



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

Desenvolvimento de radioimunocombinados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe): influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas

ANA CLÁUDIA CAMARGO MIRANDA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo
2020

Desenvolvimento de radioimunocombinados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe): influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ANA CLÁUDIA CAMARGO MIRANDA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo
2020**

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

Como citar:

MIRANDA, A. C. C. **Desenvolvimento de radioimunoconjugados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe):** influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas. 2020. 165 p. Tese (Doutorado 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)

Miranda, Ana Cláudia Camargo

Desenvolvimento de radioimunoconjugados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe): influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas / Ana Cláudia Camargo Miranda; orientador Elaine Bortoleti de Araújo. -- São Paulo, 2020.

165 p.

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

1. HER2. 2. trastuzumabe. 3. radioimunoconjugado. 4. radioimunodiagnóstico. 5. radioimunoterapia. I. Araújo, Elaine Bortoleti de, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLÁUDIA CAMARGO MIRANDA

Desenvolvimento de radioimunoconjugados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe): influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data da defesa: 17/12/2020

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Elaine Bortoleti de Araújo
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Marcelo Tatit Sapienza
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dr^a. Luciana Malavolta Quaglio
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo
Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dr^a. Sofia Nascimento dos Santos
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Julgamento: Aprovado

*Dedico este trabalho ao meu marido João Carlos
e à minha filha Antonella... vocês dão sentido à
minha vida!*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade da vida e constante evolução espiritual!

À minha grande família... às minhas irmãs Livia e Larissa e, especialmente aos meus pais, Gerson e Neusa, por serem meus maiores exemplos, meu alicerce! Gratidão por me ensinarem e guiarem de forma paciente; acreditando, apoiando e incentivando em cada etapa da minha vida.

Ao meu amado marido João Carlos, por ser companheiro e me apoiar incondicionalmente em todos os momentos difíceis desta trajetória acadêmica. Eu não teria chegado aqui sem seu amor e compreensão!

À minha filha Antonella, tão pequena... mas, detentora de uma maturidade que me faz ser melhor a cada dia. Obrigada meu amor por me compreender nos momentos que tive que optar pelo trabalho e me ausentar de ocasiões únicas ao seu lado.

À minha orientadora, Prof^a. Elaine Bortoleti, por me ensinar, guiar e incentivar, principalmente nos momentos mais difíceis vividos durante esses anos compartilhados.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, especialmente, ao MSc. Jair Mengatti e ao Dr. Efrain Araujo Perini do Centro de Radiofarmácia (CECRF) pelo suporte financeiro e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Dr. Euclides Timoteo do Hospital de Câncer De Barretos por colaborar prontamente com a pesquisa pelo fornecimento do anticorpo trastuzumabe.

À MSc. Marycel F. de Barboza por ter me dado a primeira oportunidade de ingressar na área da Radiofarmácia em 2000 e, desde então, ter compartilhado seu conhecimento.

Aos colegas de pós-graduação, Raquel Benedetto, Luiza Balieiro, Renata Brandão, Cristian Villas Boas, Jefferson Silva e Carolina Ferreira pelas valiosas contribuições e experiências que trocamos nesses anos.

Ao MSc. Natanael Gomes da Silva pela disponibilidade em ajudar nos estudos de biodistribuição.

À Dra. Neuza Fukumori, gratidão por sua dedicação e carinho especial dispensados a mim.

Aos amigos de longa data, Jorge, Adriano, Rosana, Dulcila, Margareth, Patrícia, agradeço por tudo que fizeram para facilitar meu trabalho durante todos esses anos no IPEN.

À toda equipe do Controle de Qualidade do CECRF, em especial, à Vivian e ao Jurandi pelo auxílio prestado em meus experimentos.

Aos colegas, Dr. Daniel Perez e Dr^a. Angélica Barbezan, por me auxiliarem no cultivo de células.

À Profa. Maria Helena Bellini do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer do Centro de Biotecnologia (IPEN) por colaborar com as análises histopatológicas.

À Dra. Maria Tereza Colturato e ao Dr. Luís Alberto Dias pela disponibilidade em participar da minha banca referente à disciplina Seminário de Área e pelas considerações realizadas ao trabalho.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE/HIAE) pelo apoio e suporte concedido, em especial, aos amigos Anna Maria Ringheim, Ana Cláudia Durante, Leonardo Fuscaldi, Jorge Mejia, Luciana Cintra, Lucas Renan e Camila Hernandez por me ajudarem em questões fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a produção e conclusão deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora por dedicarem seus tempos para avaliar esta tese.

"Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância."

Sócrates

RESUMO

MIRANDA, Ana C. C. ***Desenvolvimento de radioimunoconjugados como agentes teranósticos baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe): influência dos agentes quelantes e dos radionuclídeos nas propriedades biológicas.*** 166 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo: 2020.

O câncer de mama é a segunda maior causa de mortalidade no mundo. Os tumores HER2 positivos ocorrem em 20 a 30% dos casos de câncer de mama e podem ser caracterizados como sendo o segundo pior prognóstico em relação aos demais subtipos. Constitui um indicador de comportamento clínico mais agressivo e com pior resposta às terapêuticas convencionais. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas de imagem não invasivas utilizando anticorpos monoclonais (AcM) é um campo em rápido desenvolvimento. Devido à elevada afinidade pelo receptor HER2, o AcM humanizado trastuzumabe tem sido alvo de estudos de radiomarcagem com o intuito de radioimunodiagnóstico (RID) e radioimunoterapia (RIT). Levando-se em consideração a possível influência dos agentes quelantes bifuncionais, da razão molar anticorpo:quelante e dos radionuclídeos, nas propriedades físico-químicas e biológicas do radioimunoconjugado (RIC), este trabalho teve por objetivo desenvolver e comparar o potencial teranóstico do trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e do trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu. Os resultados evidenciaram que os diferentes agentes quelantes, razões molares e radionuclídeos não influenciaram nas seguintes propriedades: integridade e estabilidade dos imunoconjugados; processo de radiomarcagem e estabilidade dos RICs, estabilidade em soro, ligação às proteínas séricas, internalização e imunorreatividade. Em contrapartida, observou-se influência no caráter lipofílico dos RICs, na ligação às células que expressam receptores HER2, no perfil de biodistribuição e na captação tumoral. Estes dados permitem concluir que, em nível nacional, o trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu é um par teranóstico com potencial aplicação em futuros estudos clínicos (RID e RIT) de cânceres que superexpressam receptores de HER2, em especial, o câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama; HER2; trastuzumabe; anticorpo monoclonal; radioimunoconjugado; radioimunodiagnóstico e radioimunoterapia.

ABSTRACT

MIRANDA, Ana C. C. *Development of radioimmunoconjugates as theranostic agents based on the anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab): influence of chelating agents and radionuclides on biological properties*. 166 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo: 2020.

Breast cancer is the second leading cause of mortality worldwide. HER2 positive tumors occur in 20 to 30% of breast cancers and are characterized as the second worst prognosis compared to the other subtypes. It indicates a more aggressive clinical behavior, with the worst response to conventional therapies. In this context, the development of non-invasive imaging techniques using monoclonal antibodies (MAbs) is a fast developing field. Due to the high affinity to HER2 receptors, the humanized MAb trastuzumab has been radiolabeled and studied, aiming radioimmunodiagnosis (RID) and radioimmunotherapy (RIT). Taking into account the potential influence of bifunctional chelating agents, antibody:chelator molar ratio and radionuclides, in the physicochemical and biological properties of radioimmunoconjugate (RIC), this work aimed to develop and to compare the theranostic potential of ^{111}In -DTPA-trastuzumab and ^{177}Lu -DOTA-trastuzumab. The results showed that the different chelating agents, molar ratios and radionuclides did not influence in the following properties: integrity and stability of the immunoconjugates; radiolabeling process and stability of RICs, serum stability, serum proteins binding, internalization and immunoreactivity. On the other hand, there was an influence on the lipophilic feature of RICs, HER2 positive cells binding, biodistribution profile and tumor uptake. These data indicate that ^{111}In -DTPA-trastuzumab and ^{177}Lu -DOTA-trastuzumab is a theranostic pair with potential for future clinical studies in RID and RIT of cancers that overexpress HER2 receptors, especially breast cancer.

Keywords: breast cancer; HER2; trastuzumab; monoclonal antibody; radioimmunoconjugate; radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Tabela 1 - | Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama | 28 |
| Tabela 2 - | Anticorpos monoclonais (não conjugados, radioconjugados e conjugados com droga) aprovados pelo FDA para diagnóstico ou tratamento de doenças malignas (adaptada) | 38 |
| Tabela 3 - | Principais radionuclídeos utilizados na marcação de anticorpos monoclonais para diagnóstico e/ou terapia | 45 |
| Tabela 4 - | Sistemas cromatográficos estudados para definição do melhor sistema a ser utilizado na avaliação da pureza radioquímica dos RICs ... | 64 |
| Tabela 5 - | Representação dos cálculos para determinação do número de quelantes incorporados ao trastuzumabe a partir dos valores obtidos dos espectros de massa por MALDI-TOF..... | 87 |
| Tabela 6 - | Avaliação da pureza radioquímica do AcM-DTPA- ¹¹¹ In (1:10) em diferentes sistemas cromatográficos (<i>n</i> = 3) | 96 |
| Tabela 7 - | Avaliação da pureza radioquímica e estabilidade (24 horas sob refrigeração) do AcM-DTPA- ¹¹¹ In nos sistemas cromatográficos escolhidos (<i>n</i> = 3), para as razões molares de conjugação 1:10 e 1:20 radiomarcadas com diferentes atividades | 100 |
| Tabela 8 - | Avaliação da pureza radioquímica e estabilidade (24 horas sob refrigeração) do AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu nos sistemas cromatográficos escolhidos (<i>n</i> = 3), para as razões molares de conjugação 1:10 e 1:20 radiomarcadas com diferentes atividades | 100 |
| Tabela 9 - | Parâmetros farmacocinéticos do AcM-DTPA- ¹¹¹ In e do AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (1:20) determinados em camundongos fêmeas <i>BALB-c</i> sadias (<i>n</i> = 4-5) | 129 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 - | Transdução de sinal pela família HER e potenciais mecanismos de ação do HER2 | 30 |
| Figura 2 - | Diagrama esquemático que representa a estrutura modular de um anticorpo monoclonal | 34 |
| Figura 3 - | Mecanismo de ação do trastuzumabe | 41 |
| Figura 4 - | Imagem representativa do sítio de ligação do trastuzumabe construída no programa SPOCK | 41 |
| Figura 5 - | Estruturas químicas: (A) ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) e (B) S-2-(4-isotiocianatobenzil)-ácido dietilenotriamino pentacético (p-SCN-Bn-DTPA) | 47 |
| Figura 6 - | Estrutura química do ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) | 48 |
| Figura 7 - | Estrutura química do ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA-NHS-éster) | 48 |
| Figura 8 - | Fluxograma do delineamento experimental adotado neste trabalho | 55 |
| Figura 9 - | Esquema do processo de conjugação dos quelantes ao trastuzumabe, sendo (A) AcM-DTPA e (B) AcM-DOTA | 59 |
| Figura 10 - | Esquema da reação de radioimunoconjugação (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu | 63 |
| Figura 11 - | Foto da placa aderente de 12 poços contendo 3,0 x 10 ⁵ células SK-BR-3 por poço, sendo LE os poços destinados ao estudo de ligação específica e LNE os poços destinados ao estudo de ligação não específica | 68 |
| Figura 12 - | Perfil cromatográfico em CLAE (UV 280 nm) do trastuzumabe com tempo de retenção (TR) de 8,65 minutos | 80 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figura 13 - | Frações dos imunocjugados avaliados por espectrômetro UV-VIS - (A) AcM-DTPA e (B) AcM-DOTA, sendo (a) , as frações de 1 a 4 (imunocjugado - quelante) recolhidas para o processo de purificação, (b) a fração do ponto de intersecção AcM-quelante – fração 5, e (c) as frações que continham uma quantidade maior de quelante em relação ao imunocjugado que foram desprezadas..... | 82 |
| Figura 14 - | Perfil cromatográfico em CLAE (UV 280 nm) da fração 5 do processo de purificação por PD-10 do trastuzumabe conjugado ao DOTA na razão molar 1:10 | 83 |
| Figura 15 - | Perfis cromatográficos em CLAE (UV 280 nm) dos imunocjugados após purificação e dos agentes quelantes, (A) p-SCN-Bn-DTPA e AcM-DTPA (1:10 e 1:20) e o (B) DOTA-NHS-éster e AcM-DOTA (1:10 e 1:20) | 84 |
| Figura 16 - | Espectros de massas dos radioimunocjugados obtidos por MALDI-TOF, (A) AcM-DTPA (1:10 e 1:20) e (B) AcM-DOTA (1:10 e 1:20) | 86 |
| Figura 17 - | (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, na condição não reduzida, sendo: (P) padrão de peso molecular; (1) trastuzumabe; (2) trastuzumabe-DOTA (1:10); (3) trastuzumabe-DOTA (1:20); (4) trastuzumabe-DTPA (1:10) e (5) trastuzumabe-DTPA (1:20); (B) Perfil densitométrico e (C) Média dos pesos moleculares das amostras não reduzidas | 89 |
| Figura 18 - | (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, na condição reduzida, sendo: (P) padrão de peso molecular; (1) trastuzumabe; (2) trastuzumabe-DOTA (1:10); (3) trastuzumabe-DOTA (1:20); (4) trastuzumabe-DTPA (1:10) e (5) trastuzumabe-DTPA (1:20); (B) Perfil densitométrico e (C) Média dos pesos moleculares das amostras reduzidas | 90 |
| Figura 19 - | Avaliação por CLAE (UV 280 nm) da estabilidade dos imunocjugados AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões molares 1:10 e 1:20, armazenados sob a temperatura de -20 °C durante o período de 1 ano ($n = 5$) | 92 |
| Figura 20 - | Perfis cromatográficos em CLAE (UV 280 nm) dos imunocjugados íntegros após 1 ano da conjugação com pureza superior a 99%, sendo (A) AcM-DTPA (1:10) – RT 8,63 minutos e AcM-DTPA (1:20) – RT 8,53 minutos; (B) AcM-DOTA (1:10) - RT 8,67 minutos e AcM-DOTA (1:20) – RT 8,60 minutos | 93 |
| Figura 21 - | Perfis cromatográficos representativos dos radionuclídeos $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$ avaliados em TLC <i>scanner</i> , sendo (A) sistema 1 e (B) sistema 2 | 98 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 22 - | Perfis cromatográficos representativos, avaliados em TLC-scanner, das marcações do trastuzumabe, com atividade de 296 MBq, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu no sistema cromatográfico 1 (iTLC-SG / tampão citrato de sódio 0,1 M - pH = 5,0) | 99 |
| Figura 23 - | Perfis cromatográficos representativos, avaliados em TLC-scanner, das marcações do trastuzumabe, com atividade de 296 MBq, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu no sistema cromatográfico 2 (TLC-SG / metanol:amônia 10%) | 99 |
| Figura 24 - | Avaliação da pureza radioquímica por CCD dos radioimunoconjugados, nas razões molares 1:10 e 1:20, após radiomarcagem e estabilidade de 24 horas. (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3) | 102 |
| Figura 25 - | Perfis cromatográficos obtidos por CLAE representativos dos tempos de retenção (TRs) relacionados ao (A) AcM-DTPA 1:10 (TR = 8,82 minutos; UV = 280 nm); (B) p-SCN-Bn-DTPA (TR = 11,31 minutos; UV = 280 nm); (C) ¹¹¹ InCl ₃ (TR = 12,19 minutos – detecção radioativa) e (D) AcM-DTPA- ¹¹¹ In 1:10 (TR = 9,25 minutos – detecção radioativa) | 103 |
| Figura 26 - | Perfis cromatográficos obtidos por CLAE representativos dos tempos de retenção (TRs) relacionados ao (A) AcM-DOTA 1:20 (TR = 8,98 minutos; UV 280 nm); (B) DOTA-NHS-éster (TR = 11,62 minutos; UV 280 nm) e (C) ¹⁷⁷ LuCl ₃ (TR = 11,99 minutos - detecção radioativa) e (D) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu 1:20 (TR = 9,52 minutos - detecção radioativa) | 104 |
| Figura 27 - | Estabilidade dos radioimunoconjugados (296 MBq/nmol) mantidos em meio reacional e sob refrigeração até 168 horas. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3) | 105 |
| Figura 28 - | Estabilidade do AcM-DTPA- ¹¹¹ In avaliada por CLAE (UV = 280 nm), sendo (A) e (A') referentes a razão molar 1:10, nos tempos imediato e 168 horas após radiomarcagem; (B) e (B') representando a razão 1:20 nas mesmas condições | 107 |
| Figura 29 - | Estabilidade do AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu avaliada por CLAE (detecção radioativa), sendo (A) e (A') referentes a razão molar 1:10, nos tempos imediato e 168 horas após radiomarcagem; (B) e (B') representando a razão 1:20 nas mesmas condições | 108 |
| Figura 30 - | Estabilidade dos radioimunoconjugados (296 MBq/nmol) mantidos em soro de roedor, à 37 °C por 168 horas. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 6) | 109 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 31 - | Avaliação comparativa da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional ($n = 3$) e soro de roedor ($n = 6$) por CCD até 168 horas, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, nas razões molares 1:10 e 1:20. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” | 110 |
| Figura 32 - | Avaliação da ligação dos radioimunoconjugados (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu às proteínas séricas. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 4-5$). Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre as respectivas razões molares (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) | 113 |
| Figura 33 - | Estrutura química do Kadcylo [®] , conjugado de anticorpo-medicamento (trastuzumabe entansina - T-DM-1) | 114 |
| Figura 34 - | Avaliação do coeficiente de partição (Log P) dos radioimunoconjugados (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 4-5$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) | 115 |
| Figura 35 - | Fotos representativas das células em placas aderentes: (A) SK-BR-3 (HER2 positivo) e (B) MDA-MB-231 (controle negativo para HER2) – aumento de 10 x | 117 |
| Figura 36 - | Percentuais de ligação específica dos radioimunoconjugados às células SK-BR-3. O AcM-DTPA- ¹¹¹ In, bem como o AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu apresentaram diferença estatística entre as razões molares 1:10 e 1:20 | 118 |
| Figura 37 - | Percentuais de ligação dos radioimunoconjugados às células SK-BR-3 e MDA-MB-231, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In (1:10); (A') AcM-DTPA- ¹¹¹ In (1:20); (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (1:10), (B') AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (1:20); (LE) ligação específica e (LNE) ligação não específica. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) | 118 |
| Figura 38 - | Imunorreatividade do AcM-DTPA- ¹¹¹ In (1:20), sendo (A) avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado ligado especificamente às células SK-BR-3 e (B) avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado às células SK-BR-3 na presença de competidor. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 3$) | 121 |
| Figura 39 - | Imunorreatividade do AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (1:20), sendo (A) avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado ligado especificamente às células SK-BR-3 e (B) avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado às células SK-BR-3 na presença de competidor. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 3$) | 122 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Figura 40 - | Gráfico representativo da porcentagem de ligação total às células SK-BR-3 (HER2 positivo) pelo número de células: (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, sendo LT - Ligação Total; LE - Ligação Específica e LNE - Ligação Não Específica, com bloqueio. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3) | 124 |
| Figura 41 - | Internalização do AcM-DTPA- ¹¹¹ In e do AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, ambos na razão molar 1:20, durante o período de 24 horas de incubação. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 4) | 126 |
| Figura 42 - | Curva da porcentagem da atividade dos RICs em sangue total de camundongos fêmeas <i>BALB-c</i> sadios, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, na razão molar (1:20). Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 4-5) | 128 |
| Figura 43 - | Gráfico comparativo entre as curvas das porcentagens das atividades dos RICs, AcM-DTPA- ¹¹¹ In e AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (1:20), em sangue total de camundongos fêmeas <i>BALB-c</i> sadios. Os valores estão expressos como “média ± desvio padrão” (n = 4-5) | 130 |
| Figura 44 - | Biodistribuição em camundongos fêmeas <i>BALB-c</i> sadios em diferentes tempos, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DTPA- ¹⁷⁷ Lu, ambos na razão molar 1:20. AI – Atividade injetada. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5) | 133 |
| Figura 45 - | Foto ilustrativa da medição da massa tumoral do camundongo <i>BALB-c Nude</i> fêmea após 21 dias da inoculação | 137 |
| Figura 46 - | Corte histológico de tumor mamário humano (SK-BR-3) com a presença de densa massa tumoral indicando alta atividade mitótica. Pleomorfismo celular com algumas células cuboides; porém, com maior frequência de células fusiformes. Citoplasma basófilo escasso. As setas indicam vasos tumorais. Coloração hematoxilina & eosina (H&E) e aumento de 100 x | 138 |
| Figura 47 - | Corte histológico de tumor mamário humano (SK-BR-3) apresentando região limítrofe do tumor (massa celular fortemente acidófila - arroxeadada) e o tecido muscular. As setas indicam células tumorais migrando para o tecido muscular. Coloração H&E e aumento de 200 x | 139 |
| Figura 48 - | Biodistribuição em camundongos fêmeas <i>BALB-c Nude</i> com tumor em diferentes tempos, sendo (A) AcM-DTPA- ¹¹¹ In e (B) AcM-DTPA- ¹⁷⁷ Lu, ambos na razão molar 1:20. AI – Atividade injetada. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5) | 140 |

Figura 49 - Relação alvo – não alvo em diferentes tempos, sendo **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-¹⁷⁷Lu, ambos na razão molar 1:20. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas 142

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo geral | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos | 25 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 3.1 Câncer de mama: incidência e classificação | 27 |
| 3.1.1 Câncer de mama HER2 positivo – mecanismo de ação | 29 |
| 3.2 Oncologia Personalizada e Imagem Molecular | 31 |
| 3.3 Imunoterapia na oncologia | 32 |
| 3.3.1 Estrutura dos anticorpos monoclonais | 33 |
| 3.4 Radioimunodiagnóstico e Radioimunoterapia | 35 |
| 3.4.1 Tratamento do câncer de mama com trastuzumabe | 39 |
| 3.5 Radionuclídeos utilizados em RID e RIT | 42 |
| 3.6 Agentes quelantes bifuncionais | 46 |
| 3.7 Trastuzumabe como radioimunoconjugado | 49 |
| 3.7.1 Par teranóstico | 52 |
| 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 54 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS | 57 |
| 5.1 Imunoconjugação | 57 |
| 5.1.1 Conjugação dos agentes quelantes ao trastuzumabe | 57 |
| 5.1.2 Determinação do número de quelantes acoplados por molécula de anticorpo. | 60 |
| 5.1.3 Análise da integridade estrutural dos imunoconjugados | 61 |
| 5.1.4 Avaliação da estabilidade dos imunoconjugados | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2 Radioimunoconjugação | 62 |
| 5.2.1 Radiomarcção | 62 |
| 5.2.2 Análise da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados | 63 |
| 5.2.3 Avaliação da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional | 65 |
| 5.3 Estudos <i>in vitro</i> | 65 |
| 5.3.1 Estudo da estabilidade dos radioimunoconjugados em soro | 65 |
| 5.3.2 Ligação dos radioimunoconjugados às proteínas séricas | 65 |
| 5.3.3 Análise do coeficiente de partição (Log P) | 66 |
| 5.3.4 Cultura Celular | 67 |
| 5.3.5 Estudo de ligação específica às células SK-BR-3 e MDA-MB-231 | 67 |
| 5.3.6 Estudo de imunorreatividade | 70 |
| 5.3.7 Estudo de internalização | 71 |
| 5.4 Estudos <i>in vivo</i> | 72 |
| 5.4.1 Estudos em camundongos <i>BALB-c</i> | 73 |
| 5.4.1.1 Farmacocinética | 73 |
| 5.4.1.2 Biodistribuição | 74 |
| 5.4.2 Estudos em camundongos <i>BALB-c</i> Nude | 76 |
| 5.4.2.1 Desenvolvimento do Modelo Tumoral Xenográfico | 76 |
| 5.4.2.2 Análise histopatológica | 76 |
| 5.4.2.3 Biodistribuição | 77 |
| 5.5 Análise estatística | 78 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 79 |
| 6.1 Imunoconjugação | 79 |
| 6.1.1 Conjugação dos agentes quelantes ao trastuzumabe | 79 |
| 6.1.2 Determinação do número de quelantes acoplados por molécula de anticorpo. | 85 |
| 6.1.3 Análise da integridade estrutural dos imunoconjugados | 88 |
| 6.1.4 Avaliação da estabilidade dos imunoconjugados | 91 |
| 6.2 Radioimunoconjugação | 94 |
| 6.2.1 Radiomarcção | 94 |
| 6.2.2 Análise da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados | 96 |

| | |
|--|------------|
| 6.2.3 Avaliação da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional | 104 |
| 6.3 Estudos <i>in vitro</i> | 108 |
| 6.3.1 Estudo da estabilidade dos radioimunoconjugados em soro | 108 |
| 6.3.2 Ligação dos radioimunoconjugados às proteínas séricas | 111 |
| 6.3.3 Análise do coeficiente de partição (Log P) | 115 |
| 6.3.4 Estudo de ligação específica às células SK-BR-3 e MDA-MB-231 | 117 |
| 6.3.5 Estudo de imunorreatividade | 120 |
| 6.3.6 Estudo de internalização | 125 |
| 6.4 Estudos <i>in vivo</i> | 127 |
| 6.4.1 Estudos em camundongos <i>BALB-c</i> | 127 |
| 6.4.1.1 Farmacocinética | 127 |
| 6.4.1.2 Biodistribuição | 132 |
| 6.4.2 Estudos em camundongos <i>BALB-c Nude</i> | 137 |
| 6.4.2.1 Desenvolvimento do Modelo Tumoral Xenográfico | 137 |
| 6.4.2.2 Análise histopatológica | 138 |
| 6.4.2.3 Biodistribuição | 139 |
| 7 CONCLUSÕES | 144 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 147 |

1 INTRODUÇÃO

Com o crescente desenvolvimento da medicina personalizada, o uso de anticorpos monoclonais (AcMs) como agentes terapêuticos para o câncer tem sido amplamente explorado, pois possuem a vantagem de se ligar às células tumorais de forma específica, diferenciando-os do tratamento quimioterápico convencional.^[1,2,3] Paralelamente, observa-se um grande interesse em empregar AcMs radiomarcados na avaliação e seguimento de respostas a tratamentos específicos, avaliação quantitativa e não invasiva por imagem da expressão do alvo para planejamento da estratégia do tratamento e, por último, estudos promissores no desenvolvimento de radioimunoconjugados (RICs) com fins teranósticos.^[4,5]

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente e com maior mortalidade entre as mulheres. Apesar do evidente avanço nos tipos de tratamentos disponíveis, o câncer de mama afeta 2,1 milhões de mulheres por ano. A taxa de incidência desta doença, entre as mulheres, é alta em regiões mais desenvolvidas, devido ao maior acesso aos métodos diagnósticos; porém, observa-se aumento desta taxa em quase todas as regiões do mundo. O diagnóstico precoce e o rastreamento da doença são extremamente importantes para aumentar a sobrevivência das mulheres acometidas com o câncer de mama, justificando os avanços científicos no desenvolvimento de novos agentes diagnósticos e terapêuticos.^[6]

A descoberta dos receptores hormônio-esteroides deu início ao desenvolvimento de medicamentos para a terapia-alvo do câncer de mama. Conseqüentemente, as pesquisas voltadas para o melhor entendimento dos receptores tirosina-quinase permitiram o surgimento do primeiro tratamento utilizando o AcM trastuzumabe.^[7]

O trastuzumabe é um AcM anti-HER2 humanizado IgG1, aprovado pelo FDA em 1998 como o primeiro AcM para o tratamento do câncer de mama HER2 positivo. Pode ser usado também no tratamento de outros tipos de tumores sólidos, como o

câncer gástrico, de ovário e carcinoma de pulmão de células não pequenas.^[4,5] Em especial, o câncer de mama do subtipo HER2 positivo, muito estudado desde sua descoberta em 1987 por Dr. Slamon et al, possui superexpressão da proteína oncogênica HER2, ocorre em aproximadamente 20% a 30% dos casos de câncer de mama e está associado a um prognóstico pior. Desta forma, o AcM trastuzumabe tem sido alvo de estudos de marcação radioativa com o intuito diagnóstico, terapêutico e teranóstico.^[8-10]

A marcação de um AcM com radionuclídeos metálicos e lantanídeos é possível pelo uso de agentes quelantes bifuncionais, que possuem uma porção reativa para ligação covalente às proteínas e uma porção capaz de se ligar fortemente ao radiometal, formando assim, um complexo fisiologicamente estável. Tal estabilidade *in vivo* é desejável para o radioimunodiagnóstico (RID) e para a radioimunoterapia (RIT), a fim de reduzir os danos da radiação e toxicidade aos órgãos e tecidos não alvo.^[11]

A característica lipofílica do RIC também pode ser alterada dependendo da carga e da lipofilicidade do agente quelante incorporado, podendo exercer influência no comportamento biológico.^[12] Outros fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um RIC, como o método de conjugação que não deve levar à degradação do anticorpo, assim como o processo de radiomarcagem que deve ser rápido, com baixa concentração do anticorpo para resultar em alta atividade molar.^[13]

O desenvolvimento de radiofármacos à base de metal representa uma área de pesquisa dinâmica e em rápido crescimento, que requer um conhecimento especial da química de coordenação dos metais e ligantes.^[14] Sabe-se que as características do complexo radionuclídeo - agente quelante pode influenciar em seu tempo de metabolização, promovendo o aumento da depuração sanguínea do radiofármaco, via sistema renal.^[15] Por outro lado, a avaliação da melhor razão molar anticorpo:quelante no processo de desenvolvimento de radioimunocombinações é relevante, visto que poderá influenciar na atividade molar do anticorpo radiomarcado, bem como em sua estabilidade. Esta, por sua vez, influenciará na habilidade diagnóstica ou terapêutica dos radioimunocombinações, tendo em vista a capacidade de ligação específica às células tumorais, sem perda da imunorreatividade.^[16,17]

Tendo em vista a importância do anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado (trastuzumabe) e os avanços tecnológicos relacionados à oncologia personalizada envolvendo o RID e a RIT, torna-se evidente o interesse no estudo da conjugação e radiomarcção deste anticorpo, que resulte no desenvolvimento de radiofármacos com aplicação em diagnóstico e terapia de tumores que superexpressam receptores HER2, principalmente, o câncer de mama. O conceito de radiofármacos teranósticos têm evoluído de estudos pré-clínicos rumo aos estudos clínicos com resultados promissores.^[4,18-30]

Considerando a influência dos agentes quelantes bifuncionais e dos radionuclídeos nas propriedades físico-químicas e biológicas do RIC, a originalidade deste trabalho consiste em comparar o potencial de dois agentes quelantes, em razões molares diferentes, combinados aos radionuclídeos ^{111}In e ^{177}Lu , no desenvolvimento de RICs baseados no anticorpo monoclonal anti-HER2. A avaliação comparativa levará em consideração parâmetros como pureza radioquímica, estabilidade da conjugação e da radiomarcção, bem como a avaliação das propriedades biológicas dos RICs, incluindo o padrão de biodistribuição, as propriedades farmacocinéticas, a porcentagem de ligação às células tumorais, a imunorreatividade, além da estabilidade *in vivo*. Apesar de a literatura apresentar estudos relacionados à radiomarcção do trastuzumabe, em especial, o aspecto comparativo entre os dois RICs propostos neste trabalho não está contemplado em estudos prévios; além disso, a experiência local torna-se importante quanto ao desenvolvimento da imunoconjugação e radioimunoconjugação para avaliação da preservação da imunorreatividade, bem como, da especificidade dos RICs pelo alvo.

Ademais, em nível nacional, o trabalho contempla o desenvolvimento inédito do par teranóstico, trastuzumabe-DTPA- ^{111}In e trastuzumabe-DTPA- ^{177}Lu , para oferecer suporte científico ao maior produtor de radiofármacos brasileiro, o Instituto de Pesquisas Energéticas (IPEN), na disponibilização de radiofármacos baseados em AcMs, para a realização de estudos clínicos em Medicina Nuclear para o diagnóstico e tratamento de tumores HER2 positivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver o método de conjugação e radiomarcção do anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe) com os agentes quelantes p-SCN-Bn-DTPA e DOTA-NHS-éster e com os radionuclídeos $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente. Posteriormente, avaliar a influência dos agentes quelantes, da razão molar anticorpo:quelante e dos radionuclídeos de cada radioimunoconjugado, trastuzumabe-DTPA- ^{111}In e trastuzumabe-DOTA- ^{177}Lu , nos parâmetros físico-químicos e nas propriedades biológicas, com vistas a identificar o potencial do par teranóstico para futura aplicação em estudos clínicos no diagnóstico, estadiamento e tratamento de cânceres que superexpressam receptores HER2, em especial, o câncer de mama.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar os parâmetros de conjugação do anticorpo trastuzumabe com os agentes quelantes p-SCN-Bn-DTPA e DOTA-NHS-éster, nas razões molares 1:10 e 1:20 (anticorpo:quelante),
- Avaliar comparativamente a estabilidade dos imunoconjugados armazenados sob refrigeração ($-20\text{ }^\circ\text{C}$);
- Determinar, para os dois radioimunoconjugados, o número de agentes quelantes por molécula de anticorpo para cada razão molar estudada;
- Desenvolver o método de radiomarcção e determinar a pureza radioquímica dos imunoconjugados, trastuzumabe-DTPA e trastuzumabe-DOTA, nas

razões molares 1:10 e 1:20, com os radionuclídeos $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente, em diferentes atividades molares;

- Determinar a estabilidade dos radioimunoconjugados, nas razões molares 1:10 e 1:20, armazenados sob congelamento (-20 °C);

- Estudar, comparativamente, a estabilidade do trastuzumabe-DTPA- ^{111}In e do trastuzumabe-DOTA- ^{177}Lu (1:10 e 1:20) em meio reacional e em soro; bem como a ligação às proteínas séricas; coeficiente de partição e ligação específica às células SK-BR-3 (HER2 positivas) e MDA-MB-231 (controle negativo);

- Comprovar a preservação da imunorreatividade do anticorpo após processos de conjugação e radiomarcção;

- Determinar e analisar, de forma comparativa, o tempo de internalização dos radioimunoconjugados em células tumorais, assim como, as propriedades farmacocinéticas, padrão de biodistribuição em animais sadios e em animais com implante tumoral xenográfico e estabilidade *in vivo*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer de mama: incidência e classificação

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica, a qual continua sendo uma questão de saúde pública em escala global por ser a segunda maior causa de mortalidade no mundo, apesar do evidente avanço nos tipos de tratamentos disponíveis.^[7,31-33]

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, respondendo por cerca de 30% dos casos novos a cada ano. A estatística estimou 66.280 mil novos casos em 2020 no Brasil, com, aproximadamente, 17 mil óbitos no ano de 2018.^[34]

Na clínica, tradicionalmente, o diagnóstico e a classificação do câncer de mama baseiam-se nas características clínico-patológicas, como: tipo de tumor e tamanho, linfonodos regionais ao tumor e grau histológico. São classificados em três subtipos de expressão de receptores hormonais: receptor de estrogênio (RE) positivo ou receptor de progesterona (RP) positivo; receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 - do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) positivo e triplo negativo. Avanços significativos têm ocorrido nessa área, nos aproximando da era da medicina personalizada.^[35,36]

Exemplo disso foi o desenvolvimento da tecnologia de microarranjos de DNA que permitiu, tendo como base os perfis de expressão genética, a análise de mais de oito mil genes e a identificação de cinco subtipos de carcinomas de mama (**Tabela 1**): luminal A e luminal B, quando a expressão genética se assemelha à célula luminal do ducto mamário, sendo dividido em A e B pelas diferenças no perfil de proliferação celular; superexpressão de HER2, quando o tumor apresenta um perfil que superexpressa o

receptor HER2 ou moléculas por ele reguladas na sua via de sinalização celular; basal símile (basaloide), quando se assemelha à célula basal e normal símile (penta-negativo não basaloide), caracterizado por um subtipo com poucas alterações e de difícil interpretação.^[36-40]

A técnica de microarranjos de DNA é considerada onerosa, em virtude disso, estudos têm demonstrado que os subtipos podem também ser identificados de forma similar por meio de marcadores imunohistoquímicos específicos. Os subtipos moleculares sugerem a heterogeneidade dos carcinomas de mama e as possíveis linhagens de células que promovem a carcinogênese mamária, além disso, podem orientar a seleção dos pacientes para distintas terapias hormonais ou para terapias específicas.^[32,36,38,41,42]

Tabela 1 - Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama.

| Subtipo molecular | Padrão de Imunomarcção |
|---|---|
| Luminal A | RE e/ou RP positivos e HER2 negativo |
| Luminal B | RE e/ou RP positivo (s) e HER2 positivo |
| Superexpressão de HER2 | RE e PR negativos e HER2 positivo |
| Basal símile (basaloide) | RE, RP e HER2 negativos, CK 5/6 positivo e/ou EGFR positivo |
| Normal símile (penta-negativo não basaloide) | ER, RP, HER2, CK 5/6 e EGFR negativos |

RE (receptor de estrogênio; RP (receptor de progesterona); HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano); CK (citoqueratina); EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico; do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*).

Fonte: Tabela elaborada pela autora, tendo com referência os estudos de KUMAR, B. N., 2015 e SONG, Q., 2015.

Sabe-se que tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas.^[31,43,44] Essas diferenças podem se justificar pela variedade de subtipos moleculares, as quais exigem condutas terapêuticas direcionadas.^[37,38]

Ultimamente, análises da expressão gênica de milhares de amostras de carcinoma de mama revelaram dez novos subtipos moleculares, com subdivisão do grupo normal símile (grupo negativo) e mais seis subtipos no grupo basal símile.^[36]

3.1.1 Câncer de mama HER2 positivo – mecanismo de ação

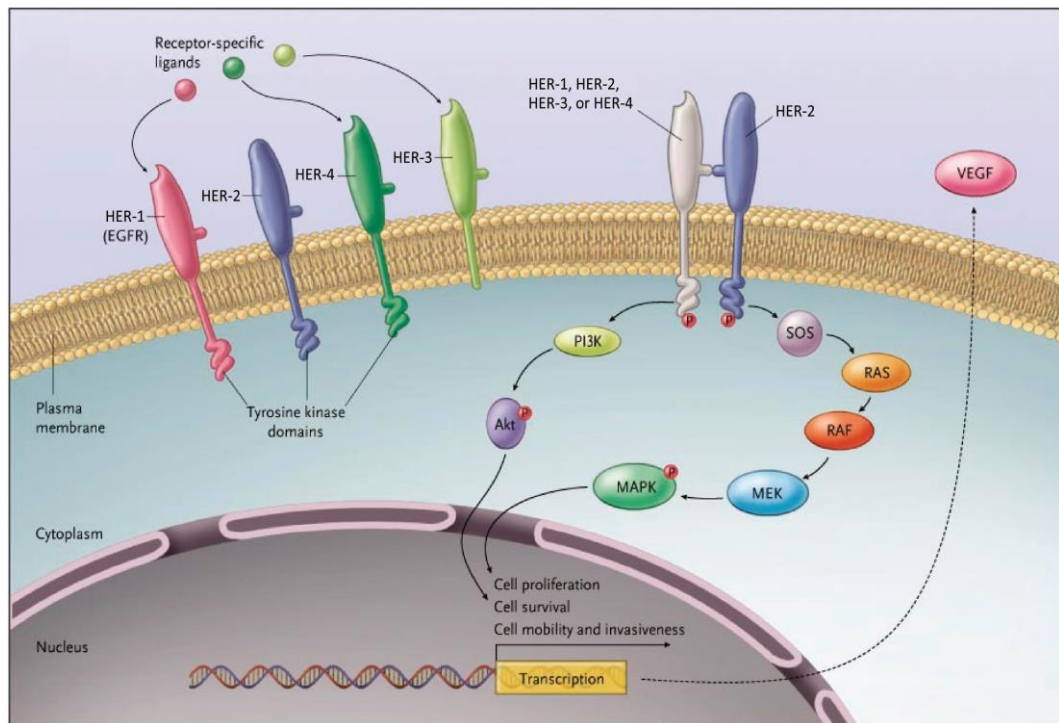
O câncer de mama do subtipo HER2 positivo possui elevada expressão da proteína oncogênica HER2, bem como, em outros tipos de tumores sólidos (adenocarcinomas), como o câncer gástrico, de ovário e carcinoma de pulmão de células não pequenas.^[35] O HER2 é um receptor tirosina-quinase pertencente à família HER (1-4) codificada pelo gene ErbB2. Pode, também, ser designado por HER2/neu/c-ErbB. Em quantidades normais, esta proteína tem papel importante no crescimento, desenvolvimento e proliferação de uma vasta categoria de células, designadas por células epiteliais.^[9,10,35,45]

Os receptores tirosina-quinase são caracterizados por três segmentos: um domínio C-terminal na porção extracelular (sítio obrigatório para um ligante específico), um domínio lipofílico transmembranar e um domínio N-terminal na porção intracelular, onde se encontram a atividade tirosina-quinase e os domínios de fosforilação. Após a ligação de uma molécula no sítio específico do domínio extracelular, os receptores são ativados por homo ou heterodimerização, desencadeando a fosforilação dos resíduos de tirosina em seus domínios intracelulares. Este processo de fosforilação promove a ativação de diferentes vias de transdução de sinais intracelulares; desta forma, inicia-se uma cascata de reações citoplasmáticas, as quais possuem importantes funções na regulação do crescimento, metabolismo e divisão celular. Estas vias interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos, a carcinogênese. Em diversos casos de câncer humano, os componentes das vias de sinalização podem estar mutados ou superexpressos.^[45,46]

Dos quatro membros da família HER, o HER1, HER3 e HER4 têm ligantes específicos no domínio extracelular; estes, preferencialmente, formam heterodímeros com HER2. Porém, diferentemente dos demais membros, o domínio extracelular de HER2 é capaz de adquirir uma conformação semelhante ao estado ativado sem a presença de um ligante e, portanto, é capaz de dimerizar espontaneamente e ativar cascatas de transdução de sinais que promovem diferentes eventos celulares. Isto também é possível quando há mutações gênicas e superexpressão desta proteína. As

principais vias de sinalização ativadas após formação de homo ou heterodímeros com HER2 inclui, principalmente, a via de PI3K e a via de Ras/MAPK que promovem a regulação de expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular, proliferação, migração celular e invasividade tumoral - **Figura 1.** [46]

Figura 1 – Transdução de sinal pela família HER e potenciais mecanismos de ação do HER2.



Fonte: HUDIS, C. A., 2007 (imagem adaptada pela autora da tese).

Esse tipo de tumor ocorre em aproximadamente 20% a 30% dos casos de câncer de mama. Em ambiente laboratorial, o aumento da expressão do HER2 origina uma transformação oncogênica e um comportamento tumoral mais agressivo. Na clínica, estudos demonstraram que o aumento da expressão do HER2 está associado a um pior prognóstico, podendo ser caracterizado como sendo o segundo pior prognóstico em relação aos demais subtipos. Constitui um indicador de comportamento clínico mais agressivo e com pior resposta às terapêuticas convencionais. Muitos estudos sugerem que existe uma relação entre a expressão de HER2 e a resistência hormonal. [9,10,35]

3.2 Oncologia Personalizada e Imagem Molecular

A oncologia personalizada (individualizada) baseia-se em evidências e oferece cuidados mais direcionados ao paciente oncológico, resultando em sucesso nos resultados e redução dos custos nos cuidados à saúde. Ela envolve análise genômica, medicamentos alvo-específicos, tratamento e diagnóstico molecular. Essencialmente, a oncologia personalizada utiliza biomarcadores teciduais, de soro, urina e imagem. É uma nova vertente que tem apresentado um impacto notável na medicina. Três tipos de biomarcadores são, particularmente, importantes: preditivo, prognóstico e de resposta terapêutica.^[47]

Ferramentas para implementar a medicina fundamentada na intervenção e no diagnóstico genético e molecular são importantes para melhorar a prevenção do câncer. Tecnologias de imagem como a Tomografia Computadorizada (do inglês, *CT – Computed Tomography*), a Tomografia por Emissão de Fóton Único (do inglês, *SPECT – Single Photon Emission Computed Tomography*) e a Tomografia por Emissão de Pósitrons (do inglês, *PET – Positron Emission Tomography*) são importantes instrumentos que auxiliam o diagnóstico precoce e a avaliação da resposta terapêutica, em nível molecular, influenciando o manejo do paciente oncológico. Futuros avanços são esperados na área da Imagem Molecular, permitindo diagnósticos integrados e o desenvolvimento do conceito de teranóstica, ou seja, a possibilidade de fazer o diagnóstico e a terapia de uma doença utilizando o mesmo biomarcador.^[47]

O HER2 é um alvo importante na oncologia, porém, atualmente, os métodos disponíveis para diagnosticá-lo são invasivos e podem apresentar resultados inconsistentes devido a heterogeneidade intratumoral. Outro fator é o tamanho da amostra biopsiada do tumor, que por ser pequena, pode não refletir a expressão da massa tumoral como um todo, bem como das possíveis lesões metastáticas. Neste cenário, a Imagem Molecular, por ser uma técnica não invasiva, oferece vantagens no diagnóstico e estadiamento de tumores HER2-positivos, permitindo a seleção de pacientes que podem ser responsivos a uma terapia direcionada, além do monitoramento da resposta terapêutica.^[5]

Pacientes com câncer de mama já estão se beneficiando com as descobertas na área molecular, inicialmente pela identificação de seus diferentes subtipos, conforme citado anteriormente, o que permitiu caracterizar o risco de recorrência, bem como, proposta de novos diagnósticos e tratamentos. Por fim, observa-se uma transição do tradicional método de “tentativa e erro” para métodos baseados no diagnóstico e terapia com biomarcadores específicos. Estima-se que nos próximos 10 anos, a medicina personalizada crescerá de 5 a 10% dentro do mercado farmacêutico.^[47]

3.3 Imunoterapia na oncologia

Há mais de um século atrás, Paul Ehrlich, sugeriu, pela primeira vez, a ideia do “bala mágica”, do inglês, *magic bullet*, que condiz com a teoria de que se um composto pudesse marcar uma doença de forma seletiva, então esse composto poderia estar combinado com um agente terapêutico para tratar a doença. Esse conceito inspirou o desenvolvimento de muitas drogas, para tratamento e diagnóstico de diversas doenças, incluindo o câncer. Nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento da tecnologia do hibridoma, a terapia do câncer usando AcMs tem demonstrado relação com as propriedades dos “comprimidos mágicos” teorizado por Paul Ehrlich.^[1,4]

O uso de AcMs como agentes terapêuticos para o câncer tem sido amplamente explorado, pois possuem a vantagem de se ligar às células tumorais de forma específica, diferenciando-os do tratamento quimioterápico convencional. Esta especificidade permite a destruição das células malignas (alvo) e a preservação das células normais. A morte celular ocorre quando o AcM se liga ao antígeno e promove o desencadeamento de uma série de mecanismos contra as células tumorais ou pelo processo de indução de uma resposta imune secundária às células alvo.^[48] Desta forma, a imunoterapia é a modalidade terapêutica que objetiva estimular ou restaurar a habilidade do sistema imune comprometido com uma determinada doença.^[49]

A primeira utilização bem sucedida de AcM no tratamento do câncer foi demonstrada em linfoma. Os resultados promissores abriram caminho para a avaliação desta modalidade terapêutica em outros tipos de tumores malignos, incluindo leucemias

e tumores sólidos. A escolha do antígeno é de extrema importância para a imunoterapia, pois se deseja que os receptores-alvo estejam presentes em grandes quantidades nas células tumorais com vistas a diminuir a toxicidade nas células normais.^[48]

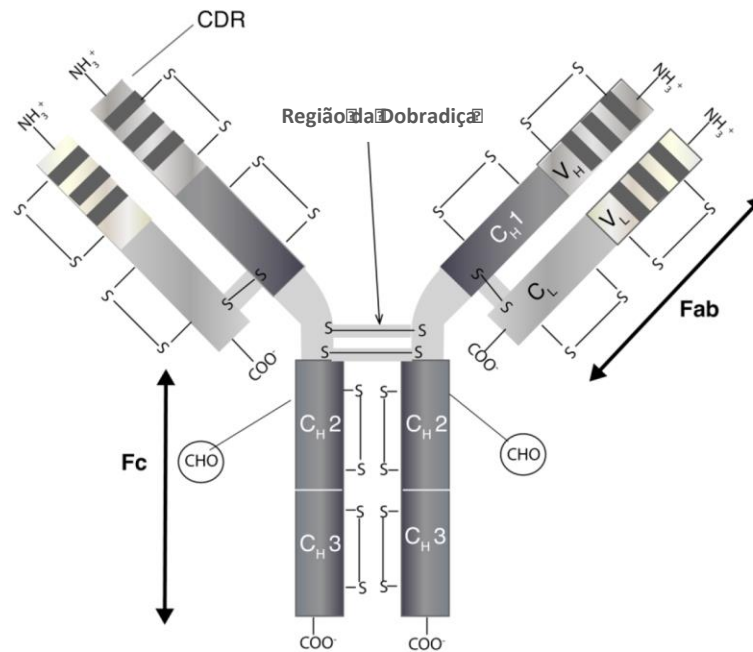
Mais de 20 anticorpos monoclonais foram aprovados como medicamentos pela *Food and Drug Administration* (FDA – Estados Unidos).^[50] Estima-se que mais de 500 novos AcMs estejam em fase de desenvolvimento, especialmente, anticorpos humanizados que possuem baixa toxicidade e alta especificidade, tornando-os ideais para fins terapêuticos.^[49]

3.3.1 Estrutura dos anticorpos monoclonais

Os AcMs são imunoglobulinas (Ig) das quais existem cinco classes (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).^[51] O mais relevante para a terapêutica é o IgG, que possui quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).^[52] IgGs são moléculas bivalentes com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, que podem ser altamente específicas para um determinado alvo, com afinidades que variam de nano a picomolar. As IgGs (**Figura 2**) possuem duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) idênticas separadas.^[53] O domínio N-terminal de uma IgG consiste em uma região variável (V) onde encontra-se a região determinante da complementaridade (CDR) que se liga à um epítipo específico em antígenos. Outros domínios dentro da IgG constituem as regiões constantes (C). A estrutura de uma IgG é amplamente dividida nas regiões Fab (2/3) e Fc (1/3). Cada um dos dois Fabs idênticos compreende uma cadeia leve que está associada por interações não covalentes com a cadeia pesada. Existe um dissulfeto (S-S) exposto às interações biológicas entre a cadeia leve e a cadeia pesada do Fab. As cadeias pesadas também estão associadas por meio de interações não covalentes dentro da região Fc. A região da dobradiça liga o Fab com o Fc, geralmente existem dois dissulfetos expostos às interações biológicas entre as cadeias pesadas na região da dobradiça. Existem também ligações dissulfídicas intramoleculares dentro de cada região constante e variável de ambas as cadeias pesada e leve. Muitos aspectos dos anticorpos, incluindo a especificidade ao epítipo, imunogenicidade, farmacocinética e funções efetoras relacionadas ao sistema

imunológico, são pesquisados objetivando o contínuo desenvolvimento da aplicação dos anticorpos no tratamento de doenças.^[54,55]

Figura 2 - Diagrama esquemático que representa a estrutura modular de um anticorpo monoclonal.



CDR: região determinante da complementaridade; COO-: terminal carboxi; CH: domínio constante, cadeia pesada, CL: domínio constante, cadeia leve; Fab: fragmento de ligação ao antígeno; Fc: fragmento da região cristalizável, NH₃: extremidade do terminal amino; SS: ligação dissulfeto; VH: domínio variável, cadeia pesada; VL: domínio variável, cadeia leve).

Fonte – AWWAD, S., 2018.

3.4 Radioimunodiagnóstico e Radioimunoterapia

O desenvolvimento de técnicas de imagem não invasivas utilizando AcMs é um campo em rápido desenvolvimento.^[1]

A marcação de anticorpos com finalidade diagnóstica e terapêutica em oncologia foi desenvolvida há mais de 30 anos. Em 1978, David Goldenberg *et al*, relataram a utilização do anti-antígeno carcinoembriônico (anti-CEA) conjugados a anticorpos policlonais marcados radioativamente para detecção de câncer por técnica de imagem. No entanto, o verdadeiro ponto de partida foi a descoberta da tecnologia do hibridoma que, de forma rápida, ofereceu uma série de novos reagentes específicos (anticorpos monoclonais) para reconhecer células tumorais, sendo uma das primeiras aplicações da tecnologia, a realização da imagem diagnóstica de tumores.^[18,56]

Tendo em vista alguns fatores, como a realização de biópsias repetidas como método diagnóstico que pode, involuntariamente, promover metástases; bem como a heterogeneidade intratumoral e o pequeno tamanho da amostra do tumor biopsiado, que pode não ser representativo da expressão tumoral no tumor como um todo faz com que a RID, de forma não invasiva, ofereça vantagens no diagnóstico e estadiamento de tumores, permitindo a seleção de pacientes que podem ser responsivos a uma terapia direcionada, além do monitoramento da resposta terapêutica e identificação de pacientes que se tornam resistentes a imunoterapia.^[5]

No radioimunodiagnóstico (RID), o iodo-131 (¹³¹I), utilizado para tratamento de carcinoma da tireoide, foi um radionuclídeo escolhido para marcar AcMs, apesar de sua energia de emissão gama, relativamente alta. Contudo, o desenvolvimento na área de diagnóstico encontrou vários problemas, como o fato da imunoglobulina apresentar meia-vida biológica longa, necessitando de vários dias para fornecer imagens de boa qualidade, por outro lado, alguns AcMs radiomarcados apresentaram ligação instável após internalização.^[18,56,57]

O primeiro problema desencadeou o desenvolvimento de pesquisas em relação ao uso de fragmentos de AcMs (com menor peso molecular) e de pré-alvos (para

aumentar a ligação específica dos AcMs radiomarcados às células tumorais) com o objetivo de aumentar a depuração sanguínea e, o segundo, levou à realização de estudos utilizando radioisótopos metálicos, como o Índio-111 (^{111}In), que permanece ligado às células tumorais após o processo de internalização do AcM, diferentemente do ^{131}I que é rapidamente excretado na forma de iodo-tirosina juntamente ao AcM. A qualidade das imagens utilizando AcMs em RID começou a melhorar com a introdução dos pré-alvos e com o advento da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) no diagnóstico de tumores sólidos e linfoma. Enquanto isso, a imunogenicidade dos AcMs murínicos havia sido reduzida com a introdução de AcMs quiméricos e humanizados através da tecnologia do DNA recombinante.^[18,56]

Vários fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um AcM radiomarcado, também chamado de radioimunoconjugado (RIC), como: o método de conjugação a um determinado agente quelante que não deve resultar na degradação do anticorpo; marcação radioativa rápida, utilizando baixas concentrações do anticorpo para obtenção de alta atividade específica (molar). *In vivo*, o RIC deve manter sua integridade e, conseqüentemente, sua imunorreatividade; deve também apresentar relação alvo/não-alvo capaz de fornecer imagens diagnósticas de alta qualidade ou terapia alvo-seletiva.^[13]

A Radioimunoterapia (RIT) é definida como uma terapia-alvo molecular que utiliza RICs para se ligar aos antígenos tumor-específicos, combinando os princípios do tratamento sistêmico com a deposição da radiação no local de interesse, poupando, assim, os tecidos saudáveis.^[4,19,30,58] Tem por objetivo aumentar o poder citotóxico dos anticorpos por meio de sua associação à um radionuclídeo. A seleção do antígeno de superfície ideal e do anticorpo a se ligar neste antígeno é crucial para o sucesso do programa terapêutico. O antígeno ideal para a RIT deve ser altamente expresso e possuir uma densidade uniforme na superfície de todas as células tumorais e não ser expresso por células normais.^[4,59]

Clinicamente, a RIT é comumente empregada no tratamento de linfomas e leucemias, pois os linfócitos são células extremamente radiosensíveis. Tumores sólidos são mais radioresistentes e requerem uma dose depositada de radiação cerca de cinco ou

dez vezes maior quando comparado com tumores hematológicos. Além disso, os tumores sólidos são caracterizados por pouca vascularização que pode causar captação heterogênea destes AcMs. Portanto, a RIT é mais adequada para tratamento de pequenos tumores, pois nestes, o anticorpo radiomarcado possui uma captação tumoral suficientemente alta e capaz de induzir um efeito tumoricida mediado pela radiação.^[59,60]

A princípio, dois RICs, tendo como alvo o antígeno CD20, foram aprovados para o tratamento de Linfoma não-Hodgkin: tositumomabe-¹³¹I (Bexxar®) e ibritumomabe-tiuxetano-⁹⁰Y (Zevalin®).^[4,61] No decorrer dos anos, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou diversos AcM para diagnóstico e terapia de doenças malignas, conforme **Tabela 2.**^[62,63]

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais (não conjugados, radioconjugados e conjugados com droga) aprovados pelo FDA para diagnóstico ou tratamento de doenças malignas (adaptada).

| Nome | Nome comercial | Classe do AcM | Alvo | Indicação | Aprovação |
|----------------------------------|----------------|-------------------|------------------------------|----------------------|-----------|
| Não-conjugados | | | | | |
| Rituximabe | Rituxan® | Quimérico (IgG1) | CD20 | LNH | 1997 |
| Trastuzumabe | Herceptin® | Humanizado (IgG1) | HER2 | Câncer de Mama | 1998 |
| Alemtuzumabe | Campath® | Humanizado (IgG1) | CD52 | LLC | 2001 |
| Cetuximabe | Erbix® | Quimérico (IgG1) | EGFR | CCE Cabeça e Pescoço | 2004 |
| Bevacizumabe | Avastin® | Quimérico (IgG1) | VEGF | Câncer Colorectal | 2004 |
| Panitumumabe | Vectibix® | Humanizado (IgG2) | EGFR | Câncer Colorectal | 2006 |
| Ofatumumabe | Arzerra® | Humanizado (IgG1) | CD20 | LLC | 2009 |
| Denosumabe | Xgeva® | Humanizado (IgG2) | RANKL | Metástases ósseas | 2010 |
| Ipilimumabe | Yervoy® | Humanizado (IgG1) | CTLA-4 | Melanoma metastático | 2011 |
| Pertuzumabe | Perjeta® | Humanizado (IgG1) | HER2 | Câncer de mama | 2012 |
| Radioconjugados | | | | | |
| Satamomabe pentedide | OncoScint® | Murínico | TAG72- ¹¹¹ In | Colorectal e ovário | 1992 |
| Nofetumomabe merpentan | Verluma® | Murínico | EGP- ^{99m} Tc (Fab) | CPPC | 1996 |
| Arcitumomabe | CEA-Scan® | Murínico | CEA- ^{99m} Tc (Fab) | Colorectal | 1996 |
| Capromabe pentedide | ProstaScint® | Murínico | PSMA- ¹¹¹ In | Próstata | 1996 |
| Ibritumomabe-tiuxetan | Zevalin® | Murínico (IgG1) | CD20- ⁹⁰ Y | LNH | 2002 |
| Tositumomabe | Bexxar® | Murínico (IgG2a) | CD20- ¹³¹ I | LNH | 2003 |
| Conjugados com droga | | | | | |
| Gentuzumomabe ozogamicina | Mylotard® | Humanizado | CD33 | LMA | 2000 |
| Brentuximabe vedotin | Adcetris® | Quimérico (IgG1) | CD30 | LH | 2011 |
| Trastuzumabe entansina | Kadcyla® | Humanizado (IgG1) | HER2 | Câncer de mama | 2013 |

LNH = Linfoma Não-Hodgkin; LLC = Leucemia Linfocítica Crônica; CCE = Carcinoma de Células Escamosas; CPPC = Câncer de Pulmão Pequena Célula; LMA = Leucemia Mieloide Aguda; LH = Linfoma de Hodgkin.

Fonte: STIGBRAND, T., 2008 e GLASSMAN, P.M., 2014.

Além da evidente importância do uso dos AcMs para fins de diagnóstico e de terapia do câncer, observam-se, atualmente, grande interesse de sua utilização na avaliação e seguimento de respostas a tratamentos específicos, avaliação quantitativa e não invasiva da expressão do alvo por PET para planejamento da estratégia do tratamento, e, por último, estudos promissores no desenvolvimento de RICs com fins teranósticos, ou seja, a possibilidade de marcar um AcM com um radionuclídeo híbrido, emissor de energia que possibilite o diagnóstico e a terapia de um tipo tumoral de forma individualizada (medicina personalizada). Outra possibilidade envolve o desenvolvimento do par teranóstico, que utiliza radionuclídeos diferentes para radiomarcador um anticorpo de interesse, obtendo assim um par de RICs, um com finalidade diagnóstica e, o outro, terapêutica.^[4]

3.4.1 Tratamento do câncer de mama com trastuzumabe

Tradicionalmente, o tratamento do câncer de mama baseia-se na combinação de quimioterapia e cirurgia, com ou sem terapia hormonal, dependendo da fase e do tipo de receptor molecular. No entanto, devido à transformação oncogênica expressiva e a clínica agressiva dos tumores que superexpressam a proteína HER2, a busca por terapias inovadoras é contínua.^[10,64]

O rápido crescimento no número de marcadores biomoleculares e o desenvolvimento de drogas para terapia-alvo no tratamento do câncer de mama teve início há mais de três décadas após o descobrimento dos receptores hormônio-esteroides. O aumento do conhecimento sobre os receptores tirosina-quinase permitiu o desenvolvimento da primeira terapia-alvo utilizando o anticorpo monoclonal humanizado, trastuzumabe. A avaliação de potenciais alvos moleculares tornou-se assim um ponto importante no diagnóstico primário e na escolha do tratamento da doença.^[7]

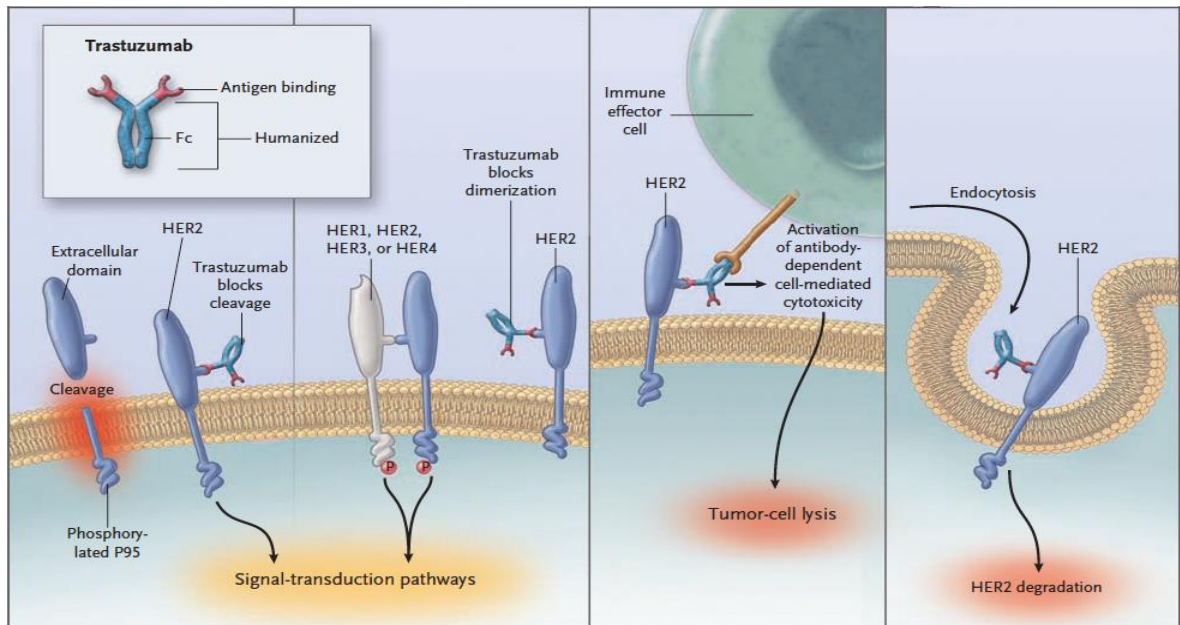
A utilização da terapia específica melhora acentuadamente o prognóstico dos pacientes oncológicos. As terapias-alvo contra HER2 são muito eficazes, tanto na forma adjuvante, quanto no contexto metastático. Pode-se dizer que o prognóstico melhorou

desde a introdução do trastuzumabe como parte do tratamento primário do câncer de mama metastático.^[9,64,65]

O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado anti-HER2, possui peso molecular igual a 145.531,5 Da (fórmula química - $C_{6470}H_{10012}N_{1726}O_{2013}S_{42}$).^[66] É indicado para o tratamento de tumores que superexpressam o receptor HER2. Foi o primeiro AcM aprovado pelo FDA para o tratamento do câncer de mama HER2 positivo desde 1998. Pode ser usado também no tratamento do câncer gástrico metastático e do adenocarcinoma metastático da junção gastroesofágica.^[21,63,67]

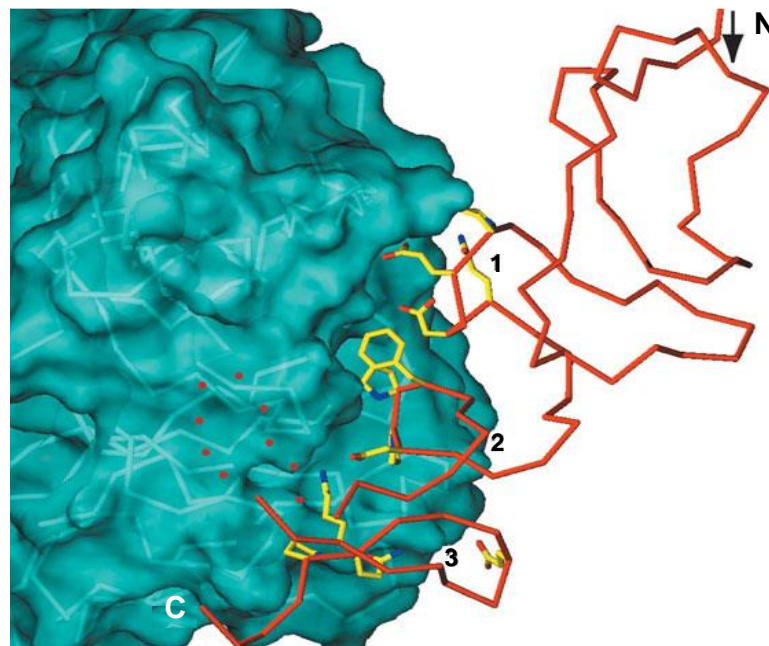
O trastuzumabe se liga ao domínio extracelular do HER2, evitando a clivagem e a ativação do receptor. Desta forma, o processo de dimerização, cascata de reações enzimáticas e sinais para a proliferação e manutenção da vida celular e de sinalização intracelular são inibidos, promovendo um efeito citostático e citotóxico com consequente lise das células tumorais e internalização do HER2 - **Figura 3**.^[46,68] A ligação é específica (terapia-alvo), o que leva a baixa incidência de reações adversas. A **Figura 4** ilustra o sítio de ligação do trastuzumabe ao receptor específico HER2.^[68]

Figura 3 - Mecanismo de ação do trastuzumabe.



Fonte: HUDIS, C. A., 2007 (imagem adaptada pela autora da tese).

Figura 4 - Imagem representativa do sítio de ligação do trastuzumabe construída no programa SPOCK. Em vermelho, observam-se as cadeias laterais do receptor HER2 em contato com a cadeia pesada Fab do trastuzumabe (em verde). (N) e (C) são as porções terminais de HER2. (1), (2) e (3) são regiões de ligação do HER2 ao AcM. Os pontos vermelhos indicam oito resíduos de ligação não visíveis na estrutura.



Fonte: CHO, H. S., 2003.

O trastuzumabe apresenta como reação adversa comum, a cardiotoxicidade com redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (insuficiência cardíaca congestiva), devido ao coração apresentar receptores HER2; porém, para a grande maioria dos pacientes, essa reação é reversível.^[5,68]

3.5 Radionuclídeos utilizados em RID e RIT

A eficiência de ação de um RIC para o RID e/ou RIT depende da escolha do antígeno alvo; das características pertinentes ao AcM, como: tamanho, especificidade e afinidade pelo alvo, além da qualidade na sua produção; porém a escolha do radionuclídeo a ser utilizado na marcação é de suma importância.^[4] As características do radionuclídeo, como: meia-vida ($T_{1/2}$), tipo de emissão radioativa, energia da radiação, radionuclídeos “filhos” produtos do decaimento do radionuclídeo “pai”, método de produção e pureza radionuclídica devem ser consideradas no momento de sua escolha.^[22]

Para ser utilizado em RID, na técnica SPECT, o radionuclídeo deve ser emissor de radiação gama (γ), que possui alto poder de penetração e emissões de energia entre 100 e 250 keV, as quais não comprometem a sensibilidade de detecção do sistema SPECT. Para PET, emissores de pósitrons são necessários para formar a imagem em um sistema dedicado de coincidência, através da leitura de dois raios gama de 511 keV cada, gerados simultaneamente em direções opostas (formando um ângulo de 180°), provindos do processo de decaimento do radioisótopo, o qual emite, do seu núcleo, o pósitron que se aniquila ao percorrer um curto espaço e encontrar um elétron. Além disso, a $T_{1/2}$ física deve ser suficientemente longa para permitir a realização dos controles de qualidade, transporte e administração do radiofármaco ao paciente e posterior aquisição da imagem. Outro fator a ser considerado é que, normalmente, os AcMs atingem razão alvo/não alvo ideais em 2 a 4 dias após sua administração, o que também limita a escolha do radionuclídeo adequado com base em sua $T_{1/2}$ física, seja para aplicação em RID, como em RIT.^[1,14,69,70]

Por mais de duas décadas, os AcMs foram marcados com ^{131}I e o ^{111}In ; porém essa técnica, apesar de confiável, promove imagens com sensibilidade e resolução

espacial inferior às imagens do sistema PET. Com o advento da tecnologia PET, os estudos foram direcionados ao desenvolvimento de radioimunoconjugados emissores de pósitrons, contudo isso requer apropriada combinação entre a meia-vida biológica do AcM com a meia-vida física do radionuclídeo. Por exemplo, o uso do flúor-18 (^{18}F) e do gálio-68 (^{68}Ga) que possuem meia-vida física curta, está limitado à marcação de peptídeos ou proteínas com baixo peso molecular; por outro lado, o zircônio-89 (^{89}Zr) e o Iodo-124 (^{124}I) são radionuclídeos adequados para marcar moléculas maiores, como os anticorpos monoclonais. Já o cobre-64 (^{64}Cu), com meia-vida de 12,7 horas, pode ser utilizado para marcar moléculas com diferentes tamanhos.^[18]

A RIT usa tipos de radiações de curto alcance, como as partículas beta negativo (β^-) e alfa (α). Essas partículas possuem alta transferência linear de energia – LET (do inglês, *Linear Energy Transfer*), ou seja, depositam altas energias em curtas distâncias, promovendo alta taxa de ionização, situação ideal para preservação de tecidos sadios. Nesse caso, espera-se alta concentração do RIC no tumor por um longo período e clareamento sanguíneo rápido, diferentemente da imagem, na qual o objetivo é proporcionar o melhor contraste entre o tumor e os tecidos adjacentes.^[4,15,68]

A aproximação do desenvolvimento de radiofármacos teranósticos, faz com que os pares de emissores beta positivo (β^+) e beta negativo (β^-), como: $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$; $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ e $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ sejam promissores, porque espera-se a mesma biodistribuição para estudos de imagem dosimétricos e, posterior terapia, utilizando o mesmo elemento; ou seja, o RIC, emissor de pósitrons, pode auxiliar na seleção de pacientes para realizar a RIT, bem como, otimizar a atividade a ser administrada no tratamento.^[18]

Em contrapartida, também é necessário considerar que nem sempre os elementos radioativos estão disponíveis ou apresentam viabilidade econômica para utilização em rotina. Outro fator a ser levado em consideração é a eficiência de radiomarkação e estabilidade do RIC quando se consideram diferentes radionuclídeos, bem como, a combinação dos radionuclídeos com os agentes quelantes bifuncionais utilizados para conjugação dos anticorpos. Desta forma, o estudo da influência de diferentes agentes quelantes bifuncionais e de diferentes elementos radioativos nas

propriedades biológicas dos radioimunocombinados representa uma importante linha de investigação para o desenvolvimento de agentes teranósticos.^[18]

Existem radionuclídeos que possuem um conjunto de características que desperta maior interesse nos pesquisadores quando se deseja marcar AcMs, seja para diagnóstico e/ou terapia (**Tabela 3**).^[4] Observa-se um direcionamento dos estudos atuais para a produção e radioquímica dos radiometais; em especial, isótopos radioativos de zircônio (Z), ítrio (Y), índio (In), gálio (Ga), cobre (Cu) e lutécio (Lu), pois possuem atributos favoráveis a marcação de biomoléculas, que combinam as características de decaimento com as características biológicas da molécula, permitindo o desenvolvimento de um radiofármaco viável para a prática clínica.^[14]

Tabela 3 - Principais radionuclídeos utilizados na marcação de anticorpos monoclonais para diagnóstico e/ou terapia.

| Radionuclídeo | Meia-vida (T _{1/2}) (horas) | Principal emissão | E _{máx.} (keV) | Máximo alcance em tecido mole (mm) | Método usual de marcação |
|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------------|---|
| Flúor-18 (¹⁸ F) | 1,83 | β ⁺ | 633 | 3,1 | N-hidroxi-succinimida Fluorobenzotato- ¹⁸ F, reação rápida, Alumínio-NOTA- ¹⁸ F |
| Gálio-68 (⁶⁸ Ga) | 1,13 | β ⁺ | 1899 | 9,8 | Ácidos poliaminocarboxílicos: DOTA, NOTA |
| Cobre-64 (⁶⁴ Cu) | 12,7 | β ⁺ | 653 | 3,2 | Diferentes agentes quelantes |
| | | β ⁻ | 579 | 2,8 | |
| Zircônio-89 (⁸⁹ Zr) | 78 | β ⁺ | 902 | 4,6 | Desferroxamina |
| Iodo-124 (¹²⁴ I) | 100 | β ⁺ | 1535 e 2138 | 7,9 e 10,9 | Marcação direta (tirosina) |
| Iodo-131 (¹³¹ I) | 193 | β ⁻ | 610 | 2,9 | Marcação direta (tirosina) |
| | | γ | 362 | - | |
| Índio-111 (¹¹¹ In) | 67 | γ | 171 e 245 | - | Ligação de coordenação: DTPA, DOTA |
| Ítrio-90 (⁹⁰ Y) | 64 | β ⁻ | 2250 | 11 | Ácidos poliaminocarboxílicos: DOTA |
| Rênio-188 (¹⁸⁸ Re) | 17 | β ⁻ | 2120 | 10 | Marcação direta ou complexos de (química análoga ao tecnécio) N ₂ S ₂ ou N ₃ S |
| | | γ | 155 | - | |
| Lutécio-177 (¹⁷⁷ Lu) | 162 | β ⁻ | 498 | 2,0 | Ácidos poliaminocarboxílicos: DOTA |
| | | γ | 208 | - | |
| Bismuto-213 (²¹³ Bi) | 0,76 | α | 8400 | 0,1 | Ácidos poliaminocarboxílicos: CHX-DTPA, DOTA |
| | | γ | 440 | - | |
| Astatino-211 (²¹¹ At) | 7,2 | α | 5870 e 7450 | 0,055 – 0,080 | Estanilação |
| | | X | 77 - 92 | - | |

NOTA - ácido 2-S-(4-aminobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético; DOTA - ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético; DTPA - ácido dietilenotriamino pentacético; CHX-DTPA – ácido N-(2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil)ciclohexano-1,2-diamino-N,N',N'',N'''-pentacético.

Fonte: KRAEBER-BODÉRE, F.; 2015 (tabela adaptada pela autora).

3.6 Agentes quelantes bifuncionais

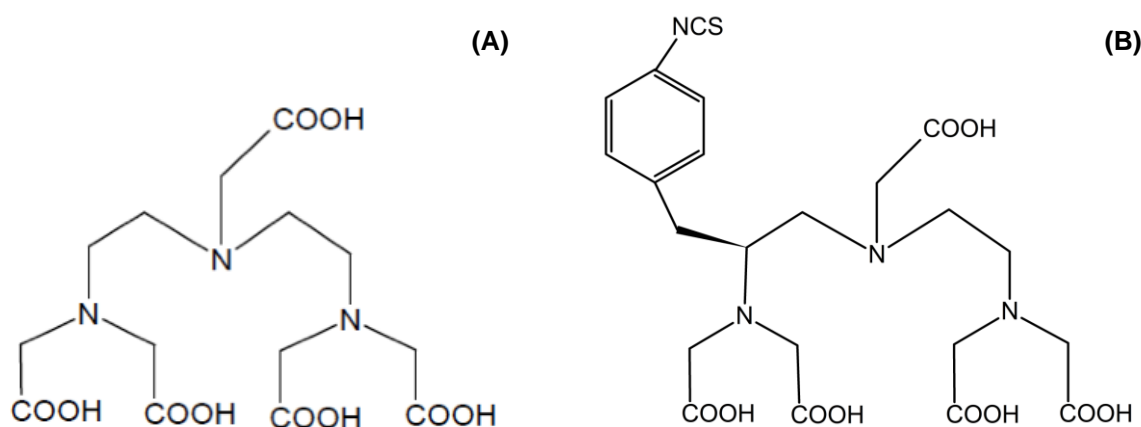
A marcação de anticorpos monoclonais com radionuclídeos metálicos é possível geralmente pelo uso de agentes quelantes bifuncionais, que possuem uma porção reativa para ligação covalente às proteínas e uma porção capaz de se ligar fortemente ao radiometal, formando assim, um complexo fisiologicamente estável. Tal estabilidade *in vivo* é desejável para RID e RIT, a fim de reduzir os danos da radiação e toxicidade aos órgãos e tecidos normais. Os radiometais possuem diferentes químicas de coordenação e, com isso, requerem agentes quelantes específicos com distintos átomos doadores e estruturas ligantes. A seleção do quelante a ser usado no processo de radiomarcação é determinada pela natureza e estado de oxidação do íon metálico.^[11,15]

Os agentes quelantes bifuncionais podem apresentar um impacto na biodistribuição do AcM, interferindo em sua velocidade de metabolização e excreção renal.^[15,71] Ele deve ser hidrofílico, formar um quelato com o metal com alta estabilidade termodinâmica, bem como ter uma cinética inerte a pH entre 5 e 7,5. A alta estabilidade termodinâmica é necessária para que não haja perda do radiometal e este cause efeitos indesejáveis por acúmulo em órgãos não alvo. Isso é particularmente importante quando o radiometal é altamente tóxico, como o ¹⁷⁷Lu, Ítrio-90 (⁹⁰Y) ou Samário-153 (¹⁵³Sm) que se acumulam nos ossos e podem causar danos à medula óssea. Os quelantes bifuncionais competem frequentemente com quelantes naturais presentes na corrente sanguínea, como por exemplo, a transferrina.^[14,15,72]

O fato de possuir a cinética inerte reflete na razão de dissociação de íon metálico do agente. Uma rápida cinética de dissociação é frequentemente observada em quelantes acíclicos, como o DTPA (ácido dietilenotriamino pentacético) e o p-SCN-Bn-DTPA (S-2-(4-isotiocianatobenzil)-ácido dietilenotriamino pentacético) - **Figura 5**, levando a baixa estabilidade *in vivo*, porém sua maior vantagem é a rápida cinética de radiomarcação sob condições favoráveis. Complexos baseados em estruturas macrocíclicas geralmente apresentam maior estabilidade *in vivo*, como, por exemplo, a classe de agentes quelantes macrocíclicos derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-

tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético) - **Figura 6**, que tem se mostrado promissora para aplicações em radiomarcção de anticorpos monoclonais.^[11,14,15,72]

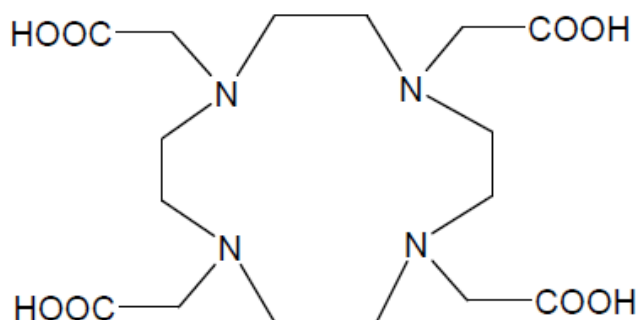
Figura 5 - Estruturas químicas: **(A)** ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) e **(B)** S-2-(4-isotiocianatobenzil)-ácido dietilenotriamino pentacético (p-SCN-Bn-DTPA).



Fonte: Imagem feita pela autora no programa CHEMSKETCH (2020).

A cinética de marcação dos quelantes bifuncionais macrocíclicos baseados no DOTA é usualmente lenta e também mais dependente das condições de radiomarcção, consideradas especiais, incluindo a concentração do agente quelante, pH, temperatura de reação e tempo de aquecimento, solução tampão e concentração da solução tampão e, presença de íons metálicos, como o Fe^{3+} e Zn^{2+} . Normalmente, são condições que requerem temperatura elevada para a obtenção de alto rendimento radioquímico. Essa questão deve ser levada em consideração quando o agente a ser marcado for proteína, pois temperaturas elevadas podem levar a perda de sua imunorreatividade.^[15,72-74]

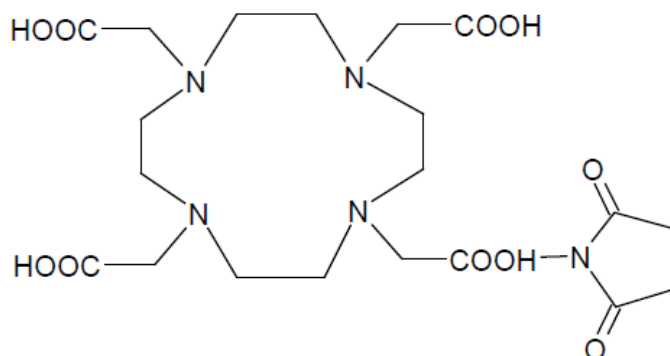
Figura 6 - Estrutura química do ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA).



Fonte: Imagem feita pela autora no programa CHEMSKETCH (2020).

Sabe-se que o DOTA forma complexos estáveis com muitos radiometais, como o ^{111}In , ^{67}Cu , ^{90}Y ou ^{177}Lu e por este motivo é usado para radiomarcagem de muitas biomoléculas. Para ocorrer a conjugação do quelante à biomolécula é necessária a ativação do grupo carboxílico do quelante via um éster ativo e a reação com uma amina primária da biomolécula, desta forma se obtêm uma ligação peptídica altamente estável em condições fisiológicas. Um exemplo da ativação do grupo carboxílico é a formação do éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS), originando o DOTA-NHS-éster - **Figura 7**. Os ésteres do NHS ativados são seletivos para aminas primárias em solução aquosa e pH ligeiramente básico, como é o caso das condições da reação de imunoconjugação.^[72,74]

Figura 7 - Estrutura química do ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano *N,N',N'',N'''*-tetraacético (DOTA-NHS-éster).



Fonte: Imagem feita pela autora no programa CHEMSKETCH (2020).

Considerando que a química de coordenação de cada radionuclídeo requer um agente quelante específico e que isso pode influenciar diretamente na eficiência de marcação, biodistribuição e farmacocinética do radioimunoconjugado, as pesquisas estão voltadas a determinar o melhor quelante bifuncional para determinada biomolécula. Alguns autores relatam a marcação de biomoléculas com gálio-68 (^{68}Ga) e ^{111}In utilizando agentes quelantes derivados de DTPA, DOTA e NOTA. Por outro lado, derivados de DOTA, NOTA (ácido 2-S-(4-aminobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) e TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetracético) estão sendo usados, com sucesso, na marcação de anticorpos e peptídeos com cobre-64 (^{64}Cu) e cobre-67 (^{67}Cu). Já para a marcação de biomoléculas com zircônio-89 (^{89}Zr), observam-se estudos utilizando quelantes derivados de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), DTPA, DOTA e DFO (desferroxamina).^[14,15,21,74-83]

3.7 Trastuzumabe como radioimunoconjugado

Devido à elevada afinidade ao receptor HER2, o AcM trastuzumabe tem sido alvo de estudos de marcação radioativa com o intuito diagnóstico, terapêutico e teranóstico. A escolha do radionuclídeo deve ser criteriosa e dependerá de suas propriedades físicas, como: o tempo de meia-vida e o tipo de energia emitida. Outra questão a ser considerada, neste caso, é o clareamento sanguíneo lento do anticorpo.^[4,10]

A técnica de aquisição de imagem PET associada a um RIC pode auxiliar na seleção de pacientes candidatos a realizar imunoterapia, bem como prever respostas terapêuticas. Embora tumores que expressam HER2 possam ser determinados na prática clínica através de ensaios imunohistoquímicos ou de hibridização *in situ* fluorescente, problemas técnicos podem ocorrer decorrentes de lesões que não sejam acessíveis à biópsia e da mudança da expressão de HER2 durante o curso da doença. Por isso, estudos têm provado que, de forma não invasiva, os métodos moleculares, como as imagens de PET promovidas por radionuclídeos (^{68}Ga , ^{64}Cu e ^{89}Zr) elucidam as questões descritas acima.^[4,21]

Inicialmente, o trastuzumabe foi marcado com ^{111}In para visualizar lesões primárias e metastáticas em ratos pela técnica de imagem SPECT. Posteriormente, ele foi estudado em humanos com tumores HER2 positivos. Sabe-se que a técnica SPECT possui limitações em relação à resolução espacial e a sensibilidade de detecção em tecidos profundos. Com o intuito de otimizar a detecção de HER2, estudos de marcação e imagem do trastuzumabe marcado com ^{89}Zr , via DFO, foram realizados em ratos e estão sendo realizados em humanos; tanto os estudos pré-clínicos como os estudos clínicos apresentaram resultados promissores, comprovando o potencial, para uso clínico, do AcM marcado com ^{111}In e com ^{89}Zr em RID, porém as imagens realizadas com trastuzumabe-DFO- ^{89}Zr mostraram-se superiores em relação a detecção e quantificação das lesões HER2 positivas em pacientes com câncer de mama metastático.^[21,81-88]

Por outro lado, existem estudos demonstrando a marcação do trastuzumabe com ^{64}Cu , via DOTA e NODAGA.^[21,71,89-91] Apesar de sua meia-vida curta (12,8 horas) em relação à depuração sanguínea do AcM, ele possui vantagens potenciais em comparação ao ^{89}Zr (meia-vida de 3,3 dias) em termos de segurança radiológica e dose de exposição à radiação do paciente.^{21,91]}

O trastuzumabe também foi marcado com os radionuclídeos gálio-67 (^{67}Ga) e ^{68}Ga , os estudos demonstraram sua quelação via NOTA e derivados do DOTA. Em especial, um grupo marcou o trastuzumabe com ^{67}Ga utilizando o DOTA-NHS-éster como agente quelante e descreveu resultados promissores que sugerem o radioimunoconjugado como um potente composto para realizar diagnóstico e acompanhamento de pacientes com tumores HER2 positivos utilizando a tecnologia SPECT.^[23,92]

A marcação com iodo-124 (^{124}I) também é possível, porém os radiometais são preferidos, devido à conhecida internalização celular do trastuzumabe e conseqüentemente rápido efluxo do radiomarcado das células.^[21,91]

Para aplicação em RIT, trabalhos relatam a marcação do trastuzumabe com ^{177}Lu via DOTA com resultados adequados de eficiência de marcação, imunoreatividade e estabilidade em soro humano. Os estudos de biodistribuição e imagem em pequenos

animais mostram a captação tumoral aumentando até 2 dias após a administração do RIC e progressiva diminuição nos outros tecidos.^[19,24,93]

Kang et al. (2012) compararam a cinética de radiomarcção do trastuzumabe com ^{90}Y e ^{177}Lu , utilizando um agente quelante bimodal, contendo um grupo isotiocianato. Os RICs apresentaram cinética de complexação rápida e estabilidade de 2 semanas em soro humano. Os estudos de biodistribuição em camundongos *Nude* mostraram-se favoráveis, com alta relação de captação tumor/sangue.^[20]

Huyvetter et al. (2014) sugerem o DTPA como agente quelante para marcar o trastuzumabe com ^{177}Lu e ^{111}In e nanocorpos de anti-HER2 (fragmentos do AcM) conjugados com DTPA e marcados com ^{177}Lu e ^{111}In . O objetivo do trabalho foi comparar a retenção renal dos três compostos em camundongos. Os fragmentos de anti-HER2 apresentaram significativa redução da captação renal constituindo um potente agente molecular para a terapia de tumores que expressam HER2. Análises histopatológicas do tecido renal não revelaram sinais de toxicidade.^[94]

Alguns estudos propuseram a marcação do trastuzumabe com alfa (α) emissores, como: actínio-225 (^{225}Ac), bismuto-213 (^{213}Bi) e chumbo (^{212}Pb). Os radionuclídeos α -emissores são considerados adequados para o tratamento de micrometástases porque possuem elevado LET. Observou-se a erradicação de aproximadamente 67% das micrometástases pulmonares provocadas em animais transgênicos com sobrevivência de um ano, porém análises dosimétricas mostraram que a dose recebida é consideravelmente alta e a toxicidade renal também.^[95] Meredith et al. (2014) demonstraram, em estudos realizados em animais e humanos, que o trastuzumabe- ^{212}Pb , quando administrado por via intraperitoneal, apresenta distribuição mínima na cavidade peritoneal, mostrando-se como um potencial RIC terapêutico para pacientes com tumores que expressam HER2.^[96]

3.7.1 Par teranóstico

O termo teranóstico pode ser entendido como a combinação de um biomarcador preditivo com um agente terapêutico. Este termo foi criado por John Funkhouser em 1998 e, desde então, seu uso tem aumentado constantemente. No entanto, o conceito de teranóstica não é novo na área da Medicina Nuclear. A ideia de utilizar um composto radioativo no diagnóstico por imagem, confirmação da expressão-alvo e terapia com radionuclídeos surgiu há mais de 50 anos, sendo aplicado às doenças da tireoide. Em 1941, Saul Hertz foi o primeiro a utilizar o radionuclídeo ^{131}I para tratar pacientes com hipertireoidismo e posteriormente, pacientes com câncer da tireoide.^[97,98] Em 1946, Seidlin et al. publicaram o primeiro estudo sobre terapia para câncer metastático de tireoide com iodo radioativo.^[99]

Nos últimos anos, houve um progresso sem precedentes no campo da teranóstica nuclear. Estudos randomizados de fase 3 em pacientes com tumores neuroendócrinos, bem como respostas efetivas em pacientes com câncer de próstata, mostraram a notoriedade das aplicações teranósticas, bem como o potencial econômico significativo, com uma possível receita anual de vários bilhões de dólares americanos.^[100,101]

Como mencionado anteriormente, o receptor HER2 é considerado um alvo relevante para o diagnóstico não invasivo por imagem e para terapia direcionada com radionuclídeos. Neste contexto, o desenvolvimento de moléculas com objetivo teranóstico, tem sido fortemente explorado nos últimos anos.^[5]

Estes avanços evidenciam a importância do desenvolvimento de radioimunconjugados com aplicação teranóstica. Em virtude da alta incidência do câncer de mama do subtipo HER2 positivo e da disponibilidade de radionuclídeos no Brasil, decidiu-se conjugar o trastuzumabe ao agentes quelantes DTPA e DOTA para radiomarcá-los com ^{111}In , que é emissor de radiação gama e possui propósito de aplicação diagnóstica, e com ^{177}Lu , emissor de partículas beta negativo, prevalentemente, para aplicação em terapia. O objetivo é que este par teranóstico, além de permitir o

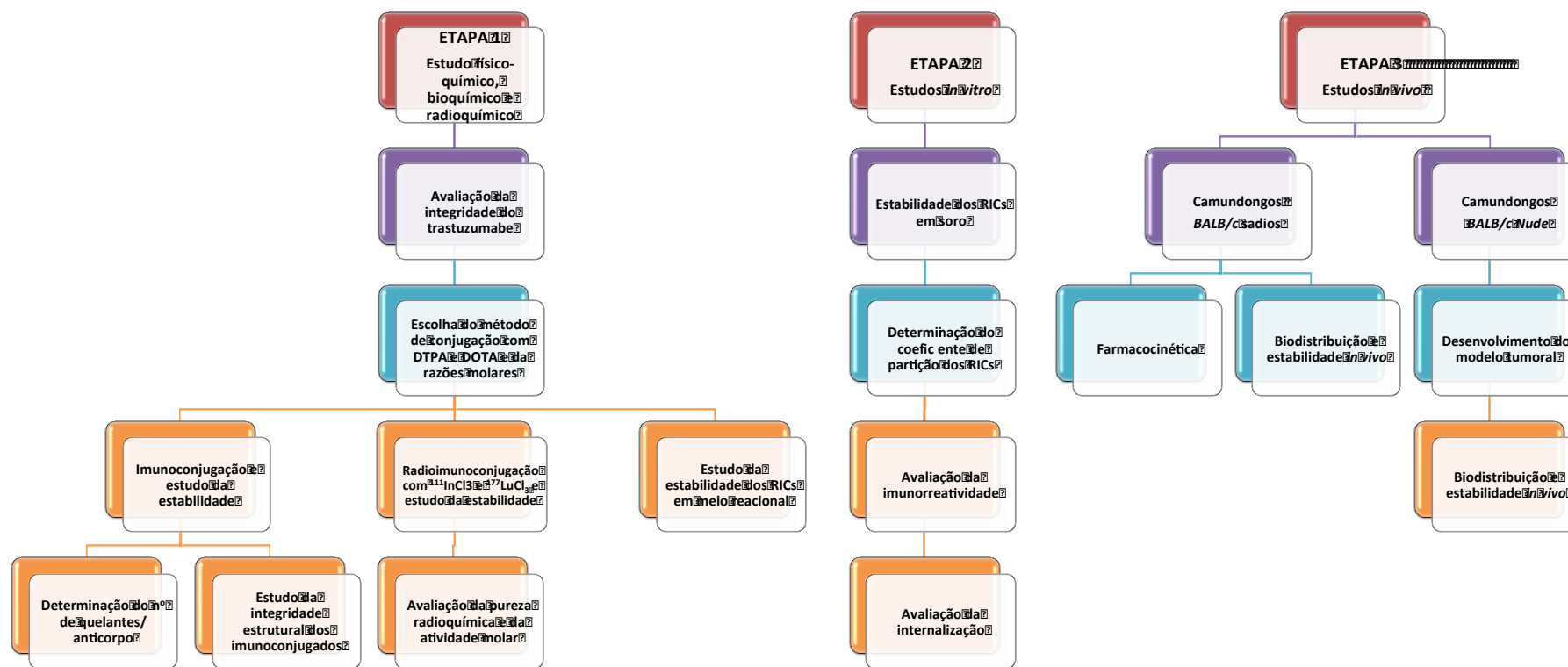
diagnóstico e estadiamento da doença, possa confirmar a expressão do alvo e, conseqüentemente, possa eleger o paciente ao tratamento específico.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental adotado para o desenvolvimento dos radioimunocombinados e estudo da influência dos agentes quelantes bifuncionais e dos radionuclídeos em suas propriedades físico-químicas e biológicas, com o objetivo de se obter um par teranóstico para o diagnóstico e tratamento de tumores HER2 positivos, será apresentado a seguir.

O presente trabalho foi dividido em três grandes etapas: (1) Estudos físico-químico, bioquímico e radioquímico; (2) Estudos *in vitro* e (3) Estudos *in vivo* conforme **Figura 8**. Estas etapas contemplam estudos experimentais que visaram elucidar a principal questão investigativa desta tese. Os resultados obtidos ao final de cada etapa permitiram seguir para a etapa seguinte.

Figura 8 – Fluxograma do delineamento experimental adotado neste trabalho.



Fonte: Autora da tese.

Na primeira etapa do trabalho foram realizadas análises físico-química, bioquímica e radioquímica. Primeiramente, a integridade do trastuzumabe foi avaliada para a condução dos estudos subsequentes. A escolha do método de imunconjugação do trastuzumabe com p-SCN-Bn-DTPA e DOTA-NHS-éster, bem como das duas razões molares anticorpo:quelante foi efetuada. Para cada razão molar, foi determinado o número de quelantes acoplados por molécula de anticorpo, como também a integridade estrutural do anticorpo após processo de conjugação.

A radiomarcção do trastuzumabe-DPTA e trastuzumabe-DOTA com $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente, foi realizada com diferentes atividades molares. O melhor método cromatográfico para análise da pureza radioquímica foi estudado e a estabilidade dos RICs, nas duas razões molares, foi determinada em meio reacional.

A segunda etapa consistiu em estudos *in vitro* dos RICs. Para as duas razões molares foram estudados: a estabilidade em soro, a ligação às proteínas séricas, o coeficiente de partição e a ligação específica às células SK-BR3 (HER2 positiva) e às células MDA-MB-231 (controle negativo), com e sem bloqueio.

A partir dos resultados obtidos até este ponto do trabalho, para cada RIC, foi escolhida a razão molar que promoveu a incorporação de certo número de grupamentos quelantes ao anticorpo, a qual promoveu alta pureza radioquímica e ligação específica às células SK-BR3. Desta forma, os estudos de imunorreatividade e internalização foram realizados.

A terceira etapa baseou-se em estudos *in vivo* com a melhor razão molar de cada radioimunoconjugado. Os camundongos *BALB/c* sadios foram utilizados para caracterização da farmacocinética, biodistribuição e estabilidade *in vivo*.

Para o desenvolvimento do modelo tumoral xenográfico foram utilizados os camundongos *BALB/c Nude*. Após implante e crescimento tumoral, os animais foram avaliados quanto à biodistribuição e a estabilidade *in vivo* dos RICs.

Por fim, todos os resultados obtidos foram comparados para a finalização do trabalho com a resposta à principal questão investigativa referente à influência de diferentes agentes quelantes e radionuclídeos nas propriedades físico-químicas e biológicas dos RICs baseados no trastuzumabe.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia (CECRF), no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CEBIO), sendo dependências sediadas na área do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Esses laboratórios possuem infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, animais e células. Parte dos processos de imunoc conjugação foi desenvolvida no laboratório de pesquisa em Radiofarmácia do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) localizado no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC). Os animais utilizados foram doados pelo CETEC e os estudos realizados conforme autorização das Comissões de Ética no Uso de Animais: CEUA/IPEN nº170/16 e SGPP/HIAE nº 3463/18.

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram adquiridos da *Merck Millipore* (São Paulo, Brasil) com graus de pureza PA e HPLC. No preparo das soluções e tampões foi utilizada água ultrapura ou água purificada por osmose reversa e tratada com resina trocada de íons (Chelex® 100, *Bio-Rad Laboratories Inc.*, Califórnia, EUA).

5.1 Imunoc conjugação

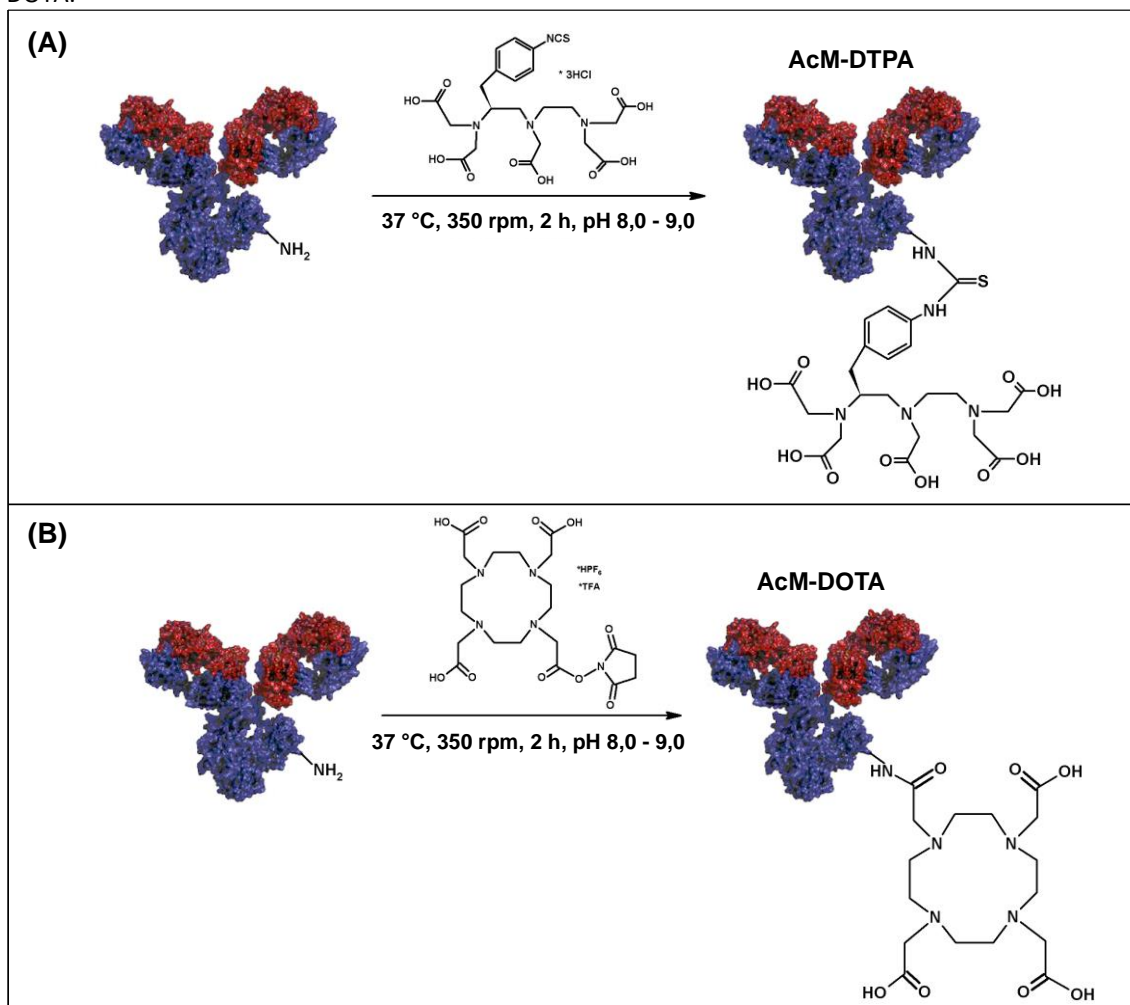
5.1.1 Conjugação dos agentes quelantes ao trastuzumabe

As condições de conjugação para obtenção dos radioimunoc conjugados tiveram como base estudos previamente publicados para os agentes quelantes, p-SCN-Bn-DTPA (DTPA) e DOTA-NHS-éster (DOTA).^[11,15,20-30,71,73,88,93,102]

O trastuzumabe (Herceptin®) foi adquirido da Roche (Basileia, Suíça). Em concentração inicial de $10,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi purificado pelo método da centrifugação (centrífuga 5702 RH – *Eppendorf*) em tubo concentrador Amicon® Ultra 10.000 MWCO (*Merck Millipore* - Burlington, USA), por 3 ciclos de 10 minutos, utilizando tampão bicarbonato de sódio 0,2 M (pH 8,5), $3000 \times g$ e temperatura de 4 °C. O perfil cromatográfico do trastuzumabe purificado foi obtido pelo cromatógrafo líquido de alta eficiência - modelo 1290 Infinity II (*Agilent Technologies*- Santa Clara, EUA) utilizando o software Open Lab ECM® (*Agilent Technologies* - Santa Clara, EUA); com detecção UV de 280 nm e coluna BioSep SEC-S 3000, 300 x 7,8 mm, 5 μm (*Phenomenex* - Torrance, EUA); nas condições: modo isocrático; tampão fosfato de sódio 0,1M (pH = 6,5 – 7,0) como fase móvel e fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura do forno de coluna de 30 °C; temperatura do compartimento de amostra de 4 °C e tempo de desenvolvimento cromatográfico de 16 minutos. Ao final desse processo, a concentração da solução do anticorpo foi determinada no espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (*Agilent Technologies* - Santa Clara, EUA), em comprimento de onda igual a 280 nm, multiplicando-se a absorbância, o valor de μ (inverso do coeficiente de extinção $\mu = 0,712 \text{ mg}/\text{mL}\cdot\text{cm}$) e o fator de diluição.

A conjugação foi realizada com os agentes quelantes S-2-(4-isotiocianatobenzil)-ácido dietilenotriamino pentacético (p-SCN-Bn-DTPA) e ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-ácido tetracético mono-N-hidroxisuccinamida éster (DOTA-NHS-éster), adquiridos da *Macrocyclics* (Plano, EUA), em duas razões molares anticorpo:quelante, 1:10 e 1:20, nas condições de reação: incubação a 37 °C, com agitação de 350 rpm, por 2 horas em bloco agitador/aquecedor TS-100C (*Biosan* – Riga, Letônia) e pH final da reação entre 8,0 – 9,0 (**Figura 9**). A purificação em coluna de exclusão molecular Sephadex® G25 PD-10 (*GE Healthcare* - Chicago, EUA) foi realizada em sequência, percolando-se tampão acetato de amônio 0,25 M (pH = 6,5 – 7,0).

Figura 9 - Esquema do processo de conjugação dos quelantes ao trastuzumabe, sendo **(A)** AcM-DTPA e **(B)** AcM-DOTA.



Fonte: Autora da tese.

Foram coletadas frações de 1 mL, no volume final de 10 mL. As frações foram lidas no espectrômetro. A fração que apresentou o ponto de intersecção anticorpo – quelante foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As frações de maior absorvância foram recolhidas e purificadas em tubo concentrador utilizando-se tampão acetato de amônio 0,25 M (pH = 6,5 – 7,0), em 4 ciclos de centrifugação de 30 minutos, a 3000 x *g* e temperatura de 4 °C. A cada ciclo, 4 mL de tampão acetato de amônio 0,25 M (pH = 6,5 – 7,0) foram adicionados ao tubo. Ao final dos ciclos, o imunocombinado purificado foi concentrado ao volume de 1 a 1,5 mL; sua concentração final foi ajustada para 5 mg·mL⁻¹ para posterior fracionamento em alíquotas de 1 mg/0,2 mL, que foram acondicionadas sob condições de congelamento (-20 °C), para futuras

marcações. A avaliação do anticorpo complexado aos quelantes, bem como sua integridade foram realizadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

5.1.2 Determinação do número de quelantes acoplados por molécula de anticorpo

O número de moléculas de p-SCN-Bn-DTPA e de DOTA-NHS-éster por molécula de trastuzumabe (AcM) foi determinado em amostras dos imunocjugados purificados, pelo método de espectrometria de massas MALDI-TOF, ou seja, ionização por dessorção a laser assistida por matriz, cuja sigla em inglês é MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, sigla TOF (do inglês, *Time-of-Flight*). A aquisição dos dados foi realizada no modo linear com polaridade positiva no espectrômetro *Autoflex Speed* da *Bruker* (Billerica, EUA).

As moléculas foram ionizadas e, este processo permitiu a adição ou a subtração de elétrons à amostra original. As moléculas foram separadas em função da relação massa/carga (m/z) com o intuito de quantificar o número de moléculas de quelantes incorporados por molécula de AcM.^[103]

Para reduzir a quantidade de sal presente nas amostras a serem analisadas e evitar a possível cristalização com a matriz, o tampão dos imunocjugados foi trocado de acetato de amônio 0,25 M (pH = 6,5 – 7,0), tampão final da imunocjugação, para HEPES 0,1 M. Foram aplicados 10 μ L para análise de cada amostra.

Por fim, pela análise dos espectros gerados, o número de moléculas de quelante incorporadas ao anticorpo foi obtido pela subtração do valor da relação carga massa (m/z), encontrada na análise de cada razão molar (1:10 e 1:20), do peso molecular do trastuzumabe ($145.531,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o resultado foi dividido pelo peso molecular dos agentes quelantes, $649,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o p-SCN-Bn-DTPA e $761,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o DOTA-NHS-éster.^[104,105]

5.1.3 Análise da integridade estrutural dos imunocombinados

A integridade estrutural dos imunocombinados foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) pela comparação com o padrão de peso da proteína.^[106] Como padrão, o anticorpo trastuzumabe não combinado também foi avaliado.

As amostras de 10 µg foram preparadas com tampão de amostra sem redutor (glicerol 10%, SDS 10%, 62,5mM de Tris 1,25M - pH 6,8, azul de bromofenol 0,004%) e com redutor (adição de β-mercapto-etanol 5%). Géis de empilhamento de 5% e de resolução 8% foram preparados. Em sequência, as amostras foram aplicadas e submetidas à migração eletroforética vertical (*Bio-Rad Laboratories* – California, USA) em tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 15 mM, SDS 0,1% - pH 8,3) sob voltagem de 50 V por 30 minutos e 80 V por 120 minutos. Ao final, os géis foram corados com *Coomassie Blue G-250*.

Após a coloração do gel, o perfil densitométrico de cada amostra e do padrão de peso molecular foram obtidas a partir da origem de aplicação usando o *software Image J (Gel Analyzer)*. Para confirmar o peso molecular dos imunocombinados, uma curva analítica correlacionando a distância percorrida e o peso molecular do padrão foi determinada para obtenção do coeficiente de correlação (equação da reta), o qual foi usado para calcular o peso molecular médio dos imunocombinados.

5.1.4 Avaliação da estabilidade dos imunocombinados

A estabilidade dos imunocombinados, AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões molares estudadas, armazenados sob temperatura de -20 °C, foi avaliada nos tempos de 3, 6 e 12 meses pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando os parâmetros: detecção UV em 280 nm; coluna BioSep SEC-S 3000, 300 x 7,8 mm, 5 µm; modo isocrático; tampão fosfato de sódio 0,1M (pH = 7) como fase móvel e fluxo de 1

mL.min⁻¹; temperatura do forno de coluna de 30 °C; temperatura do compartimento de amostra de 4 °C e tempo de desenvolvimento cromatográfico de 16 minutos.

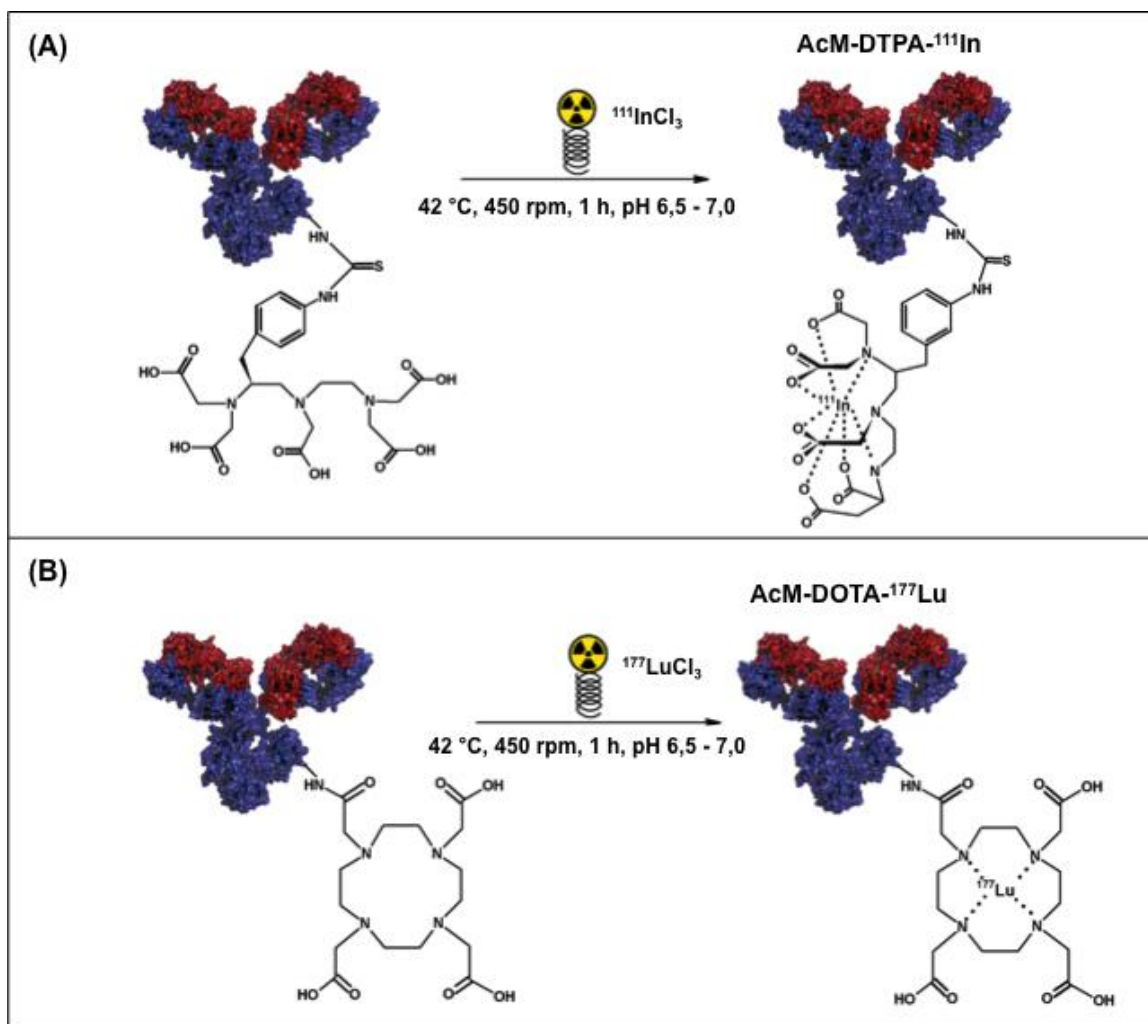
5.2 Radioimunoconjugação

5.2.1 Radiomarcção

Os imunoconjugados, AcM-DTPA (1:10 e 1:20) e AcM-DOTA (1:10 e 1:20), com massa inicial de 1 mg/0,2 mL (concentração de 5 mg·mL⁻¹) foram radiomarcados com os radionuclídeos: cloreto de índio-¹¹¹In (¹¹¹InCl₃) proveniente da *Curium Pharma* (Londres, Reino Unido) e cloreto de lutécio-¹⁷⁷Lu (¹⁷⁷LuCl₃) proveniente da *IDB Holland bv* (Baarle-Nassau, Holanda), respectivamente. Foram estudadas as atividades de 37, 74, 148 e 296 MBq, e atividades molares de 5,39; 10,77; 21,54 e 43,09 MBq/nmol correspondentes, lidas no calibrador de atividades CRMTM- 35R (*MIRION Technologies*, Capintec Inc. - Nova Jersey, EUA).

A reação ocorreu à temperatura de 42 °C pelo período de 1 hora e sob agitação de 450 rpm em bloco agitador/aquecedor. O tampão acetato de amônio 0,25 M (pH = 6,5 – 7,0) foi utilizado para acertar o volume final da reação para 1,5 mL (**Figura 10**).^[16,19,20,21,24-26,29,71,81,82,88,89,91,92,94,107]

Figura 10 - Esquema da reação de radioimunoconjugação **(A)** AcM-DTPA- ^{111}In e **(B)** AcM-DOTA- ^{177}Lu .



Fonte: Autora da tese.

5.2.2 Análise da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados

A pureza radioquímica de marcação dos RICs, nas razões molares 1:10 e 1:20, foi avaliada por dois métodos: (1) CLAE no cromatógrafo líquido de alta eficiência - modelo 1290 Infinity II (*Agilent Technologies*- Santa Clara, EUA) acoplado ao detector de radiação *Eckert & Ziegler Radiopharma Inc.* (Hopkinton, USA), e ao *software* Open Lab ECM® (*Agilent Technologies* - Santa Clara, EUA) com detecção UV de 280 nm e coluna BioSep SEC-S 3000, 300 x 7,8 mm, 5 μm (*Phenomenex* - Torrance, EUA); nas condições: modo isocrático; tampão fosfato de sódio 0,1M (pH = 7) como fase móvel e fluxo de 1

mL.min⁻¹; temperatura do forno de coluna de 30 °C; temperatura do compartimento de amostra de 4 °C e tempo de desenvolvimento cromatográfico de 16 minutos; e, (2) cromatografia ascendente em camada delgada (CCD) de sílica gel, estudo em triplicatas, utilizando fitas de 10 segmentos, avaliação imediata e 24 horas após a marcação dos radioimunoconjugados com as atividades citadas anteriormente.

Foram estudados diferentes sistemas por CCD (**Tabela 4**), a fim de definir o melhor sistema para avaliação da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados.^[108,109] O AcM-DTPA-¹¹¹In, na razão molar 1:10, foi utilizado para essa definição.

Tabela 4 - Sistemas cromatográficos estudados para definição do melhor sistema a ser utilizado na avaliação da pureza radioquímica dos RICs.

| Fase estacionária (suporte cromatográfico) | Fase móvel (solvente) | Impurezas avaliadas |
|--|---|--|
| iTLC-SG | MeOH:EDTA 50nmol/L em tampão acetato de amônio 0,1M - 1:1 (v:v) | ¹¹¹ InCl ₃ e DTPA- ¹¹¹ In |
| iTLC-SG | MeOH:Acetato de amônio 1M - 1:1 (v:v) - pH 8,5 | ¹¹¹ InCl ₃ e DTPA- ¹¹¹ In |
| iTLC-SG | Tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0 | ¹¹¹ InCl ₃ e DTPA- ¹¹¹ In |
| iTLC-SG | MeOH: Amônia 10% - 1:1 (v:v) | DTPA- ¹¹¹ In |
| TLC-SG (Al) | MeOH: Amônia 10% - 1:1 (v:v) | DTPA- ¹¹¹ In |

O suporte iTLC-SG (fitas de fibra de vidro impregnadas com sílica gel) foi adquirido da *Agilent Technologies* - Santa Clara, EUA e o TLC-SG (fitas de alumínio impregnadas com sílica gel) da *Merck Millipore* - São Paulo, Brasil. As fitas foram quantificadas no contador gama automático tipo poço com cristal NaI (TI) - D5002 cobra II (*Canberra-Packard* - Baixa Áustria, Áustria) e em radiocromatógrafo, TLC-scanner AR-2000 da *Eckert & Ziegler Radiopharma Inc.* (Hopkinton, USA).

Os cálculos referentes ao fator de retenção (FR), tempo de retenção (TR) e à pureza radioquímica (PR) foram realizados.

5.2.3 Avaliação da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional

Para o estudo da estabilidade, os imunoconjugados AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões estudadas, foram radiomarcados com $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente, com atividade molar de 43,09 MBq/nmol; foram mantidos em meio reacional e sob refrigeração (2-8 °C). Nos tempos 4, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, uma alíquota foi retirada do frasco de reação de cada RIC para análise por CCD no sistema iTLC-SG / tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0 ($n = 3$). A análise por CLAE foi realizada nos tempos imediato e 168 horas após radiomarcagem dos imunoconjugados, conforme protocolos anteriormente descritos.

5.3 Estudos *in vitro*

5.3.1 Estudo da estabilidade dos radioimunoconjugados em soro

A estabilidade dos radioimunoconjugados, nas razões molares 1:10 e 1:20, foi estudada em soro de roedores. Para cada RIC, foram adicionados 50 μL (aproximadamente 9 MBq com pureza radioquímica superior a 90%) a 450 μL de soro (*pool*) em sextuplicatas. A incubação ocorreu à temperatura de 37 °C e agitação de 450 rpm. Nos tempos de 4, 24, 48, 72, 96 e 168 horas, uma alíquota foi retirada para ser avaliada por CCD, em duplicatas, utilizando o sistema iTLC-SG / tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0.

5.3.2 Ligação dos radioimunoconjugados às proteínas séricas

A ligação dos RICs às proteínas séricas, nas razões molares 1:10 e 1:20, foi realizada em soro de roedores. As radiomarcações dos imunoconjugados foram realizadas com a maior atividade molar estudada (43,09 MBq/nmol) e com pureza radioquímica

superior a 90%. Para cada RIC foram adicionados 190 µL (aproximadamente 37 MBq) a 1000 µL de soro (*pool*). A incubação ocorreu à temperatura de 37 °C e agitação de 350 rpm. Nos tempos de 1, 4, 24, 48 e 72 horas, uma alíquota de 200 µL foi retirada para adição de 200 µL de acetonitrila gelada (1:1 – v/v). Os microtubos, contendo as misturas, foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos para precipitação das proteínas séricas. Posteriormente, os sobrenadantes dos microtubos foram recolhidos para serem quantificados, em contador gama, juntamente aos respectivos microbutos contendo os precipitados (*pellets*). O estudo foi realizado em quintuplicatas e a percentagem da ligação às proteínas séricas (LP) foi calculada pela equação - **Eq. 1**.

$$\% LP = \frac{\text{atividade (cpm) precipitado}}{\text{atividade (cpm) precipitado} + \text{atividade (cpm) sobrenadante}} \times 100$$

(Eq. 1)

5.3.3 Análise do coeficiente de partição (Log P)

O coeficiente de partição (Log P) foi determinado para os RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, nas razões molares 1:10 e 1:20. As marcações foram realizadas com a maior atividade molar estudada (43,09 MBq/nmol) e com pureza radioquímica superior a 90%.^[110,111]

Para cada RIC, foram adicionados em microtubos, 50 µL (aproximadamente 9 MBq) do radioimunoconjugado, 450 µL de água (fase aquosa) e 500 µL de n-octanol (fase orgânica), pré-saturados por 24 horas. A mistura foi agitada por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, aguardou-se 5 minutos para iniciar um processo de centrifugação por 5 minutos a 3000 rpm para separação completa das fases. Em sequência, uma alíquota de 100 µL foi retirada da fase aquosa e da fase orgânica de cada microtubo para ser contada no contador gama automático. O estudo foi realizado em sextuplicata. O coeficiente de partição (Log P) foi calculado pela equação - **Eq. 2**.

$$\text{Log } P = \log_{10} \frac{\text{atividade (cpm) na fase orgânica}}{\text{atividade (cpm) na fase aquosa}}$$

(Eq. 2)

5.3.4 Cultura Celular

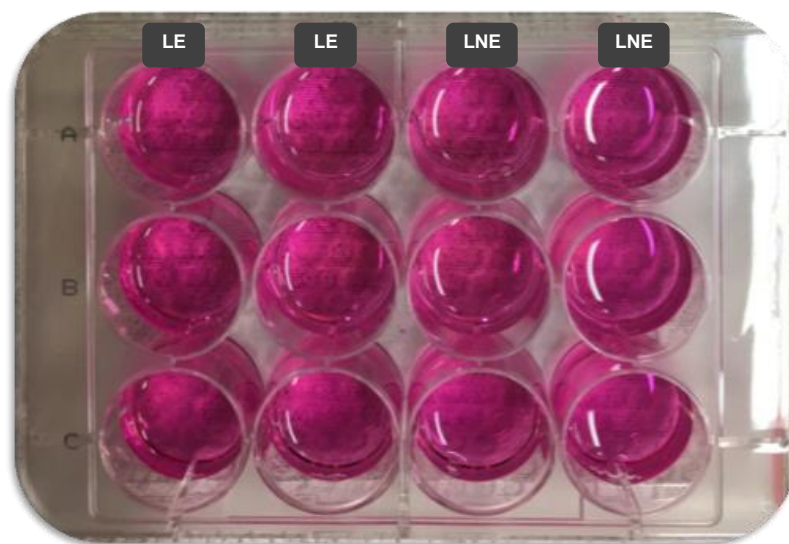
As linhagens celulares SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™), receptor HER2 positivo, e MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), receptor HER 2 negativo, foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg·mL⁻¹ de gentamicina (*Gibco, Life Technologies*, Maryland, USA). As células foram mantidas em incubadora umidificada Series II Water-Jacketed da *Thermo Scientific* (Massachusetts, USA) a 37 °C com 5% dióxido de carbono (CO₂). O crescimento das células em monocamada foi realizado em garrafas T75 (*SPL Life Sciences*, Gyeonggi, Korea) e observado diariamente através de um microscópio de fase invertida (OMAX 14.0 MP digital USB, OMAX CO. - South Korea). Para perpetuação da linhagem celular, quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas por 2 vezes com 5 mL de PBS – tampão fosfato salino (Cultilab - SP, Brasil) e retiradas da garrafa T75 pela ação de 2 mL de tripsina (Cultilab – SP, Brasil), durante 5 minutos a 37 °C (tripsinização). A inativação da tripsina foi realizada pela adição de 4 mL do meio de cultura suplementado. As células foram subcultivadas na proporção de 1:10. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias com 10 mL de meio novo. A alteração da coloração do meio de cultura, que indica atividade metabólica celular e alteração de pH, foi controlada diariamente.

5.3.5 Estudo de ligação específica às células SK-BR-3 e MDA-MB-231

O estudo de ligação dos RICs às células baseou-se em procedimentos descritos na literatura, com modificações.^[25,112-115]

Para o AcM-DTPA-¹¹¹In (1:10 e 1:20), a ligação específica, em células SK-BR-3 (HER2 +) e MDA-MB-231 (HER2 -), foi avaliada em placas aderentes de 12 poços (*Sarstedt* SP, Brasil) – **Figura 11**.

Figura 11 – Foto da placa aderente de 12 poços contendo $3,0 \times 10^5$ células SK-BR-3 por poço, sendo LE os poços destinados ao estudo de ligação específica e LNE os poços destinados ao estudo de ligação não específica.



Fonte: Autora da tese.

Para cada linhagem celular e para cada razão molar (1:10 e 1:20) foi utilizada uma placa semeada com $3,0 \times 10^5$ células por poço ($n = 6$). Após 24 horas, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS (pH = 7,2). Em sequência, nos poços destinados ao estudo de ligação específica (LE) foram colocados 500 μ L do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 500 μ L do AcM-DTPA-¹¹¹In (2,2 pmol). Nos poços destinados ao estudo com bloqueio (ligação não específica - LNE) foram adicionados 500 μ L do meio DMEM suplementado, contendo excesso do trastuzumabe não radiomarcado (2,2 nmol, ou seja, 1000 vezes) como competidor, e 500 μ L do AcM-DTPA-¹¹¹In (2,2 pmol). As placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas. Decorrido o tempo, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS (pH = 7,2). Em seguida, as células foram tripsinizadas e recolhidas em microtubos. Os microtubos, assim como o padrão da atividade adicionada por poço (atividade padrão), em triplicatas, foram encaminhados

para quantificação em contador gama, em contagens por minuto (cpm). Os cálculos foram realizados conforme equação - **Eq. 3**.

$$LE \text{ ou } LNE = \frac{\textit{atividade (cpm) poço} \times 100}{\textit{atividade (cpm) padrão}}$$

(Eq. 3)

O estudo de ligação específica do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:10 e 1:20), em células SK-BR-3 (HER2 +) e MDA-MB-231 (HER2 -), foi realizado em microtubos. Para cada linhagem celular e para cada razão molar (1:10 e 1:20) foram utilizadas 2,0 x 10⁶ células em 450 µL por microtubo (*n* = 5).

Para a LE, foram adicionados ao volume de células, 50 µL de PBS 1 % BSA e 250 µL do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (2,2 pmol). Para a LNE, foram adicionados ao volume de células, 50 µL de PBS 1% BSA, contendo excesso do trastuzumabe não radiomarcado (2,2 nmol, ou seja, 1000 vezes) como competidor, e 250 µL do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (2,2 pmol). Após incubação por 1 hora a 4 °C e sob agitação branda, os microtubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Foram realizadas sequências de três lavagens com PBS frio. Os sobrenadantes de todo o processo foram recolhidos e armazenados em microtubos denominados como “sobrenadante”. Os microtubos contendo sobrenadante e precipitado (*pellet*) foram quantificados em contador gama. A LE e a LNE foram calculadas conforme equação – **Eq. 4**.

$$LE \text{ ou } LNE = \frac{\textit{atividade (cpm) pellet}}{\textit{atividade (cpm) pellet} + \textit{atividade (cpm) sobrenadante}} \times 100$$

(Eq. 4)

Os RICs utilizados apresentaram pureza radioquímica superior a 90%. Os resultados obtidos foram plotados em gráficos tendo como base a comparação das porcentagens de ligação específica (LE) e não específica (LNE) de cada linhagem.

5.3.6 Estudo de imunorreatividade

O estudo de imunorreatividade foi realizado para os radioimunocombinados AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu na razão molar 1:20 e com pureza radioquímica superior a 90%. O método utilizado para avaliar a imunorreatividade do anticorpo foi proposto por Lindmo e colaboradores.^[116]

Os RICs foram diluídos em meio de cultura (1% SFB) a uma concentração de aproximadamente 40 ng/mL. Como competidor, foi utilizado o próprio anticorpo não combinado e não radiomarcado, diluído a uma concentração de 1 mg/mL. Diluições seriadas foram realizadas a fim de obter as seguintes quantidades de células em 500 µL de meio de cultura (1% SFB): 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,156 x 10⁶. Esta diluição foi realizada seis vezes, sendo um conjunto de 3 diluições utilizado para determinar a porcentagem de ligação específica (LE) e o outro conjunto de três diluições utilizado para determinar a porcentagem de ligação não específica (LNE), obtendo-se assim, triplicata de cada concentração celular para a LE e LNE. Posteriormente, adicionou-se 50 µL (9,75 µg) da solução de competidor ao conjunto de diluições referentes à ligação não específica, seguido de incubação prévia por 30 minutos a 4 °C sob agitação branda. Em seguida, adicionou-se 250 µL da solução do anticorpo radiomarcado a todos os tubos (ligação específica e ligação não específica) na concentração final de 13,3 ng/mL. As células foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora a 4 °C sob agitação branda. Ao final do tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas três vezes com meio de cultura com 1% de soro fetal bovino – (SFB) e os precipitados de células foram contados em contador gama, juntamente com um padrão da atividade total adicionada. O experimento foi realizado em triplicata. Para a obtenção das curvas de porcentagem de ligação total, ligação específica e não específica em relação

ao número de células foram construídos gráficos relacionando a concentração de células (mL/milhão) *versus* a ligação total /ligação específica e os dados foram ajustados para uma curva de regressão linear. O valor de Y quando X foi igual a zero, corresponde à fração imunorreativa (r) expressa em 1/r.

5.3.7 Estudo de internalização

O estudo de internalização foi realizado para os RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20, e baseou-se no protocolo descrito em estudos anteriores, com modificações. As marcações foram realizadas com a maior atividade molar estudada (43,09 MBq/nmol) e com pureza radioquímica superior a 90%.^[26,89]

Foram adicionados em microtubos, para cada RIC, $2,0 \times 10^6$ células SK-BR-3 contidas em 500 μ L de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e 250 μ L do AcM radiomarcado na concentração final de 13 ng/mL. Os microtubos foram levados à estufa e incubados na temperatura de 37 °C com 5% CO₂. Após os tempos de 1, 4 e 24 horas, as respectivas quadruplicatas foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos; os sobrenadantes, referentes à fração não específica, não foram armazenados. Em sequência, o botão de células foi ressuspensão pela adição de 500 μ L de tampão ácido gelado (ácido acético 0,2 M - pH 2,8). Os microtubos foram incubados a 4 °C por 10 minutos para evitar internalização posterior. Ao término da incubação, os microtubos foram novamente centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram recolhidos em microtubos denominados “Tubo 1” - fração não específica ligada na superfície das células. O “pellet” formado pela última centrifugação foi denominado como “Tubo 2”- fração internalizada nas células. Os conteúdos de todos os microtubos foram lidos no contador gama automático e a porcentagem de internalização específica foi calculada pela equação - Eq. 5.

$$\% \text{ Internalização específica} = \frac{\text{atividade (cpm) da fração internalizada (tubo 2)}}{\text{atividades (cpm) da fração não específica (tubo 1) + (tubo 2)}} \times 100$$

(Eq. 5)

5.4 Estudos *in vivo*

Os animais utilizados nos estudos *in vivo* foram provenientes do biotério do CETEC, classificados com padrão sanitário SPF (*Specified Pathogen Free*), ou seja, os animais são livres de patógenos específicos para a espécie.

Para cada estudo, os camundongos foram transportados para o biotério do Centro de Radiofarmácia do IPEN em caixas microisoladoras e em veículo refrigerado. Ao chegar ao biotério do IPEN foram aclimatados por 7 dias antes de iniciar os experimentos. Os animais foram alojados em *racks* ventiladas com sistema isolador filtrante de entrada e saída de ar, com cama de flocos (maravalha), sob condições ideais de temperatura (22 ± 3 °C), umidade $55 \pm 10\%$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e oferta *ad-libitum* de ração e água esterilizada. Em cada caixa ficaram alojados, no máximo, 5 animais. Eles receberam como enriquecimento ambiental, material de ninho (papel) e rolinho. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), seguindo o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*Guide*, 2011), o ARRIVE (*Animal Research: Reporting of in vivo Experiments*), com as devidas aprovações nas Comissões de Ética do IPEN e do HIAE, conforme mencionado anteriormente.

5.4.1 Estudos em camundongos *BALB/c*

5.4.1.1 Farmacocinética

O estudo de farmacocinética foi realizado em camundongos *BALB/c* sadios para os RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20, com pureza radioquímica superior a 90%. Visando a otimização do uso de animais, foram utilizados os camundongos do grupo de 168 horas do estudo de biodistribuição dos animais sadios ($n = 4-5$). Nos tempos: imediato (0), 4, 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas após administração dos RICs, 60 μ L de sangue foi coletado do plexo orbital do animal, utilizando tubo capilar heparinizado, após indução anestésica com 5% do isoflurano. A radioatividade das amostras de sangue foram quantificadas no contador gama tipo poço e os dados foram analisados, após o ajuste para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. Foram calculados os parâmetros farmacocinéticos de 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. Para determinação da depuração (CL) foi utilizada a equação - Eq. 6.

$$CL = \frac{\text{Atividade injetada (cpm)}}{\text{Área sob a curva}}$$

(Eq. 6)

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação - **Eq. 7**.

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \times \text{peso do animal (kg)}$$

(Eq. 7)

O tempo de meia-vida efetiva foi calculado considerando o tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação como sendo o tempo de meia-vida biológica mediante a equação - **Eq. 8**.

$$T^{1/2} = \frac{T^{1/2} \text{ biológica} \times T^{1/2} \text{ física}}{T^{1/2} \text{ biológica} + T^{1/2} \text{ física}}$$

(Eq. 8)

5.4.1.2 Biodistribuição

O estudo de biodistribuição foi realizado para os RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20, com pureza radioquímica superior a 90%. Foram utilizados camundongos fêmeas da raça *BALB/c*, sadios, com idade entre quatro a oito semanas e peso de aproximadamente 20 a 30 gramas ($n = 4-5$).

Foram administrados 18,5 MBq/ 0,1 mL do radioimunoconjugado por via intravenosa na veia caudal dos animais após indução anestésica com 5% do isoflurano (BioChimico, RJ, Brasil). Após 4, 24, 48, 72, 96 e 168 horas da administração do RIC, os animais foram eutanasiados por *overdose* anestésica, combinação de 300 mg/kg de

Cetamina (Cetamin[®], Syntec do Brasil, SP, Brasil) e 30 mg/kg Xilazina (Anasedan[®], CEVA Brasil, SP, Brasil), sendo 3 vezes a dose anestésica, administrado por via intraperitoneal. Os principais órgãos foram retirados e pesados. A radioatividade de cada órgão foi quantificada no contador gama. Posteriormente, as carcaças foram armazenadas em um *freezer* em área controlada para decaimento total da radioatividade, para então, serem encaminhadas para incineração. As porcentagens da atividade injetada por grama de órgão (% AI/g) foram calculadas por intermédio da média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada, pela equação - **Eq. 9**.

$$\% AI/g = \frac{\text{atividade (cpm) órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times (\text{atividade (cpm) padrão} - \text{atividade (cpm) cauda})} \times 100$$

(Eq. 9)

Para calcular a porcentagem de atividade injetada presente nos músculos, % AI (músculo), e nos ossos, % AI (ossos), dos animais, retirou-se o músculo da coxa e o fêmur dos camundongos e calculou-se a porcentagem de atividade por grama. O peso dos músculos foi assumido como 40% (**Eq. 10**) e dos ossos como 12% (**Eq. 11**) do peso total do camundongo.^[117]

$$\% AI (\text{músculo}) = \frac{\text{atividade (cpm) músculo} \times 40 \times \text{peso do animal (g)}}{\text{peso músculo (g)} \times (\text{atividade (cpm) padrão} - \text{atividade (cpm) cauda})}$$

(Eq. 10)

$$\% AI (\text{osso}) = \frac{\text{atividade (cpm) fêmur} \times 12 \times \text{peso do animal (g)}}{\text{peso fêmur (g)} \times (\text{atividade (cpm) padrão} - \text{atividade (cpm) cauda})}$$

(Eq. 11)

5.4.2 Estudos em camundongos *BALB/c Nude*

5.4.2.1 Desenvolvimento do Modelo Tumoral Xenográfico

O modelo tumoral xenográfico foi desenvolvido em camundongos atímicos *BALB/c* (Nu/Nu) *Nude* fêmeas, com idade entre quatro a oito semanas e peso de aproximadamente 20 a 30 gramas ($n = 4$). Foram inoculadas 5×10^6 células SK-BR-3 ressuspensas em 100 μL de uma mistura de meio de cultura e de matrigel (1:1) – *Corning Matrigel*[®] (*Life sciences, New York, USA*), administrados por via subcutânea no flanco inferior direito de cada camundongo. O crescimento do tumor foi avaliado semanalmente por meio da medida com paquímetro do diâmetro menor e do diâmetro maior da massa tumoral de cada camundongo. Os animais foram eutanasiados e os tumores foram retirados e encaminhados para análise histopatológica, quando o volume médio das massas tumorais atingiram aproximadamente 8 mm^3 .^[24,26]

O volume do tumor foi calculado conforme proposto por Faustino-Rocha et al. considerando as medidas obtidas do diâmetro menor e do diâmetro maior da massa tumoral, segundo a equação - Eq. 12.^[118]

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{(\text{diâmetro menor})^2 \times \text{diâmetro maior}}{2}$$

(Eq. 12)

5.4.2.2 Análise histopatológica

As lâminas histológicas foram preparadas, em colaboração, no Laboratório de Histologia do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC/HIAE).

As amostras da massa tumoral de cada animal foram armazenadas em solução de paraformaldeído (*Merck Millipore* - São Paulo, Brasil) para posterior processamento. Os tecidos passaram por 10 banhos químicos durante 12 horas sob temperatura de até 72 °C, utilizando o processador TP 1020 (*Leica Biosystems Inc.*, Illinois, EUA). Na primeira etapa foi usado o formol 10% para preservação e conservação do tecido, seguido de uma sequência de álcoois (70%, 85%, 96% e álcool absoluto – *Prolink Química*, São Paulo, Brasil) para a retirada do formol e desidratação do tecido. O processo terminou com dois banhos de parafina. O tecido parafinado foi retirado do processador para ser moldado (emblocamento em parafina) no módulo de inclusão EG1150 H (*Leica Biosystems Inc.*, Illinois, EUA) e acondicionado em cassete histológico para posterior corte do tecido em 5 µm de espessura no micrótomo rotativo automatizado HistoCore AUTOCUT (*Leica Biosystems Inc.*, Illinois, EUA). As lâminas histológicas foram confeccionadas e coradas com hematoxilina e eosina.

A avaliação das lâminas foi realizada, em colaboração, pela Dr^a. Maria Helena Bellini, veterinária e professora do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Foi utilizado o microscópio da marca Nikon Eclipse E600 (*Nikon* - Tokio, Japan).

5.4.2.3 Biodistribuição

Para o estudo de biodistribuição em camundongos BALB/c *Nude*, as células tumorais SK-BR-3 foram inoculadas em animais com idade entre quatro a oito semanas e peso de aproximadamente 20 a 30 gramas ($n = 4-5$).

Após crescimento tumoral, os RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20, com pureza radioquímica superior a 90% foram administrados na atividade de 18,5 MBq/ 0,1 mL, por via intravenosa, na veia caudal dos animais após indução anestésica com 5% do isoflurano. Após 24, 72 e 168 horas da administração do RIC, os animais foram eutanasiados por *overdose* anestésica, conforme protocolo descrito anteriormente. Os principais órgãos, bem como a massa tumoral e o músculo

contralateral foram retirados e pesados. A radioatividade de cada órgão foi quantificada no contador gama. Posteriormente, as carcaças foram armazenadas em um *freezer* em área controlada para decaimento total da radioatividade, para então, serem encaminhadas para incineração. As porcentagens da atividade injetada por grama de órgão (% AI/g) foram calculadas seguindo as equações descritas no item 5.4.1.2.

Os cálculos da relação alvo - não alvo (tumor/músculo contralateral (MC) e tumor/sangue) foram realizados nos tempos 24, 72 e 168 horas após administração dos RICs, conforme as equações - **Eq. 13** e **Eq. 14**.

$$Relação\ tumor - MC = \frac{\% \frac{AI}{g} tumor}{\% \frac{AI}{g} MC}$$

(Eq. 13)

$$Relação\ tumor - sangue = \frac{\% \frac{AI}{g} tumor}{\% \frac{AI}{g} sangue}$$

(Eq. 14)

5.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com o auxílio do programa *GraphPad Prism*[®] (versão 6.01). As variáveis foram apresentadas como “média ± desvio padrão” ou “média ± erro”. As médias de dois grupos foram comparadas pelo teste *t-student*. As médias de três ou mais grupos foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de *Tukey* (*one-way* ANOVA) ou teste de Bonferroni (*two-way* ANOVA). Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Imunoconjugação

6.1.1 Conjugação dos agentes quelantes ao trastuzumabe

A conjugação do agente quelante à estrutura do anticorpo é necessária para o radionuclídeo de interesse ser incorporado ao imunoconjugado. Na escolha do agente quelante a ser utilizado, deve-se considerar o grupo químico do quelante que se ligará ao anticorpo. Os derivados de DTPA e DOTA mais utilizados para conjugar proteínas são o p-SCN-Bn e o NHS-éster, pois são grupos que podem ser ativados *in situ* no momento da reação e assim ter maior afinidade pelas aminas presentes no anticorpo.^[15,119]

Sendo assim, a escolha do agente quelante e também do radionuclídeo é um fator determinante no desenvolvimento de um RIC, pois a química de coordenação do radionuclídeo metálico determinará a geometria e estabilidade do complexo quelante – radionuclídeo. Os radionuclídeos possuem diferentes químicas de coordenação e requerem quelantes com diferentes estruturas moleculares e átomos doadores de elétrons; estes, por sua vez, podem influenciar nas propriedades físicas, comportamento biológico, incluindo a cinética de excreção, do radioimunoconjugado.^[15,74]

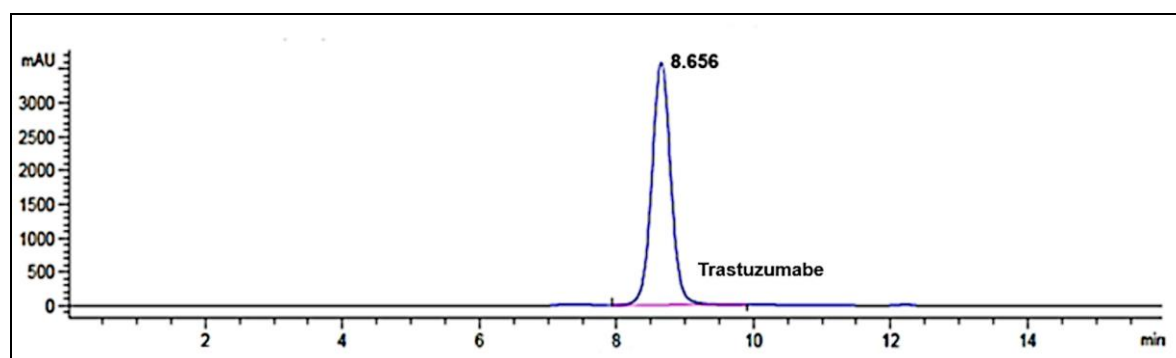
O processo de conjugação ocorre em pH ligeiramente alcalino (8,0 – 9,0) pela reação de hidrólise do grupamento isotiocianato do p-SCN-Bn-DTPA e do grupamento éster, no caso do DOTA-NHS-éster, tornando o grupamento carboxílico do quelante altamente seletivo pelos grupamentos amínicos presentes na cadeia pesada do anticorpo. Porém, a reação de mais de um grupo carboxílico do quelante ao grupo amino do

anticorpo pode diminuir a estabilidade do complexo, assim sendo, a reação de conjugação deve ocorrer com excesso molar do quelante. Neste contexto, o estudo e identificação da razão molar (anticorpo:agente quelante) mais adequada torna-se importante, pois a baixa incorporação de quelante pode comprometer a eficiência e estabilidade da radiomarcagem, e por outro lado, o excesso pode influenciar na imunorreatividade do anticorpo. [15,74]

Para este estudo, com base em trabalhos da literatura e experiências prévias do grupo, foram escolhidas as razões molares 1:10 e 1:20 e os agentes quelantes, p-SCN-Bn-DTPA e DOTA-NHS-éster, para serem conjugados ao trastuzumabe para posterior radiomarcagem com $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente, utilizando condição única de reação: incubação a 37 °C, com agitação de 350 rpm, por 2 horas e pH final da reação entre 8,0 – 9,0.

A princípio, o trastuzumabe foi submetido à purificação para a retirada dos excipientes presentes na formulação comercial, como estabilizantes e conservantes, com o objetivo de evitar qualquer tipo de interferência na ligação do anticorpo ao agente quelante, favorecendo o rendimento da conjugação. O processo foi realizado pela troca de tampão por processo de ultrafiltração em tubo concentrador Amicon. [73,102] O trastuzumabe apresentou-se puro com tempo de retenção de 8,65 minutos, conforme **Figura 12**.

Figura 12 - Perfil cromatográfico em CLAE (UV 280 nm) do trastuzumabe com tempo de retenção (TR) de 8,65 minutos.

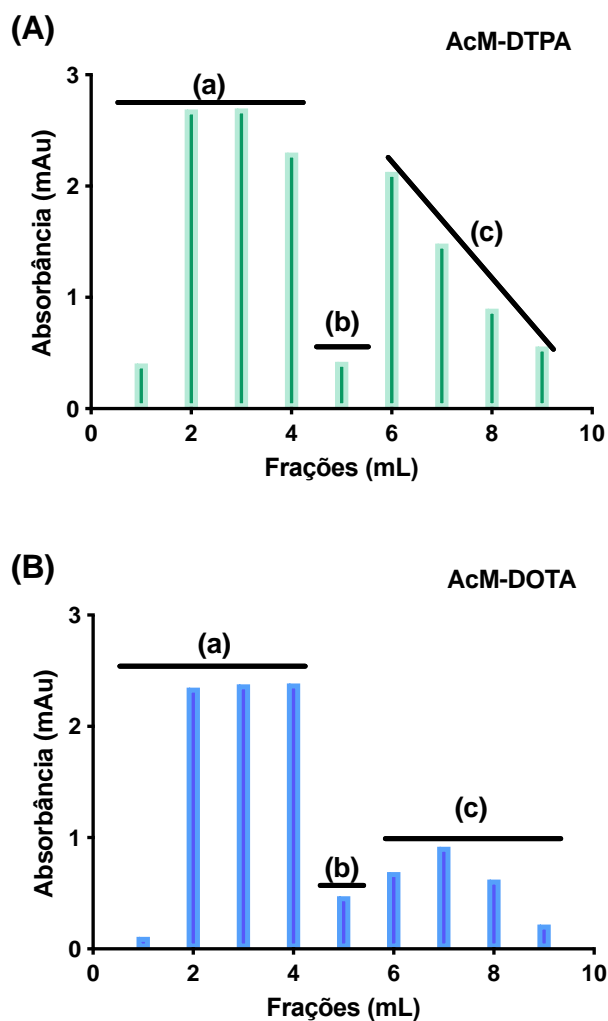


Após o processo de conjugação, observou-se por meio de análise de espectrofotometria UV-VIS, que o trastuzumabe conjugado com o quelante estava presente nas frações 1 a 4 que foram recolhidas para posterior purificação por processo de ultrafiltração por centrifugação em tubo concentrador Amicon®.

As frações 6 a 10 indicaram a presença do quelante e o ponto de intersecção anticorpo-quelante estava presente na fração 5, conforme **Figura 13**. Schjoeth-Eskesen et al. demonstraram a presença do trastuzumabe-DOTA-NHS-éster nas frações 3 a 6 e o quelante livre na fração 10, diferenças entre estudos podem acontecer nesta avaliação, assim a padronização da purificação *in loco* torna-se essencial.^[21]

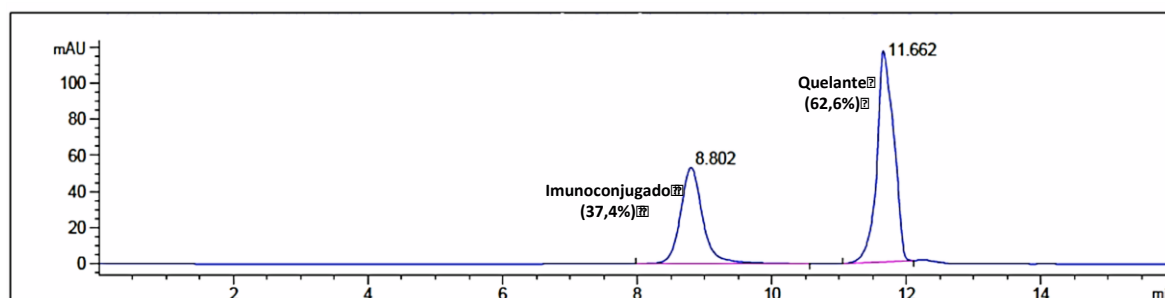
A primeira fase de purificação para retirada do excesso de quelante e separação das frações de interesse utilizou a coluna de exclusão molecular Sephadex® G25 com 10 cm de comprimento de gel. O ponto de intersecção observado pode ser interpretado como a sobreposição das curvas do imunoconjugado AcM-DTPA ou AcM-DOTA com o quelante DTPA ou DOTA devido ao tamanho da coluna. Colunas com maior comprimento poderiam ter sido utilizadas para melhorar a eficiência de separação, porém optou-se pela PD-10 para otimizar o tempo do processo

Figura 13 - Frações dos imunocombinados avaliados por espectrômetro UV-VIS - **(A)** AcM-DTPA e **(B)** AcM-DOTA, sendo **(a)**, as frações de 1 a 4 (imunocombinado - quelante) recolhidas para o processo de purificação, **(b)** a fração do ponto de intersecção AcM-quelante – fração 5, e **(c)** as frações que continham uma quantidade maior de quelante em relação ao imunocombinado que foram desprezadas.



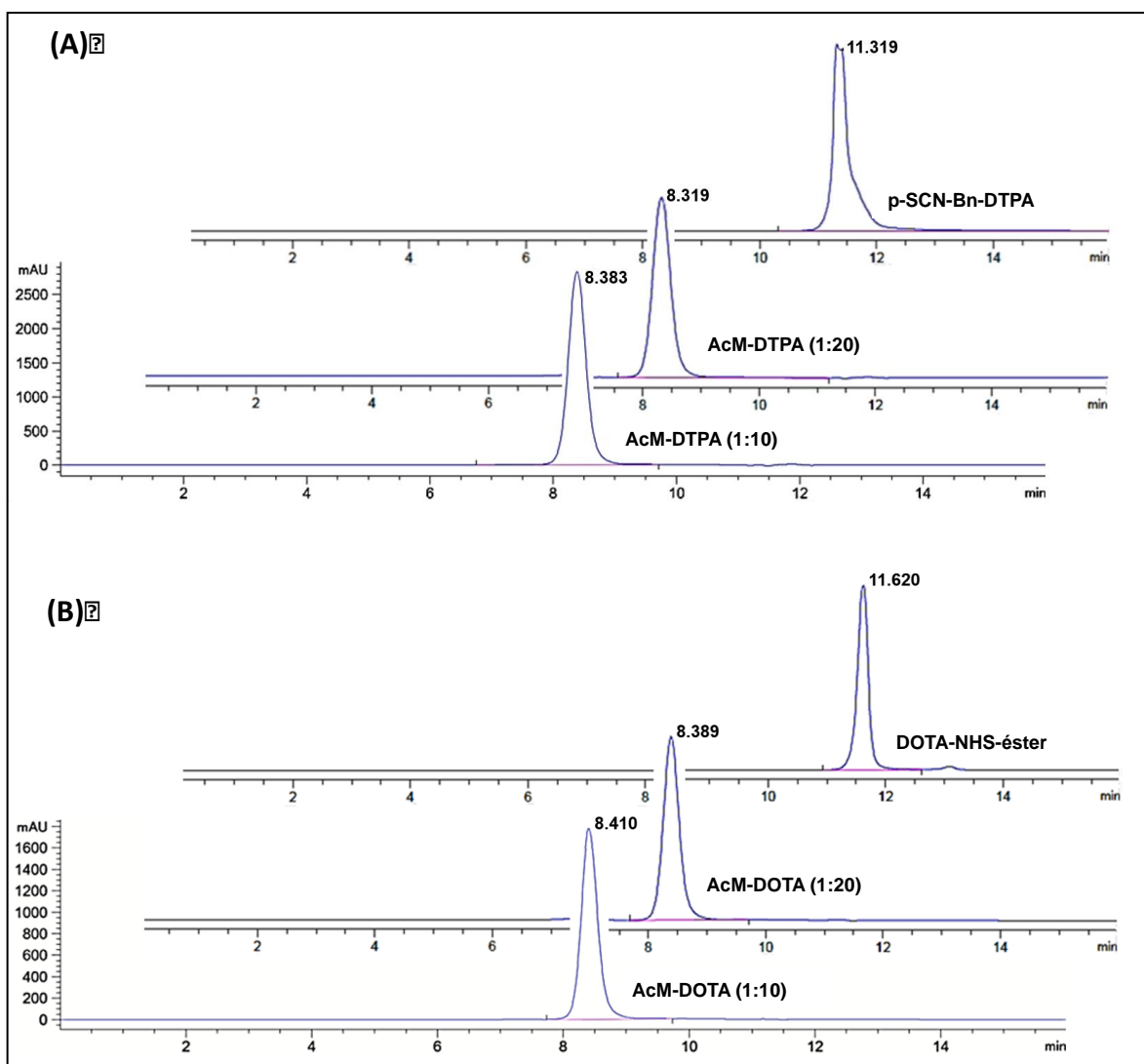
O cromatograma da fração 5, referente ao ponto de intersecção, onde há presença na mesma fração do imunocombinado (TR 8,80) e do quelante (TR 11,66) foi obtido por CLAE - **Figura 14**.

Figura 14 - Perfil cromatográfico em CLAE (UV 280 nm) da fração 5 do processo de purificação por PD-10 do trastuzumabe conjugado ao DOTA na razão molar 1:10.



Os perfis cromatográficos dos imunoconjugados (**Figura 15**), obtidos nas razões molares 1:10 e 1:20, demonstram eficiência dos procedimentos de conjugação e purificação, com os imunoconjugados íntegros e sem a presença dos quelantes livres. Os imunoconjugados, AcM-DTPA e AcM-DOTA, apresentaram tempos de retenção semelhantes no sistema de CLAE empregado, e ligeiramente menores que o TR do anticorpo trastuzumabe, devido ao aumento do peso molecular em função da incorporação dos grupamentos quelantes, uma vez que foi utilizada a coluna de exclusão molecular, onde substâncias com maior peso molecular são eluídas primeiramente.^[120] Não se observou diferença significativa nos TRs dos imunoconjugados em função da razão molar empregada na conjugação. O agente quelante p-SCN-Bn-DTPA apresentou TR = 11,31 minutos e o DOTA-NHS-éster, TR = 11,62 minutos.

Figura 15 – Perfis cromatográficos em CLAE (UV 280 nm) dos imunocombinados após purificação e dos agentes quelantes, **(A)** p-SCN-Bn-DTPA e AcM-DTPA (1:10 e 1:20) e **(B)** DOTA-NHS-éster e AcM-DOTA (1:10 e 1:20).



O processo de purificação dos imunocombinados do presente trabalho foi realizado de forma mista, ou seja, para separação das frações de interesse (frações onde o AcM-quelante estava presente após reação de conjugação) foi utilizada a coluna de exclusão Sephadex® G25 PD-10 com posterior ultrafiltração em tubo concentrador Amicon®. Wojdowska et al. demonstraram a influência que o método de purificação pode exercer no rendimento de conjugação pela comparação, para o RIC rituximabe-DOTA, de 3 tipos de métodos de purificação disponíveis comercialmente: coluna de exclusão PD-10, ultrafiltração por tubo concentrador Amicon® e diálise. Seus resultados mostraram que o maior rendimento de conjugação pode ser obtido pela ultrafiltração (77,2%), seguido da

diálise (50,5%) e coluna de exclusão PD-10 (34%).^[121] Levando em consideração esses resultados, optou-se pelo protocolo misto de purificação, com objetivo de otimizar o tempo do procedimento de conjugação, bem como preservar a integridade do anticorpo, uma vez que a purificação em coluna PD-10 é rápida e reduz o número de ciclos de ultrafiltração por centrifugação.

Vale ressaltar que no processo de conjugação todas as soluções e tampões utilizados foram preparados com água ultrapura ou com água purificada por osmose reversa e tratada com resina trocadora de íons (Chelex[®] 100), bem como as vidrarias utilizadas tratadas com ácido, pois a presença de metais trivalentes (Fe, Al, Cd e Zn) no imunocjugado final, mesmo que em concentrações muito baixas, pode interferir na química de radiomarcção, por competir por sítios de ligação do radionuclídeo metálico existentes no agente quelante.^[122,123]

6.1.2 Determinação do número de quelantes acoplados por molécula de anticorpo

As massas moleculares dos imunocjugados AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões molares 1:10 e 1:20, foram determinadas pela técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF (**Figura 16**), considerado o método mais preciso para este tipo e quantificação.^[11]

O número de quelantes incorporados por molécula de anticorpo foi obtido pela subtração do valor da relação massa/carga (m/z), encontrada na análise de cada razão molar (1:10 e 1:20), do peso molecular teórico do trastuzumabe ($145.531,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o resultado foi dividido pelo peso molecular dos agentes quelantes, $649,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o p-SCN-Bn-DTPA e $761,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ para o DOTA-NHS-éster.

O número médio de moléculas de DTPA acopladas ao trastuzumabe foi de 6 a 7 para as duas razões molares estudadas. Já o número médio de DOTA acoplados ao anticorpo foi de 6 a 7 para a razão molar 1:10 e de 8 a 9 para a razão molar 1:20 (**Tabela 5**) Apenas para o AcM-DOTA foi observada maior incorporação de quelantes com o aumento da razão molar na reação de conjugação. Estes resultados apresentaram-se

maiores quando comparados aos dados da literatura, os quais empregaram o método espectrofotométrico para avaliação.^[19,24,26,89,112] Por exemplo, Rasaneh et al. conjugaram o trastuzumabe com o quelante DOTA-NHS-éster, na razão molar 1:20, e obtiveram, por avaliação espectrofotométrica, 2,1 - 2,7 moléculas de DOTA incorporadas por molécula de anticorpo.^[19] Em contrapartida, Bhusari et al. obtiveram 7,2 moléculas de DOTA incorporados por molécula de trastuzumabe, avaliados pelo método de espectrometria de massas MALDI-TOF.^[107]

Figura 16 - Espectros de massas dos radioimunoconjugados obtidos por MALDI-TOF, **(A)** AcM-DTPA (1:10 e 1:20) e **(B)** AcM-DOTA (1:10 e 1:20).

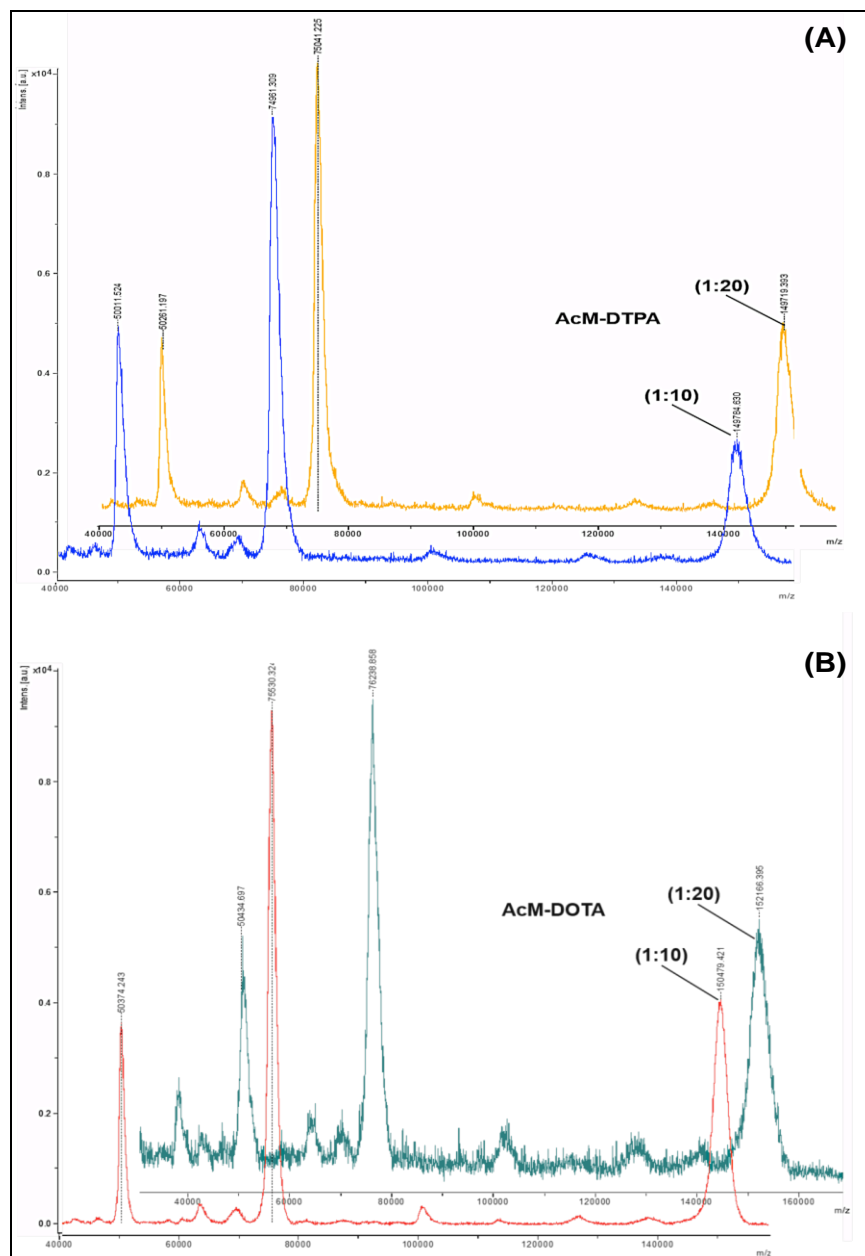


Tabela 5 - Representação dos cálculos para determinação do número de quelantes incorporados ao trastuzumabe a partir dos valores obtidos dos espectros de massa por MALDI-TOF.

| Massa molecular MM (g·mol ⁻¹) | Razão molar do quelante | MALDI-TOF MM (g·mol ⁻¹) | MM imunoconjugado MM trastuzumabe (145.531,5 g·mol ⁻¹)/ MM quelante | Nº de quelantes/AcM |
|--|----------------------------|---|--|------------------------|
| 649,9 | DTPA 1:10 | 149.784,63 | 4.253,13 / 649,9 | 6,54 |
| 649,9 | DTPA 1:20 | 149.719,39 | 4.187,89 / 649,9 | 6,44 |
| 761,5 | DOTA 1:10 | 150.479,42 | 4.947,92 / 761,5 | 6,50 |
| 761,5 | DOTA 1:20 | 152.166,39 | 6.634,89 / 761,5 | 8,71 |

Apesar do resultado de determinação do número de quelantes por anticorpo apontar um número maior de quelantes incorporados para a razão 1:20 da conjugação com o quelante DOTA, o perfil de CLAE dos imunoconjugados (**Figura 15**) não revelou diferença significativa no tempo de retenção dos imunoconjugados de DOTA, obtidos a partir das razões molares 1:10 e 1:20. Tal discrepância reforçou a importância de se estudar as propriedades biológicas de tais imunoconjugados, de modo a avaliar a influência da razão molar empregada.

O número de quelantes incorporados à molécula de anticorpo está diretamente relacionada ao tipo de quelante, bem como à razão anticorpo:quelante, pH, temperatura e tempo de reação e a concentração inicial do imunoconjugado utilizado na radiomarcagem.^[17] Assim sendo, quantificar esse número torna-se uma avaliação importante no desenvolvimento do RIC, pois auxilia na escolha da melhor razão molar. Estudos anteriores observaram que o acoplamento excessivo de moléculas de quelante ao anticorpo pode comprometer os padrões de imunorreatividade e de biodistribuição do radioimunoconjugado. ^[11,26,74,124-127]

Zimmermann et al. relataram que, para o anticorpo chCE7, a ligação de 18 moléculas do quelante DO34 por anticorpo levou à diminuição da imunorreatividade (*in vitro*) em 25% e a captação tumoral (*in vivo*) em 80%, com aumento da captação hepática em 40%, sugerindo ser o limite para preservação da imunorreatividade e das propriedades de biodistribuição a incorporação de 11 quelantes por anticorpo.^[125] Tendo em vista esses estudos prévios, Alirezapour et al. utilizaram a proporção de 6 quelantes

por anticorpo para condução dos ensaios pré-clínicos realizados para o radioimunoconjugado trastuzumabe-DOTA-¹¹¹In.^[26]

Nos itens seguintes deste estudo será realizada uma discussão comparativa entre as razões molares estudadas (1:10 e 1:20), para os RICs, trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu, em relação às propriedades físico-químicas e de ligação às células que expressam os receptores HER2.

6.1.3 Análise da integridade estrutural dos imunocombinados

A avaliação qualitativa da integridade estrutural dos anticorpos após incorporação dos quelantes foi realizada por SDS-PAGE, sob condição não reduzida e reduzida. As bandas dos imunocombinados, nas razões molares 1:10 e 1:20 foram comparadas com a banda do anticorpo não combinado e com o padrão de peso da proteína com o objetivo de verificar se o processo de imunocombinação e purificação comprometeram a integridade da estrutura do trastuzumabe.

A densitometria foi realizada com o intuito de confirmar o peso molecular médio das bandas avaliadas.

Na condição não reduzida, o trastuzumabe, bem como os imunocombinados avaliados apresentaram peso molecular médio de 168,02 KDa, este resultado é comparável aos estudos anteriores da literatura (**Figura 17**).^[26,128,129]

Na condição reduzida (**Figura 18**), observou-se duas bandas com peso molecular médio de 56,46 kDa e 24,48 kDa que correspondem à cadeia pesada e à cadeia leve da molécula de IgG, respectivamente, que foram separadas devido à quebra das pontes de dissulfeto.

Os perfis de migração no gel de poliácridamida e densitométrico dos imunocombinados, nas condições não reduzida e reduzida, mostraram-se similares ao trastuzumabe não combinado, sugerindo assim que não houve degradação do anticorpo devido à reação de combinação.

Figura 17 - (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, na condição não reduzida, sendo: (P) padrão de peso molecular; (1) trastuzumabe; (2) trastuzumabe-DOTA (1:10); (3) trastuzumabe-DOTA (1:20); (4) trastuzumabe-DTPA (1:10) e (5) trastuzumabe-DTPA (1:20); **(B)** Perfil densitométrico e **(C)** Média dos pesos moleculares das amostras não reduzidas.

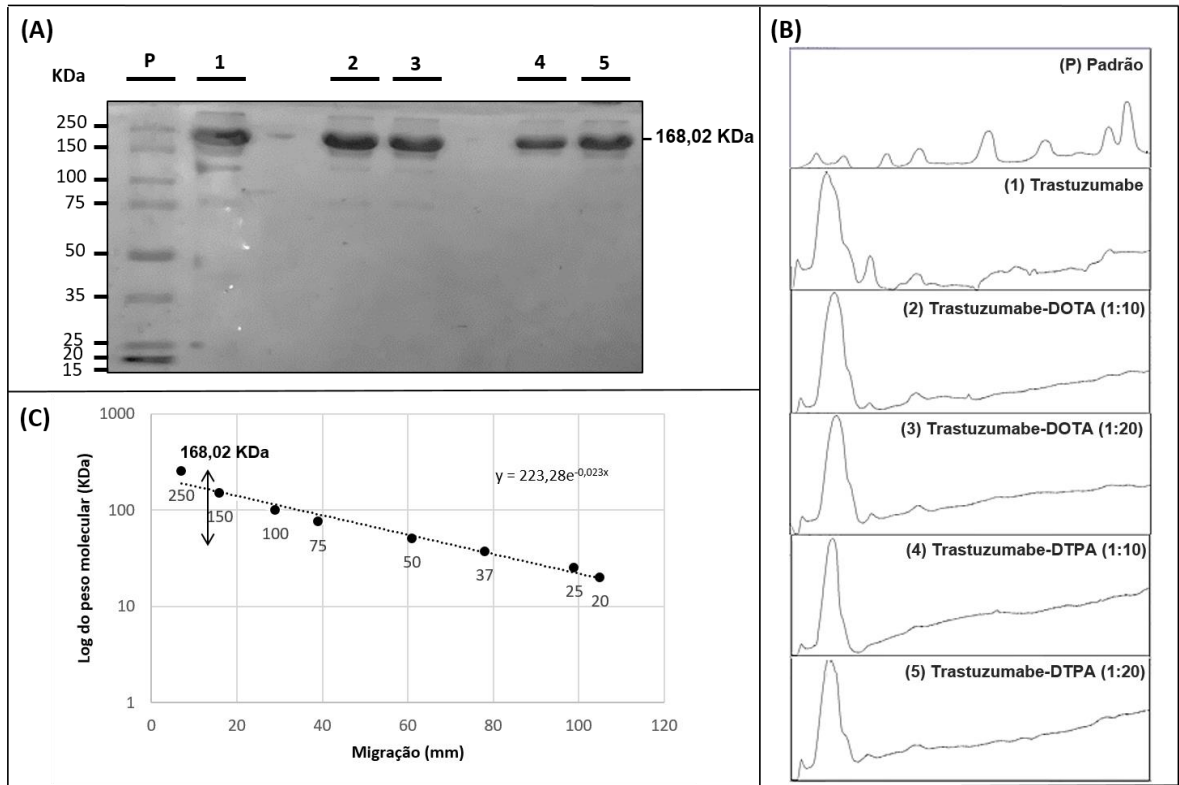
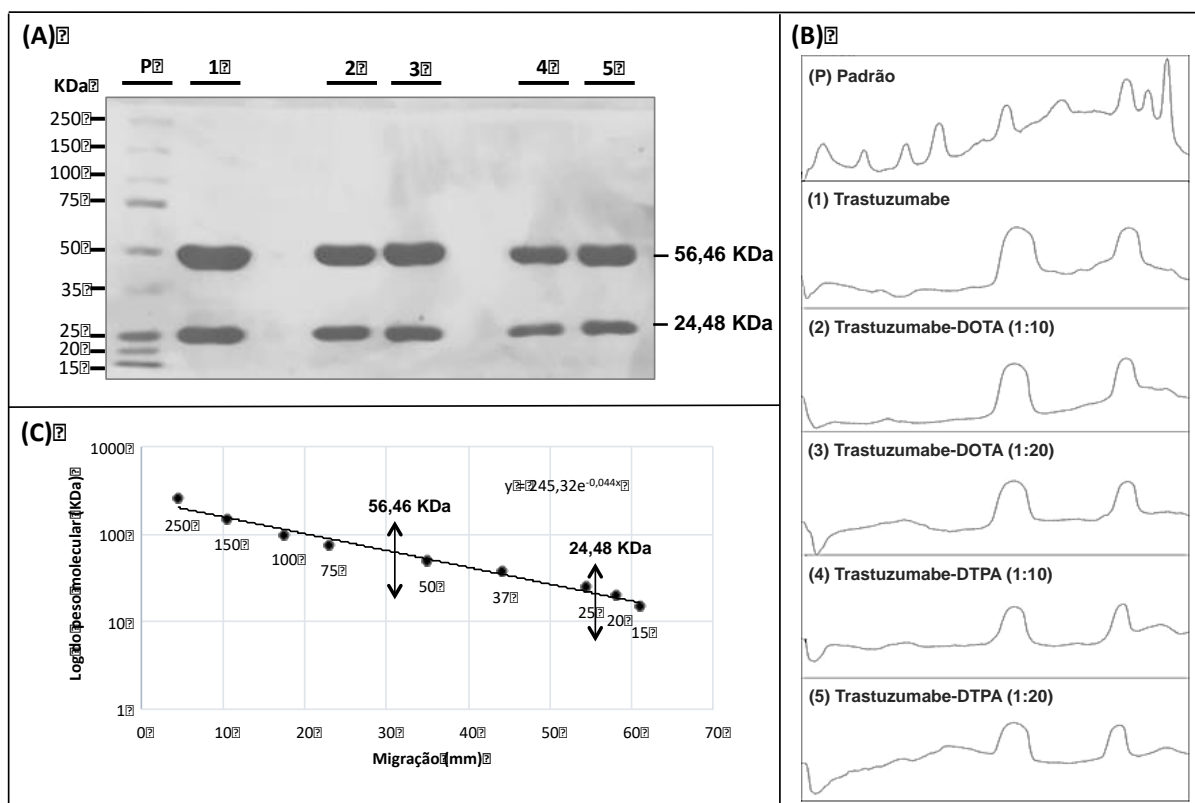


Figura 18 - (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, na condição reduzida, sendo: (P) padrão de peso molecular; (1) trastuzumabe; (2) trastuzumabe-DOTA (1:10); (3) trastuzumabe-DOTA (1:20); (4) trastuzumabe-DTPA (1:10) e (5) trastuzumabe-DTPA (1:20); **(B)** Perfil densitométrico e **(C)** Média dos pesos moleculares das amostras reduzidas.



Gianini et al. verificaram para o anticorpo tenatumomabe, por análises em espectrometria de massas MALDI-TOF, que as reações de conjugação ocorreram preferencialmente na cadeia pesada do anticorpo, principalmente para os quelantes derivados de DOTA; mas, que no caso do isotiocianato (DTPA), a conjugação também pode ocorrer na cadeia leve.^[130] As massas moleculares encontradas na avaliação de Gianini et al. são similares às obtidas neste trabalho pela avaliação por SDS-PAGE.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pode avaliar a ocorrência de reações químicas de polimerização, que podem acontecer devido ao processo de conjugação do agente quelante ao anticorpo, especialmente aos quelantes que contêm dois grupos reativos que interagem com os grupamentos amino das lisinas em duas biomoléculas separadas (ligação intermolecular). O emprego de um agente quelante que contenha apenas um grupo reativo simples, por exemplo, SCN-Bz-DTPA, ao invés de cDTPA, pode evitar a ocorrência desse tipo de reação. O nível de polimerização tolerável depende da

biomolécula, mas é desejável que ocorra em menos que 10% do maior peso molecular da espécie para evitar a diminuição da imunorreatividade ou da afinidade de ligação ao receptor, bem como minimizar o sequestro do sistema reticuloendotelial.^[131]

6.1.4 Avaliação da estabilidade dos imunocombinados

Os imunocombinados AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões molares 1:10 e 1:20, armazenados sob congelamento (-20 °C), mostraram-se estáveis durante o período de 1 ano, apresentando pureza superior a 98%, conforme resultados obtidos em CLAE. Apesar da ligeira diminuição da pureza observada nos dois radioimunocombinados, não houve perda estatisticamente significativa da estabilidade ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que o AcM-DTPA razão molar 1:20 tende a ser mais estável em relação a razão 1:10. Por outro lado, os dados apontam que o AcM-DOTA na razão 1:10 tende a ser mais estável em relação à razão 1:20 (**Figuras 19 e 20**).

Figura 19 - Avaliação por CLAE (UV 280 nm) da estabilidade dos imunocombinados AcM-DTPA e AcM-DOTA, nas razões molares 1:10 e 1:20, armazenados sob a temperatura de -20 °C durante o período de 1 ano. Os valores estão expressos como “média \pm desvio-padrão” da porcentagem de pureza dos imunocombinados (n = 5).

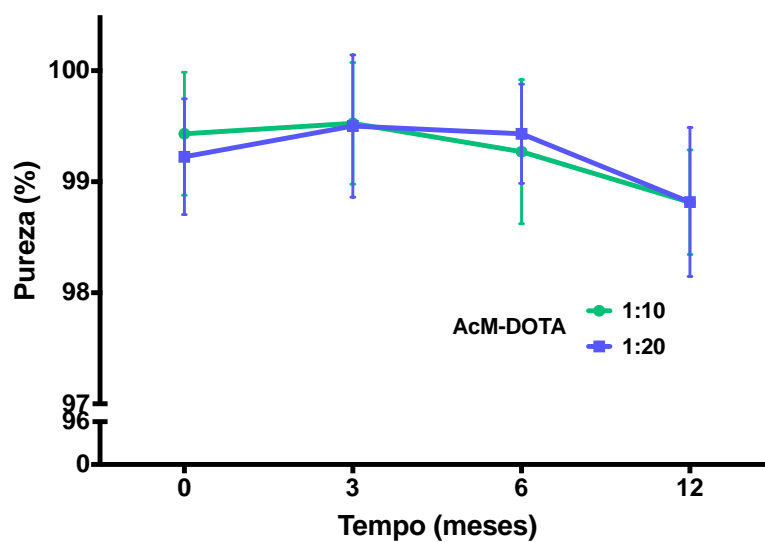
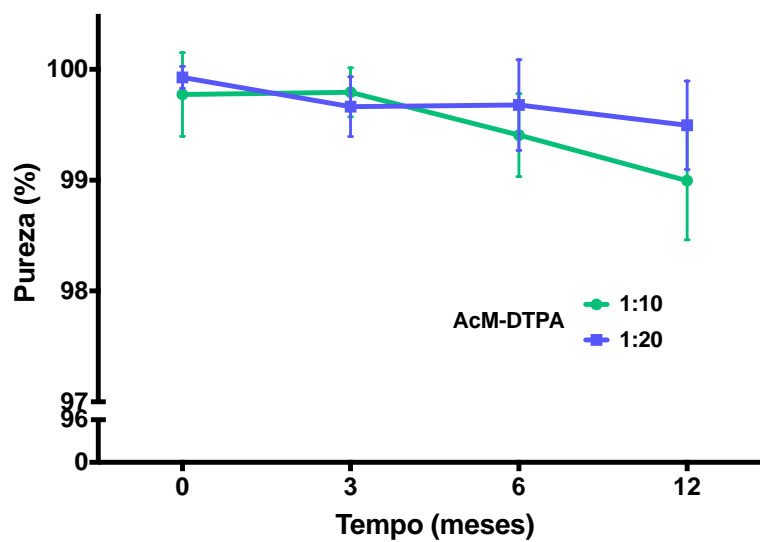
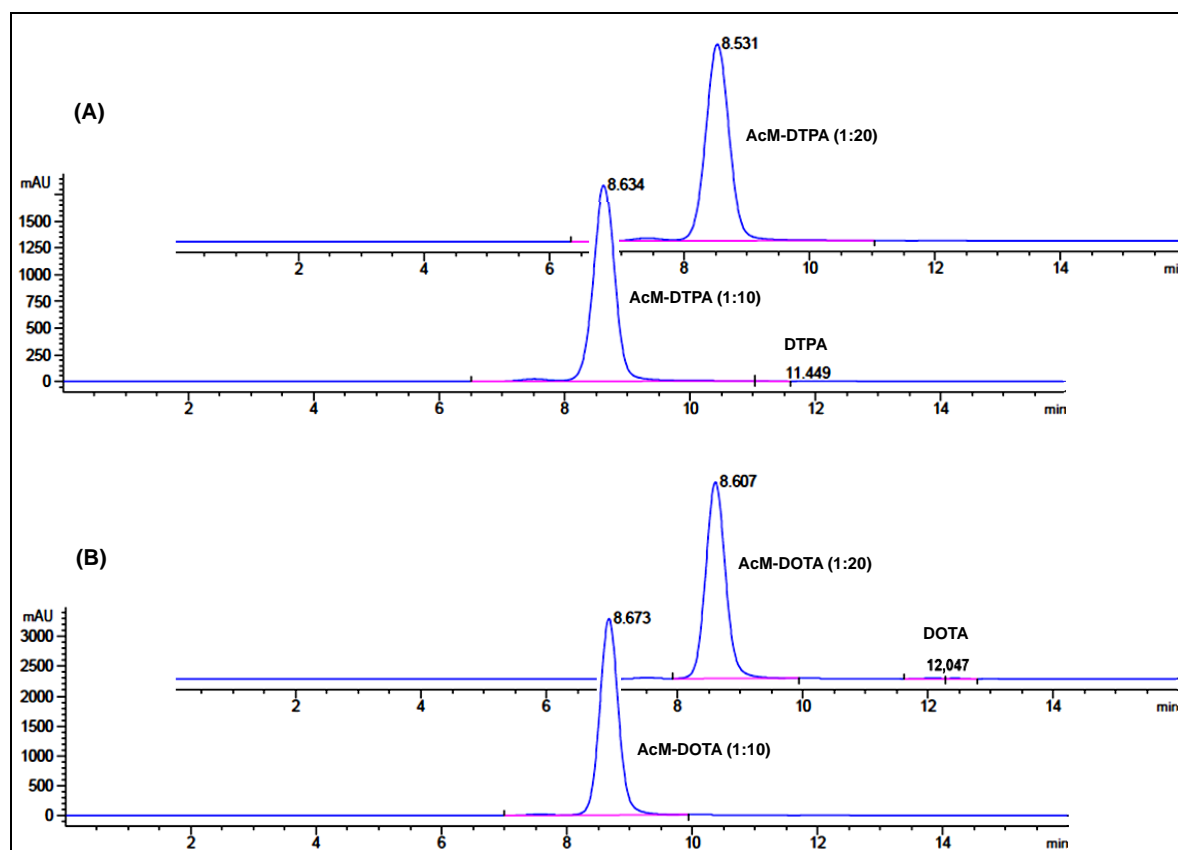


Figura 20 - Perfis cromatográficos em CLAE (UV 280 nm) dos imunocombinados íntegros após 1 ano da conjugação com pureza superior a 99%, sendo **(A)** AcM-DTPA (1:10) – RT 8,63 minutos e AcM-DTPA (1:20) – RT 8,53 minutos; **(B)** AcM-DOTA (1:10) - RT 8,67 minutos e AcM-DOTA (1:20) – RT 8,60 minutos.



Estudos envolvendo o pertuzumabe-Bz-DTPA demonstraram que este imunocombinado, sob a forma liofilizada, mostrou-se estável até quatro meses armazenado sob refrigeração (2-8 °C).^[108,132] No presente trabalho, o processo de liofilização dos imunocombinados não estava contemplado nos objetivos, porém os resultados de estabilidade na forma congelada (-20 °C) foram satisfatórios no período avaliado de 1 ano.

A avaliação da estabilidade do imunocombinado sob determinada condição de armazenamento é uma etapa importante do estudo porque permite determinar o prazo de validade do imunocombinado, uma vez que os processos de conjugação e purificação envolvem várias etapas e um determinado tempo para execução. Assim, ter imunocombinados prontos para a radiomarcagem facilita uma possível rotina de produção.

6.2 Radioimunoconjugação

6.2.1 Radiomarcação

A literatura dispõe de diferentes protocolos de marcação do trastuzumabe com radionuclídeos metálicos.^[19-21,24-26,29,71,81,82,88,89,91,93,94]

Radioisótopos trivalentes metálicos tendem a não formar interações fortes de forma direta com estruturas proteicas, assim a conjugação a um agente quelante bifuncional é um processo necessário para que ocorra a incorporação do metal, formando assim, complexos altamente estáveis.^[73,102]

A radiomarcação de imunoconjugados com metais trivalentes, como o $^{111}\text{InCl}_3$ e o $^{177}\text{LuCl}_3$, pode ser obtida por incubação prologada à temperatura ambiente, já que proteínas submetidas à temperatura alta por um período de tempo longo tende a sofrer desnaturação. Por outro lado, a permanência prolongada do anticorpo em solução contendo o metal radioativo pode levar à radiólise da proteína. Por este motivo, deseja-se um protocolo de radiomarcação rápido e eficiente.^[11]

O radionuclídeo índio-111 (^{111}In) é produzido em ciclotron pela reação nuclear $^{111}\text{Cd} (p, n) ^{111}\text{In}$, possui meia-vida de 67,9 horas (2,80 dias). Após produção, o ^{111}In é separado do cádmio pelas técnicas de extração por solvente, troca iônica ou ambas; embora a coprecipitação com hidróxido férrico também seja uma técnica utilizada. Decai por captura eletrônica com duas emissões de radiação gama (γ), de 171 e 245 KeV (91% e 94% de abundância, respectivamente), por isso é utilizado para radiomarcas moléculas com o objetivo de usá-las no diagnóstico de doenças pela aquisição de imagens em gama câmara SPECT.^[74]

O ^{111}In é um metal do grupo IIIB caracterizado como um ácido forte com preferência por base forte. Seu estado de oxidação mais prevalente em solução aquosa é +3 e foi demonstrado que nesse estado de oxidação, ocorre a formação de complexos termodinamicamente estáveis com 4, 5 e 6 ligantes de coordenação, sendo 6 ligantes o

mais estável. Devido à sua alta densidade de carga, possui preferência por átomos aceptores de elétrons, como os grupamentos amínicos. A química de coordenação e as propriedades biológicas do In (III) são semelhantes ao Fe (III). Por ser altamente carregado com cátions, sua hidrólise em pH maior que 4, necessária no processo de radiomarcção, é um significativo desafio. Uma outra questão a ser considerada é a formação de hidróxidos (OH) em função do pH maior que 7. Íons trivalentes são estáveis em solução aquosa em pH ácido, porém deseja-se pH próximo do neutro na formulação final.^[74,133,134]

O trastuzumabe foi conjugado ao p-SCN-Bn-DTPA para ser radiomarcado com $^{111}\text{InCl}_3$. A vantagem de conjugar um agente quelante acíclico ao anticorpo, como o DTPA, é que pode-se obter, eficiência de radiomarcção alta, em procedimento rápido e sob condições amenas, com estabilidade termodinâmica maior em comparação com outros quelantes.^[133]

Já o lutécio-177 (^{177}Lu) é um radionuclídeo que pode ser produzido em reator, decai para háfnio-11 (^{177}Hf) por três emissões beta (β^-), sendo 177 KeV (12%), 385 KeV (9%) e 498 KeV (79%) e duas emissões de raios γ de 113 KeV (7%) e 208 KeV (11%), com meia-vida de 160,4 horas (6,7 dias). Um dos métodos para produzi-lo envolve irradiação do ^{176}Lu enriquecido em reator (n, γ). Por este método, o ^{177}Lu é obtido com custo baixo, rendimento alto e atividade específica mediana.^[74] A baixa energia da emissão β^- do ^{177}Lu é adequada para ser utilizada em terapia, pois além de proporcionar menor dose de radiação à medula óssea, quando comparada à exposição do ^{90}Y , promove baixa penetração no tecido alvo, o que pode ser uma característica importante para o tratamento de tumores pequenos.^[19,107]

O DOTA-NHS-éster foi escolhido para conjugação ao trastuzumabe e posterior marcação com $^{177}\text{LuCl}_3$ por ser um agente quelante macrocíclico que promove estabilidade cinética e termodinâmica maior. Contudo, sua cinética de radiomarcção é mais lenta quando comparada ao DTPA, requerendo aquecimento, que pode representar uma etapa crítica na marcação de biomoléculas como anticorpos monoclonais, tornando ainda mais importante avaliar a estabilidade do radiomarcado.^[133]

Diante dessas peculiaridades, com intuito de otimizar esta etapa do trabalho, um protocolo único foi escolhido para otimizar a radiomarcção dos imunocorpusculados, trastuzumabe-DTPA e trastuzumabe-DOTA (1:10 e 1:20) com $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$, respectivamente. O protocolo de reação estabelecido foi: massa inicial de 1 mg/0,2 mL (concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão acetato de amônio 0,25 M, temperatura de 42 °C; tempo de 1 hora e pH entre 6,5 – 7,0. Essa condição teve como base o estudo desenvolvido por Massicano, 2016, com modificações.^[135]

6.2.2 Análise da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados

Sabe-se que o pH, a temperatura, a natureza do agente quelante, bem como a atividade molar (atividade específica) podem influenciar diretamente na pureza radioquímica do anticorpo.^[134] Por esta razão, após determinação do protocolo a ser implementado no processo de radiomarcção, a avaliação da pureza radioquímica se torna essencial. A princípio, diferentes sistemas cromatográficos utilizando camada delgada (CCD) foram avaliados para determinação da melhor condição a ser utilizada em todas as avaliações realizadas nesse trabalho. Os resultados obtidos estão na **Tabela 6**. A padronização foi realizada com o radioimunoconjugado AcM-DTPA- ^{111}In (1:10).

Tabela 6 - Avaliação da pureza radioquímica do AcM-DTPA- ^{111}In (1:10) em diferentes sistemas cromatográficos ($n = 3$).

| Atividade (MBq) | Sistemas cromatográficos (CCD) | | | | |
|-----------------------|---|--|---|--|--|
| | iTLC-SG (MeOH:EDTA 50nmol/L em tampão acetato de amônio 0,1M - 1:1) | iTLC-SG (MeOH:Acetato de amônio 1M - 1:1 - pH 8,5) | iTLC-SG (Tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0) | TLC-SG (Al) (MeOH:NH ₃ 10% - 1:1) | iTLC-SG (MeOH:NH ₃ 10% - 1:1) |
| | % AcM-DTPA- ^{111}In | | | % DTPA- ^{111}In | |
| 37 | 92,30 ± 0,09 | 94,00 ± 0,29 | 93,86 ± 0,40 | 3,34 ± 0,10 | 21,37 ± 14,18 |
| 74 | 90,08 ± 0,25 | 91,43 ± 0,04 | 90,28 ± 0,58 | 3,96 ± 0,46 | 22,42 ± 6,68 |
| 148 | 87,24 ± 0,06 | 89,36 ± 0,66 | 88,39 ± 0,33 | 5,03 ± 1,07 | 27,23 ± 1,14 |
| 296 | 92,28 ± 0,13 | 93,31 ± 0,47 | 93,50 ± 0,20 | 5,04 ± 0,96 | 14,45 ± 0,69 |
| $^{111}\text{InCl}_3$ | 93,19 ± 1,73 | 90,66 ± 1,77 | 96,35 ± 0,79 | 99,64 ± 0,18 | 91,22 ± 1,51 |

A escolha dos sistemas baseou-se na melhor capacidade de separação cromatográfica das impurezas do radioimunoconjugado, bem como do radionuclídeo livre, em diferentes atividades de marcação.

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção. Entretanto, usando-se fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas. Entre os adsorventes mais utilizados na análise de radiofármacos estão: a sílica (SiO_2) e a alumina (Al_2O_3). Em geral, a sílica apresenta caráter fracamente ácido e pode ser empregada na separação de compostos lipofílicos utilizando o mecanismo de adsorção. A alumina possui características alcalinas e também pode ser empregada na separação de compostos lipofílicos. O solvente ou mistura de solventes a ser utilizado como fase móvel possui papel fundamental na separação da mistura. Entende-se que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente.^[136,137]

Desta maneira, para avaliação da pureza radioquímica dos RICs por CCD foram escolhidos os sistemas cromatográficos: (1) iTLC-SG (fibra de vidro) como fase estacionária e tampão citrato de sódio 0,1 M (pH = 5,0) como fase móvel para quantificação das impurezas. A fase móvel com pH ácido permite que os radiometais migrem para o frente da fita cromatográfica (**Figura 21 A**).

Para a quantificação dos quelantes livres foi escolhido o sistema (2) TLC-SG (alumínio) como fase estacionária e metanol: NH_3 10% 1:1 (v/v) como fase móvel, pois o sistema empregando iTLC-SG para a mesma mistura de solventes apresentou resultados de impurezas discordantes do sistema empregando TLC-SG e dos sistemas de CCD empregando tampão citrato de sódio 0,1 M (pH = 5,0) como fase móvel. Os radiometais sofrem hidrólise em pH básico, formando espécies coloidais, e assim, precipitam na origem da fita (**Figura 21 B**).^[138]

No sistema 1, os radioimunoconjugados permanecem na origem da fita (FR = 0) e as impurezas (DTPA- ^{111}In e $^{111}\text{InCl}_3$; DOTA- ^{177}Lu e $^{177}\text{LuCl}_3$) migram juntas para o

fronte (FR = 1) – **Figura 22**. No sistema 2, os radioimunoconjugados, bem como os radionuclídeos livres permanecem na origem (FR = 0) e os quelantes radiomarcados livres (DTPA- ^{111}In e DOTA- ^{177}Lu) migram para o frente (FR = 1) - **Figura 23**. Nos dois sistemas cromatográficos, os radioimunoconjugados permanecem na origem da fita devido ao tamanho e carga da proteína (trastuzumabe) – aproximadamente 150 kDa.^[26]

Figura 21 - Perfis cromatográficos representativos dos radionuclídeos $^{111}\text{InCl}_3$ e $^{177}\text{LuCl}_3$ avaliados em TLC-scanner, sendo **(A)** sistema 1 e **(B)** sistema 2.

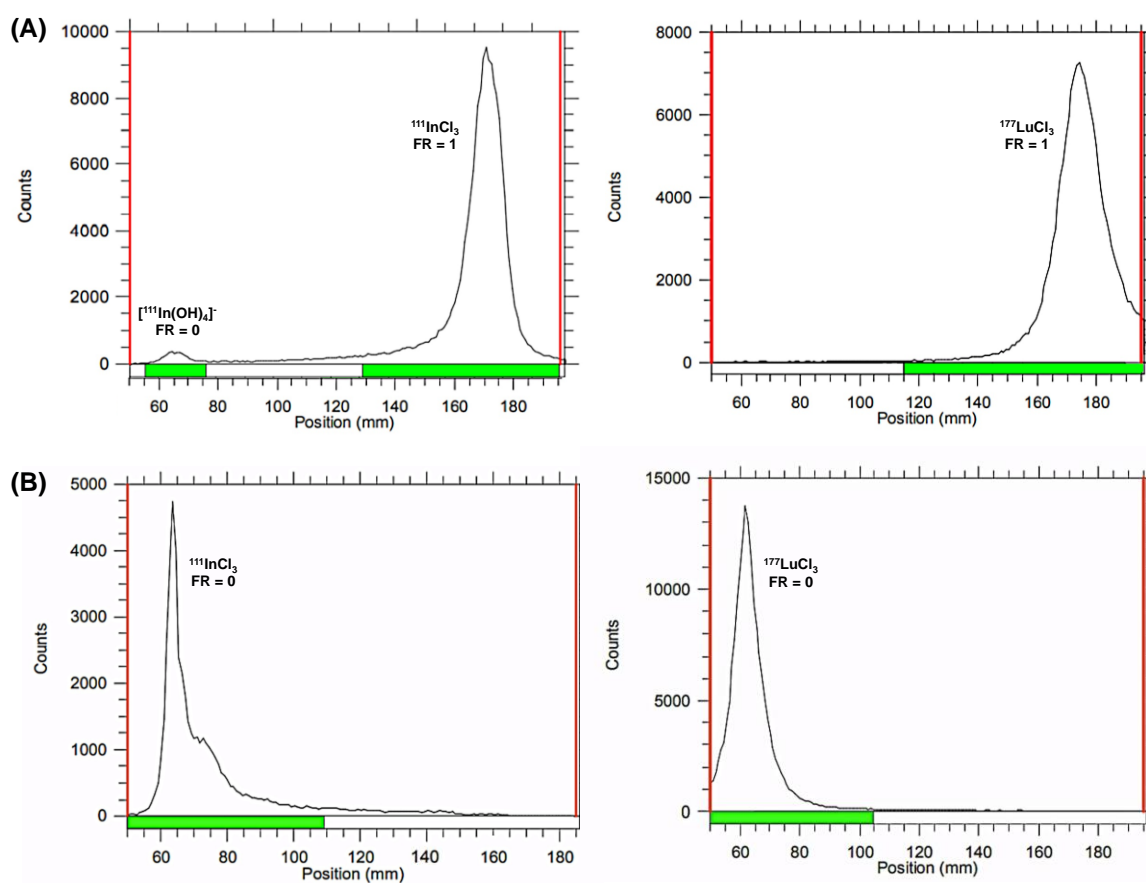


Figura 22 – Perfis cromatográficos representativos, avaliados em TLC-scanner, das marcações do trastuzumabe, com atividade de 296 MBq, sendo **(A)** AcM-DTPA- ^{111}In e **(B)** AcM-DOTA- ^{177}Lu no sistema cromatográfico 1 (iTLC-SG / tampão citrato de sódio 0,1 M - pH = 5,0).

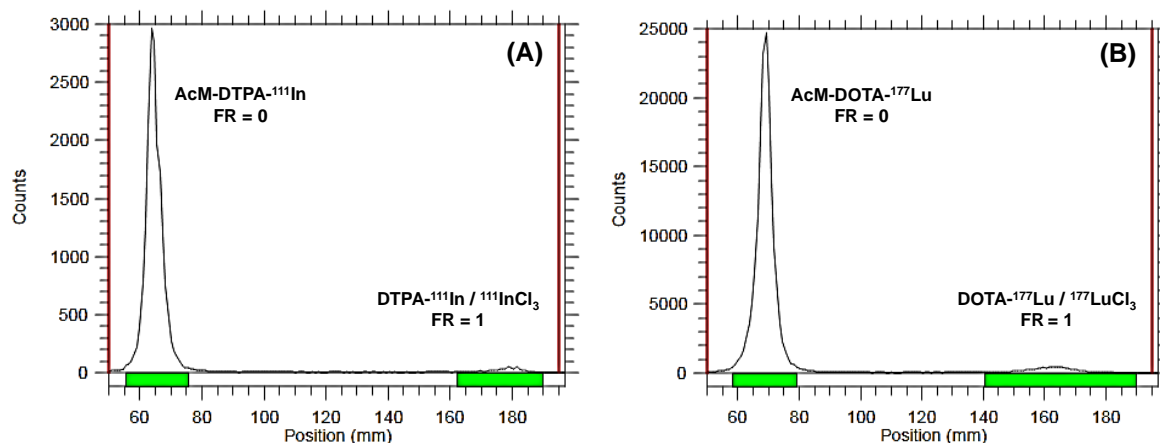
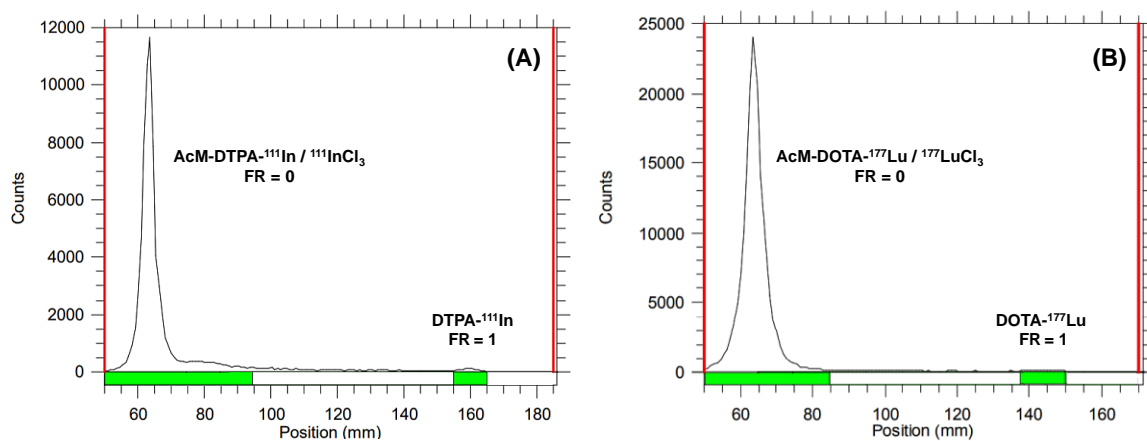


Figura 23 - Perfis cromatográficos representativos, avaliados em TLC scanner, das marcações do trastuzumabe com atividade de 296 MBq, sendo **(A)** AcM-DTPA- ^{111}In e **(B)** AcM-DOTA- ^{177}Lu no sistema cromatográfico 2 (TLC-SG / metanol:amônia 10%).



As **Tabelas 7 e 8** compilam as porcentagens dos rendimentos de marcação do AcM-DTPA- ^{111}In e do AcM-DOTA- ^{177}Lu , bem como as porcentagens de DTPA- ^{111}In -DOTA- ^{177}Lu livres avaliados por CCD. Para a avaliação da estabilidade após 24 horas da radiomarkação, os RICs foram armazenados sob refrigeração.

Tabela 7 - Avaliação da pureza radioquímica e estabilidade (24 horas sob refrigeração) do AcM-DTPA-¹¹¹In nos sistemas cromatográficos escolhidos ($n = 3$), para as razões molares de conjugação 1:10 e 1:20 radiomarcadas com diferentes atividades.

| Pureza radioquímica - AcM-DTPA- ¹¹¹ In | | | | | | |
|---|----------------------------|----------|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Atividade (MBq) | Atividade molar (MBq/nmol) | Tempo | Razão molar 1:10 | | Razão molar 1:20 | |
| | | | iTLC-SG (tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0) | TLC-SG (Al) (MeOH: Amônia 10% - 1:1) | iTLC-SG (tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0) | TLC-SG (Al) (MeOH: Amônia 10% - 1:1) |
| | | | % AcM-DTPA- ¹¹¹ In | % DTPA- ¹¹¹ In | % AcM-DTPA- ¹¹¹ In | % DTPA- ¹¹¹ In |
| 37 | 5,39 | Imediato | 94,38 ± 0,36 | 3,73 ± 0,20 | 96,78 ± 0,19 | 4,61 ± 0,62 |
| | | 24h | 94,10 ± 0,96 | 4,15 ± 0,50 | 97,14 ± 0,11 | 3,55 ± 0,43 |
| 74 | 10,77 | Imediato | 94,60 ± 1,00 | 4,36 ± 0,28 | 94,74 ± 0,42 | 5,69 ± 1,39 |
| | | 24h | 94,73 ± 0,21 | 4,01 ± 0,23 | 93,69 ± 0,48 | 3,57 ± 0,24 |
| 148 | 21,54 | Imediato | 94,37 ± 0,23 | 4,62 ± 0,67 | 96,93 ± 0,34 | 4,38 ± 0,50 |
| | | 24h | 93,88 ± 0,80 | 5,02 ± 0,76 | 91,25 ± 0,20 | 4,66 ± 0,90 |
| 296 | 43,09 | Imediato | 95,33 ± 0,12 | 5,33 ± 1,35 | 96,21 ± 0,43 | 4,88 ± 0,04 |
| | | 24h | 95,52 ± 0,13 | 4,61 ± 0,18 | 96,35 ± 0,18 | 4,98 ± 0,35 |

Tabela 8 - Avaliação da pureza radioquímica e estabilidade (24 horas sob refrigeração) do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu nos sistemas cromatográficos escolhidos ($n = 3$), para as razões molares de conjugação 1:10 e 1:20 radiomarcadas com diferentes atividades.

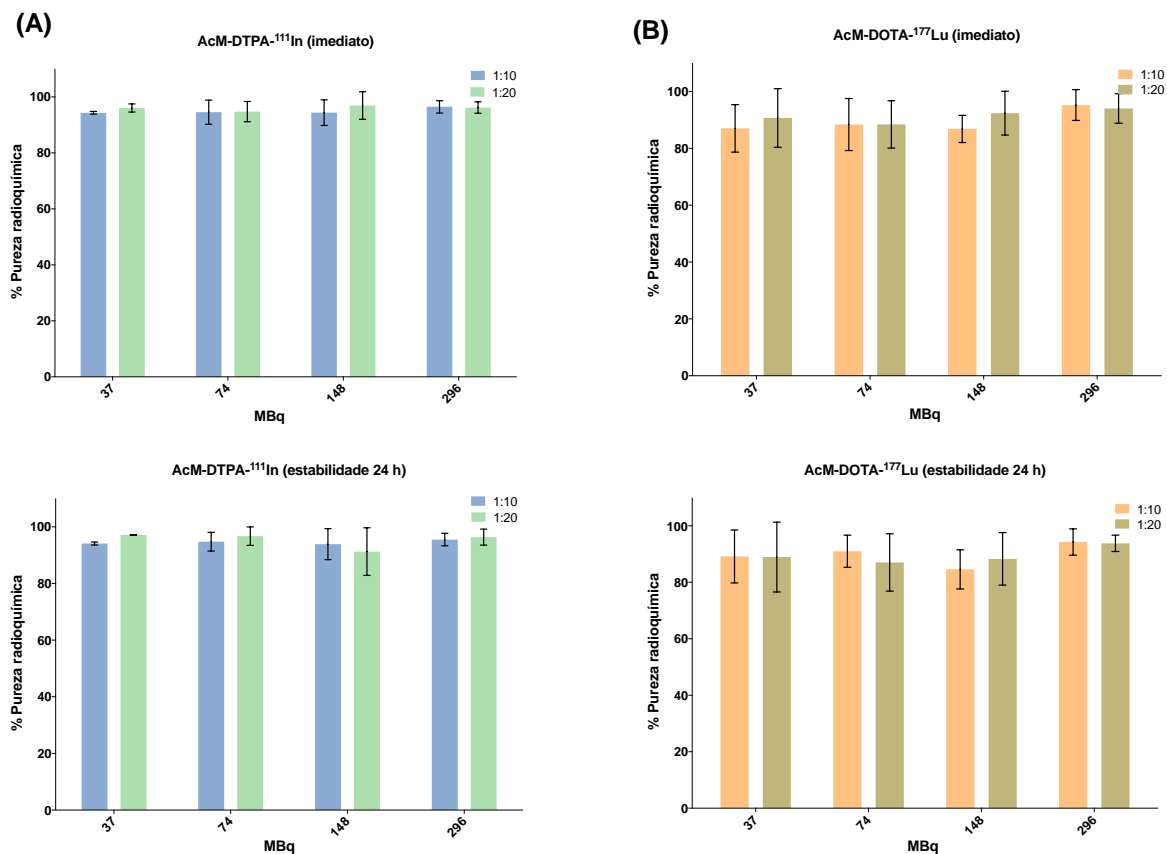
| Pureza radioquímica - AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu | | | | | | |
|---|----------------------------|----------|---|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Atividade (MBq) | Atividade molar (MBq/nmol) | Tempo | Razão molar 1:10 | | Razão molar 1:20 | |
| | | | iTLC-SG (tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0) | TLC-SG (Al) (MeOH: Amônia 10% - 1:1) | iTLC-SG (tampão citrato de sódio 0,1M - pH 5,0) | TLC-SG (Al) (MeOH: Amônia 10% - 1:1) |
| | | | % AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu | % DOTA- ¹⁷⁷ Lu | % AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu | % DOTA- ¹⁷⁷ Lu |
| 37 | 5,39 | Imediato | 87,02 ± 2,04 | 3,54 ± 0,63 | 90,69 ± 1,56 | 3,83 ± 0,63 |
| | | 24h | 89,19 ± 1,17 | 6,61 ± 0,06 | 88,96 ± 0,40 | 10,28 ± 1,59 |
| 74 | 10,77 | Imediato | 89,55 ± 0,03 | 2,94 ± 0,30 | 88,43 ± 0,07 | 9,94 ± 1,45 |
| | | 24h | 87,77 ± 0,66 | 6,67 ± 0,57 | 87,06 ± 0,16 | 11,90 ± 2,06 |
| 148 | 21,54 | Imediato | 86,83 ± 0,76 | 1,55 ± 0,30 | 92,41 ± 0,25 | 9,59 ± 0,64 |
| | | 24h | 84,61 ± 1,48 | 5,42 ± 0,14 | 88,34 ± 1,62 | 11,03 ± 1,64 |
| 296 | 43,09 | Imediato | 95,25 ± 1,26 | 2,55 ± 0,65 | 94,04 ± 1,11 | 8,68 ± 0,25 |
| | | 24h | 94,25 ± 0,92 | 4,19 ± 0,37 | 93,81 ± 0,50 | 7,52 ± 1,28 |

A média das porcentagens da pureza radioquímica dos radioimunoconjugados, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, nas razões molares 1:10 e 1:20 e nas atividades molares avaliadas, foram superiores a 94% e 86%, respectivamente, sem purificação, mostrando estabilidade após 24 horas da radiomarcção nas atividades molares experimentadas. Não houve diferença estatisticamente significativa na pureza radioquímica para as diferentes atividades e razões molares ($p > 0,05$) – Teste *two-way* ANOVA (**Figura 24**).

Os valores da pureza radioquímica do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, não purificado, apresentaram-se menores podendo ser atribuídos à condição única de marcação empregada realizada para ambos RICs, sem preocupação com a otimização dos parâmetros e sem correção da massa do anticorpo em função da variação da atividade específica do radionuclídeo em cada lote adquirido. Além disso, a alta atividade específica do ¹¹¹InCl₃, isento de carregador, quando comparado à atividade específica do ¹⁷⁷LuCl₃ (≥ 500 GBq/ mg) certamente contribuiu para os resultados de pureza radioquímica maiores e mais reprodutíveis. Neste caso, a purificação em coluna de exclusão molecular PD-10 é indicada para remover o excesso do radionuclídeo livre.

Todos os experimentos *in vitro* e *in vivo* desse trabalho foram realizados com a maior atividade molar estudada (43,09 MBq/nmol) e com pureza radioquímica superior a 90%, quando inferior ao esperado, o radioimunoconjugado foi purificado com intuito de aumentar a pureza radioquímica.

Figura 24 - Avaliação da pureza radioquímica por CCD dos radioimunoconjugados, nas razões molares 1:10 e 1:20, após radiomarcagem e estabilidade de 24 horas. **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 3$).



Os tempos de retenção (TR) dos imunoconjugados, agentes quelantes, radionuclídeos e radioimunoconjugados foram determinados por CLAE, conforme **Figura 25 e 26**.

Figura 25 – Perfis cromatográficos obtidos por CLAE representativos dos tempos de retenção (TRs) relacionados ao **(A)** AcM-DTPA 1:10 (TR = 8,82 minutos; UV = 280 nm); **(B)** p-SCN-Bn-DTPA (TR = 11,31 minutos; UV = 280 nm); **(C)** $^{111}\text{InCl}_3$ (TR = 12,19 minutos – detecção radioativa) e **(D)** AcM-DTPA- ^{111}In 1:10 (TR = 9,25 minutos – detecção radioativa).

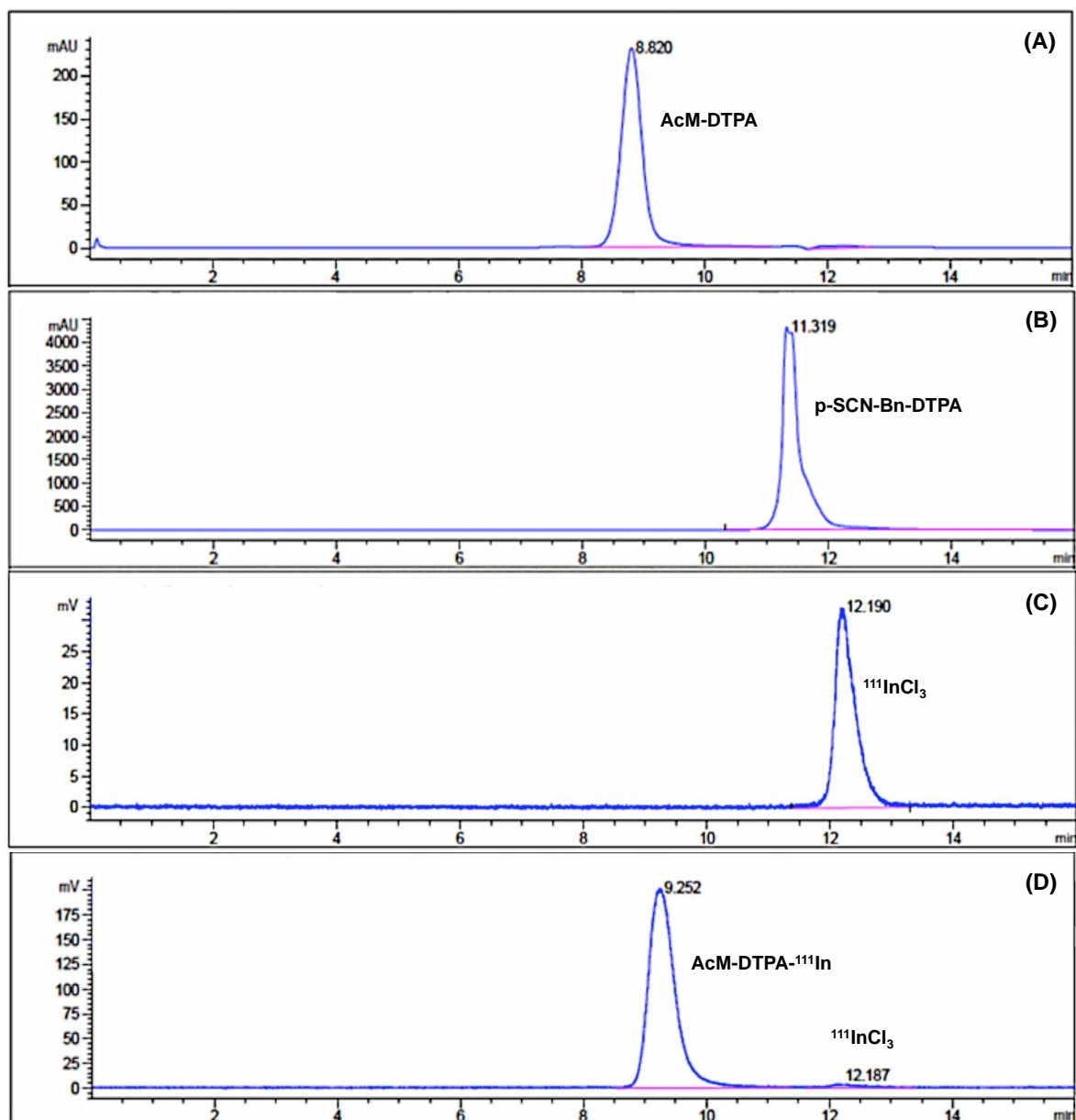
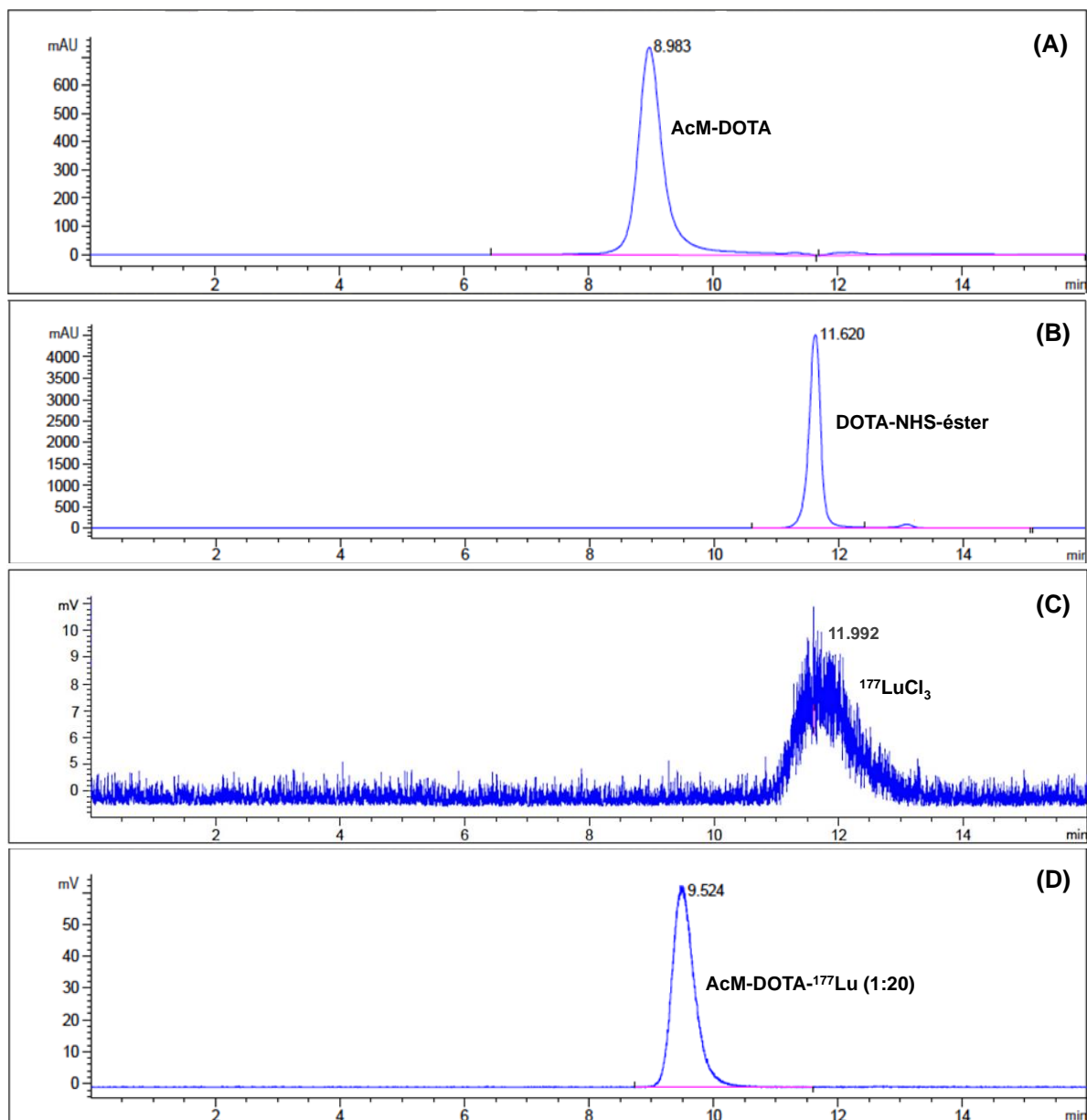


Figura 26 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE representativos dos tempos de retenção (TRs) relacionados ao **(A)** AcM-DOTA 1:20 (TR = 8,98 minutos; UV 280 nm); **(B)** DOTA-NHS-éster (TR = 11,62 minutos; UV 280 nm) e **(C)** $^{177}\text{LuCl}_3$ (TR = 11,99 minutos - detecção radioativa) e **(D)** AcM-DOTA- ^{177}Lu 1:20 (TR = 9,52 minutos - detecção radioativa).

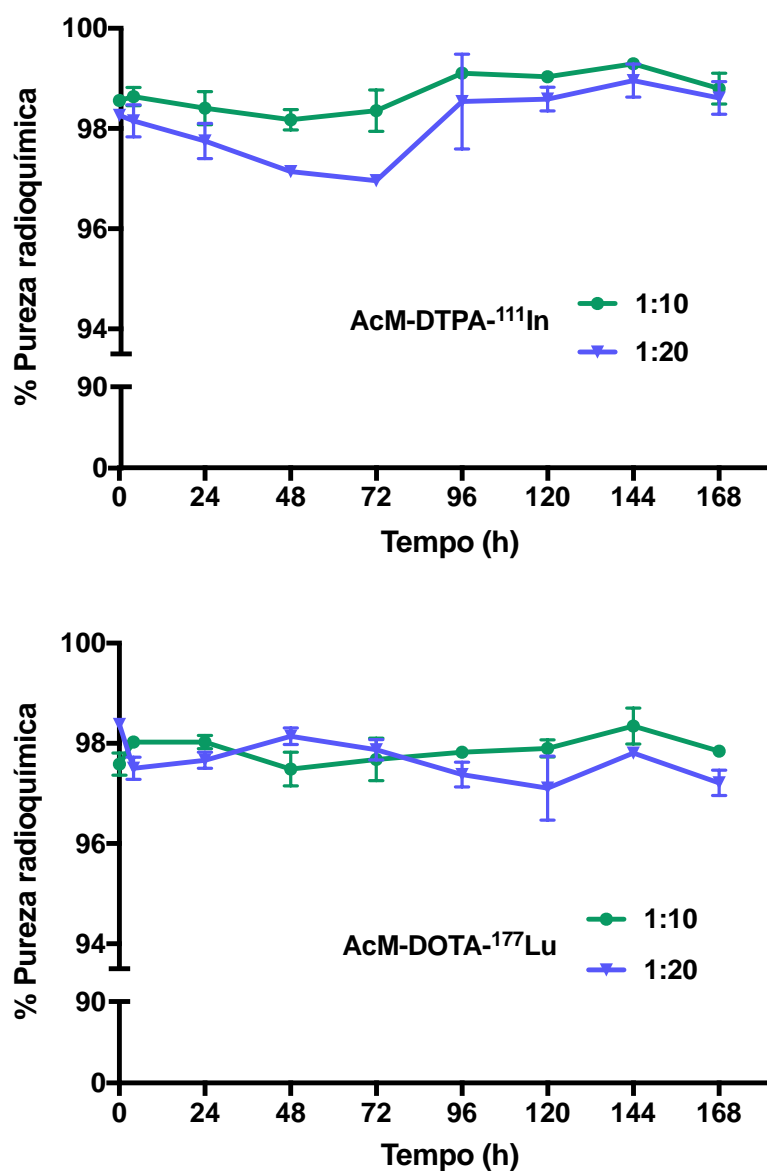


6.2.3 Avaliação da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional

A avaliação da estabilidade por CCD mostrou que os RICs, AcM-DTPA- ^{111}In e AcM-DOTA- ^{177}Lu (1:10 e 1:20), radiomarcados com 296 MBq/nmol, maior atividade molar experimentada, permaneceram estáveis em meio reacional (tampão acetato de amônio

0,25 M (pH = 6,5 – 7,0) e sob temperatura de 2-8 °C, durante todo o período estudado (até 168 horas), com pureza radioquímica superior a 96% (**Figura 27**), demonstrando estabilidade de ligação dos quelantes ao anticorpo, bem como estabilidade dos complexos formados com os radionuclídeos, conforme dados da literatura.^[19,26,29] A razão anticorpo:quelante não influenciou na estabilidade do radioimunoconjugado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as purezas radioquímicas ao longo do tempo ($p > 0,05$) – Teste *two-way* ANOVA.

Figura 27 - Estabilidade dos radioimunoconjugados (296 MBq/nmol) mantidos em meio reacional e sob refrigeração até 168 horas. Os valores estão expressos como “média \pm desvio-padrão” ($n = 3$).



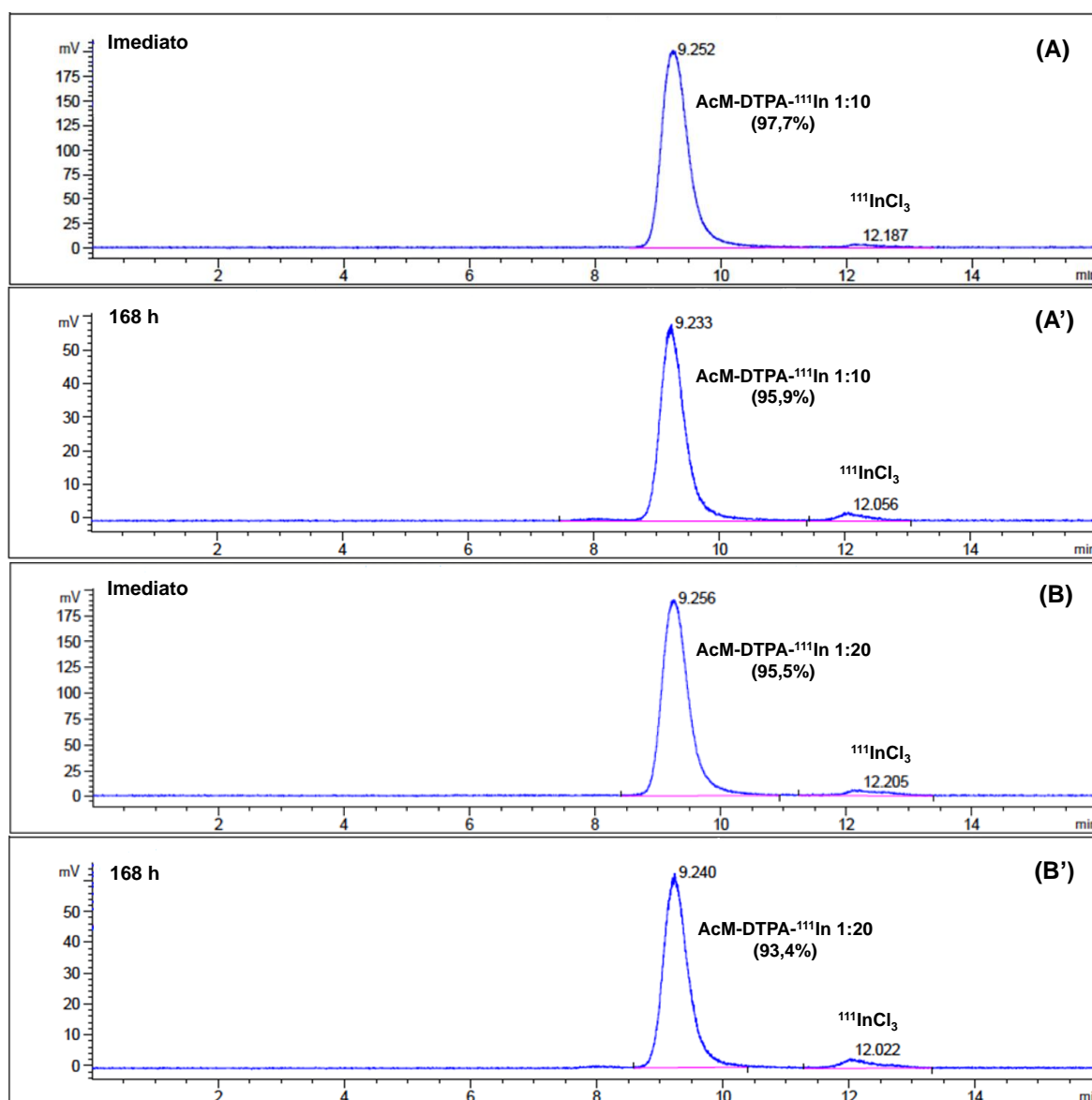
A avaliação da estabilidade por CLAE (**Figura 28**) mostrou que, no período estudado, a pureza radioquímica do AcM-DTPA- ^{111}In , na razão 1:10, diminuiu de 97,7% para 95,9% e, na razão 1:20, de 95,5% para 93,4%.

Apesar da literatura apontar possível labilidade cinética do complexo formado com DTPA acíclico, resultando na dissociação do radiometal^[133], o trastuzumabe-DTPA- ^{111}In apresentou-se estável por 168 horas, armazenado sob refrigeração.

Os resultados do estudo de Blend et al. mostraram que o trastuzumabe-DTPA- ^{111}In , na razão molar 1:10, também manteve-se estável quando mantido sob temperatura ambiente e 37 °C durante o período de 96 horas, sem diminuição da pureza radioquímica.^[29]

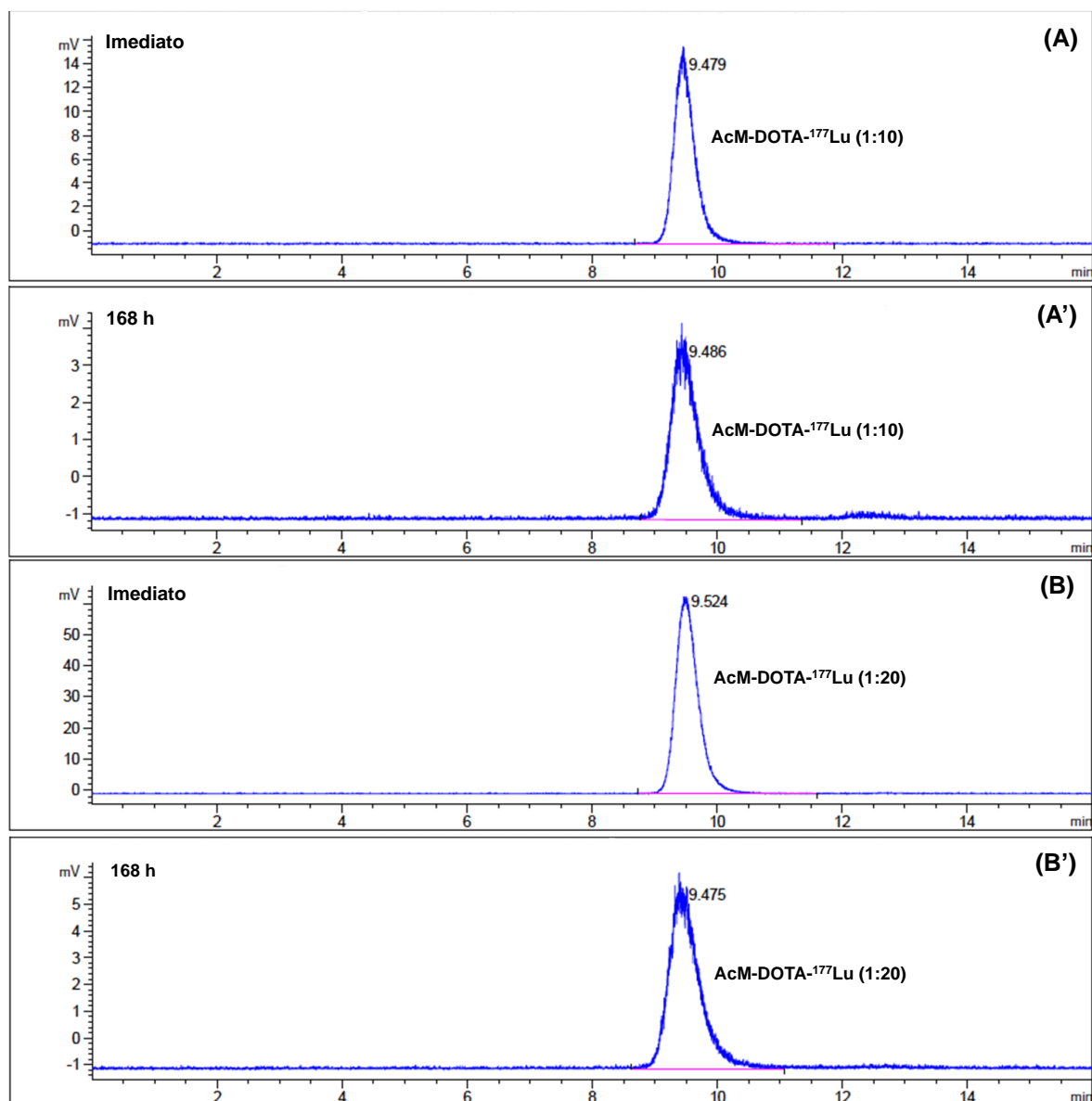
Lub-de Hooge et al. descreveram alta estabilidade do trastuzumabe-DTPA- ^{111}In armazenado sob temperatura de 4 °C, em tampão PBS por 14 dias.^[25]

Figura 28 – Estabilidade do AcM-DTPA-¹¹¹In avaliada por CLAE (UV = 280 nm), sendo (A) e (A') referentes a razão molar 1:10, nos tempos imediato e 168 horas após radiomarcção; (B) e (B') representando a razão 1:20 nas mesmas condições.



Esta análise também foi realizada para o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (**Figura 29**), porém o radioimunoconjugado foi purificado logo após o processo de radiomarcção. A pureza radioquímica na razão molar 1:10 diminuiu, insignificamente, de 99,5% para 98,8% e, na razão 1:20, de 99,3% para 98,7% durante as 168 horas avaliadas. O DOTA-NHS-éster, por ser um agente quelante macrocíclico, promoveu maior estabilidade cinética e termodinâmica quando comparado ao agente quelante acíclico p-SCN-Bn-DTPA.^[133]

Figura 29 - Estabilidade do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu avaliada por CLAE (detecção radioativa), sendo **(A)** e **(A')** referentes a razão molar 1:10, nos tempos imediato e 168 horas após radiomarcagem; **(B)** e **(B')** representando a razão 1:20 nas mesmas condições.



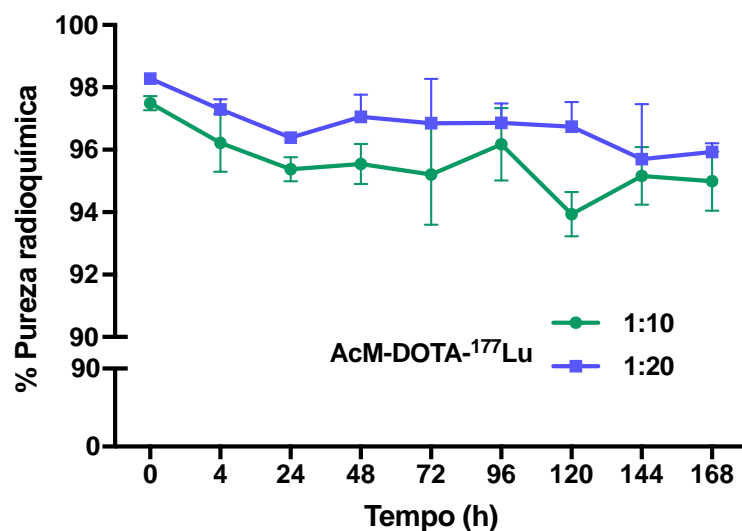
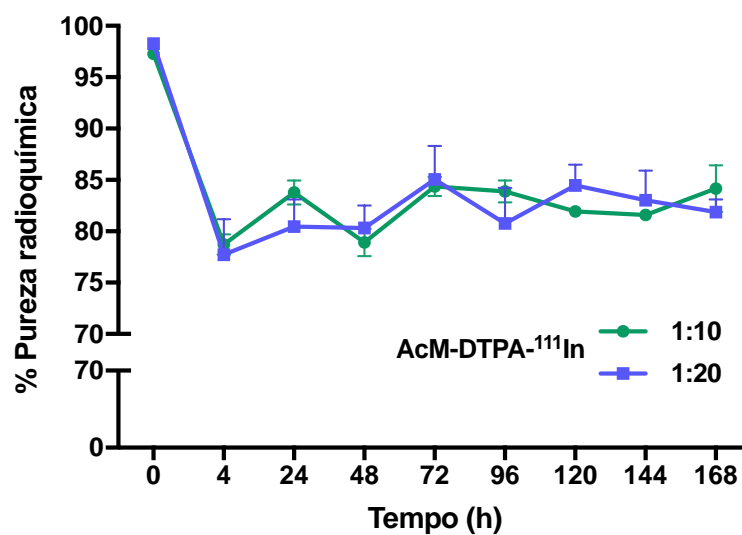
6.3 Estudos *in vitro*

6.3.1 Estudo da estabilidade dos radioimunoconjugados em soro

Em soro de roedor, o AcM-DTPA-¹¹¹In e o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentaram pureza radioquímica superior à 75% e 94%, respectivamente, nas duas razões molares

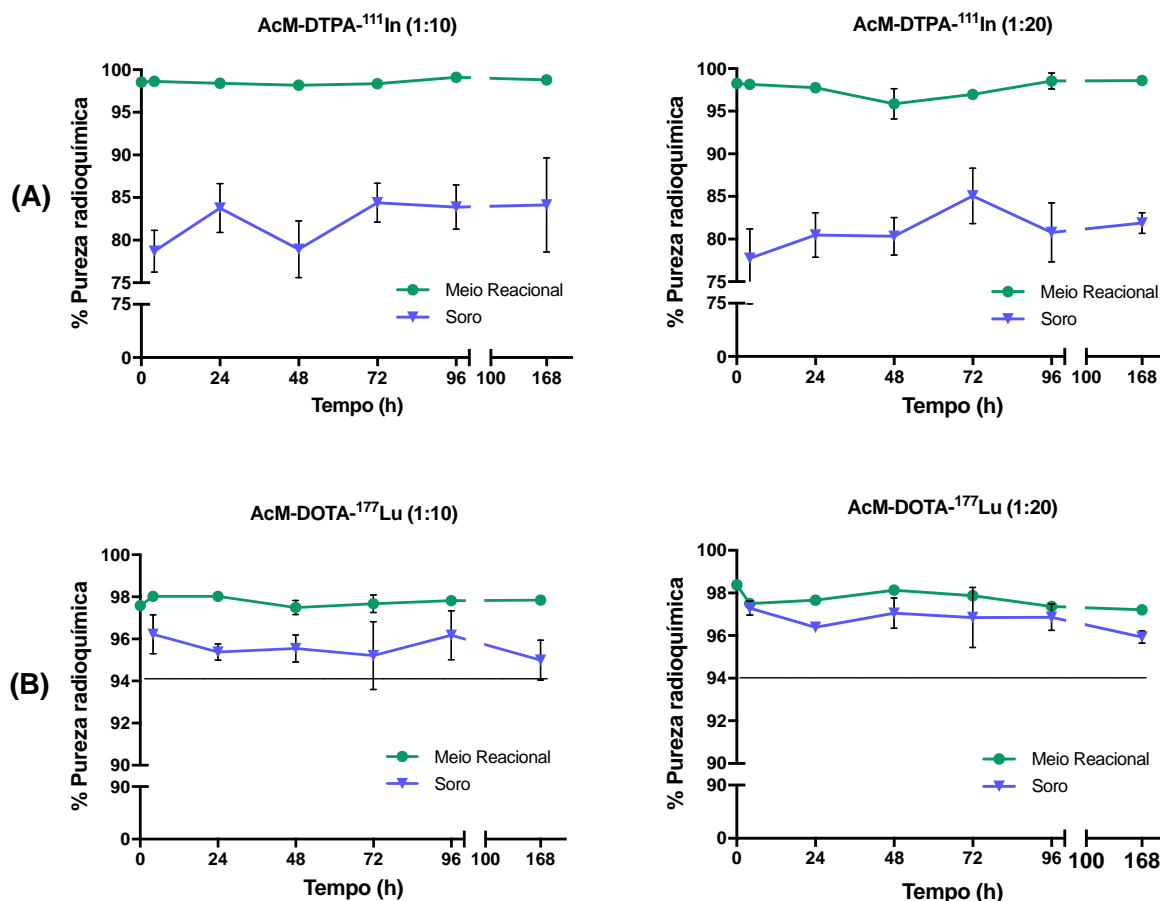
(1:10 e 1:20), mostrando estabilidade durante as 168 horas avaliadas - **Figura 30**.

Figura 30 - Estabilidade dos radioimunoconjugados (296 MBq/nmol) mantidos em soro de roedor, à 37 °C por 168 horas. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 6$).



Conforme a **Figura 31 A**, o AcM-DTPA-¹¹¹In, em comparação aos resultados obtidos em meio reacional, perdeu estabilidade quando incubado em soro. A pureza radioquímica diminuiu de aproximadamente 95% (meio reacional) para 75% (soro), em ambas razões molares.

Figura 31 – Avaliação comparativa da estabilidade dos radioimunoconjugados em meio reacional ($n = 3$) e soro de roedor ($n = 6$) por CCD até 168 horas, sendo **(A)** AcM-DTPA- ^{111}In e **(B)** AcM-DOTA- ^{177}Lu , nas razões molares 1:10 e 1:20. Os valores estão expressos como “média \pm desvio-padrão”.



Como a química de coordenação e as propriedades biológicas do In^{3+} são semelhantes ao Fe^{3+} , *in vivo*, os átomos de ferro competem com os átomos de índio por sítios específicos de ligação com proteínas, como a transferrina, lactoferrina e ferritina.^[133] Pode ocorrer também a possível troca do agente quelante utilizado para a reação de marcação com a transferrina.^[74]

Desta forma, a diminuição da estabilidade, em soro, do radioimunoconjugado que possui DTPA em sua constituição, pode ocorrer pelo processo de transquelação leve do ^{111}In , ou ainda do agente quelante, com componentes séricos.^[139]

Lub et al. observaram, para o trastuzumabe-DTPA- ^{111}In incubado ao soro à 37 °C, decréscimo da estabilidade pelo processo de transcomplexação do ^{111}In para transferrina, estimado por análises em CLAE, em 7% por dia, correspondendo a 35 – 40%

em 5 dias.^[25] Em contrapartida, Blend et al. relataram ligeira diminuição da estabilidade em plasma humano após 96 horas de incubação.^[29]

Entretanto, o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, nas razões molares avaliadas, apresentou boa estabilidade em soro, sem perda significativa ($p > 0,05$), em comparação com a estabilidade obtida em meio reacional – **Figura 31 B**. Este resultado mostrou-se congruente com o estudo que Rasaneh et al. realizaram para o RIC em questão, porém o autor utilizou soro humano e avaliou a estabilidade até 96 horas.^[19]

Cooper et al. estudaram o rituximabe-⁶⁴Cu e verificaram que o anticorpo conjugado com o agente quelante DOTA e derivados macrocíclicos mostraram-se altamente mais estáveis em soro em comparação ao DTPA.^[13]

6.3.2 Ligação dos radioimunocombinados às proteínas séricas

O plasma sanguíneo contém 93% de água e 7% de diferentes compostos, principalmente, de proteínas. A albumina é a principal proteína dessa fração e constitui, aproximadamente, 5% do plasma total. As proteínas são encontradas não apenas no plasma, mas também nos tecidos. Exercem a função de transportar substâncias pela corrente sanguínea, incluindo os fármacos. Desta forma, muitos medicamentos estão ligados às proteínas plasmáticas, esta ligação é reversível, inespecífica e depende de vários fatores característicos do fármaco.^[140]

Quase todos os fármacos, radioativos ou não, se ligam às proteínas plasmáticas em graus variáveis, sendo a principal candidata para a ligação, a albumina. Esta ligação é influenciada por uma série de fatores, como: o pH, a carga e o tamanho da molécula do radiofármaco, bem como a concentração de ânions no plasma que representará sua afinidade pelas proteínas. Em um pH mais baixo, as proteínas plasmáticas tornam-se mais carregadas positivamente e, portanto, as drogas aniônicas se ligam firmemente à elas.^[69]

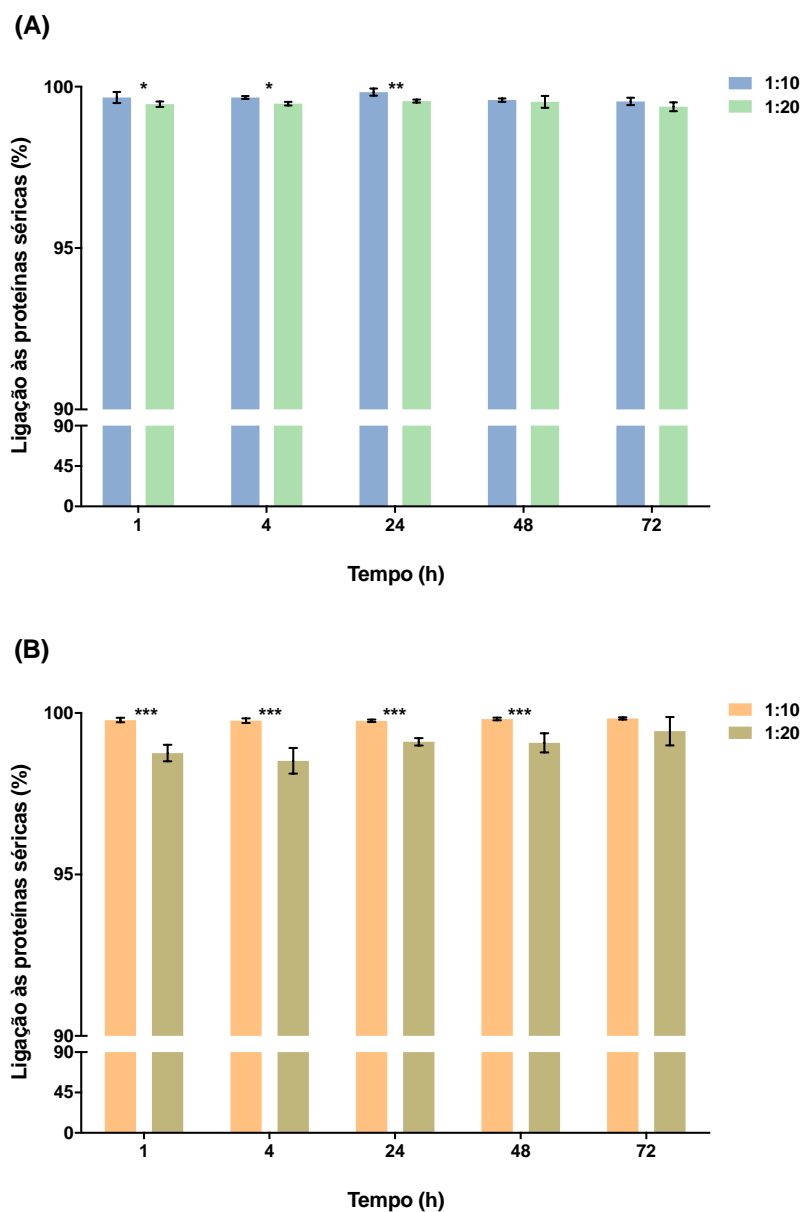
A natureza da proteína, em particular, sua composição e configuração estrutural, incluindo as hidroxilas, carboxilas e grupos amino determinam a extensão e a força da sua ligação à molécula do fármaco. Radiofármacos que possuem radioisótopos metálicos em sua estrutura podem trocar seus íons metálicos, que estão acoplados ao quelante, com as proteínas plasmáticas devido a forte afinidade do metal com a proteína. Esse processo, conforme mencionado anteriormente, é chamado de transquelação e leva à quebra *in vivo* do complexo; por exemplo, o radiometal ^{111}In descomplexa-se do quelante e seus íons se ligam fortemente à transferrina do plasma, formando transferrina- ^{111}In . Por outro lado, o anticorpo quando conjugado ao quelante DOTA apresenta maior estabilidade *in vivo* com pouco ou nenhuma transquelação.^[69]

A ligação às proteínas do plasma afeta a biodistribuição e a depuração plasmática de um radiofármaco e sua captação pelo órgão de interesse. Portanto, deve-se determinar a porcentagem de ligação às proteínas de um novo radiofármaco antes de seu uso clínico.^[69]

Neste trabalho, foi utilizado soro de roedores para quantificar a ligação às proteínas, isto é, o sangue foi coletado sem a presença de anticoagulante, responsável pela inibição da formação do coágulo.

A ligação do AcM-DTPA- ^{111}In e do AcM-DOTA- ^{177}Lu às proteínas séricas foi avaliada até 72 horas de incubação. Já na primeira hora do estudo, observou-se alto percentual de interação (>98%) com diferenças estatisticamente significativas entre as razões molares (**Figura 32**). A razão molar 1:10 para os dois RICs apresentou maior ligação às proteínas séricas.

Figura 32 - Avaliação da ligação dos radioimunoconjugados **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu às proteínas séricas. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” ($n = 4-5$). Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre as respectivas razões molares (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



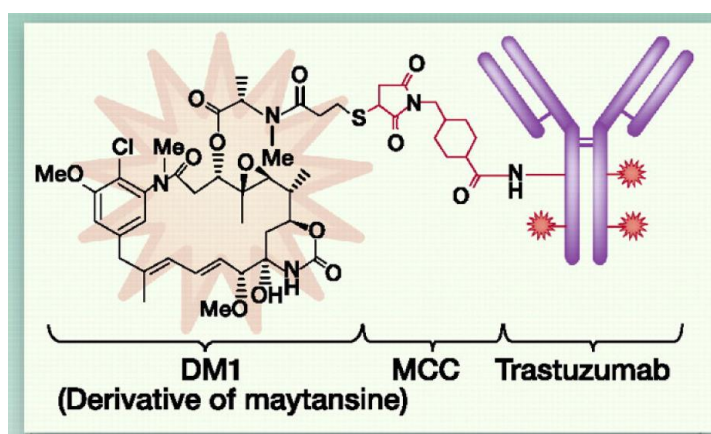
A alta taxa de ligação às proteínas séricas está associada ao baixo volume de distribuição, a cinética de eliminação lenta e meia vida plasmática longa.^[140] Estas características são próprias dos anticorpos, pois são moléculas de alto peso molecular e que, por estarem ligados às proteínas, ficam menos disponíveis para sofrerem ação enzimática, com isso sua degradação fica mais lenta, conforme observado no estudo de estabilidade em soro deste trabalho.^[50]

A literatura não descreve o percentual de ligação do AcM trastuzumabe às proteínas. Apesar da técnica utilizada ter sido previamente descrita na literatura, o alto percentual de ligação encontrado neste estudo pode ser justificado pela possibilidade de ter ocorrido precipitação dos RICs juntamente com as proteínas plasmáticas em decorrência de seu alto peso molecular. Por outro lado, a literatura permite correlacionar, parcialmente, os presentes imunoconjugados ao composto trastuzumabe entansina (Kadcyla®).^[142]

O Kadcyla® é um conjugado de anticorpo-medicamento (T-DM-1) que possui o HER2 como alvo. O trastuzumabe se liga à droga inibitória do microtúbulo DM1 (derivado de maitansina) por ligações covalentes através do ligante tioéter estável MCC (4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato). A entansina diz respeito ao complexo MCC-DM1. A correlação pode ser feita entre os agentes quelantes p-SCN-Bn-DTPA e DOTA-NHS-éster com o DM1, especificamente, o qual apresenta 93% de ligação às proteínas plasmáticas, sendo que 3,5 moléculas de DM1, em média, são conjugadas a cada molécula de trastuzumabe.^[141,142]

Este composto possui peso molecular próximo aos pesos do DTPA e DOTA (692,2 g/mol) e conforme **Figura 33** possui estrutura cíclica com grupamentos hidroxila e carboxila livres, semelhantes ao quelante DOTA, assim seu comportamento em relação a ligação às proteínas pode ser comparado aos agentes quelantes utilizados neste trabalho.
[143]

Figura 33 – Estrutura química do Kadcyla®, conjugado de anticorpo-medicamento (trastuzumabe entansina - T-DM-1).

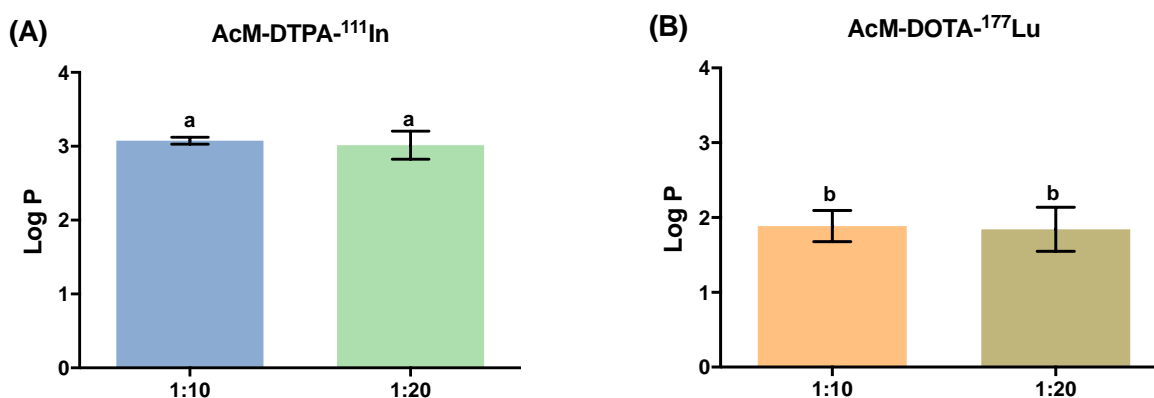


6.3.3 Análise do coeficiente de partição (Log P)

O coeficiente de partição é um parâmetro físico-químico importante de ser estudado porque permite quantificar o caráter lipofílico de uma molécula, predizendo sobre suas características farmacocinéticas. Valores de $\text{Log P} < 0$ caracterizam compostos hidrofílicos, em contrapartida, valores > 0 , compostos hidrofóbicos ou lipofílicos.^[120]

Os valores do coeficiente de partição (Log P) dos RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, estão representados na **Figura 34**. Os resultados indicam que ambos compostos apresentam característica lipofílica, sem diferença significativa entre as razões molares estudadas, considerando o mesmo RIC. Entretanto, observou-se que o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu tem um caráter menos lipofílico ($\text{Log P} \approx 1,8$) quando comparado ao trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In ($\text{Log P} \approx 3,0$), ou seja, a incorporação do agente quelante DOTA atribuiu menor lipofilicidade ao radioimunoconjugado. Estes resultados estão condizentes com a alta ligação às proteínas séricas, resultados discutidos anteriormente.

Figura 34 - Avaliação do coeficiente de partição (Log P) dos radioimunoconjugados **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu. Os valores estão expressos como “média \pm desvio-padrão” ($n = 4-5$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



Os anticorpos possuem estruturas tridimensionais conhecidas como estrutura terciária. Sua estrutura dobrada, em forma de emaranhado, dá-se pelo equilíbrio entre interações intra e intermoleculares de grupos funcionais de aminoácidos e o ambiente externo. Uma gama de interações não covalentes é importante para manter a estrutura nativa dobrada, por exemplo, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals da estrutura principal e resíduos da cadeia lateral, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.^[144] Como a estrutura emaranhada está em equilíbrio dinâmico, quaisquer fatores que alterem esse equilíbrio da interação podem fazer com que a estrutura mude, o que pode contribuir para um estado instável das moléculas grandes. Por exemplo, em solução aquosa, mais resíduos de aminoácidos solúveis ficam expostos e interagem com as moléculas de solvente acessíveis, enquanto os resíduos não polares são encapsulados formando um núcleo hidrofóbico.^[55]

Levando este conceito em consideração, os anticorpos monoclonais são moléculas caracterizadas como apolares (lipofílicas), porém a incorporação de agentes quelantes à sua estrutura pode alterar sua lipofilicidade, influenciando diretamente em sua depuração sanguínea, biodistribuição e via de excreção. Esse comportamento *in vivo* pode ser previsto pela avaliação prévia da lipofilicidade.^[12,13,145-147]

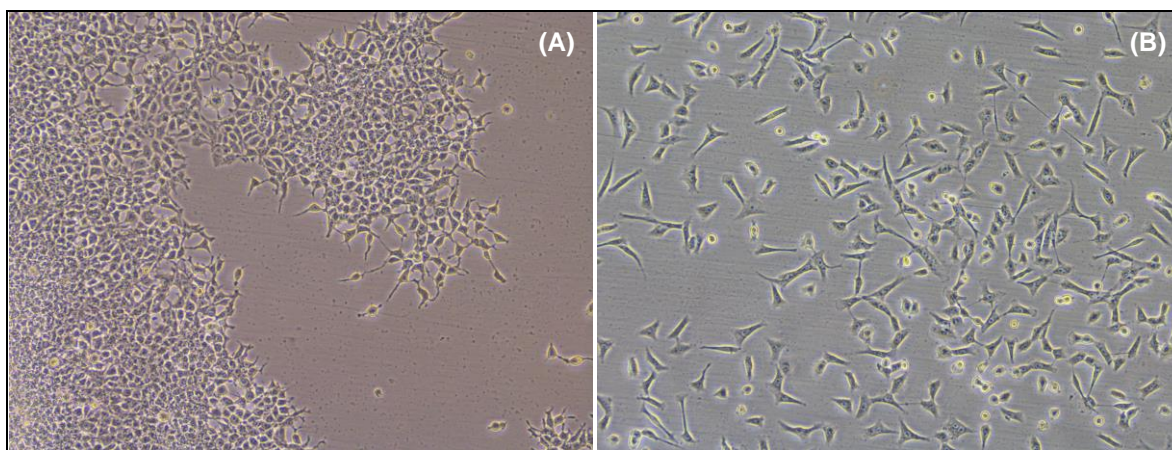
Os resultados encontrados nesse estudo permitem supor que o AcM-DTPA-¹¹¹In e o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu podem apresentar ligeiras diferenças nos estudos de biodistribuição, conforme será discutido a seguir. *In vivo*, os radioimunocombinados acumulam-se no fígado e nos rins, onde ocorrem o catabolismo das proteínas e o processo de eliminação, sendo que a retenção da radioatividade inespecífica resulta da transferência do metal radioativo às metaloproteínas endógenas.^[148]

Cooper et al. demonstraram em um estudo de conjugação do anticorpo rituximabe com os diferentes quelantes e posterior radiomarcagem com cobre-64 (⁶⁴Cu), que a depuração sanguínea dos imunocombinados contendo derivados de DTPA é mais rápida do que dos imunocombinados contendo quelante macrocíclico (DOTA), resultando em maior relação fígado/sangue e maior captação hepática e intestinal.^[13]

6.3.4 Estudo de ligação específica às células SK-BR-3 e MDA-MB-231

As linhagens celulares SK-BR-3 e MDA-MB-231 (**Figura 35**) foram cultivadas conforme descrito no item 4.3.4 para serem utilizadas nos estudos a seguir.

Figura 35 – Fotos representativas das células em placas aderentes: **(A)** SK-BR-3 (HER2 positivo) e **(B)** MDA-MB-231 (controle negativo para HER2) – aumento de 10 x.



Fonte: Autora da tese.

Os dados de ligação do trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e do trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu às células que expressam o receptor HER2 (SK-BR-3) e às células controle negativo para HER2 (MDA-MB-231) estão representados nas **Figuras 36 e 37**.

A incubação das células SK-BR-3 com os radioimunoconjugados, na presença de excesso do trastuzumabe não radiomarcado, mostrou bloqueio no percentual de ligação. Estes resultados sugerem ligação específica do trastuzumabe ao receptor HER2, visto que o excesso do anticorpo não radiomarcado deslocou a ligação dos radioimunoconjugados. Esta especificidade também é evidenciada pelo percentual de ligação menor às células HER2 negativo quando comparado ao percentual de ligação às células HER2 positivo sem bloqueio. É importante mencionar que nos ensaios de ligação específica sem bloqueio às células SK-BR-3 houve diferença estatisticamente significativa entre as razões molares 1:10 e 1:20 para o AcM-DTPA-¹¹¹In ($p = 0,0012$) e para o AcM-

DOTA-¹⁷⁷Lu ($p = 0,0294$), sugerindo influência das diferentes razões molares nos perfis de ligação às células que expressam os receptores HER2.

Figura 36 - Percentuais de ligação específica dos radioimunoconjugados às células SK-BR-3. O AcM-DTPA-¹¹¹In, bem como o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentaram diferença estatística significativa entre as razões molares 1:10 e 1:20 ($p < 0,05$).

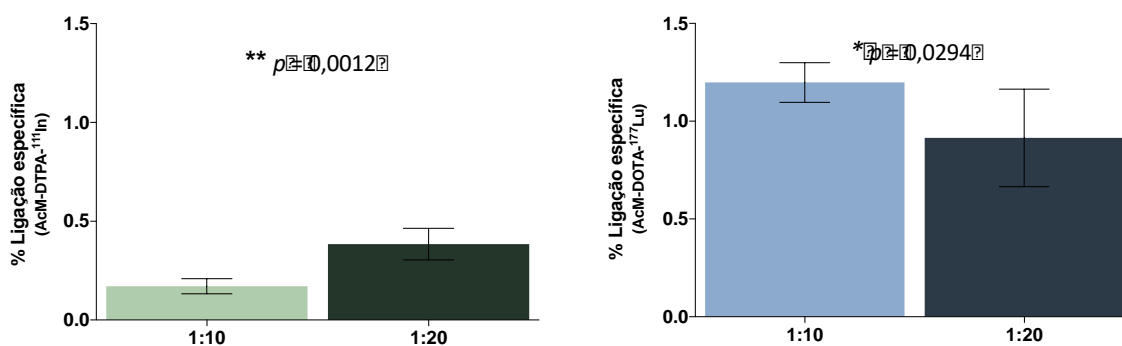
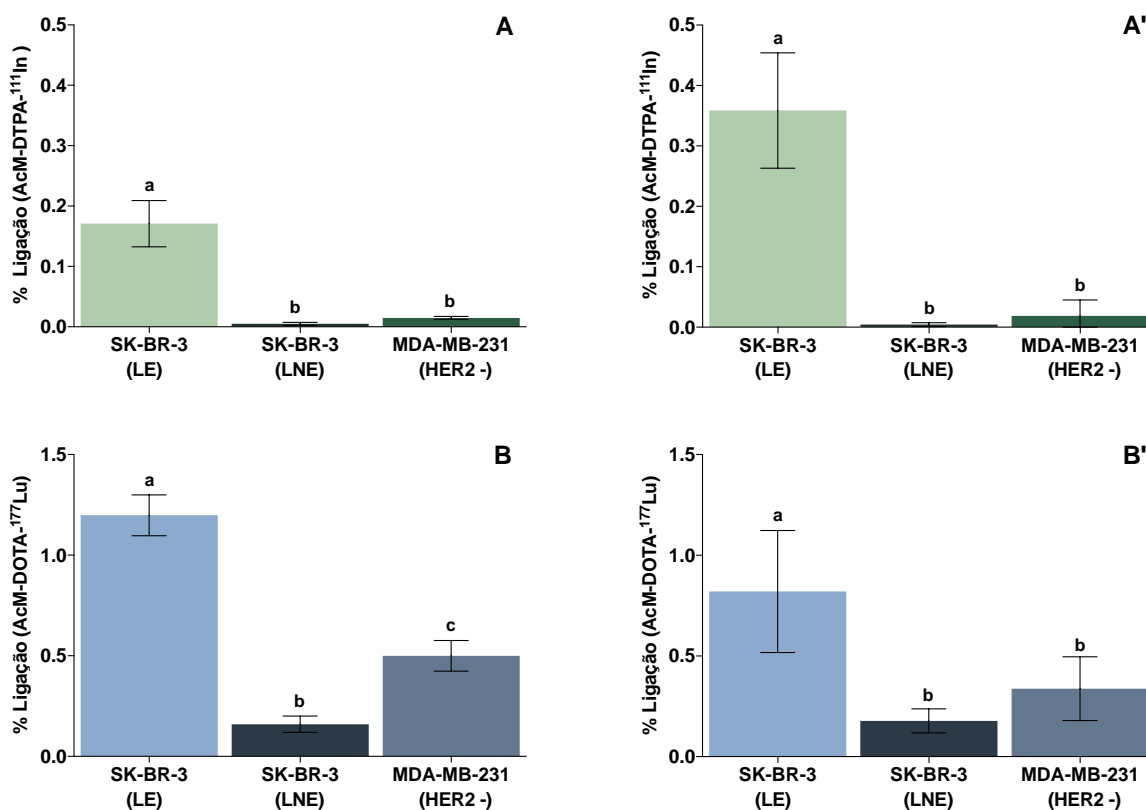


Figura 37 - Percentuais de ligação dos radioimunoconjugados às células SK-BR-3 e MDA-MB-231, sendo (A) AcM-DTPA-¹¹¹In (1:10); (A') AcM-DTPA-¹¹¹In (1:20); (B) AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:10), (B') AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:20); (LE) ligação específica e (LNE) ligação não específica. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



A avaliação do radioimunoconjugado realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF é uma aproximação do número de quelantes incorporados por molécula de anticorpo, pois, apesar de ser uma técnica bastante utilizada e considerada padrão ouro para este tipo de quantificação, apresenta dificuldades. Desta maneira, a avaliação da capacidade de ligação específica dos radioimunoconjugados às células tumorais torna-se essencial, uma vez que o número de moléculas de agentes quelantes incorporado por molécula de anticorpo pode exercer influência direta na capacidade diagnóstica ou terapêutica dos radioimunoconjugados. Moléculas de anticorpo com maior proporção de agentes quelantes tendem a apresentar maior eficiência de radiomarcção, possibilitando, teoricamente, utilizar uma quantidade menor do imunoconjugado para obtenção do radioimunoconjugado com ação final desejada (alta atividade molar). Porém, a habilidade do radioimunoconjugado de se ligar ao antígeno e às células tumorais alvo (imunorreatividade) não pode ser prejudicada.^[17]

Muitas vezes, a escolha da melhor razão molar anticorpo:quelante para o desenvolvimento do RIC baseia-se no rendimento de conjugação e radiomarcção, ou na estabilidade do imunoconjugado, porém, os resultados indicam que é importante avaliar também a influência do número de agentes quelantes incorporados na capacidade de ligação do RIC às células tumorais, para corroborar na escolha da razão molar a ser utilizada no procedimento de conjugação.

Levando em consideração os resultados obtidos neste estudo, para o RIC trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In, a razão molar 1:20 foi escolhida para ser utilizada nos estudos de imunorreatividade, internalização, biodistribuição, farmacocinética e imagem, pois apresentou maior percentual de ligação às células HER2 positivo. Para o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu, a razão molar 1:10 mostrou um percentual de ligação ligeiramente maior em relação a razão 1:20. Apesar dessa diferença, tendo como base os trabalhos de Bhusari et al. e de Rasaneh et al., a razão 1:20 também foi escolhida com intuito de se obter o mesmo parâmetro de comparação nos estudos supracitados.^[19,107]

6.3.5 Estudo de imunorreatividade

A avaliação da imunorreatividade de um RIC é importante para o sucesso do radioimunodiagnóstico e da radioimunoterapia de um determinado tipo de câncer. A imunorreatividade do anticorpo deve ser avaliada para certificar que sua fração imunorreativa foi preservada após ter passado pelos processos de conjugação, radiomarcção e possível radiólise, garantindo assim, a ligação específica do RIC ao tumor. Desta forma, a imunorreatividade torna-se um parâmetro utilizado como controle de qualidade no desenvolvimento de um radioimunoconjugado.^[148]

Comumente, a imunorreatividade pode ser medida pela afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno através da constante de afinidade (K_a) e pela fração imunorreativa (FI), que descreve a proporção de moléculas de anticorpo que são capazes de se ligar ao um excesso de antígeno, independentemente da força da ligação. A constante de afinidade é medida pelo ensaio de saturação e a fração imunorreativa pelo ensaio de Lindmo et al.^[116]

Neste trabalho, a imunorreatividade do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão 1:20, foi avaliada através do estudo de ligação específica e não específica (com excesso do trastuzumabe), utilizando células SK-BR-3, e aplicação do cálculo proposto por Lindmo et al. para determinar a fração imunorreativa. Considerou-se, teoricamente, que o anticorpo não conjugado e não radiomarcado possui imunorreatividade igual a 100%.^[116] A equação da reta e a fração imunorreativa estão expressas nas **Figuras 38 e 39**.

Figura 38 - Imunorreatividade do AcM-DTPA-¹¹¹In (1:20), sendo **(A)** avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado ligado especificamente às células SK-BR-3 e **(B)** avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado às células SK-BR-3 na presença de competidor. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3).

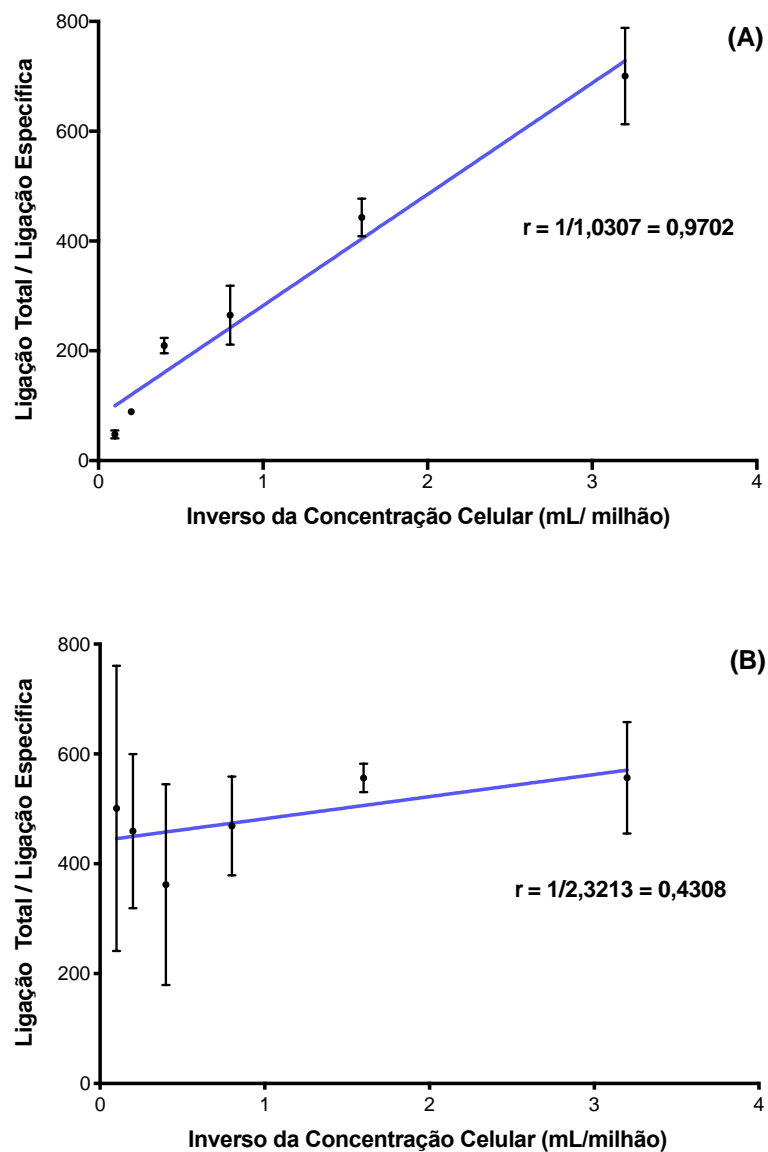
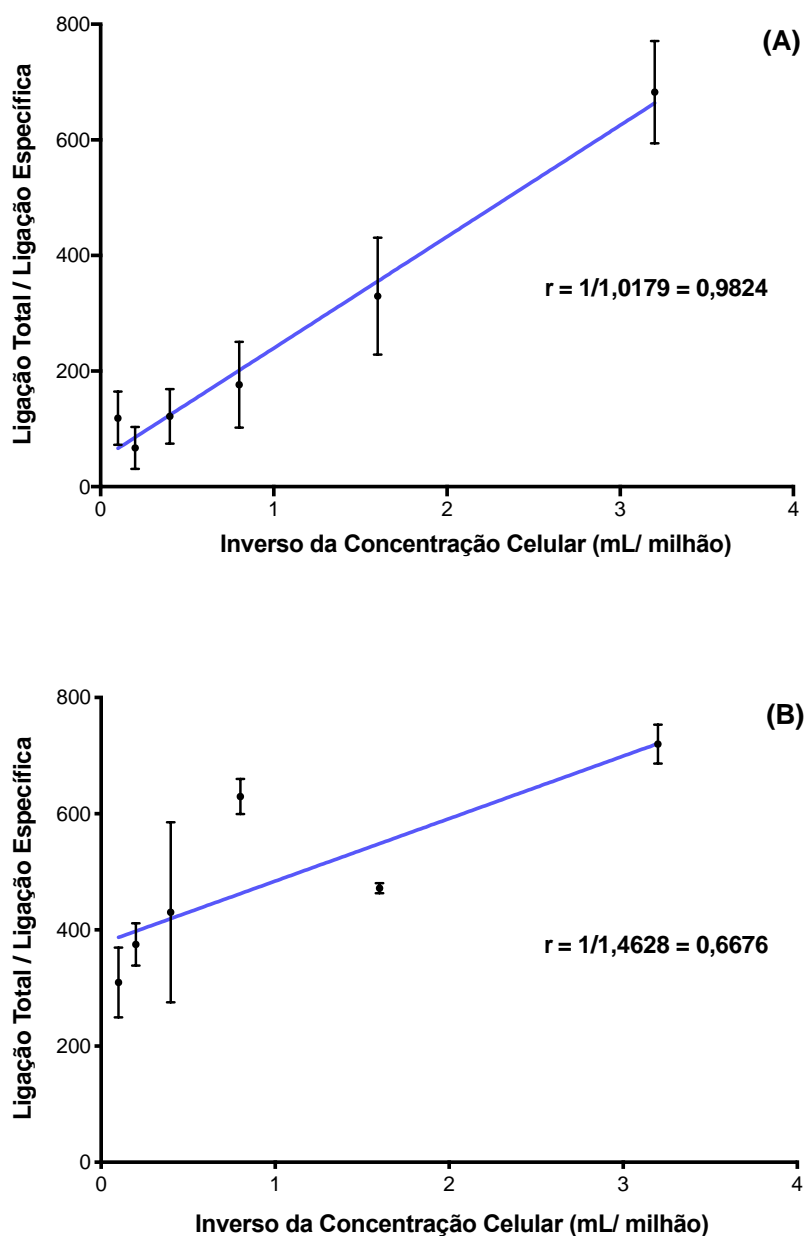


Figura 39 - Imunorreatividade do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:20), sendo **(A)** avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado ligado especificamente às células SK-BR-3 e **(B)** avaliação da fração imunorreativa do radioimunoconjugado às células SK-BR-3 na presença de competidor. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3).

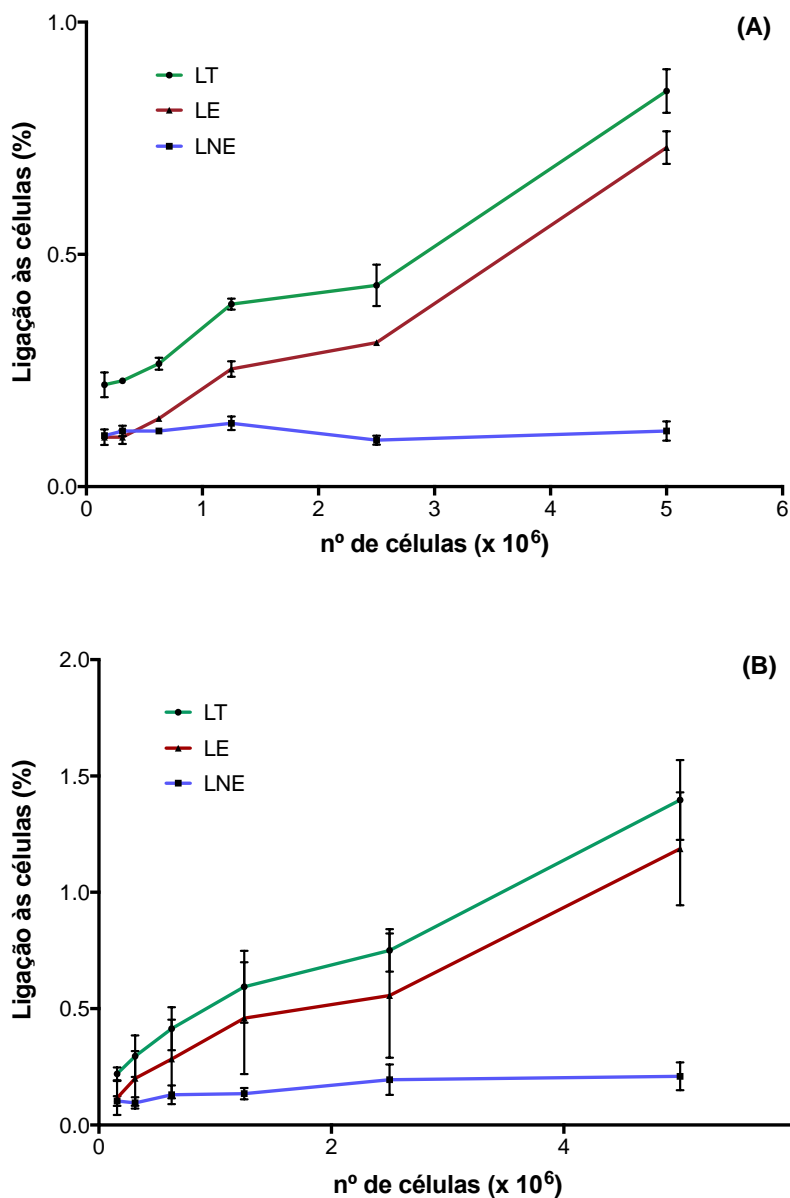


Para os dois RICs, a imunorreatividade do AcM, após conjugação e radiomarcção, manteve-se preservada mostrando um comportamento similar ao trastuzumabe não conjugado e não radiomarcado com especificidade pelo sítio de ligação HER2 (**Figura 40**).

Para o AcM-DTPA-¹¹¹In foi obtido $r = 0,9702$, ou seja, 97% da imunorreatividade preservada; entretanto, na presença do competidor, observou-se diminuição dessa porcentagem para 43% ($r = 0,4308$). Para o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu foi obtido 98% da imunorreatividade preservada ($r = 0,9824$) e, na presença do competidor, queda para 66% ($r = 0,6676$). A introdução do trastuzumabe não marcado promoveu a redução da ligação dos radioimunoconjugados às células SK-BR-3 indicando a especificidade da ligação.

Os percentuais obtidos mostraram-se superiores aos resultados encontrados na literatura. Alirezapour et al. avaliaram a imunorreatividade do trastuzumabe-DOTA-¹¹¹In utilizando células SK-BR-3 e obtiveram fração imunorreatividade de 0,79.^[26] Lub-de Hooge et al., para o trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In (razão molar 1:1), obtiveram $r = 0,87$.^[25] Rasaneh et al. estudaram o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu (razão molar 1:20) e a fração imunorreativa obtida foi de $r = 0,894$ utilizando células da linhagem MCF7, o grupo considerou que a incorporação do quelante e do radionuclídeo no anticorpo reduziu moderadamente a capacidade de ligação do radioimunoconjugado às células.^[19] Para o mesmo radioimunoconjugado (razão molar 1:20) Bhusari et al. encontraram porcentagens de imunorreatividade ainda menores, entre 72 – 77%.^[107]

Figura 40 - Gráfico representativo da porcentagem de ligação total às células SK-BR-3 (HER2 positivo) pelo número de células: **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, sendo LT - Ligação Total; LE - Ligação Específica e LNE - Ligação Não Específica, com bloqueio. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 3).



A diminuição da imunorreatividade de um RIC pode estar condicionada a razão molar anticorpo:quelante utilizada no processo de conjugação. Kukis et al. constataram que, para o anticorpo 2IT-BAT-Lym-1, não houve perda considerável da integridade funcional do imunoc conjugado para razão molar menor que 1:5 e que a imunorreatividade se manteve superior a 75% quando avaliadas as razões molares até 1:11.^[17] Por outro lado, uma ligeira diminuição na imunorreatividade, também pode

ocorrer devido a possível ligação do quelante ao sítio de ligação ao antígeno.^[149] Outro fator que pode alterar esta propriedade diz respeito ao tipo de quelante empregado na conjugação do anticorpo.^[123,150]

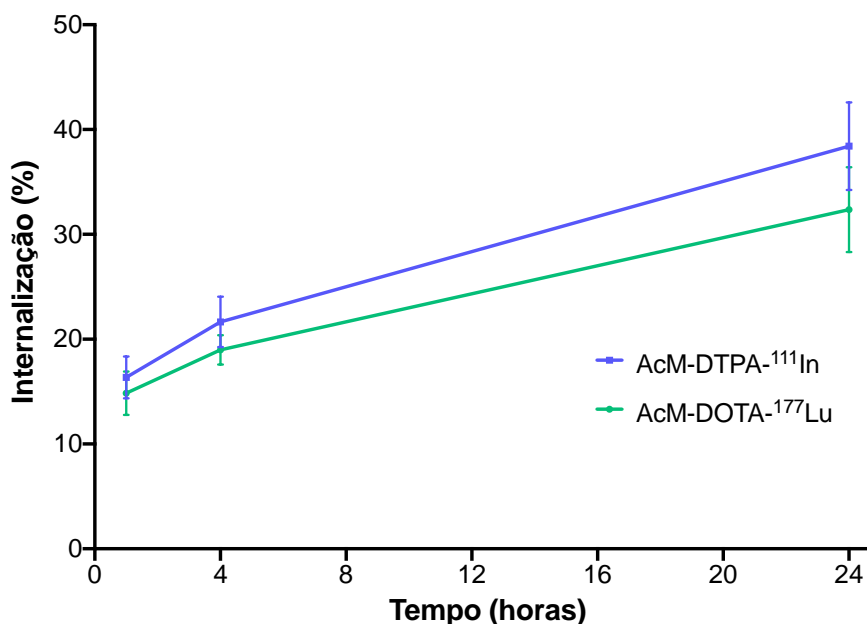
No presente trabalho, conforme mencionado anteriormente, as razões molares 1:10 e 1:20 foram analisadas previamente (estudo de ligação específica às células HER2 positiva e negativa) para condução da avaliação da imunorreatividade com a razão 1:20. Não houve influência dos diferentes agentes quelantes e radionuclídeos empregados na conjugação e radiomarcção do trastuzumabe em relação ao percentual de imunorreatividade.

6.3.6 Estudo de internalização

O estudo de internalização dos radioimunoconjugados, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20, foi avaliado em $2,0 \times 10^6$ células SK-BR-3 em diferentes tempos: 1, 4 e 24 horas após incubação a 37 °C .

O processo de internalização dos RICs apresentou-se preservado após o trastuzumabe ter passado pelos processos de imunoconjugação e radioimunoconjugação. Os RICs apresentaram comportamentos similares com aumento da internalização ao longo do tempo estudado (**Figura 41**). O AcM-DTPA-¹¹¹In apresentou internalização de 16,35% (1 hora); 21,64% (4 horas) e 38,42% (24 horas), mostrando-se ligeiramente maior em relação a internalização do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, 14,85 (1 hora); 18,99 (4 horas) e 32,37 (24 horas). Porém, não houve diferença estatística significativa quando comparado os mesmos tempos estudados entre os RICs ($p > 0,05$).

Figura 41 - Internalização do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, ambos na razão molar 1:20, durante o período de 24 horas de incubação. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 4).



Os valores encontrados neste estudo evidenciaram que o processo de internalização é lento e que os radioimunoconjugados ficam ligados aos receptores HER2, na superfície das células, em torno 80% na primeira hora e 60% após 24 horas de incubação às células SK-BR-3. Este processo, possivelmente, se justifique pelo peso molecular do trastuzumabe que se aproxima de 150 kDa. Após internalização, o anticorpo é metabolizado intracelularmente em peptídeos e aminoácidos menores.^[68]

Os resultados mostraram percentuais de internalização em relação ao tempo maiores quando comparados aos dados da literatura.

Alirezapour et al. mostraram que o trastuzumabe-DOTA-¹¹¹In, excesso molar de 80 vezes, internalizou em torno de 13% nos tempos entre 8 e 12 horas de incubação, após este período ocorreu um declínio na atividade de internalização que pode ser explicada pelo processo de transquelação do metal.^[26]

Lub-de Hooge *et al* obtiveram, para o trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In (razão molar 1:1), utilizando a linhagem celular SK-OV-3, 25% de internalização após 1 hora e 45% depois de 4 horas de incubação, mostrando retenção nas células até 24 horas.^[25]

Estas diferenças, provavelmente, sejam decorrentes das diferentes razões molares (anticorpo:quelante) e linhagens celulares empregadas por cada autor.

6.4 Estudos *in vivo*

6.4.1 Estudos em camundongos *BALB-c*

6.4.1.1 Farmacocinética

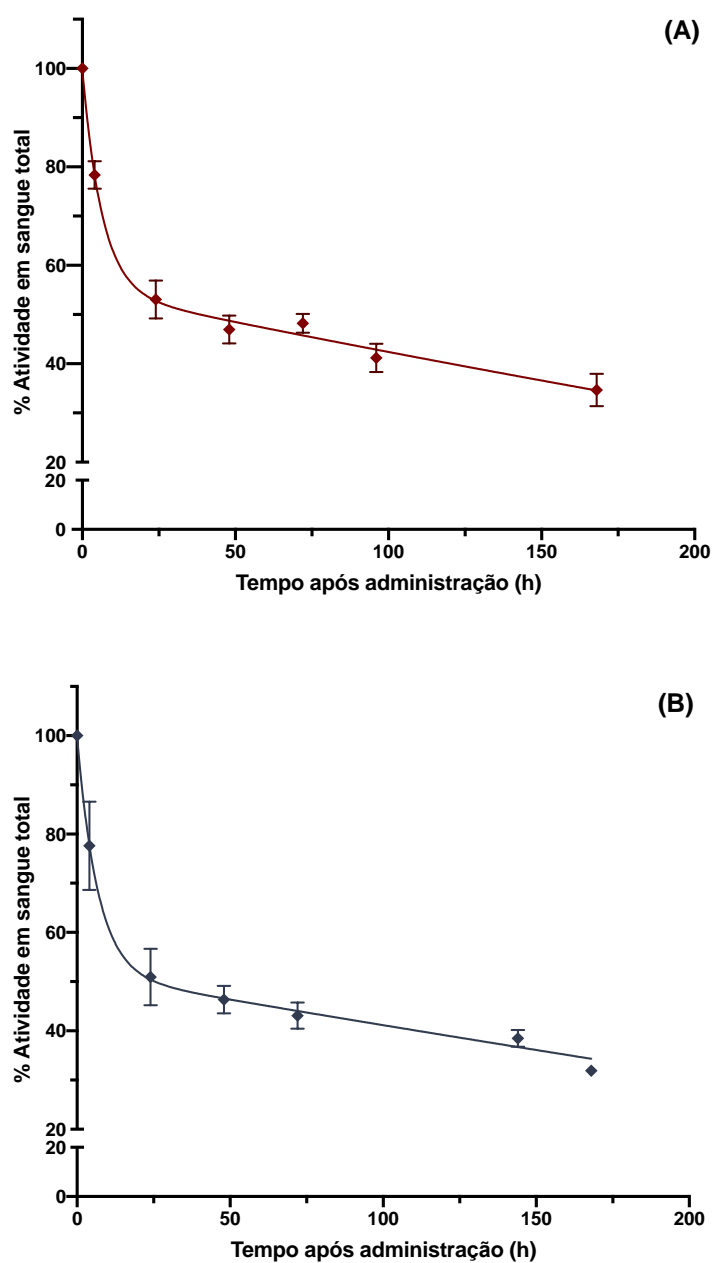
Dentre as etapas do desenvolvimento de um novo radioimunoconjugado, está a seleção do radiometal ideal, que envolve vários fatores como: meia-vida física, atividade molar, tipo(s) de decaimento e emissão(ões), energia da(s) emissão(ões), custo e disponibilidade. Além disso, a escolha do radiometal também deve considerar o perfil farmacocinético do RIC, incluindo o tempo de sua entrega no alvo desejado e seu processo de eliminação dos tecidos alvo e não-alvo.^[134]

As análises farmacocinéticas e farmacodinâmicas são estudos essenciais do processo de desenvolvimento de drogas. Os medicamentos baseados em anticorpos, frequentemente, exibem propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais complexas em relação aos compostos orgânicos pequenos (peso molecular <1.000 Da).^[50] Assim sendo, a maioria dos anticorpos possuem capacidade limitada de penetração e acúmulo nos tecidos, impactando diretamente em suas propriedades farmacocinéticas, podendo assim, afetar sua eficácia clínica. São transportados por difusão passiva, a qual sustenta a permeação ou a absorção através da membrana celular. Este processo é dependente do tamanho, hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade e carga do composto.^[55]

O estudo farmacocinético permite quantificar, através de parâmetros, os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de um dado

composto no organismo.^[151] Os parâmetros farmacocinéticos são obtidos pela construção de uma curva de concentração plasmática (% atividade do RIC em sangue total) em função do tempo (**Figura 42**).

Figura 42 – Curva da porcentagem da atividade dos RICs em sangue total de camundongos fêmeas *BALB/c* sadios, sendo **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, na razão molar 1:20. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 4-5).



Estas curvas foram utilizadas para calcular os parâmetros farmacocinéticos por modelos matemáticos bicompartimentais, simulando, desta maneira, os processos de ADME. [152]

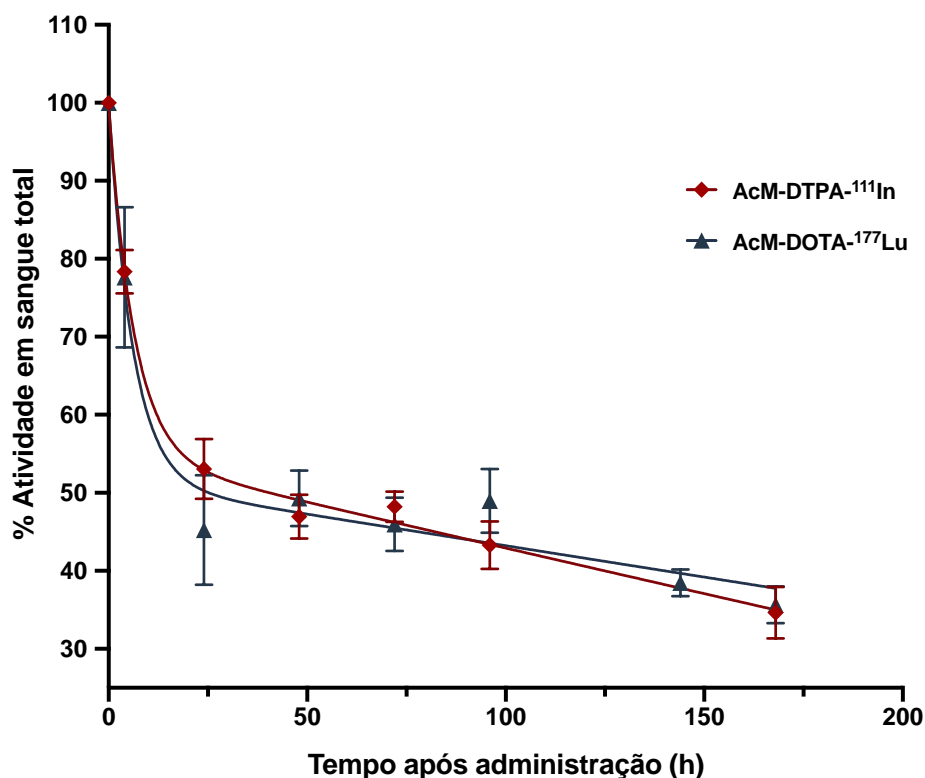
Conforme **Tabela 9**, o AcM-DTPA-¹¹¹In e o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentaram meia-vida de distribuição ($T_{1/2} \alpha$) de 4,43 h e 4,64 h, e meia-vida de eliminação ($T_{1/2} \beta$) de 774,3 h e 1362,0 h, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa destes parâmetros entre os RICs ($p < 0,05$) – **Figura 43**.

Se o processo de eliminação do anticorpo for predominantemente por endocitose, como este é um processo mediado por receptor, sugere-se que a saturação de receptores pode influenciar a biodisponibilidade de drogas proteicas direcionadas aos receptores de superfície. Este fenômeno comumente ocorre com os anticorpos que internalizam através de receptores, tornando seu tempo de eliminação mais lento. [153,154]

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:20) determinados em camundongos fêmeas *BALB-c* sadias (n = 4-5)

| Parâmetro farmacocinético | Símbolo | AcM-DTPA- ¹¹¹ In | AcM-DOTA- ¹⁷⁷ Lu |
|--|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Tempo de meia-vida da fase rápida (distributiva) | $T_{1/2} \alpha$ | 4,43 h | 4,64 h |
| Tempo de meia-vida da fase lenta (eliminação) | $T_{1/2} \beta$ | 774,3 h | 1362,0 h |
| Constante de distribuição | α | 0,16 h ⁻¹ | 0,15 h ⁻¹ |
| Constante de eliminação | β | 0,0008 h ⁻¹ | 0,0005 h ⁻¹ |
| Depuração | CL | 0,28 mL.h ⁻¹ | 0,04 mL.h ⁻¹ |
| Volume de distribuição | Vd | 0,005 L | 0,001 L |
| Tempo de meia-vida efetiva | $T_{1/2} E$ | 62,42 h | 144,78 h |

Figura 43 – Gráfico comparativo entre as curvas das porcentagens das atividades dos RICs, AcM-DTPA-¹¹¹In e AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (1:20), em sangue total de camundongos fêmeas *BALC-c* sadios. Os valores estão expressos como “média ± desvio-padrão” (n = 4-5).



A depuração (CL) de um fármaco no organismo descreve a eficiência do processo de eliminação, que é irreversível, e pode ser considerado como o parâmetro que relaciona sua velocidade de eliminação com a concentração plasmática.^[152] Os RICs estudados, na razão molar 1:20, apresentaram depuração lenta, influenciando no tempo de meia-vida da fase lenta (eliminação) - $T_{1/2\beta}$. A depuração do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu (0,04 mL.h⁻¹) apresentou-se mais lenta em relação à depuração do AcM-DTPA-¹¹¹In (0,28 mL.h⁻¹). Massicano, 2016 obteve perfil semelhante para o AcM anti-CD20-DOTA-¹⁷⁷Lu.^[135]

O volume de distribuição (Vd) é considerado um volume hipotético de fluido corporal necessário para dissolver a quantidade total de droga na mesma concentração em que é encontrada no sangue. É uma constante que relaciona a concentração plasmática e a quantidade de fármaco no organismo em um dado tempo. O volume de distribuição reflete, portanto, a extensão em que o fármaco está presente nos tecidos

extravasculares.^[152] Os resultados evidenciaram baixo volume de distribuição dos RICs, sendo que o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou menor Vd (0,001 L) em relação ao AcM-DTPA-¹¹¹In (0,005 L), indicando que ele permanece por mais tempo no espaço vascular e se distribui mais lentamente para os tecidos quando comparado ao AcM-DTPA-¹¹¹In.

O trastuzumabe possui farmacocinética não linear, após ligação ao HER2, o anticorpo é metabolizado, intracelularmente, em peptídeos menores e aminoácidos. Após ocorrer seu metabolismo, sua eliminação em humanos é mediada por células epiteliais de forma dependente da dose (não linear). A excreção renal do trastuzumabe é muito pequena e sua meia-vida é de aproximadamente 28 dias, podendo diminuir com doses pequenas.^[66,68] Em contrapartida, Ramli et al. observaram que o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu, após 240 horas de sua administração, teve quase 35% da radioatividade excretada pela urina, em comparação com 7% pelas fezes. Este padrão de depuração ocorreu por consequência do alto peso molecular e, possivelmente, devido ao RIC possuir carga negativa.^[155]

Os radiofármacos administrados no sistema biológico são eliminados por meio da excreção fecal ou urinária, transpiração ou outros mecanismos. Esta eliminação segue uma lei exponencial semelhante à do decaimento do radionuclídeo ditado por sua meia-vida física. Assim sendo, todo radiofármaco possui meia-vida biológica que está associada ao perfil farmacocinético e farmacodinâmico da molécula. A associação da meia-vida física com a meia-vida biológica fornece a meia-vida efetiva de um radiofármaco. Ela deve ser adequada para o estudo que se propõe, ou seja, para radiofármacos utilizados em diagnóstico, ela deve ser longa o suficiente para permitir a realização do exame e curta o suficiente para não fornecer uma exposição desnecessária ao paciente. Por outro lado, para radiofármacos utilizados em terapia, ela deve ser longa o suficiente para permitir o tratamento da doença, especialmente quando concentradas nos tecidos alvos, como os tumores.^[69,152]

No presente trabalho, o tempo de meia-vida efetiva ($T_{1/2} E$) encontrado para o AcM-DTPA-¹¹¹In foi de 62,42 h. Entretanto, para o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu foi aproximadamente duas vezes maior (144,78 h) em relação ao $T_{1/2} E$ do AcM-DTPA-¹¹¹In.

Se, por um lado, a permanência maior no organismo é desejável quando se considera aplicação em terapia, tal permanência deve estar relacionada diretamente ao órgão alvo, no caso, o tumor. No caso do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, a permanência maior em circulação pode representar maior irradiação de órgãos não alvo, especialmente os mais vascularizados.

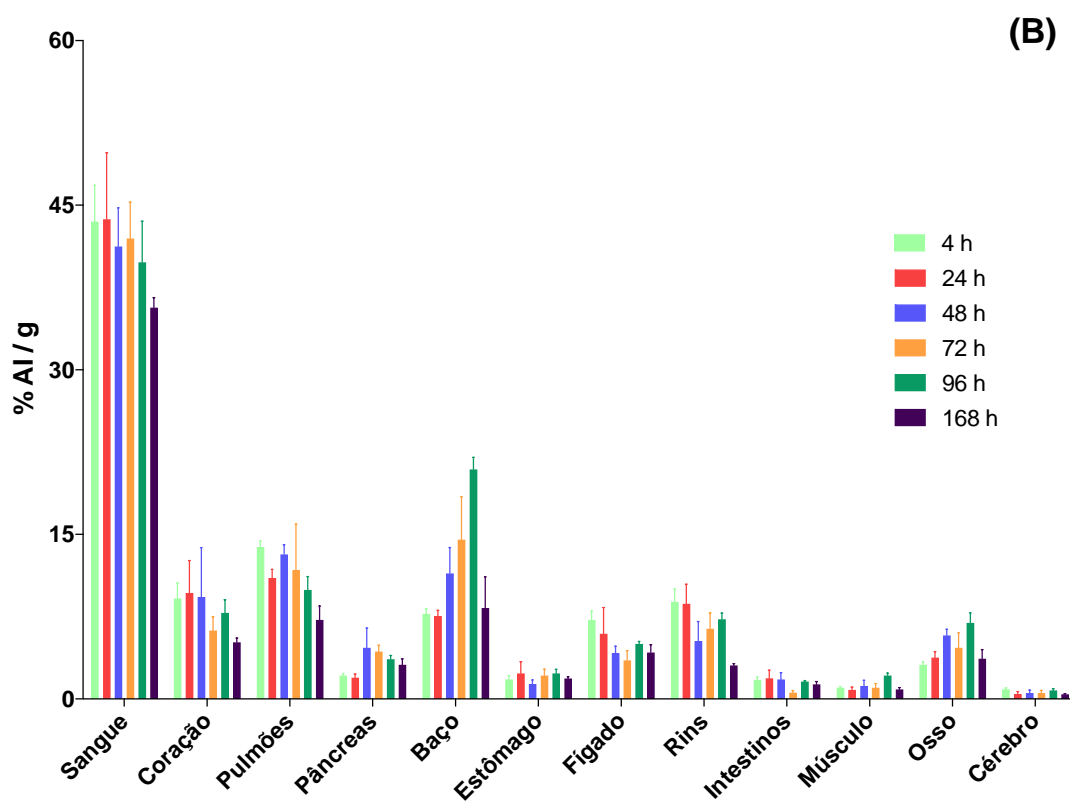
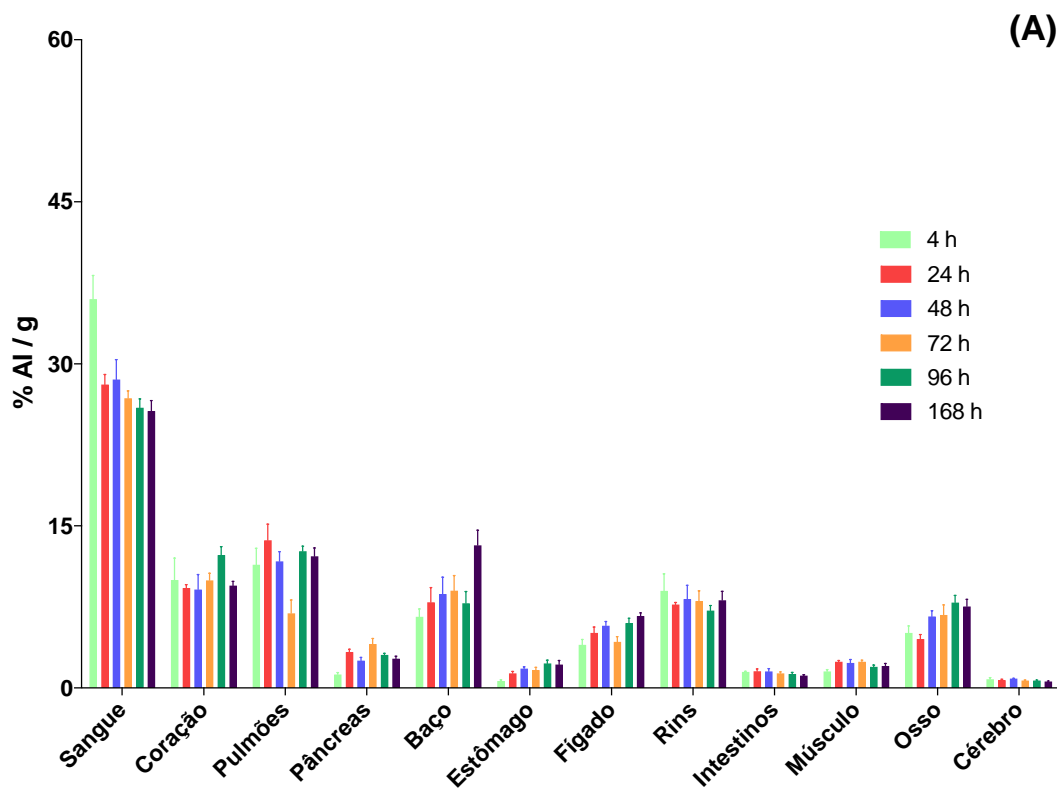
6.4.1.2 Biodistribuição

Os resultados da biodistribuição nos principais órgãos de camundongos *BALB-c* fêmeas saudáveis, nos tempos 4, 24, 48, 72, 96 e 168 horas após administração do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, separadamente, estão representados na **Figura 44**.

O estudo da biodistribuição de um radiofármaco é fundamental para o estabelecimento de sua eficácia e aplicação, inclui as etapas de distribuição nos tecidos, depuração plasmática e excreção urinária e/ou fecal após sua administração. A porcentagem de captação de um radiofármaco em cada órgão está relacionada à sua taxa de depuração plasmática após a administração. A quantificação das vias de excreção é também um parâmetro importante para a avaliação do perfil do radiofármaco. Quanto mais rápida a excreção urinária ou fecal, menor será a dose de radiação ao indivíduo.^[69]

Os anticorpos são biomoléculas com alto peso molecular, conseqüentemente, conforme dados farmacocinéticos apresentados no item 6.4.1.1, o processo de difusão através do endotélio vascular torna-se lento. Acredita-se que o transporte convectivo (transporte por diferença de densidade) seja o principal mecanismo responsável pela passagem dos RICs, do fluido sanguíneo para os fluidos intersticiais.^[50,55,156]

Figura 44 - Biodistribuição em camundongos fêmeas *BALB-c* sadios em diferentes tempos, sendo **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, ambos na razão molar 1:20. **AI** – Atividade injetada. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5).



Os dados evidenciaram captação renal associada a captação hepática, indicando que os RICs são metabolizados pelo fígado com eliminação dos metabólicos pelos rins, já que a eliminação ocorre via catabolismo intracelular.^[50] Este mecanismo justifica a alta captação presente no baço, em todo período estudado, por possuírem linfócitos B, que são, parcialmente, responsáveis pelo catabolismo do anticorpo. Lub de Hooge et al. também observaram captação esplênica considerável após 5 horas da administração do radioimunoconjugado.^[25]

Os mecanismos de eliminação dos anticorpos incluem filtração glomerular, secreção biliar e biotransformação (metabolismo ou catabolismo). A eliminação renal é uma via primária de depuração das moléculas pequenas, tornando-se uma via pouco eficiente para as moléculas IgG, devido ao tamanho.^[50,69] A secreção através da bile e, conseqüentemente, pelas fezes, é uma via de eliminação importante dos anticorpos IgA, porém para os IgG não é considerada uma rota significativa. Assim sendo, a maior parte da eliminação de IgG ocorre via catabolismo intracelular seguida de endocitose, pelos processos de pinocitose, mediada por receptor (interação dos domínios Fab do anticorpo com os epítomos presentes na superfície das células) e fagocitose por células imunes.^[50,156]

Quadri et al. verificaram que o agente quelante pode ser um fator determinante no perfil de biodistribuição de um RIC. Os quelantes lábeis podem ser clivados do anticorpo por enzimas presentes no soro e no fígado, dando origem aos metabólitos radioativos de baixo peso molecular que tenderão a ser eliminados pelos rins.^[157]

Cooper et al. estudaram a imunoconjugação do rituximabe com diferentes quelantes, incluindo derivados de DTPA e macrocíclicos e obtiveram um resultado congruente aos apresentados no presente trabalho em relação à depuração sanguínea, ou seja, o rituximabe contendo quelantes macrocíclicos apresentou depuração mais lenta comparados aos derivados de DTPA, com captação hepática maior.^[13]

Alirezapour et al. estudaram a biodistribuição do $^{111}\text{InCl}_3$ em ratos normais Sprague-Dawley e observaram que o $^{111}\text{In}^{3+}$ livre comporta-se como o cátion Fe^{3+} *in vivo*, sendo rapidamente removido da circulação com acúmulo de aproximadamente 10% no fígado após 24 horas. Porém, uma maior fração é excretada na urina na forma de cátion solúvel em água. Constataram também que o complexo transferrina-metal utiliza a via hepática como rota de acúmulo, este comportamento pode ser comparado a outros radiometais como o $^{177}\text{Lu}^{3+}$.^[26] Os resultados de Alirezapour et al. corroboram com os perfis de biodistribuição encontrados no presente estudo, bem como, com outros trabalhos da literatura.^[74,158-160]

Ramli et al. relataram retenção hepática do trastuzumabe-DOTA- ^{177}Lu por até 144 horas de sua administração, indicando que parte do RIC foi metabolizado ou catabolizado no fígado. Este fenômeno, conforme mencionado anteriormente, é comum para moléculas de alto peso.^[155] No entanto, esta retenção, quando avaliada até 72 horas após administração do RIC foi muito menor quando comparada a retenção hepática obtida no estudo de Costantini et al. para o trastuzumabe-DTPA- ^{111}In , no mesmo tempo em ratos normais.^[115]

Os dados obtidos neste estudo possibilitaram constatar a presença dos radioimunoconjugados no fígado (máximo de 8% da AI/g) em todo período estudado, devido à depuração sanguínea lenta. Esta evidência está alinhada com o tempo de meia-vida de eliminação dos RICs e com o coeficiente de partição [AcM-DTPA- ^{111}In (Log P \approx 3,0) e AcM-DOTA- ^{177}Lu (Log P \approx 1,8)] determinados. Entretanto, a diferença entre os valores de Log P dos RICs não é claramente evidenciada no perfil de biodistribuição.

Observou-se presença dos RICs nos pulmões e intestinos em todos os tempos estudados, esta captação pode estar associada a presença fisiológica do oncogene HER2 nesses órgãos, estando condizentes com os dados da literatura.^[25,26]

Neste estudo, também foi observada baixa captação no cérebro, pâncreas, estômago e músculo esquelético. Este perfil é esperado conforme descrito por Lub de Hooge et al. que também observou, em seu estudo, baixa captação óssea provinda da possível descomplexação do ^{111}In da molécula de trastuzumabe-DTPA- ^{111}In .^[25]

A porcentagem da captação óssea é um indicativo da estabilidade *in vivo* de um anticorpo complexado a um radiometal, pois este, em sua forma livre, é ativamente captado pelos ossos. Os complexos metálicos dos conjugados com DOTA exibem maior estabilidade *in vivo* em relação ao agente quelante DTPA.^[119] Este fato foi evidenciado pelos resultados obtidos neste trabalho, ou seja, a captação óssea do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou-se inferior à captação óssea do AcM-DTPA-¹¹¹In nos tempos de 4 h e 168 h, apresentando diferença estatística significativa, $p = 0,0261$ e $p = 0,0071$, respectivamente.

O AcMs estão sendo amplamente utilizados como biomarcadores para obtenção de imagens moleculares, pois são alvo específicos. Adicionalmente, as técnicas radioquímicas empregadas, permitem rápida produção do RIC, com alta pureza radioquímica, sem perda de suas propriedades intrínsecas, o que permite avançar do desenvolvimento dos estudos pré-clínicos para os estudos clínicos. No entanto, seu alto peso molecular e, conseqüentemente, sua depuração sanguínea lenta condiciona a aquisição das imagens entre 4 a 7 dias após a administração do RIC. Desta forma, várias estratégias estão sendo estudadas para diminuir o peso molecular do anticorpo e assim, acelerar seu processo de depuração sanguínea e permitir a realização de imagens mais precoces. Além da radiomarcagem do AcM intacto, pode-se encontrar na literatura, estudos direcionados ao desenvolvimento e radiomarcagem de fragmentos do AcM (Fab e (Fab')₂), denominados como nanocorpos, minicorpos e *affibodies* para o desenvolvimento de novos agentes de imagem para HER2. A ideia de se projetar moléculas menores é promover ligação ao alvo com alta afinidade agregada a diminuição do tempo de intervalo entre a administração do RIC e a realização da imagem diagnóstica, de dias para horas, proporcionando melhor contraste na imagem e diminuição da exposição do paciente à radiação.^[5,161] Quanto à aplicação terapêutica, como exposto anteriormente, o RIC deve apresentar depuração sanguínea longa o suficiente para permitir o tratamento da doença.^[69] Assim sendo, a vantagem de se utilizar fragmentos do trastuzumabe encontra-se na redução da captação renal.^[94]

No presente trabalho, o AcM intacto foi utilizado por estar disponível e, também, por ser a primeira experiência brasileira.

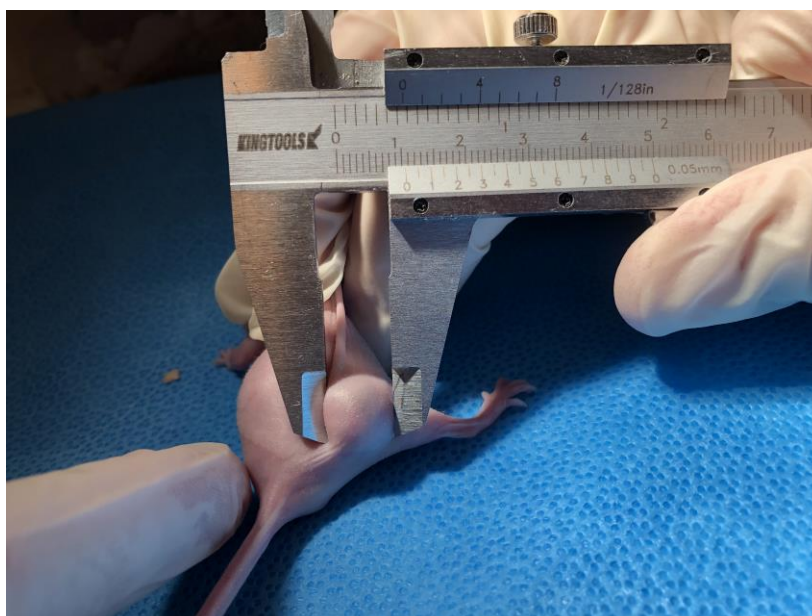
6.4.2 Estudos em camundongos *BALB-c Nude*

6.4.2.1 Desenvolvimento do Modelo Tumoral Xenográfico

O camundongo *BALB-c Nude*, caracterizado como sendo da espécie isogênico, apresenta gene recessivo autossômico, situado o cromossomo 11. Esta espécie possui timo rudimentar (atímico), apresentando assim, deficiência na produção de linfócitos T; o que faz com que não ocorra rejeição de transplantes de outras linhagens e apresente maior susceptibilidade às infecções.^[162] Dessa maneira, essa linhagem foi utilizada para o desenvolvimento tumoral xenográfico.

Após a inoculação de 5×10^6 células SK-BR-3 no flanco inferior direito dos 4 camundongos fêmeas, o crescimento da massa tumoral foi avaliado semanalmente através da medida dos eixos curtos e longos de cada animal. Após 21 dias da inoculação, os tumores atingiram o volume médio com desvio padrão de $7,2 \pm 0,25 \text{ mm}^3$ (**Figura 45**).

Figura 45 - Foto ilustrativa da medição da massa tumoral do camundongo *BALB-c Nude* fêmea após 21 dias da inoculação.



Conforme estudos prévios, o volume adequado da massa tumoral para a realização dos estudos *in vivo* varia entre 7-8 mm³.^[21,24,26] Assim, nesse trabalho foram utilizados camundongos fêmeas com a média de volume tumoral de 7 mm³.

Após medição e análise do volume, as massas tumorais dos camundongos foram retiradas para análise histopatológica.

6.4.2.2 Análise histopatológica

A análise histopatológica dos tumores inoculados no espaço subcutâneo de camundongos fêmeas *BALB-c Nude* foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer do Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN, com o intuito de verificar se a morfologia presente nos cortes histológicos eram compatíveis com tumor mamário humano SK-BR-3 – **Figuras 46 e 47**.

Figura 46 - Corte histológico de tumor mamário humano (SK-BR-3) com a presença de densa massa tumoral indicando alta atividade mitótica. Pleomorfismo celular com algumas células cuboides; porém, com maior frequência de células fusiformes. Citoplasma basófilo escasso. As setas indicam vasos tumorais. Coloração hematoxilina & eosina (H&E) e aumento de 100 x.

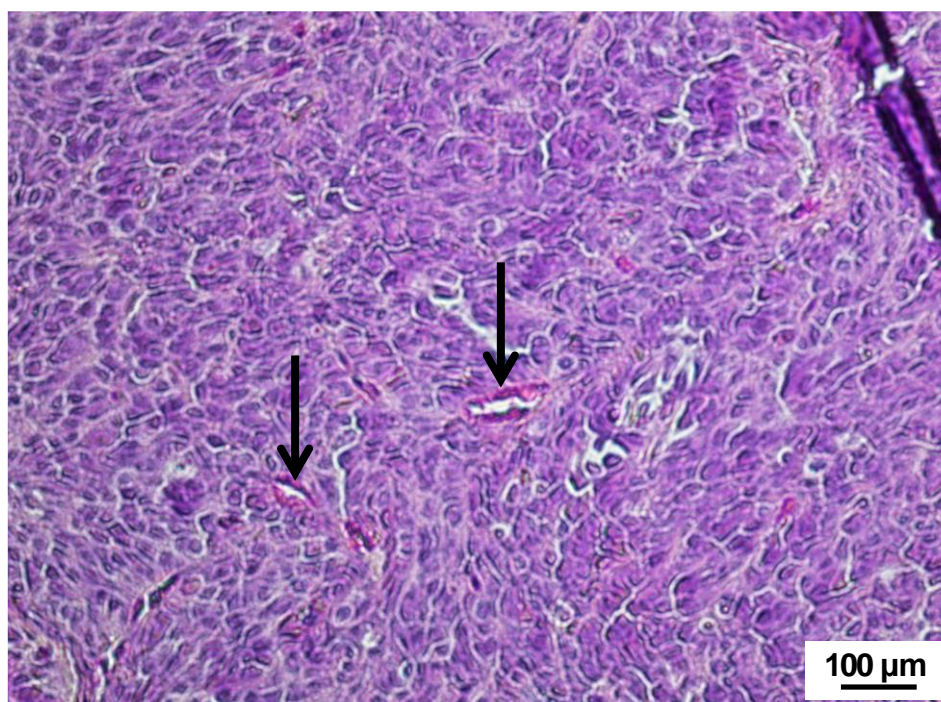
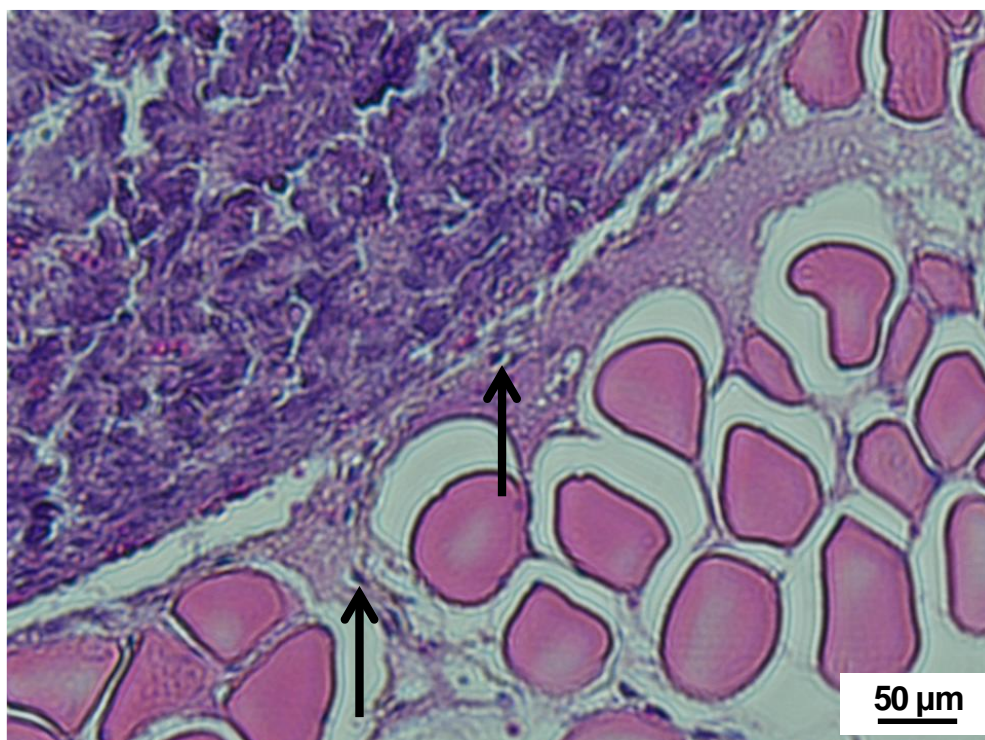


Figura 47 - Corte histológico de tumor mamário humano (SK-BR-3) apresentando região limítrofe do tumor (massa celular fortemente acidófila - arroxeadada) e o tecido muscular. As setas indicam células tumorais migrando para o tecido muscular. Coloração H&E e aumento de 200 x.

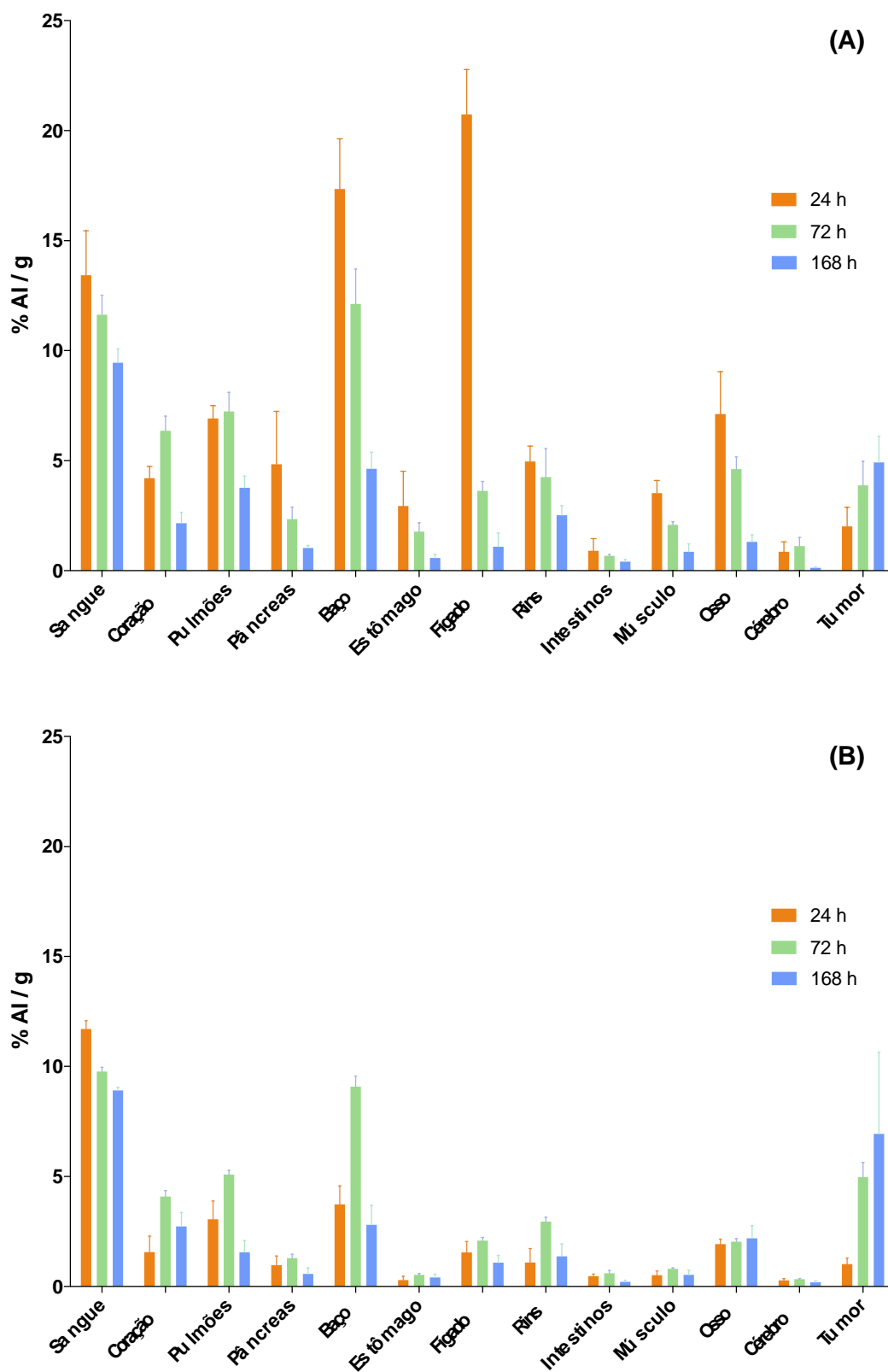


Os laudos comprovaram a presença de células SK-BR-3 nas amostras analisadas, apresentando quadro morfológico compatível com tumor de mama. Todos os experimentos que envolveram células da linhagem SK-BR-3 foram realizados com a expansão da mesma matriz.

6.4.2.3 Biodistribuição

A avaliação da biodistribuição em camundongos fêmeas *Nude* com tumor foi realizada nos tempos 24, 72 e 168 horas após administração do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, separadamente – **Figura 48**. O estudo apresentou um perfil semelhante à biodistribuição em animais saudáveis com alta captação tumoral.

Figura 48 - Biodistribuição em camundongos fêmeas *BALB-c Nude* com tumor em diferentes tempos, sendo **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA¹⁷⁷Lu, ambos na razão molar 1:20. **AI** – Atividade injetada. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5).

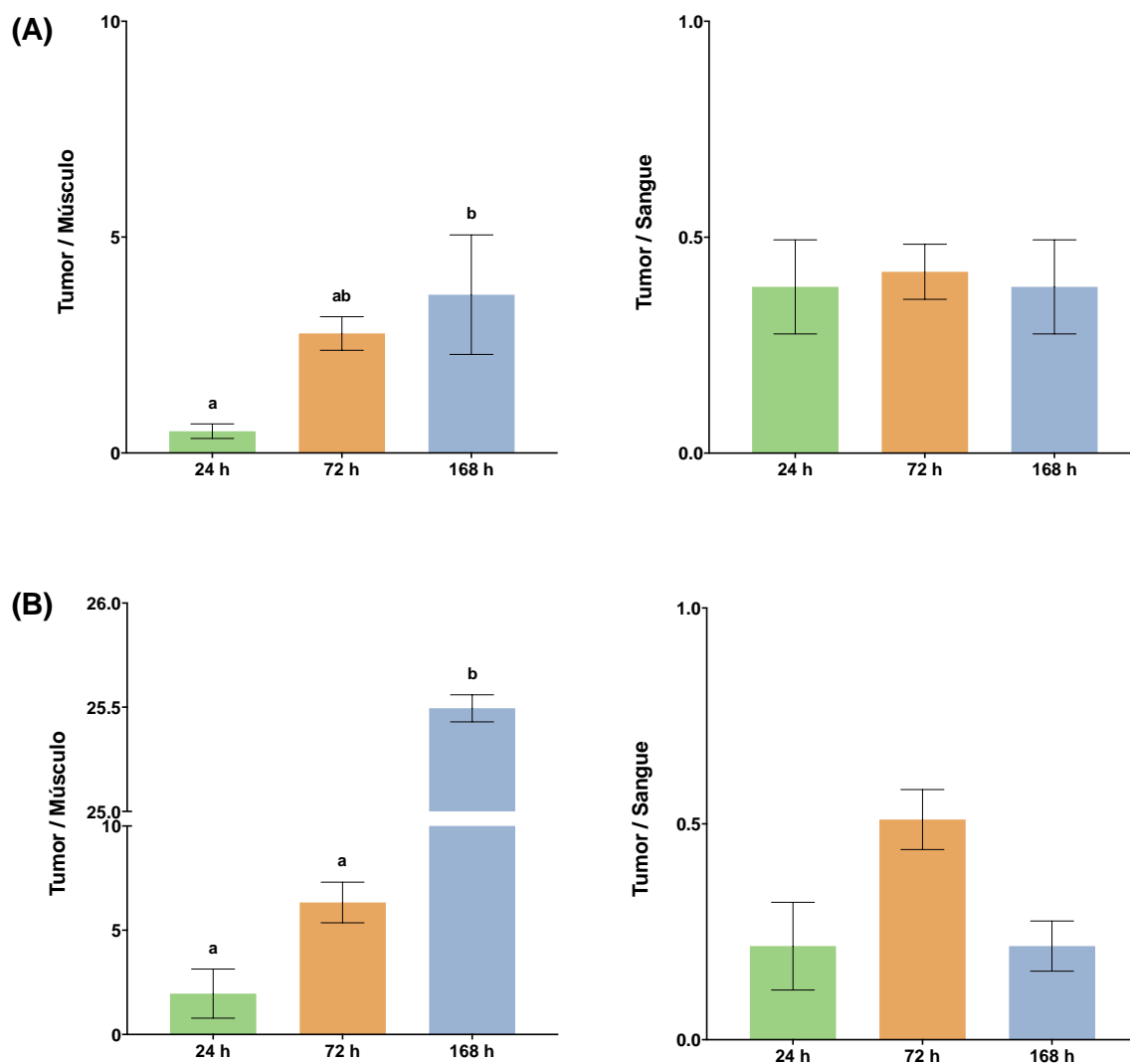


Porém, nota-se maior presença do AcM-DTPA-¹¹¹In no fígado e no baço no tempo de 24 horas, sugerindo que, além da ocorrência da metabolização hepática, pode ter ocorrido, de forma associada, o processo de transquelação do complexo transferrina-metal, o qual, utiliza a via hepática como rota de acúmulo com captação esplênica expressiva. Outro ponto a ser considerado é que a presença do tumor pode ter alterado a função hepato-esplênica.

A **Figura 48** também mostra que a captação tumoral foi significativa e aumentou no decorrer do período avaliado, tanto para o AcM-DTPA-¹¹¹In [2,02% (24 h); 3,88% (72h); 4,92% (168 h)] como para o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu [1,02% (24 h); 4,97% (72h); 6,94% (168 h)], indicando especificidade da ligação dos RICs ao alvo.

As razões tumor/músculo contralateral e tumor/sangue foram calculadas a partir das porcentagens de atividade injetada por grama ou por mL obtidas no estudo de biodistribuição em camundongos *BALB-c Nude* – **Figura 49**.

Figura 49 – Relação alvo – não alvo em diferentes tempos, sendo **(A)** AcM-DTPA-¹¹¹In e **(B)** AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, ambos na razão molar 1:20. Os valores estão expressos como “média ± erro” (n = 4-5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.



O aumento significativo nas razões tumor/músculo para os RICs no decorrer do tempo estudado ($p < 0,05$), reforça a especificidade do AcM-DTPA-¹¹¹In e do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu pelo receptor HER2, sendo que o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou maior razão em relação ao AcM-DTPA-¹¹¹In. Por outro lado, devido ao clareamento sanguíneo lento observado no estudo de biodistribuição, a relação tumor/sangue mostrou-se baixa, sem variações significativas ao longo do período estudado ($p > 0,05$).

Para que o RID e a RIT do câncer sejam realizados com sucesso, deve-se considerar a importância da preservação da imunorreatividade do RIC, conforme discutido anteriormente e, conseqüentemente, da sua especificidade pelo tumor, evidenciada por seu maior acúmulo no tumor e pela maior razão tumor (alvo)/tecido normal (não alvo). No entanto, é importante ressaltar que a alta imunorreatividade nem sempre garante a captação tumoral eficaz. Assim sendo, existem vários fatores que podem influenciar na captação do RIC pelo tumor.^[148]

Conforme já referenciado, a depuração sanguínea dos anticorpos, geralmente, é lenta e a captação hepática proeminente. Sendo assim, normalmente, a absorção tumoral do anticorpo é baixa, pois é dependente da especificidade e concentração do RIC. Além do tempo de residência do RIC no sangue, outros fatores podem influenciar em sua concentração no tumor, como: fluxo sanguíneo e volume vascular, reação cruzada e sequestro por tecidos normais, difusão do anticorpo através dos capilares (considerada limitada) e catabolismo (via de eliminação). Se o tumor for mais vascularizado e menos necrótico, haverá mais fluxo sanguíneo e, portanto, maior captação do anticorpo.^[69,148] Outro fator a ser considerado é a resposta imune do hospedeiro, como o efeito HAMA (Anticorpo Humano anti-camundongo, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*) e HACA (Anticorpo Humano anti-quimérico, do inglês, *Human Anti-Chimeric Antibody*).^[148] Como o trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, o efeito HAMA e HACA não são observados.

7 CONCLUSÕES

Há um enorme esforço no desenvolvimento de radiofármacos alvo específicos para a detecção precoce de doenças e terapia do câncer. A identificação de alvos e ligantes para receptores específicos é crítica para o desenvolvimento bem sucedido de radiofármacos alvo específicos. O desafio consiste em elaborar a formulação radioquímica do RIC e, também, na manutenção de sua ligação específica ao receptor de interesse, sem perda da imunorreatividade e das características de biodistribuição.

Apesar de existirem artigos que relatam a radiomarcagem do trastuzumabe, é importante ressaltar que foi relevante realizar todos os estudos relacionados às propriedades físico-químicas, bioquímicas e radioquímicas dos RICs, pois possibilitaram demonstrar a adequabilidade dos procedimentos propostos, que resultaram na preparação de RICs com pureza radioquímica satisfatória e imunoreatividade preservadas, além de dar suporte para a realização dos estudos biológicos. Desta maneira, foi possível atingir o principal objetivo deste trabalho, que foi comparar, de forma inédita, os resultados obtidos entre o AcM-DTPA-¹¹¹In e o AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu, tendo em vista a influência que os agentes quelantes bifuncionais e os radionuclídeos podem exercer nas propriedades supracitadas.

Partindo deste princípio, os parâmetros de imunoconjugação e radioimunoconjugação do trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e do trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu, nas razões molares 1:10 e 1:20, foram otimizados de forma satisfatória e reprodutível. Os imunoconjugados mantiveram-se íntegros após 1 ano do processo de conjugação. Os RICs apresentaram porcentagens de pureza radioquímica superiores a 90% para as duas razões molares, nas atividades estudadas e tempos após marcação, revelando que as diferentes razões molares não influenciaram na integridade dos imunoconjugados, no processo de radiomarcagem e na estabilidade dos radioimunoconjugados.

O AcM-DTPA-¹¹¹In (1:10 e 1:20) apresentou caráter mais lipofílico quando comparado ao AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu e esta diferença pode ser atribuída às características químicas dos diferentes agentes quelantes e radionuclídeos utilizados. Porém, não houve diferença entre as razões molares.

Os RICs, nas razões molares 1:10 e 1:20, apresentaram-se estáveis em meio reacional durante o tempo estudado. Ao serem incubados em soro, entretanto, observou-se queda da pureza radioquímica do AcM-DTPA-¹¹¹In em ambas as razões. Os RICs exibiram alta ligação às proteínas séricas, não havendo diferença estatística entre eles.

A determinação do número de agentes quelantes incorporados por molécula de AcM juntamente com o estudo de ligação às células SK-BR-3 evidenciaram que a razão molar anticorpo:quelante influencia na especificidade de ligação do RIC às células HER2 positivas; mostrando que a melhor razão foi a 1:20. Desta forma, os estudos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos com o trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu de razão molar 1:20.

Os RICs (1:20) mantiveram a fração imunorreativa preservada e apresentaram aumento da internalização ao longo do tempo estudado, sem diferenças estatísticas entre eles.

O perfil farmacocinético e de biodistribuição dos RICs (1:20) foram compatíveis com dados da literatura. Ambos apresentaram boa estabilidade *in vivo* e considerável captação tumoral, porém foi possível constatar maior captação do AcM-DOTA-¹⁷⁷Lu em relação ao AcM-DTPA-¹¹¹In.

Conclui-se, com os resultados do presente trabalho, que a natureza do agente quelante, a razão molar anticorpo:quelante empregada e o radionuclídeo utilizados para conjugar e radiomarcado o trastuzumabe, podem exercer influência em determinadas propriedades do radioimunoconjugado.

Por fim, entende-se que o trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In e o trastuzumabe-DOTA-¹⁷⁷Lu constituem um par teranóstico com potencial para ser aplicado, nacionalmente, em estudos clínicos futuros, no radioimunodiagnóstico e radioimunoterapia, respectivamente, de cânceres que superexpressam receptores de HER2, especialmente o câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WRIGHT, B. D.; LAPI, S. E. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use. *J Nucl Med*. v. 54, 1171 - 1174, 2013.
- [2] WU, A. M. Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET. *J Nucl Med*. v. 50, 2 - 5, 2009.
- [3] BARBET, J.; KRAEBER-BODÉRE F.; CHATAL, J. F. What can be expected from nuclear medicine tomorrow? *Cancer Biother Radiopharm*. v. 23, 483 - 504, 2008.
- [4] KRAEBER-BODÉRE, F.; BODET-MILIN, C.; ROUSSEAU, C. Radioimmunoconjugates for the treatment of cancer. *Semin Oncol*. v. 1 (5), 613 - 622, 2014.
- [5] MASSICANO, A. V. F.; MARQUEZ-NOSTRA, B. V.; LAPI, S. E. Targeting HER2 in Nuclear Medicine for Imaging and Therapy. *Mol Imaging*. v. 17, p. 1 – 11, 2018.
- [6] **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Breast Cancer/ Early diagnosis and screening, 2020. [Citado 2020 Out 19]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
- [7] VERONESI, U.; BOYLE, P.; GOLDBIRSCHE, A.; ORECCHIA, R.; VIALE, G. Breast cancer. *Lancet*. v. 365, 1727 - 1741, 2005.
- [8] SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G., LEVIN, W. J.; ULLRICH, A.; MCGUIRE, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. v. 235(4785), 177 - 182, 1987.

[9] WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J.; DOWSETT, M.; FITZGIBBONS, P.L.; HANNA, W. M.; LANGER, A.; McSHANE, L. M.; PAIK, S.; PEGRAM, M. D.; PEREZ, E. A.; PRESS, M. F.; RHODES, A.; STURGEON, C.; TAUBE, S. E.; TUBBS, R.; VANCE, G. H.; VIJVER, M. VAN DE; WHEELER, T. M.; HAYES, D. F. American Society of Clinical Oncology. College of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* v. 25(1), 118 - 145, 2007.

[10] WEBER, J.; HABERKORN, U.; MIER, W. Cancer Stratification by Molecular Imaging. *Int J Mol Sci.* v. 16, 4918 - 4946, 2015.

[11] LEWIS, M. R.; RAUBITSCHKE, A.; SHIVELY, J. E. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjug Chem.* v. 6 (5): 565 - 576, 1994.

[12] ACAR, C.; TEKSÖZ, S.; ÜNAK, P., BIBER, F. Z. Investigation of new bifunctional agents: D-penicillamine. *J Radioanal Nucl Chem.* v. 273 (3): 641 - 647, 2007.

[13] COOPER, M. S.; MA, M. T.; SUNASSEE, K.; SHAW, K. P.; WILLIAMS, J. D.; PAUL, R. L.; DONNELLY P. S.; BLOWER, P. J. Comparison of (64)Cu-complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity, and *in vitro/in vivo* stability. *Bioconjug Chem.* v. 23, p. 1029 - 1039, 2012.

[14] WADAS, T. J.; WONG, E. H.; WEISMAN, G. R.; ADERSON, C. J. Coordinating radiometals of cooper, gallium, indium, yttrium and zirconium for PET and SPECT imaging od disease. *Chem Rev.* v. 110, 2858 - 2902, 2010.

[15] LIU, S.; EDWARDS, D. S. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem.* v. 12, 7 - 34, 2001.

[16] MASSICANO, A. V. F.; PUJATTI, P. B.; ALCARDE, L. F.; SUZUKI, M. F.; SPENCER, P. J.; ARAÚJO, E. B. Development and biological studies of ¹⁷⁷Lu-DOTA-rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Radiopharm.* v. 9, 54 - 63, 2016.

[17] KUKIS, D. L.; DENARDO, G. L.; MIRICK, G. R.; MIERS, L. A.; GREINER, D. P.; MEARES, C.F. Effect of the extent of chelate substitution on the immunoreactivity and biodistribution of 2IT-BAT-Lym-1 immunoconjugates. *Cancer Res.* v. 55, 878 - 84, 1995.

[18] KRAEBER-BODÉRIÉ, F.; ROUSSEAU, C.; BODET-MILIN, C.; MATHIEU, C.; GUÉRARD, F.; FRAMPAS, E.; CARLIER, T.; CHOUIN, N.; HADDAD, F.; CHATAL, J. F.; CHAUVET, A. F.; CHÉREL, M.; BARBET, J. Tumor Immunotargeting Using Innovative Radionuclides. *Int J Mol Sci*. v. 16, p. 3932 - 3954, 2015.

[19] RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M. H.; DAHA, F. J.; SALOUTI, M. Radiolabeling of Trastuzumab with ^{177}Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol*. v. 36, p. 363 - 369, 2009.

[20] KANG, C. S.; SUN, X.; JIA, F.; SONG, H. A.; CHEN, Y.; LEWIS, M.; CHONG, H. S. Synthesis and Preclinical Evaluation of Bifunctional Ligands for Improved Chelation Chemistry of ^{90}Y and ^{177}Lu for Targeted Radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem*. v. 23(9), p. 1775 - 1782, 2012.

[21] SCHJOETH-ESKESEN, C.; NIELSEN, C. H.; HEISSEL, S.; HOJRUP, P.; HANSEN, P. R.; GILLINGS, N.; KJAER, A. [^{64}Cu]-labelled trastuzumab: optimization of labeling by DOTA and NODAGA conjugation and initial evaluation in mice. *J Labelled Compd Rad*. v. 58, p. 227 - 233, 2015.

[22] YEONG, C. H.; CHENG, M. H.; NG, K. H. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B*, v. 15(10), p. 845 - 863, 2014.

[23] ALIREZAPOUR B.; JALILIAN, A.R.; BOLOURINOVIN, F.; MORADKHANI, S. Production and quality control of [^{67}Ga]-DOTA-trastuzumab for radioimmunoscintigraphy. *Iran J Pharm Res*. v. 12 (2), p. 355 - 366, 2013.

[24] RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M. H.; DAHA, F. J. ^{177}Lu labeling of Herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol*. v.37, p. 949 - 955, 2010.

[25] LUB-DE HOOGE, M.N.; KOSTERINK, J.G.W.; PERIK, P.J.; NIJNUIS, H.; TRAN, L.; BART, J.; SUURMEIJER, A.J.H.; JONG, S.; JAGER, P.L.; DE VRIES, E.G.E. Preclinical characterisation of ^{111}In -DTPA-trastuzumab. *Br J Pharmacol*. v. 143, p. 99 - 106, 2004.

[26] ALIREZAPOUR B.; JALILIAN, A. R.; RAJABIFAR, S.; MIRZAI, M.; MORADKHANI, S.; POULADI, M.; ASLAMI, G. Preclinical evaluation of [^{111}In]-DOTA-trastuzumab. *J Cancer Res Ther*. v. 10, p. 112 - 120, 2014.

- [27] REILLY, R. M.; LAM, K.; CHAN, C.; LEVINE, M. Advancing Novel Molecular Imaging Agents from Preclinical Studies to First-in-Humans Phase I Clinical Trials in Academia – A Roadmap for Overcoming Perceived Barriers. *Bioconjug Chem*. v. 26, p. 625 - 632, 2015.
- [28] KNOWLES, S. M.; WU, A. M. Advances in Immuno-Positron Emission Tomography: Antibodies for Molecular Imaging in Oncology. *J Clin Oncol*. v. 30, p. 3884 - 3892, 2012.
- [29] BLEND, M. J.; STASTNY, J. J.; SWANSON, S. M.; BRECHBIEL, M. W. Labeling anti-Her2/neu monoclonal antibodies with ^{111}In and ^{90}Y using a bifunctional DTPA chelating agent. *Cancer Biother Radiopharm*. v.18(3), p. 355 - 362, 2003.
- [30] ORCUTT, K. D.; SLUSARCZYK, A. L.; CIESLEWICZ, M.; RUIZ-YI, B.; BHUSHAN, K. R.; FRANGIONI, J. V.; WITTRUP, K. D. Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. *Nucl Med Biol*. v. 38, p. 223 - 233, 2011.
- [31] CIANFROCCA, M; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. *CA: Cancer J Clin*. v. 59(5), p. 303 - 313, 2009.
- [32] KUMAR, B. N.; PATNI, P.; AGARWAL, A.; KHAN, M. A.; PARASHAR, N. Prevalence of molecular subtypes of invasive breast cancer: A retrospective study. *MJAFI*. v. 71, p. 254 - 258, 2015.
- [33] ROOIJRN, J. M.; STUTVOET, T. S.; SCHRÖDER, C. P.; VRIES, E. G. E.; Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 156, p. 90 - 101, 2015.
- [34] Ministério da Saúde / *Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)* / Estimativa de Câncer no Brasil, 2020. [Citado 2020 Set 29]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
- [35] ROSA, M. Advances in the Molecular Analysis of Breast Cancer: Pathway Toward Personalized Medicine. *Cancer Control*. v. 22(2), p. 211 - 219, 2015.
- [36] SONG, Q.; MERAJVER, S. D.; LI, J. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Human Genomics*. v. 9(27), p. 1 - 8, 2015.

[37] PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LONNING, P. E.; DALE, A. L. B.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. v. 406(6797), p. 747 – 752, 2000.

[38] SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P. E.; DALE, A. E. B. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 98, p. 10869-10874, 2001.

[39] SORLIE, T.; Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. v. 40(18), p. 2667 - 2675, 2004.

[40] HERSCHKOWITZ, J.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V.; MIKAELIAN, J. U.; HU, Z.; RASMUSSEN, K. E.; JONES, L. P.; ASSEFNIA, S.; CHANDRASEKHARAN, S.; BACKLUND, M. G.; YIN, Y.; KHRAMTSOV, A. I.; BASTEIN, R.; QUACKENBUSH, J.; GLAZER, R. I.; BROWN, P. H.; GRENN, J. E.; KOPELOVICH, L.; FURTH, P. A.; PALLAZO, J. P.; OLOPADE, O. I.; BERNARD P. S.; CHURCHILL, G. A.; DYKE, T. VAN; PEROU, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology*. v. 8(5), p. R76, 2007.

[41] CAREY, L. A.; PEROU, C. M.; LIVASY, C. A., DRESSLER, L. G.; COWAN, D.; CONWAY, K.; KARACA, G.; TROESTER, M. A.; TSE, C. K.; EDMISTON, S.; DEMING, S. L.; GERADTS, J.; CHEANG, M. C. U.; NIELSEN, T. O.; MOORMAN, P. G.; EARP, H. S.; MILLIKAN, R. C. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. v. 295, p. 2492 - 2502, 2006.

[42] MORRISON, D. H.; RAHARDJA, D.; KING, E.; PENG, Y.; SARODE, V. R. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer*. v. 107(2), p. 382 - 387, 2012.

[43] GEYER, F. C.; MARCHIO, C.; REIS-FILHO, J. S. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology*. v. 41(1), p. 77 - 88, 2009.

[44] WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. v. 6(12), p. 718 - 730, 2009.

- [45] LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L.; LIMA JR., R. C. P.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Rev Bras Oncol Clin**. v. 8(29), p. 130 - 142, 2012.
- [46] HUDIS, C. A. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. **N Engl J Med**. v. 357, p. 39 - 51, 2007.
- [47] KALIA, M. Personalized oncology: Recent advances and future challenges. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 62, p. s11 - s14, 2013.
- [48] PRESS, O. W.; LEONARD, J. P.; COIFFIER, B.; LEVY, R.; TIMMERMAN, J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphomas. **Hematol-Am Soc Hemat**. p. 221 - 240, 2001.
- [49] GAD, S. C. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology. In: POKORNY, N. J.; BITZER, J. I. B.; HALL, J. C.; TREVORS, J. T.; LEE, H. **Recombinant antibodies for pathogen detection and immunotherapy**. p. 851 - 872. 1 ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007.
- [50] WANG, W.; WANG, E. Q.; BALTHASAR, J. P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clin Pharmacol Ther**. v. 84, n. 5, p. 548 - 558, 2008.
- [51] ATTAELMANNAN, M.; LEVINSON, S. S. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. **Clin Chem**. 2000, v. 46 (2), p. 1230 - 1238, 2000.
- [52] VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Front Immunol**. v. 5, p. 1 - 17, 2014.
- [53] RAJU, T. S.; SCALLON, B. J. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 341, p. 797 - 803, 2006.
- [54] GEBAUER, M.; SKERRA, A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. **Curr Opin Chem Biol**. v. 13, p. 245-255, 2009.
- [55] AWWAD, S.; ANGKAWINITWONG, U. Overview of antibody drug delivery. **Pharmaceuticals**. v. 10: 83, p. 1 -24, 2018.

[56] LIGIERO, T. B.; ALBERNAZ, M. S.; CARVALHO, S. M.; OLIVEIRA, S. M. V.; OLIVEIRA, R. S. Monoclonal antibodies: application in radiopharmacy. *Curr Radiopharm.* v. 6(4), p. 231 - 248, 2013.

[57] KAMESWARAN, M.; GOTA, V.; AMBADE, R.; GUPTA, S.; DASH, A. Preparation and preclinical evaluation of ^{131}I -trastuzumab for breast cancer. *J Labelled Comp Radiopharm.* v. 60(1), p. 12 - 19, 2017.

[58] HERNANDEZ, M.C.; KNOX, S.J. Radiobiology of radioimmunotherapy: targeting CD20 B-cell antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* v. 59(5), p. 1274 - 1287, 2004.

[59] LARSON, S. M.; CARRASQUILLO, J. A.; CHEUNG, N. K.; PRESS, O. W. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat Rev Cancer.* v. 15(6), p. 347 - 360, 2015.

[60] KOPPE, M. J.; BLEICHRODT, R. P.; SOEDE, A. C.; VERHOFSTAD, A. A.; GOLDENBERG, D. M.; OYEN, W. J. G.; BOERMAN, O. C. Biodistribution and therapeutic efficacy of (125/131)I-, (186)Re-, (88/90)Y-, or (177)Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. *J Nucl Med.* v. 45(7), p. 1224 - 1232, 2004.

[61] DENARDO, G. L.; SYSKO, V. V.; DENARDO, S. J. Cure of incurable lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* v. 66, p. S46-56, 2006. Supplement 2.

[62] STIGBRAND, T.; CARLSSON, J.; ADAMS, G. P. Targeted Radionuclide Tumor Therapy. In: STIGBRAND, T.; ERIKSSON, D.; RIKLUND, K.; JOHANSSON, L. *Targeting tumours with radiolabeled antibodies.* p. 59 - 76. 1 ed. New York, NY: Springer, 2008.

[63] GLASSMAN, P. M.; BALTHASAR, J. P. Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Biol Med.* v. 11(1), p. 20 - 33, 2014.

[64] LOIBL, S.; DENKERT, C.; MINCKWITZ, G. V. Neoadjuvant treatment of breast cancer - clinical and research perspective. *The Breast.* v. 24, p. S73 - S77, 2015.

[65] CIRQUEIRA, M. B.; MOREIRA, M. A. R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *FEMINA.* v. 39(10), p.499-503, 2011.

- [66] DRUGBANK. Trastuzumab. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00072>>. Acesso em: 8. Abr. 2020.
- [67] CHO, H. S.; MASON K.; RAMYAR, K. X.; STANLEY, A. M.; GABELLI, S. B.; DENNEY JR, D. W.; LEAHY, D. J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. v. 421, p. 756 - 760, 2003.
- [68] BOEKHOUT, A. H.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Trastuzumab. *The oncologist*. v. 16. p. 800 - 810, 2011.
- [69] SAHA, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 7 ed. New York: Springer, 2010.
- [70] HAMILTON, D. *Diagnostic Nuclear Medicine – A Physics Perspective*. 1.ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.
- [71] GHOSH, S. C.; PINKSTON, K. L.; ROBINSON, H.; HARVEY, B. R.; WILGANOWSKI, N.; GORE, K.; SERVICK-MURACA, E. M.; AZHDARINIA, A. Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for ⁶⁴Cu-labeled immunoconjugates. *Nucl Med Biol*. v. 42, p. 177 - 183, 2015.
- [72] MÄCKE, H. R.; GOOD, S. Radiometals (non-Tc, non-Re) and bifunctional labelling chemistry. In: VÉRTES, A.; NAGY, S.; ZOLTÁN, K. *Handbook of Nuclear Chemistry*. p. 279-314. 1 ed. v. 4. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [73] COOPER, M. S.; SABBAH, E.; MATHER, S. J. Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. *Nature Protocols*. v. 1(1), p. 314 - 317, 2006.
- [74] LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev*. v. 60, p. 1347 - 1370, 2008.
- [75] CHEN X.; LIU, S.; HOU Y.; TOHME, M.; PARK, R.; BADING, J. R.; CONTI, P. S. MicroPET imaging of breast cancer α v-integrin expression with ⁶⁴Cu-labeled dimeric RGD peptides. *Mol Imaging Biol*. v. 6, p. 350 - 359, 2004.
- [76] JONG, M. D.; BAKKER, W. H.; KRENNING, E. P.; BREEMAN, W. A. P.; PLUIJM, M.E. VAN DER; BERNARD, B. F.; VISSER, T. J.; JERMANN, E.; BÉHÉ, M.; POWELL, P.; MÄCKE, H. R. Yttrium-90 and indium-111 labeling, receptor binding and biodistribution of [DOTA⁰,D-

Phe¹,Tyr³]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med*. v. 24, p. 368 - 371, 1997.

[77] PARRY, J. J.; KELLY, T. S.; ANDREWS, R.; ROGERS, B. E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ⁶⁴Cu labeled DOTA-Linker-Bobesin(7–14) analogues containing different amino acid linker moiety. *Bioconjug Chem*. v. 18, p. 1110 - 1117, 2007.

[78] MOI, M. K.; MEARES, C. F.; McCALL, M. J.; COLE, W. C.; DENARDO, S. J. Copper chelates as probes of biological systems: stable copper complexes with macrocyclic bifunctional chelating agent. *Anal Chem*. v. 148, p. 249 - 253, 1985.

[79] FERREIRA, C. L.; YAPP, D. T.; LAMSA, E.; GLEAVE, M.; BENSIMON, C.; JUREK, P.; KIEFER, G. E. Evaluation of novel bifunctional chelates for the development of Cu-64-based radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*. v. 35, p. 875 - 882, 2008.

[80] BARTHOLOMÄ, M. D. Recent developments in the design of bifunctional chelators for metal-based radiopharmaceuticals used in Positron Emission Tomography. *Inorg Chim Acta*. v. 389, p. 36 - 51, 2012.

[81] CHANG, A. J.; DESILVA, R.; JAIN, S.; LEARS, K.; ROGERS, B.; LAPI, S. ⁸⁹Zr-Radiolabeled Trastuzumab Imaging in Orthotopic and Metastatic Breast Tumors. *Pharmaceuticals*. v. 5, p. 79 - 93, 2012.

[82] MOREAU, M.; RAGUIN, O.; VRIGNEAUD, J. M.; COLLIN, B.; BERNHARD, C.; TIZON, X.; BOSCHETTI, F.; DUCHAMP, O.; BRUNOTTE, F.; DENAT, F. DOTAGA-Trastuzumab. A New Antibody Targeting HER2/Neu Antigen for Diagnostic Purposes. *Bioconjug Chem*. v. 23, p. 1181 - 1188, 2012.

[83] RICE, S. L.; RONEY, C. A.; DAUMAR, P.; LEWIS, J. S. The next generation of Positron Emission Tomography radiopharmaceuticals in Oncology. *Semin Nucl Med*. v. 41(4), p. 265 - 282, 2011.

[84] PERIK, P. J.; HOOGE, M. N. L. D.; GIETEMA, J. A.; GRAAF, W. T. A. VAN DER; HORTE, M. A.; JONKMAN, S.; KOSTERINK, J. G. W.; VELDHUISEN, D. J. VAN; SLEIJFER, D. T.; JAGER, P. L.; DE VRIES, E. G. E. Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. v. 24, p. 2276 - 2282, 2006.

- [85] DIJKERS, E. C. F.; KOSTERINK, J. G. W.; RADEMAKER, A. P.; PERK, L.R.; DONGEN, G. A. M. S. VAN; BART, J.; JONG, J. R.; DE VRIES, E. G. E.; LUB-DE HOOGE, M. N. Development and characterization of clinical-grade ^{89}Zr -trastuzumab for HER2/ neu immunoPET imaging. *J Nucl Med*. v. 50, p. 974 - 981, 2009.
- [86] DIJKERS, E. C.; MUNNINK T. H. O.; KOSTERINK, J. G.; BROUWERS, A. H.; JAGER, P. L.; JONG, J. R.; VAN DONGEN, G. A.; SCHRÖDER, C. P.; LUB-DE HOOGE, M. N.; DE VRIES, E. G. Biodistribution of ^{89}Zr -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther*. v. 87, p. 586 - 592, 2010.
- [87] HOLLAND, J. P.; LOPES, E. C.; DIVILOV, V.; LONGO, V. A.; TALDONE, T.; ZATORSKA, D.; CHIOSIS, G.; LEWIS, J.S. Measuring the pharmacodynamic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using Zr–DFO-trastuzumab. *PLoS One*. v. 5 (1), p. e8859, 2010.
- [88] SCOLLARD, D. A.; CHAN, C.; HOLLOWAY, C. M. B.; REILLY, R. M. A kit to prepare ^{111}In -DTPA-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments injection under GMP conditions for imaging or radioimmunoguided radioimmunoguided surgery of HER-2 positive breast cancer. *Nucl Med Biol*. v. 38, p. 129 - 136, 2011.
- [89] ALIREZAPOUR, B.; JALILIAN, A. R.; RASAEI, J.; RAJABIFAR, S.; YAVARI, K.; KAMALIDEHGHAN, M.; BOLOURINOVIN, F.; ASLANI, G. Optimized preparation and preliminary of ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab for targeting ErbB2/Neu expression. *J Radioanal Nucl Chem*. v. 295 (2), p. 1261 – 1271, 2013.
- [90] NIU, G.; LI, Z.; CAO, Q.; CHEN, X. Monitor Therapeutic Response of Human Ovarian Cancer to 17-DMAG by Non-invasive PET imaging with ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. v. 36(9), p. 1510 - 1519, 2009.
- [91] MORTIMER, J. E.; BADING, J. R.; COLCHER, D. M.; CONTI, P. S.; FRANKEL, P. H.; CARROLL, M. I.; TONG, S.; POKU, E.; MILES, J. K.; SHIVELY, J. E.; RAUBITSCHKE, A. A. Functional Imaging of Human Epidermal Growth Factor Receptor2-Positive Metastatic Breast Cancer Using ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab PET. *J Nucl Med*. v. 55, p. 23 - 29, 2014.
- [92] HUANG, H. J.; LO, J. M. Radiochemical Characterization of $^{67,68}\text{Ga}$ labeled DOTA derivatives. *JASE*. v. 6 (1), p. 19 - 30, 2003.

[93] RASANEH, S.; RAJABI, H.; AKHLAGHPOOR, S.; SHEYBANI, S. Radioimmunotherapy of mice bearing breast tumors with ^{177}Lu -labeled trastuzumab. *Turk J Med Sci*. v. 42, p. 1292 - 1298, 2012.

[94] D'HUYVETTER, M.; VINCKE, C.; XAVIER, C.; AERTS, A.; IMPENS, N.; BAATOUT, S.; DE RAEVE, H.; MUYLDERMANS, S.; CAVELIERS, V.; DEVOOGDT, N.; LAHOUTTE, T. Targeted radionuclide therapy with a ^{177}Lu -labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*. v. 4 (7), p. 708 - 720, 2014.

[95] SONG, H.; HOBBS, R. F.; VAJRAVELU, R.; HUSO, D. L.; ESAIAS, C.; APOSTOLIDIS, C.; MORGENSTERN, A.; SGOUROS, G. Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle-emitter ^{225}Ac : comparing efficacy with ^{213}Bi , ^{90}Y . *Cancer Res*. v. 69, p. 8941 – 8948, 2009.

[96] MEREDITH, R. F.; TORQUE, J.; AZURE, M.T.; SHEN, S.; SADDEKNI, S.; BANAGA, E.; CARLISE, R.; BUNCH, P.; YODER, D.; ALVAREZ, R. Pharmacokinetics and imaging of ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab after intraperitoneal administration in ovarian cancer patients. *Cancer Biother Radiopharm*. v. 9(1), p. 12 - 17, 2014.

[97] HERRMANN, K.; LARSON, S. M.; WEBER, W. A. Theranostic concepts: more than just a fashion trend – introduction and overview. *J Nucl Med*. v. 58, p. 1s - 2s, 2017.

[98] SILBERSTEIN, E.B. Radioiodine: the classic theranostic agent. *Semin Nucl Med*. v. 42, p. 164 – 170, 2012.

[99] SEIDLIN, S.M.; MARINELLI, L.D.; OSHRY, E. Radioactive iodine therapy; effect on functioning metastases of adenocarcinoma of the thyroid. *J Am Med Assoc*. v. 132(14), p. 838 - 847, 1946.

[100] STROSBURG, J.; EL-HADDAD, G.; WOLIN, E.; HENDIFAR, A.; YAO, J.; CHASEN, B.; MITTRA, E.; KUNZ, P. L.; KULKE, M. H.; JACENE, H.; BUSHNELL, D.; O'DORIDIO, T. M.; BAUM, R. P.; KULKARNI, H. R.; CAPLIN, M.; LEBTAHI, R.; HOBDDAY, T.; DELPASSAND, E.; VAN CUTSEM, E.; BENSON, A.; SRIRAJASKANTHAN, R.; PAVEL, M.; MORA, J.; BERLIN, J.; GRANDE, E.; REED, N.; SEREGNI, E.; ÖBERG, K.; LOPERA SIERRA, M.; SANTORO, P.; THEVENET, T.; ERION, J. L.; RUSZNIEWSKI, P.; KWEKKEBOOM, D.; KRENNING, E. Phase 3 trial of ^{177}Lu -Dotatate for midgut neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. v. 376, p. 125 – 135, 2017.

[101] RAHBAR, K.; AHMADZADEHFAR, H.; KRATOCHWILL, C.; HABERKORN, U.; SCHÄFFERS, M.; ESSLER, M.; BAUM, R. P.; KULLKARNI, H. R.; SCHIMIDT, M.; DRZEZGA, A.; BARTENSTEIN, P.; PFESTROFF, A.; LUSTER, M.; LÜTZEN, U.; MARX, M.; PRASAD, V.; BRENNER, W.; HEINZEL, A.; MOTTAGHY, F. M.; RUF, J.; MEYER, P. T.; HEUSCHKEL, M.; EVESLAGE, M.; BÖGEMANN, M.; FENDLER, W. P.; KRAUSE, B. J. German multicenter study investigating ^{177}Lu -PSMA-617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. *J Nucl Med*. v. 85 - 90, 2017.

[102] BREEMAN, W.A.P.; JONG, M.; VISSER, T.J.; ERION, J.L.; KRENNING, E.P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30 (6): 917 - 920, 2003.

[103] TANAKA, K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed*. v. 42(33), p. 3860 - 3870, 2003.

[104] SIEGEL M. M.; HOLLANDER I. J.; HAMANN, P. R.; JAMES, J. P.; HINMAN, L.; SMITH, B. J.; FARNSWORTH, A. P.; PHIPPS, A.; KING, D. J.; KARAS, M.. Matrix-assisted laser desorption-UV/ionization mass spectrometric analysis of monoclonal antibodies for the determination of carbohydrate, conjugated chelator and conjugated drug content. *Anal Chem*. v. 63(21), p. 2470 - 2481, 1991.

[105] WAKANKAR, A.; CHEN, Y.; GOKARN, Y.; JACOBSON, F.S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs*. v.3 (2): 161 -172, 2011.

[106] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227(5259), p. 680 - 685, 1970.

[107] BHUSARI, P.; VATSA, R.; SINGH, G., PARMAR, M.; BAL, A.; DHAWAN, D. K.; MITTAL, B.; SHUKLA, J. Development of Lu-177-trastuzumab for radioimmunotherapy of HER2 expressing breast cancer and its feasibility assessment in breast cancer patients. *Int J Cancer*. v. 140, p. 938 - 947, 2017.

[108] LAM, K.; SCOLLARD, D. A.; CHAN, C.; LEVINE, M. N.; REILLY, R. M. Kit for the preparation of ^{111}In -labeled pertuzumab injection for imaging response of HER2-positive breast cancer to trastuzumab (Herceptin). *Appl Radiat Isot*. v. 95, p. 135 – 142, 2015.

- [109] SUMERDON, G. A.; ROGERS, P. E.; LOMBARDO, C. M.; SCHNOBRICH, K. E.; MELVIN, S. L.; HOBART, E. D.; TRIBBY, I. I.E.; STROUPE, S. D.; JOHNSON, D. K. An optimized antibody-chelator conjugate for imaging of carcinoembryonic antigen with indium-111. *Nucl Med Biol.* v. 17(2), p. 247 – 254, 1990.
- [110] DURKAN, K; LAMBRECHT, FY; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc : ^{99m}Tc -litorin and biodistribution in rats. *Bioconjug Chem.* v. 18(5), p. 1516 - 1520, 2007.
- [111] DURANTE, A. C. R.; SOBRAL, D. V.; MIRANDA, A. C. C.; ALMEIDA, E. V.; FUSCALDI, L. L.; DE BARBOZA, M. R. F. F.; MALAVOLTA, L. Comparative Study of Two Oxidizing Agents, Chloramine T and Iodo-Gen[®], for the Radiolabeling of β -CIT with Iodine-131: Relevance for Parkinson's Disease. *Pharmaceuticals.* v. 12(25) p. 2 - 8, 2019
- [112] BLEND, M. J.; STASTNY, J. J.; SWANSON, S. M.; BECHBIEL, M. W. Labeling anti-Her2/neu monoclonal antibodies with ^{111}In and ^{90}Y using a bifunctional DTPA chelating agent. *Cancer Biother Radiopharm.* v. 18(3), p. 355 - 362, 2003.
- [113] KAMESWARAN, M.; PANDEY, U.; GAMRE, N., et al. Preparation of ^{177}Lu -Trastuzumab injection for treatment of breast cancer. *Appl Radiat Isot.* v. 148, p. 184 - 190, 2019.
- [114] SAMPATH, L.; KWON, S.; KE, S.; WANG, W.; SCHIFF, R.; MAWAD, M. E.; SEVICK-MURACA, E. M. Dual-Labeled Trastuzumab-Based imaging agent for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer. *J Nucl Med.* v. 48, p. 1501 - 1510, 2007.
- [115] COSTANTINI, D. L.; CHAN, C.; CAI, Z.; VALLIS, K. A.; REILLY, R. M. ^{111}In -Labeled trastuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): an auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer. *J Nucl Med.* v. 48, p. 1357 - 1368, 2007.
- [116] LINDMO, T.; BOVEN, E.; CUTTITTA, F.; FEDORKO, J.; BUNN JR, P.A. Determination of the immunoreactivity fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods.* v. 72(77), p. 891 - 984, 1984.
- [117] PUJATTI, P. B. **Marcadores moleculares derivados da bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT e PET.** 2012. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

- [118] ROCHA, A. F.; OLIVEIRA, P. A.; OLIVEIRA, J. P.; GUEDES, C. T.; MAIA, R. S.; DA COSTA, R. G.; COLAÇO, B.; PIRES, M. J.; COLAÇO, J.; FERREIRA, R.; GINJA, M. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. **Nature America: Lab Animal**. v. 42 (6): 217 - 224, 2013.
- [119] MIER, W.; HOFFEND, J.; KRAMER, S.; SCHUHMACHER, J.; HULL, W. E.; EISENHUT, M.; HABERKORN, U. Conjugation of DOTA using isolated phenolic active esters: the labeling and biodistribution of albumin as blood pool marker. **Bioconjug Chem.**, v. 16 (1), p. 237 - 240, 2005.
- [120] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Savier, 2002.
- [121] WOJDOWSKA, W.; KARCZMARCZYK, U.; MAURIN, M.; GARNUSZEK, P.; MIKOLAJCZAK, R. Standardization of procedures for the preparation of ^{177}Lu - and ^{90}Y -labeled DOTA-rituximab based on the freeze-dried kit formulation. **Current Radiopharmaceuticals**. v. 8 (1), p. 62 - 68, 2015.
- [122] NIKULA, T. K.; CURCIO, M. J.; BRECHBIEL, M. W.; GANSOW, O. A.; FINN, R. D.; SCHEINBERG, D. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. **Nucl Med Biol**. v. 22 (3), p. 387-390, 1995.
- [123] HENS, M.; VAIDYANATHAN, G.; WELSH, P.; ZALUTSKY, M. R. Labeling internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody with ^{177}Lu : *in vitro* comparison of acyclic and macrocyclic ligands. **Nucl Med Biol**. v. 36, p. 117 - 128, 2009.
- [124] BOSWELL, C. A.; BRECHBIEL, M. W. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. **Nucl Med Biol**. v. 34(7), p. 757 - 778, 2007.
- [125] ZIMMERMANN, K.; GRÜNBERG, J.; HONER, M.; AMETAMEY, S.; SCHUBIGER, P. A.; NOVAK-HOFER, I. Targeting of renal carcinoma with $^{67/64}\text{Cu}$ -labeled anti-L1-CAM antibody chCE7: Selection of copper ligands and PET imaging. **Nucl Med Biol**. v. 30 (4), p. 417 - 427, 2003.
- [126] PERK, L. R.; VOSJAN, M. W.D.; VISSER, G. W. M.; BUDDE, M.; JUREK, P.; KIEFER, G. E.; VAN DONGEN, G. A. M. S. P-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. v. 37 (2), p. 250 - 259, 2010.

- [127] NATARAJAN, A.; HABTE, F.; GAMBHIR, S. S. Development of a novel long-lived immuno-PET tracer for monitoring lymphoma therapy in a humanized transgenic mouse model. *Bioconjug Chem.* v. 23 (6), p. 1221 - 1229, 2012.
- [128] WAGNER-ROUSSET, E.; JANIN-BUSSAT, M. C.; COLAS, O.; EXCOFFIER, M.; AYOUB, D.; HAEUW, J. F.; RILATT, I.; PEREZ, M.; CORVAIA, N.; BECK, A. Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion. *mAbs.* v. 6 (1), p. 173-184, 2014.
- [129] HOLLEVOET, K; SMIDHT, E. D.; GEUKENS, N.; DECLERCK, P. Prolonged *in vivo* expression and anti-tumor response of DNA-based anti-HER2 antibodies. *Oncotarget.* v. 9 (17), p. 13623 - 13636, 2018.
- [130] GIANNINI, G.; MILAZZO, F. M.; BATTISTUZZI, G.; ROSI, A.; ANASTASI, A. M.; PETRONZELLI, F.; ALBERTONI, C.; TEI, L.; LEONE, L.; SALVINI, L.; DE SANTIS, R. Synthesis and preliminar *in vitro* evaluation of DOTA-Tenatumomab conjugates for theranostic applications in tenascin expressing tumors. *Bioorg Med Chem.* v. 27; p. 3248 - 3253, 2019.
- [131] GAD, S. C. Handbook of Pharmaceutical Biotechnology. In: REILLY, R. M. **The Radiopharmaceutical Science of Monoclonal Antibodies and Peptides for Imaging and Targeted *in situ* Radiotherapy of Malignancies.** p. 883 - 942. 1 ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007.
- [132] REILLY, R. M.; LAM, K.; CHAN, C.; LEVINE, M. Advancing novel molecular imaging agents from preclinical studies to first-in-humans phase I clinical trials in academia – a roadmap for overcoming perceived barriers. *Bioconjug Chem.* v. 26, p. 625 - 632, 2015.
- [133] WEINER, R.E.; THAKUR, M.L. Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. (editores). **Handbook of radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications.** Wiley, West Sussex, England, 2003.
- [134] VALLABHAJOSULA, S. **Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT.** p. 179 -196, 1 ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [135] MASSICANO, A. V. F. **Desenvolvimento farmacotécnico de um radioimunoconjugado para terapia de linfoma não-Hodgkin.** Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2016.

- [136] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. São Paulo: Editora da Unicamp, 2006.
- [137] BAUER, K.; GROS, L.; WERNER, S. **Thin-layer chromatography – an introduction**. 1 ed. Heidelberg: Hüthing Buch Verlag, 1991.
- [138] BAUM, R. P. Therapeutic Nuclear Medicine, Medical Radiology. Radiation Oncology. In: OKARVI, S. M.; MAECKE, H. R. **Peptides for nuclear medicine therapy: chemical properties and production**. p. 105 - 123. 1 ed. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.
- [139] COLE, W. C.; DeNARDO, S. J.; MEARES, C. F.; McCALL, M. J.; DeNARDO, G. L.; EPSTEIN, A. L.; O'BRIEN, H. A.; MOI, M. K. Serum stability of ⁶⁷Cu chelates: Comparison with ¹¹¹In and ⁵⁷Co. **Int J Rad Appl Instrum B**. v.13, p. 363 - 368, 1986.
- [140] RITSCHHEL, W. A.; KEARNS, G. L. Binding of drugs to biological material. In: RITSCHHEL, W. A.; KEARNS, G. L. **Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications**. p. 105 - 115. 7 ed. Washington: American Pharmacist Association, 2009.
- [141] DRUGBANK. Trastuzumab emtansine. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB05773>>. Acesso em: 15. Abr. 2020.
- [142] ROCHE. Bula Kadcycla® (trastuzumabe entansina). Disponível em: <https://docs.google.com/gview?url=https://uploads.consultaremedios.com.br/drug_leaflet/Bula-Kadcyla-Paciente-Consulta-Remedios.pdf?1591374296&embedded=true>. Acesso em: 15. Abr. 2020.
- [143] SADEGHI, S.; OLEVSKY, O.; HURVITZ, S.A. Profiling and targeting HER2-positive breast cancer using trastuzumab emtansine. **Pharmgenomics Pers Med**. v.7. p. 329 - 338, 2014.
- [144] ROBERTS, C. J. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control. **Trends Biotechnol**. v. 32, p. 372 - 380, 2014.
- [145] DEMIR, I.; MUFTULER, F. Z. B.; UNAK, P.; ACAR, C. *In vivo* investigation of radiolabeled bevacizumab in healthy rat tissues. **Braz Arch Biol Technol**. v.54 (1), p. 73 - 79, 2011.

- [146] SCHMITT, A.; BERNHARDT, P.; NILSON, O.; AHLMAN, H.; KÖLBY, L.; FORSSELL-ARONSSON. Differences in biodistribution between ^{99m}Tc -depreotide, ^{111}In -DTPA-octreotide, and ^{177}Lu -DOTA-Tyr3-octreotate in a small-cell lung cancer animal model. ***Cancer Biother Radiopharm.*** v. 20 (2), p. 231 - 236, 2005.
- [147] DECRISTOFORO, C.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; SOSABOWSKI, J. ^{99m}Tc -HYNIC-[Tyr3]-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with ^{111}In -octreotide. ***J Nucl Med.*** v. 41 (6), p. 1114 - 1119, 2000.
- [148] REILLY, R. The immunoreactivity of radiolabeled antibodies - its impact on tumor targeting and strategies for preservation. ***Cancer Biother Radiopharm.***, v. 19, n. 6, p. 669 - 672, 2004.
- [149] LEWIS, M. R.; BOSWELL, C. A.; LAFOREST, R.; BUETTNER, T. L.; YE, D.; CONNETT, J. M.; ANDERSON, C, J. Conjugation of monoclonal antibodies with TETA using activated esters: biological comparison of ^{64}Cu - TETA- 1A3 with ^{64}Cu - BAT- 2IT- 1A3. ***Cancer Biother Radiopharm.*** v.16 (6), p. 483 - 494, 2001.
- [150] SABBAH, E. N.; KADOUCHE, J.; ELLISON, D.; FINUCANE, C.; DECAUDIN, D.; MATHER, S. J. *In vitro* and *in vivo* comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer. ***Nucl Med Biol.*** v. 34 (3), p. 293 - 304, 2007.
- [151] KHOJASTEH, S. C.; WONG, W.; HOP, C. E. C. A. ***Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide.*** Nova York, N.Y.: Springer, 2011.
- [152] STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. ***Farmacocinética Básica e Aplicada.*** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- [153] WANG, B.; LAU, Y. Y.; LIANG, M.; VAINSHTEIN, I.; ZUSMANOVICH, M.; LU, H.; MAGRINI, F.; SLEEMAN, M.; ROSKOS, L. Mechanistic modeling of antigen sink effect for mavrilimumab following intravenous administration in patients with rheumatoid arthritis. ***J Clin Pharmacol.*** v. 52, p. 1150 - 1161, 2012.
- [154] McKEAGE, K.; PERRY, C.M. Trastuzumab: A review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. ***Drugs.*** v. 62, p. 209 - 243, 2002.

[155] RAMLI, M.; HIDAYAT, B.; AGUSWARINI, S.; ARDIYATNO, C. N.; SUBUR, M.; HUMANI, T. S.; RITAWIDYA, R.; MUTALIB, A.; MASJHUR, J. Preclinical study of ^{177}Lu -DOTA-trastuzumab: a potential radiopharmaceutical for therapy of breast cancer positive HER-2. *JKI*. v. 11(2), p. 116 – 122, 2013.

[156] SHI, S. Biologics: An update and challenge of their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*. v. 15, p. 271 - 290, 2014.

[157] QUADRI, S. M.; VRISENDORP, H. M. Effects of linker chemistry on the pharmacokinetics of radioimmunoconjugates. *Q J Nucl Med*. v. 42, p. 250 - 256, 1998.

[158] KOKAI, Y.; COHEN, J. A.; DREBIN, J. A.; GREENE, M. I. Stage- and tissue- specific expression of the neu oncogene in rat development. *Dev Biol*. v. 84, p. 8498 - 8501, 1987.

[159] ANDO, A.; ANDO, I.; HIRAKI, T.; HISDA, K. Relation between the location of elements in the periodic table and various organ-uptake rates. *Nucl Med Biol*. v. 16. p. 57 – 80, 1989.

[160] HNATOWICH, D. J. Recent Developments in the radiolabeling of antibodies with iodine, indium, and technetium. *Sem Nucl Med*. v. XX (1), p. 80 - 91, 1990.

[161] GAROUSI, J.; ORLOVA, A.; FREJD, F. Y.; TOLMACHEV, V. Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond. *EJNMMI Radiopharm Chem*. v. 5 (16), p. 1 – 26, 2020.

[162] CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apli*. v. 28 (1), p. 11 - 23, 2007.

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.