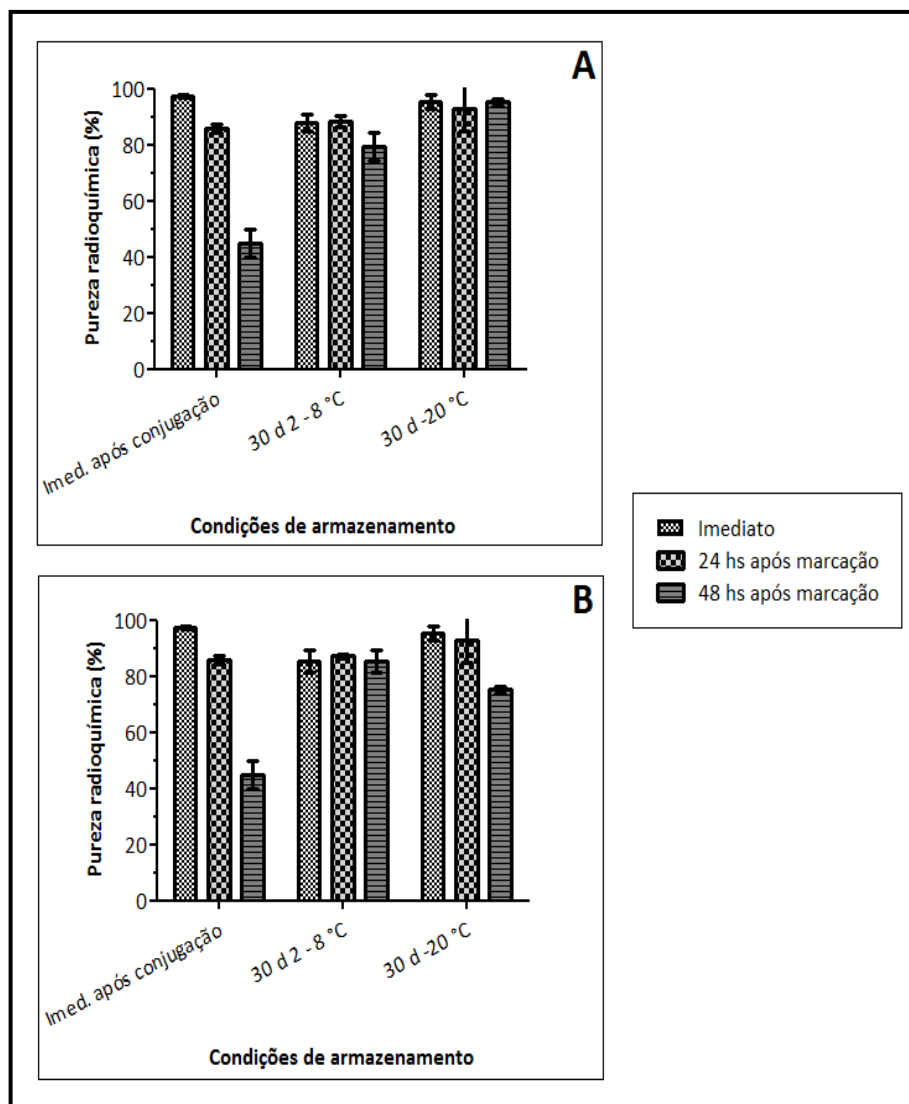


FIGURA 35 - Estabilidade do rituximab-DOTA purificado e armazenado em diferentes condições (razão molar 1:20). Em A, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 37 °C**; 200 μL ; 350 rpm. Em B, as condições de radiomarcagem foram: 1 mg do rituximab-DOTA purificado; 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$; **1 hora a 43 °C**, 200 μL , 350 rpm. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 2).

A fim de confirmar os resultados anteriormente obtidos, foram avaliadas três condições de radiomarcagem diferentes.

As purezas radioquímicas obtidas após a radiomarcagem do rituximab-DOTA com Lu-177 nestas três condições estão apresentadas na FIG. 35.

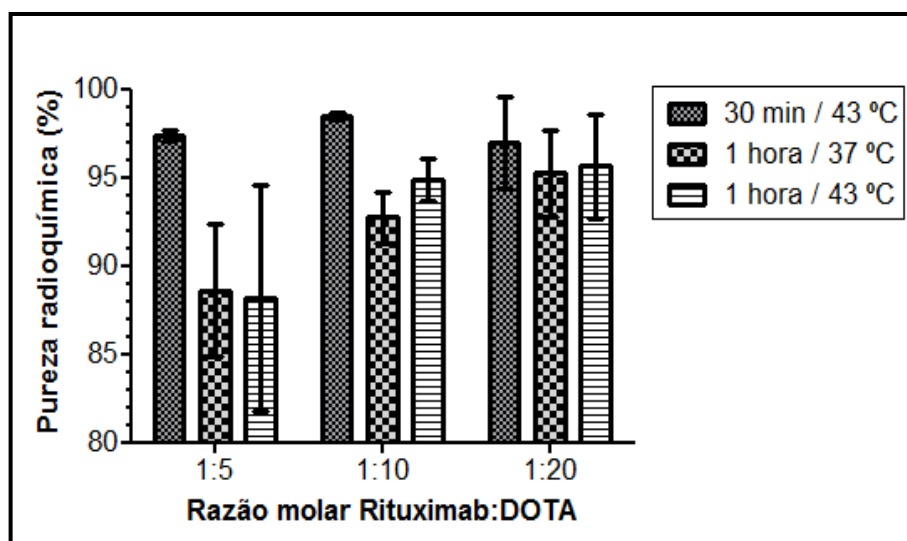


FIGURA 36 – Influência da temperatura e tempo de radiomarcção. Marcou-se 1 mg de rituximab-DOTA purificado com 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$. Tempo de radiomarcção imediato. Sistema cromatográfico: metanol:acetato de amônio 0,4 M (1:1 v/v) e papel Whatman nº 1 (n = 3 para condição 1 hora a 43 °C e n = 2 para as restantes).

A razão molar de 1:20 apresentou alta pureza radioquímica (superior a 95%) nas três condições. As condições de 30 minutos e 1 hora a 43 °C, apresentaram alta pureza radioquímica para as razões de 1:10 e 1:20 (superior a 95%) e razoável pureza para a razão de 1:5 (superior a 88%).

Apesar de ser uma condição interessante do ponto de vista de preservação da integridade protéica, a condição de 1 hora a 37 °C mostrou-se aplicável, e sem necessidade de purificação posterior, ou seja, apresentou pureza radioquímica superior a 95% , apenas para a razão molar de 1:20.

A condição padrão de radiomarcção, inicialmente proposta para este trabalho (1 hora / 43 °C), resultou em alta pureza radioquímica para as três razões molares e, portanto, foi mantida como condição padrão.

5.9 Variações da massa de rituximab-DOTA e estabilidade do rituximab-DOTA- ^{177}Lu

A atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ incorporada por mol de anticorpo, ou seja, a atividade

específica do radiofármaco é uma grandeza importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos radiofármacos (Saha, 1998, Thrall et al., 2003). Radiofármacos de baixa atividade específica tem baixo valor do ponto de vista da aplicação clínica, uma vez que, as moléculas não marcadas competem com as marcadas pela ligação aos receptores *in vivo*, além de provocarem toxicidade decorrente dos efeitos fisiológicos provocados por essa ligação. Em contrapartida, atividade específica muito alta pode provocar radiólise e, no caso específico de proteínas marcadas, desnaturação (Saha, 1998).

As duas razões molares estudadas (1:20 e 1:50), apresentaram pureza radioquímica dependente da massa de Acm, conforme demonstrado na FIG. 36. A maior pureza radioquímica foi obtida quando radiomarcou-se 5 mg da razão molar 1:50 (superior a 90%), com 148 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$, provavelmente devido ao maior número de espécies quelantes acopladas ao Acm, conferindo maior atividade específica (Forrer et al., 2009).

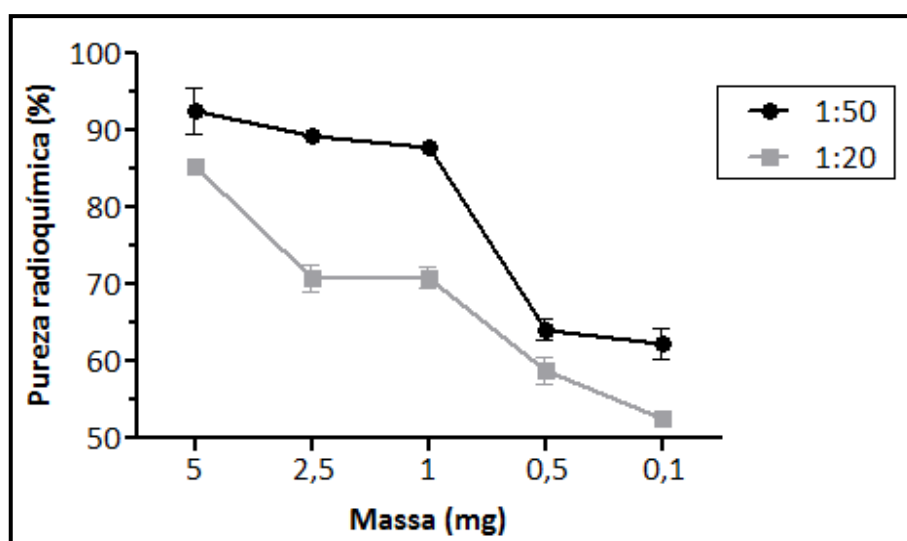


FIGURA 37 - Radiomarcção do Rituximab-DOTA com diferentes massas. Condições de radiomarcção: 148 MBq (4 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 1 hora à 43 °C, 350 rpm (n = 2).

Estudos posteriores deverão ser realizados radiomarcando 5 mg do imunoconjugado (1:50) com diferentes atividades do radionuclídeo.

A estabilidade do imunoconjugado radiomarcado nesta condição otimizada foi

analisada após armazenamento à 2-8 °C em geladeira por até 72 horas e à 37 °C em soro humano por até 24 horas. Os resultados da análise de estabilidade à 2-8° C são mostrados na TAB. 8. A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada e o composto apresentou queda de cerca de 10% na pureza radioquímica nas primeiras 24 horas após a radiomarcção. Esta porcentagem de pureza radioquímica manteve-se praticamente inalterada até 72 horas.

TABELA 8 - Estabilidade do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu a 2-8 °C. Condições de radiomarcção: 5 mg, 148 MBq (4 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃, 1 hora à 43 °C, 350 rpm (n = 2).

Pureza radioquímica				
Razão molar rituximab:DOTA	Imediato	24 horas	48 horas	72 horas
1:50	92,51 ± 2,98	83,55 ± 3,09	84,17 ± 2,28	83,66 ± 0,45

Estes resultados sugeriram a necessidade de investigar o efeito de agentes estabilizantes para manutenção da pureza radioquímica da radiomarcção (Audicio et al., 2011).

A adição de ácido gentísico ou ácido ascórbico na preparação será investigada, bem como o efeito da diluição e/ou congelamento da preparação na estabilidade da radiomarcção.

Para análise da estabilidade em soro humano, o imunoconjugado radiomarcado foi diluído em soro humano fresco e os perfis cromatográficos em TLC-SG foram examinados imediatamente e após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação a 37 °C. Os perfis obtidos são apresentados na FIG. 37. Pode-se observar que não houve formação de espécies com R_f diferente do imuconjugado, indicando que, apesar da pureza radioquímica diminuir com o tempo (TAB. 9), o imuconjugado é pouco metabolizado pelas enzimas plasmáticas.

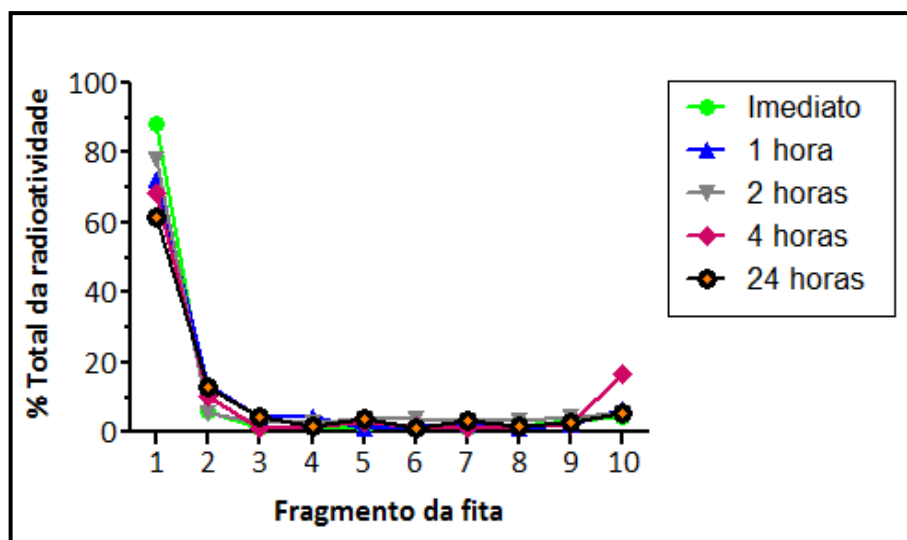


FIGURA 38 – Perfil cromatográfico do Rituxmab-DOTA-¹⁷⁷Lu em TLC-SG após incubação em soro humano a 37 °C.

TABELA 9 - Estabilidade do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano (n = 3).

Pureza Radioquímica (%)					
Razão molar rituximab:DOTA	Imediato	1 hora	2 horas	4 horas	24 horas
1:50	91,14 ± 0,95	87,42 ± 2,88	82,08 ± 5,27	78,46 ± 6,35	74,84 ± 11,47

5.10 Purificação em coluna PD-10

Uma pureza radioquímica maior do que 95% pode ser estabelecida como critério de aceitação para a aplicação clínica, tendo em vista a pequena porcentagem de radioisótopo livre (Thrall et al., 2003).

Além disso, a presença de impurezas no radiofármaco resulta em imagem de má qualidade devido à alta radiação de fundo provinda dos tecidos adjacentes e do sangue. Outro aspecto é a irradiação desnecessária dos tecidos não-alvo (Saha, 1998).

Para obter a pureza radioquímica necessária para aplicação *in vivo* do radioimunoc conjugado, pode-se lançar mão do procedimento de purificação.

Sendo assim, o imunoc conjugado radiomarcado, foi purificado por uma coluna de exclusão molecular (PD-10) e sua pureza radioquímica determinada por cromatografia em camada delgada (CCD).

A análise em CCD demonstrou a obtenção de um composto com pureza radioquímica superior a 97% ($97,21 \pm 1,03$; $n=3$). Este resultado foi confirmado pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Nesse sistema, o DOTA- ^{177}Lu ou o lutécio não ligado foi facilmente separado do rituximab-DOTA- ^{177}Lu pela diferença entre seus tempos de retenção.

O radiocromatograma de CLAE do rituximab-DOTA- ^{177}Lu purificado (FIG. 38) mostrou apenas uma pequena fração de DOTA- ^{177}Lu nas misturas de reação (menor que 3%), resultado da alta pureza radioquímica obtida. Com esta pureza, o rituximab-DOTA- ^{177}Lu pôde ser aplicado nos demais estudos.

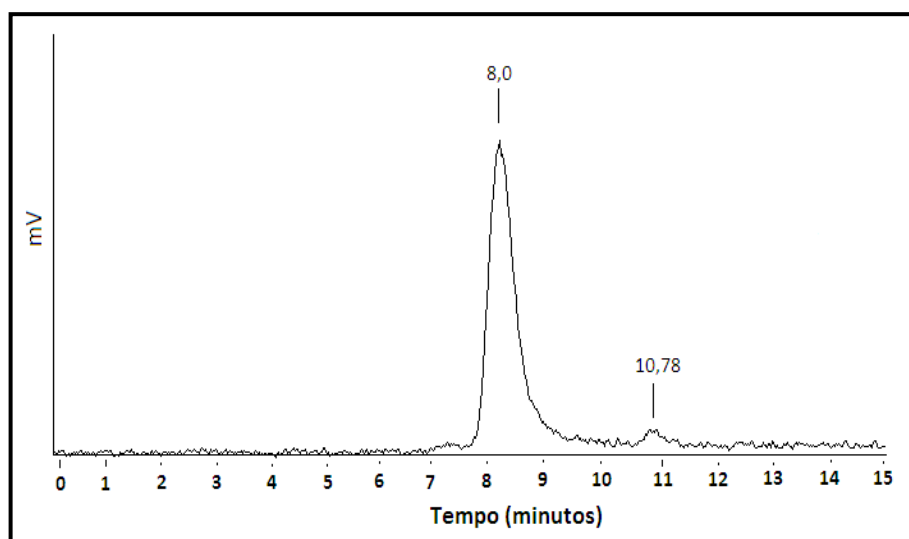


FIGURA 39 – Radiocromatograma de CLAE do rituximab-DOTA- ^{177}Lu após purificação em coluna PD-10.

5.11 Ligação às proteínas séricas

O sangue contém cerca de 93% de água e os 7% restantes é composto por proteínas, e a principal proteína é a albumina, correspondendo a 5% do total do plasma (Ritschel et al., 2009).

Essas proteínas exercem a função de transportar diferentes substâncias, como fármacos, pela corrente sanguínea, e para tanto é necessário que estas substâncias se liguem às proteínas plasmáticas. Esta ligação é um fenômeno reversível e não específico dependendo de muitos fatores, tais como pH e carga da droga, afinidade pelas proteínas plasmáticas, tamanho da droga, entre outros (Ritschel et al., 2009).

Assim como os fármacos não radioativos, os radiofármacos também se ligam à estas proteínas e aqueles que possuem quelantes metálicos podem sofrer um processo chamado de transquelação. Isso ocorre quando há a troca de íons metálicos com as proteínas. Contudo, quando comparados com o DTPA, anticorpos monoclonais radiomarcados via DOTA, apresentam maior estabilidade *in vivo* com pouca, ou nenhuma, transquelação (Saha, 1998).

A ligação às proteínas do plasma afeta diretamente a biodistribuição do radiofármaco aos tecidos de interesse. Portanto, é necessário determinar a extensão dessa ligação em qualquer radiofármaco novo, antes da sua utilização (Saha, 1998).

Várias técnicas podem ser utilizadas para realizar esta determinação. A mais utilizada é a precipitação das proteínas adicionando-se ácido tricloroacético ou etanol no plasma/soro coletado após a administração do radiofármaco. Desta forma, é possível medir a atividade no precipitado (Saha, 1998).

Os resultados da ligação do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu às proteínas séricas *in vitro* após a incubação a 37 °C por diferentes tempos são apresentados na FIG. 39.

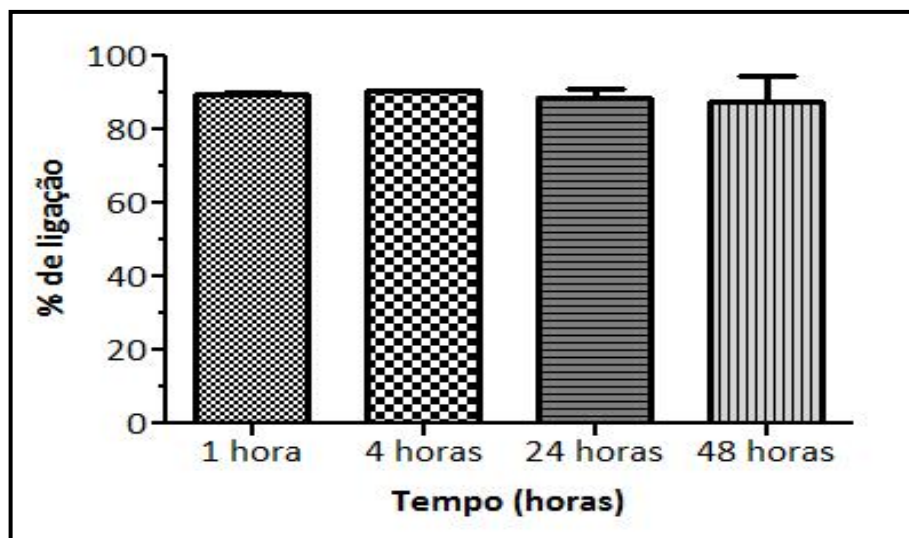


FIGURA 40 – Ligação do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu às proteínas séricas.

Aproximadamente 85% do radiofármaco se ligou às proteínas *in vitro* e essa fração não se altera significativamente com o tempo de incubação.

Sabendo que somente fármacos livres, ou seja, fármacos não acoplados às proteínas séricas se ligam ao receptor e exercem seu efeito farmacológico (Ritschel et al., 2009), é possível afirmar que a alta ligação às proteínas plasmáticas sugere clareamento e biodistribuição lentos *in vivo*.

5.12 Desenvolvimento de modelo tumoral em camundongos *Nude*

Os camundongos implantados com 10 milhões de células *Raji*, foram acompanhados semanalmente por quatro meses a fim de avaliar crescimento de tumor sólido. No entanto, este crescimento não foi observado.

Isso ocorreu provavelmente devido à afinidade pelo sistema linfático que essas células apresentam. DeNardo e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo tumoral para LNH com células *Raji* em camundongos *Nude*, submetendo estes camundongos à irradiação prévia com 4 Gy. Esta irradiação prévia suprime ainda mais o já suprimido sistema imunológico dos camundongos *Nude*, impedindo que os mesmos desenvolvam uma resposta imunológica contra as células tumorais. Provavelmente, seja este o detalhe que favoreceu o crescimento tumoral nestes animais.

5.13 Estudos de farmacocinética em camundongos *Swiss sadios*

A ação farmacológica de uma droga só ocorre quando ela atinge, em concentrações adequadas, o órgão no qual se espera que tenha atividade. Para que isso aconteça, a droga precisa atravessar diversas membranas biológicas. A concentração desta droga nos locais de ação depende da dose e da velocidade de biotransformação e excreção da mesma no organismo. O uso de modelos matemáticos na descrição desses processos permite a previsão acerca da concentração dos fármacos nos vários compartimentos do organismo em virtude da dose, via de administração e tempo (Giesbrecht et al., 1979; Lara et al., 1979; Ritschel et al., 2009)

Denomina-se farmacocinética a variação da concentração plasmática de um fármaco ou de seu metabólito após a administração, ou seja, as variações das concentrações dos fármacos nos diferentes fluidos e tecidos do organismo decorrentes do sistema dinâmico de liberação, absorção, distribuição, retenção, ligação, metabolismo e excreção (Ritschel et al., 2009).

A curva de clareamento sanguíneo do imunoc conjugado radiomarcado pode ser observada na FIG. 40.

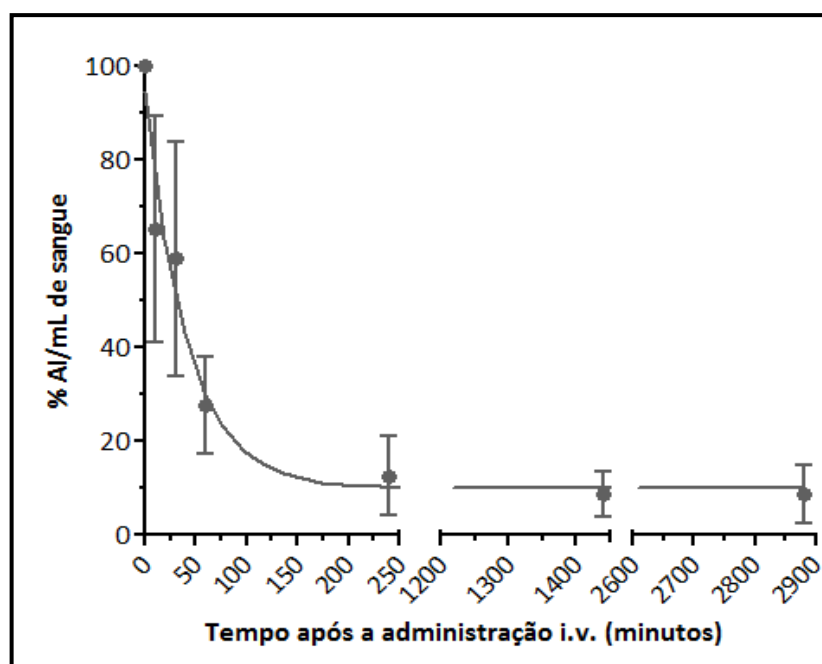


FIGURA 41 – Curva de clareamento sanguíneo rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Swiss sadios* (n = 4).

A curva da FIG. 40 foi utilizada para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu, os quais são apresentados na TAB. 10. Os parâmetros foram calculados após ajuste dos dados para um modelo de decaimento exponencial em uma única fase ou modelo monopartimental.

TABELA 10 - Parâmetros farmacocinéticos para o rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu determinados em camundongos *Swiss* fêmeas sadias (n=4).

Parâmetro Farmacocinético	
$K_{el}^1 (min^{-1})$	0,01781
$t_{1/2}^2 (min)$	38,91
$CL^3 (mL.min^{-1})$	0,0032
$Vd^4 (L.kg^{-1})$	0,006

¹ Constante de eliminação; ² tempo de meia-vida; ³ depuração; ⁴ volume de distribuição

A meia vida plasmática ($t_{1/2}$) de um radiofármaco é definida como o tempo necessário para reduzir sua atividade inicial no sangue pela metade (Saha, 1998). O rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma meia vida longa e um baixo clareamento sanguíneo, como já era esperado, tendo em vista sua alta ligação às proteínas séricas.

Mesmo alta, a meia vida do radiofármaco é menor que a do rituximab não marcado, que é cerca de 60 horas (Schott, 1998). Isso é uma vantagem do ponto de vista dosimétrico, já que, uma meia vida baixa reduz a irradiação *in vivo* dos tecidos não alvo.

O volume de distribuição (Vd) não é um volume real, e sim um volume hipotético de fluido corporal que seria necessário para dissolver a quantidade total de droga na mesma concentração que o encontrado no sangue. É uma constante de proporcionalidade relacionando a quantidade de droga no corpo com a concentração medida em fluidos biológicos (plasma sanguíneo, ou soro). O volume de distribuição reflete, portanto, a extensão em que o fármaco está presente nos tecidos extravasculares (Lara et al., 1979; Ritschel et al., 2009).

É possível observar que o rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou baixo volume de distribuição, indicando que ele permanece por mais tempo no espaço vascular e se

distribui lentamente para os tecidos (Lara et al., 1979). Este resultado também era esperado, visto que, uma maior permanência no espaço vascular é uma característica dos anticorpos.

5.14 Estudos de biodistribuição em camundongos *Swiss* sadios

O resultado do estudo de biodistribuição do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu, pode ser visualizado na TAB. 11. Os dados estão expressos em porcentagem de atividade administrada em virtude da atividade captada pelo tecido (% AI) (FIG. 41) ou por grama de tecido (% AI/g) (FIG. 42).

TABELA 11 – Biodistribuição do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu (0,185 MBq) em camundongos *Swiss* fêmeas sadias (n = 4).

Tempo após injeção	1 hora		4 horas		24 horas		48 horas	
	% AI	% AI/g	% AI	% AI/g	% AI	% AI/g	% AI	% AI/g
Unidade de medida								
Coração	0,90±0,1	7,98±1,2	1,01±0,1	9,09±4,4	0,56±0,1	4,52±0,7	0,64±0,0	5,63±1,3
Pulmões	1,61±0,3	8,23±3,0	1,54±0,3	7,01±3,0	1,38±0,1	5,77±1,1	1,47±0,4	5,86±2,1
Pâncreas	0,54±0,1	2,81±0,4	0,97±0,2	3,86±1,3	0,54±0,1	2,92±0,4	0,45±0,1	2,09±0,4
Baço	0,61±0,1	7,51±2,6	0,51±0,1	4,92±2,4	1,58±0,4	8,45±3,2	0,75±0,2	6,74±2,8
Estômago	0,86±0,2	1,18±0,2	1,21±0,1	1,12±0,3	1,28±0,3	1,80±0,3	0,93±0,1	1,06±0,5
Fígado	17,32±2,3	13,56±4,0	15,56±1,5	10,09±3,6	19,01±1,4	10,84±2,8	15,54±2,7	10,64±4,6
Rins	3,12±0,3	7,47±0,8	3,49±0,4	8,20±0,9	2,66±0,2	5,65±1,3	2,23±0,2	5,19±1,1
Intestinos	4,40±0,4	1,51±0,3	6,44±0,3	1,96±0,8	4,97±0,4	1,47±0,3	4,10±0,3	1,29±0,3
Músculo	0,23±0,1	1,09±0,4	0,11±0,0	0,52±0,4	0,30±0,0	1,27±0,2	0,25±0,0	1,16±0,3
Osso	0,27±0,0	3,71±1,0	0,24±0,0	2,53±0,9	0,20±0,0	2,37±0,9	0,21±0,0	2,60±0,4
Cérebro	0,31±0,1	0,78±0,5	0,40±0,0	0,87±0,1	0,30±0,1	0,68±0,3	0,42±0,0	1,00±0,2

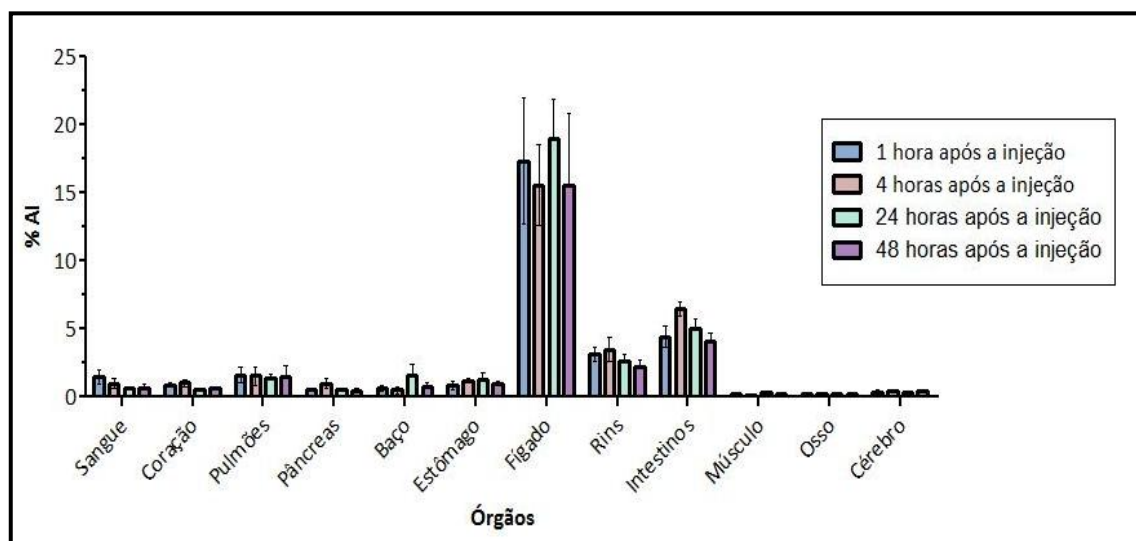


FIGURA 42 – Biodistribuição (em % de atividade captada pelo tecido) do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Swiss* sadios.

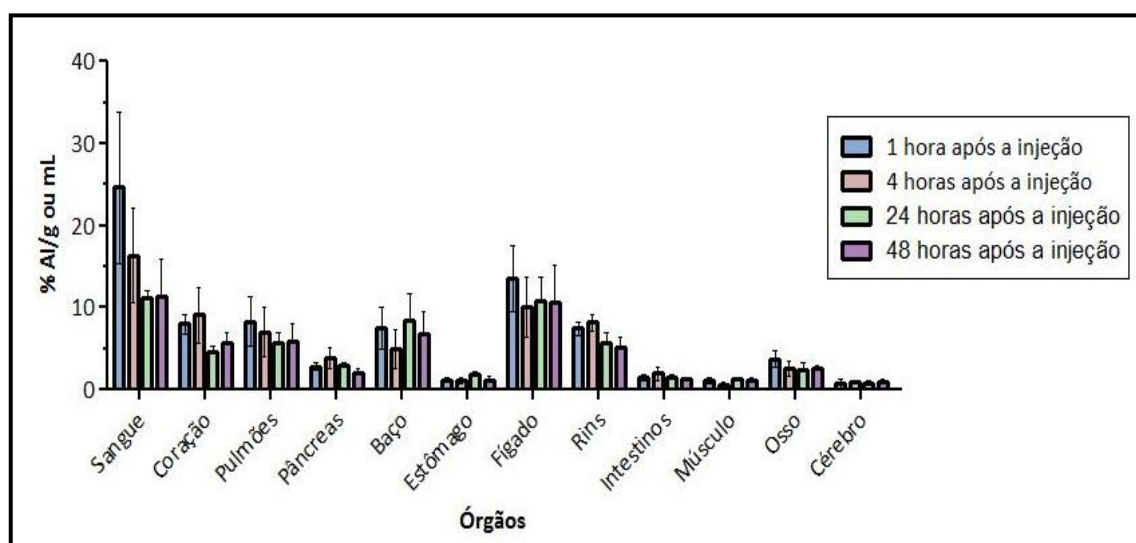


FIGURA 43 – Biodistribuição (em % de atividade captada por grama de tecido) do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Swiss* sadios.

Considerável atividade foi captada no baço e em outros órgãos do sistema retículoendotelial (ou sistema mononuclear fagocitário), provavelmente, devido o acúmulo de linfócitos B nos mesmos, (Jalilian et al., 2008) o que confirma os dados obtidos da literatura (Schott, 1998; Press et al., 2001).

Tendo em vista que, moléculas maiores que $60.000 \text{ g.mol}^{-1}$ não são filtradas pelos glomérulos (Saha, 1998), a captação renal associada com a alta captação no fígado indica que o radiofármaco sofre acentuado metabolismo hepático. A captação no fígado diminui após 4 horas e se mantém constante, (FIG. 42) provavelmente, devido à excreção e/ou decomposição do radiofármaco (Jalilian et al., 2008).

Concentração significativa da radioatividade pode ser observada nos intestinos até 48 horas após a administração, indicando que esta é uma via importante de excreção.

A captação no coração e nos pulmões, provavelmente, decorre do aporte sanguíneo nestes órgãos.

A captação óssea é comumente assumida como um controle da estabilidade *in vivo* de moléculas radiomarcadas com lutécio. Esse tecido capta ativamente o lutécio não ligado, sendo um bom indicador da pureza radioquímica das marcações e de estabilidade *in vivo* perante descomplexação, especialmente nos tempos iniciais. A captação óssea do Acm radiomarcado foi insignificante se comparada à do ^{177}Lu não ligado, a qual atinge níveis de 10% da atividade injetada, apenas no fêmur, 2 horas após a administração (Jiménez, 2007). Estes resultados confirmam a ausência de contaminação por este radiolantanídeo na preparação, conforme demonstrado na cromatografia líquida de alta eficiência.

5.15 Ligação às células *Raji*

A preservação da imunorreatividade em anticorpos radiomarcados é uma condição primária para o reconhecimento do tumor. O uso de anticorpos que não são imunocompetentes contribui para a irradiação de tecidos não alvo (Schaffland et al., 2004; Konishi et al., 2004).

A perda da imunorreatividade pode ser causada pelo processo de conjugação, radiomarcção e radiólise durante o armazenamento do anticorpo (Konishi et al., 2004).

Estudos de competição são geralmente precedidos de estudos de saturação, com o objetivo de conhecer a massa de anticorpo necessária para bloquear todos os

receptores. Para este trabalho, não foi possível realizar estudos de competição, mas como a capacidade de se ligar ao antígeno é um controle de qualidade essencial em anticorpos radiomarcados, optou-se por realizar um estudo preliminar para avaliar este parâmetro.

Desta forma, o rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu foi incubado a 37 °C com as células *Raji* na presença e na ausência de competidor (rituximab não conjugado). Estes resultados estão ilustrados na FIG. 43.

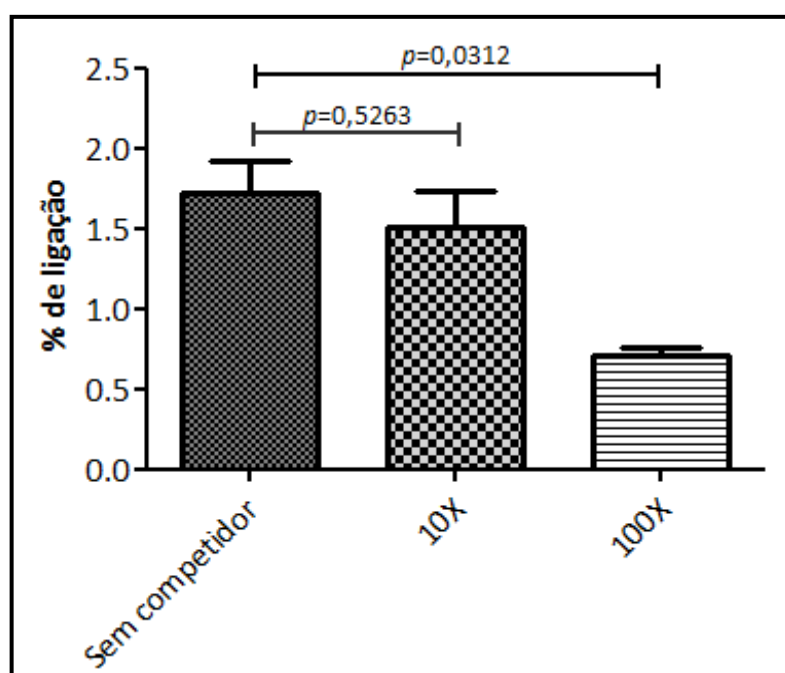


FIGURA 44 – Ligação do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu às células *Raji* na ausência e presença de competidor (rituximab não conjugado) (n=1).

Apesar das limitações do método, foi possível observar que quanto maior a quantidade de competidor, menor a ligação do rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu às células. Esta diferença foi pequena, mas significativa, ($p=0,0312$) quando o excesso de competidor foi 100 vezes maior que a massa de rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Estes resultados indicam que apesar do longo, e muitas vezes prejudicial processo de obtenção do radiofármaco, o rituximab não perdeu sua capacidade de reconhecimento do antígeno. Esta robustez diante de modificações químicas do rituximab

foi constatada por Forrer e colaboradores (2009), uma vez que não foi observada diminuição significativa da imunorreatividade do anticorpo, quando quatro ou mais quelantes se acoplaram à sua cadeia.

6.0 CONCLUSÕES

Apesar da imunoc conjugação de anticorpos se tratar de um procedimento que envolve várias etapas que devem ser cuidadosamente seguidas, foi possível desenvolver um protocolo de fácil execução e que se mostrou reprodutível.

O imunoc conjugado obtido demonstrou estabilidade por até 240 dias, quando armazenado à 2-8 °C e a -20 °C, conforme foi constatado pela análise em CLAE.

O produto final obtido apresentou a necessidade de purificação pós radiomarcção, mas este processo possibilitou a obtenção de um produto com pureza radioquímica dentro dos critérios de aceitação.

A estabilidade sob refrigeração deste radiofármaco indicou necessidade de estudos com adição de estabilizantes na preparação, uma vez que a pureza radioquímica do mesmo caiu 10% nas primeiras 24 horas após a radiomarcção. A alta estabilidade demonstrada quando incubado em soro humano foi confirmada pela baixa captação óssea do radiofármaco, até mesmo em tempos tardios.

O rituximab-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou cinética e clareamento lentos, bem como um baixo volume de distribuição nos compartimentos extravasculares. A ligação às proteínas séricas foi alta e isso corrobora com os parâmetros farmacocinéticos encontrados, uma vez que fármacos que se ligam em grande quantidade às proteínas séricas, geralmente, apresentam baixo volume de distribuição, baixa constante de eliminação e meia vida alta.

O anticorpo radiomarcado apresentou excreção primariamente renal, mas, com significativa excreção pelos intestinos. Outro aspecto importante foi a alta captação hepática, indicando um alto metabolismo por este órgão.

Os perfis de farmacocinética e de biodistribuição são compatíveis com os dados encontrados na literatura para a maioria dos anticorpos monoclonais radiomarcados.

Novas tentativas, utilizando-se de técnicas diferentes da inicialmente proposta, deverão ser realizadas para o desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos *Nude*, uma vez que este aspecto não pôde ser concluído.

Por fim, o estudo de ligação às células *Raji*, indicou que as etapas de obtenção do radiofármaco, não prejudicaram sua capacidade de se ligar ao antígeno presente em células de linfoma não-Hodgkin.

7.0 PRÓXIMAS ETAPAS

As próximas etapas deste trabalho são:

a) Imunoconjugação

- Estudar novas razões molares rituximab:DOTA;
- Desenvolvimento de metodologia em espectrômetro de massa para análise do número de grupamentos quelantes acoplado ao anticorpo;
- Desenvolvimento de um kit liofilizado para radiomarcção e avaliação da sua estabilidade.

b) Radiomarcção

- Estudos de variação de massa, atividade, pH e volume da radiomarcção;
- Radiomarcção com diferentes radioisótopos.
- Avaliação da estabilidade da radiomarcção em diferentes condições de armazenamento.

c) Estudos *in vitro*

- Ensaios de afinidade utilizando células *Raji*, a fim de avaliar a influência da razão molar Acm:DOTA sobre a esta propriedade do anticorpo;
- Ensaios de imunorreatividade;
- Análise da estabilidade em soro por CLAE.

d) Estudos *in vivo*

- Desenvolvimento de modelo tumoral em camundongos *Nude*, segundo a metodologia empregada por DeNardo e colaboradores (2009);

- Comparação da biodistribuição e farmacocinética do anticorpo conjugado em diferentes razões molares;
- Estudo de biodistribuição em camundongos *Nude* implantados com linfoma humano;
- Ensaio de ligação às proteínas plasmáticas do anticorpo marcado;
- Estudo de corpo inteiro e de imagem cintilográfica em gama-câmara;
- Estudo toxicológico do produto final radiomarcado.

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Parecer - Projeto Nº 35/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"ESTUDO DA DERIVATIZAÇÃO E MARCAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD20 PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA RADIONUCLÍDICA"** de responsabilidade da pesquisadora **ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2009

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKANJI, A.G. *Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na terapia de linfoma não-Hodgkin*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.
2. ARAÚJO, L.H.L.; VICTORINO, A.P.O.S.; MELO, A.C.; ASSAD, D.X.; LIMA, D.S.; ALENCAR, D.R.; MOREIRA, M.M.L.; FILHO, O.M.; COELHO, R.F.S.; ASMAR, S.B.; PEREIRA, B.S.V.; SCHELIGA, A. Linfoma Não-Hodgkin de alto grau – Revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54 p. 175-183, 2008.
3. AUDICIO, P.F.; CASTELLANO, G.; TASSANO, M.R.; REZZANO, M.E.; FERNANDEZ, M.; RIVA, E.; ROBLES, A.; CABRAL, P.; BALTER, H.; OLIVER, P. [¹⁷⁷Lu]DOTA-anti-CD20: Labeling and pre-clinical studies. **Applied Radiation and Isotopes**, 2011 (DOI:10.1016/j.apradiso.2011.01.026).
4. BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 8, p. 148-192.
5. BOSWELL, C.A.; BRECHBIEL, M.W. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, n. 7, p. 757–778, 2007.
6. DIAS, C.R.B.R. *Estudo de marcação dos anticorpos monoclonais IOR-CEA-1 e IOR-EGF/R3 com ^{99m}Tc*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2005.
7. CHEN, J.; LINDER, K. E.; CAGNOLINI, A.; METCALFE, E.; RAJU, N.; TWEEDLE, M. F.; SWENSON, R. E. Synthesis, stabilization and formulation of [¹⁷⁷Lu]Lu-AMBA, a systemic radiotherapeutic agent for gastrin releasing peptide receptor positive tumors. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 66, p. 497-505, 2008.
8. COOPER, M.S.; SABBAH, E.; MATHER, S.J. Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. **Nature Protocols**, v.1, n.1, p. 314-317, 2006.
9. DeNARDO, S.J.; DeNARDO, G.L.; O'GRADY, L.F.; MACEY, D.L.; EPSTEIN, A.L.; PENG, J.S.; McGAHAN, J.P. Treatment of a patient with B cell lymphoma by ¹³¹I LYM-1 monoclonal antibodies. **The International Journal of Biological Markers**, v. 2, n. 1, p. 49-53, 1987.

10. DENARDO, G.L.; SYSKO, V.V.; DENARDO, S.J. Cure of incurable lymphoma. ***Journal of Radiation Oncology Biology***, v. 66, n.2, p. S46-S56, 2006.
11. DENARDO, S.J.; LIU, R.; ALBRECHT, H.; NATARAJAN, A.; SUTCLIFFE, J.L.; ANDERSON, C.; PENG, L.; FERDANI, R.; CHERRY, S.R.; LAM, K.S. ^{111}In -LLP2A-DOTA polyethylene glycol-targeting $\alpha 4\beta 1$ integrin: comparative pharmacokinetics for imaging and therapy of lymphoid malignancies. ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 50, n. 4, p. 625-634, 2009.
12. DENARDO, G; DENARDO, S. Dose intensified molecular targeted radiotherapy for cancer –Lymphoma as a paradigm. ***Seminars in Nuclear Medicine***, v. 40, n. 2, p. 136-144, 2010.
13. DIAS, C.R.B.R. *Estudo de marcação dos anticorpos monoclonais IOR-CEA e IOR-EGF/R3 com ^{99m}Tc* Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2005.
14. ***DOTA e DOTA-NHS-éster***. Disponível em: <<http://www.macrocyclics.com>>. Acesso em 17 fev. 2011.
15. DU, J.; WANG, H.; ZHONG, C.; PENG, B.; ZHANG, M.; LI, B.; HUO, S.; GUO, Y.; DING, J. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 282, n. 20, p. 15073-15080, 2007.
16. FORRER, F.; CHEN, J.; FANI, M.; POWELL, P.; LOHRI, A.; MÜLLER-BRAND, J.; MOLDENHAUER, G.; MAECKE, H.R. In vitro characterization of ^{177}Lu -radiolabelled chimeric anti-CD20 monoclonal antibody a preliminary dosimetry study. ***European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging***, v. 36, n. 9, p. 1443-1452, 2009.
17. GIESBRECHT, A.M.; ZYNGIER, S.B. Absorção e distribuição de drogas. IN: ZANINI, A. C.; OGA, S. ***Farmacologia aplicada***. São Paulo: Atheneu, 1979. p. 29-33
18. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunotherapy of lymphoma: Bexxar and Zevalin. ***Seminars in Nuclear Medicine***, v. 40, n. 2, p.122-135, 2010.
19. HENS, M.; VAIDYANATHAN, G.; WELSH, P.; ZALUTSKY, M. R. Labeling internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody with ^{177}Lu : in vitro comparison of acyclic and macrocyclic ligands. ***Nuclear Medicine and Biology***, v. 36, p. 117-128, 2009.
20. HERNANDEZ, M.C.; KNOX, S.J. Radiobiology of radioimmunotherapy: targeting CD20 B-cell antigen in non-Hodgkin's lymphoma. ***International Journal of Radiation Oncology Biology Physics***, v. 59, n. 5, p. 1274-1287, 2004.

21. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da incidência de câncer no Brasil 2010**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 05 mai. 2010a.
22. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Linfoma Não-Hodgkin**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=457>. Acesso em: 05 mai. 2010b.
23. JIMÉNEZ, Y. V. Dosimetria interna aplicada a farmacos marcados con ¹⁷⁷Lu. Dissertação (Mestrado). Instituto Balseiro, Cuyo, 2007.
24. KERSTEN, M.J. Radioimmunotherapy in follicular lymphoma: Some like it hot... **Transfusion and Apheresis Science**, 2011. DOI: 10.1-16/j.transci.2011.01.015
25. KONISHI, S.; HAMACHER, K.; VALLABHAJOSULA, S.; KOTHARI, P.; BASTIDAS, D.; BANDER, N.; GOLDSMITH, S. Determination of immunoreactive fravtion of radiolabeled monoclonal antibodies: what is na appropriate method? **Cancer Biotheraoy and Radiopharmaceuticals**, v. 19, n. 6, 2004.
26. JACENE, H.A.; FILICE, R.; KASECAMP, W.; WAHL, R.L. Comparison of ⁹⁰Y-Tositumomab in clinical practice. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 48, n. 11, p-1767-1776, 2007.
27. JALILIAN, A.R.; MIRSADEGHI, L.; KAMALI-DEGHAN, M.; MORADKHANI, S.; SADDADI, F. Preparation an quality control of radiometal-DOTA-Rituximab. **World Journal of Nuclear Medicine**, v. 7, n. 2, p. 135-141, 2008.
28. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 14, Sistema imunitário e órgãos linfáticos. p. 254-283.
29. LARA, P.F.; ROMALDINI, J.H. Farmacocinética. IN: ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. São Paulo: Atheneu, 1979. p. 35-42
30. LEE, S.Y.; HONG, Y.D.; PYUN, M.S.; FELIPE, P.M.; CHOI, S.J. Radiolabeling of monoclonal anti-vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR 1) with ¹⁷⁷Lu for potential use in radioimmunotherapy. **Applied Radiation and Isotopes**, v.67, p. 1185-1189, 2009.
31. LEWIS, M.R.; RAUBITSCHKE, A.; SHIVELY, J.E.; A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolaleled immunoconjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 565-576, 1994.

32. MÄCKE, H.R.; GOOD, S. Radiometals (non-Tc, non-Re) and bifunctional labelling chemistry. In: VÉRTES, A.; NAGY, S.; ZOLTÁN, K. **Handbook of Nuclear Chemistry**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. v. 4. p. 279-314.
33. MIKOLAJCZAK, R.; PARUS, J. L.; PAWLAK, D.; ZAKRZEWSKA, E.; MICHALAK, W.; SASINOWSKA, I. Reactor produced ^{177}Lu of specific activity and purity suitable for medical applications. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 257, n. 1, p. 53-57, 2003.
34. MOHSIN, H.; JIA, F.; SIVAGURU, G.; HUDSON, M.J.; SHELTON, T.D.; HOFFMAN, T.J.; CUTLER, C.S.; KETRING, A.R.; ATHEY, P.S.; SIMÓN, J.; FRANK, R.K.; JURISSON, S.S.; LEWIS, M.R. Radiolanthanide-labeled monoclonal antibody CC49 for radioimmunotherapy of cancer: biological comparison of DOTA conjugates and ^{149}Pm , ^{166}Ho , and ^{177}Lu . **Bioconjugate Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 485-492, 2006.
35. MOTA, I. Tecidos e órgãos linfóides. In: CALICH, V.L.L.; VAZ, C.A.C. **Imunologia Básica**. Brasil: Artes Médicas, 1988. Cap. 2, p. 11-30.
36. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Non-Hodgkin Lymphoma**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultnonhodgkins/healthprofessional/allpages>>. Acesso em: 07 dez. 2010.
37. NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Savier, 2002.
38. NIKULA, T.K.; CURCIO, M.J.; BRECHBIEL, M.W.; GANSOW, O.A.; FINN, R.D.; SCHEINBERG, D.A. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 22, n.3, p. 387-390, 1995.
39. NIR-EL, Y. Production of ^{177}Lu by neutron activation of ^{176}Lu . **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 262, n. 3, p. 563-567, 2004.
40. ORCUTT, K.D.; SLUSARCZYK, A.L.; CIESLEWICZ, M.; RUIZ-YI, B.; BHUSHAN, K.R.; FRANGIONI, J.V.; WITTRUP, K.D. Engineering an antibody with picololar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 38, p. 223-233, 2011.
41. PAGEL, J.M.; PANTELIAS, A.; HEDIN, N.; WILBUR, S.; SAGANIC, L.; LIN, Y.; AXWORTHY, D.; HAMLIN, D.K.; WILBUR, D.S.; GOPAL, A.K.; PRESS, O.W. Evaluation of CD20, CD22 and HLA-DR targeting for radioimmunotherapy of B-cell lymphomas. **Cancer Research**, v. 67, n. 12, p. 5921-5928, 2007.

42. PEREIRA, F.E.L. Noções de imunopatologia. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 9, p. 193-226.
43. PESCOVITZ, M.D. Rituximab, an Anti-CD20 monoclonal antibody: History and Mechanism of action. **American Journal of Transplantation**, v. 6, p. 859-866, 2006.
44. PRESS, O.W.; LEONARD, J.P.; COIFFIER, B.; LEVY, R.; TIMMERMAN, J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphomas. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 221-240, 2001.
45. PUJATTI, P.B.; SANTOS, J.S.; SUZUKI, M.F.; MENGATTI, J.; ARAUJO, E.B. Comparative pharmacokinetic and biodistribution studies of two novel [¹⁷⁷Lu]bombesin analogues for prostate cancer diagnosis and target therapy. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 35, p. S322-S322, 2008.
46. PUJATTI, P.B. *Desenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com lutécio-177: relação estrutural e potencial diagnóstico-terapêutico para tumor de próstata*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.
47. RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M.H.; DAHA, F.J.; SALOUTI, M. Radiolabeling of Transtuzumab with ¹⁷⁷Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 36, p. 363-369, 2009.
48. RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M.H.; DAHA, F.J. ¹⁷⁷Lu labeling of Herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 37, p. 949-955, 2010a.
49. RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M.H.; DAHA, F.J. Toxicity of transtuzumab labeled ¹⁷⁷Lu on MCF7 and SKBr3 cell lines. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, p. 1964-1966, 2010b.
50. REILLY, R.M.; SCOLLARD, D.A.; WANG, J.; MONDAL, H.; CHEN, P.; HENDERSON, L.A.; BOWEN, B.M.; VALLIS, K.A. A kit formulated under good manufacturing practices for labeling human epidermal growth factor with ¹¹¹In for radioterapeutic applications. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 4, p. 701-708, 2004.
51. ROBBINS, S.L. **Patologia** 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1969.
52. SAHA, G.B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. New York, NY: Springer, 1998.
53. SCHAFFLAND, A.O.; BUCHEGGER, F.; KOSINSKI, M.; ANTONESCU, C.; PASCHOULD, C.; GRANNAVEL, C.; PELLIKKA, R.; DELALOYE, A.B. ¹³¹I-Rituximab: relationship

- between immunoreactivity and specific activity. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 45, n. 10, p. 1784-1790, 2004.
54. SCOTT, S.D. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Practice*, v. 6, n. 3, p. 195-197, 1998.
55. SISTEMA LINFÁTICO. Disponível em <<http://www.afh.bio.br/imune/linfa1.asp>>. Acesso em: 01 dez. 2010.
56. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. *Linfomas*. Disponível em: <<http://www.sbcancer.org.br/final/artigossetor.asp?idart=11>>. Acesso em: 07 dez. 2010.
57. STIGBRAND, T.; ERIKSSON, D.; RIKLUND, K.; JOHANSSON, L. Therapeutically used targeted antigens in radioimmunotherapy. In: STIGBRAND, T.; CARLSSON, J.; ADAMS, G. *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*. New York, NY: Springer, 2010a. Cap. 2, p. 13-23.
58. STIGBRAND, T.; ERIKSSON, D.; RIKLUND, K.; JOHANSSON, L. Targeting tumours with radiolabeled antibodies. In: STIGBRAND, T.; CARLSSON, J.; ADAMS, G. *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*. New York, NY: Springer, 2010b. Cap. 4, p. 59-76.
59. THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. *Medicina Nuclear*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
60. TOLMACHEV, V. Choice of radionuclide and radiolabelling. In: STIGBRAND, T.; CARLSSON, J.; ADAMS, G. *Targeted Radionuclide Tumor Therapy. Biological Aspects*. New York, NY: Springer, 2010. Cap. 8, p. 145-174.
61. UNICAMP. *Linfoma de Hodgkin*. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/lamhemo11.html>>. Acesso em: 07 dez. 2010.
62. VERMES, L.M.S. Antígenos. In: CALICH, V.L.L.; VAZ, C.A.C. *Imunologia Básica*. Brasil: Artes Médicas, 1988. Cap. 4, p. 50-63.
63. WALSH, G. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. England: Wiley, 2003. cap.10, Antibodies, vaccines and adjuvants. p. 403-461.
64. ZALUTSKY, M.R. Radionuclide Therapy. In: VÉRTES, A.; NAGY, S.; ZOLTÁN, K. *Handbook of Nuclear Chemistry*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003a. v. 4. p. 315-348.

65. ZALUTSKY, M.R.; LEWIS, J.S. Radiolabeled antibodies for tumor imaging and therapy. In: WELCH, M.J.; REDVANLY, C.S. **Handbook of Radiopharmaceuticals**. England: Wiley, 2003b. p. 685-714.

66. WONG, J.Y., RAUBITSCHKEK, A.; YAMAUCHI, D.; WILLIAMS, L.E.; WU, A.M.; YAZAKI, P.; SHIVELY, J.E.; COLCHER, D.; SOMLO, G. A Pretherapy biodistribution and dosimetry study of indium-111-radiolabeled trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 25, n. 4, p. 387-393, 2010.