



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

**Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-68Ga
em modelos tumorais in vitro e in vivo**

BIANCA FRANCHESQUETI VIVALDINI

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

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

**São Paulo
2020**

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

**Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-68Ga
em modelos tumorais in vitro e in vivo**

Versão Corrigida

BIANCA FRANCHESQUETI VIVALDINI

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

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

**São Paulo
2020**

Fonte de Financiamento: IPEN-CNEN

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

FRANCHESQUETI VIVALDINI, B. ***Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em modelos tumorais in vitro e in vivo.*** 2020. 99 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Franchesqueti Vivaldini, Bianca

Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-68Ga em modelos tumorais in vitro e in vivo / Bianca Franchesqueti Vivaldini; orientador Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo. -- São Paulo, 2020.

99 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Câncer de Próstata. 2. Diagnóstico. 3. Radiofármaco. 4. Radiomarcção. I. Bortoleti de Araújo, Profa. Dra. Elaine, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Bianca Franchesqueti Vivaldini

Título: Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em modelos tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 18/03/2020

Banca Examinadora

Prof. Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: André Rinaldi Fukushima

Instituição: Faculdade das Américas

Julgamento: Aprovado

Prof. Dra.: Raquel Benedetto

Instituição: MCE Farmácia

Julgamento: Aprovado

Agradecimentos

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo por ter acreditado e confiado em mim para a realização deste projeto. Obrigada por toda a paciência e ensinamentos transmitidos. Serei eternamente grata. A Sra. me ajudou a realizar um sonho!

À minha família, especialmente meus pais, Aurea e Moacir, por terem dado todo o apoio e a força de que eu precisava e à minha irmã, Giovanna, por toda a parceria de sempre. Também aos meus tios e avós por sempre estarem por perto. Ao primo Túlio por me compreender sempre e me auxiliar nas questões da vida e nos cálculos.

Aos funcionários do Centro de Radiofarmácia, em especial à Dra. Maria Tereza Colturato pela parceria e acompanhamento neste trabalho. À Dra. Margareth Mie N. Matsuda por participar da banca de qualificação e por todos os ensinamentos compartilhados. Ao Luis Alberto P. Dias por todo o auxílio nas eluições do gerador e nos ensaios. Ao Natanael e Jurandir pela ajuda nos ensaios de biodistribuição e a todos os funcionários do Controle de Qualidade pela compreensão e disponibilização dos equipamentos para as análises. Ao Joel e Rômulo por todo o auxílio com os equipamentos e as construções dos gráficos.

Ao Dr. Daniel Perez por toda a ajuda no cultivo celular e à Priscila Passos com a compreensão e as doações das placas de cultura para a realização dos ensaios. A ajuda de vocês foi de suma importância.

À Dra. Maria Helena Bellini por toda a ajuda com a inoculação celular e as análises de histopatologia. Sou grata por todo o ensinamento e seu acompanhamento prestado.

Ao Hospital Beneficência Portuguesa e ao Cristiano Duarte, por disponibilizar amostradas de ^{68}Ga .

A toda equipe da Soluções em Física Médica pelo apoio, compreensão e ajuda. Muito mais do que isso, Bruno, Heber, Iara, Julia e Túlio se tornaram amigos e meu sentimento é de gratidão. Agradeço também pelas viagens realizadas no transporte das doses de ^{68}Ga .

Aos amigos que fiz no Centro de Radiofarmácia e que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho. À Alyne, que me ensinou e acompanhou nas primeiras radiomarcações. À Andressa, que mesmo com sua trajetória curta pela radiofarmácia me auxiliou no que podia. À Ana Claudia, Carolina, Cristian, Luiza, Mariana e Raquel, por toda a amizade desenvolvida, compreensão e apoio nos experimentos. À Renata por ser parceira, me acompanhar e auxiliar sempre.

Às amigas da vida, Aline, Angela, Larissa, Rafaela e Thais, por sempre acreditarem e me apoiarem. Ao Felipe, por compreender e me apoiar muito nessa reta final.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear pela bolsa concedida.

À banca por ter aceitado o convite.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo auxílio e infraestrutura.

Por fim, a Deus, pois Ele sabe de todas as coisas e aos anjos da guarda, pois sei que sempre estiveram comigo durante esta fase.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

Avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em modelos tumorais *in vitro* e *in vivo*

Bianca Franchesqueti Vivaldini

RESUMO

Os exames de diagnóstico por imagem, utilizados em medicina nuclear, com a administração de radiofármacos, apresentam grandes avanços devido a sua alta especificidade e sensibilidade, aumentando a confiabilidade dos resultados. Este trabalho teve como foco estudos anteriores baseados no peptídeo inibidor do receptor de PSMA associado ao quelante bifuncional HBED-CC e radiomarcado com ⁶⁸Ga, composto que se mostrou com alta capacidade de diagnosticar recidivas e metástases de câncer de próstata quando utilizado nos exames de diagnóstico por imagem, auxiliando também no diagnóstico precoce da doença. Realizou-se estudos de radiomarcagem do PSMA-HBED-CC com ⁶⁸Ga em bancada (método não automatizado) com o objetivo de aumentar o rendimento da marcação, utilizando cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análises de pureza radioquímica, avaliando eluatos de ⁶⁸GaCl₃ proveniente de geradores de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga de diferentes fabricantes. A partir dos estudos de adequação do tampão e das condições de radiomarcagem, obteve-se uma formulação prévia para o desenvolvimento de um kit para pronta marcação com ⁶⁸Ga, avaliando-se, inclusive, a influência da qualidade do eluato do gerador sobre o rendimento de marcação. Para a avaliação da especificidade biológica do radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga *in vivo*, desenvolveram-se estudos de biodistribuição em animais sadios e em animais com crescimento tumoral. Para a avaliação da especificidade do radiofármaco em ensaios *in vitro*, foram realizados estudos de velocidade de ligação celular e estudo de ligação/saturação. Os estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciaram a especificidade do radiofármaco por células e tumores de câncer de próstata, contribuindo para consolidar os estudos pré-clínicos necessários para registro do radiofármaco.

Palavras-chave: câncer de próstata, diagnóstico, radiofármaco, radiomarcagem.

Evaluation of the biological specificity of the radiopharmaceutical PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga in vitro and in vivo tumor models

Bianca Franchesqueti Vivaldini

ABSTRACT

Diagnostic images in nuclear medicine, obtained with the administration of radiopharmaceuticals, present great advances due to their high specificity and sensitivity, increasing the reliability of the results. This work focused on previous studies based on the ⁶⁸Ga radiolabeled bifunctional chelator associated to PSMA receptor inhibitor peptide, compound that has been shown to be capable of diagnosing prostate cancer recurrences and metastases when used in diagnostic imaging, also assisting in the early diagnosis of the disease. PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga radiolabelling studies (non-automated method) were performed to increase the labeling yield, using thin layer chromatography and high performance liquid chromatography for radiochemical purity analyzes, evaluating ⁶⁸GaCl₃ eluates from ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators from different manufacturers. From buffer suitability studies and radiolabelling conditions, a prior formulation was obtained for the development of a ⁶⁸Ga ready-label kit, including the study of the influence of generator eluate quality on labeling yield. For the evaluation of the *in vivo* biological specificity of the PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, biodistribution studies were performed on healthy and tumor-growing animals. Radiopharmaceutical specificity was also evaluated *in vitro*, with tumor cell binding speed, saturation and competition studies. *In vivo* and *in vitro* studies have shown radiopharmaceutical specificity for prostate cancer cells and tumors, contributing to consolidate the preclinical studies required for radiopharmaceutical registration.

Keywords: prostate cancer, diagnosis, radiopharmaceutical, radiolabeling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Câncer de próstata.....	17
3.2 Radiofármacos dirigidos para o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA).....	21
3.3 Geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	27
3.4 Propriedades do radionuclídeo ^{68}Ga	29
3.5 Quelante bifuncional	32
4. MATERIAIS	37
4.1 Reagentes e soluções.....	37
4.2 Equipamentos.....	37
4.3 Outros.....	38
4.4 Animais	38
4.5 Infraestrutura	39
5. MÉTODOS	40
5.1 Condição preliminar de radiomarcção	40
5.2 Escolha e preparo da solução tampão de marcação.....	40
5.3 Escolha do sistema cromatográfico para ensaio de pureza radioquímica.....	41
5.4 Estudos de radiomarcção não-automatizada	43
5.4.1 Radiomarcção de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd., Rússia, não purificado previamente.....	43
5.4.2 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd., Rússia, com purificação prévia.....	44
5.4.3 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Rússia), com purificação prévia e filtração final.....	44
5.4.4 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG - Alemanha.....	45

5.4.5 Radiomarcção não automatizada de kit liofilizado de PSMA-HBED-CC da empresa POLATOM, com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG, Alemanha.....	46
5.5 Radiomarcção automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co Ltd., Russia.....	46
5.6 Controle radionuclídico – Teste de pureza radionuclídica.....	46
5.7 Ensaio <i>in vivo</i>	47
5.7.1 Ensaio de biodistribuição em animais sadios e estudo farmacocinético.....	47
5.7.2 Cultura de células LNCaP.....	49
5.7.3 Desenvolvimento do modelo tumoral prostático ectotópico	50
5.7.4 Análise histopatológica	50
5.7.5 Ensaio de biodistribuição em animais com crescimento tumoral	50
5.8 Ensaio <i>in vitro</i>	52
5.8.1 Ensaio de velocidade de ligação celular.....	52
5.8.2 Ensaio de ligação/saturação celular	53
5.8.3 Ensaio de competição	54
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
6.1 Escolha e preparo da solução tampão de marcação.....	56
6.2 Escolha do sistema cromatográfico para ensaio de pureza radioquímica.....	56
6.2.1 Perfil cromatográfico de $^{68}\text{GaCl}_3$	56
6.2.2 Perfil cromatográfico PSMA-HBED-CC	60
6.2.3 Perfil cromatográfico PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga	61
6.3 Estudos de radiomarcção não-automatizada.	62
6.3.1 Radiomarcção de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd. (Russia), não purificado previamente.....	62
6.3.2 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia.....	65
6.3.3 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia e filtração final.....	66
6.3.4 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha).	67

6.3.5 Radiomarcção não automatizada de kit liofilizado de PSMA-HBED-CC da empresa POLATOM, com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha).....	70
6.3.6 Radiomarcção automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia).	71
6.4 Controle radionuclídico – Teste de identidade e pureza radionuclídica	72
6.5 Ensaios <i>in vivo</i>	75
6.5.1 Ensaio de biodistribuição em animais sadios.....	75
6.5.2 Ensaio de biodistribuição em camundongos SCID com crescimento tumoral.....	81
6.5.4 Análise histopatológica	86
6.6 Ensaios <i>in vitro</i>	90
6.6.1 Ensaio de velocidade de ligação.....	90
6.6.2 Ensaio de ligação/saturação	91
6.6.3 Ensaio de competição	91
7. CONCLUSÃO	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

A medicina nuclear baseia-se na utilização de radiofármacos (moléculas marcadas com radionuclídeos) para diagnóstico e terapia de variados quadros patológicos, dentre eles, o câncer. (Robilotta, 2006)

A classificação atual de radiofármacos inclui os radiofármacos prontos para uso, componentes não radioativos para marcação com um componente radioativo, radionuclídeos para marcação e eluatos de geradores de radionuclídeos. (RDC 64/2009, ANVISA)

Os exames de diagnóstico com a utilização de radiofármacos na medicina nuclear possuem alta sensibilidade, sendo possível adquirir informações biológicas com quantidades mínimas (nano ou picomolar) de radiofármacos, permitindo estudar órgãos e sistemas em níveis macroscópicos e moleculares. (Robilotta, 2006)

A imagem cintilográfica é obtida por meio da detecção externa da radiação emitida pelo radiofármaco após a sua administração ao paciente, podendo ser por via oral, respiratória e injetável. Esses compostos seguem então um caminho funcional e biológico específico, promovendo diagnósticos precoces das patologias. Difere-se assim dos outros métodos de exames laboratoriais por imagem, como a tomografia computadorizada e ultrassom, por exemplo, já que as alterações anatômicas podem se desenvolver somente em estágios mais avançados da patologia, enquanto as alterações funcionais e bioquímicas normalmente se expressam nos estágios iniciais das doenças. A medicina nuclear se torna então relevante para um diagnóstico precoce e de maior precisão. (Robilotta, 2006)

Dados estatísticos levantados pela GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) em 2018, por meio da *International Agency for Research on Cancer*, apresentam o câncer de próstata em segundo lugar por incidência em homens, sendo o tipo de câncer mais diagnosticado e a segunda causa de mortalidade em homens. (GLOBOCAN, 2018)

Para o ano de 2018, a estimativa foi de 450 mil novos casos de câncer de próstata e 77 mil ocorrências de morte por câncer prostático na Europa. (Malvezzi *et al*, 2018) Nos Estados Unidos, a estimativa de novos casos de

câncer de próstata foi de 174.650 apenas para o ano de 2019. (*American Cancer Society, 2019*)

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), para o biênio de 2018 e 2019, foram esperados 68 mil casos de câncer de próstata no Brasil, relatando que será também um dos tipos de câncer mais diagnosticados. (INCA, 2018)

O desafio da prática clínica frente ao diagnóstico do câncer de próstata se dá pela divergência de resultados negativos de exames convencionais, como a biópsia e o toque retal, frente a níveis elevados de PSA sérico, limitando o diagnóstico precoce. (Antunes, 2008)

A dosagem de PSA pode ainda representar resultados falso-positivos, uma vez que essa glicoproteína é produzida por células prostáticas, não necessariamente pelas células cancerosas da próstata. (Amorim *et al*, 2011).

Assim, diversos radiotraçadores foram estudados e desenvolvidos para exames de diagnósticos por imagem, tendo como alvo molecular o PSMA (Antígeno de membrana específico da próstata), um peptídeo sobre expresso no câncer de próstata, objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. (Afshar *et al*, 2014) A Tabela 1 ilustra alguns exemplos de marcadores ligados ao PSMA já estudados. (Sterzing *et al*, 2016)

Tabela 1: Exemplos de marcadores ligantes do PSMA. (Adaptado de Haberkorn *et al*, 2016)

Marcador	Base	Aplicações
^{111}In -J591	Ligante PSMA - Anticorpo	Diagnóstico - PET
^{64}Cu -J591	Ligante PSMA - Anticorpo	Diagnóstico - PET
J591- ^{89}Zr	Ligante PSMA - Anticorpo	Diagnóstico - PET
MIP-1404- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	Ligante PSMA - Inibidor	Diagnóstico - SPECT
MIP-1072- ^{123}I e MIP-1095- ^{123}I	Ligante PSMA - Inibidor	Diagnóstico - SPECT
DCFBC- ^{18}F	Ligante PSMA - Inibidor	Diagnóstico - PET
J591- ^{90}Y	Ligante PSMA - Anticorpo	Terapia
J591- ^{177}Lu	Ligante PSMA - Anticorpo	Terapia
PSMA-617- ^{177}Lu	Ligante PSMA - Inibidor	Terapia
PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga	Ligante PSMA - Inibidor	Diagnóstico - PET

O destaque se dá para os estudos com um peptídeo inibidor do receptor de PSMA, ligado ao quelante HBED-CC (ácido N,N'-bis[2-hidroxi-5-carboxietilbenzil]etilenediamino-N,N'-diacético) e radiomarcado com ^{68}Ga . Estudos realizados com PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga apresentaram um alto contraste na imagem PET, detectando recidivas e metástases relacionadas ao câncer de próstata. (Afshar *et al*, 2014) O ^{68}Ga , radionuclídeo emissor de pósitrons com apenas 68 minutos de meia-vida física, apresenta como vantagem fácil disponibilidade de obtenção, sendo produzido por meio de gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, não sendo necessário a instalação de um ciclotron. O radionuclídeo eluído na forma de solução ácida de cloreto de galio ($^{68}\text{GaCl}_3$) apresenta propriedades adequadas para a radiomarcção de peptídeos para uso em diagnósticos em PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons). (Banerjee *et al*, 2010)

De acordo com os estudos de radiomarcção do PSMA-HBED-CC com ^{68}Ga desenvolvidos no IPEN, empregando-se módulo de síntese automatizado, obteve-se o radiofármaco PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga com pureza radioquímica superior a 95%. O transporte aos centros de medicina nuclear da cidade de São Paulo e arredores mostrou-se viável, do ponto de vista da qualidade do produto, uma vez que o radiofármaco apresentou estabilidade em temperatura ambiente por até 4 horas. Entretanto, a distribuição deste radiofármaco, na forma pronta para uso, para demais regiões do estado de São Paulo e também do Brasil torna-se inviável, tendo em vista o tempo de meia vida físico curto do radionuclídeo. (Alcarde, 2016)

Para que o radiofármaco PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga possa ser empregado em todos os serviços de Medicina Nuclear do Brasil que possuem tecnologia para imagem PET, disponibilizando o benefício do diagnóstico precoce e de recidivas e metástases do câncer de próstata, a pacientes de todas as regiões do país, este projeto teve o objetivo de estudar uma formulação de PSMA-HBED-CC para marcação direta com o eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$, contribuindo para o desenvolvimento de um kit para pronta marcação, que possa ser comercializado e distribuído para todo o país. Considerando-se o potencial para o registro deste kit junto à ANVISA, este projeto demonstrou a especificidade do radiofármaco em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Esta apresentação do radiofármaco representa uma tendência mundial

de aplicação de radiofármacos de ^{68}Ga , a partir da comercialização recente de geradores ditos “GMP” (do inglês “Good Manufacturing Practices”), para os quais o eluído do gerador apresenta propriedades para ser utilizado diretamente na marcação de peptídeos, formulados a partir de componentes não radiativos (kits) para marcação. Deste modo, a preparação do radiofármaco de galio-68 poderá ser realizada no ambiente da Radiofarmácia hospitalar, a partir da aquisição do kit para marcação e do gerador de galio-68, desde que ambos sejam produtos registrados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento da formulação de um kit de PSMA-HBED-CC para pronta marcação com eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ e conduzir estudos pré-clínicos para demonstrar a especificidade do radiofármaco por receptores PSMA.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar condições de marcação direta do peptídeo com o eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, contribuindo para desenvolvimento de componente não radioativo para pronta marcação (kit);
- Avaliar a biodistribuição do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga , em modelo animal com crescimento de células de tumor de próstata que expressam PSMA, utilizando método invasivo.
- Avaliar a especificidade do peptídeo radiomarcado por células de tumor de próstata que expressam PSMA em ensaios *in vitro* (estudos de ligação);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer de próstata

Dados estatísticos levantados pela GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) em 2018, por meio da *International Agency for Research on Cancer*, apresenta o câncer de próstata em segundo lugar por incidência em homens, sendo o tipo de câncer mais diagnosticado e a segunda causa de mortalidade em homens. (GLOBOCAN, 2018)

Para o ano de 2018, a estimativa é de 450 mil novos casos de câncer de próstata e 77 mil ocorrências de morte por câncer prostático na Europa. (Malvezzi *et al*, 2018) Nos Estados Unidos, a estimativa de novos casos de câncer de próstata é de 174.650 apenas para o ano de 2019. (*American Cancer Society*, 2019)

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), para o biênio de 2018 e 2019, são esperados 68 mil casos de câncer de próstata no Brasil, relatando que será também um dos tipos de câncer mais diagnosticado. (INCA, 2018)

Segundo a GLOBOCAN, o câncer de próstata ocupa o segundo lugar em países de alto e médio IDH (índice de desenvolvimento humano) sugerindo que países mais desenvolvidos apresentam maiores números de incidência da doença, sendo um fator socioeconômico e urbanístico. (GLOBOCAN, 2018)

Os exames clínicos de PSA sérico, disponíveis na década de 1980, e o exame de toque juntamente com biópsia, facilitaram o diagnóstico de câncer de próstata, o que consequentemente aumentou o número de casos diagnosticados e os números de incidência da patologia. (GLOBOCAN, 2018)

Tem sido notável a diminuição no número de casos de morte pelo câncer de próstata na América do Norte, Norte da Europa, Oceania e alguns países da Ásia, devido à disponibilidade de tratamentos melhores e de técnicas mais adequadas para diagnósticos precoces, enquanto nota-se um aumento no número de mortalidade em países em desenvolvimento como Rússia, Cuba, Brasil e outros países da América Central e América do Sul, devido a um acesso mais limitado ao tratamento e técnicas de diagnóstico menos efetivas. (GLOBOCAN, 2018)

A importância clínica do diagnóstico precoce das lesões ocasionadas pelo câncer de próstata leva em consideração o estadiamento da doença, o prognóstico e a terapia como fatores principais. (Afshar *et al*, 2014) Acometendo a população de homens na terceira idade, o câncer de próstata não tem origem etiológica ainda conhecida, apesar de ser uma patologia comum atualmente. (GLOBOCAN, 2018) Diferente de outras patologias causadas por anormalidades, o câncer de próstata não tem fatores padronizados que ditam a probabilidade do seu desenvolvimento em homens. (Miyahira *et al*, 2018)

Os níveis séricos de PSA podem indicar metástases, ainda em tamanhos reduzidos, meses ou até mesmo anos antes da detecção destes nódulos em exames de imagens, sugerindo que o câncer prostático tenha um longo histórico natural. (Miyahira *et al*, 2018)

Os principais fatores de risco encontrados para o surgimento de casos de câncer de próstata englobam a idade, uma vez 95% dos casos ocorrem em homens acima de 50 anos, histórico familiar e etnia africana. A obesidade, hábitos alimentares e o fumo não são fatores de riscos incidentes, porém podem alterar biologicamente o câncer de próstata. (Lee, 2018)

Estudos sugerem que alterações no cromossomo 1 e banda q24, enquanto jovem, torna o aparecimento do câncer de próstata mais suscetível, porém tal dado é encontrado em apenas 10% da população de homens com a patologia. Síndromes genéticas e mutações no gene BRCA1/2, por exemplo, também estão relacionadas com o aumento da probabilidade do surgimento da patologia, encontradas de 5 a 10% nos casos estudados. (Lee, 2018)

A testosterona, presente no tecido sadio da próstata, também é considerada como um dos fatores para o desenvolvimento do câncer, onde há uma progressão e invasão da doença através da sinalização pelos receptores andrógenos, em altos níveis na patologia, o que sugere que o câncer de próstata possui alta sensibilidade por andrógenos, mesmo que em níveis baixos. A involução da doença e a morte das células cancerígenas mostram diminuição da sinalização pelos receptores andrógenos. (Lee, 2018)

Até a alguns anos, a terapia de privação de andrógeno era a técnica mais adequada para tratamento do câncer de próstata metastático, porém a mesma se mostrava ineficiente após um curto espaço de tempo, em média de

12 a 18 meses, devido à resistência desenvolvida pelas células tumorais à castração. (Rodrigues, 2014)

O câncer de próstata se desenvolve geralmente na zona periférica da próstata e em sua fase inicial costuma ser assintomático, podendo levar a um diagnóstico tardio, o que aumenta os índices de mortalidade da doença. (Lima *et al*, 2017) Quando sintomático, os pacientes apresentam aumento urinário, dificuldade ou dor para iniciar a micção e dificuldade de esvaziamento da bexiga, semelhantes a um quadro de hiperplasia prostática benigna (HPB). (Lee, 2018)

Já o câncer de próstata metastático se desenvolve principalmente nos linfonodos e medula óssea, onde a grande maioria dos nódulos apresenta volume reduzido. (Miyahira *et al*, 2018) Uma quantidade significativa de pacientes com câncer prostático acaba desenvolvendo quadro de metástase óssea, dado que interfere na escolha da conduta terapêutica. (Lapa *et al*, 2016)

Sendo um fator de saúde pública atual, o diagnóstico do câncer de próstata se dá majoritariamente por meio da dosagem dos níveis séricos de PSA (antígeno específico da próstata), uma glicoproteína sintetizada pela próstata, que funciona como um marcador biológico para o câncer prostático, e exame de toque acompanhado de biópsia, quando determinado. (Amorim *et al*, 2011).

A dosagem sérica de PSA pode apresentar resultados falso-positivos, uma vez que essa glicoproteína é produzida por células prostáticas, não necessariamente pelas células cancerosas da próstata. (Antunes, 2008). Com peso molecular de 30 a 34.000 Da, esta glicoproteína é secretada pelas células epiteliais da próstata, estando presente em maior quantidade no esperma do que em níveis séricos humanos. Em casos de câncer da próstata, há elevação dos níveis de PSA sérico, o que também pode ocorrer em casos de patologias não cancerosas, como a hiperplasia prostática benigna (HPB) que ocorre em faixas etárias semelhantes, necessitando de exames que permitam a diferenciação. (Averbeck *et al*, 2010) Como referência, valores maiores do que 4 ng/mL podem indicar probabilidade significativa de câncer prostático, embora estudos mostrem que 15 % dos pacientes com a patologia apresentarão valores inferiores e a cada quatro casos um paciente apresentará valores altos de PSA sérico entre 4 e 10 ng/mL. A alteração destes valores também pode

indicar recorrência do câncer prostático ou a eficiência da terapia. Assim, os níveis séricos de PSA não são recomendados como um parâmetro primário de diagnóstico da patologia. (Pillai *et al*, 2016)

O exame de toque também é considerado limitado para um diagnóstico preciso, além disso, o desafio da prática clínica frente ao diagnóstico do câncer de próstata se dá pela divergência de resultados quando a biópsia e o toque retal apresentam resultados negativos, contra um elevado nível sérico de PSA (Antunes, 2008).

A utilização de parâmetros como a dosagem sérica de PSA e escala de Gleason (parâmetro que permite avaliar o grau de diferenciação do tumor) para prever a probabilidade do desenvolvimento de um câncer de próstata metastático não se mostra tão eficiente, visto que estes parâmetros apenas relatam a presença do câncer e sua extensão, sem apresentar dados de possíveis nódulos e processos cancerígenos distantes do nódulo prostático. Neste caso, técnicas de diagnóstico por imagem como a tomografia de emissão de pósitrons (PET) em conjunto com a tomografia computadorizada (PET/CT) auxiliam no diagnóstico da patologia, sua recorrência e na visualização de processos metastáticos. (Lapa *et al*, 2016)

Visando ter métodos de diagnóstico mais precisos, com um grau de especificidade e seletividade maior, há interesse em estudos com marcadores moleculares, utilizados para aquisição de imagens em equipamentos PET, tendo como alvo o PSMA (antígeno de membrana específico da próstata), já que este é sobre expresso no câncer de próstata, podendo diminuir as taxas de resultados falso-positivos (Afshar *et al*, 2014).

Na área de Medicina Nuclear, o desenvolvimento de radiofármacos dirigidos para o PSMA é uma estratégia potencial para obter imagens do câncer prostático e suas metástases, empregando principalmente a tecnologia PET, mas também uma alternativa terapêutica, podendo levar a radiação às células cancerígenas com o objetivo de destruir as células, quando se empregam radiofármacos produzidos com radionuclídeos emissores de partículas beta ou alfa. Além do mais, o câncer prostático mostrou-se sensível à radiação, sendo favorável o seu tratamento com radioterapia de feixe externo, braquiterapia e terapia radionuclídica com o uso de radiofármacos.

3.2 Radiofármacos dirigidos para o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA)

O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) é identificado biologicamente como uma glicoproteína transmembrânica do tipo II, de 100 kD, com 707 aminoácidos na porção extracelular, 24 aminoácidos na porção transmembrânica e 19 aminoácidos na porção intracelular. (Maurer *et al*, 2016)

Devido a sua capacidade de hidrolisar moléculas de poliglutamato com glutamatos carboxiterminados, o PSMA é também conhecido como glutamato carboxipeptidase II ou folato hidrolase 1. (Miyahira *et al*, 2018)

Apresenta-se mais precisamente no citoplasma e na região apical das células do tecido que circunda os ductos prostáticos e quando ocorrem displasias na próstata, o PSMA se apresenta na superfície luminal dos ductos, aumentando sua expressão na evolução da patologia. (Perera *et al*, 2016) Em casos de metástases e aumento da diferenciação do tumor, observa-se como consequência um aumento dos níveis de PSMA. (Eder *et al*, 2014)

Apesar de ser específico da próstata, o PSMA também está presente, em menor quantidade, em outros tecidos sadios como rins, glândulas salivares, cérebro, intestino delgado, gânglios, vasos sanguíneos recém-formados, nos astrócitos do sistema nervoso central e também em alguns tumores sólidos como tumor de mama, colon e câncer renal. (Eder *et al*, 2014 & Maurer *et al*, 2016)

Sendo atualmente o único antígeno de membrana prostático conhecido, o PSMA é tido como alvo terapêutico para o câncer de próstata. Sua característica de transitar em ciclos entre a membrana e o citoplasma da célula favorece a internalização celular de moléculas ligadas ao PSMA. (Miyahira *et al*, 2018) A internalização ocorre quando o PSMA é ligado à molécula ligante, que pode ser anticorpos ou moléculas pequenas como peptídeos, permanecendo no lisossomo ou sendo liberada ao citoplasma celular. (Maurer, 2016) Além disso, o PSMA é formado por dois monômeros, sendo ativado a nível enzimático na sua forma homodimérica, com domínios nas camadas intracelular, extracelular e transmembrânico. (Maurer *et al*, 2016)

O PSMA é dificilmente atingido, quando alvo, por moléculas de maior peso molecular, nas superfícies luminais da glândula da próstata devido à formação de barreiras pelas membranas e camadas basais e no cérebro pela barreira hematoencefálica. Essas barreiras são menores no câncer de próstata invasivo e em suas metástases, permitindo assim uma maior captação das moléculas-alvo ou agentes direcionados ao PSMA nos tecidos. Explica-se assim, o fato de maior captação de agentes tendo como alvo o PSMA em tecidos prostáticos cancerígenos em relação a tecidos saudáveis. (Miyahira *et al*, 2018)

Segundo Hope e colaboradores, a expressão de PSMA é heterogênea, pois se relaciona com os receptores de andrógeno (RA), onde estudos mostram que a inibição do RA aumenta a expressão de PSMA, podendo melhorar a visualização de lesões na imagem utilizando equipamentos PET. (Hope *et al*, 2017)

Considera-se assim, o PSMA como um alvo adequado para avaliação de respostas à terapia, já que a sua expressão é heterogênea e se diferencia em níveis de lesão, localidade, atividade e sinalização pelos receptores de andrógeno. (Miyahira *et al*, 2018)

As imagens PET para diagnóstico utilizando os agentes ligados ao PSMA apresentam alta sensibilidade e especificidade para detecção de tumores prostáticos, quando comparados a outros métodos de imagem, como aqueles que utilizam radiofármacos de ^{99m}Tc e tomografia computadorizada. (Miyahira *et al*, 2018)

Diferentes anticorpos monoclonais são estudados, desde meados de 1980, para marcações com agentes de imagem para o uso em medicina nuclear, tendo como alvo as porções intracelulares e extracelulares do PSMA, mostrando bons resultados de imagens, porém, devido a sua meia-vida biológica, o uso de anticorpos para diagnóstico se torna menos efetivo, uma vez que promove um aumento da atividade de fundo em órgãos não-alvo e conseqüentemente, uma baixa captação tumoral. (Maurer *et al*, 2016)

Nesse sentido, visando minimizar as limitações das marcações, as moléculas inibidoras de PSMA foram estudadas quanto a marcações com radionuclídeos, como ^{123}I , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{18}F e ^{68}Ga . (Maurer *et al*, 2016)

Após vários anos da introdução do radiofármaco fludesoxiglicose (^{18}F) ou FDG- ^{18}F , o setor de medicina nuclear passou por grandes avanços com o início do uso das moléculas inibidoras de PSMA na prática clínica. (Kopka *et al*, 2017)

A síntese das moléculas ligantes de PSMA e suas moléculas inibidoras foi baseada na descoberta dos substratos ativos, que são homólogos em nível de estrutura e função a enzima glutamato carboxipeptidase 2, dos sítios de reconhecimento do PSMA. Em nível estrutural, os sítios de reconhecimento possuem dois íons de zinco (sendo uma membrana binuclear ligada a zinco protease), um grupo detector de glutamato e um grupo não farmacofórico. (Maurer *et al*, 2016 & Kopka *et al*, 2017)

As moléculas inibidoras de PSMA podem ser divididas em três classes, de acordo com sua estrutura, baseadas em tiol, fósforo ou uréia, este último possuindo maior afinidade e especificidade por PSMA, além de boa internalização em células de linhagem LNCaP. (Maurer *et al*, 2016)

Em 2008, as primeiras moléculas inibidoras de PSMA, MIP-1072- ^{123}I e MIP-1095- ^{123}I , baseadas no grupamento ureia, foram introduzidas objetivando o diagnóstico de câncer de próstata. (Kopka *et al*, 2017) Tais moléculas apresentaram, em estudos *in vivo* com homens acometidos por câncer de próstata metastático, uma rápida detecção de células cancerígenas da próstata acumuladas nos ossos, tecidos moles e na glândula da próstata. (Cimadamore *et al*, 2018)

O inibidor de PSMA baseado em ureia Glu-NH-CO-NH-Lys(AHX)-HBED-CC, inicialmente radiomarcado com ^{68}Ga , ganha destaque na prática clínica para diagnóstico de câncer da próstata, mostrando alta sensibilidade e especificidade por receptores PSMA, auxiliando na detecção de metástases, recidivas e em um diagnóstico mais preciso de câncer prostático. (Maurer *et al*, 2016)

A ligação da molécula HBED-CC, agente quelante, ocorre através do sítio do ácido aminohexanóico (grupamento amina com 6 carbonos), se ligando ao grupamento uréia (Glu-ureia-Lys). (Kopka *et al*, 2017) O composto se liga às células prostáticas cancerígenas, onde ocorre a sua internalização e acúmulo. Além das células cancerígenas da próstata, o composto possui afinidade pelo trato urinário, intestino delgado, fígado, baço e glândulas salivares,

promovendo uma captação significativa nesses órgãos, porém, em órgãos não-alvo, o composto possui um clareamento sanguíneo rápido. Como vantagem, órgãos com maior probabilidade de metástase prostática possuem uma baixa captação do composto, como ossos, tecido linfático e tecido retroperitoneal. (Maurer *et al*, 2016)

Atualmente, o PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, também chamado PSMA-11-⁶⁸Ga, (Figura 1) é o composto mais utilizado para imagens PET, podendo detectar câncer de próstata primário, recorrências do câncer prostático, metástases mesmo que em volumes reduzidos, além de visualizar respostas ao tratamento. (Maurer *et al*, 2016)

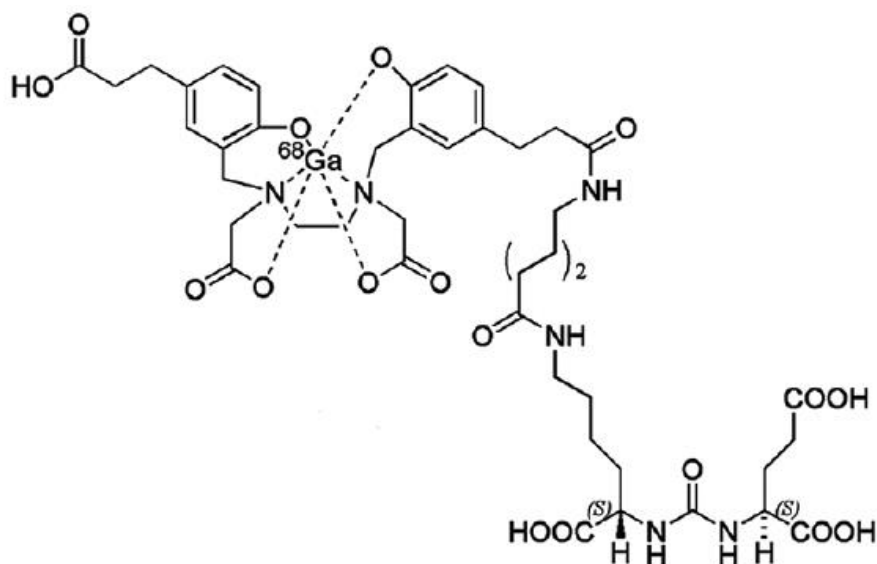


Figura 1: Estrutura química do PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga. (Cuccurullo *et al*, 2018)

Até o ano de 2018, aproximadamente dez mil pacientes foram submetidos ao uso de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga para diagnóstico de câncer de próstata, por meio das imagens PET. (Myahira *et al*, 2018)

O composto também mostrou resultados favoráveis quanto ao auxílio na escolha da conduta terapêutica ou até mesmo na mudança de condutas terapêuticas já impostas ao paciente diagnosticado. Em um estudo realizado com um número de 70 pacientes submetidos à prostatectomia e com indícios

de recorrência da patologia, a alteração na gestão destes pacientes ocorreu em 29 %. (Myahira *et al*, 2018)

Segundo um estudo realizado por Caroli e colaboradores, de 314 pacientes com câncer prostático, 197 pacientes apresentaram resultado positivo com a utilização do composto PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, onde uma ou mais lesões foram detectadas, por paciente. O composto ainda foi capaz de detectar nódulos pélvicos em 117 pacientes e nódulos distantes em 80 pacientes. No mesmo estudo, 88 pacientes com resultado negativo em ¹⁸F-Colina, apresentaram resultado positivo com o composto PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga. Concluiu-se também que os altos níveis de PSA possuem relação com a detecção de altas taxas de recidivas. (Caroli *et al*, 2018)

Estudos comparativos realizados por Eder e colaboradores, com PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga apresentaram imagens de alto contraste e números maiores de lesões, diagnosticando metástases e recidivas de câncer de próstata quando comparados, por exemplo, ao ¹⁸F-Colina. (Eder *et al*, 2014)

Com o objetivo de analisar a influência do PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, 1007 pacientes foram analisados após o período de 1 hora após a administração do composto em busca de detectar a recorrência do câncer prostático. O composto foi capaz de detectar a recorrência da patologia em 79,5% do total de pacientes, correlacionando ainda o exame de imagem PET/CT positivo com os níveis séricos de PSA e ADT. Fatores como a escala de Gleason, quantidade de produto administrado e idade do paciente não foram relacionados com o resultado do exame de imagem positivo. (Afshar *et al*, 2017)

Radionuclídeos como ¹⁷⁷Lu e ²²⁵Ac não se ligam eficientemente ao grupo quelante do PSMA-HBED-CC, não sendo assim, um composto para finalidade terapêutica em medicina nuclear. (Kopka *et al*, 2017)

O PSMA-617 (Figura 2), desenvolvido a partir de modificações na estrutura do PSMA-HBED-CC, surgiu objetivando o desenvolvimento de um agente teranóstico, podendo ser radiomarcado com ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y e ²²⁵Ac. Na prática clínica, o composto PSMA-617-¹⁷⁷Lu é considerado o principal radiofármaco para endoradioterapia. (kopka *et al*, 2017) É considerado o primeiro agente teranóstico estudado, atualmente sendo estudado também para endoradioterapia, que promove baixa exposição a radiação sem prejudicar

a qualidade de imagem, resultando em imagens com alto contraste no diagnóstico de câncer prostático. (Maurer *et al*, 2016) O composto também foi radiomarcado com ^{177}Lu , um agente terapêutico, apresentando alta taxa de internalização nas células tumorais da próstata. (Emmett *et al*, 2017)

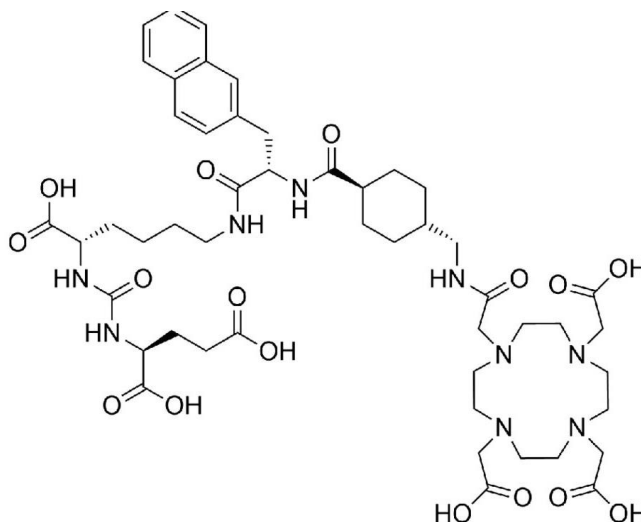


Figura 2: Estrutura química do PSMA-617. (Cardinale *et al*, 2017)

O PSMA-I&T (Imagem e Terapia), outra molécula ligante de PSMA, teve seus estudos desenvolvidos e desde 2015 vem sendo estudada em marcações com ^{68}Ga , ^{177}Lu e ^{111}In , sendo um agente de imagem teranóstico, agente de endoradioterapia e de cirurgia radioguiada, respectivamente. (Maurer *et al*, 2016)

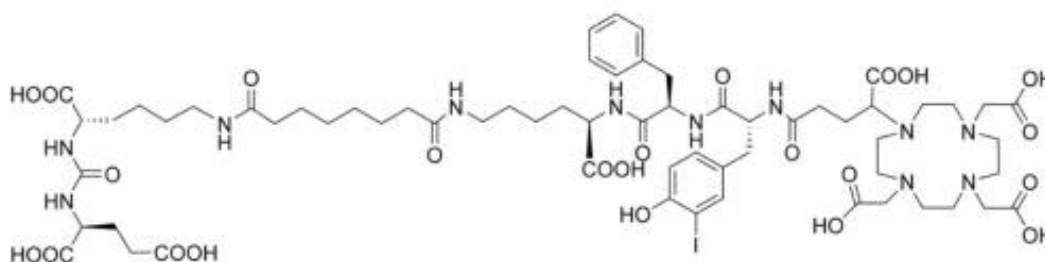


Figura 3: Estrutura química do PSMA I&T. (Al-Momani *et al*, 2017)

Como agentes de imagem, as mesmas moléculas inibidoras, contendo grupamento ureia, têm apresentado alta especificidade e sensibilidade no diagnóstico precoce do câncer de próstata, como o PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga. (Miyahira *et at*, 2018)

3.3 Geradores de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga

Os geradores funcionam como um meio de aquisição de radionuclídeos através do sistema de decaimento de um radionuclídeo de meia-vida física longa (radionuclídeo pai) para um radionuclídeo de meia-vida física curta (radionuclídeo filho). Neste sistema, o radionuclídeo pai é produzido em reator nuclear ou ciclotron. (Osso e Knapp, 2011)

Na produção de geradores de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga, por exemplo, o radionuclídeo pai (⁶⁸Ge) é produzido em ciclotrons a partir da irradiação de ⁶⁹Ge, por meio da reação “p, 2n”, originando o radionuclídeo ⁶⁸Ge por decaimento por captura eletrônica, conforme a equação descrita abaixo. (Zorrilla, 2012)



A meia-vida física longa do ⁶⁸Ge (270,82 dias) promove um bom tempo de funcionamento do gerador e compensa seu custo elevado, permitindo eluições e obtenção de ⁶⁸Ga por aproximadamente 12 meses, com um bom custo-benefício. (Zorrilla, 2012)

O uso de geradores de radionuclídeos facilita a rotina clínica proporcionando segurança e disponibilidade do radiofármaco em locais distantes de centros produtores e ciclotrons, permitindo a obtenção do radionuclídeo em poucos minutos, além do produto da eluição ser livre de

carregadores, proporcionando uma alta atividade específica do radionuclídeo. (Zorrilla, 2012)

No sistema de gerador, os dois radionuclídeos, pai e filho, sofrem o processo de desintegração radioativa, tendendo a atingir o equilíbrio entre a formação e o decaimento do radionuclídeo filho (Osso e Knapp, 2011)

O início do desenvolvimento dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ocorreu na década de 1960 e, atualmente, existem alguns tipos de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ disponíveis comercialmente cujas características particulares são comparadas na Tabela 2 (Osso e Knapp, 2011)

Na utilização de sistema de geradores, a separação do radionuclídeo pai do radionuclídeo filho é realizada principalmente pelo método cromatográfico utilizando materiais de adsorção orgânico ou inorgânico, por meio de troca iônica. Nesse sistema, um dos radionuclídeos fica retido na coluna e o outro é retirado por eluição, utilizando-se solventes específicos. (Osso e Knapp, 2011) No caso dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, o ^{68}Ge fica retido na coluna do gerador e o ^{68}Ga é retirado, em sua forma iônica ($^{68}\text{Ga}^{+3}$), por eluição com solução de ácido clorídrico. (Cunha, 2015)

Os geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ possuem um sistema de coluna orgânica, a partir de dodecil-3,4,5-trihidroxibenzoato ou inorgânica, com TiO_2 ou ZrO_2 , ambas capazes de reter o radionuclídeo pai ^{68}Ge , permitindo que o eluído contendo o ^{68}Ga apresente níveis de ^{68}Ge e de outros metais, compatíveis com critérios farmacopeicos. (Zorrilla, 2012) Segundo a Farmacopeia Europeia, a taxa de radioatividade total correspondente ao ^{68}Ge e outras impurezas emissoras de raios gama não deve ser superior a 0.001%. (Farmacopeia Europeia 9.0)

Após certos períodos de uso do gerador, o aumento da concentração de contaminantes é previsto, diminuindo a sua eficiência de eluição. (Rosch, 2013; ITG, 2011)

Comumente, é necessária a utilização de técnicas de purificação do eluído, como a utilização de colunas catiônicas, para aumentar a porcentagem de pureza do eluato e diminuir a concentração de contaminantes nas radiomarcações. (Zorrilla, 2012)

Os geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ dos fabricantes ITG (Alemanha) e IRE ELiT (Bélgica) (Tabela 2), de acordo com as especificações, produzem eluídos de

^{68}Ga de qualidade “GMP” (*Good Manufacturing Practice*), prontos para uso, o que descarta a necessidade de processos de purificação do produto. (ITG; IThemba; IRE ELiT)

Tabela 2: Características de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ dos fabricantes Eckert and Ziegler, Cyclotron Co., Ithemba, ITG e IRE ELiT, de acordo com informações recolhidas dos fabricantes.

Fabricante	Tipo de coluna	Solução de eluição	% ^{68}Ge	Tempo de vida útil
Eckert and Ziegler	Óxido de titânio (TiO_2)	HCl 0,1 M	< 0,001	1 ano/300 eluições
Cyclotron Co.	Óxido de titânio (TiO_2)	HCl 0,1 M	0,005	1 ano/300 eluições
Ithemba	Óxido de estanho (SnO_2)	HCl 1,0 M ou HCl 0,6 M	~ 0,002	1 ano/200 eluições
ITG	Sílica/Orgânica	HCl 5,5 M ou HCl 0,05 M	< 0,005	400 eluições
IRE ELiT	---	HCl 0,1 M	$\leq 0.001\%$	450 eluições

3.4 Propriedades do radionuclídeo ^{68}Ga

Devido ao crescente uso de Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) para aquisição de imagens para diagnóstico, aumentou-se a procura por

radionuclídeos metálicos emissores de pósitrons, principalmente o ^{68}Ga , obtido por meio da utilização de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. (Maecke, 2007)

Além do seu tempo de meia-vida físico, o ^{68}Ga apresenta características físicas vantajosas como tendo 89% de seu decaimento por emissão de pósitrons (partículas β^+ , $E_{\text{máx}} = 1,92 \text{ MeV}$) e 11% por captura eletrônica. Na aniquilação de um pósitron com um elétron, há a liberação de dois fótons gama ($E_{\text{máx}} = 511 \text{ keV}$ cada) em direções opostas, que serão captados pelo equipamento PET para a aquisição de imagens. Tais características geram resultados diagnósticos com boa dosimetria para o paciente e boa resolução espacial da imagem. (Zorrilla & Arencibia 2012)

Devido a sua classificação química na tabela periódica, o ^{68}Ga possui facilidade em formar íons oxidados, sendo seu estado de oxidação +3 o mais estável, e quando em solução aquosa, se torna ácido forte possuindo alta capacidade de formar complexos, como ocorre no processo de eluição dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. A partir da utilização de solução de HCl para eluição do gerador, o ^{68}Ga forma complexos com os íons cloreto. (Zorrilla & Arencibia 2012)

Os estudos de compostos radiomarcados com ^{68}Ga começaram na década de 1950 e surgiram como uma alternativa para o uso de moléculas marcadas com ^{18}F , já que a obtenção deste depende de ciclotrons e sua meia-vida física é curta para ser transportado a longas distâncias. (Zorrilla, 2012) Além disso, o principal radiofármaco de flúor-18, a fludesoxiglicose (^{18}F) não é adequado para diagnosticar tumores não-glicolíticos, como carcinoma hepatocelular, tumores neuroendócrinos e câncer de próstata. A capacidade de diferenciar tumores de um processo infeccioso ou inflamatório é limitada, assim como o diagnóstico de tumores em regiões com metabolismo elevado. (KHAN et al., 2009) Já compostos de inibidores de PSMA radiomarcados com ^{68}Ga apresentam alta capacidade de detectar tumores prostáticos. (Dietlein, 2015)

Os diversos comportamentos do gálio em diferentes faixas de pH estão ilustrados na Figura 4 e na Tabela 3. (NEUMAIER e FANI, 2010; GREEN e WELCH, 1989; SCHUBIGER, 2007; ROESCH e RISS, 2010).

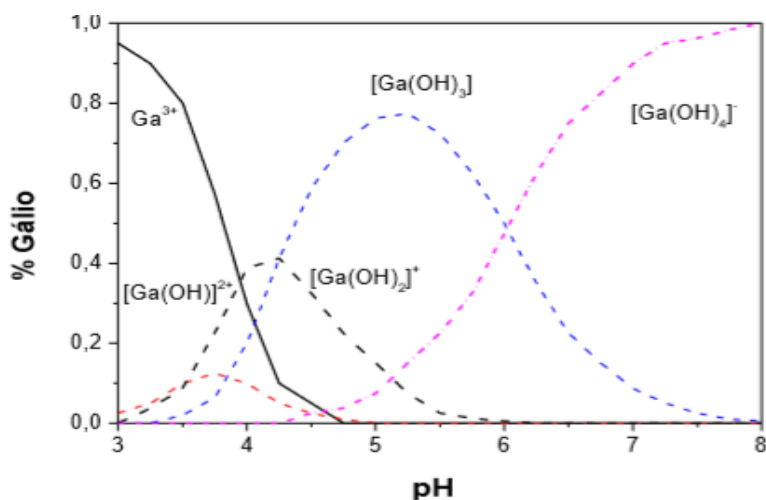


Figura 4: Comportamento do ⁶⁸Ga em diferentes valores de pH. (Roesch e Riss, 2010).

Tabela 3: Formas predominantes do ⁶⁸Ga em diferentes faixas de pH.

pH da solução	Forma predominante do Gálio
1 - 3	Ga ³⁺
4	[Ga(OH) ₂] ⁺
4,5 - 6	[Ga(OH) ₃]
> 6	[Ga(OH) ₄] ⁻

Para manter a estabilidade do Ga⁺³ em solução aquosa, é necessário prover uma solução ácida, na faixa de pH 3. Em valores de pH de 3 a 7, quando não são utilizados agentes quelantes, ocorre a formação de hidróxidos e em pH acima de 7 pode ocorrer processos de desmetalção. Para minimizar processos de hidrólise, convém utilizar solução de HCl e ajuste de pH para favorecer as reações de complexação. (Cunha, 2015)

Podem ocorrer também processos de transquelação com a transferrina sanguínea, devido à semelhança do íon de Ga³⁺ com o íon de Fe³⁺. Assim, complexos de Ga³⁺ devem possuir maior estabilidade do que os complexos com transferrina plasmática para evitar estes processos de transquelação. (Cunha, 2015)

Na ausência de complexação do Ga^{3+} , órgãos com maior capacidade de ligação com a transferrina podem ter sua captação aumentada, como pulmões e fígado, por exemplo, indicando que não há estabilidade adequada no composto. (Cunha, 2015)

O aumento da utilização de ^{68}Ga em preparações radiofarmacêuticas se deve ainda aos valores favoráveis de constantes de estabilidade (demonstrado por Log KL) das moléculas quelantes de interesse, mostrados na Tabela 4. (Zorrilla & Arencibia 2012)

Tabela 4: Constantes de estabilidade do ^{68}Ga com algumas das moléculas quelantes.

Quelante	pM	Log KL
DTPA	22,8	23,3
EDTA	21,7	21,7
DOTA	---	21,33
Transferrina (K1)	21,3	20,3
Transferrina (K2)	20,3	19,3

3.5 Quelante bifuncional

Em preparações radiofarmacêuticas nas quais a radiomarcção de biomoléculas envolve a utilização de radionuclídeos metálicos, faz-se necessário a utilização de quelantes bifuncionais na formulação. (Cunha, 2015)

Os quelantes bifuncionais possuem uma terminação primária em sua estrutura, por onde o metal se ligará com a ajuda de um conjunto de átomos doadores de elétrons que farão reações de coordenação com metais, além de um grupamento funcional, sendo esse uma terminação secundária, que se liga à molécula biologicamente ativa por meio de ligações covalentes e, quando necessário, com o auxílio de espaçadores. (Bartholoma, 2012) Os agentes

quelantes atuam como um ligante do radionuclídeo metálico a uma molécula alvo. (Cunha, 2015)

Os quelantes bifuncionais impedem a formação de hidrólise e transquelação, dando estabilidade ao radionuclídeo e à preparação radiofarmacêutica, já que impedem a liberação dos íons metálicos quando administrados no paciente. (Cunha, 2015)

Os espaçadores, quando inseridos na estrutura, auxiliam na farmacocinética do radiofármaco, promovendo um tempo de eliminação biológica adequado do produto e ao mesmo tempo, proporcionando uma ligação da molécula ao alvo de interesse em um período de tempo adequado para terapia ou aquisição de imagens. (Cunha, 2015)

Dentre as funções dos espaçadores, quando utilizados, além de promover um espaçamento da porção metálica do local de interação, destacam-se a capacidade de alterar a lipofilicidade do radiofármaco, sua carga global externa e sua polaridade, além de realizar substituições iônicas, catiônicas ou ser um substituinte neutro. Desta forma, os espaçadores podem alterar o local de captação do radiofármaco e o processo de excreção, de acordo com o objetivo pretendido. (Cunha, 2015)

Um agente quelante ideal é aquele que apresenta estabilidade, promove facilmente reações de complexação e conjugação, possui seletividade para o radionuclídeo de interesse além de ser facilmente sintetizado. Além destes fatores, o agente quelante bifuncional deve ser avaliado quanto ao seu impacto na farmacocinética e no clareamento que irá proporcionar ao radiofármaco, além da sua lipofilicidade e da sua carga total. Moléculas alvo de baixo e alto peso molecular, como peptídeos e anticorpos respectivamente, são influenciadas pelo agente quelante. (Bartholoma, 2012)

Normalmente, o quelante bifuncional se liga à molécula ativa por meio de processos de conjugação, sendo essas reações simples. (Cunha, 2015) Um exemplo de reação de conjugação é a ligação de um grupo carboxílico e uma amina do tipo primária, ou ligações do tipo tioéter e tiouréia, por meio dos grupos de isotiocianato que reagem com aminas do tipo primárias, e a maleimida que reage com grupos tiol. (Cunha, 2015) Também pode ocorrer conjugação através da ligação de uma amina do tipo primária ou secundária

com um haleto de alquila, sendo essa uma reação de N-alquilação por ataque nucleofílico. (Cunha, 2015)

Os quelantes bifuncionais podem ser de estrutura acíclica ou macrocíclica, onde essa última garante uma melhor termodinâmica e melhor estabilidade à preparação radiofarmacêutica, evitando reações de transquelação e hidrólise, porém requer reações de conjugação mais fortes, ao contrário dos quelantes acíclicos. Tal fato pode influenciar na integridade da molécula alvo, já que reações de conjugação mais fortes podem requerer processos de aquecimento. (Cunha, 2015)

Além disso, as moléculas quelantes bifuncionais que contam com a presença de amins e carboxilas, são mais favoráveis a preparações radiofarmacêuticas. (Cunha, 2015)

Um número variado de agentes quelantes com diferentes estruturas moleculares e suas particularidades foram estudados e propostos para uso com ^{68}Ga , objetivando boa estabilidade e seletividade. (Bartholoma, 2012) Os agentes quelantes mais estudados para ^{68}Ga são o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra acético), o NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) e o anidrido cíclico de DTPA (ácido dietileno-triaminopentacético). (Cunha, 2015)

De estrutura macrocíclica, o quelante DOTA é o mais utilizado para aplicações em PET. Possui baixa constante de estabilidade quando radiomarcado ao ^{68}Ga , já que o radionuclídeo é de estrutura muito pequena para se ajustar à molécula do DOTA. Assim, para as radiomarcações serem eficientes, há a necessidade de procedimentos de aquecimento a temperatura de 95°C pelo período curto de 5 minutos. O peptídeo derivado de somatostatina quelado ao DOTA, (DOTA-TOC), radiomarcado com ^{68}Ga é o único radiofármaco com ^{68}Ga aprovado por órgãos reguladores de medicamentos. (Spang and Roesch, 2016)

O NOTA se mostrou um agente quelante com boa estabilidade para o ^{68}Ga , além de promover radiomarcações em temperatura ambiente. Em comparação com o quelante DOTA, a estabilidade do NOTA é na grandeza de nove vezes maior. (Bartholoma, 2012) Isso se deve ao fato da estrutura do radionuclídeo ^{68}Ga se adequar perfeitamente à estrutura pequena do quelante NOTA. (Spang and Roesch, 2016)

O NODAGA, derivado do quelante NOTA, também é um dos agentes bifuncionais importantes para quelação com ^{68}Ga . A partir da sua primeira síntese, em 2002, o NODAGA tem aparecido em publicações de radiomarcações rápidas com ^{68}Ga e também em processos de conjugações com proteínas. (Bartholoma, 2012))

O quelante acíclico DTPA, apresenta alta afinidade ao ^{68}Ga . Em contrapartida, estudos mostram baixa estabilidade cinética. Essa estabilidade cinética pode ser elevada substituindo a molécula de carbono da estrutura do DTPA, porém poderá ocorrer alta dissociação plasmática, o que é uma desvantagem do composto. (Bartholoma, 2012)

Apesar dos quelantes bifuncionais macrocíclicos despertarem o interesse da radiofarmácia devido às suas características de estabilidade e farmacocinética, os quelantes acíclicos também apresentam suas vantagens para radiomarcações com radionuclídeos metálicos, especialmente para aqueles de meia-vida física curta, pois promovem radiomarcações mais rápidas. (Bartholoma, 2012)

O quelante DEDPA é um exemplo de agente quelante acíclico que quando complexado com ^{68}Ga , promove radiomarcações rápidas, em temperatura ambiente, com alta estabilidade e rápida eliminação renal. (Bartholoma, 2012)

Na década de 1950, o quelante acíclico HBED (ácido N,N'-di(2-hidroxibenzil)etilenodiamina-N,N'-di-acético) começou a ter seus estudos desenvolvidos, se destacando devido à estrutura molecular se assemelhar à estrutura de uma molécula de EDTA, porém, com dois fenóis livres. O composto se mostrou com alta estabilidade na complexação com ^{68}Ga . Do seu derivado, o quelante bifuncional macrocíclico HBED-CC (N,N'-bis[2-hidroxi-5-(carboxietil)benzil]etilenodiamina-N,N'-ácido diacético) se mostrou com alta estabilidade, promovendo radiomarcações rápidas e sem a necessidade de processos de aquecimento, o que favorece o seu uso em formulações com moléculas sensíveis a temperaturas altas. (Bartholoma, 2012)

Em comparação com o quelante NOTA, estudos de radiomarcação desenvolvidos a partir da complexação com a proteína tetrafluorofenolato (TFP) e radiomarcado com ^{68}Ga , mostraram que o quelante HBED-CC apresentou 98,7% de rendimento radioquímico, enquanto o quelante NOTA apresentou

apenas 50%, ambos nas mesmas condições de marcação. Além disso, ambos apresentaram alta estabilidade. Nos estudos de biodistribuição *in vivo*, a biodistribuição foi semelhante para ambos os quelantes utilizados, porém a captação hepática foi maior para o quelante NOTA, enquanto a captação renal foi maior para o HBED-CC. (Bartholoma, 2012)

Estudos de radiomarcção foram desenvolvidos a partir do quelante HBED-CC conjugado ao PSMA. A literatura sugere uma etapa de aquecimento no processo, apesar do quelante HBED-CC ser capaz de promover radiomarcções em temperatura ambiente. Os resultados de imagem realizados com HBED-CC-PSMA radiomarcados com ^{68}Ga , a partir da aquisição de imagens em equipamentos PET, mostraram um radiofármaco promissor no diagnóstico de câncer de próstata. Além disso, o uso do quelante HBED-CC com PSMA mostra que radiofármacos de ^{68}Ga são capazes de unir a praticidade de radiomarcções diretas e a alta estabilidade *in vivo*. (Spang *et al*, 2016)

Outros quelantes foram desenvolvidos a partir do HBED-CC, porém não tiveram seu uso muito difundido na prática clínica, como o HBED-CI, HBED-AA e o HBED-CA. (Spang *et al*, 2016)

Outra aplicação do quelante HBED-CC foi sua complexação com TFP-éster, apresentando uma alta estabilidade por até 3 meses. Sua síntese se dá em apenas uma etapa de purificação por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Estudos na literatura mostram a conjugação do HBED-CC (TFP) com peptídeos e também com anticorpos, em especial o mAb425, um fator de crescimento anti-epidérmico. (Spang *et al*, 2016)

4. MATERIAIS

4.1 Reagentes e soluções

- Acetato de sódio anidro (Merck, Alemanha);
- Acetona ultrapura (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila para CLAE (Merck, Alemanha);
- Ácido cítrico (Cromato Produtos Químicos, Brasil);
- Ácido clorídrico ultrapuro (Merck, Alemanha);
- Ácido trifluoroacético para CLAE (Sigma Aldrich, EUA);
- Água purificada - Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- Álcool etílico (Merck, Alemanha);
- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- Eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG, fornecido por Hospital Colaborador
- Hidróxido de sódio, lentilhas (Merck, Alemanha);
- Inibidor de PSMA conjugado ao HBEDCC - PSMA-11 (ABX, Alemanha)
- Ketamina (Vetbrands, Brasil);
- Kit PSMA-HBED-CC para marcação com ^{68}Ga (POLATOM, Polônia)
- Manitol (Merck, Alemanha);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil);
- Metanol (Merck, Alemanha);
- Penicilina:estreptomicina (Cultilab, Brasil);
- Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Tripsina bovina (Cultilab, Brasil);
- Xilazina (Syntec, Brasil).

4.2 Equipamentos

- Balança analítica M220 (Denver Instrument, EUA);
- Balança semi-analítica (Lutron, EUA);
- Cabine de fluxo laminar para cultivo celular classe 2 (Scanlaf, EUA);

- Calibrador de atividade CRMTM - 35R (Capintec, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) - D5002 cobra II (Packard - Canberra, EUA);
- Detector de Germânio – HPGe (Canberra Industries, Austrália)
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 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-10^a, forno CTO-10 Avp e Detector radioativo (câmara de cintilação - NaI) (Shimadzu, Japão);
- Gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga de 50 mCi (1850 MBq) (Cyclotron & Co, Ltd, Russia);
- Medidor de pH (Tecnopon, Brasil)
- Módulo automático Modular-Lab PharmTracer (Eckert and Ziegler, Alemanha)

4.3 Outros

- Cartucho de purificação StrataX-A (Phenomenex, EUA)
- Coluna XTerra RP8 para cromatografia líquida de alta eficiência nas dimensões 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters, EUA)
- 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 capilares, tubos cônicos tipo Falcon;
- Mini coluna compacta Sep-pak C18
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG) e ITLC-SG (Merck, Alemanha);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos e provetas.

4.4 Animais

Foram utilizados animais saudáveis, da linhagem BALB/c e animais imunodeprimidos, da linhagem SCID, provenientes do biotério do IPEN, mediante

aprovação do projeto pela Comissão Ética para Utilização de Animais (CEUA - IPEN), sob o número do projeto 194/17.

4.5 Infraestrutura

Este trabalho foi realizado nos laboratórios das dependências do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/USP), em especial os laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia, o laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia e o Biotério. Esses laboratórios possuem toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais, respectivamente.

5. MÉTODOS

5.1 Condição preliminar de radiomarcção

Os ensaios e os parâmetros iniciais de radiomarcção foram baseados no kit desenvolvido pela empresa POLATOM (Polônia) para radiomarcção do PSMA-HBED-CC com ^{68}Ga . O kit possui em sua formulação 20 μg do peptídeo PSMA-HBED-CC e apresenta acetato de sódio em sua composição. A instrução de radiomarcção do kit prevê utilização de 5 mL de solução de cloreto de galio ($^{68}\text{GaCl}_3$) e 10 minutos de marcação a 90 °C.

Para os experimentos realizados, utilizou-se o gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd. (Rússia), o qual foi eluído com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M e o eluato de gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha), obtido por eluição com solução de HCl 0,05 M, ambos para a obtenção de 5 mL de solução de $^{68}\text{GaCl}_3$, conforme instruções dos próprios fabricantes.

5.2 Escolha e preparo da solução tampão de marcação

O tampão acetato de sódio a ser utilizado na composição do kit foi avaliado para os diferentes eluatos de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. O tampão acetato de sódio foi preparado em diferentes concentrações molares (0,1 M, 1 M e 1,5 M), onde foram testadas com pH final de 5 e 6 e avaliadas frente a diferentes volumes (5 mL e 10 mL) de solução de HCl 0,1 M e HCl 0,05 M, empregadas na eluição de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia) e ITG (Alemanha).

Os ensaios de avaliação da capacidade tamponante das diferentes concentrações de tampão acetato de sódio foram realizados sem empregar os eluatos radioativos, que foram substituídos pelas soluções de ácido clorídrico empregadas na eluição dos geradores. Os volumes de ácido estudados

correspondem ao volume preconizado (5 mL) e volume máximo (10 mL) de eluição dos geradores.

5.3 Escolha do sistema cromatográfico para ensaio de pureza radioquímica

Para a definição do método e padronização do perfil cromatográfico das espécies radioquímicas envolvidas na radiomarcagem do inibidor de PSMA com o $^{68}\text{GaCl}_3$, analisou-se o comportamento do $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de ambos os fabricantes (Cyclotron & Co – Rússia e ITG – Alemanha) e da mistura de radiomarcagem nos seguintes sistemas cromatográficos:

- **Cromatografia em camada delgada (CCD)**

- Fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5
- Fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5
- Suportes cromatográficos de ITLC-SG (suporte de fibra de vidro impregnada com sílica gel) e TLC-SG (fina camada de sílica gel sobre tira de alumínio), de 1,5 cm de largura, 13 cm de comprimento e 1,5 cm de distância do ponto de aplicação da amostra em relação a base da fita, de forma a obter 10 segmentos; (Alcarde, 2016)

Amostras da solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ e da mistura de marcação contendo PSMA- ^{68}Ga foram analisadas por CCD. Uma alíquota de 5 μL foi depositada na origem das fitas cromatográficas ITLC-SG e TLC-SG. As fitas cromatográficas foram submetidas às condições de corrida na fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5 e fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5. Após o término das corridas, as fitas foram secas em estufas, cortadas em 10 segmentos e submetidos à contagem em contador gama tipo poço.

- **Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)**

- Fase móvel A: ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v);
- Fase móvel B: ácido trifluoroacético:acetonitrila (1:999 v/v).
- Coluna XTerra RP8 para cromatografia líquida de alta eficiência nas dimensões 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters, EUA).

O gradiente de concentração de solvente está descrito na Tabela 5. O sistema de CLAE empregado está descrito na proposta do radiofármaco na Farmacopeia Europeia (*Gallium (⁶⁸Ga) PSMA – 11 injection*, Farmacopeia Europeia, 9.0).

Tabela 5: Gradiente de concentração de solventes descrito no ensaio de determinação de pureza radioquímica por CLAE na proposta de monografia para o PSMA-11-⁶⁸Ga da Farmacopeia Europeia (*Gallium (⁶⁸Ga) PSMA – 11 injection*, Farmacopeia Europeia, 9.0).

Tempo (min)	Fase móvel A (v/v)	Fase móvel B (v/v)
0 – 0,5	95	5
0,5 - 10	95 - 60	5 - 40
10 - 11	60 - 95	40 - 5
11 - 16	95	5

Amostras da solução de ⁶⁸GaCl₃ e da mistura de marcação contendo PSMA-⁶⁸Ga foram analisadas por CLAE. Uma amostra correspondente a 11,1 MBq (300 µCi) foi retirada do frasco de marcação ou do frasco contendo ⁶⁸GaCl₃ e o volume foi completado para 500 µL de solução salina. As soluções foram analisadas por CLAE pelo método descrito.

Para fins de comparação com a Farmacopeia Europeia e para avaliar a integridade do peptídeo PSMA-HBED-CC, 10 µg do peptídeo foram diluídos em 500 µL de solução salina e a solução foi analisada por CLAE, conforme método descrito.

5.4 Estudos de radiomarcção não-automatizada

A eluição do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ e as radiomarcções ocorreram conforme a condição padrão de marcação, onde 5 mL de solução de cloreto de gálio foram acrescentados a 20 μg de peptídeo, previamente diluído com 1 mL de solução tampão acetato de sódio 1,5 M pH 6. O frasco foi submetido ao aquecimento por 10 minutos a 90 °C.

Foram realizados estudos de radiomarcção empregando-se a solução eluída do gerador com e sem purificação prévia, descritos nos itens a seguir. Em cada marcação, a pureza radioquímica foi analisada por CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M, pH 8.5 (v/v), conforme descrito no item 5.3. As análises foram realizadas em triplicata.

5.4.1 Radiomarcção de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd., Russia, não purificado previamente.

Foram realizadas marcações (N=6) empregando $^{68}\text{GaCl}_3$ sem purificação prévia, na condição padrão de marcação. A faixa de atividade empregada nas marcações foi de 333 a 370 MBq (9 a 10 mCi).

Em cada marcação, a pureza radioquímica foi analisada por CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M, pH 8.5 (v/v) conforme descrito no item 5.3. As análises foram realizadas em triplicata.

5.4.2 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd., Russia, com purificação prévia.

Realizou-se radiomarcções (N=6) com purificação prévia do eluído proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (Cyclotron & Co., Ltd.).

Após a eluição do gerador com 5 mL de HCl 0,1 M, procedeu-se à purificação da solução final, empregando-se o mesmo cartucho catiônico utilizado nos módulos automatizados para a síntese de ^{68}Ga -DOTATATO (StrataX-A, Phenomenex, EUA). A solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ foi percolada através do cartucho catiônico, o eluído foi desprezado, uma vez que arrastou os contaminantes químicos e radionuclídico, e o galio-68 foi eluído do cartucho com 800 μL de solução de acetona ácida (preparada a partir de 0,17 mL de HCl 37% + 2,23 mL de água purificada e acetona, para completar o volume para 100 mL). O volume deste eluído foi completado para 5 mL com HCl 0,1M.

Esta solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ purificada foi transferida para um frasco de marcação contendo 20 μg do PSMA-HBED-CC e 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 6. A solução final foi aquecida em bloco aquecedor por 10 minutos a 90 °C. A faixa de atividade empregada nas marcações foi de 222 a 370 MBq (6 a 10 mCi).

A pureza radioquímica de cada uma das radiomarcções foi analisada por CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (v/v), conforme descrito no item 5.3. As análises foram realizadas em triplicata.

5.4.3 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia e filtração final.

Objetivando aumentar ainda mais a porcentagem de pureza radioquímica, análises foram feitas filtrando o produto final radiomarcado obtido

de acordo com o item 5.4.2 previamente descrito, em membrana filtrante 0,22 μm , método que também é utilizado em módulo automatizado.

A faixa de atividade empregada nas marcações foi de 222 a 370 MBq (6 a 10 mCi).

A pureza radioquímica de cada uma das radiomarcações foi analisada por CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (v/v), conforme descrito no item 5.3. As análises foram realizadas em triplicata.

5.4.4 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG - Alemanha.

A pureza radioquímica da marcação (N=3) também foi estudada empregando-se solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ eluída de gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (grau GMP), do fabricante ITG (Alemanha), sem prévia purificação.

A eluição do gerador foi realizada com 5 mL de HCl 0,05 M, conforme especificação do fabricante.

A mistura de marcação contendo 20 μg do peptídeo em 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 6 e o volume da solução eluída de $^{68}\text{GaCl}_3$ foi submetida a aquecimento por 10 minutos a 90 $^{\circ}\text{C}$.

A faixa de atividade empregada nas marcações foi de 148 a 222 MBq (4 a 6 mCi).

A pureza radioquímica das marcações foi determinada empregando-se o método de CCD/ITLC-SG em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M, pH 8.5 (v/v), conforme descrito no item 5.3. As análises foram realizadas em triplicata.

A radiomarcção também foi analisada quanto a sua estabilidade em temperatura ambiente após 4 horas.

5.4.5 Radiomarcção não automatizada de kit liofilizado de PSMA-HBED-CC da empresa POLATOM, com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG, Alemanha.

O kit existente no mercado internacional, fabricado pela empresa POLATOM (Polônia), foi radiomarcado (N=1) com o eluído proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ da ITG, Alemanha.

O $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador da ITG (5 mL) foi diretamente incorporado ao frasco do kit liofilizado. A solução final foi aquecida em bloco aquecedor por 10 minutos a 90 °C, conforme instruções do fabricante.

A radiomarcção foi analisada em CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol : acetato de amônia 1M, pH 8.5 (v/v), conforme descrito no item 5.3.

5.5 Radiomarcção automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co Ltd., Russia.

Para fins de comparação, realizou-se análise do produto radiomarcado em módulo de síntese automatizado empregado na produção de ^{68}Ga -DOTATATO, porém adaptado para os parâmetros de radiomarcção utilizados nos estudos anteriores descritos (Alcarde, 2016).

A análise da marcação foi realizada por CLAE, conforme método descrito no item 5.3.

5.6 Controle radionuclídico – Teste de pureza radionuclídica

A pureza radionuclídica do ^{68}Ga foi realizada para o eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia) e ITG (Alemanha).

Os testes foram realizados com a colaboração do Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN, empregando-se detector de germânio (Li). As análises foram feitas empregando-se tempos de contagem de 120 segundos e 7.200 segundos.

5.7 Ensaios *in vivo*

5.7.1 Ensaio de biodistribuição em animais sadios e estudo farmacocinético

Todos os experimentos *in vivo* presentes neste plano foram realizados seguindo as normas e as condutas ditadas pela SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório). Desta forma, os estudos *in vivo* foram primeiramente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN/USP.

Para o ensaio de biodistribuição em animais sadios, foram utilizados camundongos machos da espécie BALB/c. Estes foram mantidos no biotério do IPEN em condições controladas de temperatura, umidade, iluminação e alimentação.

O ensaio foi realizado com 20 animais, divididos em quatro grupos a serem estudados nos tempos de 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos e 120 minutos, totalizando cinco camundongos por grupo.

A radiomarcagem para a aquisição do PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga a ser utilizado no ensaio de biodistribuição foi realizada empregando-se eluído do gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga do fabricante Cyclotron & Co, previamente purificado e com filtração do produto final, conforme procedimento descrito no item 5.4.3. A solução de radiomarcagem final foi filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm.

Para análise da pureza radioquímica da marcação, foi utilizado sistema de CLAE e em CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M, pH 8,5 (v/v), previamente descritos no item 5.3. As análises em CCD foram realizadas em triplicata.

Os animais foram pesados e identificados conforme o grupo. A administração do produto radiomarcado se deu por via endovenosa caudal e a atividade injetada foi de 11,1 MBq/100 μ L (300 μ Ci /100 μ L) por animal.

Conforme os tempos a serem estudados (30, 45, 60 e 120 minutos) os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 20 mg/mL de solução de ketamina básica e 4 mg/mL de xilazina, sendo administrados 100 μ L/20 gramas de peso corporal do camundongo, realizando-se posteriormente, a eutanásia por deslocamento cervical.

Empregando-se procedimento de dissecação, retirou-se coração, pulmões, pâncreas, baço, estômago, fígado, rins, intestino, amostra de músculo da pata traseira, osso (fêmur), cérebro, sangue (plexo orbital) e cauda. Os órgãos foram lavados e a radioatividade individual foi contada em contador gama tipo poço.

Calculou-se a porcentagem de atividade injetada (%AI) e a atividade por grama do tecido/órgão ou mL de sangue (%AI/g), corrigindo a contagem do padrão da atividade injetada pela contagem da cauda de cada animal, a fim de descontar qualquer acúmulo de produto radiomarcado que possa ter ocorrido durante a injeção.

Para corrigir o decaimento radioativo do ^{68}Ga utilizaram-se amostras em triplicata de solução padrão da atividade injetada nos animais, que foram contadas em contador gama tipo poço, juntamente com a contagem dos órgãos de cada grupo de camundongos.

Para cálculo da porcentagem injetada presente nos ossos (%AI/osso) e nos músculos (%AI/músculo) dos animais, retirou-se parte do fêmur e do músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a contagem por grama e assumiu-se a massa do esqueleto como 12% e dos músculos como 40% da massa corpórea. Para o cálculo da %AI sangue total, foi determinada a volemia de cada animal, multiplicando-se o peso corpóreo por 0,0778 e a volemia foi multiplicada pela %AI/mL de sangue cada animal.

A análise farmacocinética foi realizada a partir dos resultados de captação no sangue total nos diferentes tempos estudados, sendo um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento.

Os parâmetros farmacocinéticos como meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), constante de distribuição (α) e constante de eliminação (β), bem como a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC), foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA)

O clareamento sanguíneo (CL) foi calculado pela equação:

$$CL = \frac{\textit{Atividade total administrada}}{AUC} \quad \text{EQ.1}$$

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação:

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \quad \text{EQ.2}$$

5.7.2 Cultura de células LNCaP

As células LNCaP foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 100 U/mL de penicilina e streptomina em 300 µg/mL.

As células foram armazenadas nas condições de 37°C de temperatura e em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram recultivadas em um período de duas vezes por semana.

5.7.3 Desenvolvimento do modelo tumoral prostático ectotópico

Para o desenvolvimento do modelo tumoral, utilizaram-se 13 camundongos machos da linhagem SCID, com 8 a 10 semanas de idade.

Células da linhagem LNCaP foram inoculadas por via subcutânea nos músculos da pata esquerda e direita, em concentrações de 5×10^6 e 10×10^6 células/mL, respectivamente.

Os animais foram observados por 15 dias para avaliar o crescimento tumoral, considerando-se desejável um crescimento de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. Os tumores foram medidos utilizando-se um paquímetro digital e os valores das medidas foram utilizados para o cálculo do volume tumoral.

Os animais foram eutanasiados e os tumores foram retirados e isolados imediatamente para análise histopatológica.

5.7.4 Análise histopatológica

Os tumores foram mantidos em solução de Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 3 horas. Em seguida, o processamento dos tumores foi realizado e estes foram incorporados em parafina.

As análises foram realizadas em cortes de 5 μ m coloridos com hematoxilina e eosina.

Os cortes foram analisados por meio de microscopia. (Nikon Eclipse E600; Nikon;Tokio;Japan)

5.7.5 Ensaio de biodistribuição em animais com crescimento tumoral

Para o ensaio de biodistribuição em animais com crescimento tumoral, foram utilizados camundongos machos da linhagem SCID. Estes foram

mantidos no biotério do IPEN em condições controladas de temperatura, umidade, iluminação e alimentação.

A inoculação dos animais com células LNCaP ocorreu conforme o item 5.7.3 descrito anteriormente, a partir da inoculação de 5×10^6 células/mL, por animal.

O ensaio foi realizado com 10 animais, divididos em dois grupos (grupo com bloqueio de receptor e grupo sem bloqueio de receptor) a serem estudados no tempo de 60 minutos após a administração do radiofármaco, totalizando cinco camundongos por grupo.

No grupo de animais com bloqueio de receptor, foram administrados 100 μg de PSMA-HBED-CC (ABX, Alemanha) por animal, 30 minutos antes da administração do radiofármaco.

A radiomarcagem para a aquisição do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga a ser utilizado no ensaio de biodistribuição foi realizada empregando-se eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, previamente purificado e com filtração do produto final, conforme procedimento descrito no item 5.4.3.

Para análise da pureza radioquímica da marcação, foi utilizado sistema de CLAE e em CCD/ITLC-SG, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M, pH 8,5 (v/v), previamente descritos no item 5.3. As análises em CCD foram realizadas em triplicata.

Os animais foram pesados e identificados conforme o grupo. A administração do produto radiomarcado se deu por via endovenosa caudal e a atividade injetada foi de 11,1 MBq/100 μL (300 μCi /100 μL) por animal.

Após 60 minutos da administração do radiofármaco, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 20mg/mL de solução de ketamina básica e 4 mg/mL de xilazina, sendo administrados 100 μL /20 gramas de peso corporal do camundongo, realizando-se posteriormente, a eutanásia por deslocamento cervical.

Através do procedimento de dissecação, retirou-se coração, pulmões, pâncreas, baço, estômago, fígado, rins, intestino, amostra de músculo da pata traseira, osso (fêmur), cérebro, sangue (plexo orbital), cauda e tumor. Os órgãos foram lavados e a radioatividade individual foi contada em contador gama tipo poço.

Calculou-se a porcentagem de atividade injetada (%AI) e a atividade por grama do tecido/órgão (%AI/g), corrigindo a contagem do padrão da atividade injetada pela contagem da cauda de cada animal, a fim de descontar qualquer acúmulo de produto radiomarcado que possa ter ocorrido durante a injeção.

Para corrigir o decaimento radioativo do ^{68}Ga utilizaram-se amostras em triplicata de solução padrão da atividade injetada nos animais, que foram contadas em contador gama tipo poço, juntamente com a contagem dos órgãos de cada grupo de camundongos.

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.8 Ensaaios *in vitro*

5.8.1 Ensaio de velocidade de ligação celular

Realizou-se a radiomarcagem do peptídeo PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador Cyclotron & Co (Rússia) purificado, nas condições de radiomarcagem descritas anteriormente no item 5.4.3. Para análise da pureza radioquímica foi utilizado sistema de CLAE previamente descrito, que demonstrou porcentagem de pureza radioquímica de 92,8%.

O ensaio de velocidade de ligação celular foi desenvolvido a partir de 5 mL do produto radiomarcado. O volume foi completado para 12 mL com meio de cultura RPMI 1640 10% v/v SFB. Em cada poço da placa de cultura, contendo 200×10^3 células LNCaP, foi depositado 1 mL da solução, totalizando 9 poços, sendo eles triplicata para cada tempo. Para o padrão, reservou-se 3 tubos onde foram depositados 1 mL da solução do produto marcado diluído em meio de cultura, sendo o volume completado para 2 mL com solução salina.

O ensaio foi desenvolvido em tempos propostos de 30, 45 e 60 minutos, separados e analisados três poços para cada um desses tempos.

Após a contagem de cada tempo, removeu-se 1 mL de cada poço e depositou-se 1 mL de PBS, agitando levemente a solução do poço com o auxílio da micropipeta. O volume de 1 mL foi novamente retirado do poço, acrescentando novamente mais 1 mL de PBS e repetindo o procedimento de leve agitação. Retirou-se o volume de 1 mL do poço e adicionou-se 1 mL de solução de NaOH 1M, aguardando aproximadamente 5 minutos. O volume de 1 mL de cada poço foi retirado e depositado no respectivo tubo de contagem, identificado de acordo com cada tempo a ser estudado. Novamente acrescentou-se 1 mL de solução de NaOH em cada poço e aguardou-se por aproximadamente 5 minutos. Retirou-se 1 mL de cada poço e depositou-se no seu respectivo tubo de contagem, totalizando assim um volume de 2 mL em cada tubo.

Todos os tubos tiveram a radioatividade contada em contador gama tipo poço e posteriormente, os resultados foram avaliados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.8.2 Ensaio de ligação/saturação celular

O ensaio de ligação/saturação celular foi desenvolvido a partir de 5 mL do produto radiomarcado, de acordo com a condição de marcação descrita no item 5.4.3. Para análise da pureza radioquímica foi utilizado sistema de CLAE previamente descrito, que demonstrou porcentagem de pureza radioquímica de 93 %.

Em cada poço da placa de cultura, contendo 200×10^3 células LNCaP, o meio de cultura foi removido e depositou-se o produto marcado, com volume calculado para cada concentração estudada, sendo o volume completado com meio de cultura RPMI 1640 10% v/v SFB, para perfazer 1 mL de solução final. O ensaio totalizou 18 poços, sendo eles triplicata para cada concentração de produto marcado estudado, onde: 0,1; 0,6; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 nM.

Após 30 minutos, com armazenamento em refrigeração, removeu-se o volume total de cada poço, transferindo para tubos de contagem, e em seguida

depositou-se em cada poço 1 mL de PBS. Após agitação suave, os volumes foram recolhidos nos mesmos tubos de contagem correspondentes. Este procedimento de lavagem dos poços com 1 mL de PBS foi repetido e os volumes foram novamente recolhidos nos tubos correspondentes. Estes tubos reuniram a porção do radiofármaco não ligada às células.

Em seguida, adicionou-se a cada poço 1 mL de solução de NaOH 1M, e após 5 minutos à temperatura ambiente, a solução de NaOH de cada poço foi retirada e depositada em novo tubo de contagem, identificados de acordo com cada tempo a ser estudado. Novamente acrescentou-se 1 mL de solução de NaOH em cada poço e após 5 minutos os volumes foram transferidos para os tubos de contagem correspondentes. Estes tubos reuniram a porção celular do ensaio.

Todos os tubos tiveram a radioatividade contada em contador gama tipo poço e posteriormente, os resultados foram avaliados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

5.8.3 Ensaio de competição

O ensaio de competição foi desenvolvido a partir de 5 mL do produto radiomarcado, de acordo com a condição de marcação descrita no item 5.4.3. Para análise da pureza radioquímica foi utilizado sistema de CLAE previamente descrito, que demonstrou porcentagem de pureza radioquímica de 95 %.

Em cada poço da placa de cultura, contendo 200×10^3 células LNCaP, depositou-se o produto marcado, com volume calculado para cada concentração estudada, sendo 0,1 nM, 1,0 nM e 2,0 nM, em triplicada para cada concentração, totalizando 9 poços.

Em conjunto, para visualização da ligação específica, o experimento descrito foi repetido nas mesmas condições, porém acrescentando-se a cada poço um excesso molar do PSMA-HDEB-CC não radiomarcado da ordem de 10 vezes, totalizando 18 poços ao final do ensaio.

Após 30 minutos, com armazenamento em refrigeração, removeu-se o volume total de cada poço, transferindo para tubos de contagem, e em seguida depositou-se em cada poço 1 mL de PBS. Após agitação suave, os volumes foram recolhidos nos mesmos tubos de contagem correspondentes. Este procedimento de lavagem dos poços com 1 mL de PBS foi repetido e os volumes foram novamente recolhidos nos tubos correspondentes. Estes tubos reuniram a porção do radiofármaco não ligada às células.

Em seguida, adicionou-se a cada poço 1 mL de solução de NaOH 1M, e após 5 minutos à temperatura ambiente, a solução de NaOH de cada poço foi retirada e depositada em novo tubo de contagem, identificados de acordo com cada tempo a ser estudado. Novamente acrescentou-se 1 mL de solução de NaOH em cada poço e após 5 minutos os volumes foram transferidos para os tubos de contagem correspondentes. Estes tubos reuniram a porção celular do ensaio.

Todos os tubos tiveram a radioatividade contada em contador gama tipo poço e posteriormente, os resultados foram avaliados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Escolha e preparo da solução tampão de marcação

Como melhor resultado, dentre as molaridades estudadas, o volume de 1,0 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 6,0 promoveu tamponamento de até 5,0 mL das soluções ácidas, quando consideradas as concentrações de HCl de 0,1 M e 0,05 M empregadas na eluição dos geradores de diferentes fabricantes, fornecendo condições apropriadas para a radiomarcagem do peptídeo, apresentando pH final entre 5,0 e 5,5.

Utilizando o eluato do gerador em seu volume máximo (10 mL de solução de HCl 0,1 M), o tampão acetato de sódio 1,5 M promoveu tamponamento final na faixa de pH entre 4 e 4,5.

De acordo com a proposta de especificação do produto na Farmacopeia Europeia, sugere-se que a faixa de pH esteja entre 4 e 8, incluindo assim, a faixa de pH obtida para a solução tampão estudada.

6.2 Escolha do sistema cromatográfico para ensaio de pureza radioquímica

6.2.1 Perfil cromatográfico de $^{68}\text{GaCl}_3$

Os perfis cromatográficos obtidos do cloreto de gálio-68 em cromatografia em camada delgada (CCD) estão apresentados nas Figuras de 5 a 9.

Observa-se com os resultados obtidos em CCD, que a fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5 retém a espécie de $^{68}\text{GaCl}_3$ na origem da fita (Figuras 7 e 8), enquanto que com a fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5, o $^{68}\text{GaCl}_3$ migra para o final da fita

cromatográfica (Figuras 5 e 6). Os perfis foram idênticos quando se utilizou suporte de ITLC-SG e TLC-SG.

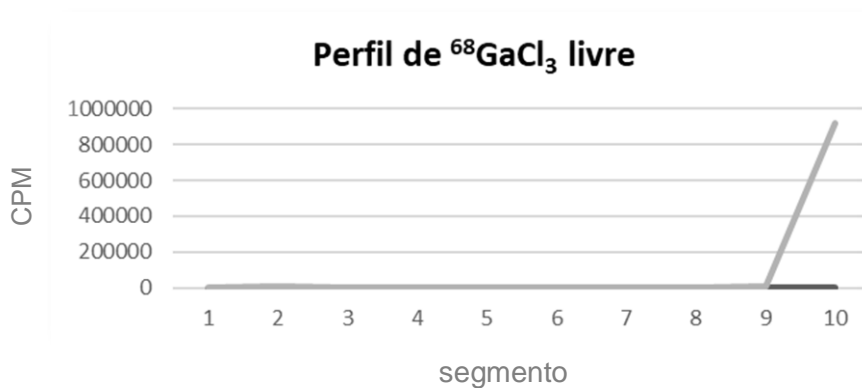


Figura 5: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ (gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ – Cyclotron & Co, Russia) em fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5, em suporte cromatográfico de fita ITLC-SG.

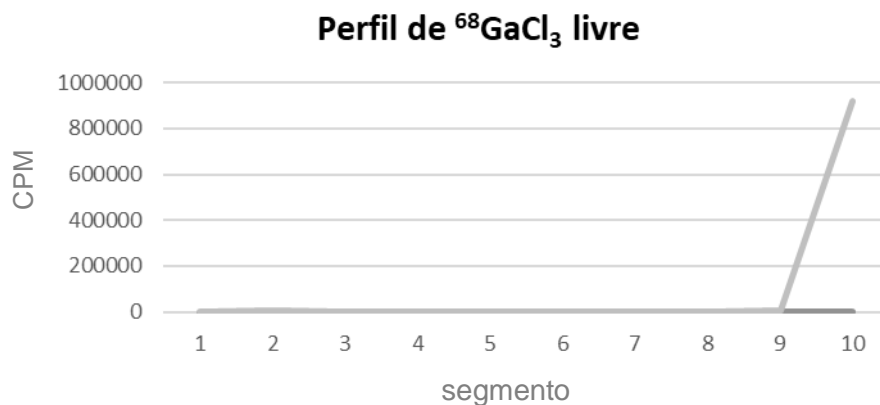


Figura 6: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ (gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ – Cyclotron & Co, Russia) em fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5, em suporte cromatográfico de fita TLC-SG.

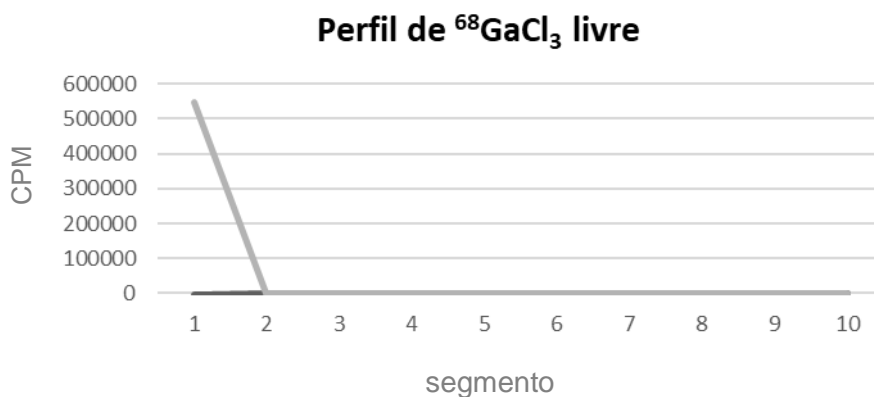


Figura 7: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ (gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ – Cyclotron & Co, Russia) em fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5, em suporte cromatográfico de fita ITLC-SG.

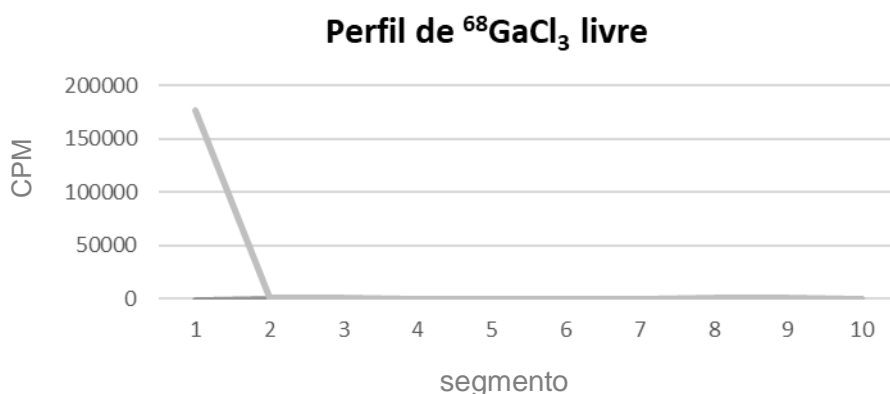


Figura 8: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ em fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5, em suporte cromatográfico de fita TLC-SG.

A Figura 9 apresenta o perfil de CLAE para o cloreto de galio-68, sendo que a espécie radioquímica apresentou tempo de retenção entre aproximadamente 3 a 4 minutos.

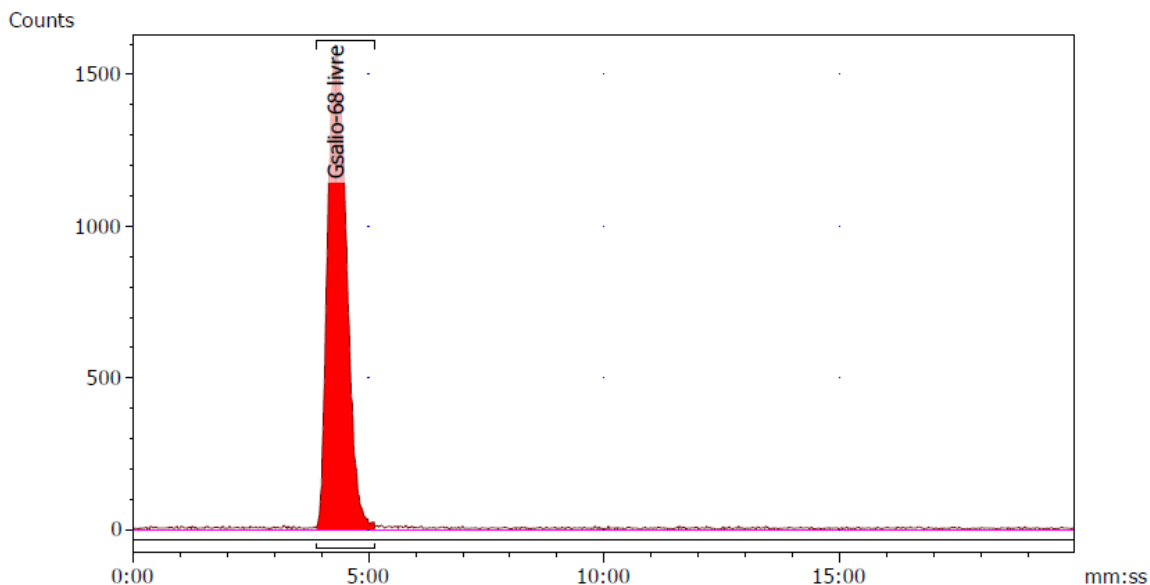


Figura 9: Perfil de $^{68}\text{GaCl}_3$ em análise por CLAE utilizando detector de radiação, Coluna XTerra RP8 (4,6 x 150 mm, 5 μm) e gradiente de fase móvel: fase (A), ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v) e Fase móvel (B), ácido trifluoroacético, acetonitrila (1:999 v/v), 95% a 60% de (A) em 10 minutos

Para fins de comparação, os resultados obtidos na análise em CCD em ITLC-SG do $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha) estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

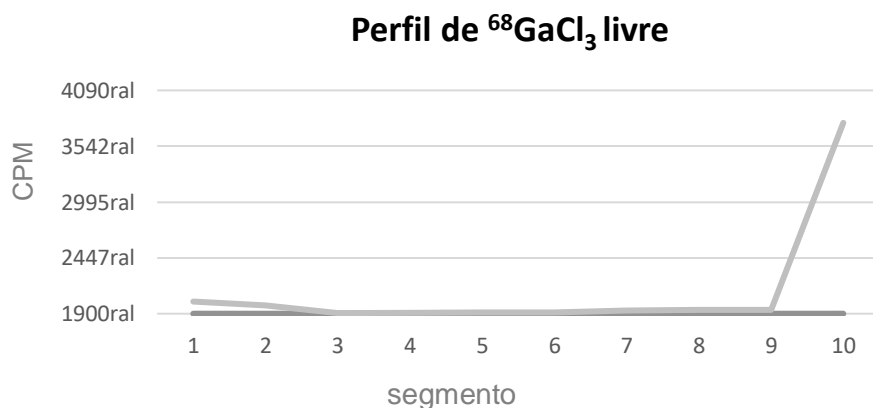


Figura 10: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ (gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ – ITG, Alemanha) em fase móvel citrato:ácido cítrico 1M (v/v) pH 5, em suporte cromatográfico de fita ITLC-SG.

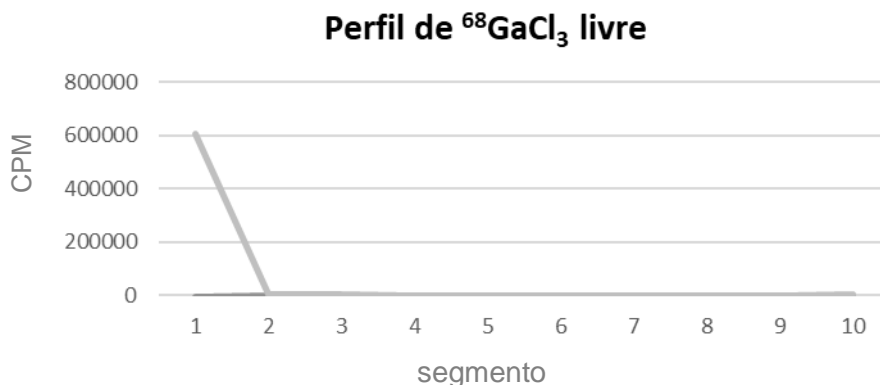


Figura 11: Perfil de CCD de $^{68}\text{GaCl}_3$ (gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ – ITG, Alemanha) em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5, em suporte cromatográfico de fita ITLC-SG.

Em comparação com o tempo de análise cromatográfica, a fita ITLC-SG se mostrou mais rápida que a TLC-SG, sendo possível finalizar a corrida aproximadamente em 30 minutos. A fita TLC-SG apresentou os mesmos perfis cromatográficos da fita de ITLC-SG, porém o tempo de corrida foi muito superior, aproximadamente 1 hora, o que se constitui em desvantagem para ensaios de rotina de liberação, considerando-se o tempo de meia vida curto do ^{68}Ga .

Deste modo, escolheu-se o sistema de CCD com suporte de ITLC-SG e solvente metanol:acetato de amônio 1 M (v/v) pH 8,5 para análise das marcações.

6.2.2 Perfil cromatográfico PSMA-HBED-CC

A Figura 12 ilustra o cromatograma (UV) do PSMA-HBED-CC obtido por CLAE segundo método descrito no item 5.3. O tempo de retenção obtido, de aproximadamente 5,5 minutos é condizente com o apresentado na monografia do produto na Farmacopeia Europeia.

O perfil cromatográfico mostrou um pico com tempo de retenção compatível com o sistema empregado, comprovando o alto grau de pureza do peptídeo utilizado nas radiomarcações, além de um pico de volume menor, sugerindo a presença de impureza em pequena quantidade ou um pico de coeluição.

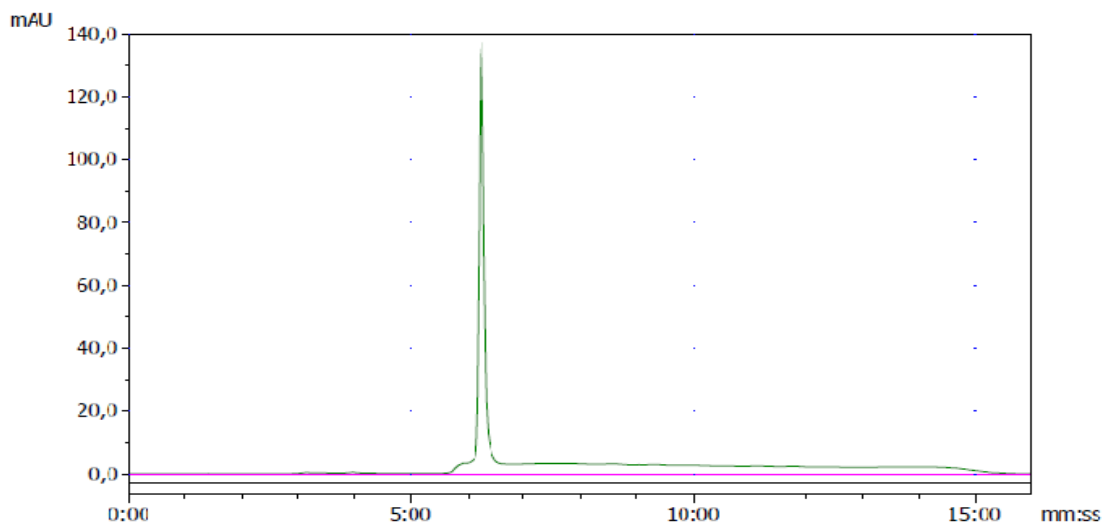


Figura 12: Peptídeo PSMA-HBED-CC em análise por CLAE (UV) utilizando Coluna XTerra RP8 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) e gradiente de fase móvel: fase (A), ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v) e Fase móvel (B), ácido trifluoroacético, acetonitrila (1:999 v/v), 95% a 60% de (A) em 10 minutos.

6.2.3 Perfil cromatográfico PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga

O cromatograma do produto PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga obtido por CLAE está representado na Figura 13. Os tempos de retenção se equiparam ao disposto na monografia do produto na Farmacopeia Europeia para ambos os produtos analisados, permitindo a separação entre o produto radiomarcado e a impureza radioquímica.

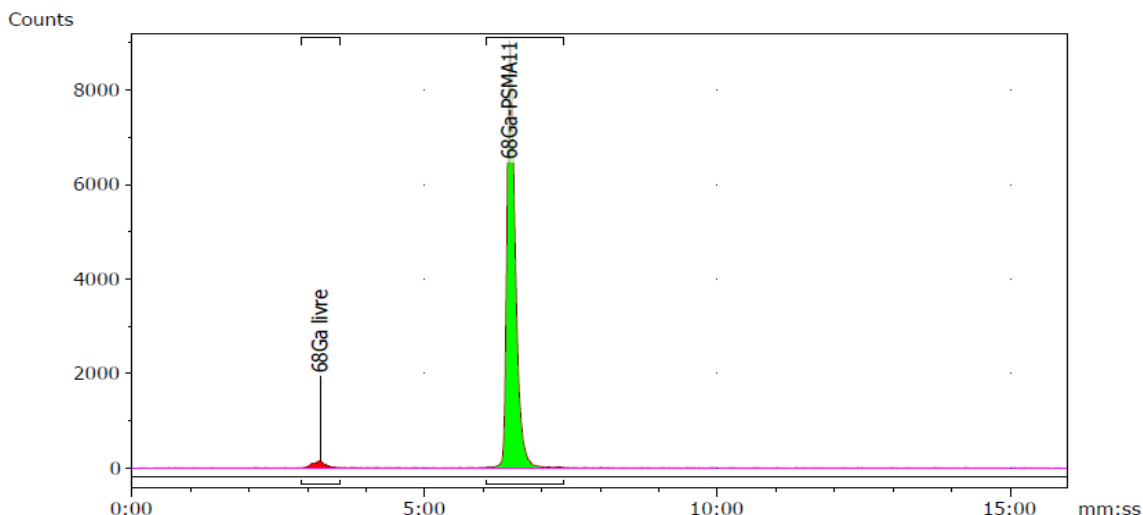


Figura 13: PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga em análise por CLAE utilizando detector de radiação, Coluna XTerra RP8 (4,6 x 150 mm, 5 μm) e gradiente de fase móvel: fase (A), ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v) e Fase móvel (B), ácido trifluoroacético, acetonitrila (1:999 v/v), 95% a 60% de (A) em 10 minutos.

Os perfis de CLAE, segundo método descrito pela Farmacopeia Europeia, demonstraram a capacidade do sistema empregado em separar as espécies radioquímicas de interesse e possibilitaram avaliar a estabilidade do peptídeo radiomarcado.

Os perfis cromatográficos do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga no sistema de CCD escolhido (suporte de ITLC-SG e solvente metanol:acetato de amônio 1 M (v/v) pH 8,5) serão ilustrados nos resultados dos estudos de radiomarcção, na ausência de um padrão do produto.

6.3 Estudos de radiomarcção não-automatizada.

6.3.1 Radiomarcção de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co, Ltd. (Russia), não purificado previamente.

A porcentagem média de pureza radioquímica (%PR) das marcações realizadas com eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co,

Ltd. (Russia), não purificado previamente, resultou valor baixo, de apenas 28% (Tabela 6). O produto final apresentou pH 5.

Tabela 6: Porcentagem média de pureza radioquímica (n=6) das marcações não automatizadas, com uso do eluato sem purificação, com fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC- ⁶⁸ Ga			
Fase móvel	suporte	% PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	28	7,34

As Figuras 14 e 15 ilustram um perfil cromatográfico em CCD e CLAE, respectivamente, da mistura de radiomarcagem utilizando o ⁶⁸GaCl₃ sem purificação prévia.

O sistema de CCD escolhido mostrou-se eficaz na separação das espécies radioquímicas presentes na preparação, uma vez que o ⁶⁸Ga livre permaneceu na origem da fita (R_f = 0), enquanto o PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga migrou com a frente do solvente (R_f = 0,9-1,0).

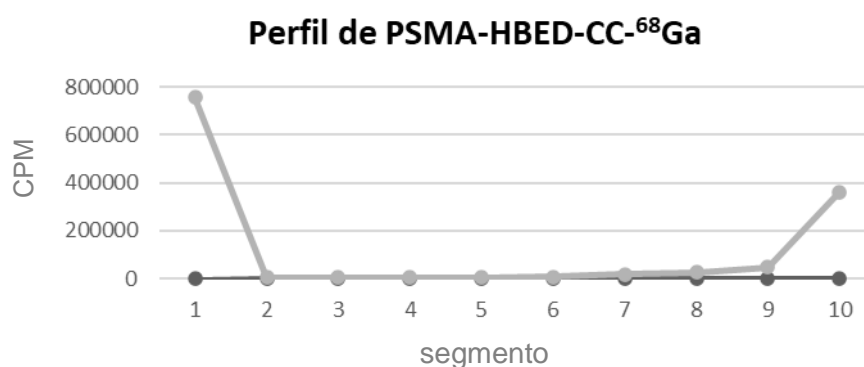


Figura 14: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC marcado com ⁶⁸GaCl₃ não purificado, em fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5.

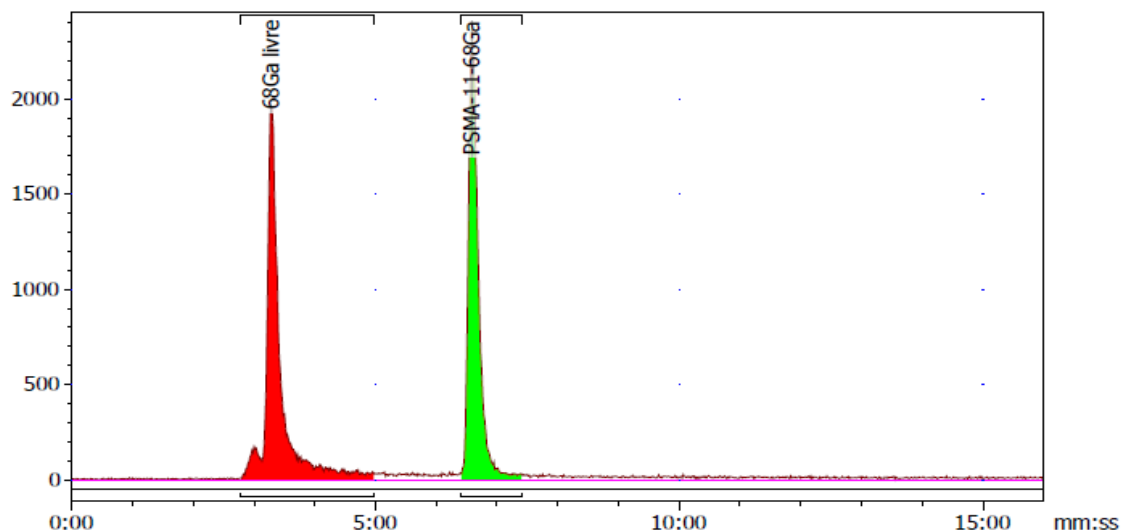


Figura 15: Perfil de CLAE do PSMA-HBED-CC marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ não purificado, utilizando detector de radiação, Coluna XTerra RP8 (4,6 x 150 mm, 5 μm) e gradiente de fase móvel: fase (A), ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v) e Fase móvel (B), ácido trifluoroacético, acetonitrila (1:999 v/v), 95% a 60% de (A) em 10 minutos.

Os resultados de pureza radioquímica baixos podem, em uma análise preliminar, estarem provavelmente relacionados à qualidade do eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ utilizado (gerador não-GMP), sugerindo níveis de contaminantes no eluato, incompatíveis com o processo de radiomarcagem do peptídeo. Em condições de excesso de contaminantes químicos e/ou radionuclídeos, os mesmos competem com o gálio na reação de conjugação com o PSMA-HBED-CC, aumentando a concentração de gálio livre no produto final e diminuindo o rendimento da marcação.

6.3.2 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos da marcação de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$, eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia, para remoção de potenciais contaminantes do tipo metais catiônicos.

Tabela 7: Porcentagem média de pureza radioquímica (n=6) das marcações não automatizadas, com purificação prévia do eluato, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga			
Fase móvel	suporte	%PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	81,6	7,35

A Figura 16 ilustra o perfil de CCD correspondente desta condição de radiomarcção.

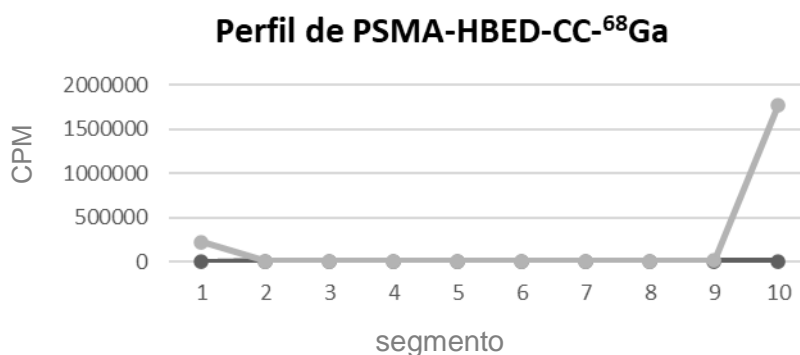


Figura 16: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ previamente purificado, em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5.

Com a purificação prévia do $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), a pureza radioquímica aumentou significativamente, porém os resultados ainda apresentam-se abaixo do critério de aceitação proposto na monografia da Farmacopeia Europeia (> 91%).

A coluna empregada na purificação prévia do eluato do gerador é constituída de resina catiônica, capaz de reter impurezas metálicas como ferro e zinco catiônicos, eventualmente presentes no eluato de geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, que podem competir com o $^{68}\text{Ga}^{+3}$ na ligação com o grupamento quelante do peptídeo. O gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia) não apresenta certificação GMP, tendo sido adquirido, originalmente, para utilização em sínteses automatizadas de radiofármacos marcados com galio-68, que promovem purificação prévia do eluato do gerador e ainda a purificação final do peptídeo radiomarcado. Neste caso, o eluato deste tipo de gerador mostrou-se inviável para marcação direta do PSMA-HBED-CC, ainda que previamente purificado em resina catiônica.

A solução final do produto marcado também apresentou leve turvação, que pode representar impacto na pureza radioquímica da marcação.

6.3.3 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia e filtração final.

A presença de turvação na mistura de marcação de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia), com purificação prévia, sugeriu a formação de espécies hidrolisadas de ^{68}Ga na mistura de marcação. A filtração da mistura de marcação em membrana de poro 0,22 μm resultou uma solução límpida. Os resultados de pureza radioquímica após a filtração aumentaram para valores que atendem ao critério de aceitação da Farmacopeia Europeia (>91%) (Tabela 8). O produto final manteve-se com pH 5.

Tabela 8: Porcentagem média de pureza radioquímica (n=6) das marcações não automatizadas, com $^{68}\text{GaCl}_3$ purificado com cartucho catiônico e a mistura de marcação filtrada em membrana filtrante 0,22 μm , em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga			
Fase móvel	suporte	%PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	92,5	1,33

A Figura 17 ilustra o perfil em CCD desta condição estudada.

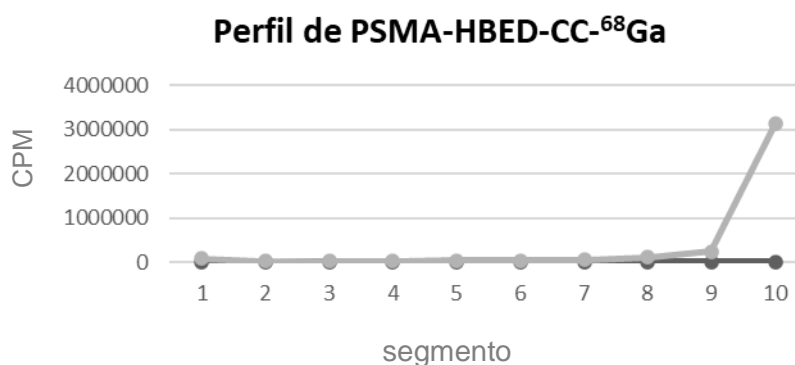


Figura 17: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ previamente purificado com cartucho catiônico com posterior filtração em membrana filtrante 0,22 μm do produto marcado, em corrida de fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5.

6.3.4 Radiomarcção não automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha).

Com a utilização do eluato proveniente de um gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ da empresa ITG, de qualidade GMP, obteve-se incremento na pureza radioquímica do produto, quando comparada com a marcação com o eluato do

gerador não GMP, alcançando valores que, em média, atenderam ao critério de aceitação da Farmacopeia Europeia, sem a necessidade de purificação do eluato e/ou filtração do produto marcado (Tabela 9).

Tabela 9: Porcentagem média de pureza radioquímica (n=3) das marcações não automatizadas empregando eluído do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), com fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga			
Fase móvel	suporte	%PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	91	1,52

A Figura 18 ilustra o perfil em CCD desta condição estudada.

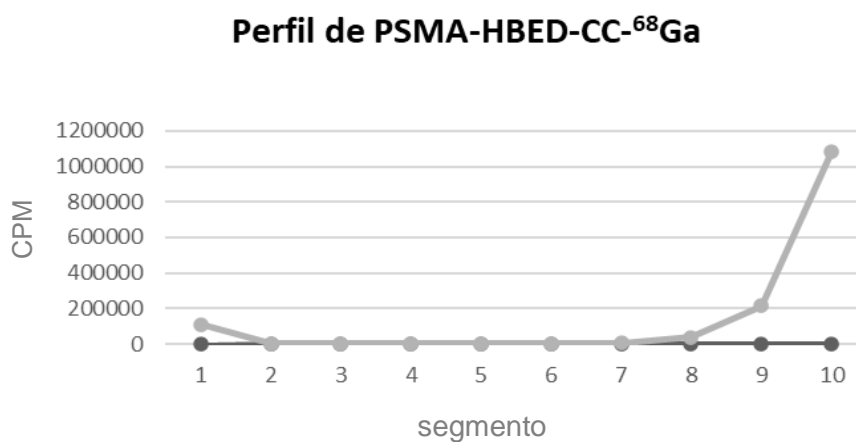


Figura 18: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), em corrida de fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5.

O produto final apresentou pH 5,5, devido a solução eluente deste gerador ser de concentração molar menor (HCl 0,05 M) do que a solução utilizada no gerador do fabricante Cyclotron & Co (HCl 0,1 M).

As marcações realizadas com o gerador da ITG foram avaliadas quanto à estabilidade por período de 4 horas após a radiomarcagem, mantidas à temperatura ambiente. Os resultados demonstram a estabilidade do produto radiomarcado (Tabela 10 e Figura 19), não apresentando alteração significativa na pureza radioquímica quando em comparação com os resultados de controle imediato, sugerindo que o produto pode ser utilizado em até 4 horas.

Tabela 10: Porcentagem média de pureza radioquímica (n=3) das marcações não automatizadas empregando eluído do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), após 4 horas da radiomarcagem com fase móvel metanol:acetato de amônia 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC-^{68}Ga			
Fase móvel	suporte	%PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	92,3	0,57

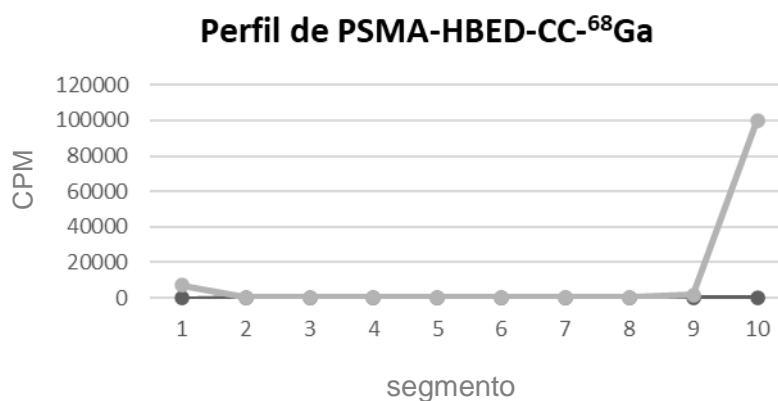


Figura 19: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), após 4 horas da radiomarcagem, em corrida de fase móvel metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5.

6.3.5 Radiomarcção não automatizada de kit liofilizado de PSMA-HBED-CC da empresa POLATOM, com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha).

Um único kit liofilizado de PSMA-HBED-CC da empresa POLATOM foi radiomarcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante ITG (Alemanha). A Tabela 11 apresenta o resultado da marcação, com o desvio padrão da triplicata das fitas cromatográficas empregadas no controle.

Tabela 11: Porcentagem de pureza radioquímica (fitas em triplicata) da marcação não automatizada, realizada com o Kit da POLATOM, empregando eluído do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), em fase móvel metanol:acetato de amônio 1M (v/v) pH 8,5, em suporte ITLC-SG.

PSMA-HBED-CC-^{68}Ga			
Fase móvel	suporte	%PR	Desvio Padrão
Metanol:acetato de amônia	ITLC-SG	97,2	0,21

A marcação apresentou resultado de porcentagem de pureza radioquímica satisfatório e bem acima do critério de aceitação estabelecido na Farmacopeia Europeia. A qualidade GMP do eluato utilizado certamente contribuiu para o resultado obtido. Comparando-se este resultado com o resultado obtido para a marcação da formulação proposta neste trabalho com o eluato do mesmo gerador, pode-se supor que a diferença de pH final (pH 5,0 na marcação do kit da POLATOM e pH 5,5 na formulação proposta) possa ter contribuído para a melhor performance do kit comercial, além de mostrar estabilidade em meio ácido.

Lamentavelmente, as restrições, neste trabalho, decorrentes da obtenção de eluatos do gerador ITG, advindos de Instituição clínica colaboradora, impediram avaliar a influência da variação do pH na pureza radioquímica da preparação. Tal estudo deverá ser realizado em estudo futuro, a partir da aquisição pelo IPEN de um gerador da marca ITG.

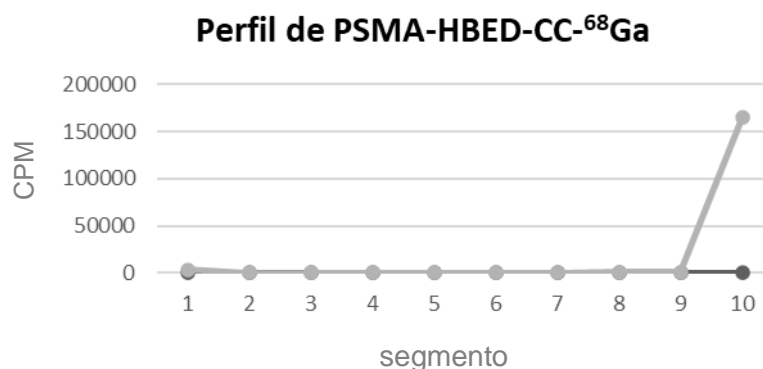


Figura 20: Perfil de CCD/ITLC-SG do PSMA-HBED-CC (kit POLATOM) marcado com $^{68}\text{GaCl}_3$ proveniente do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), em corrida de fase móvel metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5.

6.3.6 Radiomarcção automatizada de PSMA-HBED-CC com $^{68}\text{GaCl}_3$ eluído do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ do fabricante Cyclotron & Co (Russia).

Na marcação de PSMA-HBED-CC com galio-68 em módulo de síntese automatizado (Eckert-Ziegler), o eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ é obtido de forma automatizada. O módulo emprega cassete acoplado, que consiste em um sistema de dutos de transferência, cassetes de purificação e frascos como o frasco de reação, frasco para coleta de rejeito e frasco para a armazenagem do produto purificado. Durante a operação de marcação, comandada por um software do equipamento, o eluato do gerador passa por um cartucho de purificação (coluna catiônica) e é recuperado através de solução de acetona ácida ultrapura para o frasco de reação, contendo o peptídeo tamponado. Ao final do processo de radiomarcção, o produto é purificado para remover o galio-68 livre e filtrado em membrana esterilizante 0,22 μm , garantindo a obtenção de um produto final com alta pureza radioquímica, e rendimento da ordem de 70 a 80% (Alcarde, 2016)

O cromatograma obtido por CLAE (Figura 21) demonstra a eficiência do sistema de purificação da síntese automatizada, apresentando um único pico correspondente ao peptídeo radiomarcado. Entretanto, o rendimento da

marcação se torna menor em relação ao que ocorre na marcação direta da formulação do kit, para a qual a atividade radioativa inserida no frasco de marcação é perdida apenas pela constante de decaimento do radionuclídeo.

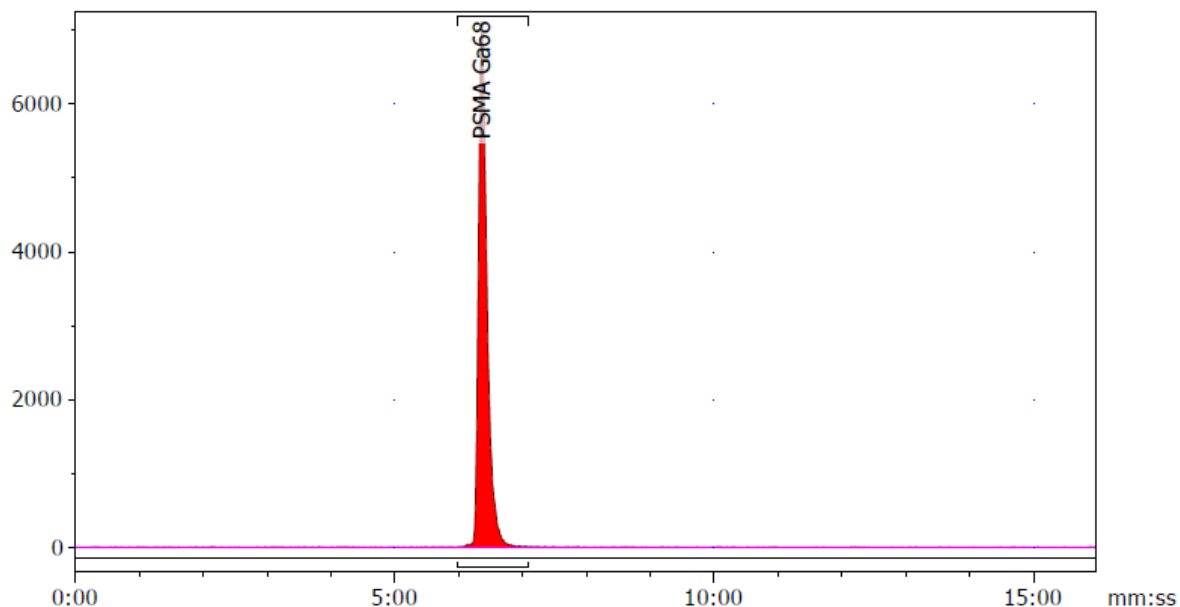


Figura 21: Perfil de CLAE do PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga radiomarcado em módulo de síntese automatizado, utilizando detector de radiação, Coluna XTerra RP8 (4,6 x 150 mm, 5 µm) e gradiente de fase móvel: fase (A), ácido trifluoroacético:água para cromatografia (1:999 v/v) e Fase móvel (B), ácido trifluoroacético, acetonitrila (1:999 v/v), 95% a 60% de (A) em 10 minutos.

6.4 Controle radionuclídico – Teste de identidade e pureza radionuclídica

Os ensaios de identidade e pureza radionuclídica foram realizados no eluato dos geradores de ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga. De acordo com a Farmacopeia Europeia, no ensaio de identidade radionuclídica deve-se observar os picos de 511 KeV e 1077 KeV e o eventual pico de 1022 KeV. O tempo de meia vida físico observado deve estar entre 62 e 74 min. Quanto à pureza radionuclídica, permite-se valores de ⁶⁸Ge de até 0,001%. A Tabela 12 ilustra os resultados

dos ensaios de identidade e pureza radionuclídica nos eluatos de gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ dos fabricantes Cyclotron & Co e ITG.

Tabela 12: Valores obtidos nas análises de identidade e pureza radionuclídica do eluato de gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ dos fabricantes Cyclotron & Co e ITG.

Ensaio	Critério (F.E. 9.0)*	Resultados Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Cyclotron & Co	Resultados Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG
Identidade radionuclídica	Presença de picos de 511 KeV e 1077 KeV e eventual pico de 1022 KeV.	Observado pico de 511 KeV e 1077 KeV. O pico de 1022 KeV não foi observado.	Observado pico de 511 KeV e 1077 KeV. O pico de 1022 KeV não foi observado.
	Tempo de $\frac{1}{2}$ vida física entre 62 e 74 min.	63 minutos	NR
Pureza radionuclídica	% de ^{68}Ge e outras impurezas radionuclídicas $\leq 0,001$	0,058 %	0 %
pH	≤ 2	1,0	1,5
Metais**	Ferro: máximo 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ Zinco: máximo 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	Não informado no site do fabricante	Fe $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Nb $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Cu $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Ni $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Ga-69 $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Pb $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ Zn $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$

* Critérios para a solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ para radiomarcção, conforme Farmacopeia Europeia 9.0

** Para o gerador ITG os resultados foram informados pelo fabricante - acesso em http://radiomedix.com/wp-content/uploads/ITG_Ge68Ga68-Generator_160830_V2.0.pdf

NR = Não realizado

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, o eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ da empresa Cyclotron & Co (Russia) apresenta porcentagem de ^{68}Ge fora da especificação farmacopeica, indicando que o

mesmo não poderia ser empregado em marcações de kits de forma direta, sem prévia purificação. Este conteúdo de ^{68}Ge explica, em parte, a baixa pureza radioquímica obtida na marcação do PSMA-HBED-CC, sem prévia purificação do eluato deste gerador.

No ensaio de pureza radionuclídica no eluato do gerador da empresa ITG, não foi observada a presença de ^{68}Ge na amostra.

Os valores limites de impurezas metálicas para o gerador da ITG, conforme informados pelo fabricante, atendem ao critério de aceitação da monografia do cloreto de galio-68 da Farmacopeia Europeia, estabelecidos particularmente para ferro e zinco. O fabricante Cyclotron & Co não informa critérios para contaminantes metálicos no eluato do gerador. Análises prévias realizadas pelo IPEN para análise de recebimento de geradores deste fornecedor revelaram conteúdos de contaminantes metálicos que não atenderam aos critérios de aceitação farmacopeicos, particularmente para o conteúdo de zinco, e em eluatos obtidos de geradores que permaneciam tempo superior a 48 horas sem eluição. A presença de contaminantes metálicos em limites que excedem as especificações farmacopeicas certamente contribuiriam para os resultados insatisfatórios de pureza radioquímica observados nas marcações empregando eluato do gerador do fabricante Cyclotron & Co, em procedimentos de marcação direta.

O eluato de geradores de galio-68 deve atender às especificações de qualidade estabelecidas na monografia do compêndio oficial para que possa ser empregado em procedimento de marcação direta de kits, na forma “pronto para uso”, apresentando características de esterilidade e atendendo aos limites de endotoxinas bacterianas.

Geradores não GMP podem ser utilizados como matéria prima na síntese de moléculas marcadas com galio-68, porém empregando-se módulos de síntese automatizados, que realizam a purificação prévia do eluato do gerador e ainda a purificação e filtração esterilizante do radiofármaco ao final do processo de síntese.

A automatização dos procedimentos de purificação constitui-se na principal vantagem da síntese de radiofármacos de galio-68 empregando-se módulos de síntese. Entretanto, a tal vantagem contrapõe-se o menor

rendimento do processo de síntese, o custo elevado dos consumíveis (cassetes) empregados nas sínteses automatizadas.

Por outro lado, a proposta de marcação direta de kits consolida-se pelo maior rendimento de utilização do galio-68 e maior praticidade na rotina de radiomarcação, porém exige a utilização de gerador com qualidade GMP.

6.5 Ensaio *in vivo*

6.5.1 Ensaio de biodistribuição em animais sadios

Os ensaios de biodistribuição em animais fazem parte dos estudos pré-clínicos do radiofármaco em desenvolvimento, aumentando a segurança e a eficácia do produto antes de ser testado em organismo humano. Estes ensaios demonstram o comportamento do radiofármaco no organismo estudado.

Os gráficos apresentados nas Figuras 22 e 23 e Tabela 12 e 13 indicam, de acordo com os tempos estudados, a biodistribuição do produto, em porcentagem da atividade administrada por grama (%AI/g) e porcentagem da atividade administrada por órgão ou tecido (%AI).

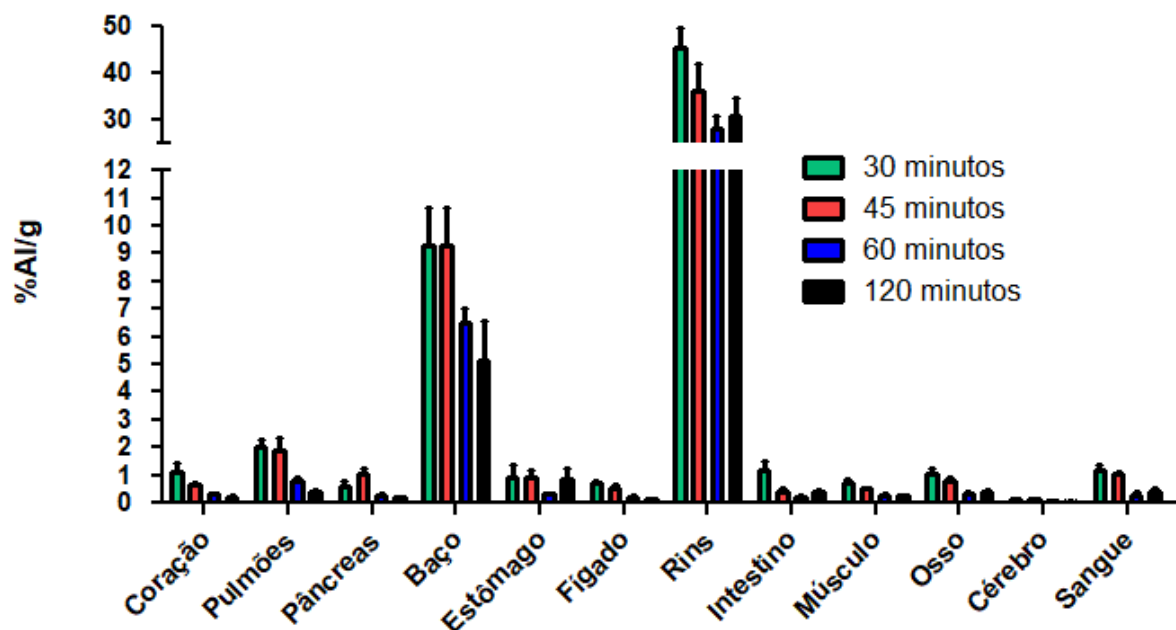


Figura 22: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos BALB/c sadios representando %AI/g de órgão ou mL de sangue em relação ao tempo (30, 45, 60 e 120 minutos).

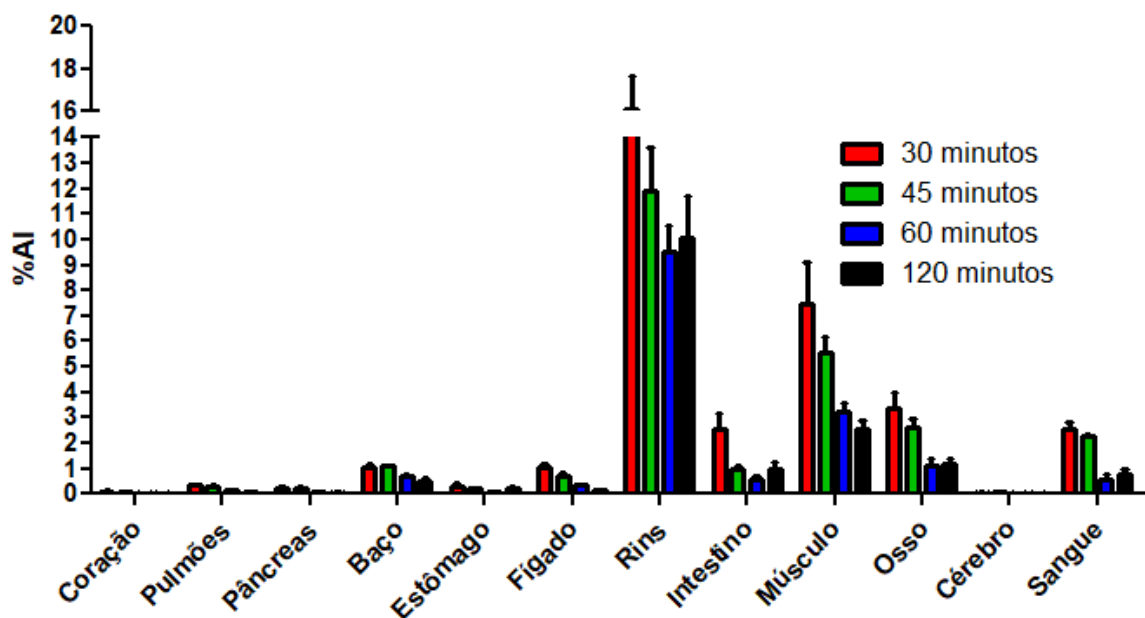


Figura 23: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos BALB/c sadios (n=5) representando %AI por órgão e total de sangue, músculo e osso, em relação ao tempo (30, 45, 60 e 120 minutos).

Tabela 13: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos BALB/c sadios: Média %AI/g órgão ou mL de sangue (n=5).

Órgão	30 minutos	45 minutos	60 minutos	120 minutos
	Média %AI/g	Média %AI/g	Média %AI/g	Média %AI/g
Coração	1,08 ± 0,81	0,65 ± 0,18	0,31 ± 0,12	0,24 ± 0,05
Pulmões	2,05 ± 0,55	1,89 ± 0,82	0,80 ± 0,29	0,41 ± 0,10
Pâncreas	0,47 ± 0,44	1,06 ± 0,35	0,29 ± 0,09	0,20 ± 0,06
Baço	9,28 ± 3,12	6,21 ± 5,54	6,50 ± 1,21	3,84 ± 3,27
Estômago	0,75 ± 0,85	0,63 ± 0,58	0,33 ± 0,03	0,86 ± 0,77
Fígado	0,72 ± 0,20	0,52 ± 0,19	0,22 ± 0,05	0,11 ± 0,06
Rins	45,32 ± 9,05	36,21 ± 10,12	16,91 ± 8,99	23,18 ± 16,37
Intestino	1,20 ± 0,66	0,41 ± 0,18	0,23 ± 0,10	0,40 ± 0,18
Músculo	0,73 ± 0,32	0,51 ± 0,08	0,30 ± 0,07	0,25 ± 0,06
Osso	0,64 ± 0,62	0,82 ± 0,23	0,34 ± 0,18	0,28 ± 0,21
Cérebro	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,07	0,06 ± 0,04	0,04 ± 0,01
Sangue	0,80 ± 0,71	0,65 ± 0,59	0,28 ± 0,21	0,29 ± 0,29

Tabela 14: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos BALB/c sadios: Média %AI/órgão ou sangue total (n=5).

Órgão	30 minutos	45 minutos	60 minutos	120 minutos
	Média %AI	Média %AI	Média %AI	Média %AI
Coração	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Pulmões	0,34 ± 0,11	0,28 ± 0,14	0,12 ± 0,05	0,05 ± 0,01
Pâncreas	0,17 ± 0,17	0,24 ± 0,12	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Baço	1,03 ± 0,35	0,74 ± 0,64	0,67 ± 0,22	0,34 ± 0,30
Estômago	0,23 ± 0,27	0,13 ± 0,12	0,09 ± 0,04	0,20 ± 0,17
Fígado	1,01 ± 0,29	0,72 ± 0,20	0,32 ± 0,04	0,14 ± 0,07
Rins	16,12 ± 3,37	11,93 ± 2,92	5,69 ± 5,36	7,57 ± 5,53
Intestino	2,57 ± 1,38	0,95 ± 0,28	0,56 ± 0,26	0,96 ± 0,52
Músculo	7,47 ± 3,61	5,52 ± 1,12	3,24 ± 0,73	2,52 ± 0,74
Osso	2,01 ± 1,99	2,61 ± 0,64	1,09 ± 0,60	0,86 ± 0,67
Cérebro	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Sangue	1,70 ± 1,49	1,31 ± 1,20	0,59 ± 0,44	0,56 ± 0,53

Os estudos de biodistribuição mostraram um clareamento sanguíneo rápido do radiofármaco, o que auxiliou na diminuição da captação de órgãos como intestino e baço, onde se esperava que ocorresse uma captação mais elevada, devido às características lipofílicas do radiofármaco.

Órgãos que não expressam receptores PSMA apresentaram baixa captação e também rápida eliminação.

Pulmões, baço e rins apresentaram maior captação do radiofármaco devido à elevada expressão de receptores PSMA. Intestino e fígado apresentaram captação moderada, devido a menor proporção de receptores PSMA nestes órgãos.

A captação moderada observada nos ossos pode ser explicada pela sua afinidade pelo ^{68}Ga livre, através de processos de acumulação, porém, observa-se que a eliminação também ocorreu de forma rápida. Este parâmetro permite avaliar, em paralelo, a estabilidade biológica do radiofármaco. Além de osso, o ^{68}Ga em sua forma livre possui afinidade por pulmões, fígado, baço e rins. (Velikyan et al, 2013)

De acordo com os dados apresentados, observa-se que os rins apresentam a maior captação dentre os órgãos avaliados, no tempo de 30 minutos, decrescendo significativamente ao longo dos demais tempos estudados. Tal captação é atribuída à eliminação do radiofármaco através do sistema urinário. Resultados de estudos de biodistribuição de PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga em animais encontrados em literatura corroboram os resultados obtidos nestes estudos. (Eder et al, 2012; Schafer et al, 2012)

Para fins de comparação, estudos *in vivo*, encontrados em literatura, a partir da administração do radiofármaco, apresentaram captação moderada em fígado, intestino e baço. Rins e glândulas salivares apresentaram captação elevada. (Afshar et al, 2015).

A curva de clareamento sanguíneo obtida no ensaio de biodistribuição (Figura 24) a partir dos dados de %AI de sangue total, demonstra a eliminação rápida do radiofármaco.

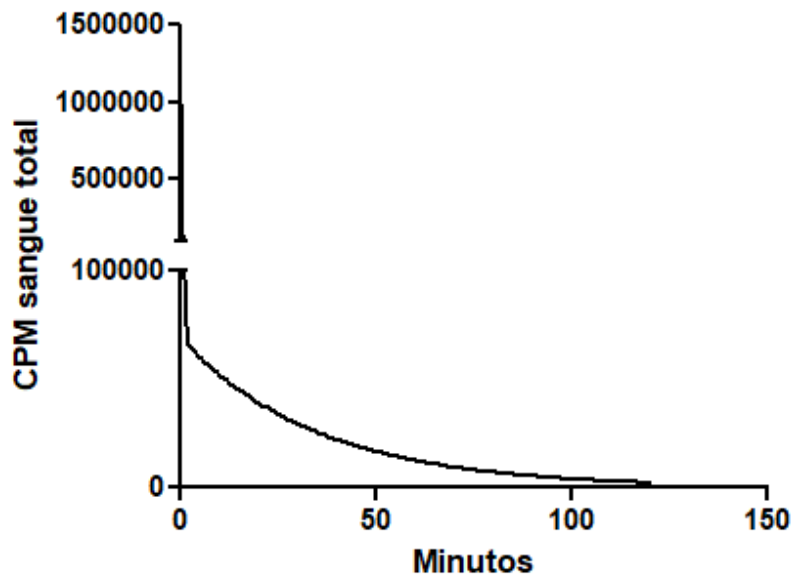


Figura 24: Curva de clareamento sanguíneo do radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga (CPM de sangue total) em animais saudios (camundongos BALB/c, n=5)

Observa-se um clareamento sanguíneo quase completo com 60 minutos após a administração do radiofármaco, o que era esperado, de acordo com dados encontrados em literatura. (Alcarde, 2016)

Além disso, o ⁶⁸Ga em sua forma química catiônica possui elevada afinidade pela transferrina sérica. O clareamento sanguíneo rápido do composto inibe a metabolização do mesmo, evitando a liberação do ⁶⁸Ga e sua ligação à transferrina e outras proteínas carreadoras de ferro. (Velikyan et al, 2013)

A partir da curva de clareamento sanguíneo, obtiveram-se parâmetros farmacocinéticos importantes para a compreensão do comportamento do fármaco em sistema biológico, apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos BALB/c sadios (n=5).

Parâmetros	Símbolo	Valor
Constante de distribuição	α	$\sim 2,915 \text{ min}^{-1}$
Constante de eliminação	β	$0,02857 \text{ min}^{-1}$
Tempo de meia-vida da fase rápida ou distributiva	$t_{1/2} \alpha$	$\sim 0,2378 \text{ min}$
Tempo de meia-vida de fase lenta ou de eliminação	$t_{1/2} \beta$	24,26 min
Clareamento sanguíneo	CL	$0,061 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Volume de distribuição	Vd	2,14 mL

A meia-vida biológica representa o período em que o fármaco é eliminado do sistema biológico em 50%. Este valor é estimado a partir do cálculo representativo de volume de distribuição (Vd) e de depuração (CL), parâmetros que reproduzem a fisiologia do sistema. (Storpirtis et al, 2011)

Os tempos de meia vida curtos das duas componentes da curva de clareamento sanguíneo, aliados ao baixo volume de distribuição encontrado, determinam um tempo de meia vida biológico pequeno para o radiofármaco, pois quanto menor for o volume de distribuição, mais rápido o radiofármaco será eliminado, proporcionando um tempo curto de meia-vida biológica. (Storpirtis et al, 2011) Tais resultados encontrados são condizentes com estudos anteriores de farmacocinética de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga desenvolvidos. (Alcarde, 2016)

Os dados obtidos com a farmacocinética auxiliam nas análises de toxicidade, dosimetria e eficácia do radiofármaco, tanto em organismo saudável quanto patológico. O clareamento sanguíneo e a área sob a curva (ASC) são os fatores matemáticos principais para o conhecimento da farmacocinética do fármaco, já que estão relacionados à dosagem. (Cavalheiro & Comarella, 2016)

6.5.2 Ensaio de biodistribuição em camundongos SCID com crescimento tumoral

Este ensaio de biodistribuição foi desenvolvido com e sem bloqueio de receptor, objetivando confirmar a especificidade do radiofármaco pelos receptores PSMA dos órgãos que os expressam.

As Figuras 25 e 26 e a Tabelas 16 e 17 representam a comparação dos resultados obtidos de acordo com os dois grupos de animais estudados, em %AI/g e %AI.

O tempo de biodistribuição estudado e o tempo esperado para o bloqueio de receptor através da administração de PSMA-HBED-CC não marcado, foram escolhidos com base em literatura onde foi demonstrado que o tempo de 60 minutos após a administração, para este estudo de bloqueio de receptor, é o mais adequado. (Lapi, 2014)

O grupo de animais com administração de PSMA-HBED-CC não marcado mostrou que houve menor captação do radiofármaco nos órgãos que apresentam receptores PSMA e no tumor, confirmando a especificidade de ligação do radiofármaco pelo receptor PSMA.

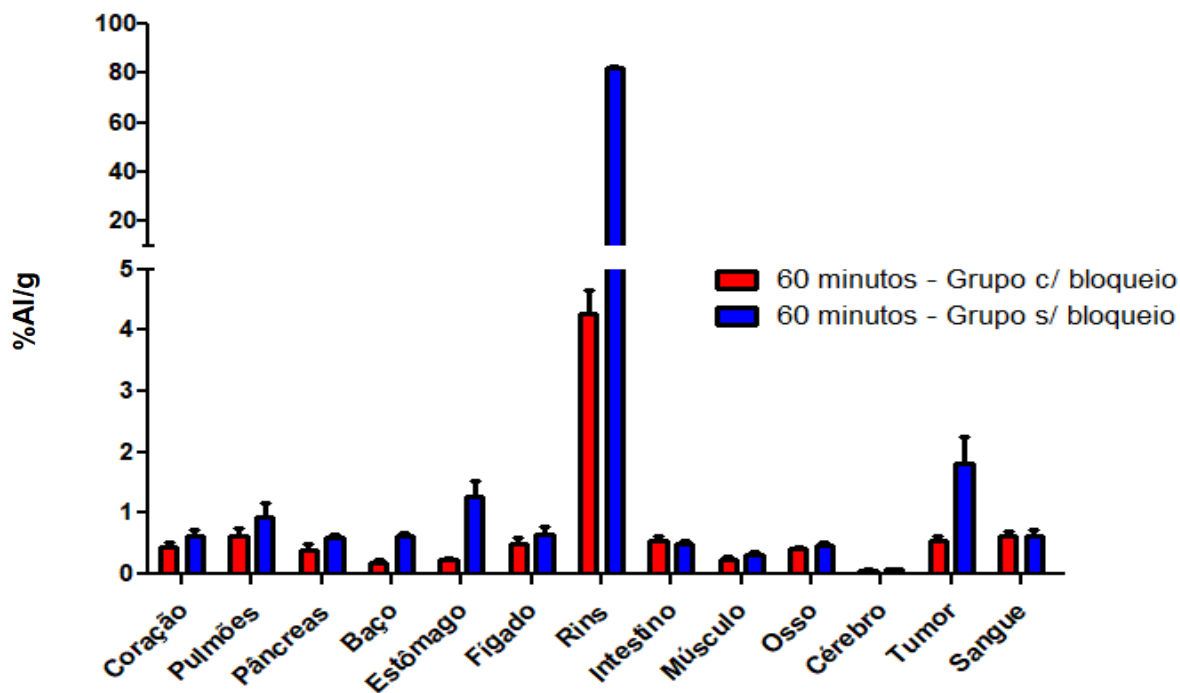


Figura 25: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em camundongos SCID com crescimento tumoral, 60 minutos após a administração do radiofármaco. Grupo de animais com bloqueio de receptor e grupo sem bloqueio de receptor. Valores obtidos em %AI/g de órgão ou mL de sangue.

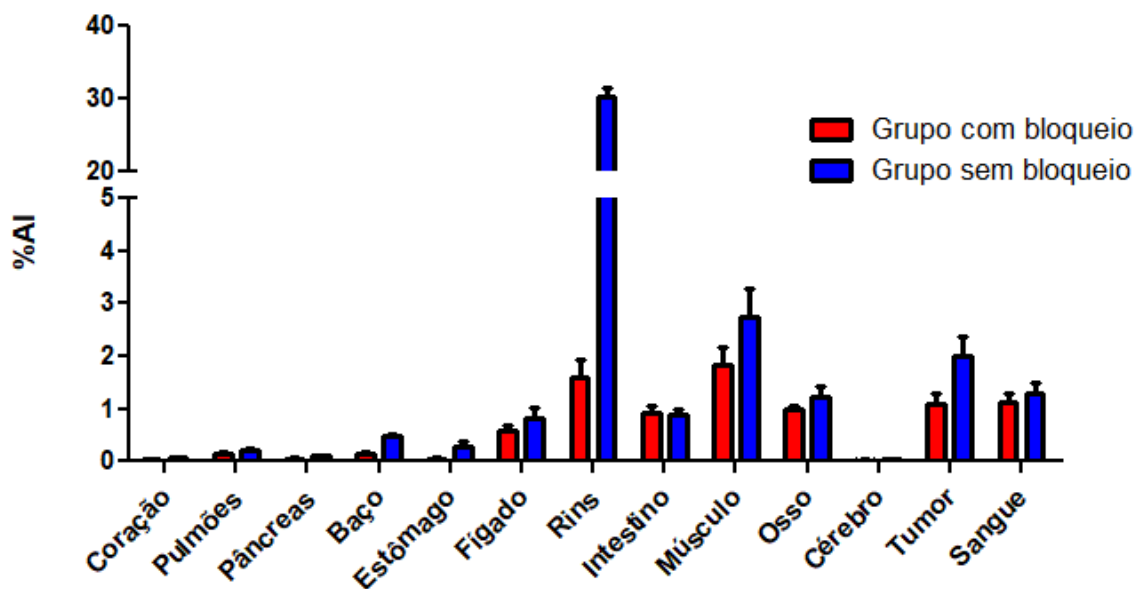


Figura 26: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em animais com crescimento tumoral, 60 minutos após a administração do radiofármaco. Grupo de animais com bloqueio de receptor e grupo sem bloqueio de receptor. Valores obtidos em %AI por órgão ou sangue total.

Tabela 16: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em animais com crescimento tumoral, 60 minutos após a administração do radiofármaco. Grupo de animais com bloqueio de receptor e grupo sem bloqueio de receptor. Valores obtidos em %AI/g de órgão ou mL de sangue.

Órgão	Grupo c/ bloqueio	Grupo s/ bloqueio
	%AI/g	%AI/g
Coração	0,44 ± 0,16	0,62 ± 0,22
Pulmões	0,63 ± 0,34	0,93 ± 0,53
Pâncreas	0,38 ± 0,34	0,59 ± 0,12
Baço	0,20 ± 0,14	0,63 ± 0,10
Estômago	0,25 ± 0,02	1,26 ± 0,63
Fígado	0,50 ± 0,06	0,64 ± 0,30
Rins	4,26 ± 0,79	82,34 ± 0,78
Intestino	0,54 ± 0,27	0,49 ± 0,12
Músculo	0,23 ± 0,70	2,73 ± 1,09
Osso	0,42 ± 0,07	1,23 ± 0,45
Cérebro	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,03
Tumor	0,54 ± 0,29	1,82 ± 0,84
Sangue	0,58 ± 0,21	0,59 ± 0,22

Tabela 17: Biodistribuição de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em animais com crescimento tumoral, 60 minutos após a administração do radiofármaco. Grupo de animais com bloqueio de receptor e grupo sem bloqueio de receptor. Valores obtidos em %AI por órgão.

Órgão	Grupo c/ bloqueio	Grupo s/ bloqueio
	%AI	%AI
Coração	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,03
Pulmões	0,14 ± 0,10	0,22 ± 0,07
Pâncreas	0,05 ± 0,06	0,09 ± 0,02
Baço	0,14 ± 0,11	0,47 ± 0,08
Estômago	0,05 ± 0,02	0,29 ± 0,18
Fígado	0,58 ± 0,04	0,82 ± 0,41
Rins	1,27 ± 1,28	30,40 ± 2,11
Intestino	0,91 ± 0,46	0,88 ± 0,22
Músculo	1,46 ± 0,85	2,73 ± 1,09
Osso	0,79 ± 0,54	1,23 ± 0,45
Cérebro	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
Tumor	1,10 ± 0,51	1,99 ± 0,75
Sangue	0,89 ± 0,36	1,02 ± 0,37

Tais resultados demonstraram que houve o bloqueio de receptor esperado uma vez que os órgãos sadios que expressam receptores PSMA tiveram a captação diminuída com a administração concomitante do PSMA-HBED-CC não marcado.

Órgãos com alta afinidade pelo PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga como baço, pulmões, fígado e principalmente rins, bem como o tumor, tiveram sua captação diminuída com o bloqueio dos receptores de PSMA, podendo ser observada uma diferença significativa, sendo $P < 0,0001$, calculado através do ANOVA (GraphPad Prism 5.0)

De acordo com a literatura, a captação pelos rins se correlaciona com a presença dos enantiômeros do PSMA-HBED-CC quando complexado ao ⁶⁸Ga e as suas formas com diferenças, em maior e menor grau, de afinidade renal. (Alcarde, 2016)

Assim, a alta captação renal obtida com os estudos de biodistribuição sugere a presença de formas enantioméricas do composto, sendo a forma L-PSMA-HBED-CC, dentro dos outros diastereoisômeros possíveis, a que possui maior afinidade pelos rins, apresentando ligação específica significativa. (Eder *et al*, 2012)

Nos resultados, observa-se que mesmo após 120 minutos da administração do radiofármaco há maior captação renal em relação aos outros órgãos, devido à eliminação do composto pela via renal.

6.5.3 Desenvolvimento do modelo tumoral prostático ectópico

Todos os camundongos inoculados com células LNCap (5×10^6 e 10×10^6) apresentaram tumores palpáveis entre 10 a 15 dias após inoculação.

Comprovou-se com este ensaio que as células LNCaP são tumorigênicas. Além disso, observou-se que a inoculação de 5×10^6 células foi adequada para o desenvolvimento tumoral em camundongos, assim como a via de inoculação escolhida.

Tais parâmetros foram utilizados para o desenvolvimento tumoral do ensaio de biodistribuição de animais com tumor.

A Figura 27 apresenta visão microscópica (aumento de 20 vezes) das células LNCaP em cultura. Após a tripsinização, as células foram utilizadas para desenvolvimento do modelo xenogênico, em camundongos SCID.



Figura 27: Análise microscópica de cultura de células LNCaP utilizadas na inoculação dos camundongos SCID para desenvolvimento do modelo tumoral.

A partir da detecção do tumor palpável, deu-se início às medições da massa tumoral com o auxílio de paquímetro digital. Posteriormente, o volume tumoral foi calculado (comprimento x altura²), estando estes apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Volume tumoral medido nos cinco animais inoculados com células LNCaP de 10 a 22 dias após inoculação.

Dias após inoculação	Volume tumoral (mm ³)			
	10 dias	15 dias	18 dias	22 dias
Animal	Vol. Tumor	Vol. Tumor	Vol. Tumor	Vol. Tumor
1	positivo	4297,6	6330,2	10316,2
2	negativo	1932,2	2448,0	5824,7
3	positivo	3591,9	4895,6	5248,2

4	negativo	2631,6	4372,6	7519,6
5	positivo	1383,4	1750,3	3372,0

Após 10 dias da inoculação, alguns tumores ainda não tinham se desenvolvido. Após 15 dias todos os tumores já estavam presentes, permitindo dar início às medições.

Após 22 dias, os tumores já apresentavam tamanhos superiores ao esperado para o ensaio de biodistribuição, sugerindo que o crescimento tumoral adequado ocorre aproximadamente com 15 dias após a inoculação celular. A Figura 28 representa a evolução do crescimento tumoral.

Avaliação do crescimento tumoral em camundongos SCID

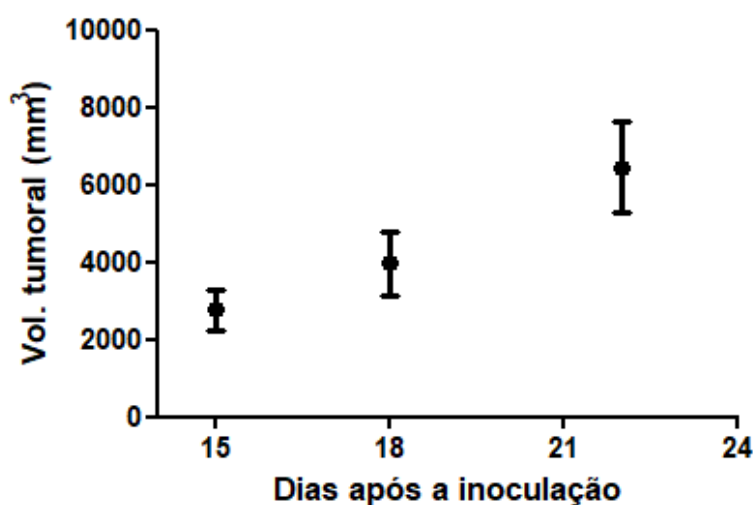


Figura 28: Gráfico de avaliação do crescimento tumoral em camundongos SCID, de acordo com os dias de observação.

6.5.4 Análise histopatológica

Para verificar se os tumores desenvolvidos nos camundongos SCID eram, de fato, constituídos por células tumorais e não advindos de um

processo inflamatório, realizou-se análise histopatológica das peças removidas dos animais.

A figura 29 apresenta a visualização microscópica de um campo representativo de um corte tumoral, com áreas de células em proliferação, áreas de necrose e vasos tumorais.

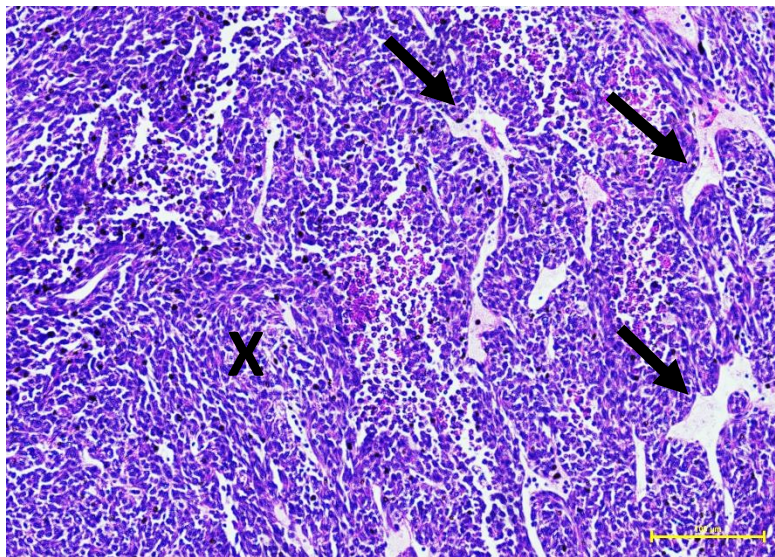


Figura 29: Corte histológico representativo de tumores gerados após a inoculação das células LNCap. Evidenciação de vasos sanguíneos (setas) e processo de necrose tecidual (X). (Ampliação 100x, Nikon Eclipse E600; Nikon;Tokio;Japan).

As Figuras de 30 a 32 mostram os campos citados no fragmento acima em aumento de 400 vezes.

Na Figura 30 verifica-se o pleomorfismo celular e nuclear, achado compatível com área de intensa atividade proliferativa. Além disso, observam-se vasos sanguíneos.

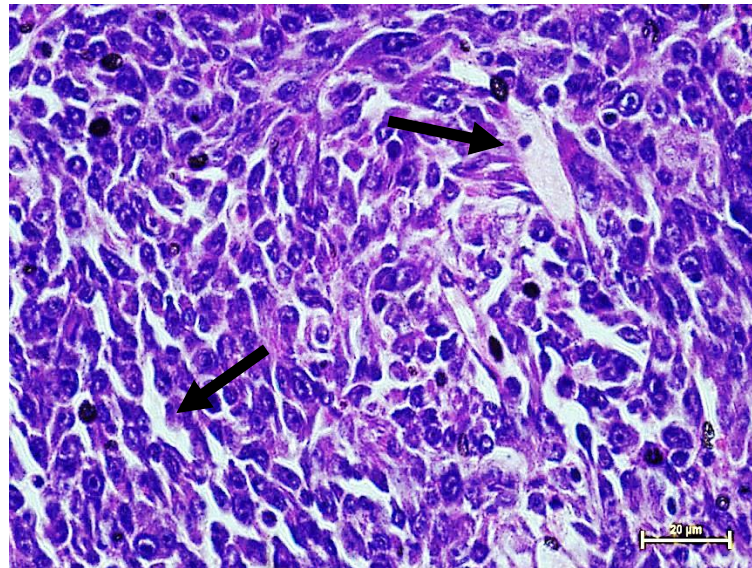


Figura 30: Corte histológico representativo de tumores LNCaP. Células. Evidenciação de vasos sanguíneos (setas). (Ampliação 400x, Nikon Eclipse E600; Nikon;Tokio;Japan)

A Figura 31 evidencia uma área de necrose tecidual. Nesse campo há desagregação da estrutura tumoral decorrente da invasão de macrófagos e granulócitos. Tais populações celulares permanecem parcialmente competentes nos camundongos SCID.

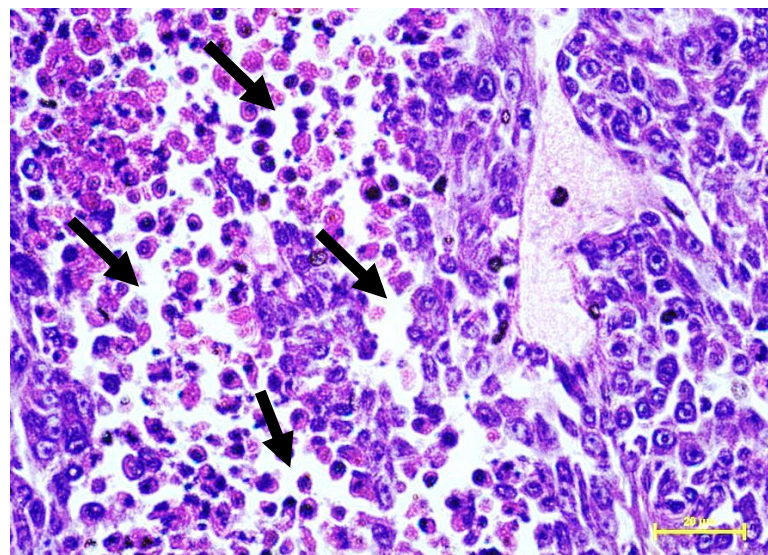


Figura 31: Corte histológico representativo de tumores gerados após a inoculação das células LNCaP. Evidenciação de células necróticas (setas). (Ampliação 40x, Nikon Eclipse E600; Nikon;Tokio;Japan)

Finalmente, a Figura 32 evidencia uma região bastante vascularizada, pleomorfismo celular e nuclear.

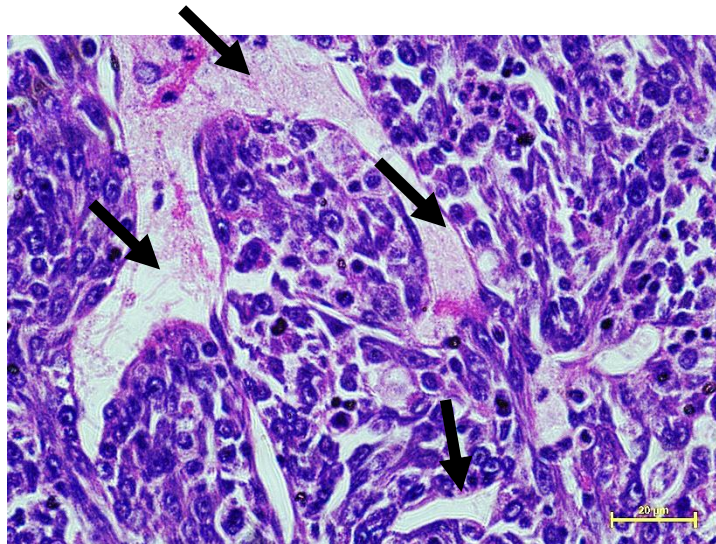


Figura 32: Corte histológico representativo de tumores gerados após a inoculação das células LNCap. Evidenciação de vasos sanguíneos (setas). (Ampliação 400x, Nikon Eclipse E600; Nikon;Tokio;Japan).

Observa-se a presença de pleomorfismo, característico de processo tumoral, com alteração no formato e no tamanho das células. (Zhang et al, 2009) A presença de vasos sanguíneos aparece também em grande evidência.

O processo de necrose tecidual abrange extensa área, o que poderia ser correlacionado a uma redução na captação do radiofármaco pelo tumor, visualizado nos estudos de biodistribuição, conforme resultados anteriormente apresentados.

A análise dos cortes histológicos representados permite concluir, por análise qualitativa, que as células apresentam características tumorais, conforme o esperado para a validação dos ensaios.

6.6 Ensaios *in vitro*

6.6.1 Ensaio de velocidade de ligação

A Figura 33 apresenta o resultado do ensaio de velocidade de ligação, evidenciando que o tempo de 30 minutos apresentou a maior porcentagem de ligação do radiofármaco aos receptores celulares, nas condições experimentais empregadas. Este tempo foi considerado para a realização do ensaio de ligação/saturação.

Ensaio de ligação PSMA-11 em células LNCaP

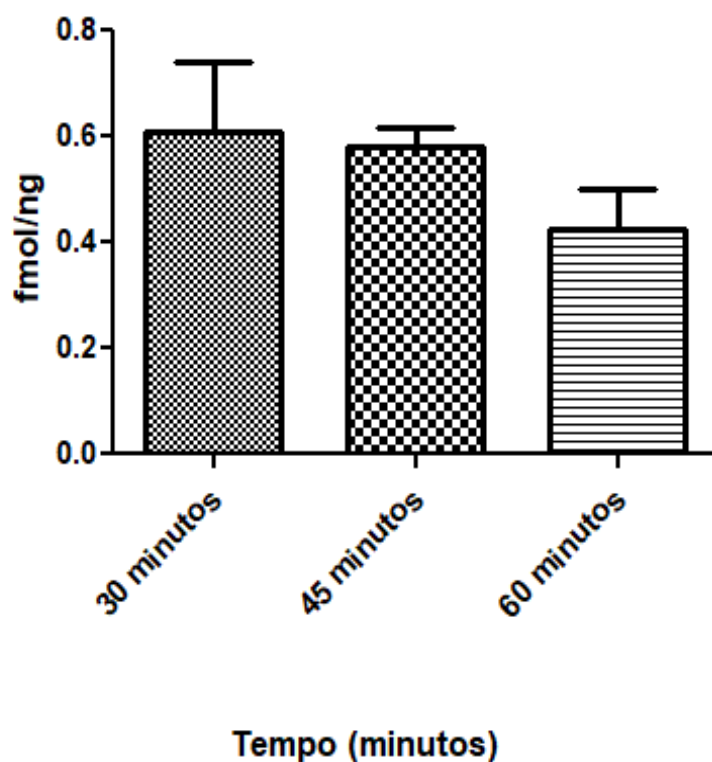


Figura 33: Gráfico de tempo para equilíbrio de ligação de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga em células LNCaP (fmol/ng de proteína LNCaP x tempo)

6.6.2 Ensaio de ligação/saturação

A Figura 34 apresenta o resultado obtido para o ensaio de ligação/saturação. As condições empregadas no estudo demonstraram o aumento da ligação do radiofármaco às células com o aumento da concentração do mesmo.

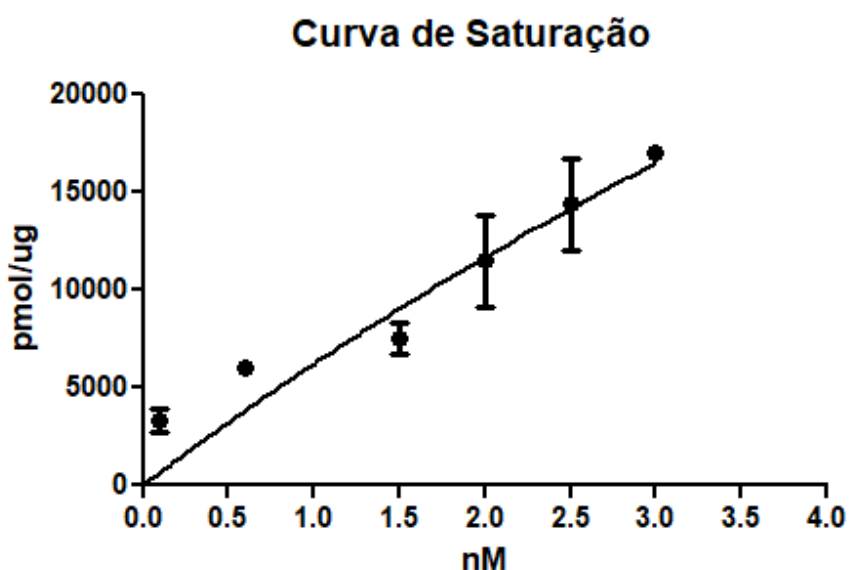


Figura 34: Ensaio de ligação de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga (pmol/ug de proteína x nM) em células LNCaP.

6.6.3 Ensaio de competição

A Figura 35 apresenta o resultado do estudo de competição que demonstrou o bloqueio dos receptores das células tumorais para as concentrações de 0,1 e 2,0 nM (o estudo de competição não foi realizado para a concentração 1,0 nM).

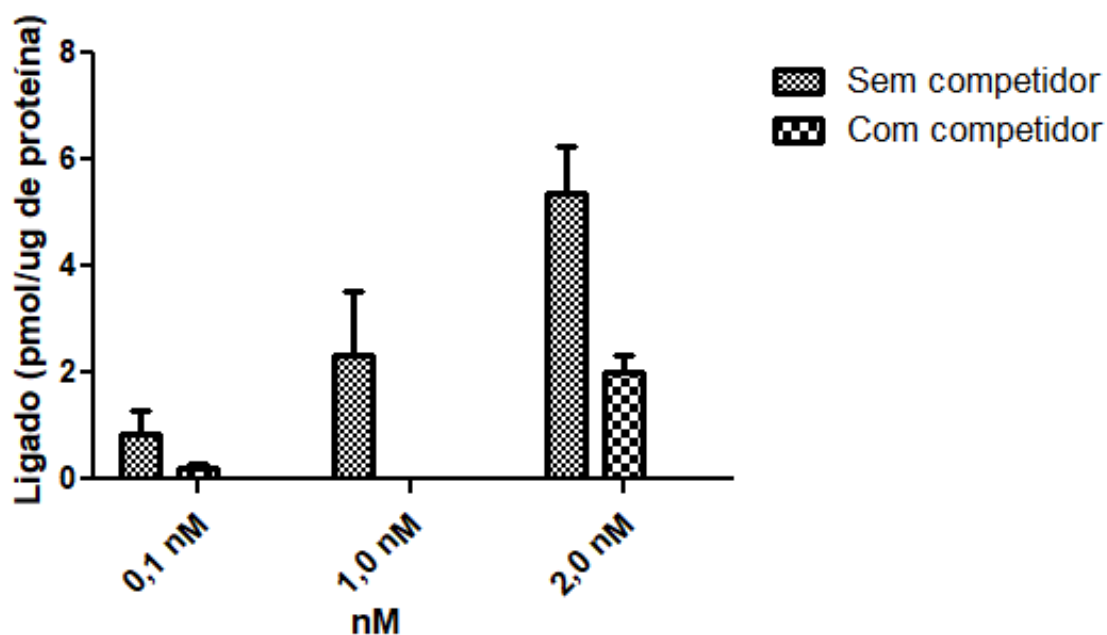


Figura 35: Ensaio de ligação de PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga (pmol/ug de proteína x nM) em células LNCaP sem e com competidor (excesso molar de 10 vezes de PSMA-HBED-CC)

Os resultados dos estudos *in vitro* realizados com o PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga, demonstraram a capacidade de ligação do radiofármaco aos receptores das células tumorais LNCap e evidenciaram a especificidade da ligação, a partir do estudo de competição, que demonstrou bloqueio de receptores superior a 50% no modelo de estudo utilizando excesso molar do peptídeo não radiomarcado.

O resultado do estudo de competição *in vitro* está alinhado com os resultados obtidos no estudo de bloqueio de receptores realizado *in vivo*, demonstrando que os modelos *in vitro* são úteis para avaliar a especificidade de radiofármacos, não envolvendo a utilização de animais e constituem-se em importante ferramenta para o desenvolvimento de radiofármacos.

Entretanto, é preciso considerar que os modelos de estudo *in vivo* fornecem informações importantes, à medida que permitem avaliar outros fatores inerentes à condição de utilização do produto, tais como a distribuição do radiofármaco em órgãos que possuem receptores específicos além do tumor, a ligação à proteínas sanguíneas, a estabilidade do produto *in vivo* e o

aporte sanguíneo da área tumoral, fatores que em conjunto ou isoladamente podem interferir na captação do radiofármaco pelo tumor *in vivo*.

7. CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho possibilitaram obter o radiofármaco PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga por meio de radiomarcção direta, a partir de uma formulação proposta para um kit de marcação, com porcentagem de pureza radioquímica (%PR) que atende ao critério estabelecido pela Farmacopeia Europeia para o produto (> 91%). Resultados satisfatórios de %PR foram alcançados em marcações diretas empregando-se eluato de gerador GMP, demonstrando que a qualidade do eluato interfere diretamente no rendimento da marcação, tornando-se pré-requisito para utilização em processos de marcação direta.

Os estudos de estabilidade desenvolvidos para o produto radiomarcado demonstraram que o mesmo permanece estável por até 4 horas após a radiomarcção, possibilitando sua utilização dentro deste período.

Os resultados sugerem a continuidade deste estudo para obtenção de uma formulação liofilizada de PSMA-HBED-CC, que promoverá estabilidade necessária para comercialização do kit para pronta marcação.

Os resultados dos estudos pré-clínicos realizados em modelos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a especificidade de ligação do radiofármaco por células tumorais com receptores PSMA-específicos e são pré-requisitos para a realização de estudos clínicos que precedem o registro futuro do produto junto ao órgão sanitário regulador.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR-OROMIEH, A. et al. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*. v. 7, p. 779-796, 2014

AFSHAR-OROMIEH, A. et al. Comparison of PET imaging with a ⁶⁸Ga-labelled PSMA ligand and ¹⁸F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 42, p. 197 – 209, 2015

AFSHAR-OROMIEH, A., et al. Diagnostic performance of 68Ga-PSMA-11 (HBED-CC) PET/CT in patients with recurrent prostate cancer: evaluation in 1007 patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 44, p. 1258, 2017.

ALCARDE, L. Estudo de radiomarcção com Gálio-68 do inibidor de PSMA baseado em ureia – avaliação comparativa de método automatizado e não automatizado. *Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares*. 2016.

AL-MOMANI, E., et. al. Validation of a [Al18F]PSMA-11 preparation for clinical applications. *Applied Radiation and Isotopes*, v.130, p. 102-108, 2017.

American Cancer Society – **Cancer Statistics, 2019**. CA CANCER J CLIN 2019; v. 69 p.7–34, 2019.

AMORIM, V. et al. Fatores associados à realização dos exames de rastreamento para o câncer de próstata: um estudo de base populacional. *Cadernos de Saúde Pública*. v.27, n.2, p.347-356, 2011.

ANTUNES, A. O papel dos genes do pepsinogênio C (PGC) e do Antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) no diagnóstico do câncer de próstata. *Tese de Doutorado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 2008

AVERBECK et. al., Diagnóstico e tratamento da hiperplasia benigna da próstata. *AMRIGS*, Porto Alegre, v. 54 (4): p. 471-477, out.-dez. 2010

BANERJEE, S. R.; PULLAMBHATLA, M.; BYUN, Y.; NIMMAGADDA, S.; GREEN, G.; FOX, J. J.; HORTI, A.; MEASE, R. C.; POMPER, M. G. ⁶⁸Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J Med Chem*, v. 53, n. 14, p. 5333-5341, 2010.

BARTHOLOMA, M. Recent developments in the design of bifunctional chelators for metal-based radiopharmaceuticals used in Positron Emission Tomography. *Inorganica Chimica Acta*, v.389, p.36-51, 2012.

CARDINALE, J. et. al. Preclinical Evaluation of ¹⁸F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. **J. Nucl. Med**, v. 58(3), p.425-431, 2017.

CAROLI, P, et al. ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT in patients with recurrent prostate câncer after radical treatment: prospective results in 314 patients. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 45, p. 2035-2044, 2018.

CAVALHEIRO, A., COMARELLA, L. Farmacocinética: modelos e conceitos – uma revisão de literatura. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n.5, 2016.

CIMADAMORE, A., et. al. Efficacy, Predictive Factors, and Prediction Nomograms for ⁶⁸Ga-labeled Prostate-specific Membrane Antigen–ligand Positron-emission Tomography/Computed Tomography in Early Biochemical Recurrent Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. **Eur Urol**, v. 73, p.656–61, 2018.

CUCCURULO, V. Nuclear medicine in prostate cancer: A new era for radiotracers. **World J Nucl Med**, v.17, p.70-78, 2018.

CUNHA, S. Avaliação do Potencial Clínico de Novos Ligandos para o Receptor Estrogénico em Diagnóstico e Terapia de Tumores da Mama. **Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa**. 2015.

DIETLEIN, M. Comparison of [¹⁸F]DCFPyL and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-HBED-CC for PSMA-PET Imaging in Patients with Relapsed Prostate Cancer. **Molecular Imaging and Biology**, v. 17, p. 575–584, 2015.

EDER, M., et al. ⁶⁸Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. **Bioconjugate Chem.**, v. 23, p. 688-697, 2012.

EDER, M.; et. al., Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals 2014**, v.7, p.779-796, 2014.

EMMETT, L., et. al. Prospective evaluation of ⁶⁸Gallium-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate câncer, v. 119, 2017.

GLOBOCAN - Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA CANCER J CLIN 2018**, v. 0, p. 1–31, 2018.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2019. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp?ID=5>>. Acesso em: 15 set. 19.

ITG. Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Disponível em:
<<http://radiomedix.com/galliumgenerators/>>. Acesso em 20 set. 19.

IThemba - Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Disponível em:
<http://tlabs.ac.za/?page_id=294>. Acesso em 10 out. 19.

IRE ELiT – Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Disponível em: <<https://www.ire.eu/our-activities/radiopharmaceutical-products>>. Acesso em 10 out. 19.

KOPKA, K., et. al., ^{68}Ga -PSMA PET/CT: Joint EANM and SNMMI procedure guideline for prostate cancer imaging: version 1.0. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 44, p.1014–1024, 2017.

Gallium (^{68}Ga) PSMA 11 injection, **Farmacopeia europeia**, 2018.

GREEN, M. A.; WELCH, M.J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. **J. Nucl. Med. Biol.**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1989.

HABERKORN, U. et al., New Strategies in Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Ligands for Diagnosis and Therapy. **Clin Cancer Res.**, v. 22, p. 9-15, 2016.

HOPE TA, Truillet C, Ehman EC, et al. ^{68}Ga -PSMA-11 PET Imaging of Response to Androgen Receptor Inhibition: First Human Experience. **J Nucl Med.**, v. 58, p. 81–84, 2017.

KHAN, M. et. al. Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging. **Eur J Surg Oncol**, 2009.

LAPI, S. et. al. Evaluation of ^{89}Zr -pertuzumab in Breast Cancer Xenografts. **Mol. Pharmaceutics**, v. 11, p. 3988–3999, 2014.

LAPA, C. et al. ^{68}Ga -PSMA-PET/CT in Patients With Biochemical Prostate Cancer Recurrence and Negative ^{18}F -Choline-PET/CT. **Clin Nucl Med. V.** 41(7), p.515–521, 2016.

LEE, R. Prostate Cancer. **Integrative Medicine**. V.4, p. 790-799, 2018.

LIMA, L.; Silva, I.; Alves, D. Investigação e prevalência dos fatores de risco para elevação e desenvolvimento de câncer de próstata e elevação do PSA: uma revisão de literatura. **Revista Interd. Ciên. Saúde**, v. 4, n.1, p. 11-16, 2017

MAECK, H.R. ^{68}Ga -PET Radiopharmacy: A Generator-Based Alternative to ^{18}F -Radiopharmacy. **Ernst Schering Research Foundation Workshop**, vol 64. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.

MALVEZZI, M., et al. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer, **Annals of Oncology**, v. 29, Abril 2018, p. 1016–1022.

NEUMAIER, B.; FANI, M. ^{68}Ga -Radiopharmaceuticals. In: WESTER, H. J. Munich Molecular Imaging Handbook Series: **Pharmaceutical Radiochemistry (I)**. Alemanha: Ed Scintomics Print Media and Publishing, v. 1, p. 103-126, 2010.

MAURER, T., et al. ^{68}Ga -PSMA ligand PET/CT in patients with prostate cancer: How we review and report. **Cancer Imaging**, v. 16, p. 14, 2016.

MIYAHIRA et. Al. Meeting report from the Prostate Cancer Foundation PSMA-directed radionuclide scientific working group. **The Prostate**. p. 1–15, 2018.

OSSO, J.; KNAPP, R. Principles and operation of radionuclide generators. In: THEOBALD, T. Sampson's Textbook of Radiopharmacy. Cornwall, Padstow: **Pharmaceutical Press**, 2011. 4. ed. p. 339-364.

PERERA, M. et. al. Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive ^{68}Ga -Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **European Urology**, v. 70, p.926-937, 2016.

PILLAI, M. et al. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 43, p. 692-720, 2016.

ROESCH, F.; RISS, P. J. The Renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Radionuclide Generator Initiates New Developments in ^{68}Ga Radiopharmaceutical Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1633-1668, 2010.

ROBILLOTA, C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev Panam Salud Publica**. 2006; 20(2/3):134–42.

RODRIGUES, S. et al. Carcinoma da próstata metastático resistente à castração - novas abordagens terapêuticas. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 31, p. 36-40, 2014.

ROSCH, F. Past, presente and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. **Appl. Radiat. Isot**, v. 76, p. 24 – 30, 2013.

SCHAFER, M, et al. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ^{68}Ga -PET imaging of prostate cancer. **EJNMMI Res.**, v. 2, p. 23, 2012.

SCHUBIGER, P.A.; LEHMANN, L.; FRIEBE, M. PET Chemistry. The Driving Force in Molecular Imaging. **Emst Schering Research Foundation Workshop 62**, v. 64, p. 215-242. Ed Springer, 2007.

SPANG, P., ROESCH, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 46, p. 373-394, 2016.

STERZING, F.; KRATOCHWIL, C.; FIEDLER, H.; KATAYAMA, S.; HABL, G.; KOPKA, K.; AFSHAROROMIEH, A.; DEBUS, J.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. 68Ga-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 43, p. 34-41, 2016.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011.

VELIKYAN, I.; ANTONI, G.; SORENSEN, J.; ESTRADA, S. Organ biodistribution of Germanium-68 in rat in the presence and absence of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC for the extrapolation to the human organ and whole-body radiation dosimetry. **J.Nucl Med.**, v. 3, p. 154-165, 2013.

ZHANG, B, et al. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. **Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 1043-1058, 2009.

ZORRILLA, J., ARENCIBIA, J. Radiofármacos de galio 68. **Nucleus**, v. 51, p.1-5, 2012.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
