

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

CARLOS ALBERTO ROSSATTO JUNIOR

**Preparo e avaliação do conjugado NOTA-CTHRSSVVC radiomarcado com
[⁶⁸Ga]gálio e [¹⁸F]flúor**

São Paulo

2021

CARLOS ALBERTO ROSSATTO JUNIOR

**Preparo e avaliação do conjugado NOTA-CTHRSSVVC radiomarcado com
[⁶⁸Ga]gálio e [¹⁸F]flúor**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Fabio Luiz Navarro Marques

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rossatto Junior, Carlos Alberto
Preparo e avaliação do conjugado NOTA-CTHRSSVVC
radiomarcado com [68Ga]gálio e [18F]flúor / Carlos
Alberto Rossatto Junior. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Fabio Luiz Navarro Marques.

Descritores: 1.Radioisótopos de flúor
2.Radioisótopos de gálio 3.Cloreto de alumínio
4.Peptídeos 5.Cromatografia líquida de alta pressão
6.Reatividade-estabilidade

USP/FM/DBD-163/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha família que acredita muito mais em mim do eu um dia poderei.

Muito obrigado por existirem.

AGRADECIMENTOS

Em primeira instância agradeço ao meu esforço e dedicação para completar mais este ciclo em minha vida, mediante às tantas dificuldades que tentaram me impedir de chegar até esta dissertação.

Em segundo plano agradeço imensamente aos meus pais Ana e Carlos e à minha irmã Bianca que sempre me apoiaram e, mesmo que não façamos parte de uma classe social privilegiada, eles sempre me ajudaram quando precisei e ainda fazem com que eu acredite em mim mesmo dia após dia.

Em terceiro plano agradeço ao meu orientador Dr. Fábio Luiz Navarro Marques pela paciência e orientação, uma vez que eu não fui dos alunos mais fáceis de lidar.

Gostaria de tecer agradecimentos sinceros aos meus amigos Anor, Cintia, Bacarolo, Bruna e Sheila, além de muitas outras pessoas que me deram cafés, conversas e apoio nos momentos de tensão e desespero.

Agradeço incalculavelmente a todos os funcionários do Centro de Medicina Nuclear e, em especial, à equipe do Laboratório de Investigação Médica 43 (LIM43) por todo o apoio teórico e também emocional nos experimentos e discussões ao longo deste ano.

Agradeço à Josy (técnica do laboratório) por me aturar e por ser uma ótima companheira de trabalho e, hoje, uma grande amiga e confidente.

Agradeço à Mara pelos puxões de orelha quando chegava atrasado pra algum evento ou palestra, ou mesmo pra tomar aquele café e distrair das responsabilidades acadêmicas.

Enfim, agradeço imensamente pela oportunidade deixando meu “muito obrigado” para toda a equipe dos LIMs 21, 24 e 43, bem como agradecer ao fomento financeiro CAPES.

EPIGRAFE

13ª Carta de Sêneca – Sobre medos infundados:

*“Existem mais coisas, Lucílio, susceptíveis de nos assustar do que existem de nos derrotar; **sofremos mais na imaginação do que na realidade...** Assim, algumas coisas nos atormentam mais do que deveriam; algumas nos atormentam antes do que deveriam; e algumas nos atormentam quando não deveriam nos atormentar. “*

Resumo

Rossatto Junior, Carlos Alberto. **Preparo e avaliação do conjugado NOTA-CTHRSSVVC radiomarcado com [⁶⁸Ga]gálio e [¹⁸F]flúor.** 2021. 80 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências – Oncologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O desenvolvimento de novas moléculas para inovação em diagnóstico de doenças crônicas, tais como câncer, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, é foco de uma variedade de laboratórios de investigação ao redor do mundo. Atualmente, peptídeos, bem como suas diferentes abordagens de radiomarcagem, têm tido um importante papel em testes clínicos em andamento, seja para diagnóstico ou tratamento, de vários tipos de cânceres. O objetivo deste trabalho é desenvolver a biomolécula sintética peptídeo-like [NOTA-CTHRSSVVC] radiomarcada com os isótopos [⁶⁸Ga]gálio e [¹⁸F]flúor, para efeito de comparação. *p*-SCN-Bn-NOTA-CTHRSSVVC foi preparado pela reação de condensação utilizando os quelantes *p*-Bn-SCN-DOTA, ou *p*-Bn-SCN-NOTA, e o peptídeo cíclico “CTHRSSVVC”. O rendimento da reação, bem como os respectivos controles de qualidade dos produtos e suas purificações, foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os picos obtidos foram confirmados por espectrometria de massas. Em se tratando da radiomarcagem, 80µl do peptídeo conjugado (NOTA-CTHRSSVVC), obtido comercialmente, foi radiomarcado em 0,350 mL de solução de acetato de sódio 0,2M (pH 4,1), adicionando-se à solução 0,05 mL contendo 1,0 – 2,5 mCi (ou 37 – 92,5 MBq) de [⁶⁸Ga]GaAcO ou [¹⁸F]AlF; as reações foram acompanhadas sob diferentes temperaturas e os controles de qualidade dos produtos radiomarcados foram avaliados por CLAE acoplado a um detector de radiação gama. A radiomarcagem dos peptídeos conjugados [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-CTHRSSVVC e [¹⁸F]AlF-NOTA-CTHRSSVVC, purificados, foram analisados por CLAE, obtendo produtos com pureza radioquímica, de 97,8% (n=3) e 95,5% (n=3), respectivamente. Ambos os radiofármacos obtidos mantiveram-se estáveis quimicamente por 4 horas.

Descritores: Radioisótopos de flúor; Radioisótopos de gálio; Cloreto de alumínio; Peptídeos; Cromatografia líquida de alta eficiência; Reatividade-estabilidade.

ABSTRACT

Rossatto Junior, C.A. **Preparation and evaluation of NOTA-CTHRSSVVC with the radioisotopes [⁶⁸Ga]Ga and [¹⁸F]AlF.** 2021. 80 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências – Oncologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The development of new molecules for innovation in the diagnosis of chronic diseases, such as cancer, atherosclerosis and neurodegenerative diseases, is the focus of a variety of researcher laboratories around the world. Currently, peptides, as well as their different approaches to radiolabeling, have played an important role in ongoing clinical tests, whether for diagnosis or treatment, of several types of cancers. The aim of this work is to develop the peptide-like synthetic biomolecule [NOTA-CTHRSSVVC] radiolabeled with the [⁶⁸Ga]gallium and [¹⁸F]fluorine isotopes, for comparison. *p*-SCN-Bz-NOTA-CTHRSSVVC was prepared by the condensation reaction using the chelators *p*-Bn-SCN-DOTA, or *p*-SCN-Bz-NOTA, and the cyclic peptide “CTHRSSVVC”. The reaction yield, as well as the respective quality controls of the products, and their purifications were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the peaks obtained were confirmed by mass spectrometry. In the case of radiolabeling, 80µl of the conjugated peptide (NOTA-CTHRSSVVC), obtained commercially, was radiolabeled in 0.350 mL of 0.2 M sodium acetate solution (pH 4.1), with 0.05 mL containing 1.0 - 2.5 mCi (or 37 - 92.5 MBq) of [⁶⁸Ga]Ga or [¹⁸F]AlF; the reactions were monitored under different temperatures and the quality controls of the radiolabeled products were evaluated by HPLC coupled to a gamma radiation detector. The preparation of *p*-SCN-NOTA-CTHRSSVVC, by condensation reaction, was analyzed by LC-MS and the structures were confirmed by the Q-TOF technique. The radiolabeling of conjugated peptides [⁶⁸Ga] Ga-NOTA-CTHRSSVVC or [¹⁸F]AlF-NOTA-CTHRSSVVC, purified, were analyzed by HPLC producing products with radiochemical purity of 97.8% (n = 3) and 95.5% (n = 3), respectively. Both of the radioactive products were chemically stable for 4 hours.

Descriptors: Fluorine radioisotopes; Gallium radioisotopes; Aluminum chloride; Peptides; Chromatography, high pressure liquid; Reactivity-stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alvos moleculares para a terapia em câncer;

Figura 2. Estrutura molecular do quelante bifuncional NOTA [Nome IUPAC];

Figura 3. Estrutura molecular da sequência peptídica cíclica “CTHRSSVVC” contendo uma ligação dissulfeto entre as cisteínas 1 e 9 e os grupos terminais carboxílico e aminico das cisteínas encontram-se livres para funcionalização. Software: ChemBioOffice Ultra v.13.0, PerkinElmer®;

Figura 4: Esquema da reação de condensação;

Figura 5 - Cromatogramas referentes à dinâmica de reação de condensação entre o peptídeo “CTHRSSVVC” e o quelante *p*-Bn-SCN-NOTA

Figura 6 - Cromatogramas referentes à dinâmica de reação de condensação entre o peptídeo “CTHRSSVVC” e o quelante *p*-Bn-SCN-NOTA

Figura 7 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do [¹⁸F]FAI utilizando diferentes massas de AlCl₃.6H₂O

Figura 8 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do [¹⁸F]FAI-NOTA-CTHRSSVVC utilizando diferentes massas do peptídeo.

Figura 9 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do [¹⁸F]FAI-NOTA-CTHRSSVVC utilizando diferentes atividade de [¹⁸F]FAI²⁺.

Figura 10 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de purificação do [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC utilizando processo de extração em fase sólida.

Figura 11 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.

Figura 12 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.

Figura 13 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo [^{18}F]AlF-NOTA-CTHRSSVVC após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.

Figura 14 - Radiocromatogramas da reação de coordenação entre o peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.

Figura 15 - Radiocromatogramas das etapas de purificação entre o peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.

Figura 16 - Radiocromatogramas de estabilidade físico-química do peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais para obtenção do produto *p*-SCN-Bn-NOTA-CTHRSSVVC.

Tabela 2 - Quantificação das áreas dos picos, a 220 e 254 nm, para as espécies detectadas via análise por CLAE.

Tabela 3 – Variáveis investigadas para definição das condições reacionais.

Tabela 4 – Coeficientes de partição e partição médio para os conjugados marcados com o complexo radioisotópico [¹⁸F]AIF.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	INFRAESTRUTURA	22
3.2	Reagentes e soluções	22
3.3	Materiais para cromatografia e purificações	23
3.4	Equipamentos e utensílios	23
3.5	MÉTODOS	24
3.5.1	Análise dos componentes reacionais.....	24
3.5.2	Avaliação da taxa de conjugação do quelante <i>p</i> -SCN-Bn-NOTA ao peptídeo CTHRSSVVC, em função do tempo	25
3.5.3	Purificação do conjugado NOTA-Bn-CTHRSSVVC.....	25
3.5.4	Preparação de concentrado de [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ a partir de eluato do gerador de germânio-gálio (⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga).....	25
3.5.5	Reação de complexação do [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ aos conjugados.....	26
3.5.6	Reação de coordenação com o complexo radioisotópico [¹⁸ F]AlF	26
3.5.7	Estabilidade do complexo pós-marcação	27
3.5.8	Determinação da lipofilicidade dos compostos.....	27
3.5.9	Análise dos Resultados	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Reação de condensação entre o ligante <i>p</i> -SCN-Bn-NOTA e o peptídeo CTHRSSVVC	29
4.1.1	Preparação do [¹⁸ F]AlF ²⁺	33
4.1.2	Coordenação com [⁶⁸ Ga]gálio.....	44
4.2	AVALIAÇÃO DA LIPOFILICIDADE DOS PRODUTOS RADIOMARCADOS	48
5	CONCLUSÕES	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	ANEXO B.....	53
	Quadro 1: Resumo das condições de preparação de NOTA-peptídeos marcados com [¹⁸ F]AlF publicados previamente na literatura.....	53

1 INTRODUÇÃO

Oncologia é a área de estudo que determina como se dá a prevenção, o diagnóstico, prognóstico e a terapêutica de tumores e câncer, sendo parte dos desafios, avaliar a integração de eventos genotípicos e fenotípicos.

Hanahan e Weinberg propuseram dez grupos de alterações fisiológicas celulares que, de modo independente ou associados, podem indicar a malignidade de células e tumores associados (figura 1), sendo que destes, três deles: (i) a inflamação, (ii) a angiogênese e (iii) o processo de invasão e metástase, estão intimamente relacionados ao microambiente tumoral e podem interagir para acelerar o processo de progressão tumoral.¹⁻³

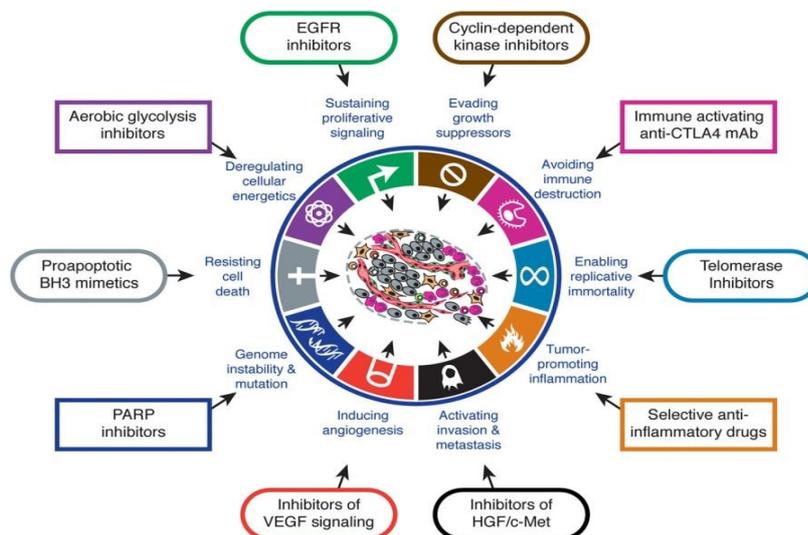


Figura 1. Alvos moleculares para a terapia em câncer.²

1.1. O processo inflamatório como promotor do desenvolvimento de tumores

Atualmente é bem esclarecido que os componentes do microambiente imunológico dos tumores e muitas terapias alvo-dirigidas tem desenvolvido novas abordagens terapêuticas com embasamento no ataque destes componentes específicos do tumor, preservando ao máximo o sistema imune dos pacientes; partindo do pressuposto os métodos de aplicação de moléculas alvo-dirigidas no desenvolvimento de biomarcadores e probes diagnósticos ganham destaque nesse novo cenário e, para otimizar esse desenvolvimento, uma variedade de técnicas são

comumente utilizadas com o intuito de fornecer o maior número de características daquele modelo tumoral e seu microambiente.

1.2. Imagem molecular

Imagem molecular foi definida como uma técnica que permite visualizar, caracterizar e mensurar processos biológicos a nível celular e molecular, em seres humanos e outros organismos vivos, utilizando-se de alvos biológicos, sondas ou traçadores e equipamentos apropriados para esses fins, podendo ser realizada tanto in vivo quanto in vitro.

A imagem molecular utiliza a energia de partículas emitidas por radioisótopos de maneira a permitir a formação de uma imagem nítida, utilizada como base métrica o perfil de captação desse radioisótopo nos diferentes tecidos biológicos do organismo em análise. Dos vários isótopos radioativos possíveis de serem utilizados o ^{99m}Tc [emissor de radiação gama ou fóton único] dominou as aplicações diagnóstica por várias décadas; a partir dos anos 2000 os emissores de pósitron ^{68}Ga , ^{11}C e ^{18}F , por exemplo, passaram a serem preferenciais para o diagnóstico por imagem em modelos pré-clínico e clínico.

Moléculas marcadas com ^{68}Ga e ^{18}F partem de diferentes premissas. O ^{68}Ga , assim como o ^{99m}Tc , é obtido através da eluição de um gerador de radioisótopos com fonte geradora de íons $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, por exemplo. Os geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, podem ser adquiridos por clínicas de medicina nuclear para uso quando necessário, uma vez que o tempo de meia-vida física do ^{68}Ga é, aproximadamente, 68 minutos; Em contrapartida, o isótopo ^{18}F , com meia-vida física mais longa, 110 minutos, permite sua produção e distribuído para serviços de medicina nuclear que estejam em um raio de 100 km do centro detentor de acelerador de partícula (ou *cíclotron*).

Junta-se a esses atributos, o fato de que a tomografia por emissão de pósitrons (PET), ou seja, a formação de imagem molecular a partir de partículas (β^+) emitidos do núcleo atômico dos isótopos supracitados, permite a tomada de imagens tomográficas dinâmicas, tornando possível a quantificação absoluta da biodistribuição das moléculas radiomarcadas em tempo real, durante todo o tempo de exame.

Na tabela 1, abaixo, são apresentadas algumas vantagens e desvantagens entre o ^{68}Ga e o ^{18}F , demonstrando quão necessários são ambos os elementos radioativos na radiofarmácia clínica e pré-clínica.

Tabela 1. Comparação entre radioisótopos para imagens PET.

	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
$[^{18}\text{F}]$	<p>1) Pode ser produzido em atividades de até 5 Ci/por lote, permitindo produzir grande quantidade de moléculas marcadas;</p> <p>2) $T_{1/2} = 110$ min, suficiente para radiomarcações e realização de vários experimentos in vitro e in vivo.</p> <p>3) Devido ao pequeno raio iônico, por vezes os sistemas biológicos o reconhecem como um átomo de hidrogênio, e a molécula a qual está ligado passa a ser reconhecida como natural pelo organismo.</p>	<p>1) Necessidade de um ciclotron, nas instalações de pesquisa, para produzi-lo (custo instalação US\$ 2 milhões).</p> <p>Também pode ser adquirido de uma unidade produtora, mas com limitações logísticas;</p> <p>2) Processo de marcação relativamente complexo, sendo aconselhável o uso de unidades automáticas para realização das reações.</p>
$[^{68}\text{Ga}]$	<p>1) É obtido através de um sistema gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, podendo ser instalado em qualquer laboratório licenciado (custo de aquisição aproximado de US 35.000,00/ano) e pode ser eluído do gerador diversas vezes ao dia;</p> <p>2) Raio iônico é adequado para complexação a vários ligantes utilizados em conjugação de biomoléculas (figura 2).</p>	<p>1) A atividade máxima dos geradores produzidos atualmente é de 100 mCi/eluição;</p> <p>2) Apresenta maior energia depositada em seu pósitron o que pode ocasionar alguma perda na qualidade da imagem gerada, quando comparada ao ^{18}F.</p>

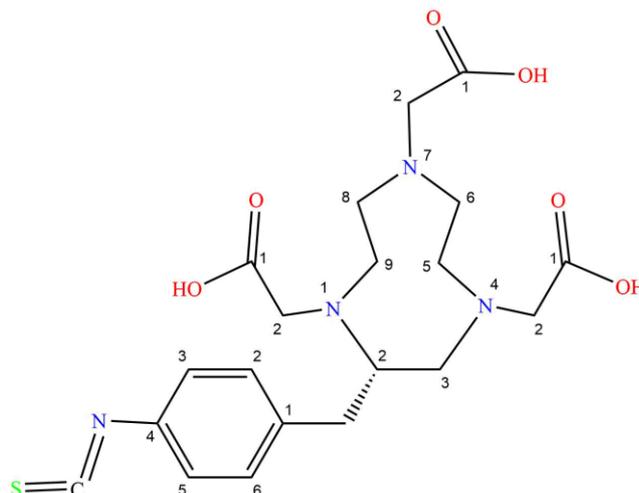
1.3. Modificação molecular para preparação de complexos de ^{68}Ga .

Considerando a facilidade de obtenção dos radioisótopos [^{68}Ga]gálio, as moléculas a serem marcadas com esse radioisótopo precisam passar por algumas modificações de forma a tornar a complexação com o radiometal possível. Uma das táticas mais comuns é introdução de grupos quelantes nestas moléculas, permitindo a complexação do radioisótopo metálico nessa porção.

Uma classe de quelantes utilizados para tal fim são os quelantes bifuncionais, ou seja, moléculas capazes de serem ligadas à biomoléculas e complexarem o metal em reação, ao mesmo tempo. Uma classe bastante utilizada dentre esses quelantes, são os macrocíclicos, como o grupo dos triazamacrocíclicos (ex.: NOTA) (figura 2). Irina Velikiyan demonstrou que quelantes macrocíclicos possuem alta estabilidade de ligação e suas constantes de dissociação são da ordem de 10^5 a 10^7 vezes menor, quando comparados aos quelantes acíclicos, tais como a desferrioxamina (DFO) e o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA); os macrocíclicos também apresentam maior resistência termodinâmica e maior lipofilicidade, características estas importantes para aplicação de biomoléculas *in vivo*.

Ebenhan e colaboradores, conjugaram o macrocíclico NOTA a um peptídeo derivado da ubiquitina (UBI29-41) e o radiomarcaram com [^{68}Ga]gálio mostrando que a estabilidade do complexo formado, demonstrando grande potencial translacional como ferramenta de imagem para captação em focos infecciosos.^[REF]

Figura 2. Estrutura molecular do quelante bifuncional NOTA [Nome IUPAC].



2-[(5S)-4,7-bis(carboxymethyl)-5-[(4-isothiocyanatophenyl)methyl]-1,4,7-triazonan-1-yl]acetic acid

Desenhado utilizando o Software ChemDrawn® v.18. (Fonte: Autor da dissertação)

1.4. O complexo radioisotópico [^{18}F]AlF - flúor-alumínio

Laverman e colaboradores, em 2010, apresentaram resultados de radiomarcagem utilizando um complexo formado por um radioisótopo ametal [^{18}F] e um metal [o alumínio – $\text{Al}_{(s)}$]. A técnica é considerada inovadora por permitir a união de um radioisótopo, comumente acoplado a biomoléculas por reações orgânicas sequenciais e grande perda de produtos no processo, para a formação de um complexo radiometálico passível de se ligar a um quelante bifuncional em apenas duas etapas reacionais e com baixíssima perda de rendimento quando comparado às técnicas mais usuais. A mais proeminente desvantagem dessa técnica é a necessidade da utilização de moléculas que possam ser funcionalizadas com quelantes bifuncionais. No entanto, as variedades de técnicas de funcionalização de biomoléculas tornam várias aplicações clínicas, bem como diminuição de perdas de produtos e aumento de rendimento reacional, possíveis a curto prazo.

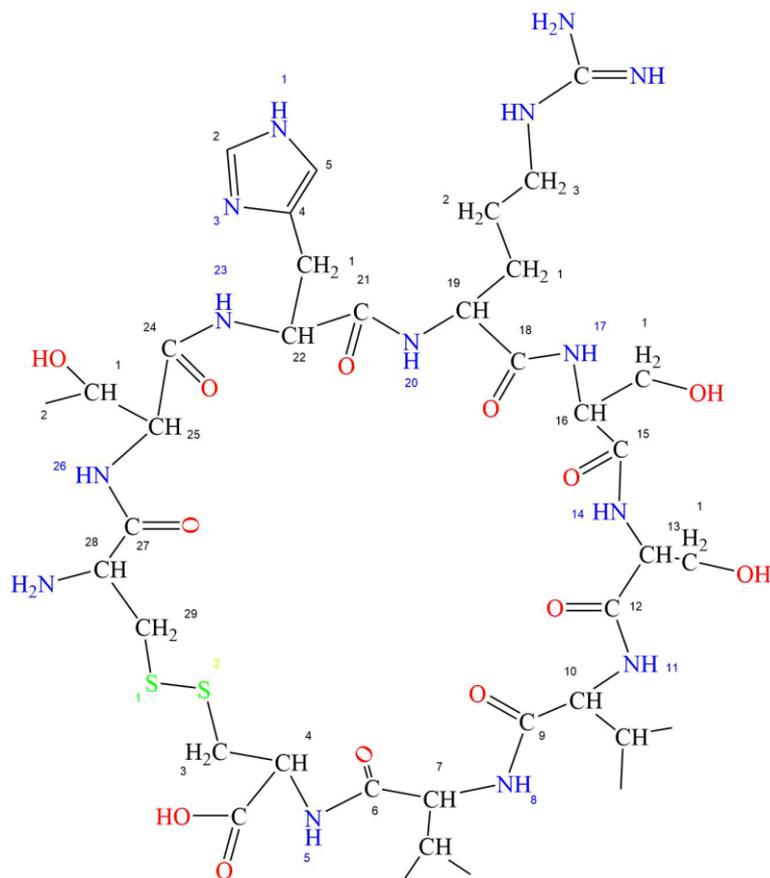
Suttcliffe e colaboradores demonstraram, através da adaptação da técnica de Laverman, a marcação de biomoléculas tais como sequências peptídicas, aptâmeros e imunoglobulinas. A técnica mostra-se versátil e ampla para expansão em clínicas

detentoras de ciclotrons, por se tratar de uma técnica de fácil adaptação e chances de bons rendimentos, tornou-se uma metodologia bastante utilizada em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

1.5. O peptídeo CTHRSSVVC

Silva e colaboradores, investigaram um grupo de peptídeos, selecionados pela técnica de *phage display*, para avaliação e validação de possíveis marcadores para diagnóstico molecular em aterosclerose, utilizando-se de um modelo animal knockout para receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}). O peptídeo selecionado com maior avidéz por placas ateroscleróticas, cuja sequência é “CTHRSSVVC”, foi modificado pela conjugação ao quelante DOTA e radiomarcado com o radioisótopo emissor de fóton único, [¹¹¹In]índio. Foram avaliadas as captações *in vitro* da biomolécula marcada em modelo animal, observando-se a captação em carótidas normais e em placas ateromatosas, apresentando resultados estatisticamente significativos a captação em placas de ateroma.

Figura 3. Estrutura molecular da sequência peptídica cíclica “CTHRSSVVC” contendo uma ligação dissulfeto entre as cisteínas 1 e 9 e os grupos terminais carboxílico e amínico das cisteínas encontram-se livres para funcionalização. Software: ChemBioOffice Ultra v.13.0, PerkinElmer®



22-((1*H*-imidazol-4-yl)methyl)-28-amino-19-(3-guanidinopropyl)-25-(1-hydroxyethyl)-13,16-bis(hydroxymethyl)-7,10-diisopropyl-6,9,12,15,18,21,24,27-octaóxido-1,2-ditíria-5,8,11,14,17,20,23,26-octaazacyclononacosano-4-carboxílico ácido

Chemical Formula: $C_{38}H_{64}N_{14}O_{13}S_2$

Molecular Weight: 989,14

Desenhado utilizando o Software ChemDrawn® v.18. (Fonte: Autor da dissertação)

Estudos posteriores [resultados não publicados] realizados em colaboração com o Prof. Dr. Kateshi Katti e col., da Universidade do Missouri - USA, demonstraram significativa captação desta sequência ao conjugar o peptídeo a nanopartículas de ouro (CTHRSSVVC – Au), em linhagens celulares de tumor de próstata PC-3 e de tumor de pâncreas Panc - 1, utilizando as técnicas CytoViva e Microscopia por transmissão de elétrons (TEM).

1.6. JUSTIFICATIVA

Há uma preocupação global em se desenvolver novas tecnologias de rastreamento, tratamento e seguimento terapêutico na oncologia. O desenvolvimento de biomarcadores e moléculas alvo-específicas tornaram-se parte da pesquisa de rotina em doenças crônicas, tais como câncer e doenças neurodegenerativas. Em se tratando de tumores sólidos, são muitos os desafios, tendo em vista a multifatorialidade da doença.

Tendo estudos preliminares mostrado o potencial do peptídeo cíclico CTHRSSVVC na afinidade por componentes estromais da doença coronariana, nosso grupo decidiu avaliar se o peptídeo CTHRSSVVC, conjugado com NOTA, contendo diferentes espaçadores, pode ser complexado ao complexo radioisotópico [¹⁸F]flúor-alumínio [AlF], utilizando a técnica de Laverman. O complexo radioisotópico Al-F é uma nova técnica a ser aplicada no Brasil e, para fins de comparação, estudaremos o comportamento da mesma biomolécula quando submetida à radiomarcagem com [⁶⁸Ga]gálio.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de preparo e radiomarcção, com $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ e $[^{18}\text{F}]\text{AlF}$, do peptídeo cíclico CTHRSSVVC derivatizado com NOTA, como potencial marcadores para células tumorais

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o processo de conjugação do quelante bifuncional p-SCN-Bn-NOTA ao peptídeo cíclico CTHRSSVVC e compará-lo ao conjugado, NOTA-CTHRSSVVC obtido comercialmente;

Padronizar o processo de radiomarcção do conjugado comercialmente adquirido, com os radionuclídeos $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ e $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$;

Comparar da radiomarcção dos conjugados peguilhado (NOTA-PEG₅-CTHRSSVVC) e não peguilhado (NOTA-CTHRSSVVC) com $[^{18}\text{F}]\text{AlF}$.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INFRAESTRUTURA

Todos os ensaios efetuados durante o período de desenvolvimento deste trabalho, foram realizados no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CMN-HCFMUSP). A instituição é credenciada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) para manipulação de materiais radioativos.

3.2 Reagentes e soluções

- Solução de ácido [¹⁸F]fluorídrico fornecido pela Unidade de Produção de Radiofármacos do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas (CinRad)
- Solução de cloreto de [⁶⁸Ga]gálio fornecido pela Unidade de Produção de Radiofármacos do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas (CinRad)
- Solução salina (NaCl 0,9 %) estéril
- Dimetilsulfóxido anidro (DMSO_(l)) (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Tampão HEPES 50 mM (pH 8,5) (Preparado pelo autor)
- Tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M (pH 9,0) (Preparado pelo autor)
- Acetonitrila (grau CLAE) (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Água ultrapura – Obtida de equipamento Milli-Q - Millipore
- Acetona (grau CLAE) (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Solução de cloreto de alumínio 40 mM (pH 4,1) (Preparada pelo autor)
- Solução de acetato de sódio 0,2 M (pH 4,1) (Preparada pelo autor)
- Ácido clorídrico ultrapuro (30 %) (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Ácido nítrico (Merck KGaA, Alemanha)
- Ácido nítrico 15% (v/v) (Preparada pelo autor)
- Etanol (grau CLAE) (Merck KGaA, Alemanha)
- Solução de citrato de sódio 0,1 M (pH 4,4 - 5,5) (Preparada pelo autor)

- Mistura de acetato de amônio: metanol (25:75 v/v) (Preparada pelo autor)
- Mistura de acetato de amônio: metanol (50:50 v/v) (Preparada pelo autor)
- Mistura de acetato de amônio: metanol (75:25 v/v) (Preparada pelo autor)
- n-octanol (Merck KGaA, Alemanha)
- Peptídeo "CTHRSSVVC" (Chinese Peptide Company, China)
- *p*-SCN-Bn-DOTA e *p*-SCN-Bn-NOTA (FutureChem Company, Coreia do Sul)
- Conjugados "NOTA-CTHRSSVVC" (Chinese Peptide Company, China)

3.3 Materiais para cromatografia e purificações

- Coluna analítica de fase reversa C18 Aeris Peptide - Phenomenex Inc, USA;
- Coluna analítica de fase reversa C18 Bondclone- Phenomenex Inc, USA;
- Cartucho de separação SepPak® C18 light (Waters, EUA)
- Cartucho de separação SepPak® QMA light (Waters, EUA)
- Suporte cromatográfico em placa de polímero C18 (TLC-RP_{C18}) (Merck KGaA, Alemanha)
- Suporte cromatográfico de fibra de vidro impregnada com sílica gel (ITLC-SG) (Merck KGaA, Alemanha)
- Tiras indicadoras de pH (Merck KGaA, Alemanha)

3.4 Equipamentos e utensílios

- Agitador/aquecedor (ESCO, Suíça)
- Balança analítica ATY-224 (Shimadzu, JPN)
- Atívimetro (Capintec – EUA)
- Contador Gama automático (Hidex – LKB, GER)
- HPLC Shimadzu 10VP (Shimadzu Corporatio, JPN)
- Detector de radiação Radiomatic 610TR (Perkin-Elmer, EUA)
- Centrífuga refrigerada 5804-R (Eppendorf, Merck KGaA, Darmstadt, GER)
- Estufa de incubação em de CO₂ (Sanyo, JPN)
- Medidor de pH (Mettler-Toledo, Suíça)

- Micro pHmêtro (Sigma-Aldrich Inc, EUA)
- Tubos e microtubos (200 µL, 1,5 mL e 5,0 mL) - (Eppendorf);
- Vidrarias: béquer, balão volumétrico, provetas, pipetas, erlenmeyers, tubos cônicos silanizados;

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Análise dos componentes reacionais

Os reagentes (i) *p*-SCN-Bn-NOTA e (ii) CTHRSSVVC, foram analisados por CLAE em colunas analíticas de fase reversa Aeris Peptide (250 mm x 4,6 µm) ou C18 Bondclone (300 mm x 4,6 µm), ambas Phenomenex®, utilizando as fases móveis (A) H₂O (0,1% TFA) e (B) acetonitrila (0,1% TFA), nos sistemas gradiente descritos a seguir, sob fluxo de 1,0 mL/minuto, utilizando detector UV-Vis a 220 e 254 nm.

Sistema 1: Proporção A e B (A:B) em relação ao tempo

0 – 3 min = 100:0; 3 – 25 min = de 100:0 % para 75:25; 25 – 50 min = de 75:25 para 35:65; 50 – 60 min = de 35:65 para 100:0;

Sistema 2: Proporção A e B (A:B) em relação ao tempo

0 – 20 min = de 97:3 para 20:80; 20 – 30 min = de 20:80 para 97:3; 30 – 35 minutos = 97:3;

Sistema 3: Proporção A e B (A:B) em relação ao tempo

0 – 1 min = de 97:3; 2 – 20 = de 97:3 para 35:65; 20 – 25 min = de 35:65 para 97:3

3.5.2 Avaliação da taxa de conjugação do quelante *p*-SCN-Bn-NOTA ao peptídeo CTHRSSVVC, em função do tempo

Em frascos de vidro silanizados, de fundo cônico e capacidade de 3 mL, foram adicionados 1 mg (1,01 μmol) do peptídeo CTHRSSVVC, dissolvido em 0,4 mL ou 0,6 mL de tampão HEPES 50 mM (pH 8,5)²⁷, ou o mesmo volume de solução $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1 M (pH 9,0)²⁸, seguido da adição, gota a gota, de 0,1 mL a 0,2 mL de solução contendo 1,11 μmol dos agentes quelantes *p*-SCN-Bn-DOTA (0,76 mg) e *p*-SCN-Bn-NOTA (0,62 mg). A solução resultante foi mantida sob agitação magnética por 4 horas, a temperatura ambiente (20-23 °C), e a cada hora foi retirada uma alíquota de 50 μL da solução de reação e analisada por CLAE, segundo sistema 2 da seção 3.4.1.

3.5.3 Purificação do conjugado NOTA-Bn-CTHRSSVVC

O produto da reação descrita no item 3.4.2, foi purificado em CLAE utilizando coluna semipreparativa de fase reversa Synergi Hydro-RP (250 mm x 10,0 mm) eluída em modo gradiente, idêntico aos especificado no item 3.4.1, exceto pelo fluxo de fase móvel utilizado, que foi de 2 mL/min. Os principais picos foram coletados em fracionador automático e a fase móvel foi evaporada a 40 °C sob fluxo de nitrogênio (N_2).

3.5.4 Preparação de concentrado de [⁶⁸Ga]Ga³⁺ a partir de eluato do gerador de germânio-gálio (⁶⁸Ge/⁶⁸Ga)

Seis mililitros de solução de [⁶⁸Ga]GaCl₃, dissolvidos em HCl 0,1 N, foram percoladas por coluna de troca catiônica, sem condicionamento prévio. O [⁶⁸Ga]Ga³⁺ retido foi eluído com a passagem de 0,4 a 0,6 mL de solução de acetona:HCl 0,1 N (98:2 v/v), a qual foi recolhida em tubo do tipo eppendorff; o solvente foi evaporado até a secura em banho seco (40°C por 3-5 minutos). O

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ residual foi ressuspendido em 0,3 - 0,5 mL de solução de NaAcO 0,2 M (pH 4) para posterior reação de radiomarcção.

3.5.5 Reação de complexação do $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ aos conjugados

Em frascos eppendorff de 1,5 mL, foram adicionados 0,350 mL de tampão NaAcO 0,2 M (pH 4), seguido da adição de 80,0 μL de solução aquosa (1,0 mg/mL) do peptídeo conjugado com NOTA. O pH foi novamente mensurado (pH de 4,0 a 4,4) e foram adicionadas, gota a gota, pela parede do frasco tipo eppendorff, 0,1 a 0,2 mL da solução contendo 1,0 – 2,5 mCi (ou 37 – 92,5 MBq). A solução foi aquecida à 100 °C para quelante NOTA, durante 10 - 15 minutos. Após resfriada à 22°C, os produtos das reações foram analisados por CLAE, conforme descrito em 3.4.1 – sistema 3.

3.5.6 Reação de coordenação com o complexo radioisotópico $[^{18}\text{F}]\text{AlF}$

Coluna trocadora de ânions QMA foi pré-condicionada com 5,0 mL de etanol absoluto, seguido por 10,0 mL de água ultrapura e, então, seca com 40,0 mL de ar. A solução de $[^{18}\text{F}]\text{fluoreto}$ foi, então, carregada à coluna e em seguida lavada com 10,0 mL de água ultrapura; por fim, o produto final retido à coluna foi eluído com 0,5 mL de solução NaAcO 0,2 M (pH 4,2). À esta solução foram adicionados 5,0 μL da solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, permanecendo em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos.

Em eppendorffs de 1,5 mL, foram adicionados 0,350 mL de tampão NaAcO 0,2 M (pH 4,2), 80,0 μL de solução (1,0 mg/mL) do peptídeo conjugado com NOTA, seguido da adição de 0,1 – 0,2 mL da solução $[^{18}\text{F}]\text{AlF}$ contendo 1,0 – 2,5 mCi (ou 37 – 92,5 MBq) de radioatividade. A solução foi aquecida a 100°C por 15 – 20 minutos e, então, resfriada a 22°C. O controle de qualidade foi realizado por CLAE, seguindo protocolo estabelecido em 3.4.1 – sistema 3.

3.5.7 Estabilidade do complexo pós-marcação

Após a purificação dos composto radiomarcados, quatro alíquotas de 20 µL, em intervalos de 1 hora, foram injetadas para análise por CLAE, seguindo o protocolo estabelecido em 3.4.1 – sistema 3. Os resultados de área do(s) pico(s) cromatográfico(s) foram convertidos em percentagem de purificação esperando, dentro do preconizado, estabilidade química dos complexos superior a 96%.

3.5.8 Determinação da lipofilicidade dos compostos

A lipofilicidade dos produtos radiomarcados foi mensurada através do teste de coeficiente (P), utilizando n-octanol e água como solventes. Uma alíquota de 200 µL do complexo purificado, previamente diluída para atividade final de 100µCi/mL, foi adicionado a uma mistura de 4 mL de n-octanol e água (1:1). A mistura foi agitada e homogeneizada e, então, centrifugada à 5000xg durante 1 min à temperatura ambiente a fim de obter uma separação mais eficiente.

Após repouso de 5 min, foram coletadas alíquotas de 100 µL de cada fase, em triplicata, em tubos tipo eppendorff e a atividade foi determinada. O coeficiente de partição e o coeficiente de partição médio foram determinados segundo as equações abaixo:

$$P_{\text{app}} = \frac{\text{atividade CPM (n-octanol)}}{\text{atividade CPM (água)}} = \text{Log}P_{\text{app}}$$

$$P_{\text{appmédio}} = \frac{\mu \text{ atividades CPM (n-octanol)}}{\mu \text{ atividades CPM (água)}} = \text{Log}P_{\text{appmédio}}$$

sendo, CPM = contagem por minuto.

3.5.9 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos pelas análises em CLAE, utilizando-se do Software Shimadzu®, foram demonstrados pelas áreas dos picos encontrados, as quais foram convertidos em percentagens. Dessa forma, os dados de conjugação, radiomarcagem, pureza e estabilidade serão apresentados em função de suas respectivas médias \pm desvio padrão das porcentagens obtidas, nos diferentes ensaios.

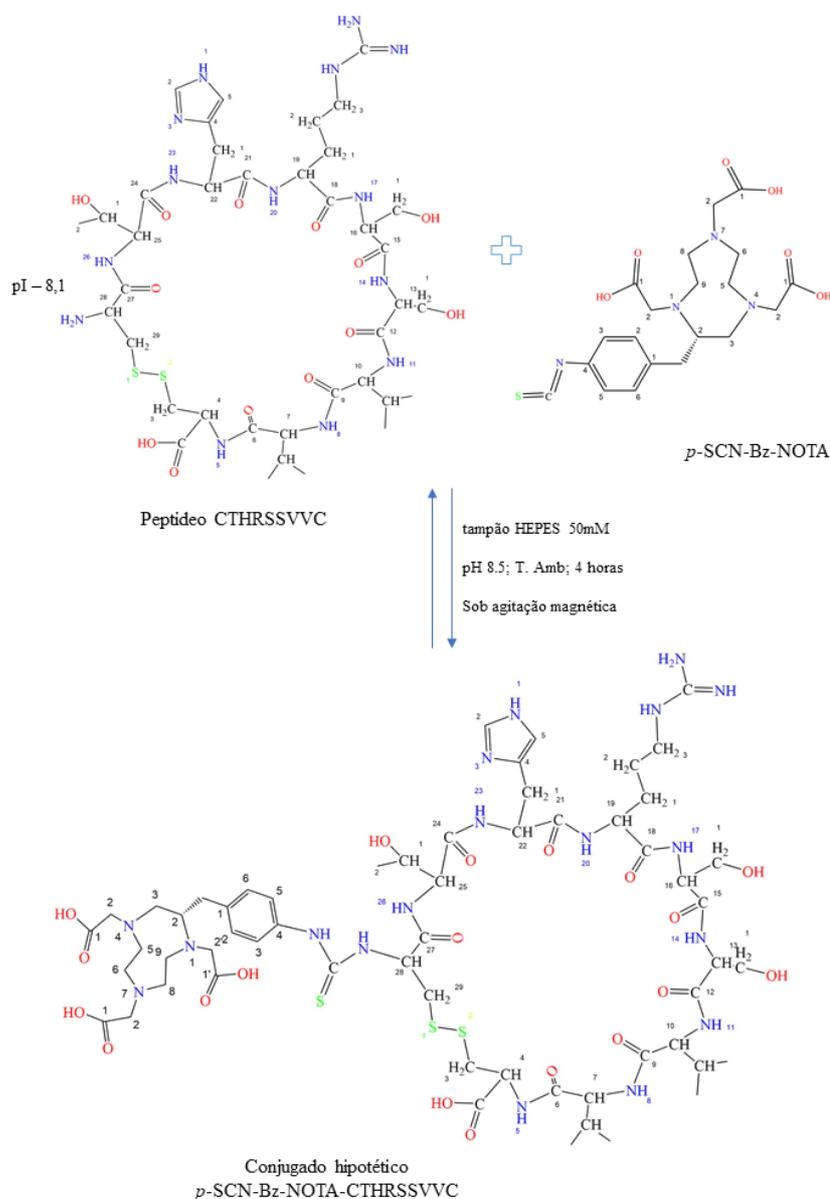
Os resultados de espectrometria de massas foram analisados com base nos relatórios de análise emitidos pela Central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reação de condensação entre o ligante *p*-SCN-Bn-NOTA e o peptídeo CTHRSSVVC

A preparação do peptídeo cíclico conjugado NOTA-Bn-CTHRSSVVC foi realizada segundo adaptação de Máté e colaboradores, conforme esquema apresentado na figura X, sendo os parâmetros reacionais apresentados na tabela x.

Figura 4: Esquema da reação de condensação.



Desenhado utilizando o Software ChemDraw[®] v.18. (Fonte: Autor da dissertação)

Tabela 1 – Condições experimentais para obtenção do produto *p*-SCN-Bn-NOTA-CTHRSSVVC

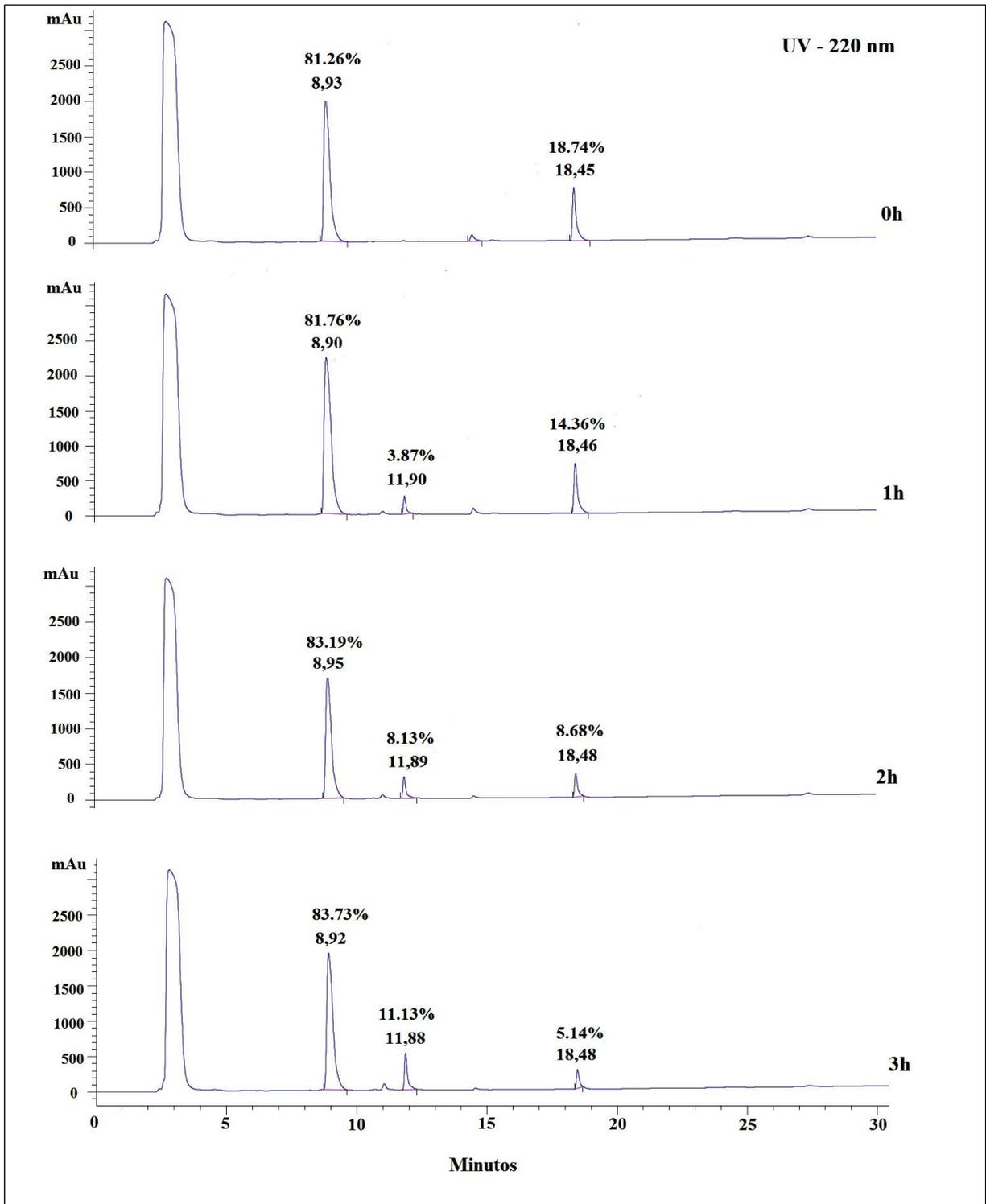
REAGENTES	QUANTIDADES	MOLS
DMSO	0,1 - 0,2 mL	-
TAMPÃO (HEPES OU HCO ₃ ⁻ /CO ₃ ²⁻)	0,35 - 0,45 mL	-
PEPTÍDEO "CTHRSSVVC"	50 - 150 µg	1,0 - 3,0 ηmols
QUELANTE NOTA	70 - 180 µg	1,1 - 2,2 ηmols

A reação realizada à temperatura ambiente, foi acompanhada utilizando CLAE para poder determinar as taxas de consumo de reagentes e aparecimento do produto. Baseado em dados já de conhecimento do grupo, foram utilizados dois comprimentos de onda para registro dos sinais (220 e 254 nm) e foram realizadas análise em quatro momentos diferentes, tempo zero, assim que os reagentes foram misturados, e os tempos de 1, 2 e 3 horas. Conforme pode ser visualizado nas figuras x e y, temos no tempo de retenção entre 8,9 a 8,95 minutos a presença do peptídeo e entre 18,45 e 18,48 minutos o quelante e, a medida que o tempo vai passando, surge um outro sinal entre 11,88 e 11,9 minutos, o qual acreditamos ser o peptídeo.

Um fato interessante a ser observado é que a medida que a reação se desenvolve, é nítida o consumo do quelante, concomitante com o surgimento do produto, mas não se observa o desaparecimento significativo do peptídeo. Esse comportamento, a que nos parece, anômalo não pôde ser justificado. Mas a obtenção do peptídeo conjugado foi confirmada por espectrometria de massa do produto com tempo de retenção entre 11,88 e 11,9 minutos. Um resumo das porcentagens determinadas por HPLC está apresentado na tabela 2.

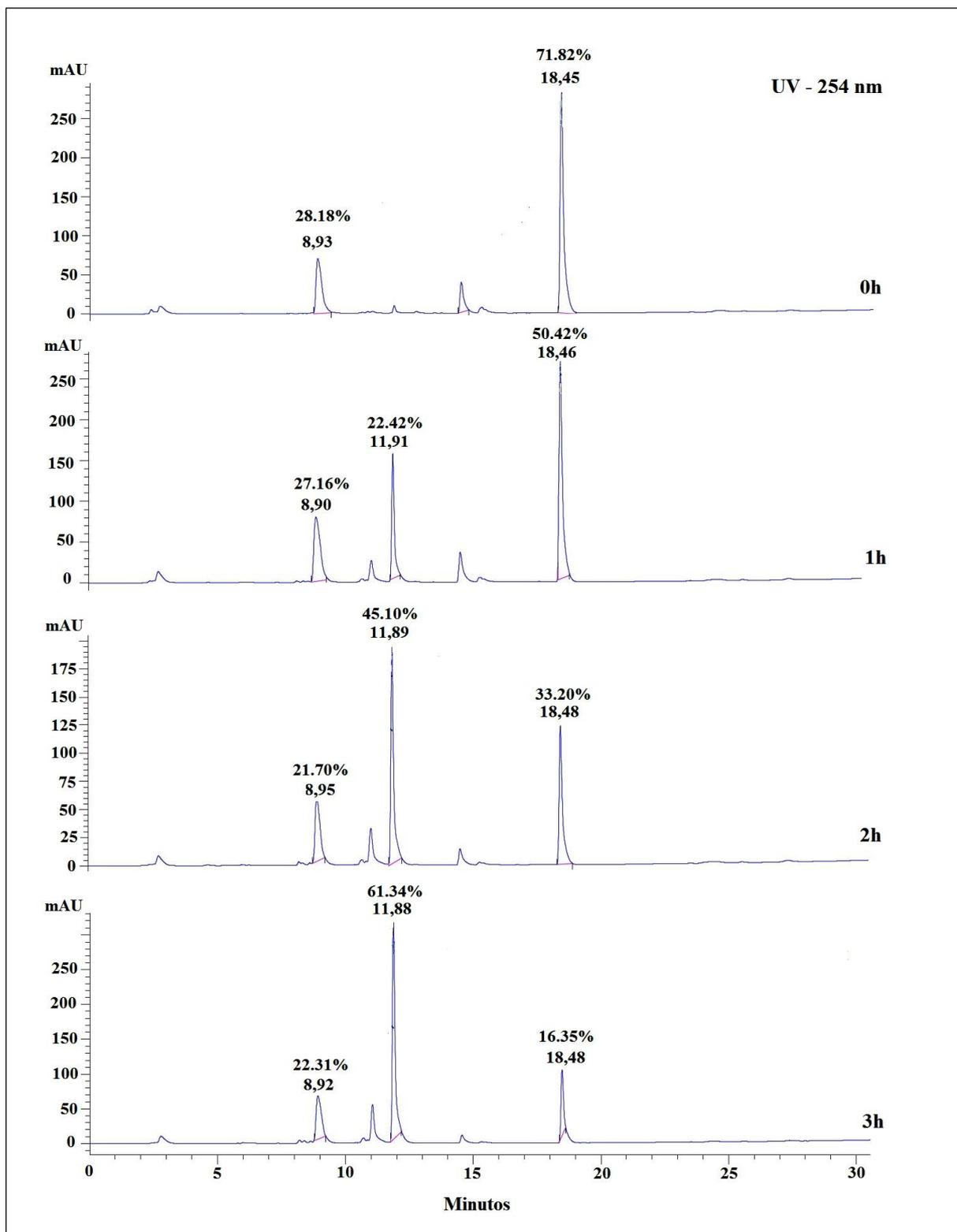
O produto isolado foi posteriormente utilizado no processo de marcação.

Figura 5 - Cromatogramas referentes à dinâmica de reação de condensação entre o peptídeo “CTHRSSVVC” e o quelante p-Bn-SCN-NOTA



Cromatogramas obtidos em equipamento de CLAE Agilent. Fase estacionária: coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide; fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e água. Absorção no UV a 220 nm. (Fonte: Autor da dissertação)

Figura 6 - Cromatogramas referentes à dinâmica de reação de condensação entre o peptídeo “CTHRSSVVC” e o quelante p-Bn-SCN-NOTA



Cromatogramas obtidos em equipamento de CLAE Agilent. Fase estacionária: coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide; fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e água. Absorção no UV a 254 nm. (Fonte: Autor da dissertação)

Os valores das percentagens obtidas, nas figuras 4 e 5, através do cálculo das áreas de cada pico em relação à área total de todos os picos, são apresentados na tabela 3, a seguir:

Tabela 2 - Quantificação das áreas dos picos, a 220 e 254 nm, para as espécies detectadas via análise por CLAE.

Tempo de reação (h)	Área do pico em 8,9 minutos (%)		Área do pico em 11,8 minutos (%)		Área do pico em 18,4 minutos (%)	
	λ (nm)		λ (nm)		λ (nm)	
	220	254	220	254	220	254
0	81,26	28,18	0	0	18,74	71,82
1	81,76	27,16	3,87	22,42	14,36	50,42
2	83,19	21,70	8,13	45,10	8,68	33,20
3	83,73	22,31	11,13	61,34	5,14	16,35

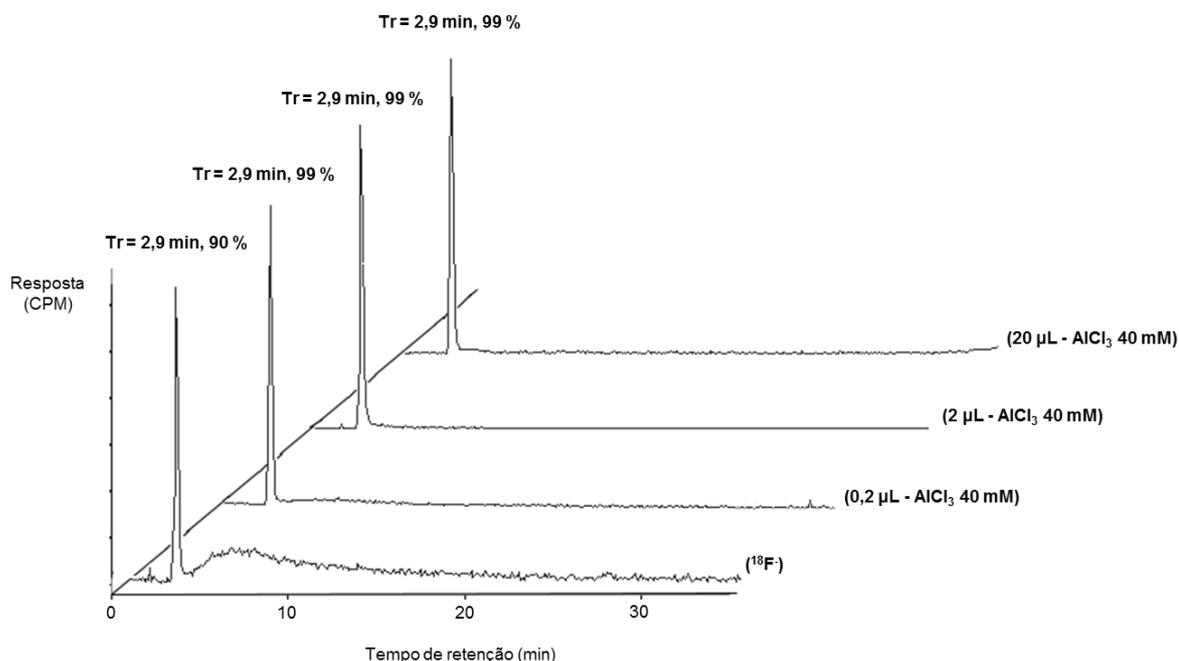
(Fonte: Autor da dissertação)

4.1.1 Preparação do $[^{18}\text{F}]\text{AlF}^{2+}$

Inicialmente foi avaliada a condição de preparação do $[^{18}\text{F}]\text{AlF}^{2+}$ utilizando diferentes massas de AlCl_3 , tendo em vista diferentes relatos apresentados na literatura.

A partir de uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 mM foram tomadas alíquotas de 0,2, 2 e 20 μL para reagir com o $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Utilizando o mesmo sistema cromatográfico estabelecido para análise do peptídeo conjugado, não foi possível verificar qualquer alteração no tempo de retenção do $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ e do produto de reação $[^{18}\text{F}]\text{AlF}^{2+}$, pois os dois compostos apresentaram o mesmo tempo de retenção de 2,9 min, conforme apresentado na figura 7. Assim, para todas as etapas posteriores foi utilizado o volume de 2 a 20 μL da solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 mM, preparada a cada processo de radiomarcção.

Figura 7 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do ^{18}F AI utilizando diferentes massas de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\% \text{TFA}$ (sistema 3), utilizando diferentes concentrações de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (Fonte: Autor da dissertação).

Deste ponto, partimos para a reação de complexação do ^{18}F FAI pelo NOTA-CTHRSSVVC, fixando alguns parâmetros reportados anteriormente por Sutcliffe e colaboradores, como tempo de reação de 15 min, temperatura de 100 °C e tampão NaAcO 0,2 M pH 4,1.

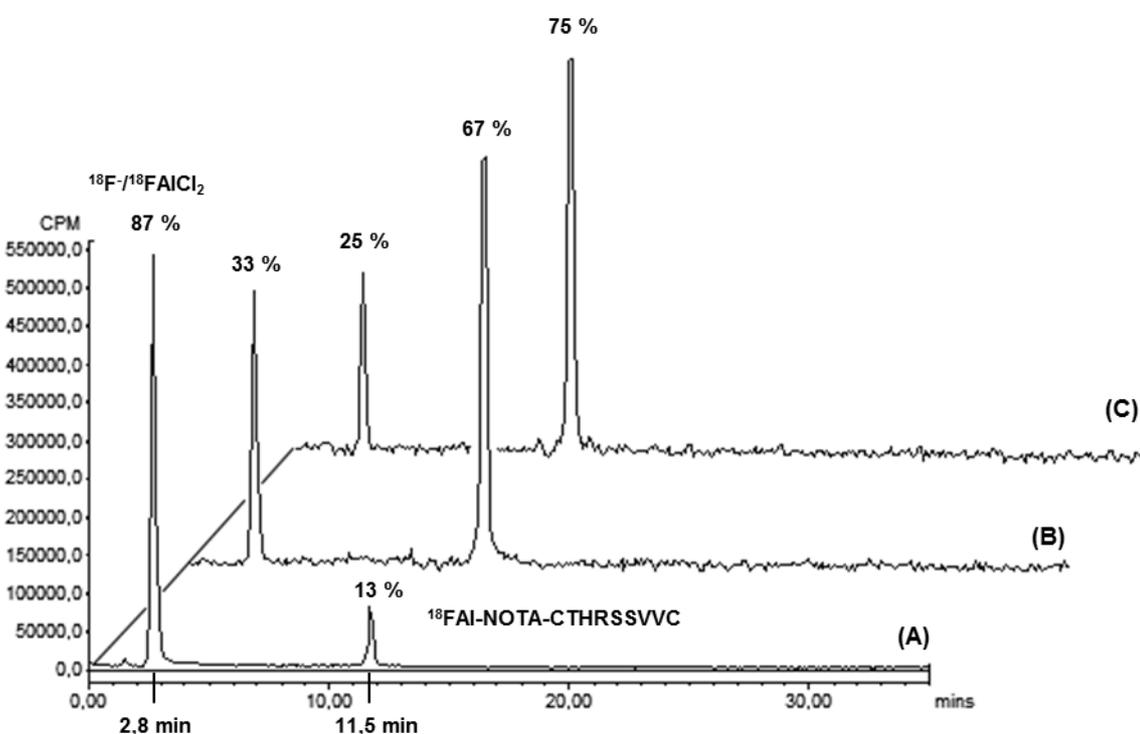
Enquanto as condições tendem a se repetir em vários trabalhos a massa de peptídeos utilizadas nos processos de marcação (Tabela do Anexo 1) variam bastante demonstrando a necessidade de estabelecer a melhor quantidade em massa ou número de moles, para cada experimento.

A partir de uma solução do peptídeo (1 mg/mL) foram adicionadas à reação alíquotas de 40 μL (40 μg – 0,28 nmols), 80 μL (80 μg – 0,56 nmols) e 120 μL (120 μg – 0,83 nmols). A análise por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico 3 especificado na seção 3.4.1; permitiu detectar dois picos (utilizando detector de radiação): (i) $T_R = 2,9$ min e (ii) $T_R = 12,2$ min. O primeiro referente ao complexo ^{18}F AI, enquanto o segundo consideramos tratar-se do produto marcado ^{18}F AI-NOTA-CTHRSSVVC, e para este segundo tempo de retenção foram obtidos

rendimentos de 13%, 67% e 73%, respectivamente a cada massa utilizada (Figura 8).

Com esses resultados e considerando que o aumento de massa de 80 µg para 120 µg, não resultou em aumento substancial do rendimento e levando em conta o preço do princípio ativo e o efeito de massa no bloqueio de potenciais receptores, adotamos a massa de 80 µg como a ideal para prosseguir os estudos.

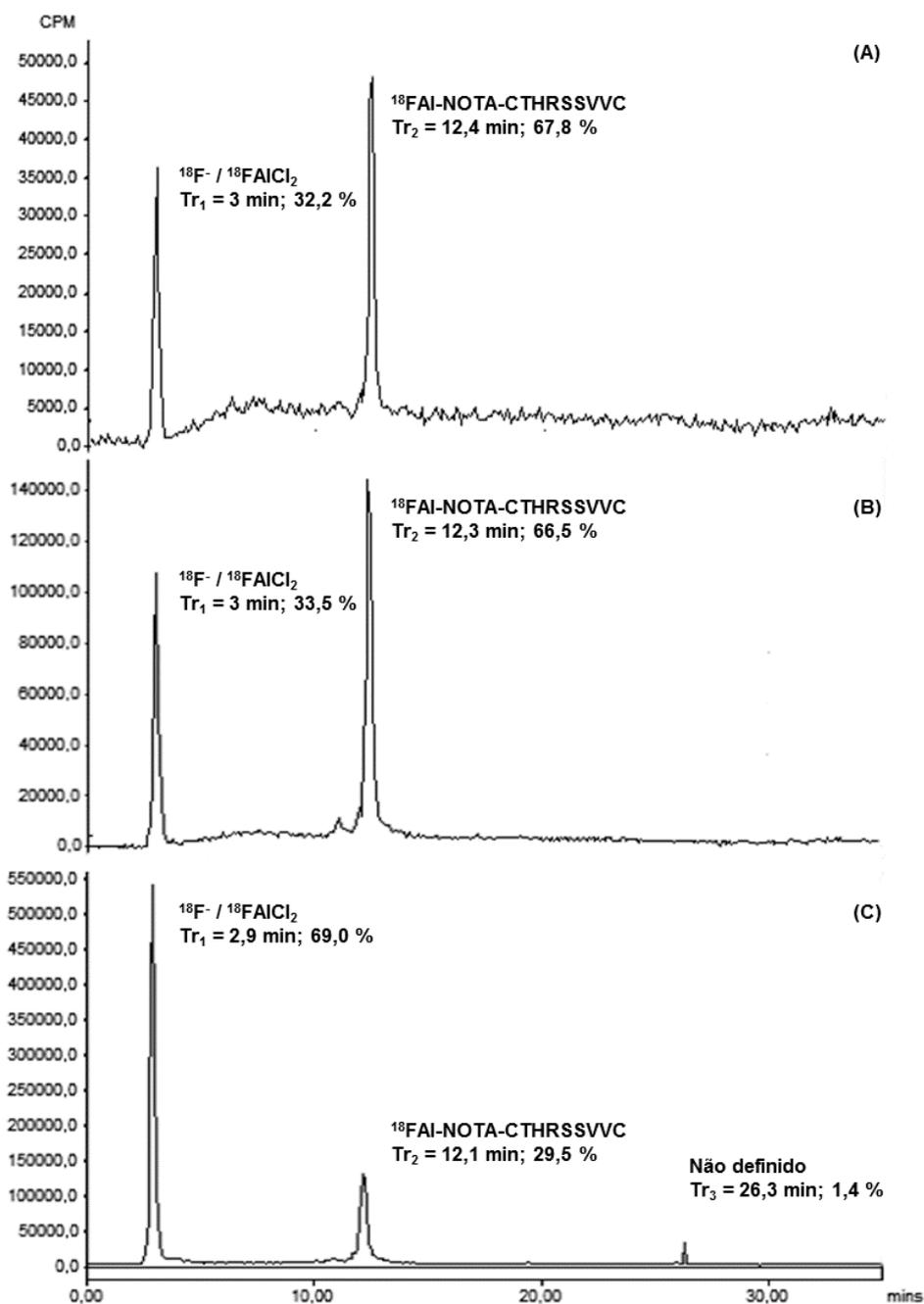
Figura 8 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do ^{18}F FAI-NOTA-CTHRSSVVC utilizando diferentes massas do peptídeo.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%TFA$ (sistema 3). Massa do peptídeo NOTA-CTHRSSVVC: A) 40 µg (0,28 nmols), B) 80 µg (0,56 nmols), C) 120 µg (0,83 nmols). (Fonte: Autor da dissertação).

Fixando a massa do peptídeo em 80 µg, foi avaliada a eficiência de marcação utilizando diferentes atividades do material radioativo, o qual de forma direta também representa o aumento da massa de ^{18}F FAI²⁺ na preparação. A partir de um mesmo solução de ^{18}F FAI²⁺ (80 mCi/270 µL), foram utilizadas 3, 15 e 30 mCi, com volume final ajustado a 100 µL.

Figura 9 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de preparação do ^{18}F FAI-NOTA-CTHRSSVVC utilizando diferentes atividade de ^{18}F FAI $^{2+}$.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA (sistema 3). Atividade do ^{18}F FAI $^{2+}$: A) 3 mCi, B) 15 mCi, C) 30 mCi. (Fonte: Autor da dissertação).

Os resultados apresentados na Figura 8, mostram que até a atividade de 15 mCi, o rendimento de marcação é constante, mas diminui fortemente para a atividade de 30 mCi. Esse resultado é condizente com vários outros publicados na

literatura, uma vez que a maioria dos autores (tabela do ANEXO 1) utilizam atividade de marcação menor que 5 mCi.

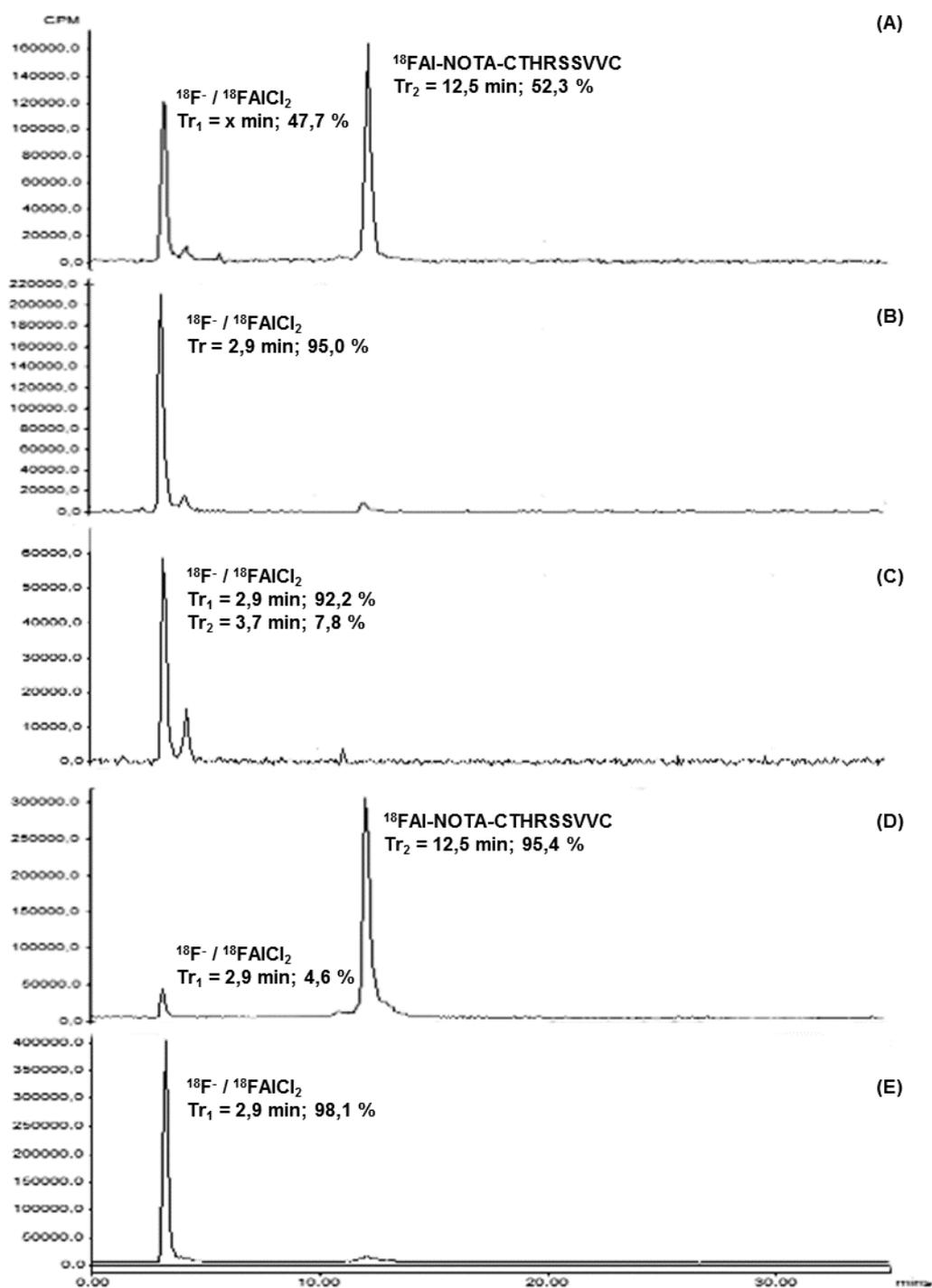
Nenhuma das condições avaliadas para a preparação do [^{18}F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC levou a obtenção de um produto com algum grau de pureza, ou seja, maior que 95 %. Deste modo foi necessário avaliar métodos de purificação e o escolhido, inicialmente com base na simplicidade e baixo custo, foi o método de purificação por extração em fase sólida, em cartucho SepaK contendo fase estacionário C-18.

O método é utilizado em várias preparações e faz uso da interação entre o analito, neste caso o peptídeo radiomarcado, e o contaminante [^{18}F]FAI $^{2+}$, através das fases sólida e móvel do sistema.

Tomando como base o perfil de eluição dos produtos de reação na CLAE, onde o [^{18}F]FAI $^{2+}$ é eluído nos tempos iniciais da corrida cromatográfica e o peptídeo só é eluído em tempos mais tardios, quando a concentração do eluente orgânico é alta, utilizamos processo semelhante na etapa de purificação.

O produto da reação entre o [^{18}F]FAI $^{2+}$ e o peptídeo NOTA-CTHRSSVVC (A) foi carregada no cartucho e o líquido de carregamento foi coletado e reservado (B), em seguida foram percolados 1 mL de H $_2$ O (C), 1 mL de solução de ACN:H $_2$ O (1:1 - v/v) (D) e finalmente 1 mL H $_2$ O (E). Todas as frações, inclusive a da reação inicial foram analisadas por CLAE, sendo o início a eficiência de marcação determinada como 62,3 % (A) e no processo de purificação a fração da mistura ACN:H $_2$ O (1:1 - v/v) (D) gerou um produto com 95,4 %, adequado para avaliação da estabilidade do complexo e de estudos biológicos.

Figura 10 - Radiocromatogramas referentes a avaliação do processo de purificação do [^{18}F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC utilizando processo de extração em fase sólida.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3): (A) amostra reacional, (B) solução de reação percolada, (C) H_2O percolada, (D) solução de ACN: H_2O (1:1 - v/v) percolada, (E) H_2O percolada (Fonte: Autor da dissertação).

O processo de purificação foi novamente aplicado, mas neste experimento o produto purificado foi analisado quanto a estabilidade de ligação do [^{18}F]flúor ao ligante NOTA acoplado ao peptídeo CTHRSSVVC. Todo o processo foi avaliado por CLAE (Figura 9), inclusive o produto final da reação (A), o produto de purificação, ao qual foi atribuído o tempo zero (B) e as análises após 1 (C), 2 (D) e 3 (E) horas à temperatura de 20-23°C. Por essa análise foi possível confirmar a estabilidade de ligação e garantir que o produto possa ser utilizado em até 3 horas da sua preparação.

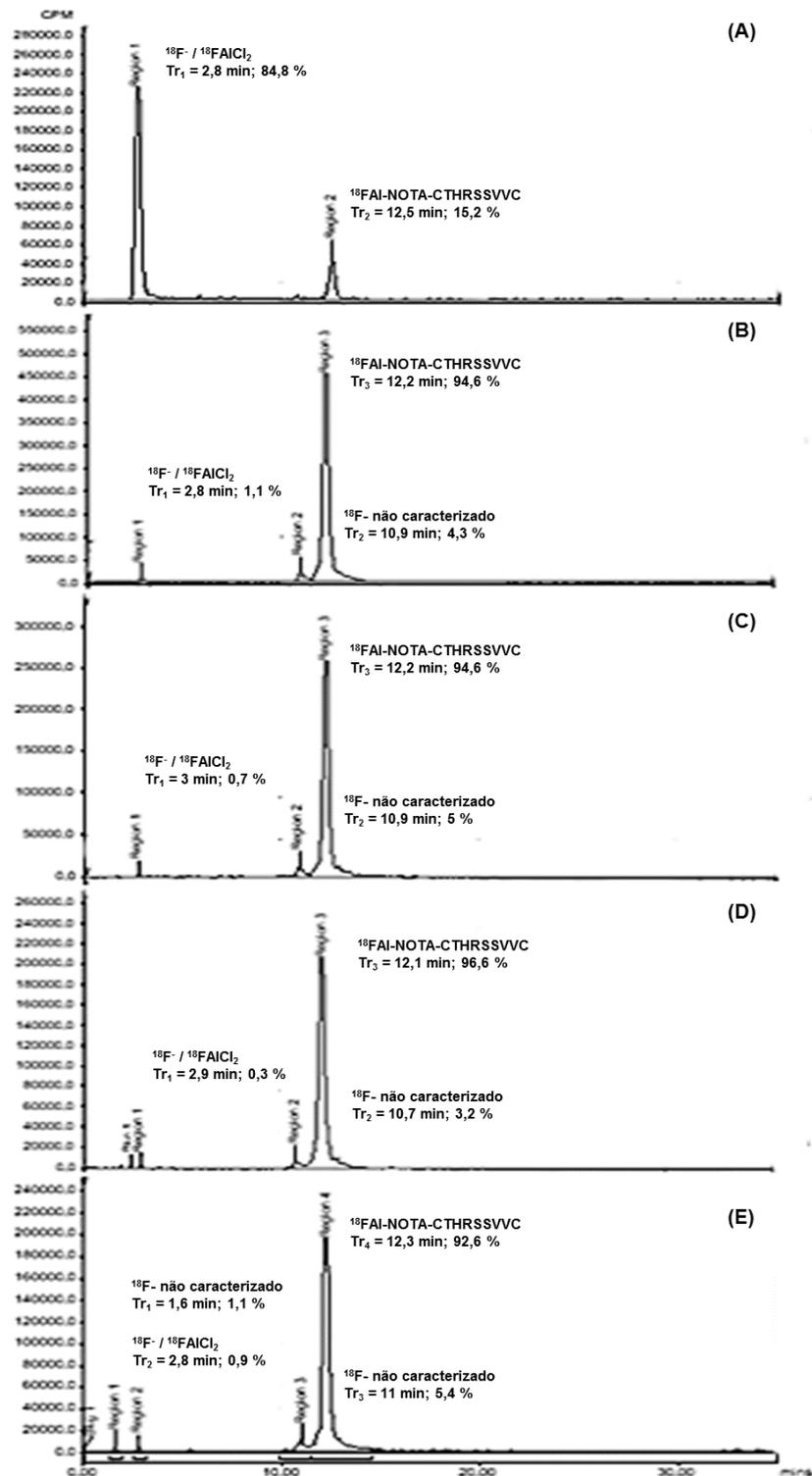
A partir dos resultados apresentados nas Figuras 6 a 9, pudemos estabelecer as condições ideais (Tabela 3) para a preparação do peptídeo apresentado e possivelmente de alguns derivados.

Tabela 3 – Variáveis investigadas para definição das condições reacionais.

Parâmetros	Condições testadas	Condições escolhidas
Frasco	eppendorffs (1,5 mL)	
Tampão	NaAcO(aq) 0,2 M – pH 4 a 4,2	
Temperatura	100 °C	
Tempo	15 minutos	
Qtdd. de peptídeo	40,0, 80,0 e 120,0 ng	80,0 ng
Atividade	3,0, 15,0 e 30,0 mCi	3,0 mCi
Volume final	400 ou 500 μL	400 ou 500 μL

(Fonte: Autor da dissertação).

Figura 11 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo $[^{18}\text{F}]\text{AlF-NOTA-CTHRSSVVC}$ após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.

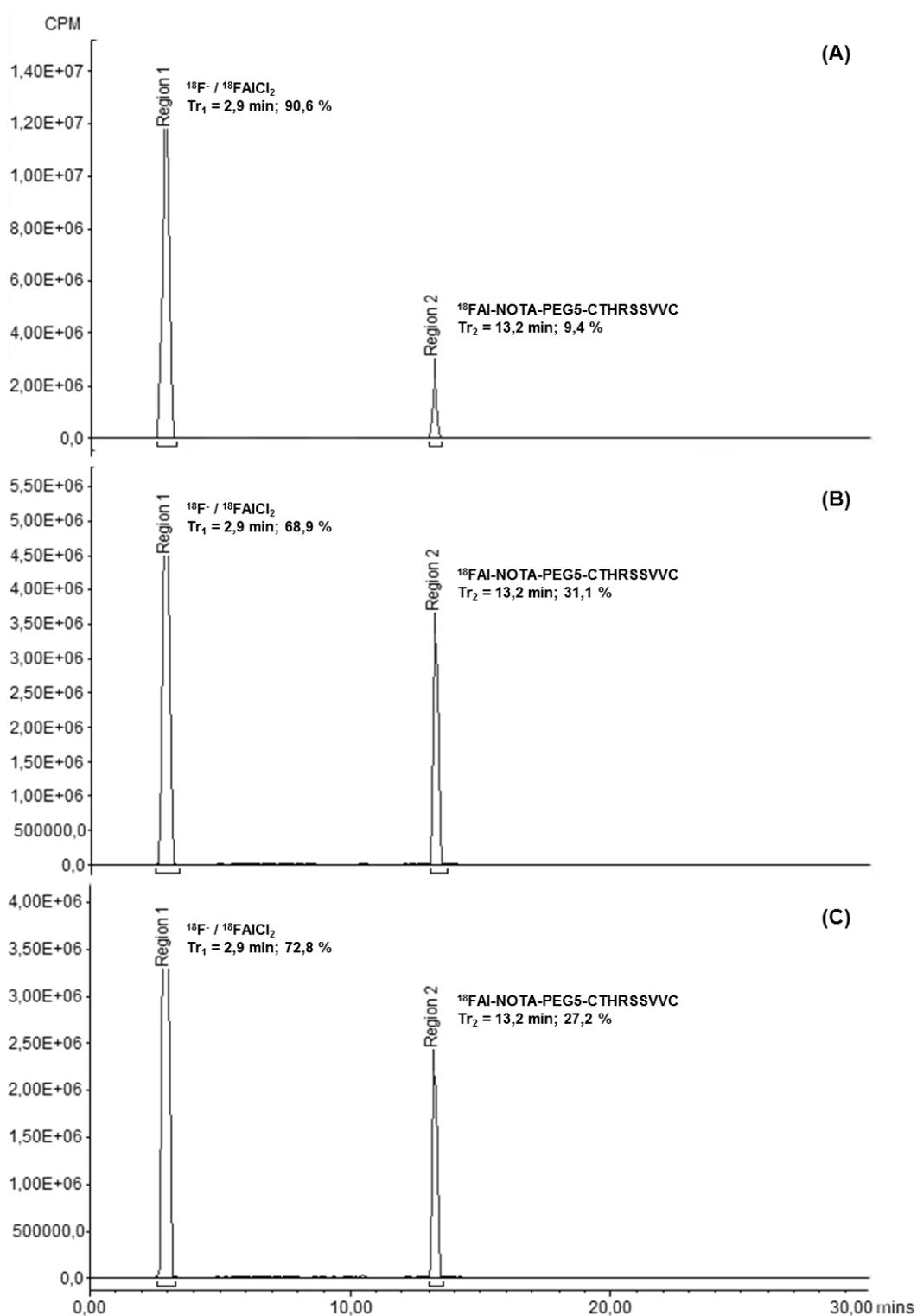


Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3): (A) amostra pós-reacional, (B) amostra purificada, (C) amostra após 1 hora da purificação, (D) amostra após 2 hora da purificação, (E) amostra após 3 hora da purificação (Fonte: Autor da dissertação).

[¹⁸F]AIF-NOTA-PEG₅-CTHRSSVVC

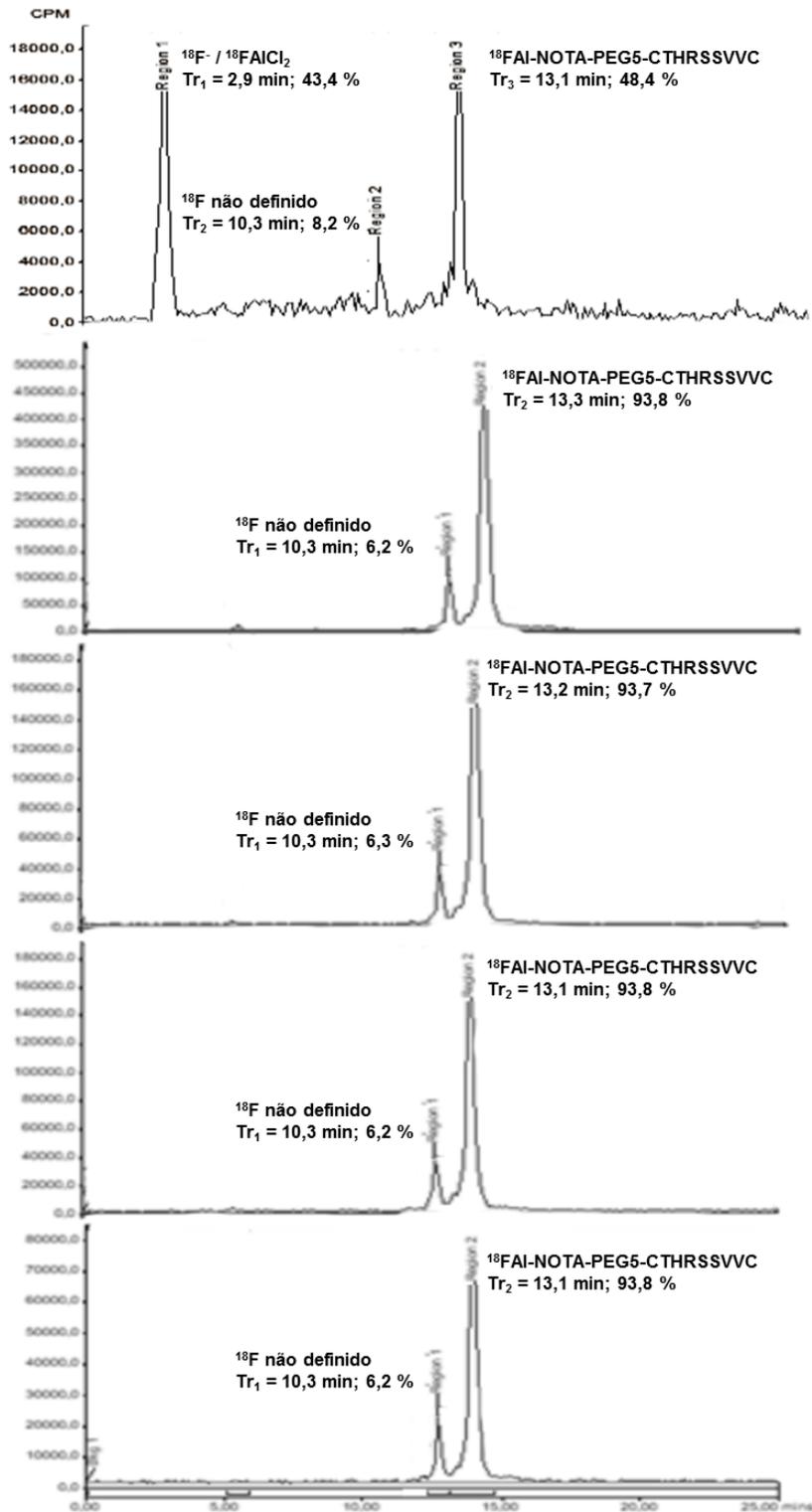
O peptídeo foi, então, modificado através da introdução de um grupo polietileno glicol com 5 monômeros (PEG₅) para permitir a investigação do distanciamento molecular e estérico do grupo NOTA ao peptídeo e, conseqüentemente, aumentando o distanciamento do radioisótopo à biomolécula, com o intuito inicial de alterar a lipofilicidade final. O afastamento do grupo quelante contendo o metal buscando diminuir a interferência desse grupo (efeito estérico), que é volumoso, a possíveis receptores existentes na membrana das células-alvo. Os resultados abaixo (figuras

Figura 12 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-CTHRSSVVC}$ após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3): (A) amostra pós-reacional, (B) amostra purificada, (C) amostra após 1 hora da purificação, (D) amostra após 2 hora da purificação, (E) amostra após 3 hora da purificação (Fonte: Autor da dissertação).

Figura 13 - Radiocromatogramas da análise de estabilidade do complexo $[^{18}\text{F}]\text{AlF-NOTA-CTHRSSVVC}$ após purificação, utilizando processo de extração em fase sólida.



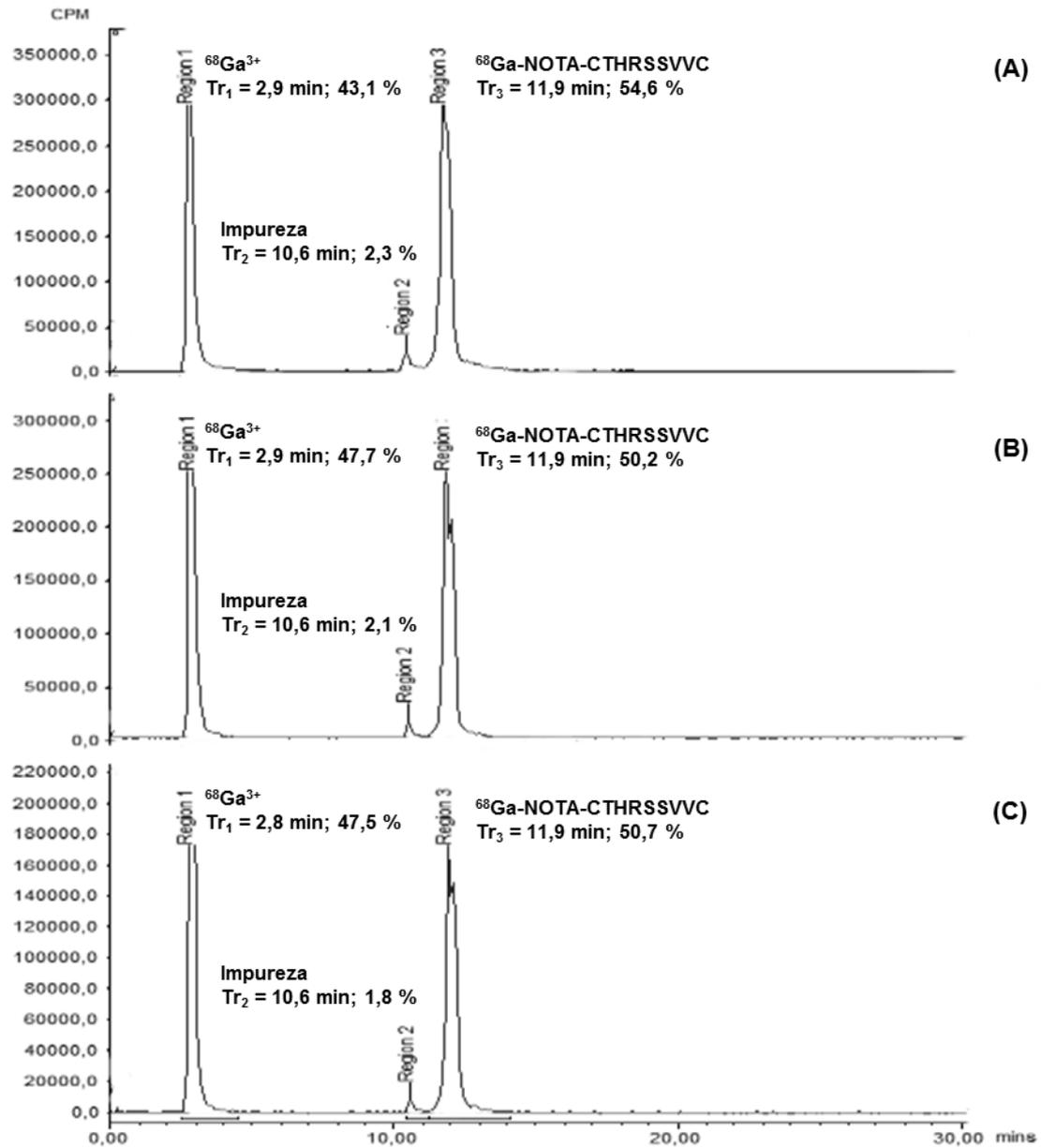
Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3).

4.1.2.2 Coordenação com [⁶⁸Ga]gálio

Para fins de comparação com a radiomarcagem efetuada com o complexo radioisotópico [¹⁸F]AlF, fizemos ensaios de radiomarcagem com o radioisótopo [⁶⁸Ga]gálio atualmente bastante utilizado para a marcação de peptídeos com finalidade diagnóstica por tomografia de emissão de pósitrons.

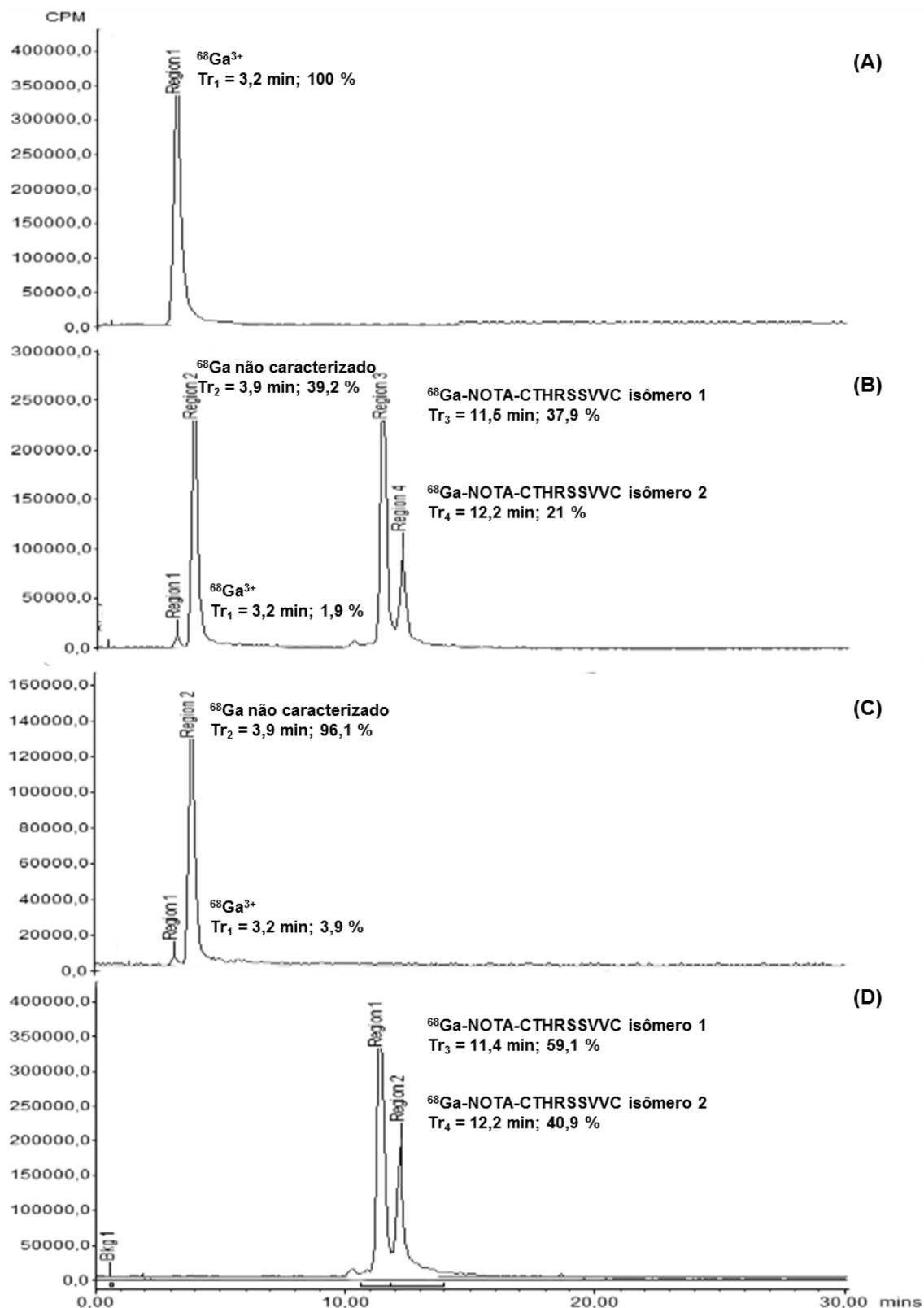
A reação entre o peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e íons de [⁶⁸Ga]Ga³⁺, analisado por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico 3 especificado na seção 3.5.1; permitiu detectar dois picos principais: (i) T_R = 3,9 min e (ii) T_R = 11,5 min (figura 14). O primeiro pico referente ao íon ⁶⁸Ga³⁺, enquanto o segundo consideramos tratar-se do complexo [⁶⁸Ga]Ga-NOTA-CTHRSSVVC. Após purificado, o radiofármaco apresentou pureza radioquímica acima de 97,0% (n=2) e T_R = 11,4 min – (figura 15). A biomolécula radiomarcada com gálio-68 teve estabilidade pós purificação de, ao menos, 4 horas (figura 16).

Figura 14 - Radiocromatogramas da reação de coordenação entre o peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.



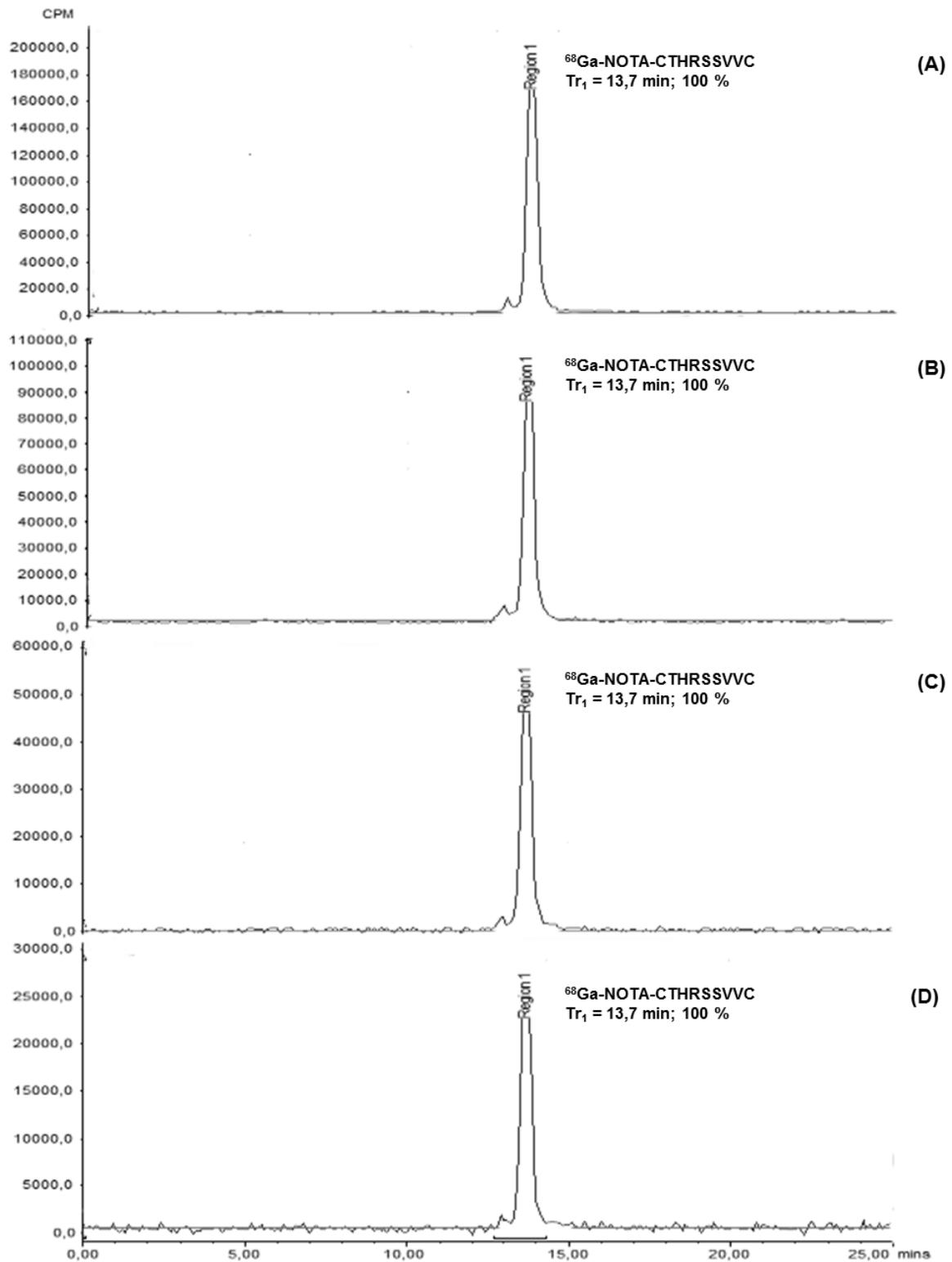
Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3).

Figura 15 - Radiocromatogramas das etapas de purificação entre o peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e H₂O/0.1%TFA (sistema 3).

Figura 16 - Radiocromatogramas de estabilidade físico-química do peptídeo conjugado NOTA-CTHRSSVVC e o radioisótopo [^{68}Ga]gálio.



Radiocromatogramas obtidos utilizando coluna de fase reversa C18 - Aeris Peptide e fase móvel: acetonitrila/0.1%TFA e $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ (sistema 3).

4.2 AVALIAÇÃO DA LIPOFILICIDADE DOS PRODUTOS RADIOMARCADOS

Os resultados para os coeficientes de lipofilicidade dos conjugados radiomarcados $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-CTHRSSVVC}$ e $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-PEG}_5\text{-CTHRSSVVC}$ podem ser verificados na tabela abaixo:

Tabela 4 – Coeficientes de partição e partição médio para os conjugados marcados com o complexo radioisotópico $[^{18}\text{F}]\text{AIF}$.

ENSAIO	$[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-CTHRSSVVC}$	$[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-PEG}_5\text{-CTHRSSVVC}$
n	4	1
*LogP _{app}	-3,25	-3,66
	-3,05	-3,73
	-2,94	-3,78
**LogP _{appmédio}	-3,05	-3,72

*ensaios em triplicata;

**média dos coeficientes obtidos em cada triplicata.

A partir do exposto, podemos verificar que ambos os coeficientes de partição demonstram moléculas hidrofílicas. O conjugado $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-PEG}_5\text{-CTHRSSVVC}$ apresenta maior hidrofílicidade quando comparado ao perfil do conjugado não peguilado.

5 . CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível obter, a partir das reações de condensação realizadas, dois produtos, diferenciando sua natureza da dos reagentes [CTHRSSVVC] e quelante, [DOTA] ou [NOTA], utilizados na reação;
- ✓ Os conjugados comercialmente obtidos [NOTA-CTHRSSVVC] e [NOTA-PEG₅-CTHRRVVC], apresentaram ótima pureza de reação, considerando a literatura [valor 1] e [valor2] respectivamente.
- ✓ Ambos os produtos radiomarcados permaneceram estruturalmente estáveis por até 4 horas, pós procedimento de purificação, com pureza acima de 92% para o [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC e acima de 96% para [¹⁸F]AIF-NOTA-PEG₅-CTHRSSVVC.
- ✓ O LogP demonstrou que os conjugados radiomarcados apresentam perfil mais hidrofílico, sendo o [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC menos hidrofílico em relação ao [¹⁸F]AIF-NOTA-PEG₅-CTHRSSVVC.
- ✓ O conjugado [¹⁸F]AIF-NOTA-CTHRSSVVC demonstrou uma dinâmica de coordenação tão eficiente quanto nas radiomarcações efetuadas com [⁶⁸Ga]gálio, demonstrando que o peptídeo pode ser radiomarcado com ambos os radioisótopos sem grandes perdas de rendimento.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Diaz EEF, Saito RF, Chammas R. Introdução ao Câncer. In: Saito RF, Lana MVG, Medrano, RF, Chammas R. Fundamentos da oncologia molecular, editores. São Paulo: Editora Atheneu; 2015. p. 1-14.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
- Kintzing JR, et al. Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016 Dec;37(12): 993-1008.
- Mankoff D. A definition of Molecular Imaging. *The J of Nucl Med* 2007 June; 48(6):18N-21N.
- Rice, SL *et al.* The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. *Semin Nucl Med* 2011, 41:265-282.
- Shetty D, *et al.* Synthesis and evaluation of macrocyclic amino acid derivatives for tumor imaging by gallium-68 positron emission tomography. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18:7338-7347.
- Ranyuk E, et al. ⁶⁸Ga/DOTA- and ⁶⁴Cu/NOTA-Phthalocyanine Conjugates as Fluorescent/PET Bimodal Imaging Probes. *Bioconjugate Chem.* 2013; 24:1624-1633.
- Velikyan, I. Synthesis, Characterisation and Application of ⁶⁸Ga-labelled macromolecules [dissertação]. Uppsala: Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Upsala; 2005.
- Ebenhan T, et al. Preclinical Evaluation of ⁶⁸Ga-Labeled 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid-Ubiquitin as a Radioligand for PET Infection Imaging. *J Nucl Med* 2014; 55:308-314.
- Silva RA, et al. CTHRSSVVC Peptide as a Possible Early Molecular Imaging Target for Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17:1-18.
- Ferreira, CL *et al.* ⁶⁸Ga small peptide imaging: comparison of NOTA and PCTA. *Bioconjug Chem.* 2012 Nov 21; 23(11):2239-46.
- Máté, G *et al.* In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR). *Eur J Pharm Sci.* 2015 Mar 10; 69:61-71.

- Zhernosekov, KP et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J Nucl Med* 2007; 48:1741-1748.
- Kim, EJ et al. Novel PET Imaging of Atherosclerosis with ^{68}Ga -Labeled NOTA-Neomannosylated Human Serum Albumin. *The Journal of Nuclear Medicine* 2015, 57(11):1792-1797.
- Dijkgraaf, I et al. PET of Tumors Expressing Gastrin-Releasing Peptide Receptor with an ^{18}F -Labeled Bombesin Analog. *J Nucl Med* 2012; 53(6):947-952.
- Wu, H et al. Imaging Integrin $\alpha\beta 3$ and NRP-1 positive gliomas with a novel fluorine-18 labeled RGD-ATWLPPR Heterodimeric peptide probe. *Mol. Imaging Biol.* 2014; 16:781-792.
- Pruessmeyer, J; Ludwig, A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and Cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2009; 20: 164-174.
- Zunke, F; Rose-John, S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *BBA – Molecular Cell Research* 2017; 1864: 2059-2070.
- Laverman, P et al. A Novel Facile Method of Labeling Octreotide with ^{18}F -Fluorine. *J Nucl Med* 2010; 51:454-461.
- McBride, W et al. Radiofluorination using aluminum-fluoride (Al^{18}F). *EJNMMI Research* 2013; 3: 36-44.
- McBride, W et al. Improved ^{18}F labeling of Peptides with Fluoride-Aluminum-Chelate Complex. *Bioconjugate Chem.* 2010, 21:1331-1340.
- Jacobson, O et al. Fluorine-18 radiochemistry, labeling and synthetic routes. *Bioconjugate Chem.* 2015; 26:1-18.
- Kumar, K; Ghosh, A. ^{18}F -AIF labeled peptide and protein conjugates as positron emission tomography imaging pharmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* 2018; 29:953-975.
- Li, D et al. ^{68}Ga -PRGD2 PET/CT in the Evaluation of Glioma: A prospective study. *Mol. Pharmaceutics* 2014; 11:3923-3929.
- Hausner, SH et al. In vitro and in vivo evaluation of the effects of aluminum [^{18}F]fluoride radiolabeling on an integrin $\alpha\beta 6$ -specific peptide. *Nuclear Medicine and Biology* 2014; 41:13-50.
- Li, Y et al. Syntheses and preliminary evaluation of [^{18}F]AIF-NOTA-G-TMTP1 for PET imaging of high aggressive hepatocellular carcinoma. *Contrast Media Mol. Imaging* 2016; 11:262-271.

Liu, S et al. One-step radiosynthesis of ^{18}F -AIF-NOTA-RGD₂ for tumor angiogenesis PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38:1732-1741.

ANEXO B

Quadro 1: Resumo das condições de preparação de NOTA-peptídeos marcados com [18F]AIF publicados previamente na literatura.

<i>Conjugou? (S/N)</i>	<i>Qtt d de peptídeo</i>	<i>Isótopo e atividade de reação</i>	<i>No caso de ser flúor-18 (qtt d de AICI3)</i>	<i>Tampão de reação</i>	<i>pH de reaçaõ</i>	<i>Temp o de reaçaõ (min)</i>	<i>Temp. de reaçaõ (°C)</i>	<i>Purificou? Qual coluna?</i>	<i>Pureza radioqu. (%)</i>	<i>Autor</i>	<i>Ano de public.</i>
<i>S. (Fmoc-based solid-phase peptide synthesis.)</i>	153 ηmol	flúor-18 200 μL (581–603 MBq)	6 ηmol	Acetato de sódio (e MES e HEPES) (1 M)	4.1	15	100	Sim. Oasis HLB cartridge (Waters)	46 – 49	Peter Laverman	2009 (origem da reação)
<i>N</i>	10 ηmol	gálio-68	*N/D	Acetato de Sódio (1 M)	3 – 4	15	60	NAP-25 size exclusion column (em PBS)	64 (puro 98.5)	Olli Moisio	2018
<i>N</i>	52,5 ηmol	flúor-18	42 ηmol	Acetato de sódio (1 M)	4	15	100	Oasis 30 mg HLB Cartridge e, em seguida, NAP-5 column	39 (puro 98.2)	Olli Moisio	2018

Continua

<i>N</i>	12 ηmol	flúor-18, 50 μL (0.74 – 1.11 GBq)	6 ηmol	Acetato de sódio (0,5 M)	4	20	100	SePak – C18 (Waters), após diluição em 20 mL de água	30 – 40 (puro >95)	Hua Wu	2014
<i>S. (Fmoc- based solid phase peptide synthesis). Ref 16</i>	100 μg	flúor-18 2 – 4 GBq (80μL)	4 – 80 ηmol	Acetato de sódio (0.1M)	4.1	15	100	Oasis HLB 1-cm3 (10- mg) cartridge (Waters)	*N/D (puro >95)	Ingrid Dijkgraaf	2012
<i>S. (vide linha anterior)</i>	10 μg	gálio-68 (315-365 MBq)	*N/A	HEPES (2.5M)	N/D	10	95	Oasis HLB (30-mg) cartridge (Waters)	*N/D (puro >95)	Ingrid Dijkgraaf	2012
<i>S.(synthesi zed manually using Fmoc- protected amino acids)</i>	40 ηmol	flúor-18 (40 MBq – 11 GBq)	1000 ηmol (ou 1μmol)	Acetato de sódio (0.5 mL; 0.5 M)	4.1	15	100	Sep-Pak C18 Plus cartridge	*N/D (puro >99)	Sven, H. Hausner	2014

Continua

S. (standard Fmoc- based solid phase peptide synthesis).	30 ηmol	flúor-18 (60 – 100 MBq)	15 ηmol	Acetato de sódio (1 M)	4.0	15	105 (micro ondas)	RP-HPLC (mesmo T _R do não- radioativo)	94±2.8 (puro >98)	Palangka, Citra R.A.P.	2019
S. Reação entre p- SCN-Bz- NOTA (em DMSO) e PRGD2 (em DMF). → 100% excesso do quelante	12 ηmol	flúor-18 100μL (0.37 GBq)	6 ηmol	Acetato de sódio (0.1 M)	4.0	20 (10 pós AlCl ₃ e 10 min pós pept)	100	RP-HPLC (Varian Bond Elut C18 column)	5 – 25 (puro >97)	Lang, L.	2011
(vide linha anterior)	7.5 ηmol	gálio-68 (±0.15 GBq)	*N/A	HEPES (0.45 mL; 1 M)	4.0	10	80	RP-HPLC (Varian Bond Elut C18 column)	75 (puro >97)	Lang, L.	2011