



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

**Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com Lutécio-177 e a sua  
avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata**

**CRISTIAN ANTONIO WIECZOREK VILLAS BOAS**

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

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

**São Paulo  
2020**

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

**Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e sua  
avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata**

**Versão Corrigida**

**Versão Original disponível no IPEN**

**CRISTIAN ANTONIO WIECZOREK VILLAS BOAS**

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

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

**São Paulo  
2020**

Fonte de financiamento: FAPESP (Processo 2018/12965-4) e CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

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

Como citar:

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. **Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e sua avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata**. 2020. 209 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em: <[www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)>. Acesso em: (formato dd/mm/aaaa)

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

<p>Wieczorek Villas Boas, Cristian Antonio Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e a sua avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata / Cristian Antonio Wieczorek Villas Boas; orientadora Elaine Bortoleti de Araújo. -- São Paulo, 2020. 209 p.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.</p> <p>1. PSMA-617. 2. Lutécio-177. 3. Atividade específica. 4. Presença ou ausência de carregador. 5. Câncer de próstata. I. Bortoleti de Araújo, Elaine, orient. II. Título.</p>
--

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Cristian Antonio Wieczorek Villas Boas**

**Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e sua avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata.**

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: 10/11/2020

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CECRF

Presidente

Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Bellini Marumo

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CEBIO Julgamento: Aprovado

Prof<sup>a</sup> Dra. Carolina Passarelli Gonçalves

UNIDERP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Euclides Timóteo da Rocha

Fundação Pio XII (Hospital de Amor)

Julgamento: Aprovado

## Dedicatória

Às Pessoas fundamentais da minha vida:  
meus pais, meu irmão,  
minha namorada,  
meus amigos,  
a presença de vocês torna tudo possível e exequível

## Agradecimentos

A Deus por estar presente em todas ocasiões e auxiliar nas minhas decisões.

Aos meus pais, Ana e Germano, que sempre foram motivo de inspiração e me deram todo o suporte necessário durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão Felipe, um verdadeiro amigo, sempre disposto ajudar em tudo que é necessário.

À minha namorada Júlia, que me acompanhou durante toda esta jornada do doutorado e este sempre ao meu lado me dando suporte e carinho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, uma pessoa de grande coração, sempre solícita, muito atenciosa, sempre disposta a compartilhar os seus conhecimentos. Aprendi muito e sou imensamente grato por ter me tido como aluno!

Ao MSc Jair Mengatti, por toda sua contribuição à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Daniel Perez e a sua aluna Priscila por terem cultivado as células LNCaP para os meus experimentos *in vitro*.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Helena Bellini e ao seu aluno Felipe, que cultivaram as células LNCaP utilizadas nos experimentos *in vivo* e inoculado as mesmas, na análise do anatomopatológico e por todo conhecimento transmitido.

Agradeço a Raquel e ao Jefferson que participaram de todas as minhas etapas e se tornaram verdadeiros amigos!

Ao Dr. Euclides Timóteo da Rocha, colaborador do Hospital de Amor, por me ceder gentilmente dados demonstrando a eficácia do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em paciente sob uso compassivo.

A todos os funcionários do Centro de Radiofarmácia:

À Dra. Maria Tereza Colturato, por sempre me auxiliar quando foi necessário.

À Dra. Neuza Takeo O. Fukumori, Dra. Margareth Mie N. Matsuda e MSc Natanael Gomes da Silva, por entenderem as necessidades da pesquisa e disponibilizarem o uso dos equipamentos imprescindíveis para o desenvolvimento deste projeto.

À Rosana, Bruzinga, Adriano pelo cuidado e atenção na separação das minhas amostras de lutécio-177.

Aos colegas do Controle de Qualidade: Jurandi, Waldir, Domingos, Lígia, Patrícia, Carlos, Laércio, Eduardo, Cabral e Vivian por sempre serem muito solícitos e me auxiliarem no uso dos equipamentos.

Ao Jurandi por todo auxílio prestado durante os ensaios com os animais, sem você meus ensaios de biodistribuição não seriam os mesmos, muito obrigado!

Aos meus amigos de pós-graduação Adriana, Jefferson, Raquel, Luis Alberto, Luiza, Ana Claudia, Rafael, Bianca, Renata, Sofia, Jorge, Carolina e Mariana. Vocês contribuíram imensamente para a realização deste trabalho. Agradeço vocês por todo apoio, atenção, pelas conversas e distrações, momentos de alegria e tristeza e por toda experiência compartilhada.

Aos meus amigos André, Robson, Guilherme, Tiago, Vitor, Jennifer que compreenderam os meus momentos de ausência.

Aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite.

Ao IPEN, por ceder os laboratórios e pelo auxílio financeiro.

À CNEN, pela bolsa concedida.

À FAPESP, pela bolsa concedida (projeto 2018/12965-4).

A todos que de alguma forma, estiveram presentes nesta etapa da minha vida e foram importantes na concretização deste sonho.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada”

- Marie Skłodowska Curie



## RESUMO

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. **Obtenção de kit de PSMA-617 para pronta marcação com lutécio-177 e sua avaliação na aplicabilidade no tratamento do câncer de próstata.** 2020. 209 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

O câncer de próstata é o segundo tipo de neoplasia que mais afeta homens no Brasil. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2020 surgirão mais de 65 mil novos casos desta doença. Uma via eficiente para o tratamento deste câncer é a partir da produção de radiofármacos que se ligam especificamente ao antígeno de membrana prostático específico (PSMA), superexpresso nas células cancerígenas. Este trabalho estudou a radiomarcagem do PSMA-617 com lutécio-177 de atividade específica distinta, em função da rota de produção (com ou sem carregador) e o efeito *in vitro* e *in vivo* nas propriedades do radiofármaco. Também foi estudado o escalonamento de lotes piloto de produção do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (sem carregador), que demonstrou a viabilidade na produção de lote contendo até 4 doses terapêuticas do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. O trabalho apresenta proposta de um kit para marcação, a partir do estudo da estabilidade de armazenamento dos constituintes da radiomarcagem. A estabilidade das doses terapêuticas foi estabelecida por até 48 horas, mediante congelamento do produto, em embalado de transporte, que viabilizará o envio do radiofármaco para regiões distantes do local de produção. O estudo de saturação *in vitro* demonstrou que a maior atividade específica do radiofármaco resultou em valor de  $K_d$  (constante de dissociação) significativamente inferior. No ensaio de competição observou-se que, independentemente da atividade específica estudada, o bloqueio da ligação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no PSMA expresso foi semelhante. No ensaio de internalização verificou-se porcentagens semelhantes, a despeito da atividade específica de marcação. Os perfis de clareamento sanguíneo foram semelhantes, assim como o perfil de biodistribuição não foi afetado em função da atividade específica de marcação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. Contudo, observou-se um retardo na eliminação do

PSMA-617-<sup>177</sup>Lu de órgãos viscerais não alvo (fígado, baço, pâncreas) na marcação com menor atividade específica. Este estudo atestou a estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu *in vivo*, pois não se observou incremento da captação óssea (<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> possui tropismo por osso), para ambas as atividades específicas estudadas. Os ensaios com camundongos com tumor de próstata revelaram captação tumoral semelhante, independentemente da atividade específica, contudo observou-se melhor relação tumor/sangue, órgãos e tecidos de interesse com PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com menor atividade específica. O estudo de bloqueio apresentou, para ambas as atividades específicas, redução expressiva na captação tumoral e renal dos radiofármacos. Concluiu-se que a variação da atividade específica de marcação do PSMA-617 não afetou a especificidade de ligação tumoral e a escolha do lutécio-177 (com ou sem carregador) poderá basear-se em fatores como a disponibilidade do radioisótopo e os custos de produção envolvidos.

Palavras-chave: PSMA-617; lutécio-177; atividade específica; presença ou ausência de carregador; câncer de próstata.

## ABSTRACT

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. **Evaluation of the applicability in Prostate Cancer of a ready-to-use kit of PSMA-617 for radiolabeled with lutetium-177.** 2020. 209 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Accordingly, to Instituto Nacional do Cancer (INCA) prostate cancer is the second type of malignant disease that most affects men in Brazil. More than 65,000 new cases are expected in 2020. Prostate cancer cells overexpress PSMA, which make it radiopharmaceuticals that specifically bind to PSMA an efficient route for treatment. This work evaluated the effect *in vitro* and *in vivo* of two different specific activities of the  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 based on lutetium-177 route production (with or without carrier added). In addition, the feasibility of production up to 4 therapeutic doses were demonstrated at the scheduling of pilot batches of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 (non-carrier added). Based on the stability of the therapeutic doses, a prompt kit for radiolabeling was presented in this work. It will be possible to send the radiopharmaceutical to distant regions from the IPEN due to the stability of frozen therapeutic doses in a transport package established up to 48 hours. The higher specific activity of the radiopharmaceutical showed a lower dissociation constant ( $K_d$  value) with statistical significance in the saturation assay. Regardless the specific activity studied, the molar concentration of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 was similar in the competition assay. Independent of the specific activity, similar percentages of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 were internalized at the internalization assay. Pharmacokinetic and biodistribution profiles were similar, regardless of the specific activity of the radiopharmaceutical. The lower specific activity resulted in a delay in the elimination of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 from non-target visceral organs (liver, spleen and pancreas). For both specific activities studied were attested the stability *in vivo* of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617, once there was no increase in bone uptake ( $^{177}\text{LuCl}_3$  has bone tropism). Similar uptakes of  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 are observed, independent of the specific activity studied, however a better ratio tumor/blood, tissue and specific organs of interest

were noticed with the  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 at the lower specific activity in the biodistribution tumor model. A significant reduction in tumor and renal uptakes of the radiopharmaceutical, for both specific activities, were observed at the *in vivo* blocking assay. In conclusion, independent of the specific activity of the  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA-617 studied (with or without carrier added), it was observed similar tumors uptakes. The costs involved in the production of the radiopharmaceutical and the availability of the radioisotope should be used in the choice of Lutetium-177 (with or without carrier added).

Key words: PSMA-617; lutetium-177; specific activity; non-carrier added and carrier added; prostate cancer.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos inibidores de PSMA quanto a sua estrutura (anticorpos ou peptídeos) .....	51
Tabela 2 – Características físicas dos radioisótopos aplicados em terapia .....	77
Tabela 3 – Proporção dos solventes utilizados no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	92
Tabela 4 – Energia das impurezas (itérbio-175 e lutécio-177 metaestável) que podem estar presentes no lutécio-177 e que devem ser pesquisadas. ....	94
Tabela 5 – Pureza radioquímica das marcações realizadas com 740 MBq (20 mCi) de lutécio-177 com carregador em diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos) e temperatura (85 °C, 90 °C e 95 °C) com tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7. Valores expressos na forma de média e desvio padrão. ....	107
Tabela 6 – Análise comparativa da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) entre os métodos de CCD-SG e CLAE. ....	118
Tabela 7 – Análise da estabilidade do kit de PSMA-617 avaliada a partir do resultado de pureza radioquímica da marcação (%PR).....	120
Tabela 8 – Condições de marcação do PSMA-617-177Lu e características do produto acabado para as etapas de scale-up de produção. ....	124
Tabela 9 – Resultado do controle de pureza radioquímica imediata dos lotes piloto de produção ( <i>scale-up</i> ) organizados de acordo com a ordem cronológica das produções. ....	126
Tabela 10 – Avaliação do impacto da razão molar de marcação, em moles, de PSMA-617 e lutécio-177 com carregador expressos em porcentagem de pureza radioquímica (% PR) e atividade específica (A.E.) com desvio padrão (n=3). ....	127
Tabela 11 – Resultados do controle de qualidade de pureza radionuclídica do lutécio-177 proveniente dos fornecedores INM (Rússia) e NTP (África do Sul) expressos em porcentagem de pureza radionuclídica (%PRn).....	129
Tabela 12 – Resultados de controle de estabilidade radioquímica dos lotes piloto de produção, organizados de acordo com a ordem cronológica das produções:	

doses de 7,4 GBq (calibradas para 48 horas) armazenadas sob congelamento em gelo seco nos baldes de transporte. ....	132
Tabela 13 – Levantamento dos estudos de internalização do PSMA-617 disponíveis na literatura. ....	147
Tabela 14 – Parâmetros farmacocinéticos do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador determinados em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios (n=4). ....	150
Tabela 15 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).....	153
Tabela 16 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 com carregador com atividade específica de 33,95 MBq/μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). ....	156
Tabela 17 – Comparação da captação de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador no tempo de uma hora em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios. Os resultados foram expressos na média da porcentagem e erro padrão da atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) (n=4). ....	157
Tabela 18 – Comparação do volume (mm <sup>3</sup> ) e da massa (g) dos tumores de LNCaP desenvolvidos nos camundongos <i>SCID</i> machos nos ensaios de biodistribuição de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (com carregador e sem carregador). Dados expressos pela média e desvio padrão (n=16). ....	160
Tabela 19 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 sem carregador sob a atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (% AI/g) ou por mL de sangue (% AI/mL), Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).....	162

Tabela 20 – Comparação da %Al no sangue entre camundongos machos sadios ( <i>BALB/c</i> ) e camundongos machos com tumor de próstata ( <i>SCID</i> ). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).....	163
Tabela 21 – Comparação da razão da captação do tumor (%Al/g) com os órgãos ou tecido (%Al/g) ou sangue (%Al/mL) em função do tempo (30 minutos, 1 hora, 2 horas) na biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 (sem carregador) sob a atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Calculado a partir das médias de %Al/g ou mL (n=4). .....	164
Tabela 22 – Comparação da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (sem carregador) no sangue (%Al/mL), pulmões, baço, fígado, rins e intestinos (%Al/g) no tempo de 1 hora nos modelos animais sadio e tumoral. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4)..	165
Tabela 23 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 (com carregador) sob a atividade específica de 40,01 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (% Al/g) ou por mL de sangue (% Al/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).....	167
Tabela 24 – Comparação da razão da captação do tumor (%Al/g) com os órgãos ou tecido (%Al/g) ou sangue (%Al/mL) em função do tempo (30 minutos, 1 hora, 2 horas) na biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 (com carregador) sob a atividade específica de 40,01 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Calculado a partir das médias de %Al/g ou mL (n=4). .....	169
Tabela 25 – Comparação da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (com carregador) no sangue (%Al/mL), pulmões, baço, fígado, rins e intestinos (%Al/g) no tempo de 1 hora nos modelos animais sadio e tumoral. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4)..	170
Tabela 26 – Comparação da captação renal (%Al/g) do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador e com carregador em camundongos machos <i>SCID</i> com tumor de próstata. Valores expressos pela média e erro padrão (n=4).....	173

Tabela 27 – Comparação da %AI em sangue total observada na biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador em camundongos machos <i>SCID</i> com tumor de próstata. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	177
Tabela 28 – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu sob a atividade específica de 74 MBq/μg (lutécio-177 sem carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	180
Tabela 29 – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu sob a atividade específica de 40,04 MBq/μg (lutécio-177 com carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	182
Tabela 30 – Efeito do bloqueio/deslocamento expresso a partir das médias de porcentagem para o sangue, órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, intestinos e rins), músculo e tumor estudados nas biodistribuições de PSMA-617 radiomarcados com lutécio-177 com carregador e lutécio-177 sem carregador.	183



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação em esquema da próstata e de um câncer.....	38
Figura 2 – Ilustração das cinco principais vias utilizadas para o diagnóstico do câncer de próstata por meio do PSMA expresso em membrana, transportadores de glicose, transportadores de aminoácidos, transportadores de colina e ligação a PSMA no interior da célula.....	41
Figura 3 – Fórmula estrutural do FDG- <sup>18</sup> F e da glicose .....	42
Figura 4 – Fórmula estrutural da Colina- <sup>11</sup> C. ....	43
Figura 5 – Fórmulas estruturais da Fluciclovina e L-Leucina .....	44
Figura 6 – Esquema representativo do PSMA .....	45
Figura 7 – 2-PMPA.....	47
Figura 8 – Grupos farmacofórico DUPA e Glutamato-Ureia-Lisina.....	48
Figura 9 – Esquema figurativo do PSMA de membrana. Destaca-se o sítio de ligação para o glutamato conjuntamente com o Zn <sup>2+</sup> que possui um papel importante na ativação do sítio de ligação correspondem a porção S1'. Destacado em azul, é visualizado a porção S1, na qual ocorrem interações hidrofóbicas que são melhoradas quando um grupo aromático é adicionado nesta região da molécula (espaçador). Em A está representada a molécula DCIBzL, em B o PSMA-617 e em C a estrutura do ARM-P4.....	50
Figura 10 – Classificação dos inibidores de PSMA quanto ao local de ligação no PSMA de membrana.....	52
Figura 11 – Representação esquemática dos anticorpos J591 e IAB2M.....	54
Figura 12 – Fórmula estrutural do PSMA-11.....	56
Figura 13 – Fórmula estrutural do PSMA-1007- <sup>18</sup> F.....	58
Figura 14 – Fórmula estrutural do DCFBC- <sup>18</sup> F.....	59
Figura 15 – Fórmula estrutural do DCFPyL .....	60
Figura 16 – Fórmulas estruturais dos compostos MIP-1404, MIP-1405 e MIP-1427 .....	61

Figura 17 – Fórmula estrutural do MIP-1095 .....	63
Figura 18 – Fórmula estrutural do PSMA-I&T .....	64
Figura 19 – Fórmula estrutural do PSMA-I&S marcado com tecnécio-99 metaestável.....	65
Figura 20 – Fórmula estrutural do PSMA-617.....	67
Figura 21 – Comparação das fórmulas estruturais do PSMA-7 e do DDFPyL.....	73
Figura 22 – Fórmula estrutural do PSMA-I&F e PSMA-I&T .....	74
Figura 23 – Estrutura do DOTA.....	76
Figura 24 – Fluxograma da avaliação de estabilidade do kit para pronta marcação de PSMA-617.....	80
Figura 25 – Fluxograma do escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu.....	81
Figura 26 – Fluxograma para comparação do efeito <i>in vitro</i> de duas atividades específicas diferentes de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador).....	82
Figura 27 – Fluxograma de atividades para comparação do efeito <i>in vitro</i> de duas atividades específicas diferentes de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador).....	83
Figura 28 – Fórmula estrutural do PSMA-617, destacando o grupo farmacofórico (vermelho), o espaçador (azul) e o grupamento quelante DOTA (preto). .....	88
Figura 29 – Sistema de embalagem para envio de doses congeladas de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu [A] e representação esquemática do sistema [B]: frasco contendo o radiofármaco [1], acondicionado em castelo de chumbo apropriado [2], protegido dentro de um sistema plástico com trava de segurança [3] e o balde de plástico forrado com isopor [5] com gelo seco [4]. .....	95
Figura 30 – Fórmula estrutural do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu [A]. Representação estrutural do complexo formado pelo DOTA-Lu [B]. .....	106
Figura 31 – Estabilidade em 24 horas e 48 horas do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em temperatura ambiente em sistema tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 e	

sistema tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 com ácido gentísico (n=3). .....	108
Figura 32 – Estabilidade em 24 horas e 48 horas do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu congelado em sistema tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 (n=3).....	109
Figura 33 – Comparação dos perfis cromatográficos do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em CCD-SG e iCCD-SG (n=3).....	111
Figura 34 – Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (Rf=0,1) em fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, em radiocromatógrafo. ....	112
Figura 35 – Perfil cromatográfico da mistura das espécies <sup>177</sup> Lu(OH) <sub>3</sub> (Rf 0,0 – 0,1), PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (Rf 0,3 – 0,4) e DOTA- <sup>177</sup> Lu (Rf 0,9 – 1,0) em CCD-SG em fase móvel metanol:acetato de amônio 1 M pH 8,5 em radiocromatógrafo. ....	113
Figura 36 – Radiocromatograma de CLAE de uma amostra de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu (TR 12,07 min) contaminada com <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> (TR 4,27 min), em coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm), gradiente de água/TFA 0,1% e acetonitrila. (0-2min 17% acetonitrila; 2-5,99min 30% acetonitrila; 6-20min 17% acetonitrila).....	115
Figura 37 – Cromatograma de CLAE em detector UV do PSMA-617.....	116
Figura 38 – Radiocromatograma de uma amostra de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu e um pico de produto de degradação (radiólise) não identificado, antes do pico de PSMA-617.....	117
Figura 39 – Recorte dos cromatogramas obtidos por CLAE das marcações com lutécio-177 de amostras de kit de PSMA-617 armazenadas por 7 e 12 meses sob congelamento demonstrando a presença de picos secundários.....	121
Figura 40 – Perfil de CLAE/UV-Vis de dois picos após dois meses de conservação do kit de PSMA-617 em tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 em frasco único. ....	122
Figura 41 – Perfil de CLAE/UV-Vis - Acompanhamento da estabilidade do PSMA-617 não marcado dissolvido em água purificada, após 2 meses de conservação sob congelamento.....	123
Figura 42 – Espectro do lutécio-177 com os picos de energia de 112 e 208 keV. Em [A] visualiza-se o pico de aproximadamente 53 keV (1) (emissão raio X) e dentro	

do quadro branco as emissões gama em 112 e 208 keV. Em [B] consta a ampliação da região dos picos 112 (2) e 208 (3) keV. ....	130
Figura 43 – Perfis de CLAE de uma dose terapêutica mantida congelada (7,4 GBq calibrada para 48 horas) obtidos a partir do lote piloto de produção com 37 GBq, amostragem de 24 e 48 horas com pureza radioquímica de 98,9% e 96,9%, respectivamente. ....	134
Figura 44 – Influência do tempo na cinética de ligação do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu ao receptor PSMA presente na membrana das células LNCaP, resultado expresso em fmol/ng (n=8). ....	138
Figura 45 – Curva de saturação de células LNCaP com PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador. Atividade específica da marcação de 42,55 MBq/μg (n=8). Cada ponto do gráfico foi representado pela média e desvio padrão. ....	140
Figura 46 – Curva de saturação de células LNCaP com PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador. Atividade específica da marcação de 74 MBq/μg (n=8). Cada ponto do gráfico foi representado pela média e desvio padrão. ....	140
Figura 47 – Comparação entre os ensaios de competição de PSMA-617 radiomarcados com lutécio-177 com carregador e lutécio-177 sem carregador, em células LNCaP (200.000 por poço) (n=3). ....	143
Figura 48 – Ensaio de internalização do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador, com atividade específica de 25,84 MBq/μg, com 200.000 em células LNCaP por poço (n=6). ....	145
Figura 49 – Ensaio de internalização do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador, com atividade específica de 74 MBq/μg, com 200.000 em células LNCaP por poço (n=6). ....	146
Figura 50 – Comparação entre as estruturas do PSMA-DOTA e PSMA-617. Em vermelho destaca-se o espaçador e em azul o grupo β-naftil. ....	147
Figura 51 – Curva de clareamento sanguíneo (%AI sangue total) do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios entre 15 minutos e 24 horas. Experimento realizado com o radiofármaco obtido com lutécio-177 com carregador e sem carregador. Dados expressos pela média e desvio padrão (n=4). ....	149

Figura 52 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios. Os resultados foram expressos pela média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	152
Figura 53 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu obtido com lutécio-177 com carregador com atividade específica de 33,95 MBq/μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	155
Figura 54 – Corte histológico de tumor de próstata derivado da inoculação de células LNCaP em flanco esquerdo de camundongo <i>SCID</i> macho, aumento de 200 vezes.....	159
Figura 55 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). .....	161
Figura 56 – Comparação da curva de clareamento sanguíneo do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu marcado com lutécio-177 sem carregador em camundongos machos <i>BALB/c</i> sadios e <i>SCID</i> com tumor de próstata. Dados expressos em %AI em sangue total e erro padrão (n=4). .....	163
Figura 57 – Biodistribuição do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu com lutécio-177 com carregador sob a atividade específica de 40,01 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).....	166
Figura 58 – Comparação da curva de clareamento sanguíneo do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu marcado com lutécio-177 com carregador em camundongos machos <i>BALB/c</i> sadios e <i>SCID</i> com tumor de próstata. Dados expressos em %AI em sangue total e erro padrão (n=4). .....	168

Figura 59 – Comparação da captação do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador no sangue, órgãos de interesse (pulmões, fígado, rins e intestinos), músculo e tumor, após 1 hora da administração (n=4).....	171
Figura 60 – Comparação da influência da atividade específica na razão de captação tumoral <i>versus</i> órgãos e músculo, sendo este representativo da captação não específica (background) na biodistribuição com 1 hora. Dados expressos pela média. ....	174
Figura 61 – Comparação das curvas de farmacocinética obtidas a partir de injeção de 7,4 MBq de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador e com carregador em camundongos <i>BALB/c</i> e <i>SCID</i> com tumor de próstata. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4). ....	176
Figura 62 – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu sob a atividade específica de 74 MBq/μg (lutécio-177 sem carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e desvio padrão (n=4). ....	179
Figura 63 – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu sob a atividade específica de 40,04 MBq/μg (lutécio-177 com carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4). ....	181

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	Radiação alfa; constante de distribuição
Å	Angstrom ( $10^{-10}$ m)
$\beta$	Constante de eliminação
$\beta^-$	Radiação beta negativo
$\beta^+$	Radiação beta positivo (pósitron)
$\gamma$	radiação gama
%AI	Porcentagem de atividade injetada
%AI/g	Porcentagem de atividade injetada por grama
%AI/mL	Porcentagem de atividade injetada por mL
%AI sg total	Porcentagem de atividade injetada em sangue total
%PR	Porcentagem de Pureza Radioquímica
%PRn	Porcentagem de Pureza Radionuclídica
°C	Graus Celsius
$\mu$ Ci	Micro Curie
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
2-PMPA	Ácido 2-fosfonometil-pentadióico
AA	Aminoácidos
AUC	<i>Area Under the Curve</i> , área sobre a curva
BALB/c	<i>Bagg's albino</i> , linhagem genética do camundongo ( <i>Mus musculus</i> ) albino c
$B_{max}$	Densidade máxima de receptores
BRCA1	Câncer de mama 1, início adiantado
BRCA2	Câncer de mama 2
CCD-SG	Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel
CE	Captura Eletrônica
CEBIO	Centro de Biotecnologia
CECRF	Centro de Radiofarmácia
CI	Conversão Interna
CL	Clareamento Sanguíneo

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Ci	Curie
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CPM	Contagens por minuto
DL <sub>50%</sub>	Dose letal que mata 50% de uma população
DOTA	ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DP	Desvio Padrão
DTPA	Ácido dietilenotriamino pentacético
DU 145	Linhagem de câncer de próstata removida do cérebro
DUPA	ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)-ureido] pentadióico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
EPM	Erro Padrão da Média
EPR	Embalagem para Radiofármaco
EUA	Estados Unidos da América
FACBC	Fluciclovina
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fludesoxiglicose
fmol	fento mol ( $10^{-15}$ mol)
FOLH1	Folato Hidrolase I
g	grama
GBq	Giga Becquerel
GLOBOCAN	Observatório Mundial do Câncer
Glu-Ureia-Lis	glutamato-ureia-lisina
GPC2	Glutamato Carboxipeptidase II
Gy	<i>Gray</i>
HBED-cc	ácido N-N'-bis-[2-hidroxi-5-(carboxietil)benzil]etilenediamino-N-N' diacético
iCCD-SG	Cromatografia instantânea em Camada Delgada de Sílica Gel
IC <sub>50%</sub>	Concentração inibitória 50%
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares



IPBU	Inibidores de PSMA Baseados em Ureia
K <sub>d</sub>	Constante de dissociação em equilíbrio
K <sub>off</sub>	Constante de dissociação
K <sub>on</sub>	Constante de associação
kBq	<i>Kilo Becquerel</i> , quilo Becquerel
keV	<i>kilo eletron Volt</i> , quilo elétron Volt
L+R	Complexo ligante-receptor
LAL	<i>Limulus amebocyte lysate</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i> , Transferência de Energia Linear
LNCaP	Célula de carcinoma prostático humano androgênio-dependente
Log P	Coeficiente de partição
M	Molar
MBq	Mega Becquerel
mCi	Mili Curie
MeV	<i>Mega eletron Volt</i> , Mega elétron Volt
mg	miligrama
mL	mililitro
n	Nêutrons
NAA	<i>N</i> -acetil-L-aspartato
NAAG	<i>N</i> -acetil-L-aspartato-L-glutamato
NAALADase	Peptidase <i>N</i> -acetil-L-aspartil-L-glutamato
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nano grama
nM	nano molar
nmol	nano mol
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , Tampão Fosfato Alcalino
PC-3	<i>Prostate Cancer Line Cell</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> , Tomografia por Emissão de Pósitrons
pH	Potencial Hidrogeniônico

pK <sub>a</sub>	Constante de acidez
PR	Pureza Radioquímica
PSA	Antígeno Prostático Específico
PSMA	Antígeno de Membrana Prostático Específico
REA	Relação Estrutura Atividade
R <sub>f</sub>	<i>Retention fator</i> , Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SCID	<i>BALB/c with Severe Combined Immunodeficient</i> , camundongos <i>BALB/c com imunodeficiência severa combinada</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> , Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
SubKuE	DOTAGA-ffk, primeira geração do PSMA-I&T
SUV	<i>Standardized uptake value</i>
T	Tioglicolato
T <sub>1/2</sub> α	meia-vida de distribuição
T <sub>1/2</sub> β	meia-vida de eliminação
TC	Tomografia Computadorizada
TR	Tempo de Retenção
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> , Caldo caseína soja
UE/V	Unidade de Endotoxina por volume
UI	Unidades Internacionais
UV/Vis	Ultravioleta/luz visível
v/v	volume/volume
V <sub>d</sub>	Volume de Distribuição

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 A radiofarmácia e a medicina nuclear</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2 O câncer</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 O câncer de próstata</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 Radiofármacos utilizados no diagnóstico do câncer de próstata anteriores ao surgimento dos inibidores de PSMA</b> .....	<b>42</b>
3.4.1 FDG- <sup>18</sup> F (Fludesoxiglicose).....	42
3.4.2 Colina.....	43
3.4.3 Fluciclovina .....	44
<b>3.5 O Antígeno Prostático de Membrana Específico</b> .....	<b>44</b>
<b>3.6 Desenvolvimento de moléculas específicas para o PSMA</b> .....	<b>46</b>
3.6.1 Principais inibidores de PSMA .....	52
3.6.1.1 Anticorpos .....	52
3.6.1.1.1 ProstaScint® (Capromab Pendetide).....	52
3.6.1.1.2 J591 .....	53
3.6.1.1.3 IAB2M .....	54
3.6.1.2 Peptídeos.....	55
3.6.1.2.1 PSMA-11.....	55
3.6.1.2.2 PSMA-1007.....	57
3.6.1.2.3 DCFBC.....	59
3.6.1.2.4 DCFPyL.....	59
3.6.1.2.5 MIP-1404/1405/1427.....	61
3.6.1.2.6 MIP-1095.....	62
3.6.1.2.7 PSMA-I&T .....	63
3.6.1.2.8 PSMA-I&S.....	65
3.6.1.2.9 PSMA-617.....	66

3.6.1.2.10 Outros inibidores de PSMA .....	73
<b>3.7 Uso de quelantes .....</b>	<b>75</b>
3.7.1 Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) .....	75
<b>3.8 A seleção do radioisótopo .....</b>	<b>76</b>
3.8.1 O lutécio-177 .....	78
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1 Resumo do delineamento experimental.....</b>	<b>80</b>
<b>5 MATERIAIS .....</b>	<b>84</b>
5.1 Infraestrutura.....	84
5.2 Reagentes e soluções.....	84
5.3 Equipamentos, materiais e sistemas .....	85
5.4 Animais .....	87
5.5 Células de carcinoma prostático humano androgênio-dependentes (LNCaP).....	87
<b>6 MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
6.1 Estudo da radiomarcagem do PSMA-617 com lutécio-177.....	88
6.2 Condições gerais de radiomarcagem para comparação do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com e sem carregador empregado nos ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	89
6.3 Desenvolvimento de kit de PSMA-617 para pronta marcação .....	90
6.4 Escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617- <sup>177</sup> Lu.....	91
6.5 Análise de pureza radioquímica .....	91
6.5.1 Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada de sílica gel (iCCD-SG) .....	92
6.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	92
6.6 Controle de qualidade microbiológico do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu.....	92
6.7 Controle radionuclídico do lutécio-177 .....	93
6.8 Estudo de estabilidade em condições de transporte do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu.....	95
6.9 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu .....	96
6.10 Estudos com células LNCaP .....	96
6.10.1 Cultivo e preparo das células LNCaP .....	96

6.10.2 Avaliação da cinética de ligação <i>in vitro</i> entre células LNCaP e PSMA-617- <sup>177</sup> Lu .....	97
6.10.3 Ensaio <i>in vitro</i> da curva de saturação da ligação do peptídeo PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP .....	98
6.10.4 Ensaio <i>in vitro</i> de competição da ligação do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP .....	99
6.10.5 Ensaio <i>in vitro</i> de internalização do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP ..	99
<b>6.11 Estudo farmacocinético do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos BALB/c machos saudáveis .....</b>	<b>100</b>
<b>6.12 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos BALB/c machos saudáveis .....</b>	<b>101</b>
<b>6.13 Estudos de biodistribuição do PSMA-617<sup>177</sup>Lu em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP .....</b>	<b>103</b>
6.13.1 Ensaio de bloqueio de captação do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP .....	104
<b>6.14 Análise Estatística .....</b>	<b>105</b>
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>7.1 Desenvolvimento da radiomarcagem do PSMA-617 com lutécio-177 .....</b>	<b>106</b>
<b>7.2 Desenvolvimento do método de cromatografia em camada delgada – sílica gel (CDD-SG), cromatografia instantânea em camada delgada – sílica gel (iCCD-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</b>	<b>110</b>
<b>7.3 Desenvolvimento de kit de PSMA-617 para pronta marcação .....</b>	<b>119</b>
<b>7.4 Escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu .....</b>	<b>124</b>
<b>7.5 Avaliação do controle de qualidade microbiológico do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.....</b>	<b>129</b>
<b>7.6 Avaliação do controle radionuclídico do lutécio-177 adquirido da Rússia (INM) e África do Sul (NTP).....</b>	<b>129</b>
<b>7.7 Estudos de estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em condição de transporte .....</b>	<b>131</b>
<b>7.8 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu .....</b>	<b>135</b>
<b>7.9 Ensaios com células LNCaP .....</b>	<b>136</b>
7.9.1 Avaliação da cinética de ligação <i>in vitro</i> do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu às células LNCaP	

.....	137
7.9.2 Ensaio <i>in vitro</i> da curva de saturação da ligação do peptídeo PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP .....	139
7.9.3 Ensaio <i>in vitro</i> de competição da ligação do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP .....	141
7.9.4 Ensaio <i>in vitro</i> de internalização do PSMA-617- <sup>177</sup> Lu em células LNCaP..	144
<b>7.10 Estudo farmacocinético do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos BALB/c machos sadios .....</b>	<b>148</b>
<b>7.11 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos BALB/c machos sadios .....</b>	<b>151</b>
7.11.1 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador em camundongos BALB/c machos sadios.....	151
7.11.2 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador em camundongos BALB/c machos sadios.....	154
7.11.3 Comparação das biodistribuições de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador e com lutécio-177 com carregador em camundongos BALB/c machos sadios .....	156
<b>7.12 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP .....</b>	<b>159</b>
7.12.1 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP.....	160
7.12.2 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP .....	166
7.12.3 Comparação das biodistribuições de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador e com lutécio-177 com carregador em camundongos SCID com tumor de LNCaP .....	170
<b>7.13 Ensaio de bloqueio de captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com administração de excesso de peptídeo não marcado em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP .....</b>	<b>179</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>184</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>186</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>209</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais prevalente entre os homens, em primeiro encontra-se o câncer de pele não-melanoma. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2020 são esperados pouco mais de 65 mil novos casos desta doença (INCA, 2020<sup>1</sup>), o que representa um risco estimado de 66,12 novos casos para cada 100.000 homens. De acordo com dados epidemiológicos de câncer do Estado de São Paulo, entre os anos de 2000 e 2019, o câncer mais frequente entre os homens foi o de próstata, correspondendo a 27,3% de todos os diagnósticos (FOSP, 2019<sup>2</sup>).

O diagnóstico da doença é realizado pelo exame de toque retal e dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA), uma enzima produzida pelas células da próstata e que aparece no sangue em situações que envolvem morte celular, traumas ou inflamações, sendo que a elevação dos níveis plasmáticos deste marcador poderia indicar um surgimento de câncer. Entretanto, em 20% a 30% dos casos, esta elevação do nível sérico de PSA pode ser resultado de prostatite ou hipertrofia benigna, resultando em falsos positivos e na realização de biopsias desnecessárias (BRAY et al., 2018; KUMAR et al., 2005).

Embora neoplasias prostáticas detectadas inicialmente sejam frequentemente curáveis, há um grande número de pacientes com doença metastática, residual e recorrente (AHMADZADEHFAR et al., 2015). Diante do exposto, nota-se a necessidade de modalidades diagnósticas mais precisas, com elevada sensibilidade e especificidade, capazes de identificar lesões, realizar monitorização terapêutica e reestadiamento (CHEN et al., 2011).

O antígeno de membrana prostático específico (PSMA), uma glicoproteína de transmembrana do tipo II, que possui a sua maior porção extracelular e encontra-se superexpressa no câncer de próstata, cerca de 1000

---

<sup>1</sup> <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

<sup>2</sup> [www.fosp.saude.sp.gov.br:443/epidemiologia/docs/Dados\\_de\\_Cancer.pdf](http://www.fosp.saude.sp.gov.br:443/epidemiologia/docs/Dados_de_Cancer.pdf)

vezes, demonstrou ser um excelente marcador molecular para esta neoplasia, além de identificar o sítio da mesma, diferentemente do que ocorre com o PSA, que se encontra na corrente sanguínea (MARESCA et al., 2009).

A atuação do PSMA dentro das células cancerígenas ainda é incerta. No entanto, acredita-se que esta proteína seria responsável por aumentar a captação de folato pelas células. É importante mencionar que o PSMA está presente em 90% a 95% dos casos de câncer de próstata, e geralmente o nível de expressão está vinculado diretamente com a progressão ou regressão da doença (MIYAHIRA et al., 2018).

Após 27 anos do descobrimento do PSMA, diversos inibidores de PSMA baseados em ureia (IPBU), que possuem como estrutura básica o grupamento glutamato-ureia-lisina foram sintetizados, alguns destes apresentaram resultados promissores, tais como o PSMA-11 e o PSMA-617 (RISTAU et al., 2014; VIRGOLINI et al., 2018).

Uma nova era se iniciou na medicina nuclear no século XXI com a introdução de marcadores de PSMA. Os resultados iniciais para o diagnóstico foram extremamente animadores e demonstraram ser muito mais específicos e sensíveis na detecção de lesões do que o radiofármaco fludesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ ) (FDG- $^{18}\text{F}$ ). Para a terapia, a utilização destes marcadores também trouxe novas perspectivas, principalmente para pacientes que não possuem outra opção terapêutica (KOPKA et al., 2017).

Do lado do diagnóstico, aliado à melhoria na capacidade de produção de gálio-68, alguns derivados de PSMA foram testados e o PSMA-11 marcado com este radioisótopo resultou em diagnósticos mais precisos, desbancando o uso do FDG- $^{18}\text{F}$  e da colina, radiomarcada com  $^{11}\text{C}$  ou  $^{18}\text{F}$ . Um estudo retrospectivo comparou os resultados e comprovou a superioridade do PSMA-11- $^{68}\text{Ga}$  sobre colina e fluciclovina (EVANS, J. D. et al., 2018).

Na terapia, o PSMA-617 demonstrou resultados excepcionais em pacientes sob uso compassivo e, desde então, tem sido objetivo de estudo em ensaios clínicos controlados em todo o mundo, inicialmente marcado com o lutécio-177 (beta emissor) e, mais recentemente, com o actíneo-225 (alfa emissor) (KRATOCHWIL et al., 2020; VIRGOLINI et al., 2018).



Tendo como base a crescente incidência do câncer de próstata na sociedade brasileira e sob a solicitação de médicos nucleares, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), principal produtor e desenvolvedor de radiofármacos no Brasil, teve como objetivo neste trabalho, estudar a produção e estabilidade de radiofármaco PSMA-específico radiomarcado com lutécio-177, e avaliar o potencial deste radiofármaco por meio de estudos pré-clínicos contribuindo para a disponibilização futura deste radiofármaco para o tratamento do câncer de próstata.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

De forma inédita, este trabalho estudou o escalonamento de doses piloto de produção do PSMA-617-DOTA, doravante chamado de PSMA-617 marcado com lutécio-177 e avaliou o impacto da marcação deste peptídeo sob duas atividades específicas diferentes, em função da presença ou ausência de carregador no  $^{177}\text{Lu}$ , em ensaios pré-clínicos *in vitro* por meio de experimentos de saturação, competição, internalização com células de tumor de próstata LNCaP e ensaios *in vivo* de farmacocinética e biodistribuição em animais saudáveis e animais com câncer de próstata induzido pela inoculação de células LNCaP.

### 2.2 Objetivos específicos

- Definir uma condição ótima de marcação do PSMA-617 com o lutécio-177 variando o tempo e a temperatura para obter um radiofármaco com alta pureza radioquímica (superior a 95%);
- Analisar comparativamente os métodos cromatográficos de controle de qualidade da pureza radioquímica das marcações para se obter um método eficiente na separação e quantificação de potenciais impurezas radioquímicas;
- Estudar e propor um kit para pronta marcação do PSMA-617 e analisar a sua estabilidade congelado;
- Realizar o escalonamento de lotes piloto de produção com atividades terapêuticas para definir um método seguro de produção do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$ , bem como analisar a estabilidade do radiofármaco em até 48 horas após a sua produção, simulando as condições de armazenamento e transporte das doses terapêuticas fracionadas;

- Analisar o impacto do radiofármaco marcado com duas atividades específicas distintas, em função da presença ou ausência de carregador no radioisótopo, em ensaios pré-clínicos:
  - Ensaios *in vitro* de saturação, competição e internalização com células de tumor de próstata LNCaP;
  - Ensaios *in vivo* de farmacocinética e biodistribuição em animais saudáveis e animais imunossuprimidos com câncer de próstata desenvolvido por meio da inoculação de células LNCaP;
    - Verificar o impacto de distintas atividades específicas por meio da comparação dos resultados dos ensaios descritos acima e estabelecer uma relação de superioridade ou inferioridade;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A radiofarmácia e a medicina nuclear

A radiofarmácia é uma especialidade farmacêutica que tem como suas principais funções o desenvolvimento, manipulação, produção, controle de qualidade, a garantia da qualidade e os demais aspectos correlacionados aos radiofármacos empregados em Medicina Nuclear (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2019<sup>3</sup>).

Os radiofármacos são preparações farmacêuticas, em sua maioria, administradas por via intravenosa para finalidade diagnóstica ou terapêutica. Em quase todos os casos, o radiofármaco é composto por uma porção não radioativa (ligante ou carregador, que se liga especificamente à molécula ou sítio alvo) e um radioisótopo ou radionuclídeo. Quando estão prontas para uso contém um ou mais radioisótopos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Para a medicina nuclear diagnóstica, são preferencialmente utilizados radionuclídeos emissores de radiação gama ( $\gamma$ ) ou emissores de pósitrons ( $\beta^+$ ) em função dos decaimentos originarem radiação eletromagnética com grande capacidade de penetração em tecidos e baixo poder de ionização. Já para a terapia elege-se preferencialmente radionuclídeos emissores de radiação ionizante ( $\alpha$ ,  $\beta^-$  e elétrons Auger), os quais possuem baixo poder de penetração e são altamente energéticos, causando ionização do meio intracelular, quebra de ligações peptídicas, danos em DNA e consequentemente a morte celular (MASSICANO, 2016; OLIVEIRA et al., 2006).

Os radioisótopos utilizados na Medicina Nuclear são obtidos artificialmente em reatores, ciclotrons ou geradores. Em reatores, os elementos radioativos são produzidos após o bombardeamento com nêutrons podendo ser oriundos da fissão de elementos mais pesados como o urânio (formando o iodo-

---

<sup>3</sup> [www.crfsp.org.br/images/cartilhas/radiofarmacia.pdf](http://www.crfsp.org.br/images/cartilhas/radiofarmacia.pdf)

131) ou a partir da irradiação de elementos estáveis (como a produção de lutécio-177). Nos cíclotrons (aceleradores de partículas) os elementos estáveis são bombardeados com partículas carregadas positivamente, originando átomos radioativos com excesso de prótons no núcleo, como o  $^{18}\text{F}$ . Quanto aos geradores, a obtenção do radioisótopo é indireta, isto é, um radioisótopo pai é aprisionado no interior de um sistema de coluna e ao decair, gera o radionuclídeo filho (de interesse), no momento em que ocorre a eluição, este radioisótopo filho é retirado do interior da coluna para que possa ser utilizado, por exemplo o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (LOWENTHAL; AIREY, 2001).

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que emprega os radiofármacos para o diagnóstico ou a terapia. Por meio da propriedade dos radioisótopos e com a utilização de equipamentos para aquisição de imagens por emissão de pósitrons (PET, *Positron Emission Tomography*) ou de raios gama (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) é possível visualizar o funcionamento de órgãos e tecidos vivos e mensurar o tamanho de um tumor, por exemplo (SBMN, 2020<sup>4</sup>).

### 3.2 O câncer

O câncer ocorre pelo crescimento desenfreado de células que perderam a capacidade de controlar o seu ciclo celular. Algumas neoplasias permanecem no local onde se originaram enquanto outras desenvolvem a habilidade de migrar (criar metástases) para outras partes do organismo. Esta doença possui registros por Hipócrates (460-370 a.c.) e em papiros egípcios datados de 1500 a.c. que relataram um câncer de mama que foi submetido a técnicas cirúrgicas semelhantes às utilizadas atualmente para remoção de pedaços do tumor (SUDHAKAR, 2009).

Sabe-se que o câncer é um conjunto superior a 100 neoplasias que surgem em decorrência de alterações genéticas ativando oncogêneses, tais como: ciclina D1, H-ras, EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal); e também inativando genes supressores de tumor, por exemplo: p16, p53, p21, p27 (COLOMBO; RAHAL, 2009; SCUTTI et al., 2011).

---

<sup>4</sup> [www.sbmn.org.br/comunicacao/conheca-a-medicina-nuclear/](http://www.sbmn.org.br/comunicacao/conheca-a-medicina-nuclear/)

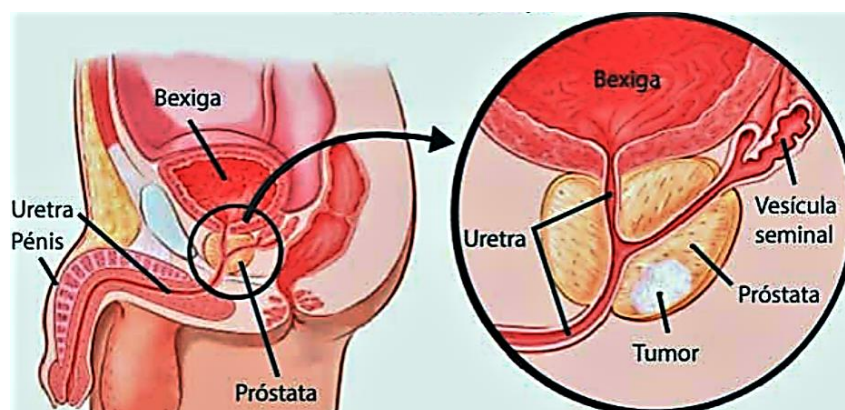
É importante mencionar que em 2008 o câncer já era a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento, na época estimou-se 12,7 milhões de novos casos em todo o mundo (JEMAL et al., 2011). Com base no levantamento mais recente do GLOBOCAN (*Global Cancer Observatory*) foram estimados que surgiriam cerca de 18 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Uma ferramenta presente (*Cancer Tomorrow*) neste site, mantido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que em 2040 serão em torno de 29,5 milhões de novos casos de câncer<sup>5</sup>.

Para o ano de 2020, de acordo com o INCA, são esperados no Brasil aproximadamente 685.960 novos casos de câncer, sendo os principais tipos o câncer de próstata, mama feminina, colón e reto (INCA, 2020). A mesma ferramenta da OMS mencionada acima pressupõe aproximadamente 1 milhão de novos casos de câncer no Brasil em 2040.

### 3.3 O câncer de próstata

A próstata (figura 1) é uma glândula retroperitoneal presente no sistema genital masculino, pesa aproximadamente 20 gramas, localiza-se entre o colo da bexiga e a uretra. Sua função é produzir o sêmen, líquido espesso em que os espermatozoides estão contidos (KUMAR et al., 2005).

**Figura 1** – Representação em esquema da próstata e de um câncer.



Fonte: <https://www.saudebemestar.pt/pt/clinica/urologia/cancro-da-prostata/>.

<sup>5</sup> <https://gco.iarc.fr/>

O câncer de próstata tem um início assintomático e em muitos casos o curso da doença é indolente. A intervenção médica para esta situação geralmente é pequena e dependendo do cenário, até mesmo descartada. Todavia, a maior parte das complicações, quando ocorrem, são dificuldade ao urinar pelo estreitamento da uretra, o que eleva a frequência da micção decorrente do aumento da próstata. Cerca de 80% dos casos de câncer de próstata são oriundos de adenocarcinomas. Em casos mais avançados, esses sintomas podem ser associados com a retenção urinária, dores na região e metástases ósseas na região pélvica (RAWLA, 2019; WOLF, 2011).

Em 1966, o patologista Donald Gleason, desenvolveu o primeiro sistema de classificação do estadiamento do câncer de próstata baseado na histopatologia. Este sistema foi dividido em 5 graus (1 a 5). O grau 1 representa um tecido sadio, o grau 2 indica aumento no espaço entre as células prostáticas, o grau 3 traduz um infiltrado de células neoplásicas com algum grau de diferenciação. Os dois últimos graus apresentam células pouco diferenciadas, sendo que para o grau 4 observa-se células neoplásicas aglomeradas com poucas células sadias, no último grau (5) encontra-se apenas células neoplásicas aglomeradas, com grande espaço intersticial e necrose (KRYVENKO; EPSTEIN, 2016).

Contudo, em muitos casos, pacientes com classificações com o *score* (grau) 3, não respondiam a terapia de forma esperada. Em 2014, este sistema de classificação foi modificado e passou a incluir não somente o aspecto histopatológico predominante, como um infiltrado celular neoplásico (grau 3), mas também uma característica que sinalize uma progressão da doença como uma região que apresente células sem diferenciação aglomeradas com necrose (grau 5), desta forma este paciente seria reclassificado com Gleason 8 (3+5) e não mais Gleason 3 (EPSTEIN et al., 2015). Esta reclassificação permitiu a melhor compreensão dos casos com pouca resposta a terapia, de forma que pacientes com *score* adicional de 5, isto é (X + 5) apresentam formas mais agressivas da doença com menor sobrevida (SAUTER et al., 2018).

A prevenção da neoplasia prostática se dá pela monitoração dos níveis plasmáticos de PSA. Para adultos jovens, segundo a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), os valores de referência estão entre 2 – 3 ng/mL (SBU, 2012). O exame de toque retal é outra ferramenta utilizada na prevenção e diagnóstico, com

o qual analisa-se a consistência da próstata, semelhante ao nariz. A presença de uma massa pétrea poderia indicar suspeita da doença. Valores de PSA superiores ao preconizado e/ou alteração da consistência prostática pelo toque são indicativos para a realização de biopsia (HUMPHREY, 2017; INCA, 2020). A ultrassonografia foi implementada nos últimos anos como auxiliar no diagnóstico do câncer de próstata com alto grau de identificação de regiões dentro da próstata com morfologia diferente da considerada “próstata normal” ou da hiperplasia prostática benigna, contudo o exame de toque, quando realizado por profissional médico capacitado, resulta em taxas semelhantes de identificação de possíveis suspeitas, com indicação para confirmação com a realização de biopsia (MAFRA et al., 2013).

A etiologia do câncer de próstata é até hoje alvo de estudos que buscam a melhor compreensão do surgimento da doença. Mais de 95% dos casos da neoplasia prostática são adenocarcinomas, os outros menos comuns são sarcomas e tumores neuroendócrinos. Dentre os adenocarcinomas, aproximadamente 90% são de origem acinar e os 10% restantes são oriundos das células do ducto (LAVERY et al., 2016).

O principal fator de risco associado ao surgimento do câncer é a idade, sendo que a partir dos 50 anos há uma maior probabilidade do aparecimento da doença. Contudo, outros fatores de risco estão envolvidos, tais como histórico familiar, fatores genéticos hereditários (como a síndrome de Lynch e mutações nos genes BRCA1 e BRCA2), tabagismo, excesso de gordura corporal, dieta (rica em carne vermelha e pobre em frutas). A origem étnica é outro fator que tem sido estudado, as variações do cromossomo 8q24 é mais frequente em pacientes africanos e afro-americanos (INCA, 2020; RAWLA, 2019).

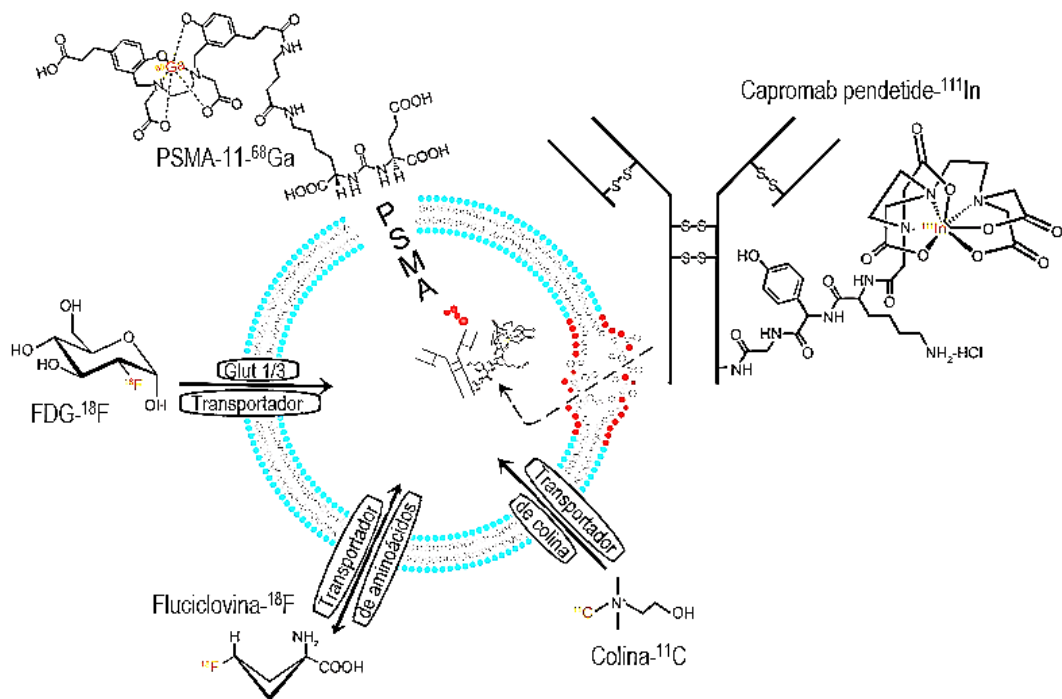
Por outro lado, o câncer de próstata pode assumir uma forma mais agressiva, sendo responsável pela disseminação de metástases ósseas e/ou viscerais. Neste tipo de situação, a sobrevida média em cinco anos é de aproximadamente 31%, contra 98% de sobrevida nos casos em que a doença está contida no órgão (JEMAL et al., 2011). Para o ano de 2020 no Brasil, de acordo com o INCA, são esperadas aproximadamente 15 mil mortes decorrentes do câncer de próstata (INCA, 2020). Em termos mundiais, para 2020 são estimados pouco mais de 378 mil falecimentos de acordo com a OMS (WHO, 2020).



Em 1998, um estudo realizado com 232 pacientes com adenocarcinoma de próstata descobriu que em 100% dos tumores *in situ* e 91% a 98% das metástases linfáticas a expressão de PSMA estava presente (SWEAT et al., 1998; WRIGHT et al., 1995).

Atualmente, existem cinco principais tipos de traçadores para o diagnóstico e/ou tratamento do câncer de próstata, utilizando 4 vias diferentes (figura 2). A partir do PSMA expresso pela célula, foram produzidos marcadores para ligação intracelular (anticorpos) e extracelular (inibidores de PSMA). As outras vias se baseiam nos transportadores de glicose, transportadores de aminoácidos e transportadores de colina (GUSMAN et al., 2019).

**Figura 2** – Ilustração das cinco principais vias utilizadas para o diagnóstico do câncer de próstata por meio do PSMA expresso em membrana, transportadores de glicose, transportadores de aminoácidos, transportadores de colina e ligação a PSMA no interior da célula.



Fonte: adaptado de GUSMAN et al, 2019.

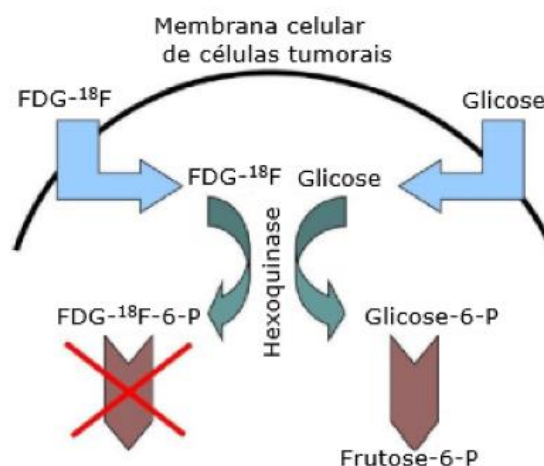
### 3.4 Radiofármacos utilizados no diagnóstico do câncer de próstata anteriores ao surgimento dos inibidores de PSMA

#### 3.4.1 (FDG-<sup>18</sup>F) Fludesoxiglicose (18F)

A glicose é utilizada como fonte de energia pelas células e após adentrar por transporte ativo, sofre um processo de fosforilação, pela enzima hexoquinase, impedindo a sua saída da célula. A segunda reação enzimática, catalisada pela fosfohexose-isomerase converte a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, por meio do rearranjo dos grupos carbonil e hidroxil nos carbonos 1 e 2 da glicose (NELSON; COX, 2017).

O FDG-<sup>18</sup>F é resultado de uma modificação da molécula de glicose, a partir da substituição da hidroxila (OH) na posição 2 por um átomo radioativo de flúor-18. Tal substituição impede o segundo processo enzimático, culminando em acúmulo de FDG-<sup>18</sup>F-6-fosfato no interior das células. Como o metabolismo celular no câncer está mais ativado, há maior absorção e conseqüentemente acúmulo de FDG-<sup>18</sup>F (figura 3) no interior das células, permitindo a aquisição de imagens PET (MILLER, 2013).

**Figura 3** – Fórmula estrutural do FDG-<sup>18</sup>F e da glicose.



Fonte: adaptado de SHARIATI et al., 2013.

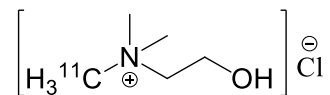
Nos estágios iniciais do câncer de próstata, geralmente existe uma heterogeneidade na captação de glicose pelas células malignas, que poderia

resultar em falsos negativos. Nos estágios mais agressivos da doenca, o FDG-<sup>18</sup>F revela-se uma boa ferramenta para o diagnóstico (JADVAR, 2016). O surgimento da colina radiomarcada com <sup>11</sup>C ou <sup>18</sup>F e inibidores de PSMA se mostraram mais específicos para o diagnóstico do câncer de próstata (RAYN et al., 2018).

### 3.4.2 Colina

A colina (figura 4)  um precursor utilizado pelas células na síntese de fosfatidilcolina, um elemento essencial para a composição de suas membranas. Em tecidos neoplásicos observa-se super expressão de colina quinase, enzima participante do processo de formação da fosfatidilcolina. A utilização da colina como radiotraçador para o câncer de próstata, mostrou-se viável, principalmente quando a velocidade de propagação da doenca era considerada baixa e com pouco consumo da glicose (PANTALEO et al., 2008).

**Figura 4** – Fórmula estrutural da Colina-<sup>11</sup>C.



Fonte: autor da tese.

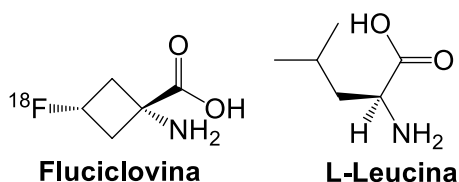
A Colina-<sup>11</sup>C revelou a sua utilidade como traçador de doenca em pacientes com elevados níveis de PSA séricos e alto ndice Gleason antes do tratamento. Em 2012, foi concedido o registro do radiofármaco nos EUA para o estadiamento inicial da doenca antes do tratamento. Contudo, após cirurgia com níveis mais baixos de PSA, a Colina-<sup>11</sup>C não apresentou a mesma eficiência, sendo necessário o desenvolvimento de outros traçadores mais específicos, principalmente para os níveis mais baixos de PSA (CECI et al., 2017).

Após o surgimento do PSMA-11-<sup>68</sup>Ga e a divulgação dos seus resultados iniciais, alguns estudos comparativos entre este novo traçador e a Colina-<sup>11</sup>C, demonstraram a superioridade do PSMA-11 na detecção de lesões metastáticas, principalmente com níveis plasmáticos de PSA inferiores a 2 ng/mL (ALONSO et al., 2018; EVANS, J. D. et al., 2018; SCHWENCK et al., 2017).

### 3.4.3 Fluciclovina

A Fluciclovina (figura 5), também conhecida por FACBC, é um análogo da L-Leucina, aminoácido essencial, cuja absorção se dá por transportadores de aminoácidos e pelo sistema transportador alalina-serina-cisteína. A expressão de transportadores de aminoácidos encontra-se aumentada em sítios cancerígenos, tornando a Fluciclovina, um sinalizador de possíveis processos neoplásicos (GUSMAN et al., 2019).

**Figura 5** – Fórmulas estruturais da Fluciclovina e L-Leucina.



Fonte: autor da tese.

A Fluciclovina-<sup>18</sup>F apresenta algumas vantagens em relação a outros radiofármacos registrados anteriormente pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Em estudo controlado, a Fluciclovina-<sup>18</sup>F demonstrou detectar mais lesões metastáticas do que o ProstaScint<sup>®</sup>, anticorpo monoclonal marcado com índio-111. Também se mostrou superior a colina-<sup>11</sup>C. A Fluciclovina-<sup>18</sup>F obteve melhores resultados que o FDG-<sup>18</sup>F na detecção de lesões metastáticas. Os dados clínicos de estudos controlados garantiram o registro deste radiofármaco em 2016 pelo FDA, sob o nome comercial Axumin<sup>®</sup>. (GUSMAN et al., 2019).

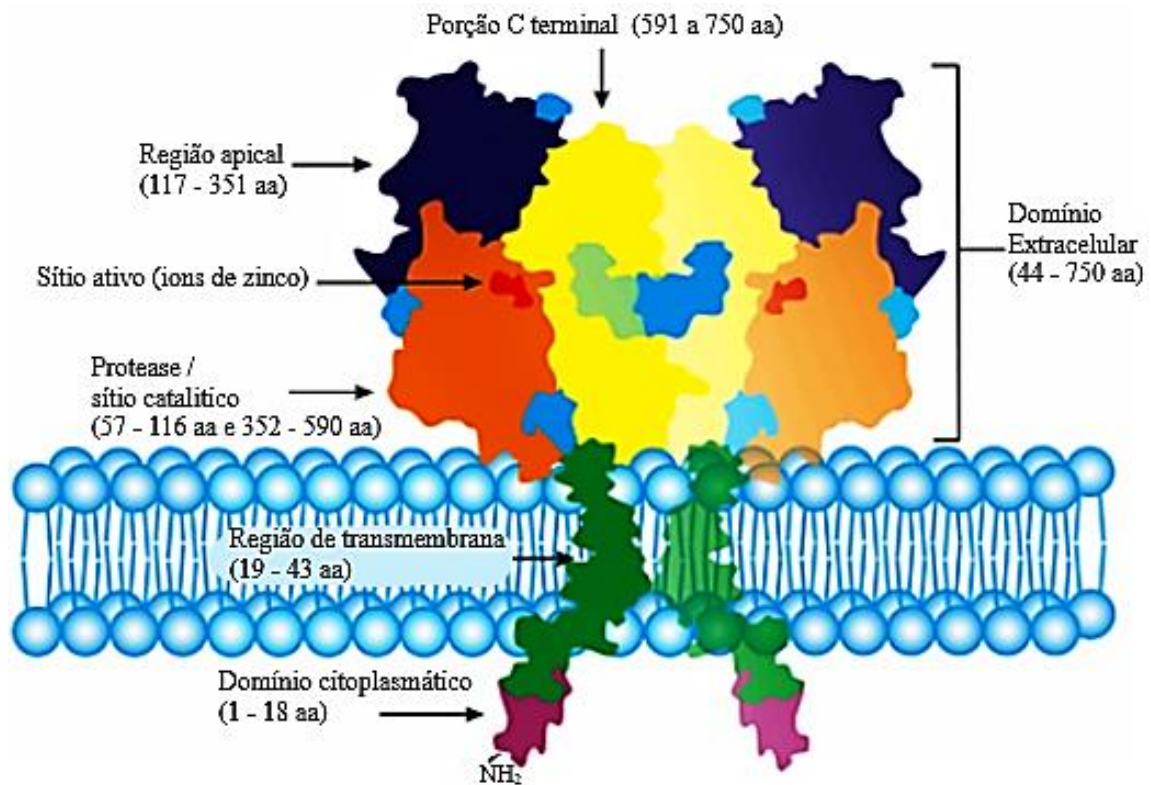
Após o surgimento do PSMA-11-<sup>68</sup>Ga, estudos comparativos conduzidos demonstraram que a capacidade de detecção da Fluciclovina-<sup>18</sup>F era inferior ao PSMA-11-<sup>68</sup>Ga, o qual liga-se especificamente ao PSMA expresso pelas células do câncer de próstata, principalmente em níveis mais baixos de PSA (1 a 2 ng/mL) (CALAIS et al., 2019).

## 3.5 O Antígeno Prostático de Membrana Específico (PSMA)

O PSMA, *Prostate Specific Membrane Antigen* (figura 6), é uma proteína de transmembrana, classificada como glicoproteína do tipo 2, atualmente explorada

como um antígeno de membrana prostática específico (pode ser encontrado na membrana ou no citoplasma da célula). É constituído de 750 aminoácidos (aa), com a maior porção extracelular. O PSMA também é conhecido por folato hidrolase I (FOLH1) ou glutamato carboxipeptidase II (GCP2), sendo expresso normalmente no epitélio prostático humano, mas encontra-se muito expresso em câncer de próstata e em suas metástases. Sabe-se que o PSMA é expresso em aproximadamente 94% dos casos de câncer de próstata, o que denota importância no desenvolvimento de substâncias que se liguem eficientemente a esta estrutura de membrana (ISRAELI et al., 1993; MARESCA et al., 2009).

**Figura 6** – Esquema representativo do PSMA.



Fonte: adaptado de Evans et al, 2016.

A porção intracelular é composta por 19 aa, o domínio de transmembrana possui 21 aa e a porção extracelular é constituída por 707 aa, sendo que o domínio da protease encontra-se entre os aminoácidos 56 – 116 e 352 – 590 (EVANS, J. C. et al., 2016; WOLF, 2011).

Embora a função do PSMA no câncer de próstata ainda seja incerta, acredita-se que seja responsável pela captação de folato, que uma vez no interior

da célula é transformado em poliglutamato e seria utilizado em processos essenciais para a proliferação celular, tais como síntese de poliaminas, reações de metilação e na síntese de nucleotídeos. O glutamato livre liberado nestas reações estimularia as vias de proliferação celular. (O'KEEFE et al., 2018).

O PSMA também possui um papel importante na invasão e neovascularização. Um experimento conduzido em 2016 com animais geneticamente modificados, que impedia a síntese de PSMA, demonstrou que houve uma redução na formação de novos vasos sanguíneos. O experimento demonstrou que a invasão e a neovascularização são dependentes da hidrólise da laminina (família de glicoproteínas de essencial relevância no desenvolvimento embrionário e nos processos de diferenciação, migração e adesão celular) pelo PSMA (CONWAY et al., 2016).

O PSMA também é expresso em outros tecidos, em níveis inferiores ao prostático, tais como rins (túbulos proximais), cérebro, mucosa duodenal, glândulas salivares e lacrimais e pulmões (RUIGROK et al., 2019). O PSMA também pode ser encontrado no câncer de tireoide e renal, contudo a superexpressão é encontrada no câncer de próstata, o que torna este marcador um alvo de extremo interesse para o diagnóstico e a terapia (RISTAU; O'KEEFE; BACICH, 2014). Finalmente, e não menos importante, após o PSMA se ligar a uma molécula projetada para uma interação específica, ocorre a internalização, tornando-o um excelente alvo para a terapia radionuclídica (KRATOCHWIL et al., 2015).

### **3.6 Desenvolvimento de moléculas específicas para o PSMA**

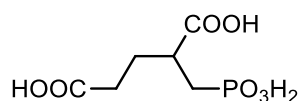
A utilização de técnicas de imagens como a cintilografia óssea, ultrassom, tomografia computadorizada (TC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são utilizadas até hoje para a detecção do câncer de próstata. Todavia, estas técnicas não são as mais adequadas para localizar metástases, pela baixa sensibilidade. Com o surgimento das técnicas de PET e SPECT, utilizando radiofármacos, tornou-se possível a detecção de pequenas lesões e novas metástases, permitindo o reestadiamento de doenças em função da alta sensibilidade dos métodos, assim como o tratamento de lesões metastáticas anteriormente desconhecidas. Naturalmente, o PSMA tornou-se alvo de estudo

para o desenvolvimento de ligantes específicos que poderiam ser utilizados para o diagnóstico mais preciso do câncer de próstata (CIMADAMORE et al., 2018).

Com estes estudos, surgiram diversos inibidores de PSMA, dos quais alguns seguiram para ensaios clínicos controlados, a citar: ProstaScint®, J591, IAB2M, PSMA-11, PSMA-617, PSMA-I&T, PSMA-I&S, MIP-1404/1405/1427, MIP-1095, DCFBC, DCFPyL e PSMA-1007 (VIRGOLINI et al., 2018).

O desenvolvimento de inibidores de PSMA teve um capítulo importante em 1996, quando um grupo de pesquisadores da *Zeneca Pharmaceuticals* sintetizaram o ácido (2-fosfonometil)-pentadióico (2-PMPA) (figura 7) que apresentou um bloqueio eficiente da enzima NAALADase, responsável pela liberação de glutamato do *N*-acetil-L-aspartato-L-glutamato (NAAG). A efetividade estava vinculada ao reconhecimento do grupo carboxílico da cadeia lateral do 2-PMPA e a atividade inibitória enzimática se deu pela presença do grupo fosfonato (JACKSON et al., 1996).

**Figura 7** – 2-PMPA.



Fonte: autor da tese.

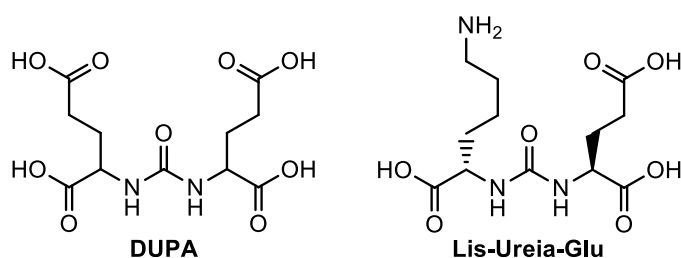
Com a descoberta do 2-PMPA, considerado padrão ouro até hoje na inibição enzimática, novos potenciais inibidores foram desenvolvidos, dos quais destaca-se o ácido (2-[3-(1,3-dicarboxipropil)-ureido]) pentadióico (DUPA), que apresenta alta afinidade pelo mesmo sítio de ligação do 2-PMPA (MACHULKIN et al., 2016).

Sabe-se que a enzima NAALADase presente no cérebro é responsável pela clivagem do NAAG em *N*-acetil-L-aspartato (NAA) e glutamato, para finalizar a atividade deste neurotransmissor. Até os anos 2000, sabia-se que o glutamato agia em outros subtipos de receptor e buscava-se uma molécula capaz de interromper a atividade da NAALADase. Ainda em 2000, foi descoberto que a utilização de uma estrutura semelhante ao NAAG, com a remoção da ligação peptídica entre os resíduos de glutamato e aspartato resultou em um composto com a mesma afinidade pelo sítio de ligação, mas com alta atividade antagonista (NAN

et al., 2000). Esta descoberta, junto com os primeiros experimentos realizados com o 2-PMPA, serviram de base para o desenvolvimento do DUPA e de outros compostos descritos na patente US7408079B2<sup>6</sup> e mais tarde do entendimento do que seria o grupo farmacofórico ideal para ligação na enzima NAALADase presente no PSMA de membrana (POMPER et al., 2008).

O grupamento DUPA apresentou vantagens em relação ao 2-PMPA, tais como a resistência a clivagem enzimática pela presença da ureia (imita uma ligação peptídica), além de produzir o mesmo efeito no sítio de ligação S1' que o grupamento fosfonato do 2-PMPA, adiciona-se a este fato o aumento da lipofilicidade que melhorou a afinidade com o S1'. O grupo farmacofórico Glu-ureia-Lis (glutamato-ureia-lisina) (figura 8) é utilizado na maioria dos inibidores de PSMA.

**Figura 8** – Grupos farmacofóricos DUPA e Glutamato-Ureia-Lisina.



Fonte: autor da tese.

A presença da lisina permite que modificações seletivas ocorram na molécula, sem afetar o glutamato, pela presença de uma amina terminal que permite aumentar a molécula por ligações peptídicas (MACHULKIN et al., 2016).

Em 2009, um grupo de autores explorou o grupo farmacofórico – Glutamato-Ureia-X e concluíram que a presença do aminoácido lisina no grupo farmacofórico era responsável por aumentar a afinidade pelo sítio de ligação. A presença de três grupos ácidos carboxílicos, dois fornecidos pelo glutamato e um pela lisina, também foram essenciais para melhorar a interação da base dos inibidores de PSMA com o sítio ligante S1' (MARESCA et al., 2009).

Outro ponto importante para a interação com o receptor é o grupamento espaçador, que atua como uma “ponte” entre o grupo farmacofórico e o quelante. Na altura do espaçador está o sítio de interação S1, no qual uma interação

<sup>6</sup> <https://patents.google.com/patent/US7408079B2/en>



hidrofóbica, preferencialmente com um anel aromático, aumenta a afinidade com o sítio (MACHULKIN et al., 2016).

O espaçador é necessário para minimizar o impacto do impedimento estérico causado pelo complexo quelante-radiometal. Um espaçador curto resulta em uma menor afinidade pelo PSMA. Em um caso específico, envolvendo um radiofármaco marcado com tecnécio-99m, demonstrou que o espaçador com 6 carbonos apresentou uma menor afinidade pela ligação com PSMA comparado a um espaçador com 11 carbonos (LU et al., 2013). Em 2012, um grupo atestou que o “túnel” localizado entre a bolsa S1’ e o topo do receptor possui um comprimento de aproximadamente 20 Å, e a utilização de um espaçador com este tamanho evitaria qualquer efeito do quelante na interação com o receptor e, conseqüentemente, melhoraria a interação da molécula com o PSMA (CHEN et al., 2012).

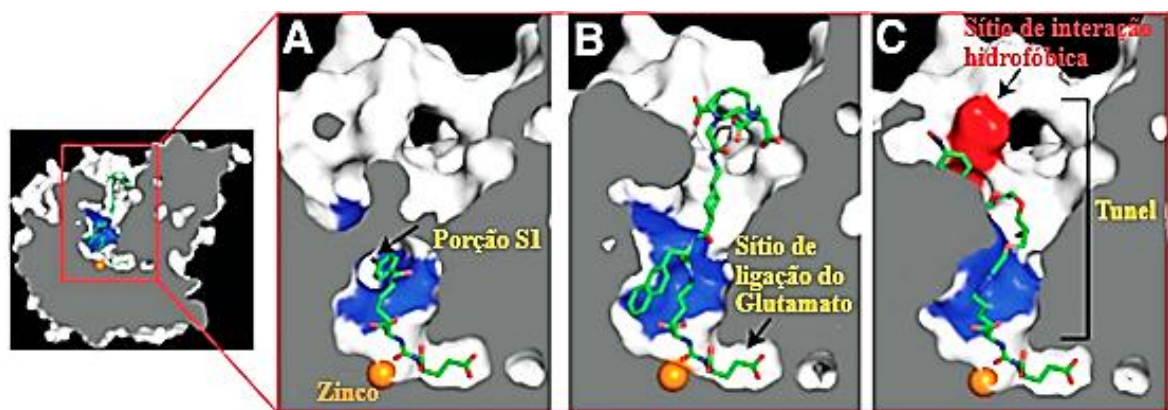
Alterações no espaçador também refletem diretamente na farmacocinética e farmacodinâmica dos inibidores de PSMA. A existência de cargas negativas no espaçador promovem uma redução na retenção do inibidor de PSMA em regiões não alvo (HUANG et al., 2014). Foi evidenciado que a introdução do grupo naftil no espaçador também aumenta a captação do inibidor de PSMA pelo tumor por conferir uma melhor interação hidrofóbica no sítio S1 (BENESOVA et al., 2015a).

Finalmente, os quelantes além de serem responsáveis por carregar o radioisótopo até a célula cancerígena, também possuem papel importante na estrutura da molécula e na forma como o inibidor de PSMA se comportará no organismo. Quelantes polares tendem a aumentar a excreção renal e diminuem a captação hepática (LU et al., 2013).

Apesar de se utilizar o espaçador para minimizar o bloqueio estérico causado por quelantes, em função da sua estrutura, em determinadas situações o quelante pode ter um papel preponderante na ligação do inibidor de PSMA. Por exemplo, um trabalho estudou o efeito da troca do quelante HBED-cc pelo DOTA no PSMA-11 e constatou que a introdução do DOTA na molécula reduziu drasticamente as propriedades de interação com o receptor, de forma que a presença do quelante HBED-cc seria primordial para a manutenção da captação tumoral do PSMA-11 (EDER et al., 2012).

Se faz necessário mencionar que o  $Zn^{2+}$  apresenta papel fundamental na orientação da ligação do glutamato no sítio enzimático, bem como a ativação desta enzima frente ao substrato (figura 9) (KOPKA et al., 2017; WÜSTEMANN et al., 2019).

**Figura 9** – Esquema figurativo do PSMA de membrana. Destaca-se o sítio de ligação para o glutamato conjuntamente com o  $Zn^{2+}$  que possui um papel importante na ativação do sítio de ligação correspondem a porção S1'. Destacado em azul, é visualizado a porção S1, na qual ocorrem interações hidrofóbicas que são melhoradas quando um grupo aromático é adicionado nesta região da molécula (espaçador). Em A está representada a molécula DCIBzL, em B o PSMA-617 e em C a estrutura do ARM-P4.



Fonte: adaptado de KOPKA et al, 2017.

O desenvolvimento de moléculas que se ligam especificamente em um alvo selecionado é complexo e custoso financeiramente. É necessário selecionar um alvo específico e ao mesmo tempo com expressão elevada em células tumorais. A molécula deve ser obtida a partir de uma rota sintética simples e barata, se possível com poucos processos de purificação. Ademais, não deve ser tóxica, apresentando elevada dose letal,  $DL_{50\%}$ , não imunogênica, ser estável *in vivo*, permitindo a sua ligação no sítio alvo. Dentre os diversos tipos de fármacos produzidos, os peptídeos se destacam pela sua facilidade na produção e radiomarcagem em relação aos lipossomas ou anticorpos (DASH et al., 2013).

A exemplo dos inibidores de PSMA, diversos grupos de pesquisas e indústrias farmacêuticas produziram variados anticorpos e peptídeos nos últimos 20 anos. Para ambos os casos, o alvo de ligação era o PSMA expresso pelas células. Inicialmente, foram concebidos anticorpos, com certa limitação, como o Capromab Pendetide (ProstaScint®). Em seguida, com melhor conhecimento da proteína de transmembrana PSMA e seu sítio de ligação extracelular, os mais

variados peptídeos foram produzidos, sendo que entre eles, os melhores resultados foram obtidos com o PSMA-11, PSMA-617, PSMA-1007, DCFPyL, PSMA-I&T, MIP-1095 e MIP-1404/1405. A produção e estudo destes peptídeos foi importante para a melhor compreensão de como estas moléculas se relacionam com o PSMA, de forma que foi possível obter o PSMA-617, considerado o estado da arte na atualidade e alvo de diversos estudos clínicos em todo o mundo (RUIGROK et al., 2019).

Os inibidores de PSMA podem ser classificados quanto ao tipo de molécula (tabela 1), sendo peptídeos ou anticorpos.

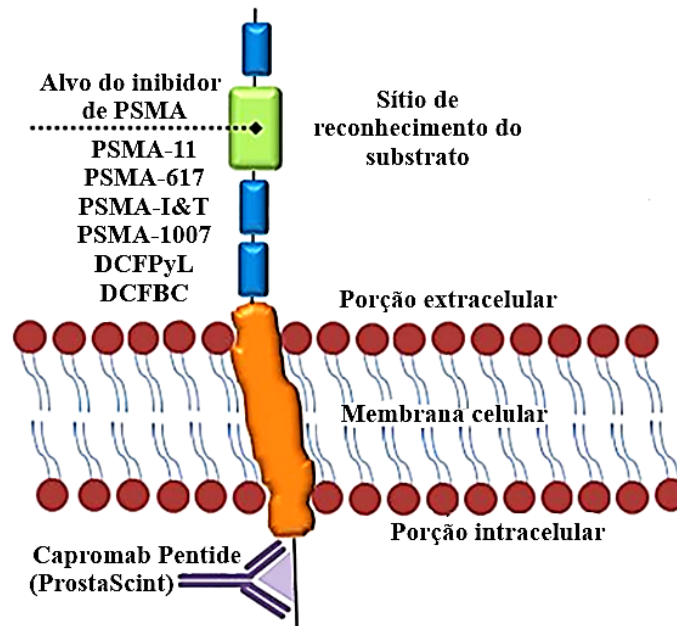
**Tabela 1** – Classificação dos inibidores de PSMA quanto a sua estrutura (anticorpos ou peptídeos).

<b>Anticorpos</b>	<b>Peptídeos</b>
ProstaScint®	PSMA-11
J591	PSMA-617
IAB2M	PSMA-I&T
	PSMA-I&S
	MIP1404/1405/1427
	MIP-1095
	DCFBC
	DCFPyL
	PSMA-1007

Fonte: autor da tese.

Os inibidores de PSMA também podem ser classificados quanto ao local em que se ligam no PSMA de membrana, sendo intracelular ou extracelular (figura 10).

**Figura 10** – Classificação dos inibidores de PSMA quanto ao local de ligação no PSMA de membrana.



Fonte: adaptado de EVANS et al, 2018.

### 3.6.1 Principais inibidores de PSMA

#### 3.6.1.1 Anticorpos

Neste tópico são tratados os principais anticorpos produzidos e utilizados no diagnóstico e/ou terapia do câncer de próstata: ProstaScint<sup>®</sup>, J591 e IAB2M.

##### 3.6.1.1.1 ProstaScint<sup>®</sup> (Capromab Pentetide)

Este anticorpo não humanizado, baseado no anticorpo monoclonal murino 7E11-C5.3, foi bastante utilizado nos Estados Unidos (EUA) para o diagnóstico do câncer de próstata (radiomarcado com índio-111). Desenvolvido nos anos 90, teve o seu registro em 1996 pelo FDA (GOURNI; HENRIKSEN, 2017).

A primeira aquisição de imagens ocorria após 30 minutos da injeção e a segunda seção entre 96 a 120 horas após a administração. O tempo de meia vida era de  $67 \pm 11$  horas (MANYAK, 2008).

Este anticorpo apresentava algumas desvantagens como se ligar na porção interna do PSMA de membrana, o que permitia identificar apenas sítios necróticos e/ou apoptóticos do tumor (GOURNI; HENRIKSEN, 2017). Em situações com pouca massa tumoral, a identificação pelas imagens SPECT ficava prejudicada (MACHULKIN et al., 2016).

O fato deste anticorpo não se ligar à porção extracelular do PSMA, que impedia a possibilidade de uma aplicação teranóstica, além de apresentar uma baixa relação tumor/tecido não alvo, evidenciou a necessidade de desenvolver novos anticorpos que fossem capazes de se ligar à porção externa do PSMA (OH; CHEON, 2018; VIRGOLINI et al., 2018).

#### **3.6.1.1.2 J591**

O J591 (150 kDa) foi o primeiro anticorpo monoclonal humanizado (IgG) desenvolvido para o PSMA e o pioneiro ao se ligar na porção extracelular desta proteína de transmembrana (porção ext1), tendo seus primeiros resultados divulgados em 2003. Diferentemente do ProstaScint®, o J591 apresentou alta efetividade (94%) na identificação de lesões metastáticas, o que levou a um estudo deste anticorpo radiomarcado com lutécio-177 para a terapia do câncer de próstata (BANDER et al., 2003).

O J591 já foi avaliado pré-clinicamente nas modalidades SPECT e PET, assim como para terapia, com os radioisótopos  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{90}\text{Y}$ . Contudo, assim como o ProstaScint®, o clareamento lento foi um obstáculo para aquisição de imagens menos tardias (OKARVI, 2019).

Atualmente, este anticorpo está presente em um estudo clínico, fase 1, nos EUA com o actíneo-225, um alfa emissor, sob o registro NCT03276572<sup>7</sup> (NIH, 2017a).

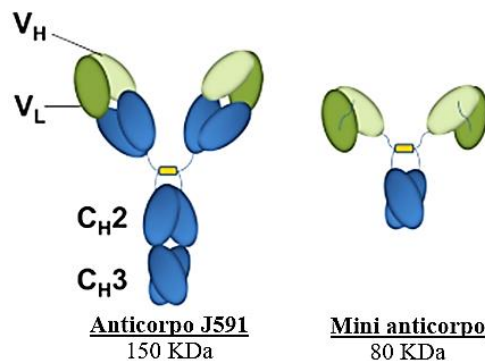
---

<sup>7</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03276572>

### 3.6.1.1.3 IAB2M

O IAB2M (figura 11) foi resultado de uma engenharia genética que reduziu praticamente pela metade (80 KDa) o anticorpo J591, tornando-o um mini anticorpo ou, mais especificamente, um fragmento de anticorpo, com apenas a porção scFv ligada ao segmento CH3. Essa modificação deu ao anticorpo uma farmacocinética mais favorável, com um clareamento sanguíneo em menos de 24 horas (VIRGOLINI et al., 2018). O IAB2M-<sup>89</sup>Zr demonstrou melhores resultados na detecção de lesões metastáticas ósseas do que o J591 (OH; CHEON, 2018).

**Figura 11** – Representação esquemática dos anticorpos J591 e IAB2M.



Fonte: (PANDIT-TASKAR et al., 2016).

Assim como ocorre com o J591, a biodistribuição do IAB2M foi similar em humanos, com acúmulo no fígado, em função da metabolização de anticorpos. Visualiza-se uma captação no córtex renal pela expressão de PSMA nas células do túbulo proximal. Em função do tamanho, os anticorpos não são excretados pela urina, o que se torna uma vantagem na detecção de lesões metastáticas próximas à região pélvica, quando comparado aos peptídeos inibidores de PSMA. Neste sentido, outra vantagem deste anticorpo está na ausência de captação em glândulas salivares e lacrimais (PANDIT-TASKAR et al., 2016).

O estudo clínico mais recente com o IAB2M-<sup>89</sup>Zr é de fase 2, conduzido nos EUA (NCT03675451<sup>8</sup>). Teve seu início em 2017 e fechamento para avaliação dos resultados iniciais no final de 2019, permanecendo sem a divulgação dos resultados (NIH, 2017b).

<sup>8</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03675451?term=iab2m&draw=2&rank=4>

### 3.6.1.2 Peptídeos

As moléculas com baixo peso molecular utilizadas para o diagnóstico e tratamento do câncer de próstata (peptídeos e peptídeos mimetizados) apresentam três principais vantagens com relação aos anticorpos. A sua preparação é mais simples, possuem uma farmacocinética mais favorável e penetram nos tumores sólidos com mais facilidade e, por último, a aquisição de imagens ocorre em até poucas horas após a administração do radiofármaco (OKARVI, 2019).

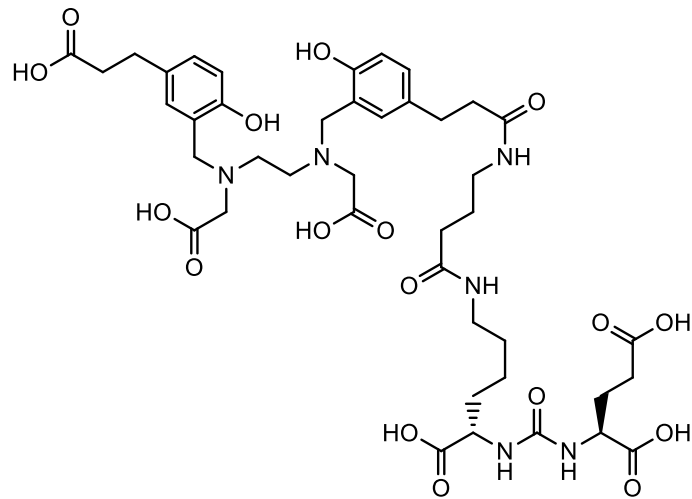
Sob outra ótica de avaliação, o grupamento Glu-Ureia-Lis apresentou resultados bastante promissores, juntamente com o custo mais baixo da síntese destes peptídeos, levando a uma corrida pela obtenção de um inibidor de PSMA que pudesse ser utilizado em humanos (GOURNI; HENRIKSEN, 2017).

Nos próximos tópicos são abordados alguns peptídeos que apresentaram resultados promissores no desenvolvimento de radiofármacos: PSMA-11, PSMA-1007, DCFBC, DCFPyL, MIP-1404/1405/1427, MIP-1095, PSMA-I&S, PSMA-I&T e PSMA-617.

#### 3.6.1.2.1 PSMA-11

Em 2012, um grupo de pesquisadores relatou a eficiência de ligação do PSMA-11 em células LNCaP, por meio de um estudo de competição com o 2-PMPA. Neste mesmo trabalho, foi comprovado *in vivo*, em camundongos com tumor de próstata, uma alta captação do PSMA-11 radiomarcado com galio-68 ( $7,7 \pm 1,45$  % após 1 hora da administração). Destacou-se também uma elevada excreção renal, com aproximadamente 137% da Atividade Injetada por grama (%AI/g) após 1 hora. Este mesmo trabalho demonstrou uma taxa de internalização de aproximadamente 10% em células LNCaP (EDER et al., 2012).

**Figura 12** – Fórmula estrutural do PSMA-11.



Fonte: autor da tese.

Em 2017, um grupo de pesquisadores comparou a eficiência na detecção de lesões metastáticas de câncer de próstata do PSMA-11 (figura 12) marcado com gálio-68 com a Colina-<sup>11</sup>C em 123 pacientes. O PSMA-11-<sup>68</sup>Ga se mostrou superior na detecção de lesões ósseas e metástases linfonodais, assim como apresentou uma taxa de detecção de ao menos uma lesão metastática superior a Colina-<sup>11</sup>C quando o PSA esteve abaixo de 1 ng/mL em pacientes que previamente tiveram a sua próstata removida (SCHWENCK et al., 2017).

Em 2017, um estudo retrospectivo analisou resultados de 1007 pacientes sob terapia de privação androgênica, submetidos a PET com PSMA-11-<sup>68</sup>Ga, entre 2014 e 2017. Este trabalho revelou uma relação positiva entre o aumento sérico do PSA e a detecção de lesões e concluiu que a velocidade de elevação do PSA sérico não teve relação com a escala de Gleason (AFSHAR-OROMIEH; HOLLAND-LETZ; et al., 2017).

Um estudo conduzido no Uruguai em 2018, demonstrou que a relação tumor/background do PSMA-11-<sup>68</sup>Ga ( $110,3 \pm 107,8$ ) foi superior à da Colina-<sup>11</sup>C ( $27,5 \pm 17,1$ ). Este inibidor de PSMA também se mostrou capaz de detectar mais lesões metastáticas (ALONSO et al., 2018).

No mesmo ano, uma outra revisão de literatura compilou os resultados publicados para o PSMA-11-<sup>68</sup>Ga, Colina-<sup>11</sup>C e Fluciclovina-<sup>18</sup>F. O PSMA-11-<sup>68</sup>Ga demonstrou superioridade aos demais entre valores séricos de PSA abaixo de 1 ng/mL, entre 1 – 2 ng/mL e superior a 2 ng/mL. Este trabalho também reportou a



limitação da fludesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ ) (FDG- $^{18}\text{F}$ ) no estadiamento do câncer de próstata, uma vez que a captação pelas células tumorais é variável e imprevisível (EVANS, J. D. et al., 2018).

Em 2012, foi sintetizado um dímero do PSMA-11, nomeado de PSMA-10. Estudo *in vitro* e *in vivo* com camundongos evidenciou que a versão dímera resultou em maior captação tumoral e elevação da relação tumor/background, não havendo registro de estudos clínicos em humanos com esta variante de PSMA (GOURNI; HENRIKSEN, 2017).

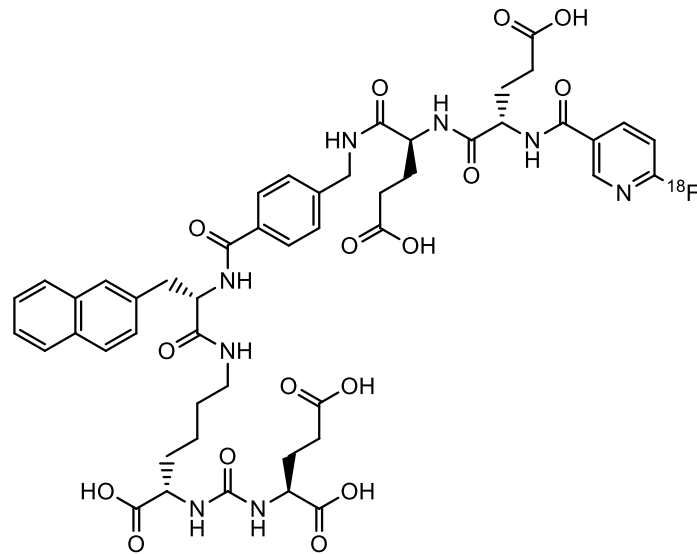
### 3.6.1.2.2 PSMA-1007

O PSMA-1007- $^{18}\text{F}$  é considerado como a segunda geração dos traçadores marcados com flúor-18, após a introdução do DCFPyL e do DCFBC. A motivação pela busca de peptídeos radiomarcados com flúor-18 se dá por dois motivos: os geradores de gálio-68 tem uma disponibilidade limitada, o que restringe a produção de radiofármacos marcados com este radioisótopo e o crescimento dos centros PET (unidades de Medicina Nuclear com um ciclotron dedicado a ela) (CARDINALE et al., 2017).

Os primeiros ensaios com este peptídeo apontaram uma taxa de aproximadamente 67% de internalização, em camundongos *Nude* com câncer de próstata desenvolvido a partir de células LNCaP. O PSMA-1007- $^{18}\text{F}$  demonstrou uma captação persistente no tumor ( $8,04 \pm 2,39\%$ ), após uma hora da administração, mesmo com bloqueio do PSMA ( $4,26 \pm 2,06\%$ ). Este mesmo trabalho demonstrou que existe uma pequena captação do peptídeo em tumor de próstata sem expressão de PSMA (CARDINALE et al., 2017).

Apesar de ocorrer captação renal deste inibidor, a excreção é intestinal e tal fato potencializa a detecção de lesões metastáticas próximas à bexiga, podendo, contudo, omitir lesões próximas a vesícula biliar (GIESEL et al., 2018). Outros aspectos importantes a serem mencionados são a menor hidrofobicidade do composto comparado com outros ( $\text{Log } P = -1,6$ ) e a alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas conferem a este peptídeo uma farmacocinética mais lenta comparado com PSMA-11- $^{68}\text{Ga}$ , sendo recomendada a aquisição de imagens a partir de 2 horas da injeção (RAHBAR, KAMBIZ et al., 2018; ROBU et al., 2018).

**Figura 13** – Fórmula estrutural do PSMA-1007-<sup>18</sup>F.



Fonte: autor da tese.

Em 2019, um grupo de pesquisadores comparou a eficiência na detecção de lesões metastáticas do PSMA-11-<sup>68</sup>Ga e do PSMA-1007-<sup>18</sup>F (figura 13) em 16 pacientes prostatectomizados. Este trabalho demonstrou que não houve superioridade na detecção de lesões de médio e alto risco. Concluiu-se que o PSMA-1007-<sup>18</sup>F foi mais eficiente na detecção de lesões benignas, em função do flúor-18 possuir um pósitron de menor energia do o gálio-68, o que melhora a resolução espacial do radiotraçador (RAUSCHER et al., 2019).

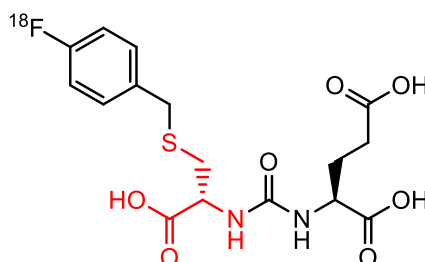
Em março de 2020, foi registrado na agencia alemã de estudos clínicos, um ensaio fase 1 (DRKS00020942<sup>9</sup>) que visa investigar e comparar a viabilidade e a eficiência na detecção de lesões em cirurgias do PSMA100-<sup>18</sup>F e do PSMA-11-<sup>68</sup>Ga (DRKS, 2020).

<sup>9</sup> [https://www.drks.de/drks\\_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL\\_ID=DRKS00020942](https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00020942)

### 3.6.1.2.3 DCFBC

O DCFBC-<sup>18</sup>F (figura 14) foi desenvolvido no final dos anos 2000 e utilizado em ensaios clínicos controlados com humanos entre 2010 e 2014. Houve uma modificação no grupo farmacofórico responsável pela ligação ao sítio de reconhecimento do glutamato (S1').

**Figura 14** – Fórmula estrutural do DCFBC-<sup>18</sup>F.



Fonte: autor da tese.

A substituição da lisina pela cisteína, destacado em vermelho na figura 16, reduziu a capacidade de ligação ao PSMA. A relação tumor/background foi inferior a de outros inibidores por apresentar um clareamento sanguíneo mais tardio em virtude da alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (TURKB EY et al., 2017).

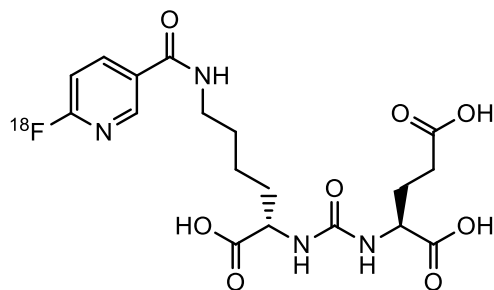
### 3.6.1.2.4 DCFPyL

O DCFPyL-<sup>18</sup>F foi sintetizado com objetivo de melhorar a farmacocinética e interação com o PSMA observadas com o seu antecessor DCFBC. Estas modificações em sua estrutura resultaram em uma maior captação tumoral aliada a uma farmacocinética mais favorável a pequenos peptídeos o que conferiram uma melhor relação tumor/background (CHEN et al., 2011).

Em um estudo comparativo com o PSMA-11-<sup>68</sup>Ga, o DCFPyL-<sup>18</sup>F apresentou uma maior eficácia na detecção de lesões metastáticas em 35 pacientes prostatectomizados, com o PSA sérico entre 0,5 ng/mL e 3,5 ng/mL (66% *versus* 88%, respectivamente). Este trabalho concluiu que dentro de uma mesma escala de Gleason não houve diferença estatística entre os dois inibidores de PSMA (DIETLEIN et al., 2017).

Em 2018, foi publicado um estudo comparativo com 12 pacientes que foram submetidos a exames de imagem com DCFPyL-<sup>18</sup>F e o PSMA-1007-<sup>18</sup>F. Este ensaio determinou que ambos apresentaram a mesma capacidade de detecção de metástases. Contudo, a utilização do DCFPyL-<sup>18</sup>F (figura 15) pode ser preterida em casos de lesões próximas a bexiga, dada à sua excreção renal (GIESEL et al., 2018). Outro estudo contrapondo os dois peptídeos demonstrou que a taxa de internalização foi considerada a mesma (aproximadamente 67%) (ROBU et al., 2018).

**Figura 15** – Fórmula estrutural do DCFPyL.



Fonte: autor da tese.

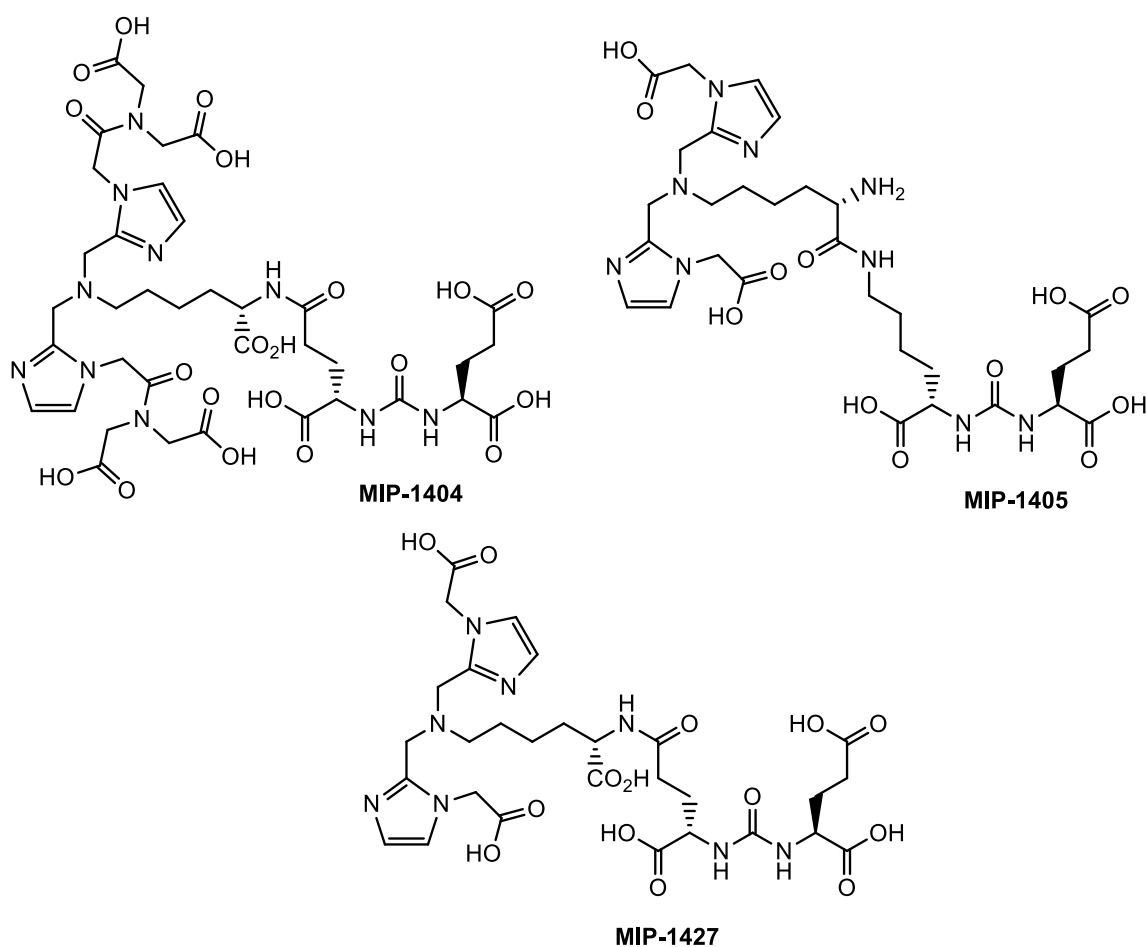
O DCFPyL-<sup>18</sup>F tem se mostrado promissor para a detecção de lesões metastáticas recorrentes com uma eficácia de 85%. Atualmente, este radiofármaco está envolvido em um estudo clínico controlado de fase 3 nos EUA (NCT03739684<sup>10</sup>) (SONG et al., 2020).

<sup>10</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03739684>

### 3.6.1.2.5 MIP-1404/1405/1427

A série dos compostos MIP (1404, 1405 e 1427) (figura 16) foi desenvolvida em 2009 pela *Molecular Insight Pharmaceuticals*, sediada nos EUA, para marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  para o diagnóstico do câncer de próstata (MARESCA et al., 2009).

**Figura 16** – Fórmulas estruturais dos compostos MIP-1404, MIP-1405 e MIP-1427.



Fonte: autor da tese.

Em 2013, foi publicado um estudo que comparou estes compostos *in vivo* com camundongos *Nude* com tumor de próstata, desenvolvido a partir da inoculação de células LNCaP. Com 1 hora após a administração, o MIP-1404- $^{99m}\text{Tc}$  apresentou um maior clareamento sanguíneo, assim como uma melhor relação tumor/background. Após 4 horas da injeção, o MIP-1404- $^{99m}\text{Tc}$  exibiu uma relação

tumor/sangue de 550, cerca de 12 vezes superior os MIP-1405-<sup>99m</sup>Tc e MIP-1427-<sup>99m</sup>Tc (HILLIER et al., 2013).

Em virtude dos resultados obtidos com o MIP-1404-<sup>99m</sup>Tc, foi realizado um ensaio clínico controlado de fase 2 (NCT01667536) com 105 pacientes nos EUA Finalizado em 2015, este estudo concluiu que o radiofármaco apresentou boa acurácia na identificação de linfonodos pélvicos comprometidos (GOFFIN et al., 2017). Tal resultado serviu de base para que no mesmo ano fosse iniciado um estudo clínico de fase 3, já finalizado sem os resultados publicados (NCT02615067<sup>11</sup>) (NIH, 2019b).

Recentemente, em um estudo clínico não controlado com humanos, foi comparada a taxa de detecção de metástases ósseas pelo MDP-<sup>99m</sup>Tc e o MIP-1427-<sup>99m</sup>Tc, o qual demonstrou que o inibidor de PSMA identificou mais sítios metastáticos verdadeiros e reduziu a número de falsos negativos de 16,9% para 10,9% (RATHKE et al., 2018).

Outro inibidor, MIP-1428-<sup>99m</sup>Tc, sintetizado conjuntamente com os mencionados acima, apresentou eliminação mais rápida, que seria favorável para o clareamento sanguíneo, mas a captação tumoral foi inferior aos outros compostos MIP sintetizados para diagnóstico (GOURNI; HENRIKSEN, 2017).

#### **3.6.1.2.6 MIP-1095**

O MIP-1095, também desenvolvido pela *Molecular Insight Pharmaceuticals*, foi envolvido em dois ensaios clínicos. O primeiro em 2008, fase 1, (NCT00712829<sup>12</sup>), marcado com iodo-123 para avaliar farmacocinética, metabolização e segurança (BARRETT et al., 2013). O segundo ensaio clínico, marcado com iodo-131 para terapia (fase 1), foi iniciado em 2017 para avaliar a tolerabilidade e a segurança de acordo com o escalonamento de dose (NCT03030885<sup>13</sup>) (NIH, 2017c).

---

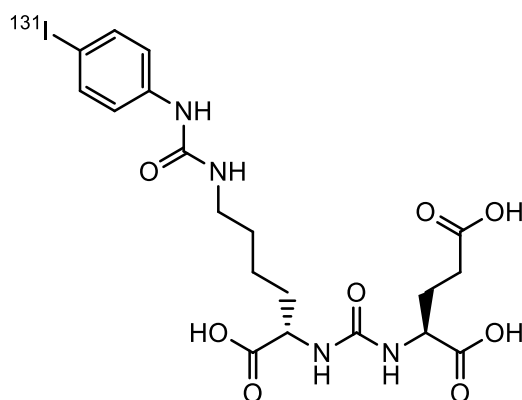
<sup>11</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02615067>

<sup>12</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00712829>

<sup>13</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03030885>

Em 2017, um grupo de pesquisadores publicou o resultado de um estudo clínico com 34 pacientes que receberam o MIP-1095-<sup>131</sup>I (figura 17) para o tratamento de metástases do câncer de próstata. Após a primeira dose, houve uma redução de 50% do PSA sérico em 70% dos pacientes e apenas dois apresentaram progressão do PSA. Após o segundo ciclo, a redução de 50% do PSA ocorreu em 30% dos pacientes e foi reportada uma elevação em 100% do PSA em quatro pacientes. A terceira dose, administrada em três pacientes, não mostrou efeito esperado, com progressão da doença em dois deles (AFSHAR-OROMIEH et al., 2017).

**Figura 17** – Fórmula estrutural do MIP-1095.



Fonte: autor da tese.

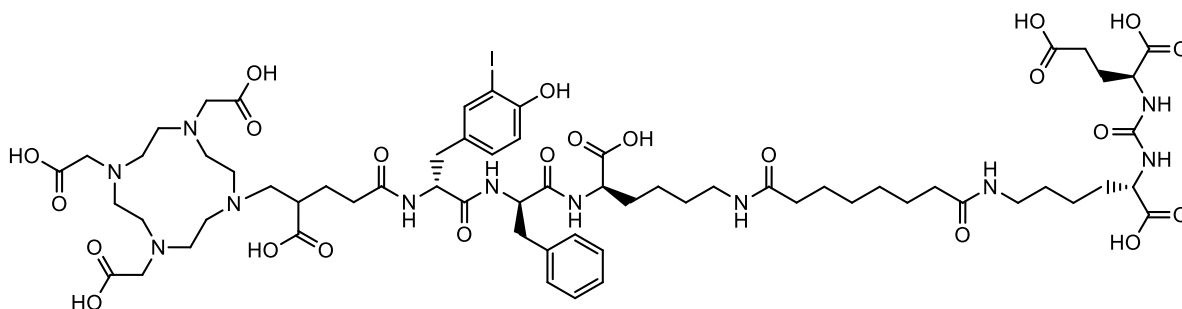
### 3.6.1.2.7 PSMA-I&T

Baseado no alto grau de ligação do PSMA-11 com o PSMA de membrana, um grupo de pesquisadores desenvolveu alguns radiotraçadores com objetivo de obter um inibidor com alta afinidade voltado para terapia, destes compostos sintetizados o melhor resultado foi obtido com o DOTAGA-ffk(SubKuE). Diferentemente do quelante HBED-cc (presente no PSMA-11), o DOTAGA permite a quelação com radiometais voltados para o tratamento, como o lutécio-177. Todavia, este novo inibidor de PSMA não demonstrou a mesma afinidade de ligação observada com o PSMA-11 (WEINEISEN, MARTINA et al., 2014).

Um ano mais tarde (2015) o mesmo grupo de pesquisadores realizou pequenas modificações na molécula, com as quais obteve-se uma melhora na capacidade de ligação ao PSMA, assim como na relação tumor/background e esta

molécula foi batizada de PSMA-I&T [DOTAGA-(I-y)-fk(Sub-KuE)] (figura 18). Este composto foi marcado com o lutécio-177 e administrado (uso compassivo) em dois pacientes. Foi observada uma farmacocinética rápida e sem apresentar problemas nas glândulas salivares ou nos rins (WEINEISEN, M. et al., 2015b).

**Figura 18** – Fórmula estrutural do PSMA-I&T.



Fonte: autor da tese.

Em 2016 foi publicado um trabalho científico que reportou uma alta captação do PSMA-I&T-<sup>111</sup>In em tumores de próstata presentes em camundongos *Nude*. Este trabalho também destacou a elevada captação renal (aproximadamente 200% AI/g) (CHATALIC et al., 2016).

Em 2017, um grupo de pesquisadores publicou um estudo que reportou uma mesma taxa de identificação de lesões metastáticas do câncer de próstata entre o PSMA-11-<sup>68</sup>Ga e o PSMA-I&T-<sup>68</sup>Ga. Contudo, o PSMA-11 apresentou valor de SUV superior (*Standardized Uptake Value*) no tumor e menor em tecidos não alvo do que o PSMA-I&T, sendo considerado mais sensível pelos autores (MCCARTHY et al., 2017).

Em 2017, um outro trabalho referiu que a capacidade de identificação de sítios metastáticos foi baixa em pacientes com escala de Gleason inferior a 7 e PSA sérico inferior a 5 ng/mL, de forma que os pesquisadores apontaram uma limitação no uso deste inibidor (MEYRICK et al., 2017).

Um estudo clínico de uso compassivo do PSMA-I&T-<sup>177</sup>Lu com 100 pacientes reportou que a sobrevida global foi mais elevada nos casos em que não havia metástases viscerais, entretanto, a porcentagem de pacientes vivos após 14 meses de estudo foi a mesma entre os grupos. Este trabalho citou que não houve efeito colateral grave em nenhum paciente e no momento da análise 90% dos



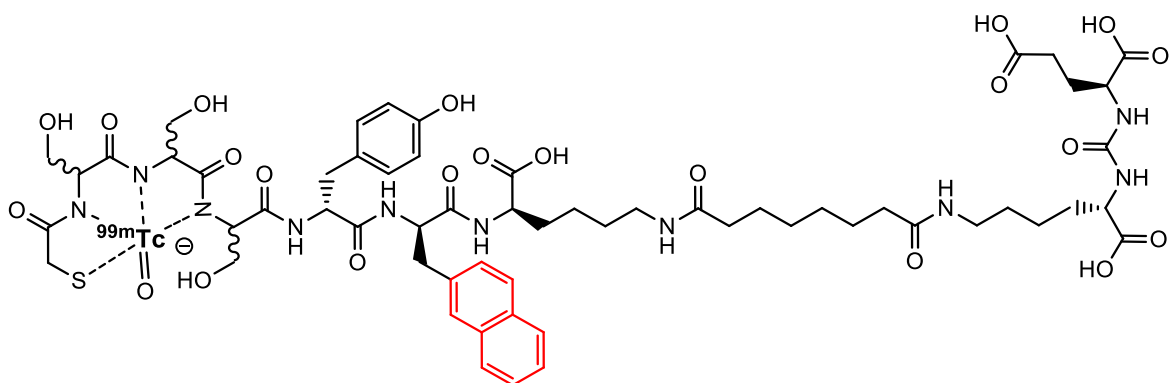
pacientes tinham apresentado evolução da doença e 60% morreram (HECK et al., 2019).

Atualmente, este inibidor de PSMA é alvo de dois estudos clínicos controlados. O primeiro ensaio é de fase 1 e 2 no qual emprega-se o PSMA-I&T-<sup>111</sup>In em cirurgias radioguiadas para remoção de metástases linfonodais na região pélvica (NCT04300673<sup>14</sup>) (NIH, 2020). Enquanto que o outro estudo clínico, de fase 2, com o PSMA-I&T-<sup>177</sup>Lu tem como objetivo avaliar a segurança e eficácia em pacientes de etnia asiática com múltiplas metástases resistentes a castração (NCT04188587<sup>15</sup>) (NIH, 2019a).

### 3.6.1.2.8 PSMA-I&S

Em 2016, um grupo de pesquisadores introduziu o PSMA-I&S, marcado com tecnécio-99 metaestável, para ser utilizado no diagnóstico do câncer de próstata, outro objetivo na síntese deste inibidor seria de disponibilizar um kit para pronta marcação de PSMA com tecnécio-99 metaestável (figura 19) (ROBU et al., 2017).

**Figura 19** – Fórmula estrutural do PSMA-I&S marcado com tecnécio-99 metaestável.



Fonte: autor da tese.

Este inibidor de PSMA apresentou uma farmacocinética mais lenta e uma retenção no interior das células cancerígenas mais prolongada, de forma que após 21 horas da administração foi observada elevada razão tumor/background,

<sup>14</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04300673>

<sup>15</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04188587>

sendo explicada pelo número menor de hidroxilas e pela substituição do grupo  $\beta$ -benzil pelo grupo  $\beta$ -naftil (destacado em vermelho). Tal fato, fez com que o PSMA-I&S se tornasse elegível para utilização em cirurgias radioguiadas (ROBU et al., 2017; WERNER et al., 2020). O grupo  $\beta$ -naftil presente no espaçador também é observado no PSMA-617 (GOURNI; HENRIKSEN, 2017).

Em 2019, estudo clínico com 31 pacientes prostatectomizados concluiu PSMA-I&S- $^{99m}\text{Tc}$  e o PSMA-11- $^{68}\text{Ga}$  foram semelhantes quanto a taxas de detecção de lesões metastáticas em linfonodos pélvicos em cirurgias radioguiadas (80%) (BERLINER et al., 2019).

Em fevereiro de 2019 foi registrado um estudo clínico prospectivo observacional com 20 pacientes (NCT03857113<sup>16</sup>) a serem submetidos a cirurgia radioguiada com o PSMA-I&S- $^{99m}\text{Tc}$ , sendo previsto a conclusão deste trabalho em 2022 (NIH, 2019c).

#### 3.6.1.2.9 PSMA-617

O PSMA-617, assim como outros inibidores de PSMA, possui o grupo Glu-Ureia-Lis, responsável pela ligação no sítio S1 (MARESCA et al., 2009). O grupo  $\beta$ -naftil (identificado em vermelho) que aumenta a interação hidrofóbica neste mesmo sítio, melhorando a interação do espaçador com a estrutura do PSMA de membrana (MACHULKIN et al., 2016).

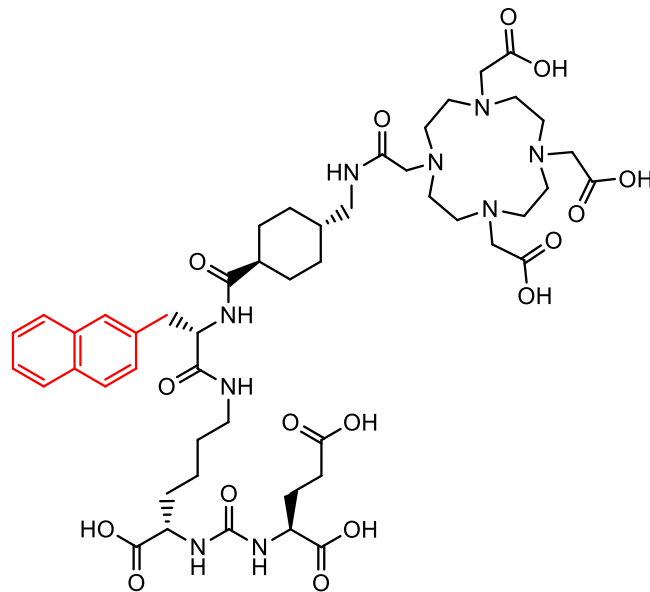
Em 2015, um grupo de pesquisadores realizou ensaio pré-clínico em camundongos com tumor de próstata com o PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$ . Foi observado captação de aproximadamente 10% no tumor, além da elevada captação renal de  $137,2 \pm 77,8\%$  AI/g (BENESOVA et al., 2015b). Neste mesmo ano, foi publicado um *short communication* que apresentou a redução do câncer em um paciente em virtude do tratamento com o PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  (sob uso compassivo), com regressão do PSA de 38,0 ng/mL para 4,6 ng/mL após dois ciclos (KRATOCHWIL et al., 2015).

---

<sup>16</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03857113>

Os primeiros dados de efeitos adversos do PSMA-617 (figura 20) radiomarcado com lutécio-177 foram divulgados em 2015. Um estudo com 10 pacientes apontou poucos efeitos colaterais, com apenas um paciente que relatou sentir os lábios secos, redução do paladar e xerostomia (AHMADZADEHFAR et al., 2015).

**Figura 20** – Fórmula estrutural do PSMA-617.



Fonte: autor da tese.

No ano de 2016, um trabalho de estudo dosimétrico com cinco pacientes reportou que as doses absorvidas em Gray (Gy) pelas glândulas salivares (1,4 Gy/GBq) e rins (0,6 Gy/GBq) foram altas, mas não críticas. O tumor absorveu dose de 13,1 Gy/GBq (DELKER et al., 2016). Outro trabalho correlacionado ao estudo dosimétrico do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu determinou que as glândulas parótidas são responsáveis pela limitação da dose, sendo a dose máxima administrada a um paciente entre 18 – 38 GBq (486 – 1026 mCi) (KABASAKAL et al., 2015)

Um estudo retrospectivo analisou dados de resposta e tolerabilidade de 74 pacientes que receberam uma dose de  $5,9 \pm 0,5$  GBq. Foi observado uma redução de PSA em 64% dos pacientes. Dez pacientes receberam um concentrado de eritrócitos em função de diversas metástases ósseas. Sete pacientes apresentaram xerostomia transiente por duas semanas (RAHBAR, K. et al., 2016).

Outro estudo clínico com sete pacientes indianos demonstrou que o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu pode ser utilizado como um agente teranóstico, uma vez que os

sítios metastáticos observados com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foram os mesmos identificados na imagem PET com o PSMA-617-<sup>68</sup>Ga (DAS et al., 2016).

No início de 2017, iniciou-se estudo de fase I com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, ainda em andamento, com escalonamento de dose deste radiofármaco em pacientes com câncer de próstata multimetastático resistente a castração<sup>17</sup>.

Em 2017, novos trabalhos clínicos publicados demonstraram a eficácia do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em pacientes com câncer de próstata multimetastático resistentes a privação androgênica. Na Alemanha, 52 pacientes, prostatectomizados foram tratados (uso compassivo) com este radiofármaco (3 a 6 ciclos), deste grupo 71% dos pacientes apresentaram redução de PSA sérico com prolongamento da sobrevida em até 60 semanas (AHMADZADEHFAR et al., 2017). Em outro estudo multicêntrico alemão, foi demonstrado que a terapia com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu teria uma performance superior à terceira linha de tratamento utilizada para o câncer de próstata (abiraterona), sendo o docetaxel e cabazitaxel utilizados como primeira e segunda linha de tratamento, respectivamente (RAHBAR et al., 2017).

Em 2017, um estudo inédito com PSMA-617 radiomarcado com escândio-44, emissor pósitron com meia-vida de 4 horas, revelou identificar as mesmas lesões encontradas com o PSMA-11-<sup>68</sup>Ga. Segundo os autores, pelo fato do escândio-44 possuir uma emissão de 632 keV, inferior aos 830 keV do gálio-68 possibilitaria obtenção de imagens PET com melhor resolução espacial. Como o escândio-44 possui meia vida de 4 horas, superior a do gálio-68 (68 minutos), permitiria aquisição de imagens mais tardias, além de possibilitar o envio do radiofármaco para centros mais distantes do local de produção (UMBRICHT et al., 2017).

O ano de 2017 também foi marcado pela aquisição dos direitos comerciais do PSMA-617, até então comercializado pela ABX, pela empresa americana *Endocyte*, no valor de 160 milhões de dólares, e o anúncio do início de um estudo clínico mundial de fase III com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu<sup>18</sup>. Um ano mais tarde, (outubro de 2018) a companhia farmacêutica *Novartis* anunciou a aquisição da

---

<sup>17</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03042468>

<sup>18</sup> <https://www.globenewswire.com/news-release/2017/10/02/1138658/0/en/Endocyte-Announces-Exclusive-Worldwide-License-of-Phase-3-Ready-PSMA-Targeted-Radioligand-Therapy-for-Development-in-Prostate-Cancer.html>

*Endocyte* pelo valor de 2,1 bilhões de dólares e tornou-se detentora dos direitos comerciais do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, bem como pela condução do ensaio clínico controlado<sup>19</sup>.

Em 2018, um grupo de pesquisadores avaliou a dose absorvida do PSMA-617-<sup>44</sup>Sc em cada órgão, de 5 pacientes com câncer de próstata metastático, como forma de prever a dosimetria destes órgãos e tecidos com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. Para um ciclo de 6 GBq, a dose prevista para os rins, glândulas salivares e fígado foram de 2,65 Gray (Gy), 1,38 Gy e 1,31 Gy, respectivamente. Este mesmo trabalho indicou que os rins suportariam um máximo de 8,68 ciclos de 6 GBq de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (KHAWAR et al., 2018).

Com o avanço das publicações clínicas relacionadas ao PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, um grupo de pesquisadores descobriu que o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi capaz de se ligar ao PSMA expresso em células de adenocarcinoma mamário (ensaio pré-clínico), em até 2% AI/g após 24 horas da injeção. As propriedades demonstradas pelo radiofármaco no ensaio foram consideradas interessantes em uma futura abordagem como potencial agente terapêutico para este câncer (SHARIFI et al., 2018).

Novos trabalhos publicados introduziram modificações no PSMA-617. O HTK01169-<sup>177</sup>Lu, ligado à de albumina, potencializou a ligação do radiofármaco nas células cancerígenas. O ensaio pré-clínico demonstrou que a ligação de 55,9% ± 12,5% AI/g em 24 horas manteve-se estável até 120 horas, o que aumentou em 5 vezes a dose absorvida no tumor (KUO et al., 2018). O PSMA-ALB-89, outra variante de PSMA-617, também ligado a albumina, demonstrou alta captação tumoral em 24 horas. A relação tumor/sangue foi de 31,3 ± 3,82 e tumor/músculo de 200 ± 38,2 (UMBRICHT et al., 2018).

Outro derivado, EB-PSMA-617, apresentou alta captação tumoral após 24 horas, cerca de 4 vezes superior ao PSMA-617, mantendo-se estável por até 50 horas. Os autores deste trabalho acreditam que o emprego de moléculas modificadas, tais como o EB-PSMA-617 reduziriam o número de ciclos necessários para o tratamento, o que poderia minimizar a dosimetria dos rins e medula óssea (WANG et al., 2018). Este radiofármaco foi utilizado em ensaio clínico

---

<sup>19</sup> <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-announces-planned-acquisition-endocyte-expand-expertise-radiopharmaceuticals-and-build-commitment-transformational-therapeutic-platforms>

(NCT03403595), em que quatro pacientes receberam uma dose de  $0,95 \pm 0,17$  GBq de EB-PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e cinco pacientes receberam uma dose de  $1,33 \pm 0,06$  GBq de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. O EB-PSMA-617 acumulou-se mais em lesões metastáticas não ósseas e ósseas, cerca de 2,15 e 5,68 vezes mais, respectivamente. Contudo, está variante de PSMA-617 modificada acumulou-se mais no estômago, fígado, baço, pulmões, medula óssea, rins e glândulas salivares, embora não tenham sido reportados efeitos adversos (ZANG et al., 2019)<sup>20</sup>.

Em 2018, o grupo Endocyte/Novartis anunciou o registro do estudo clínico fase III do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu intitulado “VISION” (EUCTR 2018-000459-41). Neste estudo, os pacientes foram divididos em dois braços. No primeiro braço, os pacientes receberam a terapia com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em conjunto com a quimioterapia considerada como padrão ouro, enquanto o segundo braço do estudo recebeu apenas a quimioterapia padrão ouro. Quando este estudo for concluído, se o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu se demonstrar efetivo, estabelecerá o uso da terapia teranóstica para o tratamento do câncer de próstata (RAHBAR, KAMBIZ; MORRIS, 2019)<sup>21</sup>.

Em 2018, a agência reguladora australiana autorizou a condução de estudo clínico controlado fase II (NCT03392428) que consiste em comparar a terapia PSMA-617-<sup>177</sup>Lu *versus* o medicamento, já comercializado, Cabazitaxel (HOFMAN et al., 2018)<sup>22</sup>.

Em 2019, um grupo de pesquisadores demonstrou que 16 pacientes, com apenas um rim funcional, se beneficiaram do tratamento com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. Com as medidas de proteção renal, por meio da administração de bolsa de aminoácidos carregados positivamente (lisina e arginina) não foram reportados danos renais. Contudo, 37% dos pacientes reportaram xerostomia (mesmo com o resfriamento da região das glândulas salivares com bolsas gelo) (ZHANG et al., 2019).

Recentemente, um grupo de pesquisadores reportou que o JHU-2545, um derivado do 2-PMPA que se liga preferencialmente em PSMA expresso em tecidos não malignos, foi capaz de reduzir a dose absorvida nas glândulas salivares e rins em 72% e 45%, respectivamente, sem afetar a captação tumoral do PSMA-

---

<sup>20</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03403595>

<sup>21</sup> <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2018-000459-41/GB>

<sup>22</sup> <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03392428>

617-<sup>177</sup>Lu (NEDELCOVYCH et al., 2019). Este composto demonstrou relevância para ser avaliado em ensaios controlados, uma vez que a xerostomia foi o principal efeito adverso relatado em um estudo clínico fase II (HOFMAN et al., 2018). Um estudo *in vitro* com glândulas salivares de porco, revelou que a captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu ocorre por via específica (PSMA de membrana) e não específica (principal), sendo este mecanismo ainda desconhecido (TÖNNESMANN et al., 2019).

Uma análise retrospectiva de 90 pacientes tratados com PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em dois centros de pesquisas alemães reportou que 53% dos pacientes foram considerados PET-negativos (sem doença aparente). Os pesquisadores relataram que os valores de PSA séricos estavam abaixo de 0,2 ng/mL em 78% dos pacientes tratados com o radiofármaco (SCHMIDT-HEGEMANN et al., 2019).

Em 2019, um grupo de pesquisadores da Austrália divulgou os resultados de estudo fase II com 14 pacientes. Foi reportada qualquer redução de PSA em 71% dos pacientes. Diminuição para valores inferiores a 50% de PSA observados antes do tratamento, foi visualizada em 5 pacientes (36% do total) (EMMETT et al., 2019). Em outro trabalho australiano publicado, concluiu-se que após 18 meses de experiência em terapias com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em um centro clínico, com 50 pacientes sob uso compassivo, a redução em ao menos 50% dos valores de PSA iniciais foi visualizada em 44% dos pacientes participantes do estudo (MCBEAN et al., 2019).

Recentemente, foi publicado um trabalho que correlacionou a expressão de PSMA com a sobrevida dos pacientes, embora ainda seja inexistente o consenso de qual concentração de PSMA expresso seria considerado como nível baixo ou alto. Este trabalho revelou que pacientes com maior expressão de PSMA tiveram uma sobrevida maior com relação aos que tinham as menores expressões. Contudo, ainda é incerto concluir se pacientes com baixa expressão de PSMA se beneficiam ou se são prejudicados com o uso de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (SEIFERT et al., 2020).

Outro trabalho publicado no ano de 2020 reportou que a administração de 3 ciclos de 7,4 GBq de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu a cada 4 semanas reduziu o PSA em 79% dos pacientes, deste grupo 35% apresentaram redução superior a 80%. Após o terceiro ciclo, os principais efeitos adversos foram plaquetopenia e leucopenia.

Os autores afirmaram que o aumento de sobrevida global de 119 semanas foi expressivo quando comparado com sobrevida média de 56 semanas nos estudos conduzidos com ciclos administrados a cada 8 semanas (RASUL et al., 2020).

O PSMA-617 não tem sido apenas radiomarcado com lutécio-177 ou gálio-68, escândio-44 ou cobre-64 para avaliação *in vitro* e/ou *in vivo*. Em 2016, foi publicado o primeiro estudo deste inibidor radiomarcado com actíneo-225, alfa emissor (KRATOCHWIL et al., 2016). Este trabalho ficou marcado pela excelente resposta a terapia.

Os radioisótopos  $\alpha$ -emissores, pela característica da partícula emitida (2 prótons e 2 nêutrons) tem alcance reduzido dentro do tecido, por exemplo, a partícula emitida pelo actíneo-225 tem um alcance médio de 70  $\mu\text{m}$ . Comparado com os radioisótopos beta emissores, a transferência de energia linear das partículas alfa são de 100 a 1000 vezes superiores, causando mais danos a organelas e DNA celular, o que resulta em morte celular. Dada esta característica, a dose absorvida por tecidos adjacentes ao tumor tende a ser inferior (HUCLIER-MARKAI et al., 2013).

Trabalho científico recentemente publicado com o PSMA-617-<sup>225</sup>Ac reportou redução de 50% do valor de PSA sérico em 70% dos pacientes após o primeiro ciclo de tratamento (7,4  $\pm$  1,5 MBq). Após 3 ciclos, apenas um paciente evoluiu com piora da doença e 88% dos pacientes apresentaram redução superior a 50% dos valores originais de PSA (SATHEKGE et al., 2019).

Atualmente, existe registro de estudo fase II/III registrado na Índia que objetiva comparar o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e PSMA-617-<sup>225</sup>Ac<sup>23</sup>.

---

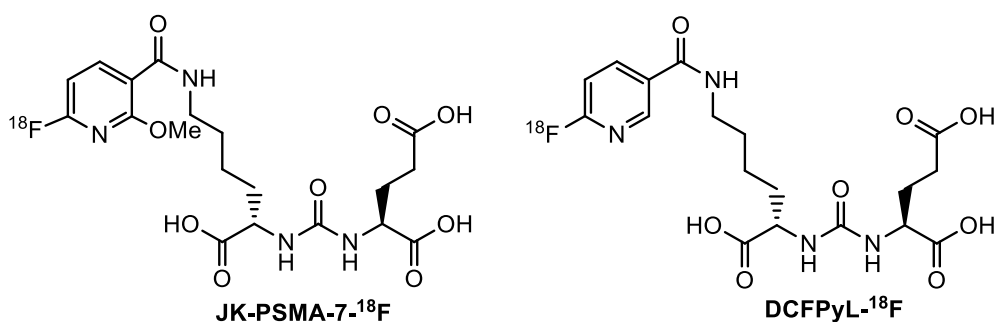
<sup>23</sup> <http://www.ctri.nic.in/Clinicaltrials/pmaindet2.php?trialid=34231>



### 3.6.1.2.10 Outros inibidores de PSMA

Mais recentemente, novos inibidores de PSMA foram sintetizados, dentre os quais citam-se o JK-PSMA-7 ou PSMA-7 e o PSMA-I&F. O PSMA-7 (figura 21) é resultado da introdução do grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>) em posição orto no anel aromático do composto DCFPyL. Esta modificação resultou em maior captação tumoral, superior no tempo de 2 horas (cerca de 1,5 vezes). Ensaio *in vivo* em ratos demonstrou que a relação tumor/background do PSMA-7 ( $8,15 \pm 1,71$ ) foi superior ao DCFPyL ( $6,38 \pm 1,87$ ), PSMA-11 ( $4,46 \pm 0,08$ ) e PSMA-1007 ( $6,23 \pm 1,88$ ) (ZLATOPOLSKIY et al., 2019).

**Figura 21** – Comparação das fórmulas estruturais do PSMA-7 e do DCFPyL.

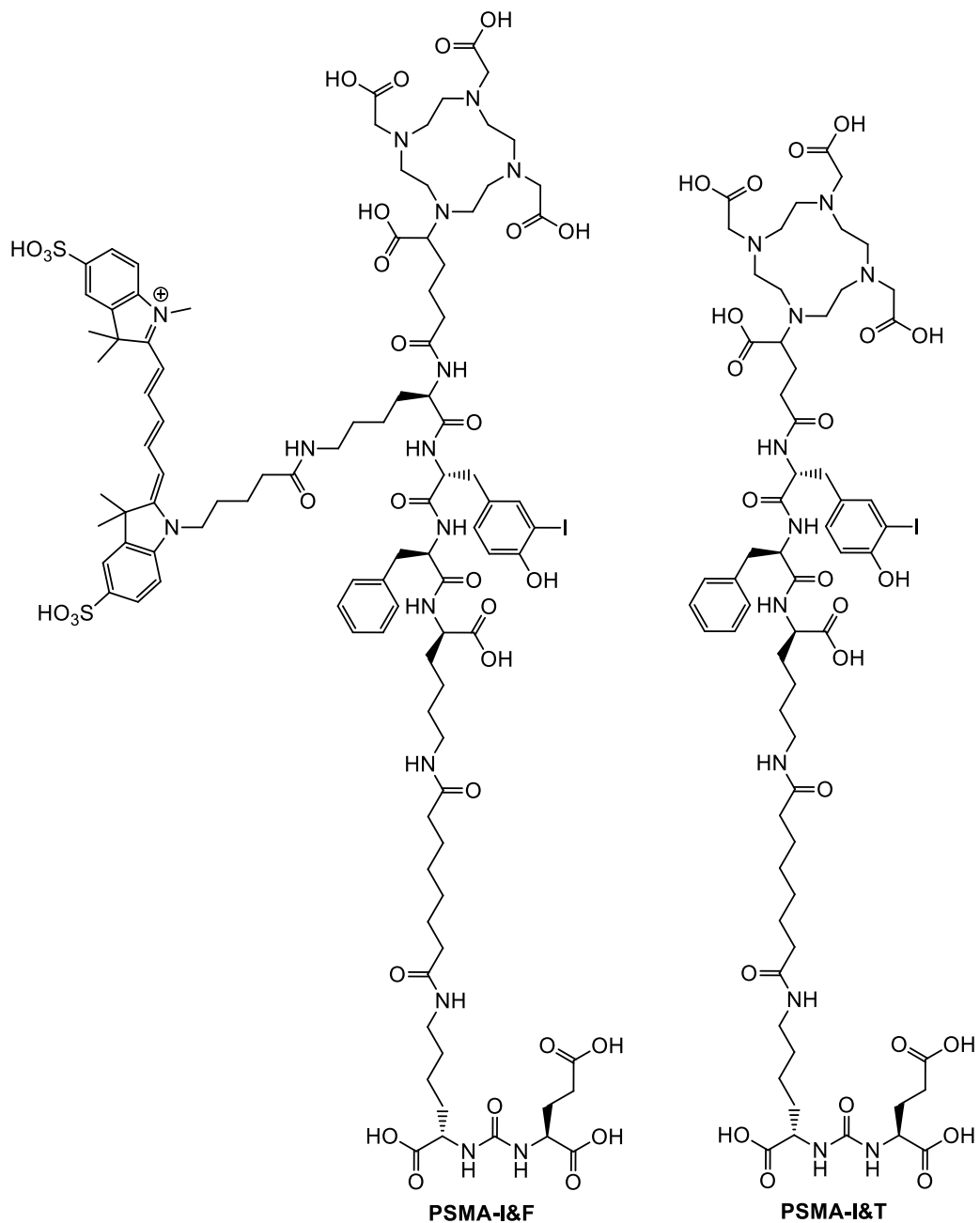


Fonte: autor da tese.

O PSMA-I&F representa uma nova categoria de inibidores de PSMA (radiohíbridos), com a introdução de dois sítios independentes para ligação com radionuclídeos na estrutura do PSMA-I&T, o que tornaria a molécula dedicada a aquisição de imagens ou com funcionalidade teranóstica (neste caso com a farmacocinética idêntica, independentemente do objetivo, isto é, imagem ou tratamento).

O PSMA-I&F (figura 22) é resultante da introdução do grupo Sulfo-Cy5, no PSMA-I&T para quelação com tecnécio-99 metaestável. Esta modificação, embora não tenha alteração na captação tumoral, culminou em maior porcentagem da atividade injetada no sangue (% AI/mL). Os autores do trabalho salientaram a versatilidade do PSMA-I&F, uma vez que poderia ser utilizado na detecção de lesões e posteriormente na condução de cirurgias radioguiadas.

**Figura 22** – Fórmula estrutural do PSMA-I&F e PSMA-I&T.



Fonte: autor da tese.

### 3.7 Uso de quelantes

A estabilidade do complexo radiometal-quelante é determinada pelas propriedades do metal e do agente quelante. Desta forma, ambas devem ser levadas em consideração quando se estuda a formação de um complexo. Os principais radiometais utilizados na medicina,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  e  $\text{Lu}^{3+}$ , são ácidos fortes e necessitam de doadores fortes, como os átomos de oxigênio ou nitrogênio para se estabilizarem (WÄNGLER et al., 2011).

Para promover a ligação do radioisótopo no fármaco/peptídeo/anticorpo, na grande maioria das vezes é necessário utilizar um agente quelante. No geral, os quelantes empregados são bifuncionais, isto é, possuem um sítio propriamente dito quelante e uma porção reativa que pode ser ligada covalentemente (conjugada) a peptídeos, nucleotídeos, anticorpos ou nanopartículas (LIU, S.; EDWARDS, 2001; PRICE; ORVIG, 2014).

A estrutura e as propriedades físicas do complexo radiometal-quelante causam impacto na farmacocinética de radiofármacos. Os complexos que apresentam alta hidrofiliabilidade aumentam a velocidade de excreção renal quando ligados a peptídeos e nucleotídeos. A mudança do quelante pode afetar profundamente a biodistribuição de um radiofármaco. Cada íon radiometálico tem uma demanda química diferente, incluindo número de coordenação, a geometria de coordenação e as preferências do tipo de átomo doador/ligação (N, O, S; dura/suave) (PRICE, E.W.; ORVIG, C., 2014).

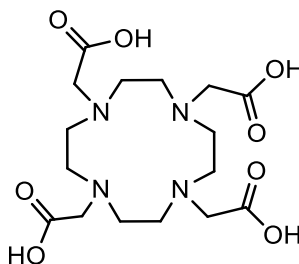
#### 3.7.1 Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA)

O DOTA é um quelante macrocíclico que consiste em um anel de 12 membros com quatro nitrogênios. É usado como um agente de complexação, em especial, para os íons lantanídeos, como o lutécio-177 (PILLAI, 2010).

O DOTA tem sido amplamente empregado como quelante para o lutécio-177 em função de apresentar boa estabilidade no complexo formado (WÄNGLER et al., 2011). A marcação de DOTA com  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$  e  $^{225}\text{Ac}$  exige aquecimento, inviabilizando tal quelante para preparações que envolvam anticorpos. Contudo, tem sido amplamente empregado durante décadas, sendo o

mais utilizado atualmente. Apresenta diversos derivados comerciais e excepcional estabilidade *in vivo*. É considerado como padrão ouro para marcações com índio-111, lutécio-177, ítrio-86 e ítrio-90 (PRICE; ORVIG, 2014).

**Figura 23** – Estrutura do DOTA.



Fonte: autor da tese.

Um dos motivos do uso do DOTA (figura 23) na radiofarmácia é a alta estabilidade termodinâmica, oriunda das quatro hidroxilas dos ácidos acéticos que formam grupos de coordenação, mantendo o metal estabilizado no centro do quelante. Estes ácidos carboxílicos com pKa entre 2 e 5 dão alta estabilidade ao complexo formado e minimizam a demetalização ocasionada por ácidos mais fortes, mesmo em pH inferior 2,0 (LIU, S.; EDWARDS, 2001).

### 3.8 A seleção do radioisótopo

Diversos radiometais podem ser empregados na medicina nuclear e a escolha destes baseia-se em função da aplicação e da necessidade. Usualmente, os principais radionuclídeos utilizados para diagnóstico são os pósitrons ( $\beta^+$ ) emissores para aplicação em PET (*Positron Emission Tomography*), tais como  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109$  min) e  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 68$  min) ou o gama ( $\gamma$ ) emissores para aplicação em SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) como  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6,02$  h) e  $^{111}\text{In}$  ( $t_{1/2} = 2,83$  d). Para terapia são empregados  $\beta^-$  emissores como  $^{90}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 2,66$  d) e  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2} = 6,7$  d) ou  $\alpha$  emissores, como o  $^{225}\text{Ac}$  ( $t_{1/2} = 10$  d) (WÄNGLER et al., 2011).

Existem vários fatores que influenciam na escolha adequada do radioisótopo para terapia neoplásica. Deve-se considerar se a forma de decaimento e a energia da partícula emitida condizem com as dimensões e a geometria do

tumor. Um radioisótopo ideal para tratar tumores sólidos de grandes dimensões será diferente daquele aplicado para eliminar pequenos sítios metastáticos, compostos apenas de algumas centenas de células. Além desses fatores, a meia vida, o método de produção, a química, as características físicas (tabela 2) e o comportamento biológico do radioisótopo também devem ser considerados (ZALUSTKY, 2011).

**Tabela 2** – Características físicas dos radioisótopos aplicados em terapia.

<b>Modo de decaimento</b>	<b>Partículas emitidas</b>	<b>Energia</b>	<b>Alcance</b>
$\beta^-$	Elétrons	Média a alta (0,5 a 2,3 MeV)	1 a 12 mm
$\alpha$	Núcleos de hélio	Alta (4 a 10 MeV)	50 a 100 $\mu\text{m}$
CE/CI	Elétrons Auger / Elétrons de conversão	Baixa (eV a keV)	Alguns nm

Fonte: adaptado de ZALUSTKY, 2011.

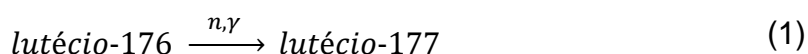
eV = elétron Volt; keV = quilo elétron Volt; MeV = mega elétron Volt; CE = captura eletrônica; CI = conversão interna.

Atualmente, os radioisótopos utilizados na clínica para terapia são principalmente emissores de partículas  $\beta^-$ , embora emissores de partícula  $\alpha$  também possam ser utilizados. Os elétrons emitidos de um núcleo em decaimento  $\beta^-$  apresentam espectro de energia e alcance variados (DASH et al., 2013).

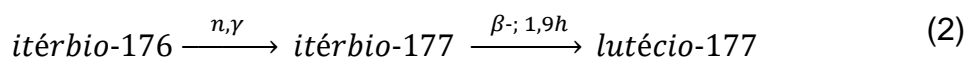
Ao interagir a matéria, as partículas  $\beta^-$  podem sofrer alteração de sua rota, e conseqüente redução da energia cinética, a qual pode chegar a zero. Uma vez que a transferência linear de energia (LET) nessa interação é relativamente baixa (0,2 keV/ $\mu\text{m}$ ), as partículas são pouco eficientes em lesar o DNA das células-alvo. Desta forma, para serem empregados como agentes terapêuticos, os emissores  $\beta^-$  devem estar presentes em altas concentrações no tecido tumoral, garantindo a transferência de milhares de elétrons a cada célula neoplásica (KASSIS; ADELSTIEN, 2002). Contudo, o radioisótopo em si, na grande maioria das vezes, não atinge o tecido alvo sem a utilização de uma molécula carregadora com alta afinidade pelo sítio de ligação (STERZING et al., 2016).

### 3.8.1 O lutécio-177

O lutécio é encontrado na natureza como óxido de lutécio-175. A sua transformação em lutécio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), isótopo radioativo, se dá em reatores de alto fluxo através do bombardeamento de um alvo enriquecido em óxido de lutécio-176 (71%) disponível comercialmente, entretanto esta rota de produção não resulta em 100% de lutécio-177 (1) (ZALUSTKY, 2011).



Este radioisótopo também pode ser obtido indiretamente, irradiando óxido de itérbio-176 ( $\text{Yb}_2\text{O}_3$ ) obtendo  $^{177}\text{Yb}$  que por decaimento  $\beta^-$  produz  $^{177}\text{Lu}$  livre de carregador, nesta rota 100% do radioisótopo final recolhido é lutécio-177 (DASH et al., 2015).



A principal característica entre as duas rotas é a presença de carregador (lutécio-176) no produto final, sendo necessário, em alguns casos, levar em consideração a molaridade da radiomarcagem. Outra diferença que destaca-se entre as duas rotas é que a produção pela via indireta geralmente resulta em um lutécio-177 com atividade específica 30% superior (BANERJEE et al., 2015) (2).

O lutécio, assim como o ítrio possui a sua camada  $4f$  interiorizada e “protegida” pelas camadas  $5s^2$ ,  $5p^6$  e  $6s^2$  e não está envolvida em ligações, a interação entre o átomo doador de elétrons e o metal é predominantemente iônica (LIU, S.; EDWARDS, 2001).

O lutécio-177 apresenta características químicas similares a de outros lantanídeos. Os quelantes multidentados, aniônicos e macrocíclicos, são necessários para garantir a estabilidade do complexo molécula carreadora-radiolantanídeo. Na ausência de ligantes que satisfaçam seu número de coordenação, ocorre a formação de um radiocolóide  $[\text{}^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3]$  em pH neutro ou alcalino e se acumula no fígado. Para evitar a formação de hidróxidos insolúveis, utiliza-se tampão citrato ou acetato, com faixas de pH que variam entre 4,5 e 6,5.

A depender do quelante empregado, pode ser necessário aquecimento para a reação de complexação (JURISSON et al., 2008). Em função do  $^{177}\text{Lu}$  mimetizar o cálcio *in vivo* e apresentar alta afinidade pelo tecido ósseo, é necessário garantir o máximo de pureza radioquímica do radiofármaco a ser empregado na terapia (PUJATTI, PRISCILLA BRUNELLI et al., 2014).

A aplicação do  $^{177}\text{Lu}$  na produção de radiofármacos para terapia radioisotópica vem se intensificando nos últimos anos. Esse crescente uso é atribuído às propriedades físico-químicas deste radioisótopo, sua meia-vida física, de 6,65 dias, significativamente maior do que a de outros radiolantanídeos como o  $^{153}\text{Sm}$  e  $^{166}\text{Ho}$ , favorecendo sua utilização em processos mais complexos de radiomarcção que demandem maior tempo e trabalho (DAS et al., 2016).

Outrossim, o  $^{177}\text{Lu}$  emite radiação  $\beta^-$  de 497 keV de energia máxima, com alcance médio de 230  $\mu\text{m}$ , sendo ideal para o tratamento de micrometástases, como as geradas pelos tumores de próstata hormônio-refratários. A emissão concomitante de radiação  $\gamma$  de 208 keV de energia confere ao lutécio-177 a possibilidade de obtenção de imagens cintilográficas (MIKOLAJCZAK et al., 2019).

O potencial terapêutico do  $^{177}\text{Lu}$  tem sido avaliado em conjunto com uma série de substâncias carreadoras. Um estudo comparativo do DOTATATO (DOTA-Tyr3-octreotato) marcado com  $^{90}\text{Y}$  ou  $^{177}\text{Lu}$  mostrou uma captação superior, por tumores pancreáticos, do radiofármaco marcado com  $^{177}\text{Lu}$  (BREEMAN et al., 2003).

Outro estudo realizado retrospectivo com base em 15 artigos concluiu que o DOTATATO- $^{177}\text{Lu}$  é eficiente na terapia de casos em que não existe outro tratamento (PUJATTI, PRISCILLA BRUNELLI et al., 2014). É válido ressaltar que este produto em questão é produzido pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN e utilizado para o tratamento de tumores neuroendócrinos pelos médicos nucleares brasileiros.

## 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

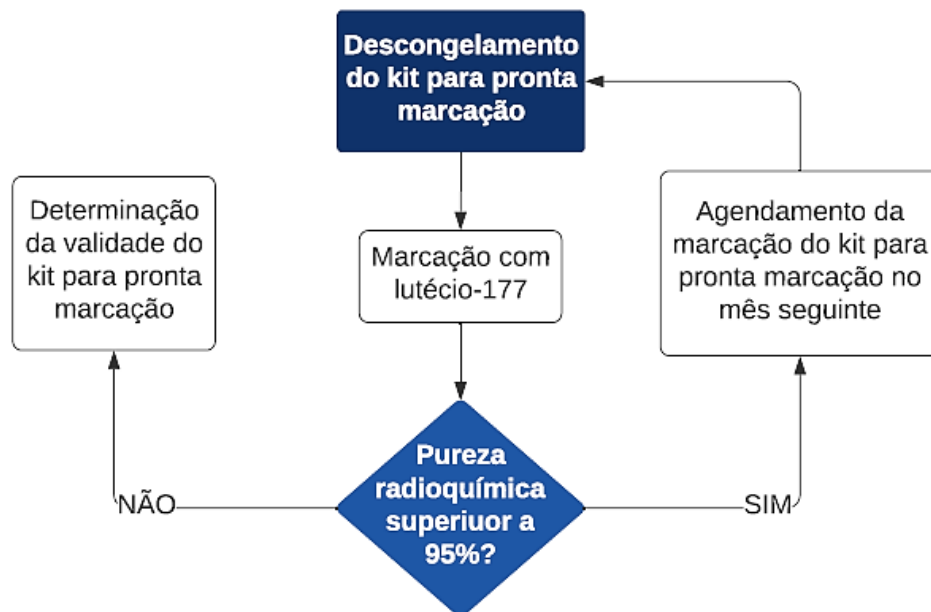
O planejamento experimental utilizado no desenvolvimento desta tese está contido neste capítulo.

### 4.1 Resumo do delineamento experimental

O peptídeo inibidor de PSMA, PSMA-617 já acoplado ao quelante DOTA, foi adquirido da empresa ABX, para marcação com lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda) e sem carregador (INM, Rússia e NTP, África do Sul). A presença ou ausência do carregador no lutécio-177, influi diretamente na atividade específica de marcação. A parte experimental consta nos itens 6 e 7.

Em uma etapa, foi avaliada a estabilidade de um kit para pronta marcação, composto pelo PSMA-617 e tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 por um período de 12 meses (figura 24).

**Figura 24** – Fluxograma da avaliação de estabilidade do kit para pronta marcação de PSMA-617.

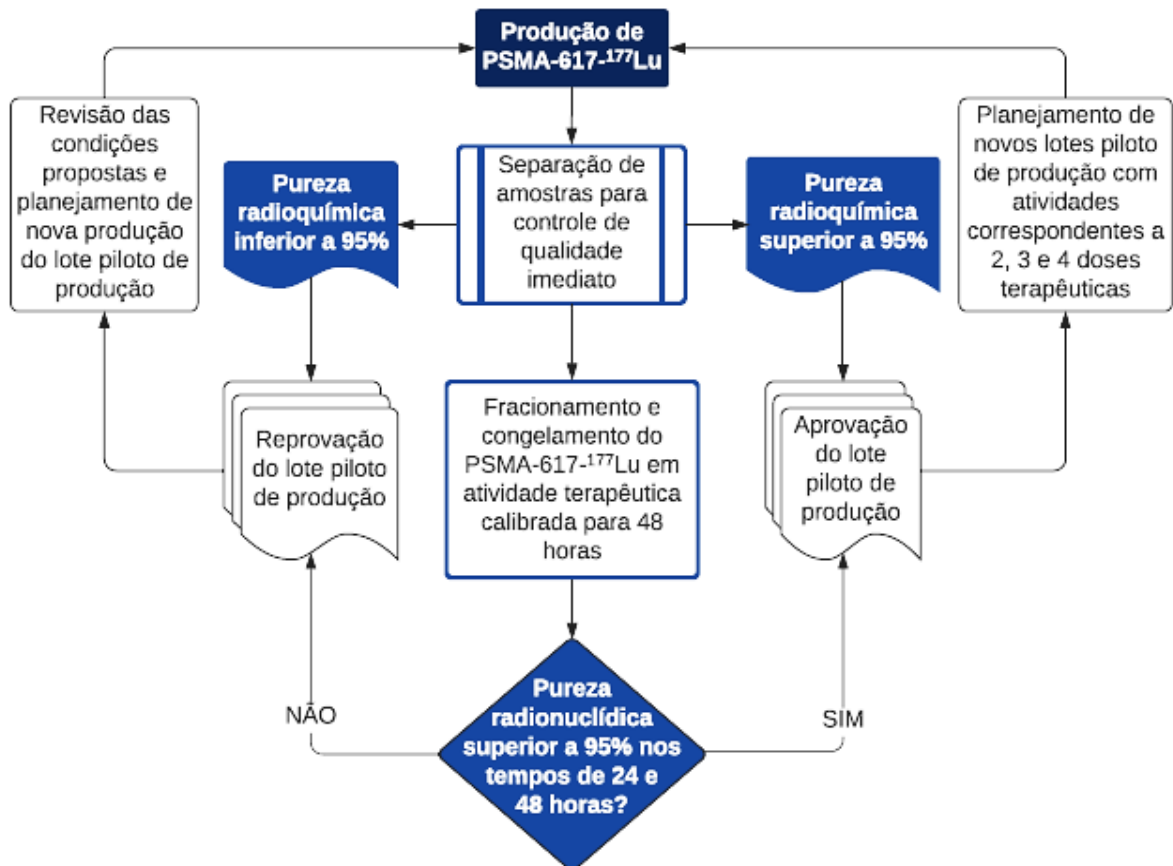


Fonte: autor da tese.



Outra etapa contemplou ensaios de escalonamento de dose do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (figura 25), para obtenção de até 4 doses terapêuticas de 7,4 GBq (200 mCi), sob atividade específica de 74 MBq/μg (2,0 mCi/μg), calibradas para 48 horas e os estudos de estabilidade destas doses imediatamente e 24 horas e 48 horas após a sua produção, sob congelamento.

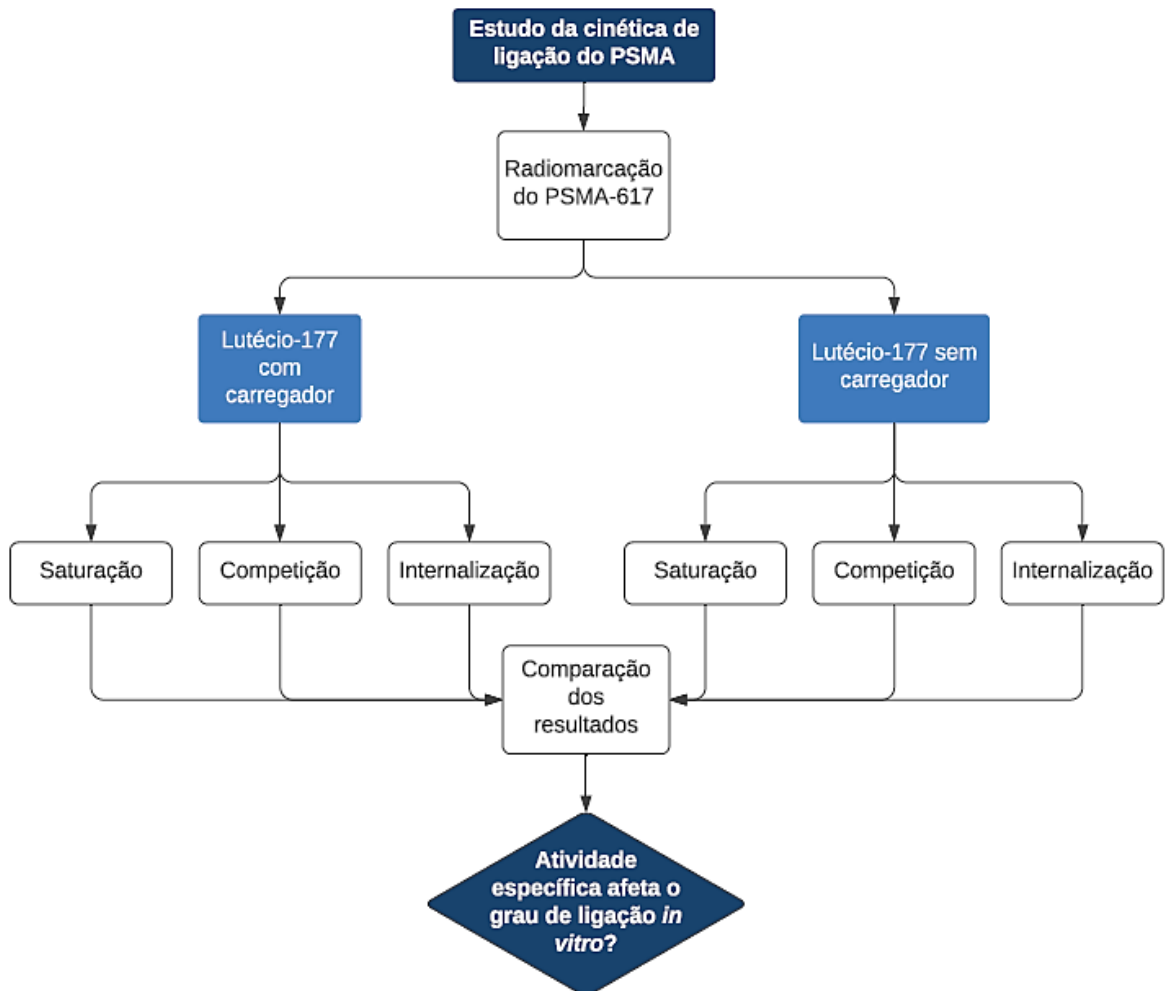
**Figura 25** – Fluxograma do escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.



Fonte: autor da tese.

Outro objetivo deste trabalho consistiu na comparação, por meio de estudos *in vitro* (figura 26), do comportamento do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, obtido com atividades específicas distintas em função da condição de marcação, de acordo com o tipo de lutécio-177 utilizado, isto é, com carregador ou sem carregador.

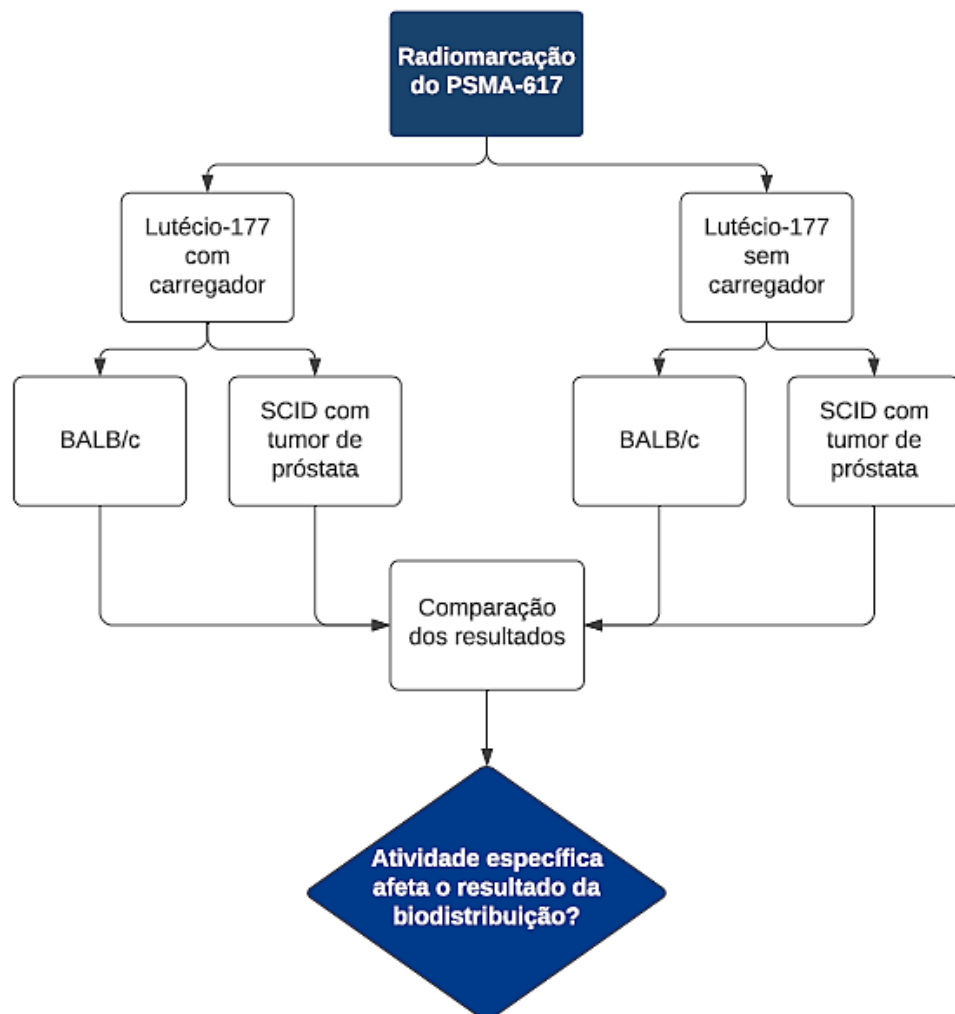
**Figura 26** – Fluxograma para comparação do efeito *in vitro* de duas atividades específicas diferentes de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador).



Fonte: autor da tese.

Outra meta estabelecida neste trabalho compreendeu na comparação do comportamento do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, sob atividades específicas distintas em função da condição de marcação, de acordo com o tipo de lutécio-177 utilizado, isto é, com carregador ou sem carregador em modelo animal sadio e tumoral (tumor de próstata).

**Figura 27** – Fluxograma de atividades para comparação do efeito *in vivo* de duas atividades específicas diferentes de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador).



Fonte: autor da tese.

## **5 MATERIAIS**

### **5.1 Infraestrutura**

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento, Preparo de Soluções e Controle de Qualidade, bem como na área dedicada à produção de moléculas marcadas com lutécio-177 do Centro de Radiofarmácia (CECRF), nos laboratórios de Cultivo Celular do Centro Biotecnologia (CEBIO) e no Biotério. Estas dependências estão localizadas no interior do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).

Estes laboratórios contam com a infraestrutura adequada para manipulação de materiais radioativos, soluções e reagentes químicos, células e animais de experimentação.

### **5.2 Reagentes e soluções**

Os principais reagentes e soluções, listados alfabeticamente, utilizados neste trabalho foram:

- Acetato de amônia (Merck, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila para CLAE (Merck Alemanha);
- Ácido acético glacial 100% (Merck, Alemanha);
- Ácido ascórbico (Merck, Alemanha);
- Ácido cítrico (Merck, Alemanha);
- Ácido clorídrico 37% (Carlo Erba, Espanha);
- Ácido etilenodiamino tetracético – EDTA (Merck, Alemanha);
- Ácido trifluoracético (Merck, Alemanha);
- Água purificada (purificador Milli-XR, EUA e Hypofarma, Brasil);
- Álcool etílico (Merck, Alemanha);
- Álcool isopropílico (Merck, Alemanha);

- Ascorbato de sódio (Sigma Aldrich, EUA);
- Citrato de sódio tri-hidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Cloreto de lutécio-177 (IDB, Holanda; INM, Rússia e NTP, África do Sul);
- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- Cloridrato de cetamina – anestésico para uso animal (Ceva, Brasil);
- Cloridrato de xilazina – relaxante muscular para uso animal (Vetbrands, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico (Sigma Aldrich, EUA);
- Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);
- Glicina (Sigma Aldrich, EUA);
- Heparina (Roche, Brasil);
- Hidróxido de sódio em lentilhas (Merck, Alemanha);
- Isoflurano – anestésico (Cristália, Brasil);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, EUA);
- N-octanol (Merck, Alemanha);
- Peptídeo PSMA-617 já acoplado ao DOTA (ABX, Alemanha);
- Solução de DTPA 0,4 mg/mL (IPEN, Brasil);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Tripsina EDTA 0,25% (Cultilab, Brasil);

### 5.3 Equipamentos, materiais e sistemas

Os principais equipamentos, materiais e sistemas, listados alfabeticamente, utilizados neste trabalho foram:

- Agitador magnético com aquecimento 725A (Fisatom, EUA);
- Agitador e aquecedor para microtubos de 1,5 mL Thermomixer Comfort (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- Cabine de fluxo laminar para cultivo de células Classe 2 (Scanlaf, EUA);
- Calibrador de atividade CRM<sup>TM</sup>-35R (Capintec, EUA);

- Coluna de fase reversa C18 para CLAE – 150 mm x 4,0 mm, 5 µm XTerra (Waters, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 Cobra II (Packard-Canberra, EUA);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Prominence, composto por sistema modulado constituído pela unidade de injetor automático de amostras SIL-AC20 HT, bomba LC-20AT, degaseificador DGU-20 SR, detector UV/Vis SPD-20A e módulo comunicador CBM-20A (Shimadzu, Japão). Acoplado a esta unidade, encontra-se o detector de radiação gama – Flow-RAM Radio HPLC Detector (Lablogic, Inglaterra);
- Detector de germânio hiperpuro (HPGe) modelo GX1518, acoplado a um sistema de aquisição multicanal (Canberra, EUA). Dados são tratados pelo software GENIE-PC (Mirion Technologies, EUA);
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Binder, EUA);
- Filtro esterilizante 0,22 Millex GV (Merck, Alemanha);
- Frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- Frascos tipo penicilina de 20 mL (Forthmed, Brasil);
- GraphPad Prism 8.0.2<sup>®</sup> (GraphPad 8.0.2<sup>®</sup>, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA);
- Laura 4.0 – software para controle do Sistema de CLAE (Lablogic, Inglaterra);
- Materiais plásticos descartáveis em geral, tais como ponteiras, seringas, microtubos cônicos com tampa para reação, tubos capilares, tubos cônicos para cultivo celular e criotubos;
- Placas para cultivo de células aderentes com seis poços (Jet Biofil, China);
- Radiocromatógrafo Scan-RAM Radio-TLC Detector (Lablogic, Inglaterra);
- Seringa de insulina com agulha de 12,7 x 0,33 mm (Becton Dickinson, EUA);
- Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina – CCD-SD (Merck, Alemanha);

- Tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas;

#### **5.4 Animais**

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos machos *BALB/c* e *SCID* (camundongos *BALB/c* imunodeficientes a partir de modificação genética), com idade entre 8 a 12 semanas, fornecidos pelo Biotério da instituição (IPEN/CNEN-SP).

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, sob projeto número (179/16) (ANEXO A) e realizados de acordo com as normas e orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Os camundongos machos foram mantidos no biotério, sob condições adequadas para mantê-los livres de patógenos. Os animais foram mantidos sob as seguintes condições ambientais:

- Temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C;
- Regime de iluminação artificial com ciclo de 12 horas com luz e 12 horas com escuridão;
- Ração e água *ad libitum*;

#### **5.5 Células de carcinoma prostático humano androgênio-dependentes (LNCaP)**

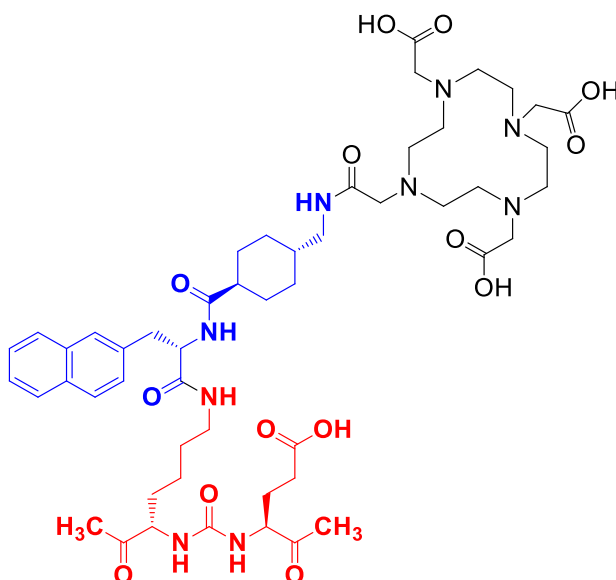
As células de carcinoma prostático humano androgênio-dependentes (LNCaP), ausentes de contaminação com micoplasma, foram doadas pelo Hospital de Amor (antigo Hospital do Câncer de Barretos) e foram cultivadas no laboratório do Centro de Biotecnologia (CEBIO), sob orientações específicas para a linhagem celular (ATCC® CRL-1740™).

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Estudo da radiomarcção do PSMA-617 com lutécio-177

A marcação de peptídeos, proteínas, anticorpos e substratos não proteicos em geral, necessitam de agentes quelantes que tornam possível o transporte de radiometais até o alvo desejado. O PSMA-617 (ABX, Alemanha) possui o quelante DOTA integrado à sua estrutura, separado do grupo farmacofórico por meio de um espaçador (figura 28). O quelante DOTA é adequado para a radiomarcção com o lutécio-177, um radioisótopo metálico da família dos lantanídeos e utilizado para fins de tratamento (PRICE; ORVIG, 2014).

**Figura 28** – Fórmula estrutural do PSMA-617, destacando o grupo farmacofórico (vermelho), o espaçador (azul) e o grupamento quelante DOTA (preto).



Fonte: autor da tese.

Em 2017 foi relatada a radiomarcção de um derivado de PSMA DOTA-conjugado com lutécio-177 e neste trabalho foi determinada as condições de radiomarcção, sendo a razão de marcação de 74 MBq/ $\mu$ g (2 mCi/ $\mu$ g), empregando-se <sup>177</sup>Lu de baixa atividade específica, à 90 °C por 30 minutos (SILVA,



2017). A partir desta condição pré-determinada, foi avaliada a robustez de marcação do PSMA-617 com o lutécio-177 (IDB, Holanda) em diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos) e temperaturas (85, 90 e 95 °C), em triplicata. Nestas marcações adicionou-se 200 µL de tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7, 10 µg de PSMA-617 (diluídos em 10 µL de água ultrapura) e 74 MBq de lutécio-177.

Com a condição de radiomarkação estabelecida, compararam-se as purezas radioquímicas obtidas em marcações empregando-se o tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 e o tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5, acrescido de 5 mg de ácido genticóico para cada 100 µL de tampão. Os produtos marcados foram conservados em temperatura ambiente e tiveram a sua estabilidade avaliada imediatamente, 24 horas e 48 horas após a radiomarkação.

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA 2 vias seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni (GraphPad 8.0.2<sup>®</sup>, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

## **6.2 Condições gerais de radiomarkação para comparação do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com e sem carregador empregado nos ensaios *in vitro* e *in vivo***

O lutécio-177 pode ser produzido a partir de duas rotas diferentes que influenciam diretamente na radiomarkação de moléculas. A produção direta, consiste em uma irradiação de nêutrons ( $n,\gamma$ ) do lutécio-176, transformando-o em lutécio-177, entretanto a conversão não é de 100%. Na amostra ainda sobrarão lutécio-176 não radioativo, chamado de carregador (BARKHAUSEN, 2011; DASH et al., 2015). Utilizou-se neste trabalho o lutécio-177 com carregador da empresa IDB (Holanda), com atividade específica mínima deste radioisótopo de 500 GBq/mg (13,5 Ci/mg) (IDB, 2020).

A segunda via de produção do lutécio-177 é indireta e envolve a irradiação com nêutrons ( $n,\gamma$ ) do itérbio-176, transformando-o em itérbio-177 que, por sua vez, converte-se em lutécio-177 por meio de um decaimento beta (tempo de meia vida de 1,9 horas), de forma que o lutécio-177 obtido no final está isento de massa lutécio não radioativo, ou seja, livre de carregador (DASH et al., 2015). Este lutécio foi adquirido das empresas INM (Rússia) e NTP (África do Sul) com

atividades específicas mínimas de 1.100 GBq/mg (30 Ci/mg) e 3.000 GBq/mg (81 Ci/mg), respectivamente (INM, 2019; NTP, 2017).

O processo de marcação que empregou o lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda) foi avaliado nas razões molares (moles de peptídeo/ moles de lutécio) de 1,5, 1,75 e 2,1, sendo esta última empregada no IPEN na produção do DATATATO-<sup>177</sup>Lu – DOT-IPEN-177®). A massa mínima de marcação de PSMA-617 foi de 10 µg (9,596 nmol) e para calcular a atividade foi necessário primeiro encontrar a quantidade em massa de lutécio presente em 4,569 nmol, dada pela seguinte equação (3):

$$Lu (\mu g) = \frac{4,569 \text{ nmol Lu} \times 176 \text{ g Lu}}{1 \text{ mol Lu}} = 0,804 \quad (3)$$

Com base na massa de lutécio encontrada calculou-se a atividade de lutécio a ser adicionada na marcação. Para tal, levou-se em consideração a atividade total presente no frasco e a massa total de lutécio-176 que foi irradiada, pela seguinte equação (4):

$$A (\text{MBq ou mCi}) = \frac{0,804 \mu g \text{ Lu} \times \text{Atividade total de lutécio-177}}{\text{massa total de lutécio irradiada}} \quad (4)$$

O processo de radiomarkação com o lutécio-177 isento de carregador (INM, Rússia e NTP, África do Sul) foi baseado na atividade específica de 74 MBq/µg ou 2mCi/µg (77,11 MBq/nmol ou 2,08 mCi/nmol), para esta situação não foi necessário calcular a atividade a partir do número de moles de lutécio, uma vez que o lutécio-176 carregador não está presente.

### 6.3 Desenvolvimento de kit de PSMA-617 para pronta marcação

Com base nos resultados do estudo das condições de marcação do PSMA-617 com <sup>177</sup>Lu foi proposto um kit para pronta marcação contendo o peptídeo e o tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7. Foram preparadas cinco amostras, cada uma contendo 10 µL (10 µg) de peptídeo e 60 µL do referido tampão. As

amostras foram congeladas e avaliou-se a integridade das mesmas por CLAE nos tempos de 1, 2, 5, 7 e 12 meses, por meio da marcação com lutécio-177.

#### **6.4 Escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu**

Com base nos resultados do estudo das condições de marcação do PSMA-617 com <sup>177</sup>Lu, foi realizado “scale-up” da produção em bancada para produção de lotes correspondentes a uma a quatro doses terapêuticas.

Foram produzidas doses do radiofármaco com lutécio-177 isento de carregador, obtidos da INM (Rússia) e da NTP (África do Sul). Por se tratar de lutécio de alta atividade específica, foram produzidos lotes de 18,5 GBq (500 mCi) e de 37 GBq (1000 mCi) com 250 µg e 500 µg de PSMA-DOTA-617, respectivamente. Este estudo permitiu verificar a efetividade para ampliação de produção, visando atender demanda futura deste radiofármaco, com base na experiência de produção do radiofármaco DOTATATO-<sup>177</sup>Lu, já comercializado pelo IPEN para tratamento de pacientes com tumor neuroendócrino (DOT-IPEN-177®).

#### **6.5 Análise de pureza radioquímica**

A pureza radioquímica (PR) é definida como a porcentagem do total da radioatividade que se encontra na forma radioquímica desejada, no caso, na forma de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. As impurezas podem representar o lutécio-177 livre (forma catiônica <sup>177</sup>Lu<sup>+3</sup>) ou na forma de óxido de lutécio [<sup>177</sup>Lu(OH)<sub>3</sub>] ou como lutécio-177 ligado apenas ao quelante DOTA. As impurezas podem ser decorrentes da radiomarkação inadequada, decomposição do peptídeo, mudança do pH ou da exposição a agentes redutores ou oxidantes (SHARP et al., 2005).

Os métodos de cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG), cromatografia em camada delgada de sílica gel instantânea (iCCD-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados no presente trabalho para a determinação da pureza radioquímica das marcações.

### 6.5.1 Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada de sílica gel (iCCD-SG)

Aplicou-se uma alíquota (1 a 2  $\mu\text{L}$ ) do radiomarcado (entre 1 a 2  $\mu\text{Ci}$ ) sobre as fitas de CCD-SG e iCCD-SG (1,2 x 10 cm). Como fase móvel utilizou-se o tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 e metanol:acetato de amônio 1 M pH 8,5 (1:1 v/v). Ao fim da cromatografia, as fitas de ou iCCD-SG CCD-SG foram secas e cortadas em fragmentos de 1 cm e a leitura da radioatividade correspondente a cada fragmento foi realizada em contador automático do tipo poço (Cobra II, Packard – Canberra, EUA). Alternativamente, a fita íntegra foi lida em radiocromatógrafo.

### 6.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Realizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e detector de radiação gama (Flow-RAM Radio HPLC Detector). Em cada corrida foi injetado aproximadamente 0,74 MBq (20  $\mu\text{Ci}$ ) e o fluxo utilizado foi de 0,4 mL/minuto por meio de uma mistura de gradiente apresentada na tabela abaixo (tabela 3).

**Tabela 3** – Proporção dos solventes utilizados no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

<b>Proporção dos solventes utilizados no sistema CLAE</b>			
	0 – 2 minutos	2,01 – 5,99 minutos	6 – 20 minutos
A (água 0,1% TFA*)	83%	70%	83%
B (acetonitrila)	17%	30%	17%

\* TFA representa ácido trifluoracético

Fonte: autor da tese.

## 6.6 Controle de qualidade microbiológico do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu

Os ensaios de esterilidade e endotoxinas foram realizados no laboratório de controle de qualidade microbiológico do Centro de Radiofarmácia do IPEN, por

pessoal devidamente treinado, de acordo com as técnicas descritas na farmacopeia brasileira e adaptadas para o controle microbiológico de radiofármacos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Para a execução dos ensaios de esterilidade e endotoxina, uma amostra de 100  $\mu\text{L}$  do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  foi diluída com 9,9 mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

Para a análise de esterilidade, 1 mL da amostra diluída foi semeada, em triplicata, em tubos contendo os seguintes meios de cultura: meio fluido de tioglicolato (T) e caldo de caseína soja (TSA). Os meios T e o TSA foram incubados e mantidos a  $32,5 \pm 2,5$  °C e  $22,5 \pm 2,5$  °C, respectivamente, por 14 dias. A ausência de turvação do meio de cultura foi interpretada como inexistência de crescimento microbiano.

O ensaio de endotoxina bacteriana foi realizado com LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) pelo método de coagulação em gel. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de radiofármaco diluído em um tubo contendo 100  $\mu\text{L}$  de LAL previamente solubilizado. O tubo foi incubado por  $60 \pm 2$  minutos a  $37 \pm 1$  °C, analisado em triplicata.

Para interpretação do resultado, o tubo foi invertido a 180 °, a formação de um gel ou massa viscosa que se aderisse a parede do tubo foi considerada como positiva e foi considerado negativo a não formação deste gel, sendo o critério de aceitação do ensaio menor do que 175 UE/V (unidade de endotoxina por volume), onde V representa o volume máximo a ser administrado em um paciente.

## **6.7 Controle radionuclídico do lutécio-177**

Para a análise da pureza radionuclídica, uma amostra do radiofármaco contendo aproximadamente 370 kBq (10  $\mu\text{Ci}$ ) foi adicionada em um frasco limpo e o volume completado para 1 mL com água ultrapura. O frasco foi tampado com rolha de borracha e vedado com filme plástico.

O frasco foi posicionado na prateleira mais distante do detector de germânio ultrapuro (Canberra) e programou-se o tempo de aquisição por 10 minutos, sendo que o tempo morto de análise não foi superior a 10%. As diferentes emissões gama em energias diferentes foram adquiridas em áreas sobre a curva

(AUC), sendo que quanto maior a prevalência daquele comprimento de energia, maior foi a AUC.

Para a interpretação do resultado, foi considerada a atividade de lutécio-177, sob a energia de 208 quilo elétron Volt (keV) dividida pela soma da atividade do lutécio-177 em 208 keV e as impurezas itérbio-175 e lutécio-177 metaestável obtidas a partir do relatório de análise de pureza radionuclídica gerada pelo software gerenciador do germânio ultrapuro (equipamento para controle de qualidade radionuclídico) (5). O critério de aceitação para a porcentagem de pureza radionuclídica (%PRn)  $\geq 99,9\%$  (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2020). O espectro com a energia característica do lutécio-177 foi considerado como prova de identidade radionuclídica para a energia de 112 keV e 208 keV.

$$\%PRn = \frac{\sum \text{atividade do lutécio-177}}{\sum \text{atividade do lutécio-177} + \text{atividade de contaminantes}} \quad (5)$$

Os contaminantes, de acordo com a farmacopeia europeia (2017) foram itérbio-175 (meia vida de 4,185 dias) e lutécio-177 metaestável (meia vida de 160,4 dias) (tabela 4).

**Tabela 4** – Energia das impurezas (itérbio-175 e lutécio-177 metaestável) que podem estar presentes no lutécio-177 e que devem ser pesquisadas.

Impureza	Energia E $\gamma$ (keV)
<sup>175</sup> Yb	282,52
	396,33
<sup>177m</sup> Lu	378,5

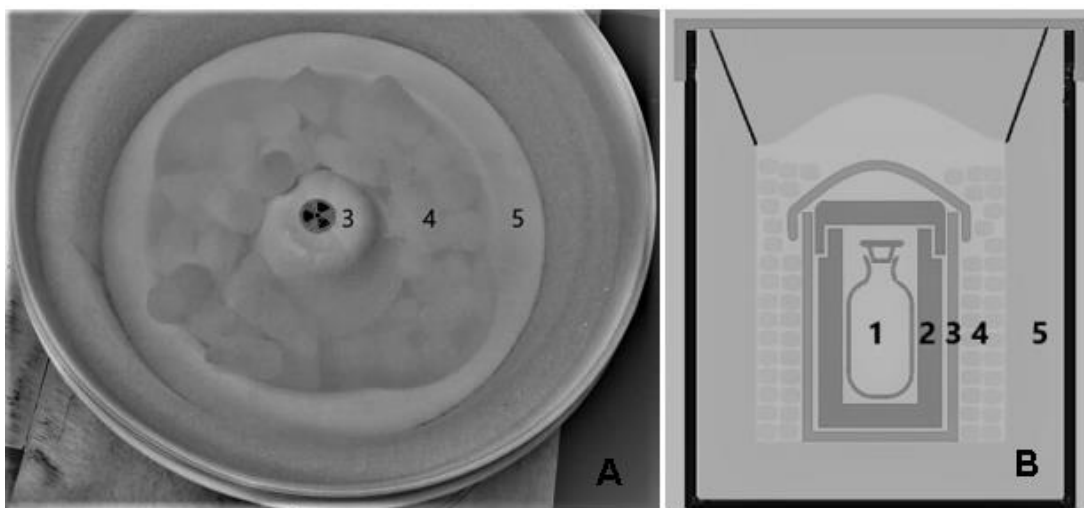
Fonte: autor da tese.

Estas impurezas são aceitas desde que estejam abaixo do limite estabelecido para o critério de aceitação. A atividade do itérbio-175 não deve ser superior a 0,1% da atividade total da amostra, enquanto a atividade máxima permitida de lutécio-177 metaestável é de 0,07% do total. Outras impurezas possíveis não devem representar mais do 0,01% da atividade total (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2020).

## 6.8 Estudo de estabilidade em condições de transporte do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu

Para avaliar a estabilidade de doses terapêuticas, foi simulada a condição de transporte, ou seja, após a produção as doses foram fracionadas para aproximadamente 9,25 GBq (250 mCi), calibrada para 2 dias (atividade próxima de 7,4 GBq ou 200 mCi após 48 horas) e foram acondicionadas em balde de gelo seco (figura 29) para que a sua estabilidade fosse avaliada num período de 48 horas.

**Figura 29** – Sistema de embalagem para envio de doses congeladas de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu [A] e representação esquemática do sistema [B]: frasco contendo o radiofármaco [1], acondicionado em castelo de chumbo apropriado [2], protegido dentro de um sistema plástico com trava de segurança [3] e o balde de plástico forrado com isopor [5] com gelo seco [4].



Fonte: autor da tese.

Foram colhidas amostras imediatamente após a produção, 24 horas e 48 horas. Para todos estes pontos foi realizado controle de qualidade em CCD-SG e CLAE. Avaliou-se também a esterilidade e presença de pirógenos no produto final, no laboratório de Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia (baseado em protocolo interno do Centro de Radiofarmácia aplicado a outros radiofármacos que necessitam de congelamento).

## 6.9 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu

Preparou-se 3 tubos, cada um contendo 3 mL de n-octanol (fase orgânica) e 3 mL de solução Tampão Fosfato Salino pH 7,4 (PBS). Misturou-se as fases por processo de agitação e aguardou-se por 24 horas até a sua completa separação. Em seguida, adicionou-se, em cada tubo, 100 µL do radiofármaco, contendo aproximadamente 12 MBq (0,34 µCi). Prontamente agitou-se os tubos durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a separação das fases, recolheu-se uma alíquota de 100 µL de cada uma delas para contagem em contador automático do tipo poço. O coeficiente de partição (Log P) foi determinado pela seguinte equação (6) (DURKAN et al., 2007):

$$\text{Log } P = \log_{10} \frac{\text{cpm da fase orgânica}}{\text{cpm da fase aquosa}} \quad (6)$$

## 6.10 Estudos com células LNCaP

A célula LNCaP é uma célula originária de um paciente com câncer de próstata metastático encontrado em linfonodo supra clavicular esquerdo (ATCC, 2020). O PSMA-617 é um antagonista que se liga especificamente ao PSMA de membrana, o que justificou a escolha das células LNCaP para os estudos *in vitro* e *in vivo*.

### 6.10.1 Cultivo e preparo das células LNCaP

As células LNCaP foram cultivadas em frasco de cultura com 75 cm<sup>2</sup> com meio de cultura RPMI 1640 acrescido de 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) com 100 UI/mL de penicilina e 300 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e a troca do meio de cultura foi realizada duas vezes por semana. Na etapa de tripsinização utilizou-se 3 mL de tripsina EDTA 0,25% com 8 minutos de incubação em estufa a 37 °C.



Para os ensaios *in vitro*, 200 mil células foram semeadas por poço, em placa de seis poços para células aderentes, com 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 10% v/v de Soro Fetal Bovino (SFB) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa por 4 horas a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> para promover a adesão das células.

Para os ensaios *in vivo*, foram preparadas suspensões de 100 µL contendo aproximadamente 5 milhões de células em PBS pH 7,4.

### **6.10.2 Avaliação da cinética de ligação *in vitro* entre células LNCaP e PSMA-617-<sup>177</sup>Lu**

O PSMA-617 radiomarcado foi diluído em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de v/v SFB a uma concentração radioativa aproximada de 36 MBq/mL (0,97 mCi/mL) que consistiam em 0,64 nmol/mL de PSMA-617. Com este ensaio foi possível verificar a taxa de ligação do PSMA-617 na superfície das células em diferentes tempos (30 minutos, 1 hora e 2 horas). Para tanto, as placas de seis poços que continham as células foram previamente acondicionadas em geladeira (2 a 8 °C) e retiradas no momento da adição da alíquota de 1 mL da solução de radiofármaco preparada previamente e novamente retornaram para a refrigeração para inibir o mecanismo de internalização do PSMA (MICHALSKA et al., 2016).

Ao término da incubação, descartou-se o sobrenadante, em seguida os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS pH 7,4.

Por fim, adicionou-se 1mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, recolheu-se o volume do poço para o tubo de contagem selecionado para a amostra e repetiu-se o processo por mais uma vez.

Preparou-se uma triplicata do padrão (adicionou-se 1 mL da solução do radiofármaco preparada anteriormente e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% para manter o volume de 2 mL idêntico em todos os tubos de contagem). Por fim, contou-se os tubos em contador automático do tipo poço e os valores obtidos em contagens por minuto (CPM) foram convertidos para fmol/ng (a partir do valor de CPM do padrão, 100% da quantidade adicionada nos poços) com Microsoft Excel e por fim o gráfico foi produzido com o GraphPad Prism 8.0.2.

Para este ensaio e os demais experimentos *in vitro*, a marcação com lutécio-177 isento de carregador respeitou a atividade específica de 74 MBq/ $\mu$ g. A marcação com lutécio-177 com carregador se deu pela relação molar 2,1 moles de PSMA-617 para 1 mol de lutécio-176 (descrito em certificado de irradiação do radioisótopo), desta forma, houve variações na atividade específica final do radiofármaco.

### **6.10.3 Ensaio *in vitro* de curva de saturação da ligação do peptídeo PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em células LNCaP**

No ensaio de saturação dois parâmetros podem ser avaliados, sendo a afinidade pela ligação no sítio alvo  $K_d$  ou constante de dissociação, quando o ligante ocupa metade dos receptores/pontos de ligação disponíveis. O segundo parâmetro avaliado é a estimativa ou densidade do número de sítios de ligação presentes no meio ( $B_{max}$ ) (DONG et al., 2015). Com este ensaio foi possível avaliar o impacto da utilização de dois tipos de diferentes de lutécio-177 (com e sem carregador) na ligação do radiofármaco aos receptores de PSMA. As células LNCaP foram cultivadas conforme o item 6.10.1.

Para a realização deste experimento, foram adicionadas alíquotas de 1 mL de PSMA-617 (radiomarcado com lutécio de alta ou de baixa atividade específica), diluído em meio RPMI 1640 acrescido de 10% v/v de SFB, contendo diferentes concentrações molares 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,6 nM, 1,5 nM, 2,0 nM, 2,5 nM, 3,0 nM e 3,5 nM de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em diferentes poços. Os tubos foram incubados por 1 hora em geladeira (2 – 8 °C), o processamento das amostras foi idêntico ao descrito no item 6.10.2 e o material coletado foi contado em contador automático do tipo poço. Os dados foram processados em software Microsoft Excel e por fim o gráfico foi produzido com o GraphPad Prism 8.0.2. Cada ponto deste ensaio foi realizado em octuplicata.

#### **6.10.4 Ensaio *in vitro* de competição da ligação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em células LNCaP**

O PSMA-617 radiomarcado foi diluído em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de 10% v/v de SBF a uma concentração de 5 nM/mL. O PSMA-617 não radiomarcado (competidor) foi diluído a uma concentração de 75 nmol/mL com o mesmo meio de cultura. O ensaio se deu pela adição de 1 mL do radiomarcado em todos os poços, em seguida metade destes recebeu mais 1 mL de meio de cultura (sem competição pelo sítio de ligação) e na outra metade adicionou-se 1 mL da solução de competidor (competição pelo PSMA de membrana), seguido de uma hora de incubação em geladeira (2 – 8 °C). Após o processamento dos poços, conforme descrito no item 6.10.2, os tubos contendo o lisado celular foram contados em contador automático do tipo poço e avaliou-se o impacto do excesso molar do peptídeo não radiomarcado na ligação do peptídeo radiomarcado ao PSMA de membrana.

#### **6.10.5 Ensaio *in vitro* de internalização do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em células LNCaP**

Para este ensaio a avaliação do impacto da atividade específica de marcação do PSMA-617 com os dois lutécios disponíveis (com e sem carregador) se deu a partir do valor de  $K_d$  encontrado no experimento de saturação, isto é, adicionou-se em cada poço a molaridade correspondente.

Para o lutécio com carregador (IDB, Holanda), adicionou-se em cada poço 1,715 nM de PSMA-617 contido em 1 mL, em concentração radioativa de 48,47 MBq/mL. No caso do lutécio isento de carregador (INM, Rússia) foi adicionado em cada poço 0,7732 nM de PSMA-617 presente em 1 mL, em concentração radioativa de 148 MBq/mL.

Em seguida, cada placa foi acondicionada em estufa à 37 °C por uma hora, seguido de lavagem com 1 mL de PBS pH 7,4, por duas vezes. A segunda parte de processamento consistiu na adição de 1 mL de tampão de glicina (0,05 M de glicina, 0,1 M de cloreto de sódio, pH 2,8), incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante, o que promoveu a remoção do peptídeo ligado na superfície da célula (HILLIER et al., 2013). Por último, adicionou-

se 1 mL de NaOH 1 M e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente, recolhendo o lisado celular. Esta etapa foi repetida por mais uma vez, em tubo de contagem que continha apenas a fração do peptídeo internalizada. O ensaio foi conduzido em quadruplicata e os padrões foram preparados em triplicata.

### 6.11 Estudo farmacocinético do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios

A farmacocinética pode ser denominada como a ciência que estuda a cinética de absorção, distribuição, metabolização e excreção de drogas/fármacos em função do tempo após a sua administração, permitindo calcular-se o tempo de meia vida plasmática, clareamento sanguíneo e volume de distribuição (JAMBHEKAR; BREEN, 2009).

O estudo de farmacocinética do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi realizado em camundongos *BALB/c* sadios adultos jovens (3 a 4 meses de idade). A amostra de sangue foi coletada por método invasivo (plexo orbital) após a anestesia composta por cetamina (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL) administrada (100 µL para cada 20 gramas) por via intraperitoneal. Procedimento aprovado pela CEUA 179/16.

Por meio de administração endovenosa (veia caudal) foram injetados 7,4 MBq (200 µCi) do radiofármaco, diluídos em 100 µL de solução de cloreto de sódio 0,9% (condições baseadas em protocolo interno do grupo de pesquisa). As amostras de sangue (75 µL) foram coletadas nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas, com um tubo heparinizado.

A radioatividade das amostras foi analisada em contador automático do tipo poço. Os dados foram processados para % de Atividade Injetada no sangue total (%AI sg total) e analisado no programa GraphPad Prism 8.0.2 sob o modelo de distribuição bicompartimental que é caracterizado por duas exponenciais, sendo uma fase de decaimento rápida e outra fase de decaimento lenta.

A porcentagem de atividade injetada no sangue total (%AI sg total) foi calculada pela fórmula (7):

$$\% AI \text{ sg total} = \frac{CPM \text{ do capilar} \times \text{volemia total}}{0,75 \mu L \times (CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ da cauda})} \times 100 \quad (7)$$

Os parâmetros farmacocinéticos avaliados foram: meia vida de distribuição ( $T_{1/2\alpha}$ ), meia vida de eliminação ( $T_{1/2\beta}$ ), constante de distribuição ( $\alpha$ ), constante de eliminação ( $\beta$ ), área sob a curva da concentração plasmática *versus* o tempo estudado (AUC), clareamento sanguíneo (CL) e volume de distribuição (Vd). Estes ensaios foram realizados em quadruplicata.

O clareamento sanguíneo foi calculado pela seguinte fórmula (8):

$$CL = \frac{\text{Atividade total administrada (CPM)}}{AUC} \quad (8)$$

O Volume de distribuição (Vd) foi calculado pela seguinte fórmula (9):

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \quad (9)$$

Para este ensaio e os demais experimentos *in vivo*, a marcação com lutécio-177 isento de carregador respeitou a atividade específica de 74 MBq/ $\mu$ g. A marcação com lutécio-177 com carregador se deu pela relação molar 2,1 moles de PSMA-617 para 1 mol de lutécio-176 (descrito em certificado de irradiação do radioisótopo), desta forma, houve variações na atividade específica final do radiofármaco.

### **6.12 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos BALB/c machos sadios**

O radiofármaco PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (7,4 MBq diluído em 100  $\mu$ L de solução de cloreto de sódio 0,9%) foi administrado por via endovenosa caudal em camundongos *BALB/c* machos sadios. Após os tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas os animais foram anestesiados com solução de cetamina (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL) administrada por via intraperitoneal (100  $\mu$ L para cada 20 gramas), eutanasiados e dissecados.

Os órgãos/tecido de interesse retirados foram o coração, fígado, baço, pulmões, pâncreas, estômago, fígado, rins, intestino delgado e grosso, músculo da

pata traseira direita, fêmur da pata traseira direita, cérebro e cauda (para descontar a atividade que ficou retida). Após removidos, foram lavados em água e pesados. Posteriormente, mediu-se a radioatividade contida nos órgãos em contador automático do tipo poço.

Calculou-se as porcentagens da atividade injetada por órgão/tecido (% AI), por grama de órgão/tecido (% AI/g) e no sangue por mL (%AI/mL) e sangue total (%AI sg total) a partir da média das contagens do padrão, preparado em triplicata, da atividade injetada. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

A porcentagem de atividade injetada por órgão/tecido (% AI) foi calculada pela fórmula (10):

$$\% AI = \frac{CPM \text{ do órgão/tecido}}{CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ residual da cauda}} \times 100 \quad (10)$$

A porcentagem de atividade injetada por grama de órgão (% AI/g) foi calculada pela fórmula (11):

$$\% AI/g = \frac{CPM \text{ do órgão/tecido}}{\text{massa do órgão (g)} \times (CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ da cauda})} \times 100 \quad (11)$$

A porcentagem de atividade injetada presente no sangue por mL (% AI/mL) foi calculada pela fórmula (12):

$$\% AI/mL = \frac{CPM \text{ do capilar}}{0,75 \mu L \times (CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ da cauda})} \times 100 \quad (12)$$

A porcentagem de atividade injetada presente no sangue total (%AI sg total) foi calculada pela fórmula (13):

$$\% AI \text{ sg total} = \frac{CPM \text{ do capilar}}{0,075 \mu L \times (CPM \text{ do padrão} - CPM \text{ da cauda})} \times \text{volemia} \times 100 \quad (13)$$

A volemia ou o volume total de sangue do camundongo foi considerado como 7,78% da massa do animal, em gramas, dado pela seguinte fórmula (14) (JÍMENEZ, 2007):

$$\text{Volemia (mL)} = \text{massa do camundongo (g)} \times 0,0778 \quad (14)$$

### **6.13 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP**

Os camundongos *SCID* (*Severe Combined Immunodeficient* ou imunodeficiência severa combinada) são camundongos *BALB/c* que possuem uma mutação autossômica no cromossomo 16 que incapacita o animal (homozigoto), em sua grande maioria, de produzir imunoglobulinas (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ou IgM). Esta mutação também impede o desenvolvimento adequado dos órgãos linfoides, sendo que o timo, baço e linfonodos não possuem linfócitos T e B. As células esplênicas destes animais não respondem aos estímulos de mitose para produção de células T e B, de forma que não ocorre rejeição de transplantes ou tumores xenográficos (JAX, 2020; SILVA, 2017).

Para o desenvolvimento do tumor, foram utilizados camundongos machos *SCID* com 3 a 4 meses de idade. Injetou-se aproximadamente cinco milhões de células, contidas em 100 µL de PBS 0,1M pH 7,4, por via subcutânea no flanco esquerdo.

Entre 15 e 20 dias após a inoculação os animais foram submetidos ao ensaio de biodistribuição. Antes do experimento, com auxílio de um paquímetro, mediu-se o tamanho dos tumores. Foi administrado 7,4 MBq (200 µCi) de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, diluído em 100 µL de solução de cloreto de sódio 0,9%, por via endovenosa.

Após os tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 24 horas os animais foram anestesiados com solução de cetamina (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL) administrada por via intraperitoneal (100 µL para cada 20 gramas), eutanasiados e dissecados. Foram removidos e pesados os mesmos órgãos/tecidos processados no experimento com animal sadio, acrescido do tumor. Posteriormente, a atividade

contida em cada uma das peças removidas foi avaliada em contador automático do tipo poço.

As peças de tumor removidas foram fixadas em formol a 10% e após o decaimento radioativo foram encaminhadas para o laboratório de histologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, onde cada tumor foi embebido em parafina, cortado com uma sessão de 5  $\mu\text{m}$ , fixado em lamina e corados por eosina e hematoxilina. As lâminas foram analisadas em microscópio (Nikon Eclipse E600) pela Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Bellini no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer no Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN.

Calculou-se as porcentagens da atividade injetada por órgão/tecido/tumor (% AI), por grama de órgão/tecido/tumor (% AI/g) e no sangue por mL e sangue total (% AI/mL e % AI sg total) a partir da média das contagens do padrão da atividade injetada, preparado em triplicata. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

#### **6.13.1 Ensaio de bloqueio de captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos SCID machos com tumor de LNCaP**

Paralelamente ao ensaio de biodistribuição com camundongos SCID do sexo masculino descrito no item anterior, um segundo grupo contendo quatro animais recebeu, por via intraperitoneal, uma administração de 100  $\mu\text{g}$  PSMA-617 (diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura) não radiomarcado, 30 minutos antes da administração da dose de 7,4 MBq do radiofármaco. Uma hora após esta administração os animais foram anestesiados, eutanasiados e dissecados. O material biológico alvo de estudo para comparação com o grupo que não recebeu bloqueio foi removido, pesado e a atividade contabilizada em contador automático do tipo poço.

Calculou-se as porcentagens da atividade injetada por órgão/tecido/tumor (%AI), por grama de órgão/tecido/tumor (%AI/g) e no sangue por mL e sangue total (%AI/mL e %AI sg total) a partir da média das contagens do padrão da atividade injetada, preparado em triplicata.



#### 6.14 Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.2. Os resultados foram expressos ou como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para os ensaios *in vivo* ou como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para os ensaios *in vitro*.

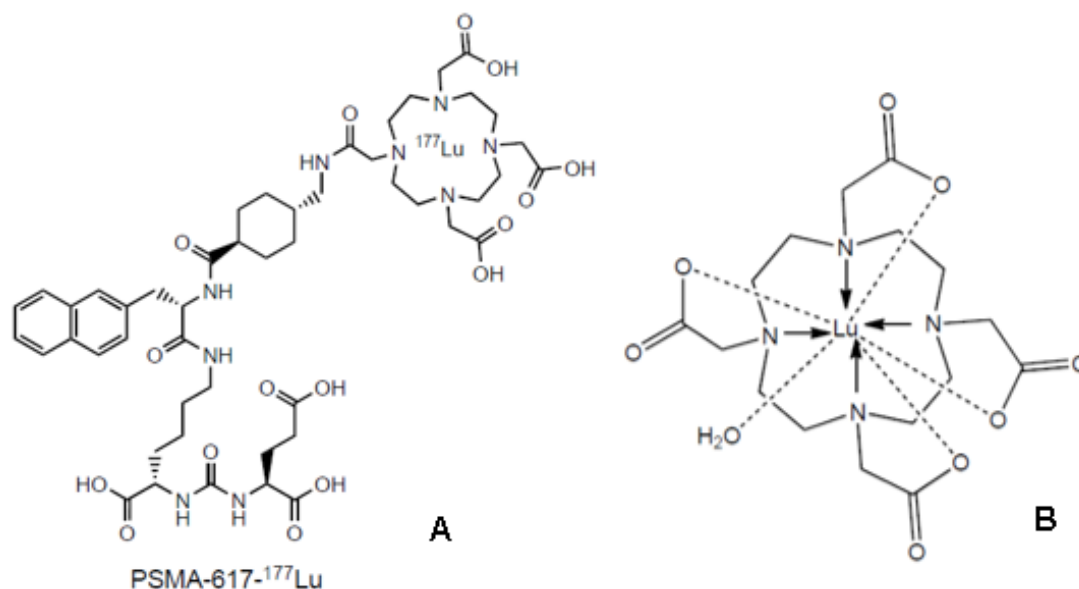
A análise estatística foi empregada com teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação dos pares, análise de variância ANOVA (uma ou duas vias), teste de Bonferroni para comparação de múltiplos grupos e método dos mínimos quadrados. As diferenças foram consideradas significativas quando o P valor foi inferior a 0,05.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Desenvolvimento da radiomarcagem do PSMA-617 com lutécio-177

A radiomarcagem do PSMA-617 com lutécio-177 se dá por um processo de quelação do grupo DOTA com o radioisótopo (figura 30 A). A coordenação do lutécio-177 com o quelante não é exatamente conhecida, todavia acredita-se que seja a mesma visualizada para DOTA com outros lantanídeos ( $\text{Ln}^{+3}$ ), cuja qual se dá pelas 4 aminas do macrociclo, juntamente com os 4 oxigênios das hidroxilas presentes nos ácidos carboxílicos e uma molécula de água (figura 30 B) (BANERJEE et al., 2015).

**Figura 30** – Fórmula estrutural do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  [A]. Representação estrutural do complexo formado pelo DOTA-Lu [B].



Fonte: autor da tese.

Inicialmente, realizou-se marcações com 10  $\mu\text{g}$  do peptídeo com 740 MBq (20 mCi) de lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda) com tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 para avaliar a influência do tempo (15, 30 e 45 minutos) e da temperatura (85, 90 e 95  $^{\circ}\text{C}$ ) na pureza radioquímica (PR). Desta forma foi possível

analisar a robustez da marcação, tendo como critério mínimo de aceitação 95% de PR. Os resultados deste estudo são expressos na tabela 5.

**Tabela 5** – Pureza radioquímica das marcações realizadas com 740 MBq (20 mCi) de lutécio-177 com carregador em diferentes tempos (15, 30 e 45 minutos) e temperatura (85 °C, 90 °C e 95 °C) com tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7. Valores expressos na forma de média e desvio padrão.

Tempo	Porcentagem de Pureza Radioquímica (%PR)		
	Temperatura		
	85 °C	90 °C	95 °C
<b>15 minutos</b>	95,6 ± 1,1	98,3 ± 0,2	98,4 ± 0,3
<b>30 minutos</b>	98,1 ± 0,3	99,4 ± 0,2	99,1 ± 0,3
<b>45 minutos</b>	98,5 ± 0,4	99,2 ± 0,1	99,0 ± 0,5

Fonte: autor da tese.

Em seguida, os resultados foram analisados estatisticamente, por ANOVA (dois fatores) e Teste Multiparamétrico de Bonferroni no qual se estabeleceu uma comparação entre as linhas, nesta análise o ponto 15 minutos a 85 °C não foi incluído, uma vez que a PR não foi superior à 95%.

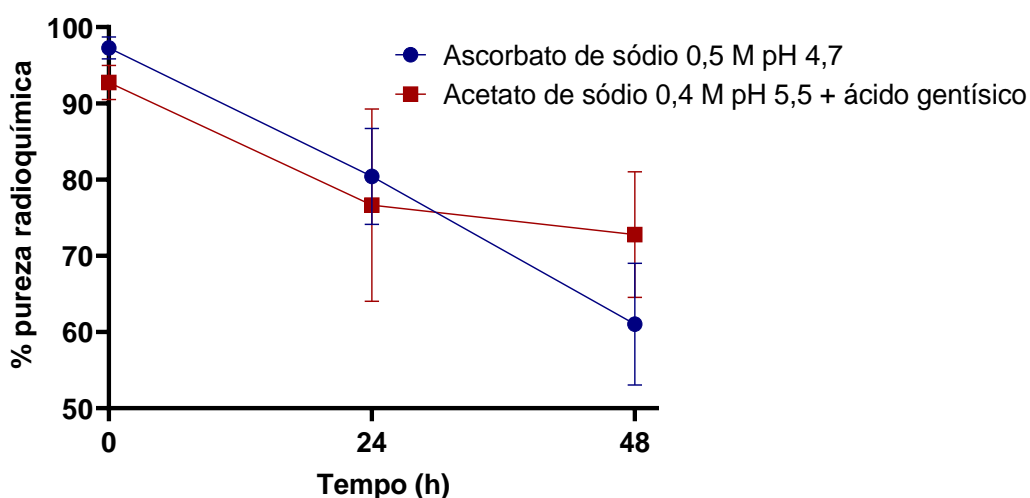
Observou-se que houve diferença estatística apenas nas marcações com duração de 30 minutos entre as temperaturas de 85 °C e 90 °C (P valor = 0,0499). É importante mencionar que com 30 minutos de reação em todas as faixas de temperatura trabalhadas foi atingida a pureza radioquímica mínima de 95%. As marcações piloto de produção foram realizadas na cela de lutécio, dentro da área produtiva do Centro de Radiofarmácia. Nesta cela o aquecedor de bloco está condicionado para manter a temperatura a  $90 \pm 2$  °C. Desta forma, foi estabelecido que a condição de marcação do PSMA-617 com lutécio-177 é a 90 °C por 30 minutos.

Foi estudado, em triplicata, o emprego do tampão acetato de sódio 0,4 M acrescido de 5 mg de ácido genticóico a cada 100 µL de tampão. As marcações de 10 µg de peptídeo com 740 MBq (20 mCi) de lutécio-177 resultaram em pureza radioquímica imediata de  $92,72\% \pm 2,24\%$ , de forma que o emprego do tampão acetato de sódio com ácido genticóico não proporcionou minimamente os 95% de PR mínima aceitáveis.

A análise de estabilidade demonstrou que com 24 horas ocorreu uma redução na pureza radioquímica do peptídeo marcado, de forma similar em ambos os sistemas tampões utilizados (figura 31).

**Figura 31** – Estabilidade em 24 horas e 48 horas do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em temperatura ambiente em sistema tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 e sistema tampão acetato de sódio 0,4 M pH 5,5 com ácido gentísico (n=3).

#### Estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em temperatura ambiente



Fonte: autor da tese.

Após 48 horas observou-se redução mais acentuada da estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em tampão ascorbato de sódio, embora a diferença estatística entre 24 e 48 horas não tenha sido significativa ( $P = 0,0691$ ).

É sabido que o ácido ascórbico possui  $pK_a$  de 4,2 com alta capacidade tamponante entre os pH 3,5 e 5,5 e atua como sistema tamponante até o pH 6,0 em concentrações superiores a 0,25 M. Em meio aquoso com pH superior a 4,2, uma hidroxila se encontra na forma de radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) que pode atuar como um quelante fraco, prevenindo a formação de lutécio coloidal [<sup>177</sup>Lu(OH)<sub>3</sub>]. Quando a radiomarcagem é realizada entre os pH 4,0 e 6,0, é desnecessária a adição de outro agente tamponante, como o acetato de sódio, o que reduz a osmolaridade do radiofármaco) (LIU, SHUANG et al., 2003).

Em 2012, grupo de pesquisadores do IPEN já havia testado e comprovado a eficácia do ácido gentísico e ácido ascórbico como mitigantes da radiólise (degradação química pelo efeito da radiação ionizante nas ligações químicas) em temperatura por até 72 horas do peptídeo derivado de bombesina

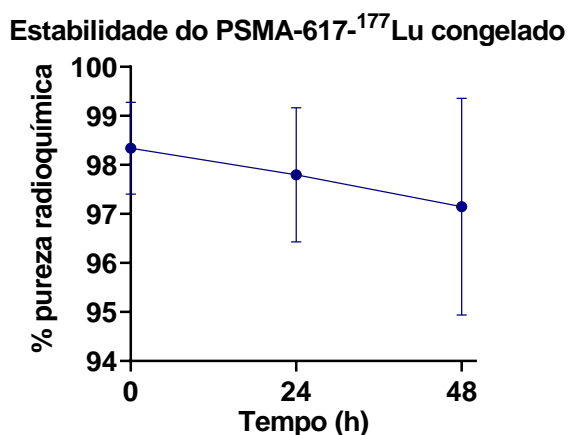
radiomarcado BEYG<sub>3</sub>-<sup>111</sup>In (PUJATTI, P.B. et al., 2012). No presente experimento, estas substâncias não demonstraram a mesma eficácia protetora, podendo tal fato ser justificado pela produção de radicais livres na água promovida pela emissão β<sup>-</sup> de até 492 KeV do lutécio-177 (WAHL et al., 1990).

Nas publicações internacionais que descrevem a preparação do radiofármaco para terapia bem como a sua aplicação em estudos clínicos, o aspecto de estabilidade é raramente observado, provavelmente pelo fato de que as longas distâncias relacionadas ao transporte do radiofármaco não sejam um problema a ser enfrentado.

O estudo de estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu sob congelamento foi uma opção deste trabalho, considerando-se as grandes distâncias impostas entre o centro produtor (IPEN) e as clínicas de medicina nuclear espalhadas por todo o Brasil.

O congelamento do radiofármaco mostrou-se uma alternativa viável para a manutenção da pureza radioquímica (figura 32). Após 24 horas e 48 horas, o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu permaneceu estável, desta forma foi adotada como condição de conservação o congelamento do produto radiomarcado.

**Figura 32** – Estabilidade em 24 horas e 48 horas do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu congelado em sistema tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 (n=3).



Fonte: autor da tese.

Em 2019, um grupo de pesquisadores avaliou a estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (80 MBq) em temperatura ambiente com diversos estabilizantes. Destacou-se o efeito protetor do ácido ascórbico, sob concentração de 3,5 mM, semelhante a metionina (3,5 mM) e etanol (10% v/v) (DE ZANGER et al., 2019). A

atividade de 80 MBq explorada pelos autores no trabalho supracitado, não afetou a estabilidade em temperatura ambiente do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu após 24 horas. Na presente tese, a marcação do radiofármaco com 740 MBq não se mostrou estável em temperatura ambiente, tal fato foi justificado pelo emprego de uma atividade de marcação 9,25 vezes superior. No presente trabalho, optou-se por utilizar um tampão ascorbato de sódio mais concentrado (0,5 M), para prevenção da radiólise nos lotes piloto de produção.

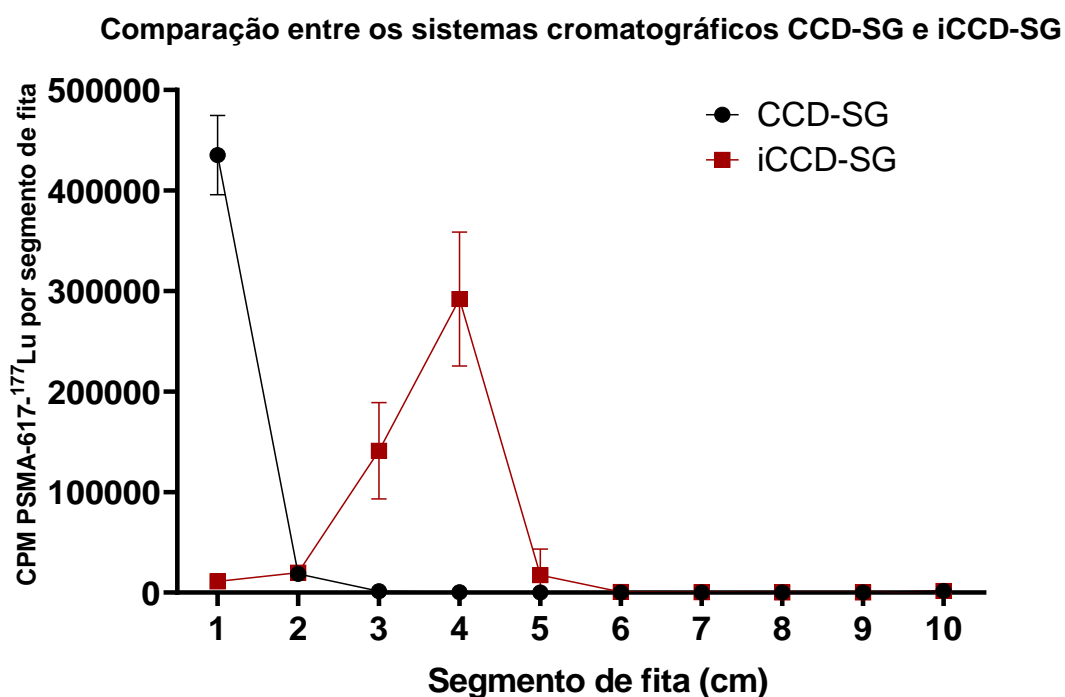
## **7.2 Desenvolvimento do método de cromatografia em camada delgada – sílica gel (CDD-SG), cromatografia instantânea em camada delgada – sílica gel (iCCD-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A análise da pureza radioquímica permite determinar, em porcentagem, a pureza de radiofármacos, bem como determinar e quantificar impurezas radioquímicas que podem ser potencialmente prejudiciais para o paciente. Esta análise é um atributo de qualidade definido pela farmacopeia brasileira e outros compêndios internacionais para a aprovação de lotes de produção de radiofármacos pelo controle de qualidade, a partir dos critérios de aceitação estabelecidos para o ensaio (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; DE BLOIS et al., 2019). É importante mencionar que estes critérios de aceitação foram baseados nos critérios adotados para o produto DOTATATO-<sup>177</sup>Lu no IPEN, uma vez que inexistente uma monografia estabelecida para o radiofármaco PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.

Com base nas metodologias de controle de qualidade de cromatografia em camada delgada em sílica gel (CCD-SG) e cromatografia instantânea em camada delgada em sílica gel (iCCD-SG) disponíveis na literatura, estudos foram conduzidos para identificar o fator de retenção ( $R_f$ ), para os quais levou-se em consideração resultados obtidos com outros derivados de peptídeo PSMA marcados com lutécio-177 (DASH et al., 2016; SILVA, 2017).

Comparou-se, em triplicata, o fator de retenção do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e do lutécio-177 livre nos dois sistemas de fitas com o tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0. No sistema CCD-SG o Rf do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi de 0,0 a 0,2 (figura 33), enquanto que no sistema iCCD-SG o Rf mostrou-se um pouco mais alongado (0,0 – 0,5).

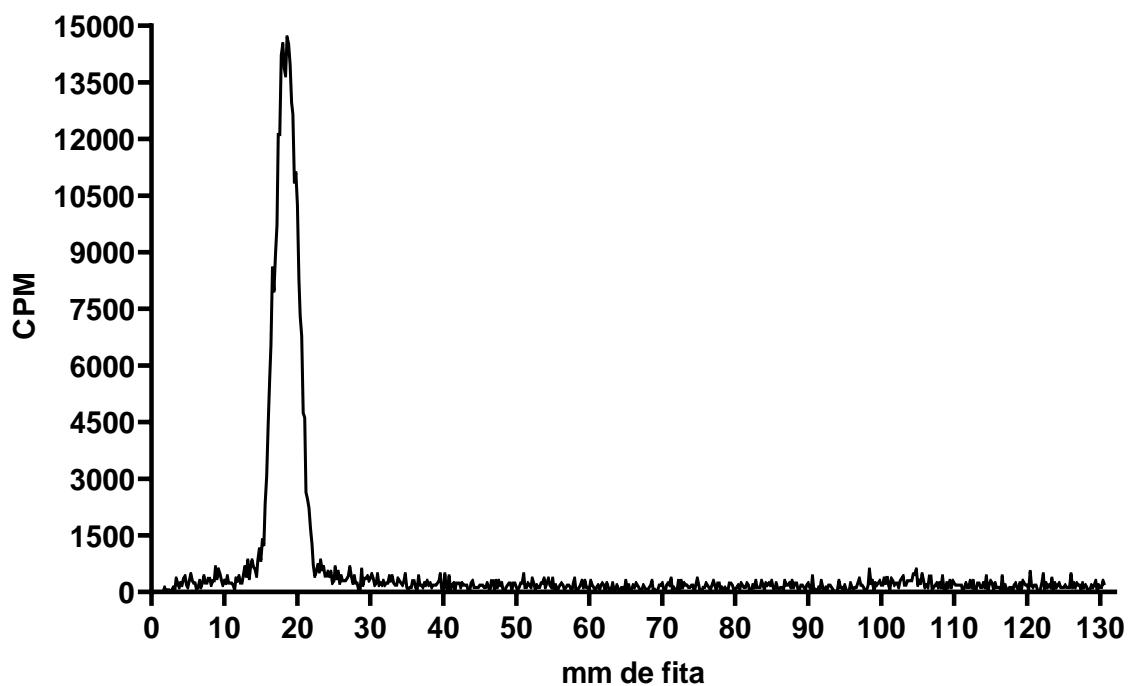
**Figura 33** – Comparação dos perfis cromatográficos do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em CCD-SG e iCCD-SG (n=3).



Fonte: autor da tese.

Contudo, a %PR foi semelhante,  $99,56\% \pm 0,11\%$  em CCD-SG e  $99,47\% \pm 0,16\%$  em iCCD-SG. O fator de retenção do lutécio-177 livre se revelou semelhante em ambos os sistemas (0,8 – 1,0). A separação entre as espécies radioativas foi mais efetiva no sistema CCD-SG (figura 34).

**Figura 34** – Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu ( $R_f=0,1$ ) em fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, em radiocromatógrafo.

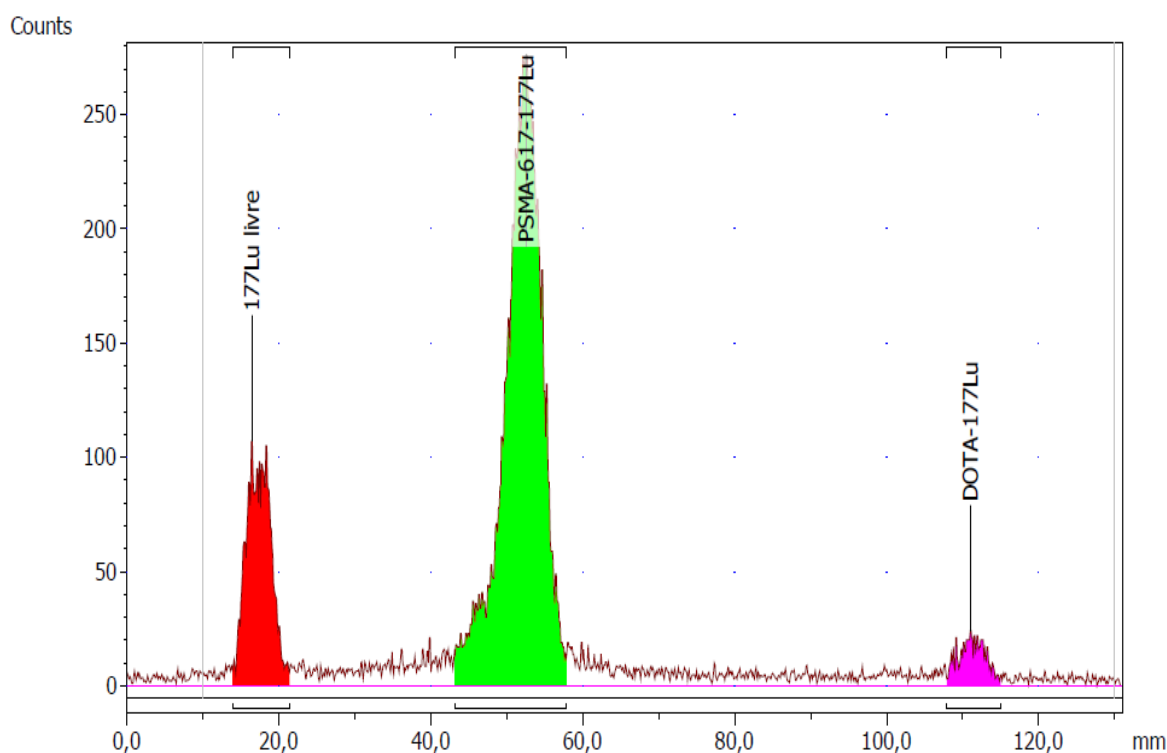


Fonte: autor da tese.



O sistema de fase móvel metanol:acetato de amônio 1 M pH 8,5 (1:1 v/v) demonstrou-se uma alternativa viável (figura 35). O lutécio-177 livre ao entrar em contato com o pH alcalino da fase móvel, converteu-se em  $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$  e permaneceu no segmento inicial aderido à sílica ( $R_f$  0,0 – 0,1), no ponto de aplicação, enquanto o PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  migrou até um terço da fita ( $R_f$  0,3 – 0,4) e o DOTA- $^{177}\text{Lu}$  proveniente de uma eventual ruptura da ligação entre o radiofármaco e o quelante migrou até o terço final da fita ( $R_f$  0,9 – 1,0). Os  $R_f$  foram confirmados a partir da análise em CCD de uma amostra contaminada com cloreto de lutécio-177 e DOTA- $^{177}\text{Lu}$ .

**Figura 35** – Perfil cromatográfico da mistura das espécies  $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$  ( $R_f$  0,0 – 0,1), PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  ( $R_f$  0,3 – 0,4) e DOTA- $^{177}\text{Lu}$  ( $R_f$  0,9 – 1,0) em CCD-SG em fase móvel metanol:acetato de amônio 1 M pH 8,5 em radiocromatógrafo.



Fonte: autor da tese.

Estes resultados obtidos pelas metodologias de CCD-SG se confirmam com os achados na literatura, apesar de relatarem propriedades de separação das espécies de forma semelhante para outros peptídeos radiomarcados com lutécio-177 (SILVA, 2017).

A fase móvel composta pelo tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 apresentou melhor efetividade na separação entre o  $^{177}\text{LuCl}_3$  e o PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$

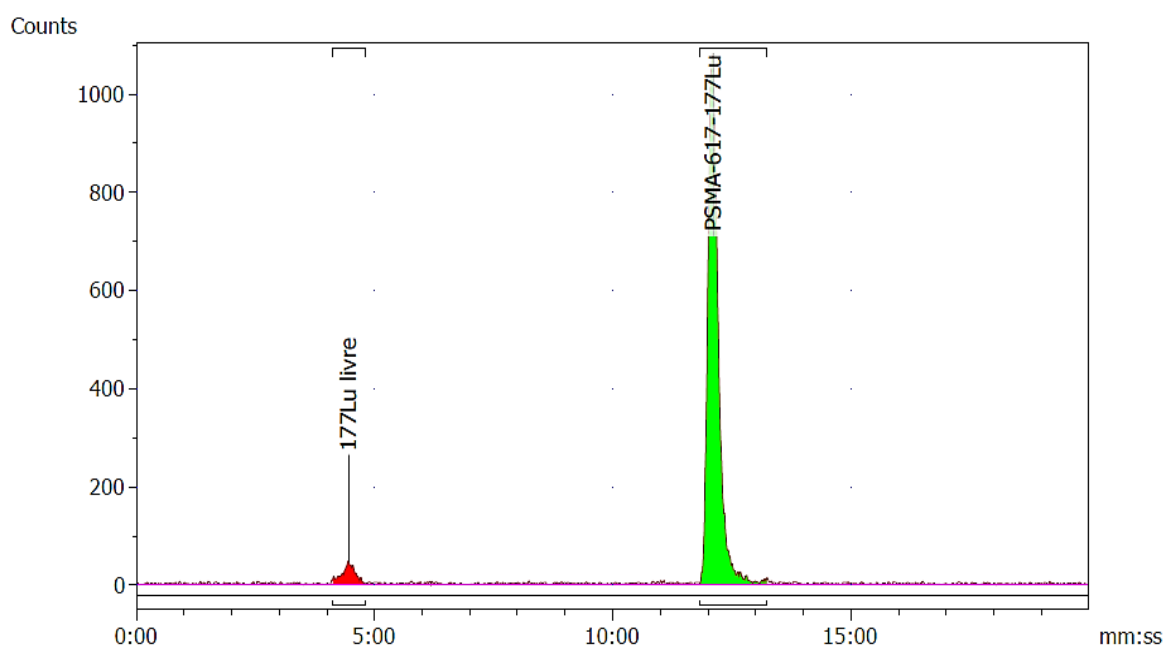
sendo o método de escolha para determinação da porcentagem de lutécio livre no radiofármaco.

Para a análise da pureza radioquímica por CLAE, consultou-se na literatura disponível algumas metodologias, principalmente as aplicadas ao PSMA e derivados. Os métodos estudados, embora se apresentassem promissores, utilizavam alto fluxo de solvente (entre 2,6 mL/min a 4 mL/min), o que reduziu o tempo de retenção entre as espécies radioativas contidas na amostra (EDER et al., 2014; SHARIFI et al., 2018). Todavia, estes métodos não poderiam ser utilizados uma vez que as colunas cromatográficas disponíveis não suportariam fluxos superiores a 1 mL/min.

Diante desta problemática, propôs-se um método com baixo fluxo, 0,4 mL/min, empregando gradiente de água/TFA 0,1% e acetonitrila e coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). É importante mencionar que a partir dos 14 minutos de corrida cromatográfica no sistema descrito iniciou-se o reequilíbrio para a próxima injeção de amostra.

Neste sistema cromatográfico proposto, o  $^{177}\text{LuCl}_3$  apresentou tempo de retenção (TR) de 4,27 minutos (adicionado como contaminante após a radiomarcagem), distante do TR exibido pelo PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  de 12,07 minutos, sendo possível identificar a presença ou ausência de cloreto de lutécio-177 livre após uma marcação (figura 36).

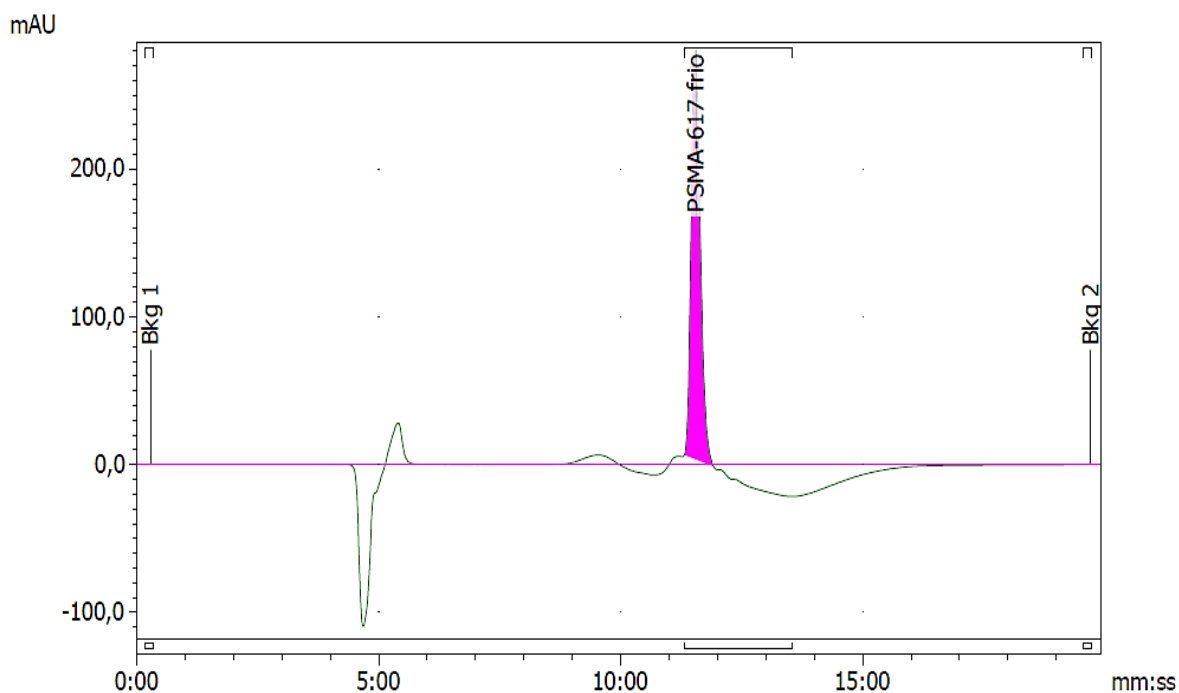
**Figura 36** – Radiocromatograma de CLAE de uma amostra de PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  (TR 12,07 min) contaminada com  $^{177}\text{LuCl}_3$  (TR 4,27 min), em coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), gradiente de água/TFA 0,1% e acetonitrila. (0-2min 17% acetonitrila; 2-5,99min 30% acetonitrila; 6-20min 17% acetonitrila).



Fonte: autor da tese.

Pode-se perceber neste sistema que houve um pequeno atraso no TR do PSMA-617 marcado (12,07 minutos, figura 35) em relação ao não marcado (11,33 minutos, figura 37).

**Figura 37** – Cromatograma de CLAE em detector UV do PSMA-617 “frio” com TR de 11,33 em coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm).



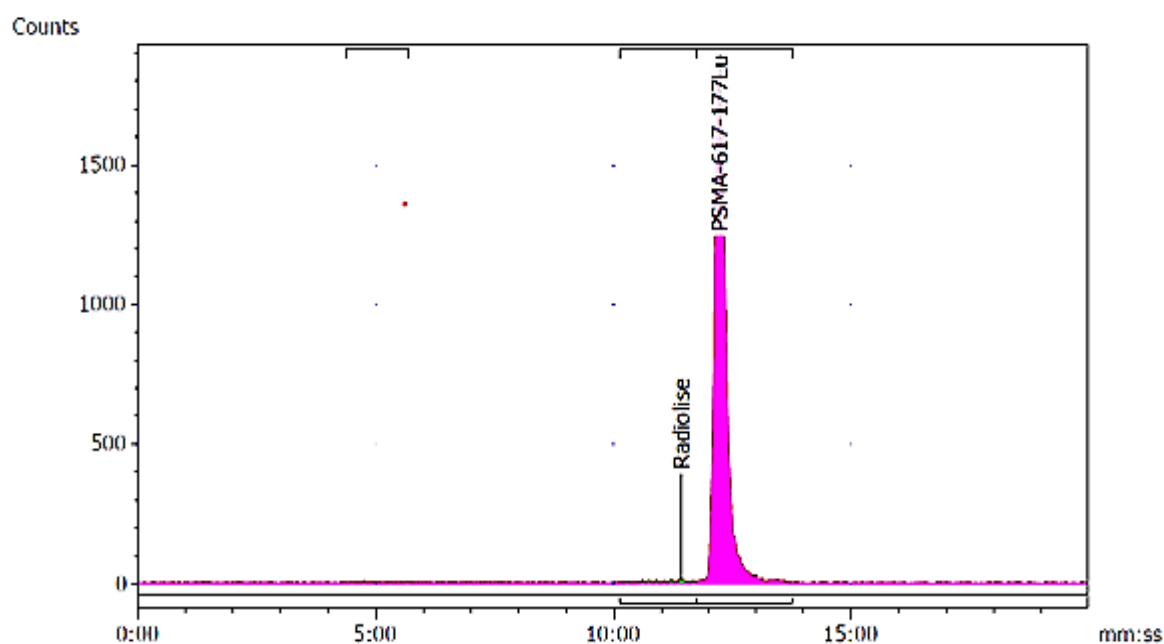
Fonte: autor da tese.

Entretanto, é importante mencionar que o sistema de detecção de radiação encontra-se instalado após a unidade de detecção UV/Vis (ultravioleta/luz visível) que identificou o PSMA-617 não marcado.

Este sistema mostrou-se capaz de apontar contaminantes e/ou produtos de degradação, por exemplo, em uma marcação que apresentou pureza radioquímica inferior a preconizada (95%) pode-se visualizar outras espécies radioativas presentes no produto final.

Na figura 38, identificou-se um pico de eventual produto de degradação em decorrência da radiólise com TR de 11,26 minutos (2,12% da área). A %PR atribuída ao PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi de 96,5%. Este mesmo produto analisado em CCD-SG resultou em 99,39% de PR. Pequenos picos em baixa porcentagem, localizados próximos ao pico de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, aqui denominados como produtos secundários, também foram observados em outros peptídeos marcados com lutécio-177 (DE ZANGER et al., 2019; GHOSH et al., 2019; MAUS et al., 2014). O método por CLAE se mostrou importante pela capacidade de visualizar a existência de produtos secundários, mesmo dentro dos limites mínimos de %PR estabelecidos e que não seriam identificados por CCD-SG.

**Figura 38** – Radiocromatograma de uma amostra de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e um pico de produto de degradação (radiólise) não identificado, antes do pico de PSMA-617.



Fonte: autor da tese.

Todavia, se fez necessário comparar os resultados de %PR obtidos com ambos os métodos. Neste sentido, em um total de 12 marcações a pureza radioquímica foi verificada por CCD-SG (tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0) e CLAE e os resultados %PR foram analisados estatisticamente, por meio do teste t de Student que demonstrou que os achados de %PR não foram estatisticamente diferentes ( $P = 0,2596$ ). Deste modo, apesar do CCD-SG não possibilitar a quantificação de espécies secundárias ou produtos de degradação, servindo

apenas para identificar a porcentagem de lutécio-177 livre, a CLAE permitiu confirmar que as %PR de todos os lotes produzidos atenderam ao critério de aceitação proposto ( $\geq 95\%$ ), ou seja, as porcentagens de impurezas não identificadas no CCD-SG foram baixas em todas as marcações, não influenciando na aprovação dos lotes (tabela 6).

**Tabela 6** – Análise comparativa da porcentagem de pureza radioquímica (%PR) entre os métodos de CCD-SG e CLAE.

<b>Análise comparativa da %PR entre os métodos de CCD-SG e CLAE</b>	
<b>CCD-SG</b>	<b>CLAE</b>
98,83	98,02
99,39	96,5
99,02	99,71
98,97	99,19
99,47	100
99,65	99,33
99,56	99,67
99,54	100
99,23	99,22
99,78	99,52
99,25	98,86
99,43	98,43

Fonte: autor da tese.

Contudo, a utilização do CLAE foi capaz de apontar e quantificar produtos de degradação que dificilmente seriam identificados por CCD-SG, sendo o método de escolha, especialmente na fase de desenvolvimento do radiofármaco e, principalmente, para avaliar a estabilidade do mesmo frente às condições de armazenamento estabelecidas.

Desta forma, com base nos resultados discutidos no estudo de desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica, concluiu-se que os sistemas cromatográficos de CCD-SG e CLAE estudados apresentaram boa

resolução e separação das espécies  $^{177}\text{LuCl}_3$  e PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$ , sendo possível empregá-los para a determinação da pureza radioquímica deste radiofármaco.

### 7.3 Desenvolvimento de kit de PSMA-617 para pronta marcação

A atividade de produzir um radiofármaco deve respeitar a análise de gerenciamento de risco da qualidade que visa adotar medidas técnicas e procedimentos para mitigar possíveis contaminações cruzadas e desvios de qualidade em geral (BRASIL, 2019a; BRAZIL, 2019b).

O PSMA-617, como matéria-prima ou insumo farmacêutico ativo (IFA), encontra-se na forma de pó liofilizado devendo ser conservado em freezer (0 °C a -20 °C) para manter a sua estabilidade. A sua reconstituição deve ser realizada em temperatura ambiente com água ultrapura (1 mg/mL), com a maior brevidade possível, para evitar a perda de estabilidade e/ou a possibilidade de contaminação. Nesta mesma etapa deve ocorrer o fracionamento do peptídeo solubilizado, de forma que cada frasco ou microtubo contenha a quantidade suficiente para a preparação de um lote de PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  considerando-se a calibração das doses para 48 horas após a produção. A estabilidade do peptídeo reconstituído e armazenado sob congelamento deve ser determinada como requisito de qualidade.

Além do peptídeo, para a marcação utiliza-se o tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7, cuja estabilidade em geladeira após preparo é de cerca de 2 meses. Caso seja preparado e acondicionado em um único frasco, em cada radiomarcação se faria necessária a abertura do frasco contendo o tampão de marcação e do frasco ou microtubo com o peptídeo. Estas etapas de abertura e manipulação dos frascos e dos materiais contidos representariam um risco de contaminação (cruzada e/ou microbiana).

Alternativamente, a preparação de um kit para marcação, a partir da mistura do peptídeo fracionado e do tampão de marcação, previamente preparados, reduz o número de etapas envolvidas no processo de produção e, ao mesmo tempo, minimiza o risco de contaminação. O prazo de validade do kit pode ser determinado por meio de estudo de estabilidade a partir do armazenamento sob congelamento.

Para este estudo de estabilidade, a composição do kit de marcação foi avaliada em escala reduzida, em amostras contendo 60  $\mu\text{L}$  de tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 e 10  $\mu\text{g}$  de PSMA-617 e congeladas ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ). Após os tempos de 1, 2, 5, 7 e 12 meses, cada amostra de kit foi marcada com lutécio-177 e a estabilidade do kit foi avaliada a partir do resultado da pureza radioquímica da marcação (%PR) em CLAE (tabela 7).

**Tabela 7** – Análise da estabilidade do kit de PSMA-617 avaliada a partir do resultado de pureza radioquímica da marcação (%PR).

<b>Pureza radioquímica da marcação do kit de PSMA-617 armazenado sob refrigeração por até 12 meses</b>			
<b>Mês</b>	<b>% PR</b>	<b>% <math>^{177}\text{LuCl}_3</math> livre</b>	<b>% produtos secundários</b>
1	99,37	0,63	0
2	99,67	0,33	0
5	99,14	0,86	0
7	95,78	2,99	1,23%
12	97,47	0,52	1,53%

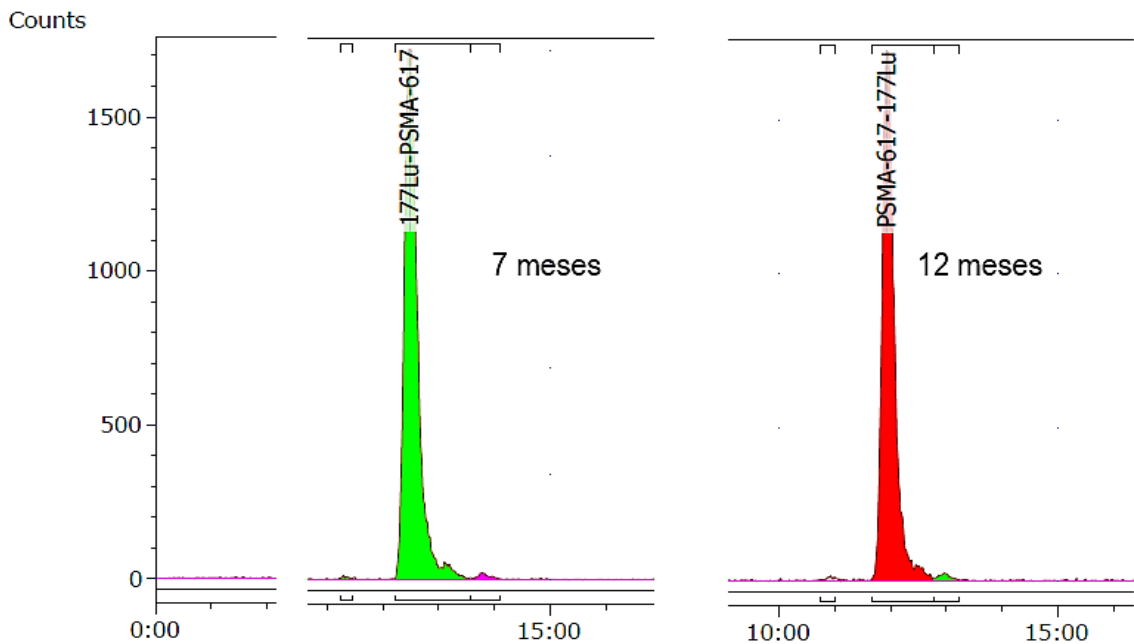
Fonte: autor da tese.

Por meio desta análise foi possível verificar que ao longo de 12 meses de armazenamento do kit de marcação nenhuma das marcações apresentou pureza radioquímica inferior a 95%.



Os cromatogramas de CLAE indicaram aos 7 e 12 meses a presença de produtos secundários que representaram 1,23% e 1,53%, respectivamente (figura 39). Embora não fosse possível determinar a natureza da sua formação (degradação natural do peptídeo ou radiólise) a presença de produtos secundários é indesejável, uma vez que poderiam representar um risco para a saúde de pacientes que viessem a receber as doses de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.

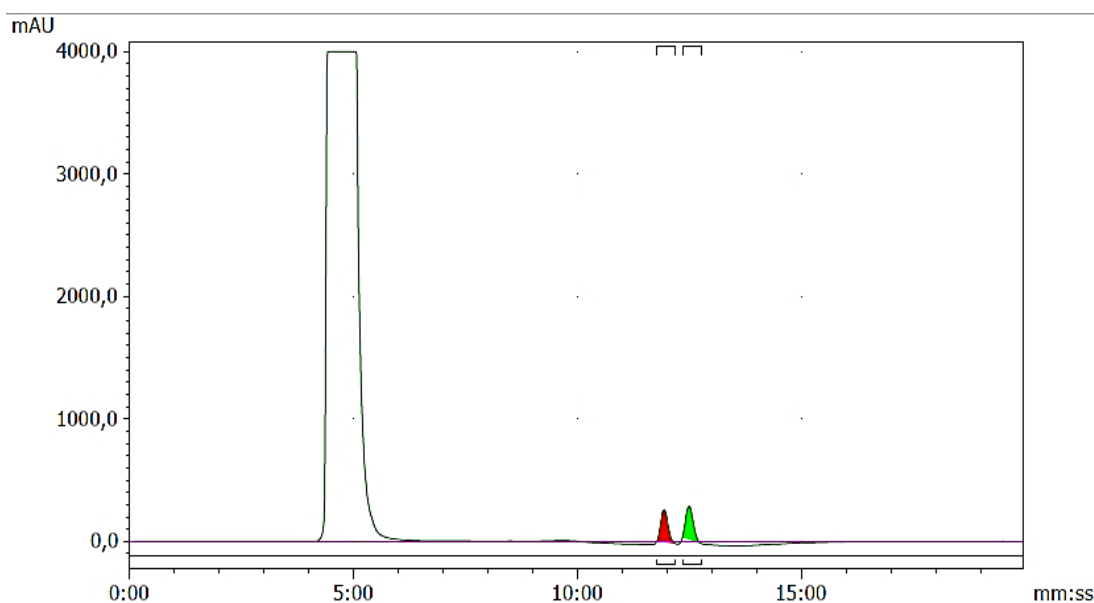
**Figura 39** – Recorte dos cromatogramas obtidos por CLAE das marcações com lutécio-177 de amostras de kit de PSMA-617 armazenadas por 7 e 12 meses sob congelamento demonstrando a presença de picos secundários.



Fonte: autor da tese.

Com dois meses de kit formulado e armazenado sob congelamento observou-se no CLAE-UV a presença de mais de um pico (figura 40), sugerindo a presença de espécie de degradação. Entretanto, a presença do ascorbato de sódio prejudicou a verificação dos picos de proteína e a estabilidade do kit, nos meses subsequentes, foi avaliada apenas pelo CLAE da radiomarcagem.

**Figura 40** – Perfil de CLAE/UV-Vis de dois picos após dois meses de conservação do kit de PSMA-617 em tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 em frasco único.

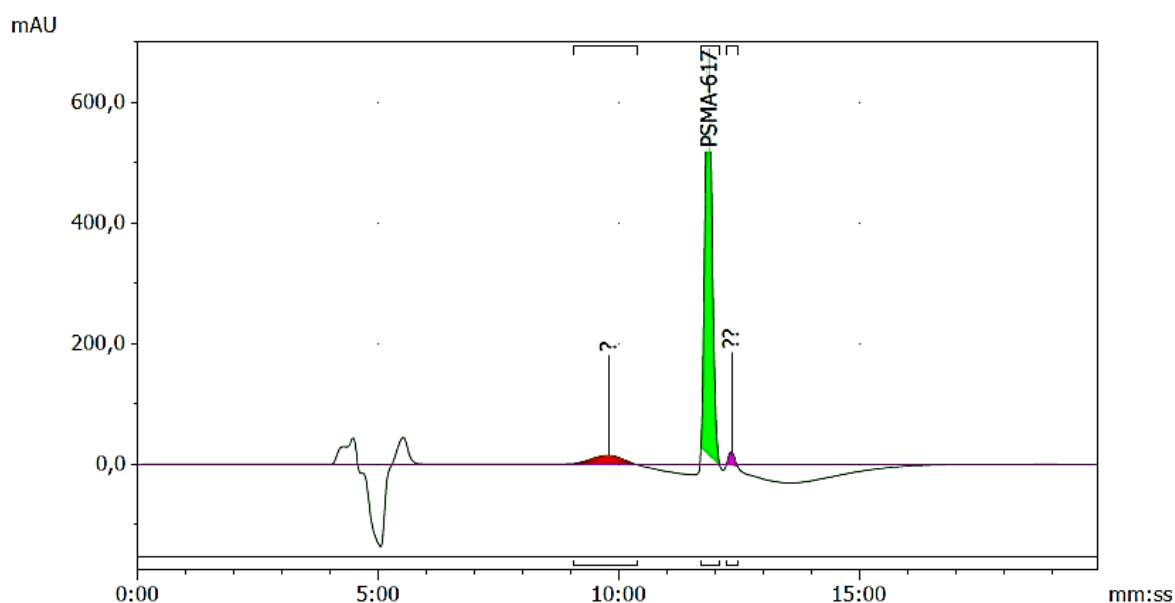


Fonte: autor da tese.

No estudo de escalonamento, que foi realizado com a proposta de kit separado (peptídeo congelado em um frasco e tampão congelado em outro), não foi visualizado pico secundário pela técnica de CLAE. Atribuiu-se o primeiro pico, destacado em vermelho, ao PSMA-617 com TR de 11,56 minutos (mesmo TR observado na figura 40), o segundo pico, com TR de 12,30 minutos não foi identificado.

Em virtude do surgimento de um novo pico na amostra do kit, uma amostra de PSMA-617 (previamente dissolvida em água purificada) congelada anteriormente a data de preparo do kit, foi analisada (figura 41) e exibiu o pico do peptídeo com pureza de cerca de 90%. Foram observados outros dois picos secundários, o primeiro com TR de 9,47 minutos e o segundo com TR de 12,26 minutos, ambos não identificados. Acreditou-se que o segundo pico seja o mesmo visualizado na figura 40, embora em menor proporção, dado ao tempo de retenção próximo.

**Figura 41** – Perfil de CLAE/UV-Vis - Acompanhamento da estabilidade do PSMA-617 não marcado dissolvido em água purificada, após 2 meses de conservação sob congelamento.



Fonte: autor da tese.

A manutenção do tampão ascorbato se revelou mais estável quando congelado, uma vez que a conservação em refrigeração foi de, no máximo, 60 dias. Após este período, o tampão que possui cor levemente amarelada, passou a apresentar coloração amarelada acentuada, sem alteração do pH e as marcações resultaram em pureza radioquímica de  $95,1\% \pm 2,4\%$ .

Com este estudo concluiu-se que a proposta de um kit em frasco único não se mostrou a opção mais adequada, pelo surgimento de picos secundários tanto no cromatograma, quanto no radiocromatograma. Em contrapartida, o kit composto por dois frascos, sendo um o peptídeo congelado em água e o segundo

contendo o tampão de marcação resfriado, revelou-se mais conveniente por não comprometer a qualidade do produto final.

#### 7.4 Escalonamento de lotes piloto de produção de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu

O escalonamento ou *scale-up* da produção de um fármaco, deve ser minuciosamente estudado para assegurar os mesmos resultados de pureza, rendimento de produção e que seja capaz de reproduzir os efeitos biológicos encontrados quando produzido em escala de bancada, garantindo assim a eficácia clínica (ALLEN JR, 2013). Para o caso dos radiofármacos, este *scale-up* pode se dar pela elevação do volume final do produto, ou seja, pelo efetivo aumento de escala de produção com o aumento da atividade da radiomarcação. Contudo, os radiofármacos podem sofrer radiólise, sendo necessário estudar o impacto na estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (FARSTAD; PEÑUELAS, 2010).

**Tabela 8** – Condições de marcação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e características do produto acabado para as etapas de *scale-up* de produção.

<b>Atividade de lutécio-177 (GBq)</b>	<b>Massa de peptídeo (µg)</b>	<b>Volume de tampão (mL)</b>	<b>Volume de NaCl 0,9% (diluição final)</b>	<b>Concentração radioativa final (GBq/mL)</b>	<b>Volume aproximado (mL) de uma dose de 9,25 GBq</b>
9,25	125	2,0	5,0	1,85	5,0
18,5	250	3,0	10,0	1,85	5,0
37	500	5,0	10,0	3,70	2,5

Fonte: autor da tese.

As condições de marcação empregadas no IPEN na produção rotineira do DOTATATO-<sup>177</sup>Lu foram utilizadas para servir de ponto de partida na definição da concentração radioativa final (tabela 8). A capacidade tamponante do tampão ascorbato de sódio empregado determinou o volume mínimo de tampão a ser empregado nos procedimentos de marcação, considerando-se o volume de

solução ácida de cloreto de lutécio-177, tanto maior quanto maior a atividade de marcação.

Em todas as marcações, o peptídeo foi adicionado ao volume determinado de tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 em um frasco tipo penicilina estéril e apirogênico, na antecâmara de preparação para as produções dos radiofármacos, sob fluxo laminar, simulando a condição do kit para marcação. O frasco foi arrolhado e transferido para o interior da cela de produção, onde foi adicionada ao frasco a alíquota de lutécio-177 correspondente à atividade planejada.

Posteriormente, o frasco foi colocado em um aquecedor de bloco e a reação ocorreu por 30 minutos a  $90 \pm 2$  °C. Utilizou-se agulha de respiro com filtro durante a reação. Logo após o término da reação, o frasco foi retirado do aquecimento e adicionou-se 0,5 mL de solução de ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) 4 mg/mL e completou-se o volume com solução salina 0,9% estéril de acordo com a tabela 6. Em seguida, o volume final foi filtrado em membrana 0,22 µm em um frasco estéril e sob vácuo.

Após a filtração, as doses foram fracionadas com calibração para 48 horas (9,25 GBq ou 250 mCi), sendo considerado como uma dose padrão de 7,4 GBq (200 mCi) (EMMETT et al., 2017). A atividade específica de marcação de 74 MBq/µg foi baseada em artigo científico que relatou a produção de uma dose terapêutica (7,4 GBq) sob esta atividade específica.

As produções de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu referenciadas na tabela 7 foram aprovadas (%PR superior a 95%) pelos controles de qualidade dos respectivos grupos de trabalho antes da administração das doses nos pacientes, sob uso compassivo.

Por meio de doações de lutécio-177 isento de carregador da NTP (África do Sul) em 2017 e mais tarde, a partir de 2018, da INM (Rússia) fruto de um acordo bilateral de comércio entre o Brasil e a Rússia, foi possível realizar o estudo de escalonamento dos lotes piloto de produção.

Desta forma, o *scale-up* dos lotes que corresponderam entre uma a quatro doses terapêuticas foi realizado com atividade específica definida em 74 MBq/µg (2,0 mCi/µg)  $\pm$  5%. As marcações foram realizadas dentro da faixa de 77,93  $\pm$  5,05 MBq/µg (2,11  $\pm$  0,14 mCi/µg), o que representou uma variação de 6,49%.

Este estudo ainda permitiu avaliar a estabilidade do PSMA-617 marcado com alta atividade nos tempos de 24 e 48 horas após a produção.

Foram realizadas um total de 13 marcações com alta atividade, 5 com lutécio proveniente da NTP (África do Sul) e 8 com lutécio-177 proveniente da INM (Rússia). Com o lutécio-177 da NTP (África do Sul), foi produzido um lote com faixa teórica de 9,25 GBq (250 mCi) e outros quatro lotes na faixa teórica de 18,5 GBq (500 mCi) cada. Os resultados dos *scale-up* de marcação estão representados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Resultado do controle de pureza radioquímica imediata dos lotes piloto de produção (*scale-up*) organizados de acordo com a ordem cronológica das produções.

Atividade (GBq)	Fornecedor de <sup>177</sup> Lu	Massa de PSMA-617 (µg)	Atividade específica (MBq/µg)	Controle de qualidade imediato (% PR)	
				CCD	CLAE
9,4	NTP	125	74,9	98,8	98,0
18,9	NTP	250	75,8	99,4	96,5
18,1	NTP	250	72,2	99,0	99,7
19,7	NTP	250	78,9	99,0	99,2
20,3	NTP	250	81,4	99,5	100
5,4	INM	76	71,1	99,9	99,3
16,1	INM	200	80,7	99,6	99,7
26,5	INM	358	74,0	99,5	100
38,7	INM	500	77,4	99,2	99,2
40,9	INM	500	81,8	99,8	99,5
22,1	INM	250	88,2	99,2	98,7
10,4	INM	125	84,8	99,4	98,4
21,6	INM	300	72,0	98,8	98,7

Fonte: autor da tese.

Parte dos lotes produzidos geraram doses terapêuticas que foram encaminhadas para o Hospital de Amor (Barretos, São Paulo) para serem administradas em pacientes sem outra opção terapêutica para o tratamento do

câncer multimetastático de próstata (uso compassivo). Estas doses continham entre 8,21 e 9,25 GBq (calibradas para 24 e 48 horas respectivamente).

Observou-se neste piloto de produção que as produções entre uma a quatro doses terapêuticas (7,4 a 37 GBq) resultaram em pureza radioquímica superior a 95% (tabela 7), estes resultados sugeriram que seria possível aumentar a produção minimamente até 74 GBq (2 Ci) por lote.

Esta condição de marcação estabelecida para o lutécio-177 isento de carregador não se mostrou viável para o lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda). Ao término da produção de 7,4 GBq com 100 µg de PSMA-617 a pureza radioquímica foi de 88,4%, abaixo dos 95% preconizados. Este resultado demonstrou que a utilização do lutécio-177 com carregador em uma radiomarkação carecia de avaliação prévia da molaridade das espécies envolvidas (PSMA-617 e lutécio-176 não radioativo presente no lutécio-177). Neste experimento, em particular, foram utilizados 95,96 nmoles de PSMA-617 (100 µg) e 106,62 nmol de lutécio-176 (não ativado contido em 7,4 GBq). Tal fato conferiu uma razão molar de 0,89 (moles de peptídeo por moles de lutécio-176), o que justificou a pureza radioquímica insuficiente.

Foram estudadas três razões molares diferentes (PSMA-617/<sup>176</sup>Lu) 1,5/1, 1,75/1 e 2,1/1 (tabela 10), sendo esta última empregada nas produções rotineiras de DOTATATO-<sup>177</sup>Lu pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN. Os moles de lutécio-176 estavam descritos em certificados de produção do lutécio-177 pela empresa IDB, Holanda.

**Tabela 10** – Avaliação do impacto da razão molar de marcação, em moles, de PSMA-617 e lutécio-177 com carregador expressos em porcentagem de pureza radioquímica (% PR) e atividade específica (A.E.) com desvio padrão (n=3).

Razão Molar	% PR	A.E. em MBq/µg (mCi/µg)
0,89	88,4	74,0 (2,0)
1,5	97,2 ± 3,9	52,6 ± 1,4 (1,4 ± 0,1)
1,75	99,7 ± 0,1	47,4 ± 0,8 (1,3 ± 0,1)
2,1	99,2 ± 0,3	38,0 ± 8,5 (1,0 ± 0,2)

Fonte: autor da tese.

Pôde-se observar que as marcações de PSMA-617 que necessitavam respeitar uma razão molar específica, no caso 2,1, resultariam em um maior consumo de peptídeo por marcação e conseqüentemente uma menor atividade específica. A razão molar de 1,75 promoveu o mesmo rendimento radioquímico, com economia do peptídeo, quando comparada com a razão 2,1.

A relação molar 2,1/1 (PSMA-617/<sup>176</sup>Lu) escolhida foi considerada superior com relação a outros experimentos existentes na literatura científica consultada. Em um dos trabalhos encontrados, foi reportado que a razão adequada de PSMA-617/lutécio-177 foi de 10/1, com uma atividade específica 19,95 MBq/μg (0,53 mCi/μg), sob esta condição não houve necessidade de purificação (SHARIFI et al., 2018). Outro trabalho, realizado na Índia, apontou que a relação molar de 5,32 foi satisfatória e dispensou a etapa de purificação com cartucho de C18 para elevação da pureza radioquímica, neste caso a atividade específica de marcação foi de 27,38 MBq/μg (0,74 mCi/μg) (NANABALA et al., 2016).

É importante salientar que a condição de marcação que emprega 2,1 moles de PSMA-617 para 1 mol de lutécio-176, extraída das condições de marcação do DOTATATO-<sup>177</sup>Lu, não foi experimentada em estudos de estabilidade com marcações correspondentes a doses terapêuticas.

O emprego do lutécio-177 com carregador apresenta duas principais desvantagens: possibilidade de variação da atividade específica de marcação entre diferentes lotes e maior consumo de peptídeo. Tais fatos justificaram o estudo de escalonamento dos lotes piloto de produção com lutécio-177 isento de carregador.

O estudo de *scale-up* dos lotes piloto de produção de 7,4 GBq a 37 GBq transcorreu conforme esperado, com pureza radioquímica sempre superior a 95%, o que demonstrou ser acertada a escolha do tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7, bem como as diluições pós-marcação e concentração radioativa final. Os ensaios de controle de qualidade microbiológico, radioquímico e radionuclídico atestaram a qualidade do produto, frente aos critérios de aceitação estabelecidos. O ensaio simulando condições de transporte comprovaram a estabilidade do radiofármaco, possibilitando o transporte para regiões distantes do local de produção e conseqüente exequibilidade de produção lotes piloto para atender futuros ensaios clínicos do radiofármaco.



## 7.5 Avaliação do controle de qualidade microbiológico do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu

Ao término da marcação e fracionamento de cada um dos lotes de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu produzidos, foi encaminhada uma amostra para a realização do controle de qualidade microbiológico (esterilidade e endotoxinas). Todos os lotes foram aprovados no controle de esterilidade (ausência de crescimento de microrganismos) e de endotoxinas bacterianas (menor do que 175 UE/V, onde V representa o volume máximo que poderia ser injetado em um paciente).

Os controles de qualidade realizados nas amostras de radiofármaco indicaram que os procedimentos de fracionamento do peptídeo, preparação da solução tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 e produção cumpriram os requisitos estabelecidos pelas Boas Práticas de Fabricação.

## 7.6 Avaliação do controle radionuclídico do lutécio-177 adquirido da Rússia (INM) e da África do Sul (NTP)

O radioisótopo lutécio-177 adquirido da África do Sul (NTP) e Rússia (INM) foi avaliado de acordo com os procedimentos internos estabelecidos pelo Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN para determinação de pureza radionuclídica, em amostras do radiofármaco (Tabela 11).

**Tabela 11** – Resultados dos controles de qualidade de pureza radionuclídica do lutécio-177 proveniente dos fornecedores INM (Rússia) e NTP (África do Sul) expressos em porcentagem de pureza radionuclídica (%PRn).

Fornecedor	% PRn	<sup>175</sup> Yb (contaminante)	<sup>177m</sup> Lu (contaminante)
NTP	99,9	Não detectado	Não detectado
NTP	99,9	Não detectado	Não detectado
NTP	99,9	Não detectado	Não detectado
INM	99,9	Não detectado	0,0090%
INM	99,9	Não detectado	Não detectado
INM	99,9	Não detectado	Não detectado
INM	99,9	Não detectado	0,0092%

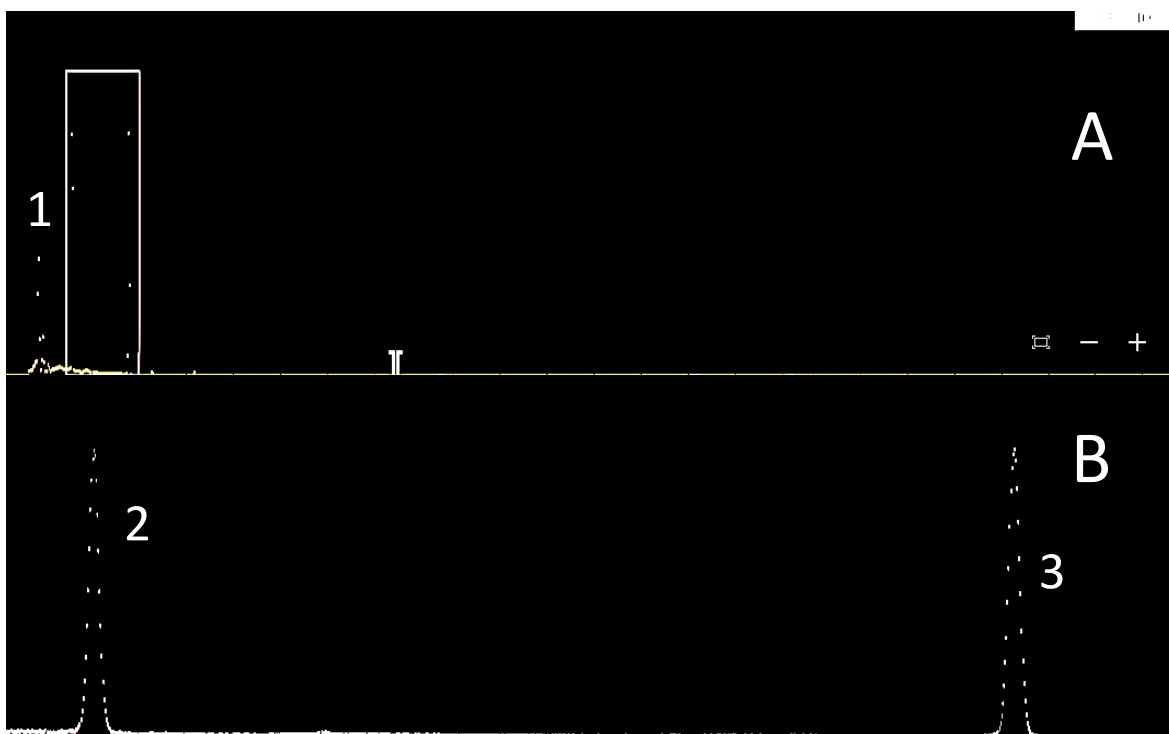
Fonte: autor da tese.

Todos os lotes de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu analisados pelo detector de germânio ultrapuro foram aprovados, com base nos mínimos de critérios de aceitação estabelecidos pela Farmacopeia Europeia 10 (2020), pois atingiram a pureza radionuclídica mínima de 99,9%. Nestas análises não foi identificada presença de itérbio-175.

O lutécio-177 metaestável, um contaminante estabelecido pela Farmacopeia Europeia 10 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2020) foi encontrado em apenas dois lotes do radiofármaco, dentro do limite estabelecido (até 0,07%).

De acordo com a monografia do lutécio-177 supracitada, devem estar presentes os principais picos energéticos de emissão gama do radioisótopo, em 112 e 208 keV, sendo este último o principal (figura 42).

**Figura 42** – Espectro do lutécio-177 com os picos de energia de 112 e 208 keV. Em [A] visualiza-se o pico de aproximadamente 53 keV (1) (emissão raio X) e dentro do quadro branco as emissões gama em 112 e 208 keV. Em [B] consta a ampliação da região dos picos 112 (2) e 208 (3) keV.



Fonte: autor da tese.

## 7.7 Estudos de estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em condição de transporte

Os radiofármacos podem sofrer degradação por meio da radiólise, que consiste na ruptura de ligações químicas por radiações com energia suficiente para tal. O efeito da radiólise está vinculado diretamente à atividade específica do produto acabado, da meia-vida do radioisótopo, da energia emitida e do tipo de emissão. As radiações particuladas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) promovem mais radiólise do que as emissões gama em função do curto alcance e da transferência de energia (FARSTAD; PEÑUELAS, 2010).

A radiólise pode ser minimizada pelo congelamento do radiofármaco, situação na qual será minimizado o trânsito dos radicais produzidos pela radiação  $\beta$  na água (WAHL et al., 1990). Outra forma de minimizar a degradação do radiofármaco é por meio da utilização de agentes antioxidantes “quenchers” também uma ferramenta a ser explorada para mitigação da radiólise (REILLY, 2010).

O estudo de estabilidade de radiofármacos terapêuticos é de extrema importância, tendo em vista o efeito de auto-radiólise inerente ao radionuclídeo  $\beta$ -emissor (lutécio-177). Para garantir a estabilidade necessária para comercialização do radiofármaco para as diferentes regiões do país, diversos fatores que contribuem para estabilidade, diminuindo o efeito da radiólise, podem ser considerados, como o efeito da redução de temperatura (congelamento) (MASSICANO, 2016).

O emprego de embalado contendo gelo seco para transporte de radiofármacos terapêuticos visa garantir que o radiofármaco mantenha-se congelado por até 48 horas após o seu envase. Para tanto o frasco contendo o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi acondicionado no interior de um castelo de chumbo com dimensões apropriadas. Em seguida o castelo foi inserido no interior de uma embalagem plástica, chamada de EPR (Embalagem para Radiofármaco), que foi colocado no interior de um balde de plástico forrado internamente com isopor para isolar termicamente o conteúdo e preenchido com gelo seco e, finalmente, o balde foi lacrado com uma tampa plástica. Este embalado, já utilizado pelo IPEN para o transporte de outros radiofármacos, tais como o DOTATATO-<sup>177</sup>Lu, permite que o

conteúdo permaneça congelado por até 48 horas, garantindo as condições de congelamento durante o transporte.

Os controles para avaliação da estabilidade do radiofármaco ocorreram imediatamente após a produção, 24 horas e 48 horas, por CCD-SG e CLAE, sendo o controle por CCD-SG imediato uma das análises realizadas pelo Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia do IPEN para aprovação oficial do lote. Como critério de aceitação, foi estabelecido pureza radioquímica mínima de 95% em todos os tempos analisados (tabela 12).

**Tabela 12** – Resultados de controle de estabilidade radioquímica dos lotes piloto de produção, organizados de acordo com a ordem cronológica das produções: doses de 7,4 GBq (calibradas para 48 horas) armazenadas sob congelamento em gelo seco nos baldes de transporte.

Atividade (GBq)	Fornecedor	Controle de qualidade (% PR)					
		Imediato		24 horas		48 horas	
		CCD	CLAE	CCD	CLAE	CCD	CLAE
9,4	NTP	98,8	98,0	98,7	95,4	98,4	NR
18,9	NTP	99,4	96,5	99,0	NR	98,6	NR
18,1	NTP	99,0	99,7	98,3	99,1	97,0	100
19,7	NTP	99,0	99,2	98,3	99,1	98,9	99,1
20,3	NTP	99,5	100,0	99,0	100	98,3	100
5,4	INM	99,6	99,3	99,6	99,2	99,8	99,3
16,1	INM	99,5	99,7	NR	NR	NR	NR
26,5	INM	99,5	100,0	99,5	97,6	99,5	99,4
38,7	INM	99,2	99,2	99,6	99,0	99,6	96,9
40,9	INM	99,8	99,5	99,5	99,6	99,8	99,4
22,1	INM	99,2	98,7	NR	NR	NR	NR
10,4	INM	99,4	98,4	NR	NR	NR	NR
21,6	INM	98,8	98,7	NR	NR	NR	NR

NR = não realizado  
Fonte: autor da tese.

Após a marcação e processamento de cada um dos lotes piloto de produção, três amostras de 50 µL e uma de 100 µL foram retiradas para realização dos controles de qualidade pelo Departamento de Controle de Qualidade do Centro

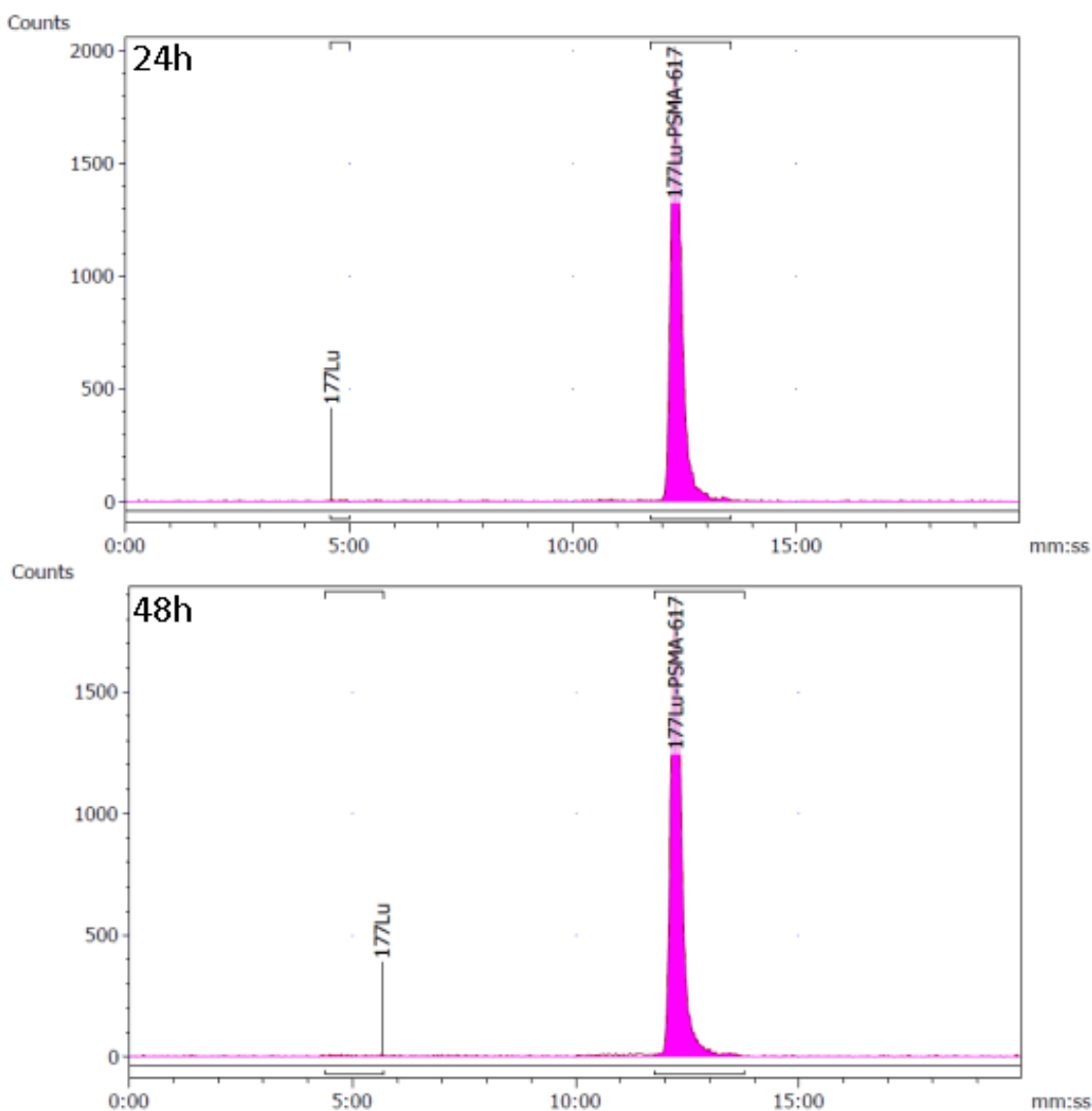
de Radiofarmácia para aprovação do lote (físico-químico, microbiológico e radionuclídico).

Em todos os lotes produzidos o pH final após o processamento foi de 4,5, este valor foi considerado aceitável, uma vez que a faixa de pH de 4,0 – 5,0 foi estabelecida como critério de aceitação. Este resultado demonstrou também que o tampão ascorbato de sódio 0,5 M pH 4,7 foi adequado para a manutenção do pH de marcação, mesmo após a diluição com solução de NaCl 0,9% estéril para obter-se a concentração radioativa final.

Um outro sistema tamponante que poderia ser utilizado e demonstra ser adequado para marcações de diversas moléculas com o lutécio-177 é o tampão acetato de sódio 0,5 M pH 4,5 (KUO et al., 2018). Contudo, seria necessário ao término da marcação adicionar algum agente estabilizante para minimizar o efeito da radiólise. Um trabalho recente avaliou a estabilidade de uma dose de 4 GBq de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em temperatura ambiente e demonstrou que a adição de agentes estabilizantes, tais como o ascorbato, metionina ou etanol reduzem a radiólise (DE ZANGER et al., 2019). O emprego do tampão formado por ácido ascórbico/ascorbato de sódio já foi bem estudado na literatura e demonstrou efeito protetor para os radiofármacos (LIU, SHUANG et al., 2003; MAUS et al., 2014).

O presente estudo demonstrou que o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu manteve-se estável durante um período de até 48 horas quando congelado em balde de gelo seco (figura 43). Tal fato é de extrema importância pois evidencia que é possível o transporte deste radiofármaco para localidades distantes que demandem até 48 horas de intervalo entre a produção e a administração no paciente, e favorecendo o transporte de doses para eventual ensaio clínico.

**Figura 43** – Perfis de CLAE de uma dose terapêutica mantida congelada (7,4 GBq calibrada para 48 horas) obtidos a partir do lote piloto de produção com 37 GBq, amostragem de 24 e 48 horas com pureza radioquímica de 98,9% e 96,9%, respectivamente.



Fonte: autor da tese.

A imediata diluição do lote produzido com NaCl 0,9% e fracionamento das doses produzidas, limitando a concentração radioativa final máxima do radiofármaco em 3,7 GBq/mL (100 mCi/mL) e o congelamento destas doses também demonstrou efetividade na mitigação da radiólise do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. Os resultados sugerem que, à semelhança do radiofármaco DOTATATO-<sup>177</sup>Lu, o PSMA-<sup>177</sup>Lu poderá ser produzido em lotes de até 74 GBq (2 Ci). A produção de DOTATATO-<sup>177</sup>Lu emprega tampão acetato de sódio, porém acrescido de ácido genticóico e ácido ascórbico para garantir a estabilidade das doses, além da diluição final com cloreto de sódio e congelamento. No caso da marcação do PSMA-617 o uso de tampão ascorbato de sódio surtiu efeito protetor semelhante, que deverá ser testado em marcações com atividades superiores a 37GBq (1 Ci).

#### **7.8 Determinação do coeficiente de partição (Log P) experimental do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu**

O Log P experimental do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi de  $-2,11 \pm 0,03$ , indicando caráter hidrofílico do radiofármaco e, possivelmente, um clareamento sanguíneo rápido. O valor do Log P obtido é semelhante ao valor encontrado na literatura para o PSMA-617 marcado com lutécio-177 de  $-2,68$  (DAS et al., 2016). O valor teórico de Log P do PSMA-617 não radiomarcado (calculado no site swissADME) foi de  $1,81$  (SIB, 2020), indicando que a complexação do radionuclídeo ao quelante DOTA altera, significativamente, o caráter lipofílico da molécula.

Os valores do coeficiente de partição são classificados de acordo com o valor de Log P, que quando é menor do que zero, indica que a substância possui maior afinidade pela fase aquosa, quando é igual a zero a substância possui afinidade por ambas as fases e quando Log P é maior do que zero a substância possui uma afinidade maior pela fase orgânica (KOROLKOVAS; H., 1988). Este dado também auxilia na previsão dos parâmetros farmacocinéticos do radiofármaco *in vivo* (ALLEN JR, 2013).

## 7.9 Ensaios com células LNCaP

A pesquisa por novos receptores ou sítios de ligação tem se desenvolvido rapidamente nas duas últimas décadas e impacta diretamente no desenvolvimento ou aprimoramento de muitos medicamentos, em virtude de uma melhor compreensão na interação entre o ligante e o receptor alvo. Os ensaios *in vitro* com radiotraçadores são utilizados para determinar a função dos receptores em nível molecular, sendo o experimento mais sensível disponível para quantificação e determinação de parâmetros *in vitro*, mesmo quando estes receptores possuem baixo nível de expressão (DONG et al., 2015).

Os radiomarcadores tem sido utilizados para estudos dos mais variados tipos de receptores, desde os adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos até para receptores superexpressos em processos tumorais, como é caso do PSMA no câncer de próstata (SATHEKGE et al., 2020).

Fundamentalmente, existem três tipos de experimentos que envolvem o estudo de ligação com receptor: cinéticos, saturação e competição (HULME; TREVETHICK, 2010).

Os ensaios de ligação ligante-receptor geralmente respeitam a lei da ação das massas, um modelo matemático que explica e prevê o comportamento das ligações/interações químicas. Este modelo se baseia em alguns preceitos (HULME; TREVETHICK, 2010):

- Todos os receptores estão igualmente disponíveis para o ligante;
- Todos os receptores, ou estão ocupados, ou estão disponíveis para ligação. O modelo não leva em consideração qualquer estado parcial de ligação;
- Nem os receptores, nem os ligantes são alterados na ligação;
- A ligação é reversível.

Caso algum destes preceitos não seja verdadeiro, existem duas opções. A primeira implicaria em desenvolver um modelo mais complexo para interpretar os resultados. A segunda opção seria analisar empiricamente os resultados com o modelo básico, sem ter grande precisão na definição da constante de dissociação em equilíbrio ( $K_d$ ) (MOTULSKY; NEUBIG, 2000).



Os ensaios de cinética, saturação e competição foram realizados com temperatura entre 2 a 8 °C, situação que inibe a internalização (MICHALSKA et al., 2016). Assim, a lei da ação das massas foi respeitada, pois não houve mudança no número de receptores disponíveis para ligação. O ensaio de internalização foi realizado a 37 °C para permitir o processo de internalização do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.

Estatisticamente, em 94% dos casos de câncer de próstata é detectado a expressão de PSMA pelas células cancerígenas (MARESCA et al., 2009). Dentre as linhagens de células metastáticas de câncer de próstata, células como PC-3 e DU 145 não apresentam expressão de PSMA, sendo necessário modificações genéticas para que o receptor passe a ser expresso. Em contrapartida, a célula LNCaP naturalmente expressa o PSMA na membrana celular, o que justificou a escolha desta linhagem para a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* (LAIDLER et al., 2005).

### 7.9.1 Avaliação da cinética de ligação *in vitro* do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu às células LNCaP

Os ensaios cinéticos são necessários para determinar as condições ideais para experimentação no estado de equilíbrio (saturação e competição) (HEIN et al., 2005). A ligação entre o receptor e o substrato forma um complexo ligante-receptor (L+R) que pode se dissociar (ligação reversível) ou não (ligação irreversível). A taxa ou constante de associação é chamada de  $K_{on}$ . A formação de novos complexos L+R depende da taxa de  $K_{on}$ , da concentração de substrato e receptores livres. A constante de dissociação,  $K_{off}$ , representa a taxa em que os complexos L+R são desfeitos (HEIN et al., 2005) (15).

$$[ligante] \times [receptor] \times K_{on} = [receptor.ligante] \times K_{off} \quad (15)$$

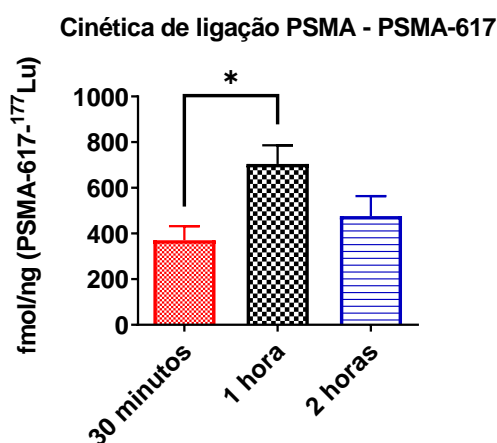
A taxa de ligação entre o ligante PSMA-617 e o seu sítio alvo, no presente caso representando pelo PSMA de membrana, é diretamente proporcional à concentração do substrato e do receptor, assim como o tempo de ensaio e temperatura também podem alterar os resultados (ENDERLE; BRONZINO, 2012).

Para a realização dos ensaios de saturação e competição, foi estabelecido que a melhor condição corresponderia ao momento em que o complexo L+R estivesse em maior concentração. Fixou-se a quantidade de células por poço (200.000) e a concentração de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu adicionada por poço (0,64 nM) e analisou-se a ligação em três momentos diferentes (30 minutos, 1 hora e 2 horas).

Após o processamento das amostras, os valores em CPM (contagens por minuto) foram transformados para fmol/ng e as concentrações de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu analisadas por ANOVA (um fator) seguido do teste pós-paramétrico de Tukey.

Observou-se diferença significativa apenas entre os tempos de 30 minutos e 1 hora ( $P = 0,0187$ ), não havendo diferença significativa entre os tempos de 1 e 2 horas ( $P = 0,1688$ ) (figura 44), o que sugeriu um equilíbrio na ligação a partir de 1 hora, embora a diferença na concentração de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu ligada nas células entre os tempos de 30 minutos e 2 horas não tenham apresentado significância ( $P = 0,7419$ ).

**Figura 44** – Influência do tempo na cinética de ligação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu ao receptor PSMA presente na membrana das células LNCaP, resultado expresso em fmol/ng (n=8).



Fonte: autor da tese.

Com base nestes achados, determinou-se o tempo de 1 hora como adequado para condução dos ensaios de saturação e competição, sendo concordante com achados na literatura em que os autores realizaram os ensaios de ligação após 1 hora de incubação (WANG et al., 2018; WIRTZ et al., 2018).

### 7.9.2 Ensaio *in vitro* de curva de saturação da ligação do peptídeo PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em células LNCaP

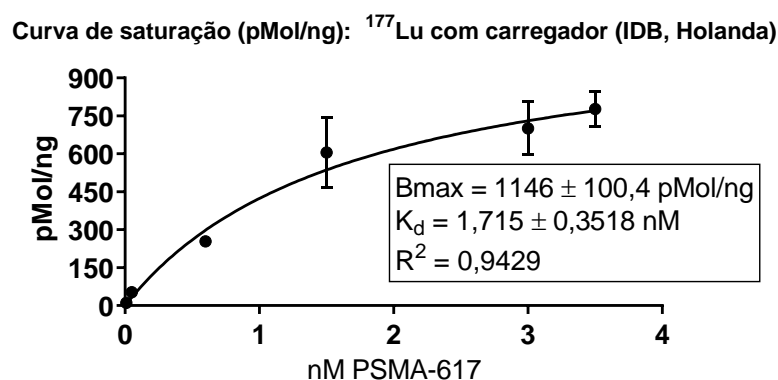
Os ensaios de saturação fornecem duas informações primordiais, a afinidade do ligante pelo sítio de ligação,  $K_d$  e uma estimativa do número de sítios presentes para ligação no tecido,  $B_{max}$  (DONG et al., 2015).

A afinidade pelo sítio de ligação ( $K_d$ ) ou também conhecido por constante de dissociação em equilíbrio, é expressa em moles/litro ou concentração molar que representa a concentração de ligante que ocupará 50% dos receptores ou sítios de ligação disponíveis (HULME; TREVETHICK, 2010). O valor de  $K_d$  também expressa o grau de afinidade do ligante pelo receptor, isto é, em estudos comparativos com diferentes radioligantes que se acoplam a um mesmo receptor, aquele que apresentar o menor valor de  $K_d$  será o que possui uma maior afinidade pela ligação (DONG et al., 2015).

Com os ensaios de saturação foi possível obter os valores de  $K_d$  para o radiofármaco obtido com atividades específicas distintas, isto é, o ensaio foi conduzido com o PSMA-617 radiomarcado com lutécio sem carregador e com carregador.

Na marcação em que foi utilizado o lutécio-177 com carregador, a atividade específica do radiofármaco foi de 42,55 MBq/μg (1,15 mCi/μg). Utilizou-se as concentrações molares de 0,01 nM, 0,05 nM, 0,6 nM, 1,5 nM, 3,0 nM e 3,5 nM. Como resultado, obteve-se um valor de  $K_d$   $1,715 \pm 0,3518$  nM e  $B_{max}$   $1146 \pm 100,4$  pmol/ng e  $R^2 = 0,9429$  (figura 45).

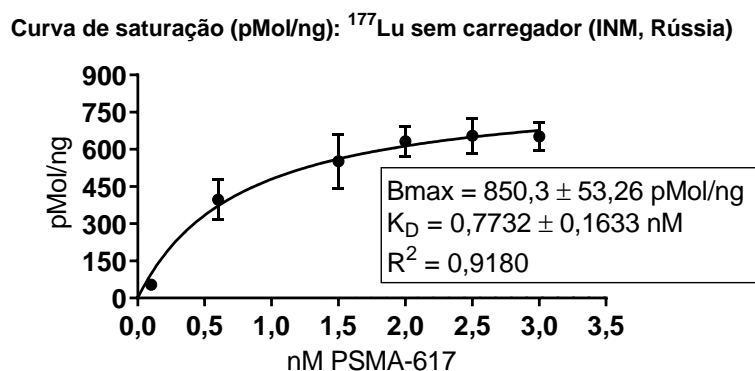
**Figura 45** – Curva de saturação de células LNCaP com PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador. Atividade específica da marcação de 42,55 MBq/μg (n=8). Cada ponto do gráfico foi representado pela média e desvio padrão.



Fonte: autor da tese.

Este mesmo experimento foi repetido com o lutécio-177 isento de carregador. A atividade específica de marcação foi de 74 MBq/μg (2,0 mCi/μg). Utilizou-se as concentrações molares de 0,1 nM, 0,6 nM, 1,5 nM, 2,0 nM, 2,5 nM e 3,0 nM e como resultado obteve-se o valor de  $K_d$  de  $0,7732 \pm 0,1633$  nM e  $B_{max}$  de  $850,3 \pm 53,26$  pmol/ng e  $R^2 = 0,9180$  (figura 46).

**Figura 46** – Curva de saturação de células LNCaP com PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador. Atividade específica da marcação de 74 MBq/μg (n=8). Cada ponto do gráfico foi representado pela média e desvio padrão.



Fonte: autor da tese.

Em seguida, os dados de  $K_d$  e  $B_{max}$  foram comparados e apresentaram diferenças significativas para  $P \leq 0,05$ , tanto no valor de  $K_d$  ( $P = 0,0067$ ), quanto para o valor de  $B_{max}$  ( $0,0078$ ).

Esta diferença esteve vinculada diretamente à atividade específica de marcação do PSMA-617 que foi atrelada à presença ou não de carregador no lutécio-177 (BANERJEE et al., 2015).

Na radiomarcação utilizou-se a relação molar de 2,1 moles de peptídeo para cada mol de lutécio-176 declarado no certificado de produção do radioisótopo. Esta condição culminou em uma radiomarcação com atividade específica para este experimento de 42,55 MBq/ $\mu$ g.

Considerando-se as duas vias de produção do lutécio-177, a atividade específica do lutécio-177 produzido pela via direta é cerca de 30% inferior à obtida pela produção indireta (BANERJEE et al., 2015).

Desta forma, pode-se concluir que a utilização do lutécio-177 isento de carregador (INM, Rússia), resultou na obtenção do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  com uma atividade específica superior, que culminou em um valor de  $K_d$  menor no ensaio de saturação, ou seja, foi necessária uma quantidade menor de PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  para ocupar 50% dos receptores disponíveis, quando comparada ao ensaio com o radiofármaco obtido com o lutécio-177 que possuía carregador.

Contudo, o ensaio realizado *in vitro* demonstrou que quanto maior a atividade específica do radiofármaco (menos peptídeo não-marcado disponível para ligação com as células), melhor foi o resultado da constante de dissociação.

### **7.9.3 Ensaio *in vitro* de competição da ligação do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$ em células LNCaP**

O ensaio de competição permite caracterizar farmacologicamente o tipo de receptor e, sob as condições ideais de experimentação, identificar o seu subtipo e a distribuição em um tecido ou em células (HEIN et al., 2005).

Estes ensaios de competição se caracterizam por adicionar um excesso de competidor (ligante não radiomarcado) e avaliar a competição entre o radioligante e o ligante competidor pelo receptor. O ensaio de competição também

pode substituir o ensaio de saturação quando não é possível observar o platô, sob as seguintes circunstâncias (HEIN et al., 2005; MOTULSKY; NEUBIG, 2000):

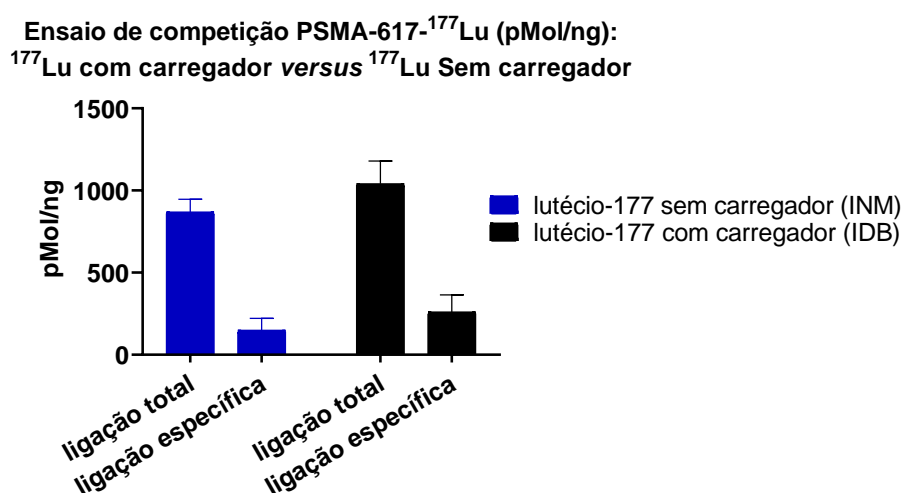
- Econômica: quando o alto custo do ligante e/ou do radioisótopo inviabilizam o ensaio;
- A atividade do radioligante necessária para a execução do ensaio é incompatível com as normas de proteção radiológica;
- O platô da curva de saturação não é visualizado por características intrínsecas ao radioligante e/ou receptor.

Em determinados ensaios, pela característica do radioligante ou das condições experimentais, se faz necessário adicionar uma concentração de competidor de até 1000 vezes em relação ao radioligante para que o competidor ocupe os sítios de ligação (HULME; TREVETHICK, 2010).

De uma forma geral, este experimento permite quantificar a ligação específica e não específica do radioligante (SITTAMPALAM et al., 2020). Quando é economicamente viável a utilização de mais de uma concentração de competidor, torna-se possível calcular o valor da concentração inibitória 50% ( $IC_{50\%}$ ) que é a concentração necessária de ligante não radiomarcado para bloquear metade da ligação específica (HEIN et al., 2005).

O ensaio de competição demonstrou um bloqueio efetivo da ligação do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  nas células LNCaP, independentemente da atividade específica de marcação empregada, 74 MBq/ $\mu\text{g}$  e 29,01 MBq/ $\mu\text{g}$ . Notou-se que a ligação do peptídeo nos receptores de PSMA-617 não apresentou diferença significativa para a ligação total ( $P = 0,3562$ ) e ligação específica ( $P = 0,3603$ ) (figura 47).

**Figura 47** – Comparação entre os ensaios de competição de PSMA-617 radiomarcados com lutécio-177 com carregador e lutécio-177 sem carregador, em células LNCaP (200.000 por poço) ( $n=3$ ).



Fonte: autor da tese.

Deste modo, apesar do estudo anterior haver demonstrado um  $K_d$  menor para o radiofármaco produzido com lutécio de alta atividade específica, o ensaio de competição, realizado nas mesmas condições experimentais, não mostrou diferença significativa na ligação total e, principalmente, na ligação específica entre os radiofármacos obtidos com atividades específicas diferentes. Este resultado alinha-se com o resultado do trabalho de BEGUM e colaboradores (2019) e sugere a necessidade de avaliação do efeito da atividade específica do radiofármaco receptor-específico em modelos tumorais *in vivo*.

Os resultados *in vitro* obtidos no presente trabalho reforçam a importância da condução do experimento de competição associado ao ensaio de saturação, uma vez que, neste caso, analisar apenas a especificidade do radiofármaco pelo valor da constante de dissociação ( $K_d$ ) poderia levar à conclusão de que o PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  com atividade específica superior (lutécio-177 isento de carregador), promoveria maior ligação aos receptores, quando comparado com o mesmo peptídeo obtido com menor atividade específica.

#### 7.9.4 Ensaio *in vitro* de internalização do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em células LNCaP

É sabido que quando agonistas se ligam ao seu receptor são internalizados e propiciam boas imagens e a possibilidade de serem utilizados como radiofármacos, com vantagem ainda maior para aplicações terapêuticas. Contudo, em 2006, foi demonstrado que os antagonistas de somatostatina, apesar de serem pouco internalizados, demonstraram boas imagens aliadas a uma farmacocinética rápida. Estes resultados apontaram para possibilidade de desenvolver antagonistas com bons resultados no diagnóstico e na terapia (GINJ et al., 2006). Os antagonistas também foram superiores em relação aos agonistas nos receptores de bombesina (ABD-ELGALIEL et al., 2008). Tal fenômeno foi relatado com os receptores de gastrina (MANSI et al., 2011). Nos anos 2000 foi relatado o potente efeito inibidor do grupamento DUPA na enzima NAALADase e em 2013 demonstrou-se o seu efeito no receptor de PSMA (KIM et al., 2013; NAN et al., 2000).

A farmacocinética de um traçador é afetada pelo grau de afinidade da formação do complexo ligante-receptor e velocidade em que ocorre a ligação e a dissociação, pelo tamanho da molécula e a sua lipofilicidade, assim como pela internalização. O mesmo trabalho de BEGUM e colaboradores (2019), empregando modelo computacional de farmacocinética, demonstrou que uma maior taxa de internalização de PSMA radiomarcado com lutécio-177 aumentaria a razão tumor/órgão de risco (rins, fígado e medula óssea) (BEGUM et al., 2019).

Durante o processo de internalização, o complexo ligante-receptor é internalizado na forma de pequenos endossomas, podendo ser dissociado, com o retorno do PSMA para a membrana celular ou o complexo pode ser degradado pelo lisossomo. Nos dois casos, o material radioativo permanece no interior da célula (WINTER et al., 2019).

A internalização do PSMA está diretamente associada à estrutura do grupamento espaçador, que é responsável por ligar em uma ponta o grupo farmacofórico do PSMA e na outra ponta o grupo quelante (BENESOVA et al., 2015a). Quando este espaçador apresenta características lipofílicas, tal qual o PSMA-617, há uma melhora na interação com o receptor, propiciando um aumento



na razão entre a captação tumoral e o radiofármaco no sangue, como uma maior internalização (VIRGOLINI et al., 2018).

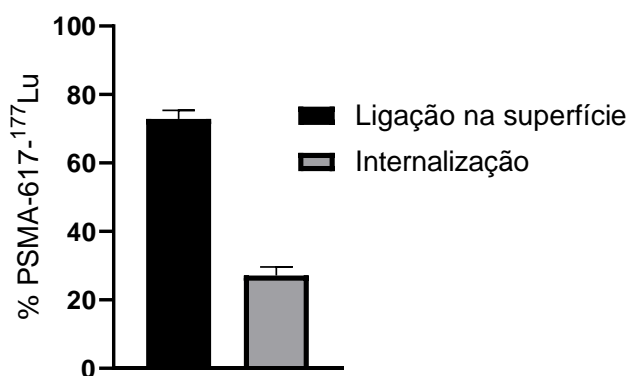
É importante mencionar que a internalização do PSMA favorece a concentração do dano da radiação no interior da célula, além de minimizar os efeitos deletérios da radiação em tecidos saudáveis (KRATOCHWIL et al., 2017). A internalização é de extrema importância para terapias que se beneficiem de elétrons Auger de curto alcance e dos alfa emissores, como por exemplo o actíneo-225 (MORGENSTERN et al., 2018).

O ensaio de internalização foi realizado com o radiofármaco produzido com as duas fontes de lutécio-177 (com e sem carregador). Para ambas as situações, a quantidade de peptídeo adicionada no meio foi correspondente ao valor de  $K_d$  encontrado no experimento de saturação. Após o processamento dos pontos, a contagem mensurada em cada poço foi convertida para porcentagem, onde 100% representaram ligação na superfície somado com a internalização.

Para o radiofármaco obtido com o lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda), foram adicionados em cada poço contendo 200.000 células LNCaP, 1,715 nM de PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$ , com atividade específica de 25,84 MBq/ $\mu\text{g}$ . A internalização do PSMA-617 foi de  $27,12 \pm 2,48\%$  (figura 48).

**Figura 48** – Ensaio de internalização do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador, com atividade específica de 25,84 MBq/ $\mu\text{g}$ , com 200.000 em células LNCaP por poço (n=6).

**Ensaio de internalização:  $^{177}\text{Lu}$  com carregador (IDB, Holanda)**



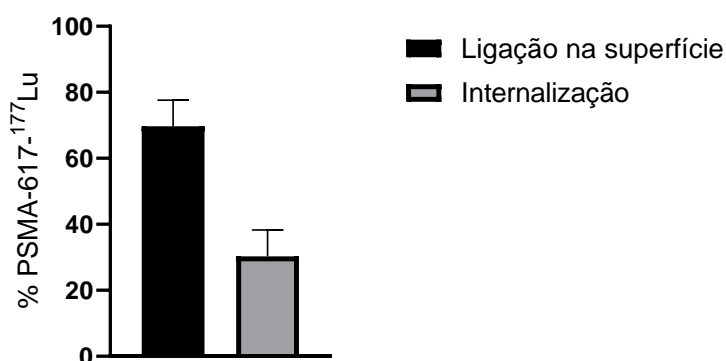
Fonte: autor da tese.

Este mesmo ensaio foi repetido com o radiofármaco obtido com lutécio-177 sem carregador (INM, Rússia), no qual foram adicionados em cada poço

0,7732 nM de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, com uma atividade específica de 74 MBq/μg e houve uma internalização de 30,33 ± 7,94% (figura 49).

**Figura 49** – Ensaio de internalização do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador, com atividade específica de 74 MBq/μg, com 200.000 em células LNCaP por poço (n=6).

**Ensaio de internalização: <sup>177</sup>Lu sem carregador (INM, Rússia)**



Fonte: autor da tese.

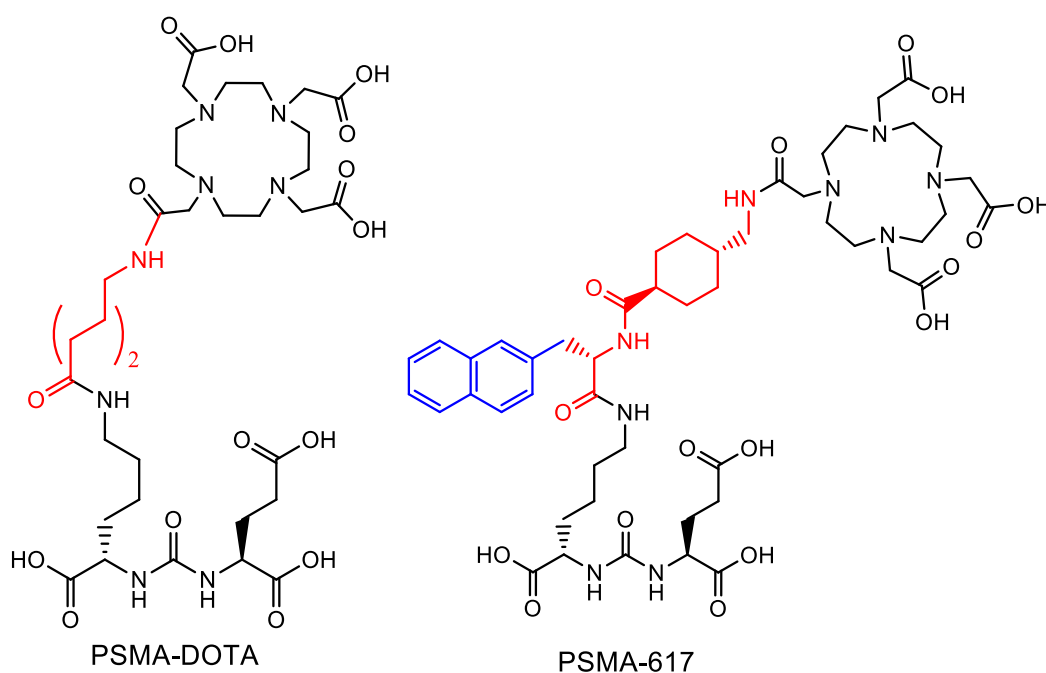
A comparação dos resultados de internalização, obtidos para os radiofármacos com atividades específicas diferentes, empregando-se o método Teste t de Student, demonstrou que não existiu diferença significativa entre as porcentagens de internalização ( $P = 0,1281$ ). Este resultado indicou que no estudo *in vitro*, a atividade específica de radiomarcagem não promoveu efeito na internalização do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nas células LNCaP.

Os resultados de internalização obtidos para PSMA-617-<sup>177</sup>Lu se mostraram superiores em relação ao primeiro derivado de PSMA estudado no IPEN, nomeado de PSMA-DOTA, que apresentou baixa porcentagem de internalização ( $0,97 \pm 0,86$  %) (SILVA, 2017).

A ligação com o receptor é possível desde que 2 requisitos mínimos, sejam atendidos: grupo farmacofórico DUPA (glutamato-ureia-lisina), grupo espaçador com comprimento adequado, de forma que evite o impedimento estérico causado pelo grupamento quelante DOTA (LU et al., 2013).

Esta interação pode ser otimizada pela presença de um grupo que permita uma interação hidrofóbica entre o espaçador e a bolsa S1 localizada no receptor PSMA. O grupo  $\beta$ -naftil (em azul, figura 50) melhora a interação com o receptor, favorecendo a captação e internalização do peptídeo (BENESOVA et al., 2015a).

**Figura 50** – Comparação entre as estruturas do PSMA-DOTA e PSMA-617. Em vermelho destaca-se o espaçador e em azul o grupo  $\beta$ -naftil.



Fonte: autor da tese.

Estudos de internalização do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  foram realizados por outros autores (tabela 13) e demonstraram variação na internalização do peptídeo, contudo é necessário salientar que os resultados não podem ser comparados, uma vez que as técnicas empregadas nos ensaios foram diferentes.

**Tabela 13** – Levantamento dos estudos de internalização do PSMA-617 disponíveis na literatura.

% de internalização do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$	Autores
40,1 $\pm$ 4,0	(WANG et al., 2018)
17,51 $\pm$ 3,99	(BENESOVA et al., 2015a)
15,5 $\pm$ 7,5	(WÜSTEMANN et al., 2016)

Fonte: autor da tese.

### 7.10 Estudo farmacocinético do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios

O estudo farmacocinético é uma importante ferramenta para explicar e descrever os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção de um radiofármaco no organismo (JAMBHEKAR; BREEN, 2009).

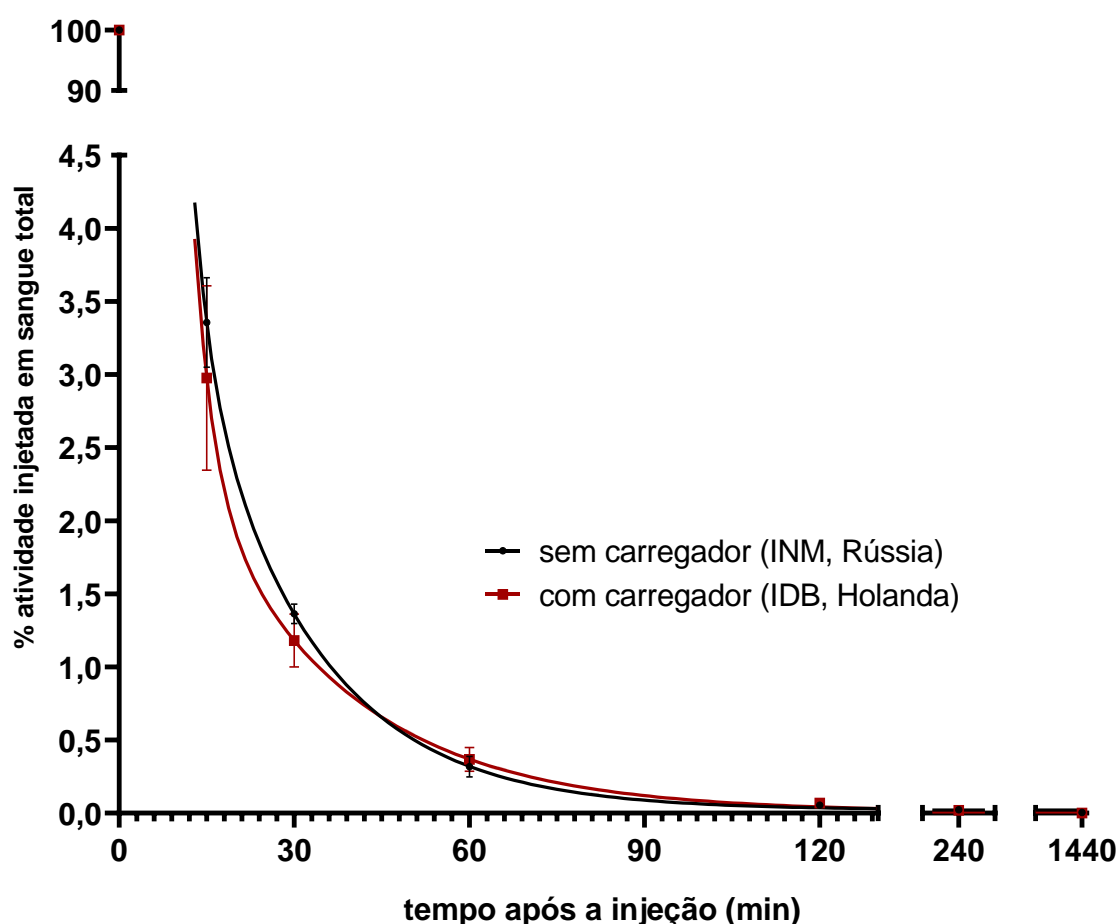
Para se obter os parâmetros farmacocinéticos de um radiofármaco é necessário construir uma curva de concentração plasmática *versus* tempo e aplicar a esta curva certos modelos matemáticos (compartimentais) que permitirão a simulação dos processos de distribuição e eliminação do radiofármaco (KHOJASTEH et al., 2011). Com estes parâmetros é possível calcular o tempo de meia-vida de distribuição e tempo de meia-vida de eliminação que representa o tempo necessário para que 50% da quantidade de radiofármaco presente no organismo seja eliminado (STORPIRTIS et al., 2011).

É mensurado também o volume de distribuição (Vd), que representa a quantidade de fluido corporal necessária para dissolver a quantidade total do radiofármaco na mesma concentração em que ela é encontrada no sangue. O volume de distribuição indica a difusão do radiofármaco nos tecidos extravasculares (STORPIRTIS et al., 2011). Outro parâmetro calculado é a depuração ou clareamento sanguíneo (CL) que corresponde à eficiência com que o organismo elimina o radiofármaco (KHOJASTEH et al., 2011).

Com o estudo do clareamento sanguíneo foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu obtido com as atividades específicas diferentes. Pela característica da curva foi utilizado o modelo de decaimento em duas exponenciais ou modelo bicompartimental (JAMBHEKAR; BREEN, 2009).

A curva de clareamento sanguíneo do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *BALB/c* pode ser visualizada na figura 51, em porcentagem de atividade injetada em sangue total (%AI sg total) em função do tempo após a administração, para os radiofármacos obtidos com os dois lutécios-177 (com e sem carregador).

**Figura 51** – Curva de clareamento sanguíneo (%AI sg total) do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *BALB/c* machos saudáveis entre 15 minutos e 24 horas. Experimento realizado com o radiofármaco obtido com lutécio-177 com carregador e sem carregador. Dados expressos pela média e desvio padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

O PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador (IDB, Holanda) sob a atividade específica de 33,95 MBq/ $\mu$ g (0,92 mCi/ $\mu$ g) apresentou uma meia-vida de distribuição ( $t_{1/2 \alpha}$ ) de 2,21 minutos e uma meia-vida de eliminação ( $t_{1/2 \beta}$ ) de 17,74 minutos. A depuração do radiofármaco foi de 0,46 mL por minuto e o volume de distribuição calculado foi de 11,79 mL.

O PSMA-617 marcado com lutécio-177 sem carregador (INM, Rússia) com a atividade específica de 74 MBq/ $\mu$ g (2,0 mCi/ $\mu$ g) apresentou meia-vida de distribuição de 1,99 minutos e meia-vida de eliminação de 13,86 minutos. A depuração foi de 0,74 mL por minuto e o volume de distribuição correspondeu a 15,1 mL.

Os resultados obtidos para os parâmetros farmacocinéticos das duas preparações de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu são sintetizados na tabela 14

**Tabela 14** – Parâmetros farmacocinéticos do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador determinados em camundongos *BALB/c* machos sadios (n=4).

Parâmetro farmacocinético	Símbolo	Valor	
		Com carregador	Sem carregador
Constante de distribuição	$\alpha$	0,31 min	0,35 min
Constante de eliminação	$\beta$	0,039 min	0,049 min
Tempo de meia-vida da fase rápida ou distribuição	$t_{1/2} \alpha$	2,21 min	1,99 min
Tempo de meia-vida da fase lenta ou eliminação	$t_{1/2} \beta$	17,74 min	13,86 min
Depuração	CL	0,46 mL.min <sup>-1</sup>	0,74 mL.min <sup>-1</sup>
Volume de distribuição	Vd	11,79 mL	15,1 mL

Fonte: autor da tese.

Aparentemente, o excesso de PSMA-617 não radiomarcado aumentou o tempo de meia-vida de eliminação e reduziu a depuração e o volume de distribuição quando comparado ao PSMA-617 radiomarcado com o lutécio sem carregador. Entretanto, após avaliação estatística comparativa evidenciou-se que não houve diferença significativa ( $P = 0,8339$ ) entre os resultados obtidos para nos parâmetros farmacocinéticos do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com atividades específicas distintas.

Houve rápida eliminação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu e em aproximadamente 2 horas foram encontrados apenas traços do radiofármaco na corrente sanguínea, corroborando com o perfil hidrofílico do radiofármaco, apontado pelo ensaio de coeficiente de partição experimental (Log P).

Estes resultados encorajaram a realização do estudo de biodistribuição em modelo animal para avaliar o potencial de aplicação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no tratamento do câncer de próstata, bem como avaliar o impacto da marcação com duas atividades específicas diferentes na captação dos diferentes órgãos e tecidos.

### **7.11 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios**

A biodistribuição do radiofármaco obtido com o lutécio-177 sem carregador foi realizada com os seguintes pontos: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. Contudo, este mesmo ensaio com o lutécio-177 com carregador foi realizado com os pontos de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora para fins de comparação da biodistribuição do radiofármaco e ao mesmo tempo minimizar o número de animais em experimentação. Para facilitar a discussão, as biodistribuições de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com os camundongos *BALB/c* machos sadios, que utilizaram lutécio com carregador e sem carregador, foram separados em subtópicos distintos e foi dedicado um tópico apenas para comparação dos resultados.

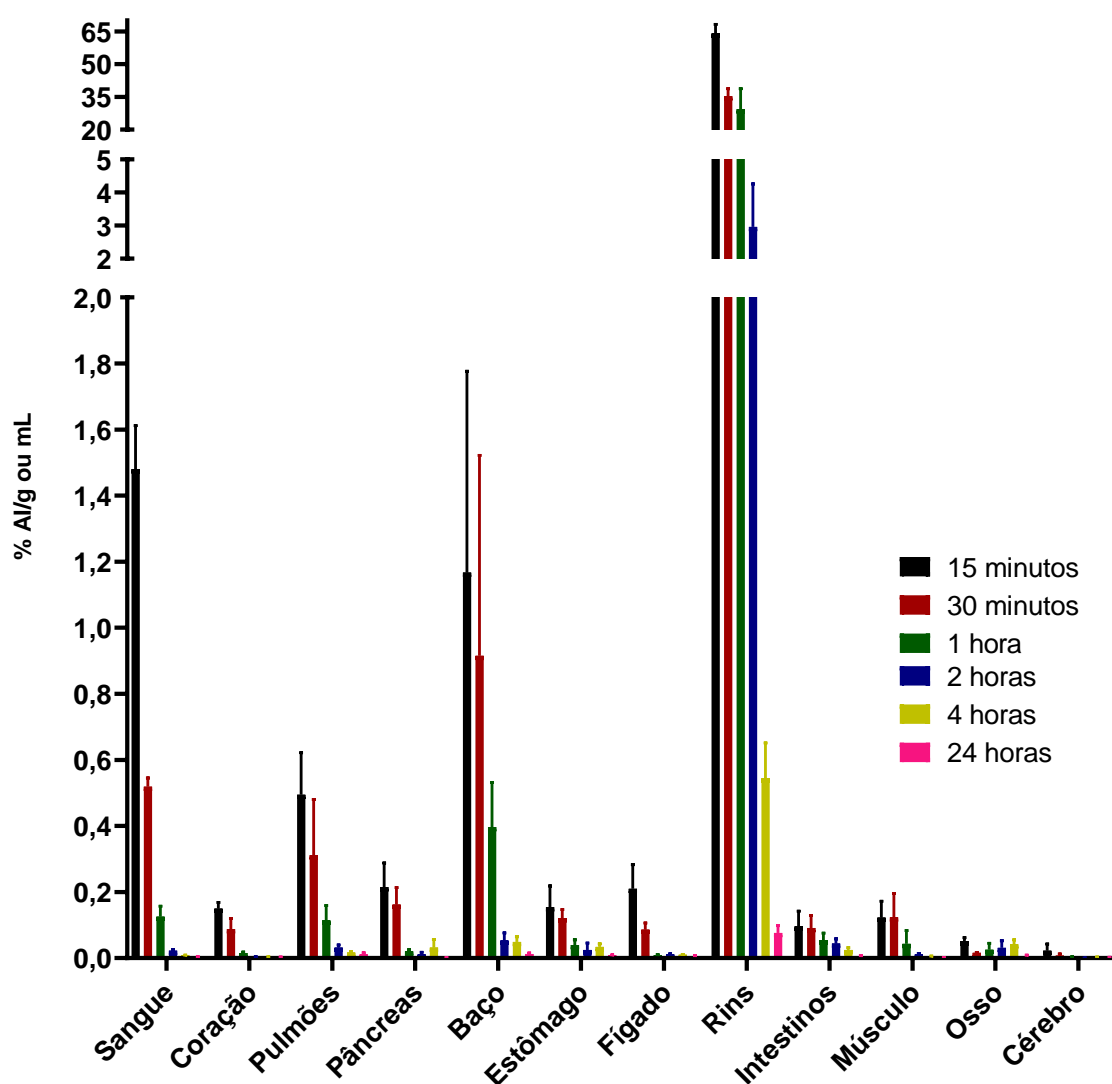
#### **7.11.1 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador em camundongos *BALB/c* machos sadios**

Foi observado um rápido clareamento sanguíneo, consistente com os dados farmacocinéticos obtidos. Após uma hora administração permaneciam circulantes apenas  $0,13 \pm 0,03$  %AI/mL.

O PSMA de membrana é expresso em níveis basais no pulmão, intestinos, cérebro e nos túbulos proximais dos rins. Foi observada também uma captação natural do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no fígado e baço (RUIGROK et al., 2019; WEINEISEN, M. et al., 2015a).

Os resultados da biodistribuição do PSMA-617 marcado com lutécio-177 sem carregador, em camundongos *BALB/c* machos saudáveis podem ser visualizados na figura 52. Os dados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por órgão (%AI), por grama de tecido ou órgão (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) (média e erro padrão).

**Figura 52** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos *BALB/c* machos saudáveis. Os resultados foram expressos pela média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

Neste experimento, foi observada discreta captação no pulmão e intestinos. Após uma hora de administração, foram encontrados apenas traços do radiofármaco, com captação de  $0,18 \pm 0,05$  %AI/g e  $0,05 \pm 0,02$  %AI/g,



respectivamente (tabela 15). Uma vez que o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu não atravessa a barreira hematoencefálica (NOMURA et al., 2014), não se esperaria captação neste órgão.

**Tabela 15** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos *BALB/c* machos saudáveis. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue		
	15 minutos	30 minutos	1 hora
Sangue	1,48 ± 0,13	0,52 ± 0,03	0,13 ± 0,03
Coração	0,15 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Pulmões	0,50 ± 0,13	0,31 ± 0,17	0,18 ± 0,05
Pâncreas	0,21 ± 0,07	0,16 ± 0,05	0,02 ± 0,01
Baço	1,17 ± 0,61	0,92 ± 0,61	0,40 ± 0,13
Estômago*	0,15 ± 0,06	0,12 ± 0,03	0,04 ± 0,02
Fígado	0,21 ± 0,07	0,09 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Rins	64,12 ± 4,11	35,29 ± 3,54	29,35 ± 9,47
Intestinos*	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,02
Músculo	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,07	0,04 ± 0,04
Ossos	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Cérebro	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

\*Com conteúdo  
Fonte: autor da tese.

Observou-se captação hepática inicial (15 minutos, 0,21 ± 0,07 %AI/g) e após uma hora foi reduzida a apenas traços de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (0,01 ± 0,01 %AI/g). Em contrapartida, visualizou-se captação esplênica aos 15 minutos de 1,17 ± 0,61 %AI/g. Após uma hora foi encontrado no órgão 0,40 ± 0,13 %AI/g do radiofármaco. Notou-se discreta captação intestinal, com perfil de clareamento semelhante aos outros órgãos viscerais sem expressão de receptor de PSMA, como o estômago, por exemplo.

A excreção do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu foi predominantemente renal em função de ser um composto hidrofílico, com expressiva captação renal, sendo a captação máxima de 64,12 ± 4,11 %AI/g com 15 minutos. É importante mencionar que o

epitélio renal possui receptores de PSMA de forma que é esperada uma captação específica neste órgão além de ser a via de eliminação, o que o torna um órgão dose limitante (AWANG et al., 2018).

Embora existam poucos estudos pré-clínicos *in vivo* na literatura com o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, a captação renal com 30 minutos foi condizente com resultado encontrado na literatura (aproximadamente 30 %AI/g, 1 hora após a injeção) para o PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador (ITG, Alemanha) (UMBRICHT et al., 2017).

Para minimizar o impacto da dose nos rins dos pacientes, tem sido administrado, por via endovenosa, uma bolsa de aminoácidos carregados positivamente (5% de lisina e 10% de L-arginina em 1,6 litros) para promover o bloqueio renal e impedir uma rápida captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nos rins. Para tanto, a sua administração é iniciada 30 minutos antes da dose do radiofármaco e permanece por 4 horas (BAUM et al., 2016). Este mesmo efeito pode ser evidenciado em animais pela administração em excesso do peptídeo não marcado ou de um competidor como o 2-PMPA (CHATALIC et al., 2016).

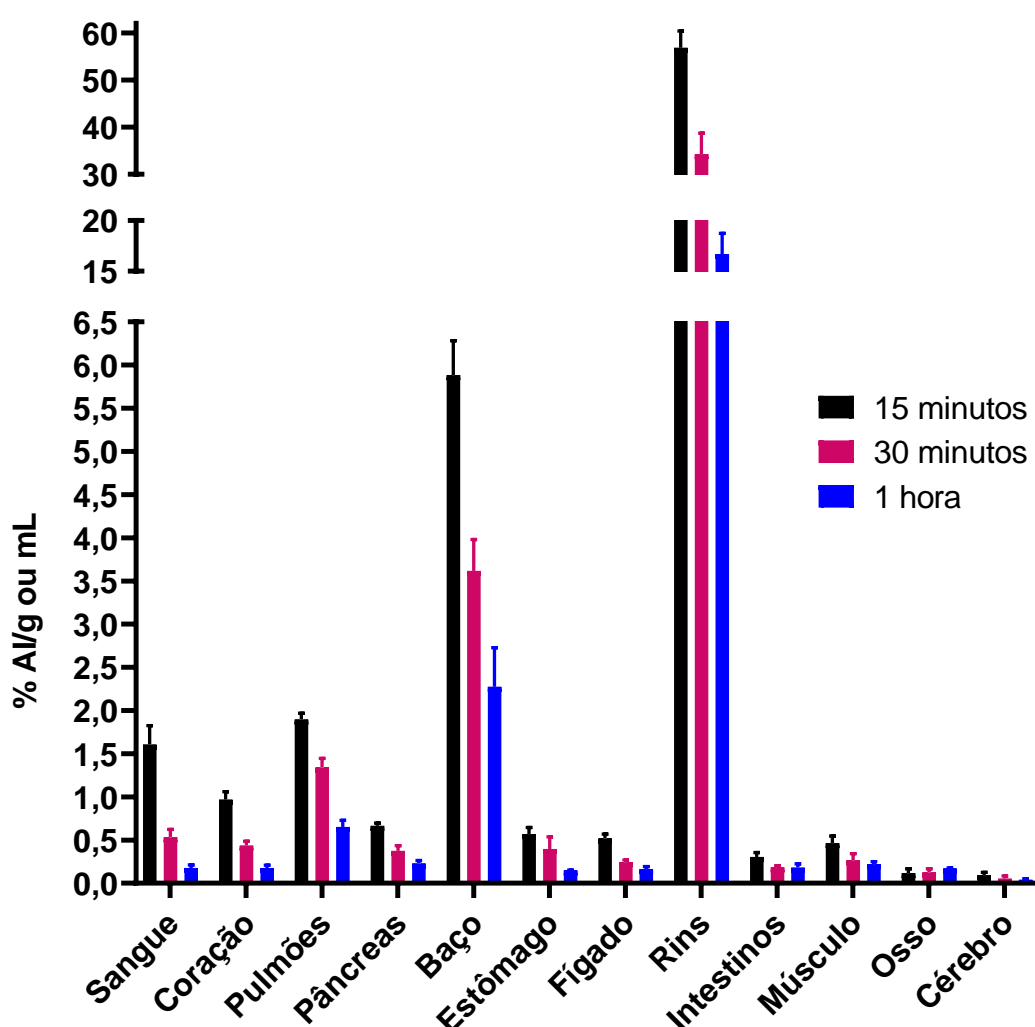
### **7.11.2 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador em camundongos *BALB/c* machos sadios**

Observou-se rápido clareamento sanguíneo, corroborado pelos dados farmacocinéticos. Após uma hora da administração, permaneciam circulantes apenas  $0,18 \pm 0,04$  %AI/mL. Este resultado foi considerado consistente com os valores de captação nos rins, sendo de  $60,59 \pm 4,30$  %AI/g e  $16,69 \pm 2,04$  %AI/g, para 15 minutos e uma hora, respectivamente.

Destacou-se a elevada captação esplênica de  $5,88 \pm 0,40$  %AI/g,  $3,61 \pm 0,37$  %AI/g e  $2,27 \pm 0,45$  %AI/g nos tempos de 15 minutos, 30 minutos e uma hora, respectivamente.

Os resultados da biodistribuição do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador, em camundongos *BALB/c* machos saudáveis estão apresentados na figura 53. Os dados foram expressos pela porcentagem média de atividade injetada por grama de tecido ou órgão (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) e corrigidos pelo erro padrão.

**Figura 53** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu obtido com lutécio-177 com carregador com atividade específica de 33,95 MBq/μg em camundongos *BALB/c* machos saudáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

O pulmão apresentou captação inicial (15 minutos) de  $1,90 \pm 0,07$  %AI/g a qual reduziu cerca de três vezes após uma hora de experimentação ( $0,65 \pm 0,07$  %AI/g). O intestino, outro órgão com expressão de PSMA apresentou captação

discreta dentro do período analisado ( $0,31 \pm 0,05$  %Al/g aos 15 minutos e  $0,18 \pm 0,04$  %Al/g após uma hora) (tabela 16).

Foi observado captação hepática inicial (15 minutos) de  $0,52 \pm 0,05$  %Al/g que foi reduzida em aproximadamente três vezes após uma hora da administração ( $0,16 \pm 0,03$  % Al/g).

**Tabela 16** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 com carregador com atividade específica de 33,95 MBq/μg em camundongos *BALB/c* machos saudáveis. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%Al/g) ou por mL de sangue (%Al/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%Al/g de órgão ou tecido ou mL de sangue		
	15 minutos	30 minutos	1 hora
Sangue	$1,61 \pm 0,22$	$0,53 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,04$
Coração	$0,97 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,03$
Pulmões	$1,90 \pm 0,07$	$1,34 \pm 0,10$	$0,65 \pm 0,07$
Pâncreas	$0,66 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,04$
Baço	$5,88 \pm 0,40$	$3,61 \pm 0,37$	$2,27 \pm 0,45$
Estômago*	$0,57 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,14$	$0,15 \pm 0,01$
Fígado	$0,52 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,03$
Rins	$60,59 \pm 4,30$	$37,42 \pm 5,48$	$16,69 \pm 2,04$
Intestinos*	$0,31 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,04$
Músculo	$0,46 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,07$	$0,22 \pm 0,01$
Ossos	$0,12 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$
Cérebro	$0,09 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$

\*Com conteúdo

Fonte: autor da tese.

### 7.11.3 Comparação das biodistribuições de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador e com lutécio-177 com carregador em camundongos *BALB/c* machos saudáveis

Para efeitos de comparação, foi escolhido o tempo de uma hora após a administração do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, pelo evidente clareamento sanguíneo. Foi analisada estatisticamente a variação da captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nos órgãos com expressão de PSMA (pulmão, intestinos e rins), além de fígado e baço

(apresentam captação natural do radiofármaco) e músculo (como representativo do background de tecido não visceral).

Observou-se que houve maior retenção do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com menor atividade específica (lutécio-177 com carregador) nos pulmões ( $P = 0,0008$ ), baço ( $P = 0,0107$ ), fígado ( $P = 0,0061$ ), intestinos ( $P = 0,0316$ ) e músculo ( $P = 0,0171$ ). Não houve diferença significativa nos rins (tabela 17).

**Tabela 17** – Comparação da captação de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador no tempo de uma hora em camundongos *BALB/c* machos saudáveis. Os resultados foram expressos na média da porcentagem e erro padrão da atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) ( $n=4$ ).

Material biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue	
	Com carregador	Sem carregador
Pulmões	0,65 ± 0,07	0,18 ± 0,05
Baço	2,27 ± 0,45	0,40 ± 0,13
Fígado	0,16 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Rins	16,69 ± 2,04	29,35 ± 9,47
Intestinos*	0,18 ± 0,04	0,05 ± 0,02
Músculo	0,22 ± 0,01	0,04 ± 0,04

\*Com conteúdo

Fonte: autor da tese.

Esta análise comparativa demonstrou que a maior presença de PSMA-617 não radiomarcado em função das condições pré-estabelecidas de produção com o lutécio-177 com carregador, conferiu um retardo na eliminação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu de órgãos viscerais com expressão basal de receptor PSMA, assim como no fígado e baço.

Não foi encontrado na literatura consultada referência à expressão de receptor PSMA nos órgãos fígado e baço. Apesar disto, observou-se expressiva captação no baço, especialmente nos animais que receberam o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu de menor atividade específica.

A comparação da captação dos órgãos evidenciou a diferença na eliminação dos radiofármacos obtidos com atividades específicas diferentes, particularmente de órgãos viscerais não alvo.

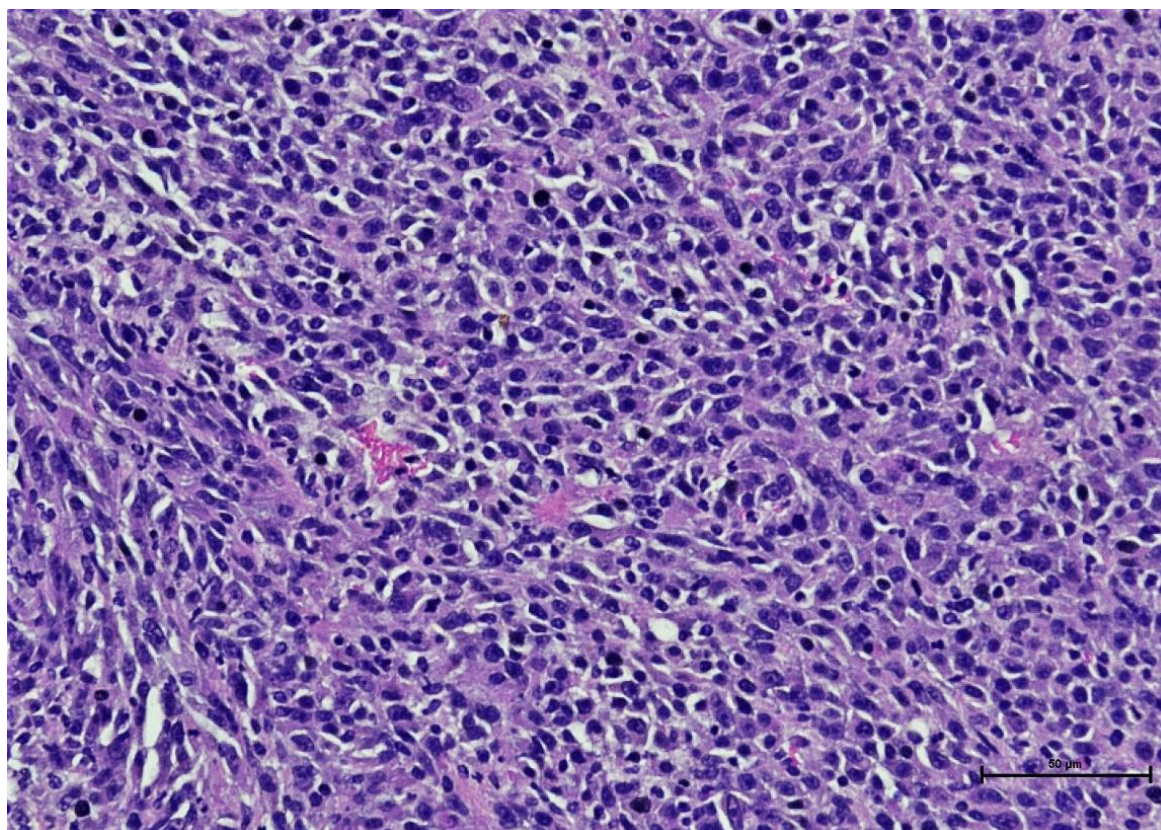
O estudo *in vivo* com animais sadios demonstrou que o emprego de duas atividades específicas diferentes não influenciou na farmacocinética do radiofármaco, tão pouco no clareamento sanguíneo. Contudo, observou-se um retardo na eliminação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu de órgãos viscerais não alvo (fígado, baço, pâncreas) na marcação com menor atividade específica. Estas diferenças se mantiveram significativas até o tempo de 1 hora do ensaio de biodistribuição. Não houve diferença significativa na captação renal.

Este estudo atestou a estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu *in vivo*, pois não se observou incremento da captação óssea (<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> possui tropismo por osso), para ambas as atividades específicas estudadas.

### 7.12 Estudos de biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *SCID* machos com tumor de LNCaP

Foi observado que a maioria das células apresentavam formato poligonal ou de eixo, não foi notado grau de diferenciação entre as células, observou-se alta proliferação celular, desorganização tecidual, heterocromatina (células em estágios diferentes do ciclo celular) e polimorfismo nuclear com pouco citoplasma, desta forma caracterizou-se como câncer de próstata, oriundo da inoculação de células LNCaP (figura 54).

**Figura 54** – Corte histológico de tumor de próstata derivado da inoculação de células LNCaP em flanco esquerdo de camundongo *SCID* macho, aumento de 200 vezes.



Fonte: autor da tese.

O estudo de biodistribuição realizado em camundongos *SCID* com modelo de tumor de próstata (células LNCaP) possibilitou avaliar, de forma comparativa, a captação nos diferentes órgãos e no tumor, ao utilizar-se o radiofármaco PSMA-617-<sup>177</sup>Lu obtido com alta e baixa atividade específica.

Os tumores foram avaliados pela massa (g) e pelo volume (mm<sup>3</sup>) , conforme a fórmula abaixo (COUTINHO et al., 2007) (16).

$$Volume = comprimento^2 \times largura \times 0,52 \quad (16)$$

Os valores de massa (P = 0,2218) e volume (P = 0,2805) não apresentaram diferença estatística entre os ensaios (tabela 18), de forma que foi possível comparar os resultados de captação tumoral do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu independentemente da atividade específica de marcação em função da presença ou ausência de carregador no lutécio-177.

**Tabela 18** – Comparação do volume (mm<sup>3</sup>) e da massa (g) dos tumores de LNCaP desenvolvidos nos camundongos *SCID* machos nos ensaios de biodistribuição de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (com carregador e sem carregador). Dados expressos pela média e desvio padrão (n=16).

<b>Lutécio-177</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Volume (mm<sup>3</sup>)</b>
<b>Com carregador (IDB, Holanda)</b>	1,185 ± 0,847	761,3 ± 599,5
<b>Sem carregador (INM, Rússia)</b>	0,967 ± 0,469	618,7 ± 608,8
<b>Valor P</b>	0,2218	0,2805

Fonte: autor da tese.

Para facilitar a discussão, as biodistribuições de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com os camundongos *SCID* machos com tumor de próstata, que utilizaram lutécio-177 com carregador e sem carregador, foram separadas em subtópicos distintos e foi dedicado um tópico apenas para comparação dos resultados.

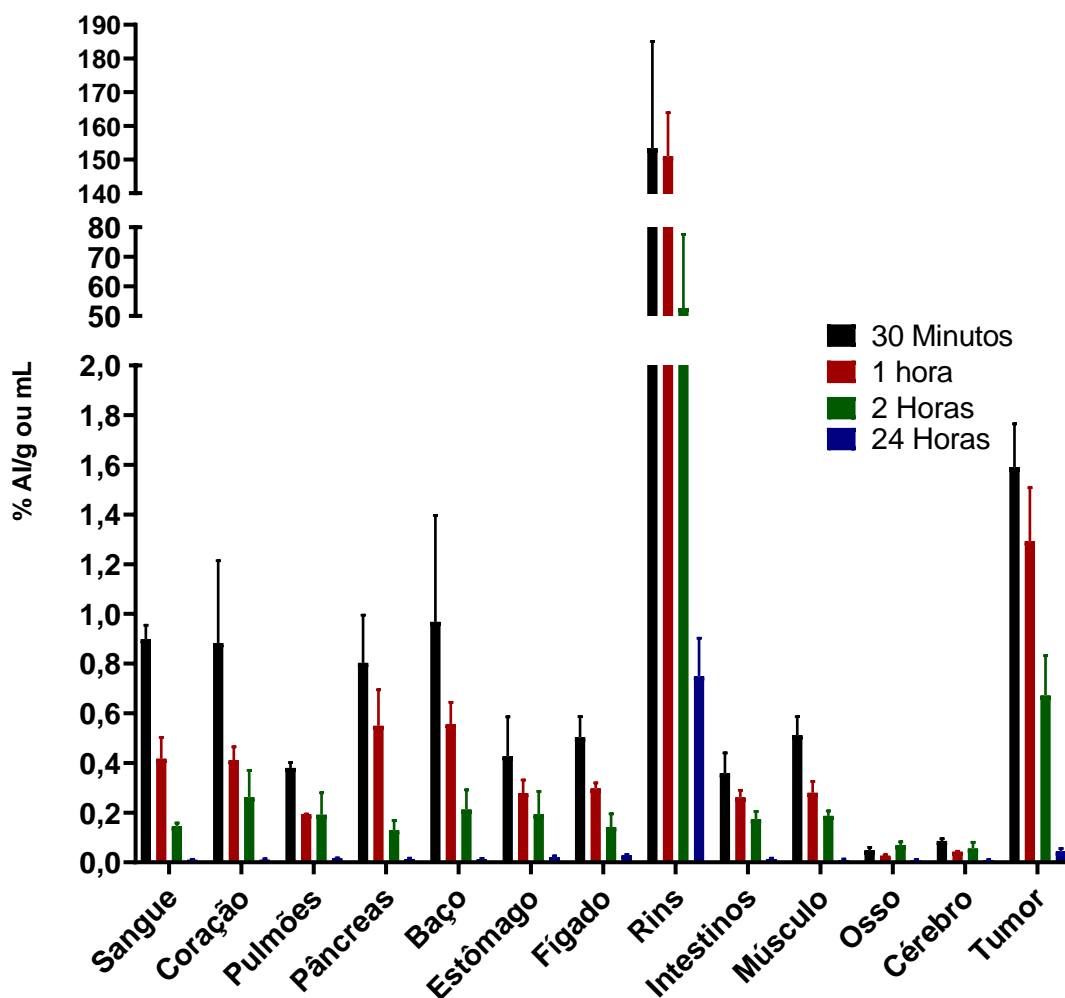
### **7.12.1 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador em camundongos *SCID* machos com tumor de LNCaP**

Na biodistribuição do PSMA-617 marcado com o lutécio-177 sem carregador (INM, Rússia), observou-se uma alta captação renal persistente por 1 hora com 153,3 ± 31,72 %AI/g, posteriormente teve uma redução com 2 horas (79,9 ± 32,5 %AI/g). Valores altos de captação renal também foram observados em um estudo de biodistribuição conduzido para o radiofármaco PSMA-617-<sup>111</sup>In, em



animais com modelo tumoral, sendo de  $290 \pm 29$  %AI/g e  $126 \pm 15$  %AI/g para 1 hora e 4 horas de biodistribuição, respectivamente (GOURNI et al., 2015).

**Figura 55** – Biodistribuição do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  com lutécio-177 sem carregador com atividade específica de 74 MBq/ $\mu\text{g}$  em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

Notou-se que após 24 horas havia apenas traços do marcador molecular no sangue, órgãos e tecido removidos no experimento. Observou-se uma captação inicial com 30 minutos no tumor de  $1,172 \pm 0,43$  %AI/g (figura 55), a qual manteve-se estável com 1 hora com  $1,292 \pm 0,216$  %AI/g e diminuindo após 2 horas para  $0,671 \pm 0,16$  %AI/g, sendo que a redução observada entre os tempos de 30 minutos e 2 horas foi significativa ( $P = 0,0127$ ).

Os dados de biodistribuição dos demais órgãos e tecidos excisados foram disponibilizados na tabela 19.

**Tabela 19** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 sem carregador sob a atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (% AI/g) ou por mL de sangue (% AI/mL), Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue			
	30 minutos	1 hora	2 horas	24 horas
Sangue	0,90 ± 0,55	0,42 ± 0,09	0,14 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Coração	0,88 ± 0,33	0,41 ± 0,05	0,26 ± 0,11	0,02 ± 0,01
Pulmões	0,38 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,09	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,80 ± 0,19	0,55 ± 0,14	0,13 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Baço	0,97 ± 0,43	0,56 ± 0,09	0,21 ± 0,08	0,01 ± 0,01
Estômago*	0,43 ± 0,16	0,28 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,02 ± 0,01
Fígado	0,50 ± 0,08	0,30 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Rins	153,3 ± 31,72	150,9 ± 12,91	52,6 ± 24,91	0,75 ± 0,15
Intestinos*	0,36 ± 0,08	0,26 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Músculo	0,51 ± 0,08	0,28 ± 0,05	0,19 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Osso	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Cérebro	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Tumor	1,59 ± 0,17	1,29 ± 0,22	0,67 ± 0,16	0,04 ± 0,01

\*Com conteúdo  
Fonte: autor da tese.

Os órgãos com expressão de receptores de PSMA, pulmão e intestinos, apresentaram discreta captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. O fígado e o baço, dois órgãos com captação natural do radiofármaco, também exibiram baixa captação, com a saída dos respectivos órgãos consistente com o clareamento sanguíneo.

O rápido clareamento sanguíneo é outro aspecto importante a se destacar, entre os tempos de 30 minutos e 1 hora a redução da % AI/mL de sangue foi estatisticamente significativa ( $P = 0,0143$ ). Todavia o clareamento nos camundongos *SCID* foi mais lento do que o observado nos camundongos *BALB/c*

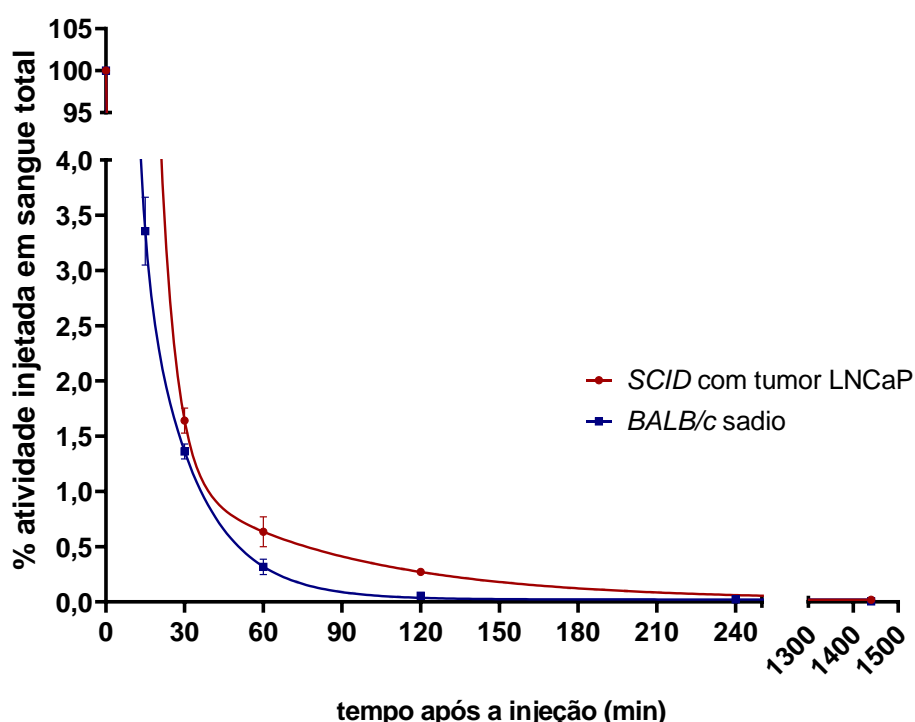
nos tempos de 30 minutos ( $P = 0,0143$ ), 1 hora ( $P = 0,0142$ ) e 2 horas ( $P = 0,0286$ ) (tabela 20).

**Tabela 20** – Comparação da %AI no sangue entre camundongos machos sadios (*BALB/c*) e camundongos machos com tumor de próstata (*SCID*). Dados expressos pela média e erro padrão ( $n=4$ ).

Tempo	Animais sadios ( <i>BALB/c</i> )	Animais com tumor ( <i>SCID</i> )
30 minutos	$0,52 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,05$
1 hora	$0,13 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,09$
2 horas	$0,02 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$

Fonte: autor da tese.

**Figura 56** – Comparação da curva de clareamento sanguíneo do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu marcado com lutécio-177 sem carregador em camundongos machos *BALB/c* sadios e *SCID* com tumor de próstata. Dados expressos em %AI em sangue total e erro padrão ( $n=4$ ).



Fonte: autor da tese.

Este retardamento da eliminação resultou em meia vida plasmática de 46,81 minutos para o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em camundongos *SCID* (figura 56), enquanto que no modelo sadio (*BALB/c*) a meia vida foi de 13,86, esta diferença foi

considerada estatisticamente significativa ( $P = 0,0154$ ) e pode ser explicada pelas alterações fisiológicas causadas pelo tumor nos camundongos *SCID*.

Este clareamento permitiria a aquisição de imagens com o lutécio-177 (emissão gama com 208,5 keV), de forma que seria possível acompanhar a terapia do tumor e de possíveis metástases ósseas ou viscerais, entretanto a região próxima aos rins e bexiga seriam prejudicadas em função da excreção ser principalmente pela via renal.

Comparou-se a razão da captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nos órgãos com expressão de receptor de PSMA, além do baço e fígado (tabela 21). Com uma hora após a administração observou-se maior razão de captação relativa do tumor com os pulmões e intestinos. O aumento da razão tumor *versus* sangue, tecido e órgãos de interesse ao longo do tempo, demonstra a especificidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu pelo tumor. Os rins apresentaram padrão inverso da razão por serem a principal via de eliminação.

**Tabela 21** – Comparação da razão da captação do tumor (%AI/g) com os órgãos ou tecido (%AI/g) ou sangue (%AI/mL) em função do tempo (30 minutos, 1 hora, 2 horas) na biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 (sem carregador) sob a atividade específica de 74 MBq/ $\mu$ g em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Calculado a partir das médias de %AI/g ou mL (n=4).

Material biológico	Razão da captação do tumor vs tecido, órgãos ou sangue		
	30 minutos	1 hora	2 horas
Sangue	1,76	3,07	4,79
Pulmões	4,18	6,78	3,72
Baço	1,64	2,32	3,16
Fígado	3,16	4,34	4,72
Rins	0,01	0,01	0,01
Intestinos*	4,44	4,96	3,86

\*com conteúdo

Fonte: autor da tese.

A comparação da captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu pelo sangue e órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, rins e intestinos) entre os experimentos realizados com camundongos sadios e com tumor de próstata revelou aumento

significativo da captação do radiofármaco nos camundongos *SCID* no sangue ( $P = 0,0182$ ), fígado ( $P = 0,0005$ ), rins ( $P = 0,0008$ ) e intestinos ( $P = 0,0009$ ) (tabela 22).

**Tabela 22** – Comparação da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (sem carregador) no sangue (%AI/mL), pulmões, baço, fígado, rins e intestinos (%AI/g) no tempo de 1 hora nos modelos animais sadio e tumoral. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).

<b>Material biológico</b>	<b>Modelo sadio</b>	<b>Modelo tumoral</b>
Sangue	0,13 ± 0,03	0,42 ± 0,09
Pulmões	0,18 ± 0,05	0,19 ± 0,01
Baço	0,40 ± 0,13	0,56 ± 0,09
Fígado	0,01 ± 0,01	0,30 ± 0,02
Rins	29,35 ± 9,47	150,9 ± 12,91
Intestinos*	0,05 ± 0,02	0,26 ± 0,03

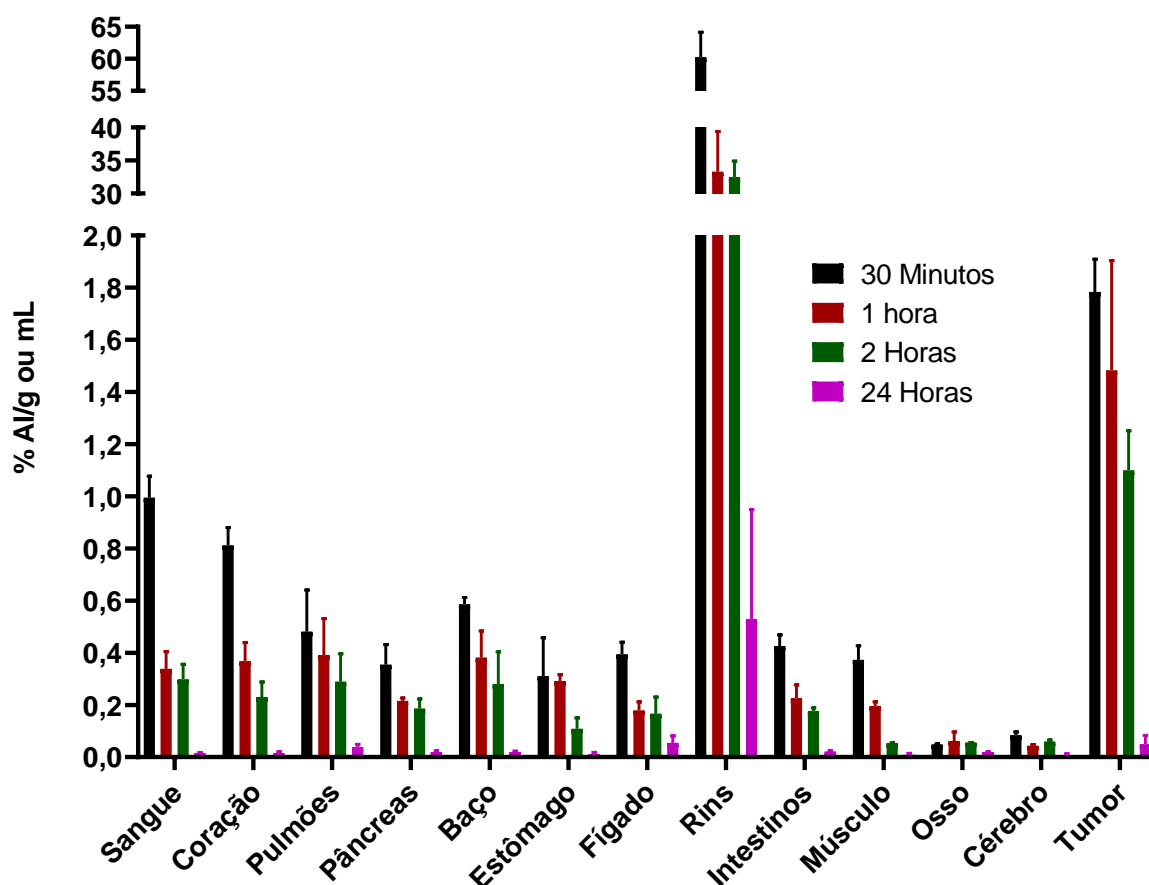
\*com conteúdo

Fonte: autor da tese.

### 7.12.2 Biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador em camundongos *SCID* machos com tumor de LNCaP

A biodistribuição do PSMA-617 marcado com o lutécio-177 com carregador, foi representada na figura 57. Houve uma captação renal inicial com 30 minutos de  $60,21 \pm 3,937$  %AI/g, que reduziu em uma hora para  $33,29 \pm 6,089$  %AI/g e manteve-se estável até duas horas após a injeção. A redução observada entre 30 minutos e 1 hora foi considerada significativa ( $P = 0,0057$ ).

**Figura 57** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 com carregador sob a atividade específica de 40,01 MBq/ $\mu$ g em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

Após 30 minutos da administração do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, observou-se captação tumoral de  $1,78 \pm 0,12$  %AI/g, a qual manteve uma estabilidade com 1 hora ( $1,48 \pm 0,42$  %AI/g) e posteriormente apresentou uma queda com 2 horas

( $1,10 \pm 0,16$  %Al/g). Houve significância estatística entre os tempos de 30 minutos e 2 horas ( $P = 0,0066$ ).

Os dados de biodistribuição dos demais órgãos e tecido retirados após a eutanásia foram dispostos na tabela 23. Notou-se que após 24 horas havia apenas traços do marcador molecular no sangue, órgãos, tecido e tumor removidos no experimento.

**Tabela 23** – Biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 (com carregador) sob a atividade específica de 40,01 MBq/μg em camundongos SCID machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos na média da porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (% Al/g) ou por mL de sangue (% Al/mL). Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%Al/g de órgão ou tecido ou mL de sangue			
	30 minutos	1 hora	2 horas	24 horas
Sangue	0,99 ± 0,08	0,34 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,01 ± 0,01
Coração	0,81 ± 0,07	0,37 ± 0,07	0,32 ± 0,06	0,01 ± 0,01
Pulmões	0,48 ± 0,16	0,39 ± 0,14	0,30 ± 0,11	0,04 ± 0,01
Pâncreas	0,35 ± 0,07	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Baço	0,58 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,28 ± 0,12	0,02 ± 0,01
Estômago*	0,31 ± 0,15	0,29 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,01 ± 0,01
Fígado	0,39 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,06	0,05 ± 0,03
Rins	60,21 ± 3,94	33,29 ± 6,09	32,45 ± 2,44	0,53 ± 0,42
Intestinos*	0,43 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Músculo	0,37 ± 0,05	0,19 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Osso	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,04
Cérebro	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Tumor	1,78 ± 0,12	1,48 ± 0,42	1,10 ± 0,16	0,05 ± 0,15

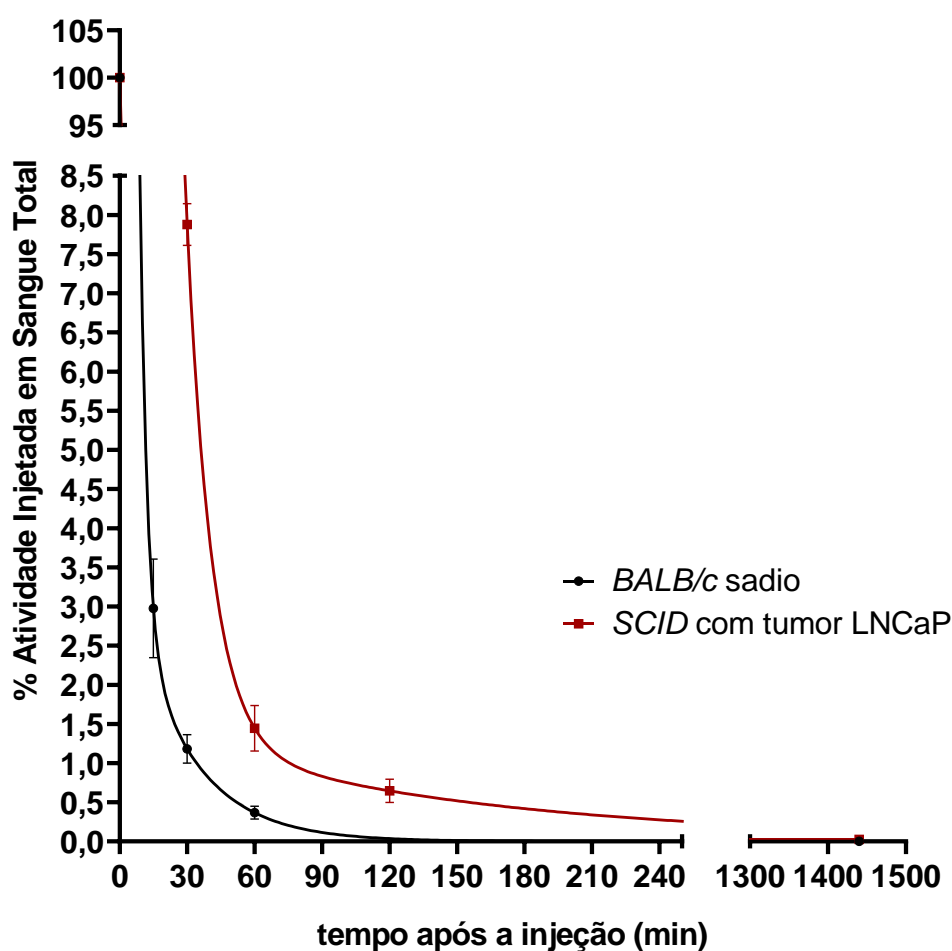
\*com conteúdo

Fonte: autor da tese.

Houve um rápido clareamento sanguíneo com significância estatística entre 30 minutos e 1 hora ( $P = 0,0004$ ). Contudo, este clareamento nos camundongos SCID revelou-se mais lento do que o visualizado nos camundongos BALB/c nos tempos de 30 minutos ( $P = 0,0124$ ). Este retardamento da eliminação resultou em meia vida plasmática de 91,77 minutos para o PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em

camundongos *SCID* (figura 58), enquanto que no modelo sadio (*BALB/c*) a meia vida foi de 17,89 minutos, esta diferença foi considerada estatisticamente significativa ( $P = 0,0001$ ) e pode ser explicada pelas alterações fisiológicas causadas pelo tumor nos camundongos *SCID*. Esta diferença foi atribuída pela diferença dos modelos animais estudados (*BALB/c versus SCID*) e as alterações fisiológicas provocadas pela presença do tumor nos camundongos *SCID*.

**Figura 58** – Comparação da curva de clareamento sanguíneo do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  marcado com lutécio-177 com carregador em camundongos machos *BALB/c* sadios e *SCID* com tumor de próstata. Dados expressos em %AI em sangue total e erro padrão ( $n=4$ ).



Fonte: autor da tese.

O rápido clareamento sanguíneo e de órgãos viscerais do PSMA-617- $^{177}\text{Lu}$  sugere a possibilidade de aquisição de imagens com o lutécio-177 (emissão gama com 208,5 keV), para acompanhamento da terapia do câncer de próstata. A região adjacente aos rins e bexiga seria prejudicada pela eliminação renal deste radiofármaco.



A razão de captação PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no tumor *versus* o sangue mostrou-se mais efetiva com uma hora da administração do radiofármaco. Este mesmo padrão se repetiu no fígado, pulmões e intestinos (tabela 24). A razão tumor/baço foi discretamente superior após duas horas da administração do radiofármaco.

**Tabela 24** – Comparação da razão da captação do tumor (%AI/g) com os órgãos ou tecido (%AI/g) ou sangue (%AI/mL) em função do tempo (30 minutos, 1 hora, 2 horas) na biodistribuição do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com lutécio-177 (com carregador) sob a atividade específica de 40,01 MBq/μg em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Calculado a partir das médias de %AI/g ou mL (n=4).

<b>Material biológico</b>	<b>Razão da captação do tumor vs tecido, órgãos ou sangue</b>		
	<b>30 minutos</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>
Sangue	1,80	4,35	3,67
Pulmões	3,71	3,79	3,66
Baço	3,05	3,89	3,93
Fígado	4,54	8,33	6,62
Rins	0,03	0,04	0,03
Intestinos*	4,19	6,59	6,28

\*com conteúdo  
Fonte: autor da tese.

Comparou-se a captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no sangue e órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, rins e intestinos) entre os experimentos realizados com camundongos saudáveis e com tumor de próstata. Esta análise revelou aumento significativo da captação do radiofármaco nos camundongos *SCID* no sangue ( $P = 0,0444$ ) e rins ( $P = 0,0499$ ) (tabela 25). Se fez necessário salientar que a discrepância observada na captação esplênica, no modelo com animais saudáveis, não esteve presente no modelo tumoral, esta diferença foi considerada significativa ( $P = 0,0112$ ).

**Tabela 25** – Comparação da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (com carregador) no sangue (%AI/mL), pulmões, baço, fígado, rins e intestinos (%AI/g) no tempo de 1 hora nos modelos animais saudáveis e tumoral. Dados expressos pela média e erro padrão ( $n=4$ ).

<b>Material biológico</b>	<b>Modelo sadio</b>	<b>Modelo tumoral</b>
Sangue	0,18 ± 0,04	0,34 ± 0,07
Pulmões	0,65 ± 0,07	0,39 ± 0,14
Baço	2,27 ± 0,45	0,38 ± 0,01
Fígado	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,03
Rins	16,69 ± 2,04	33,29 ± 6,09
Intestinos*	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,05

\*com conteúdo

Fonte: autor da tese.

### **7.12.3 Comparação das biodistribuições de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador e com lutécio-177 com carregador em camundongos *SCID* machos com tumor de LNCaP**

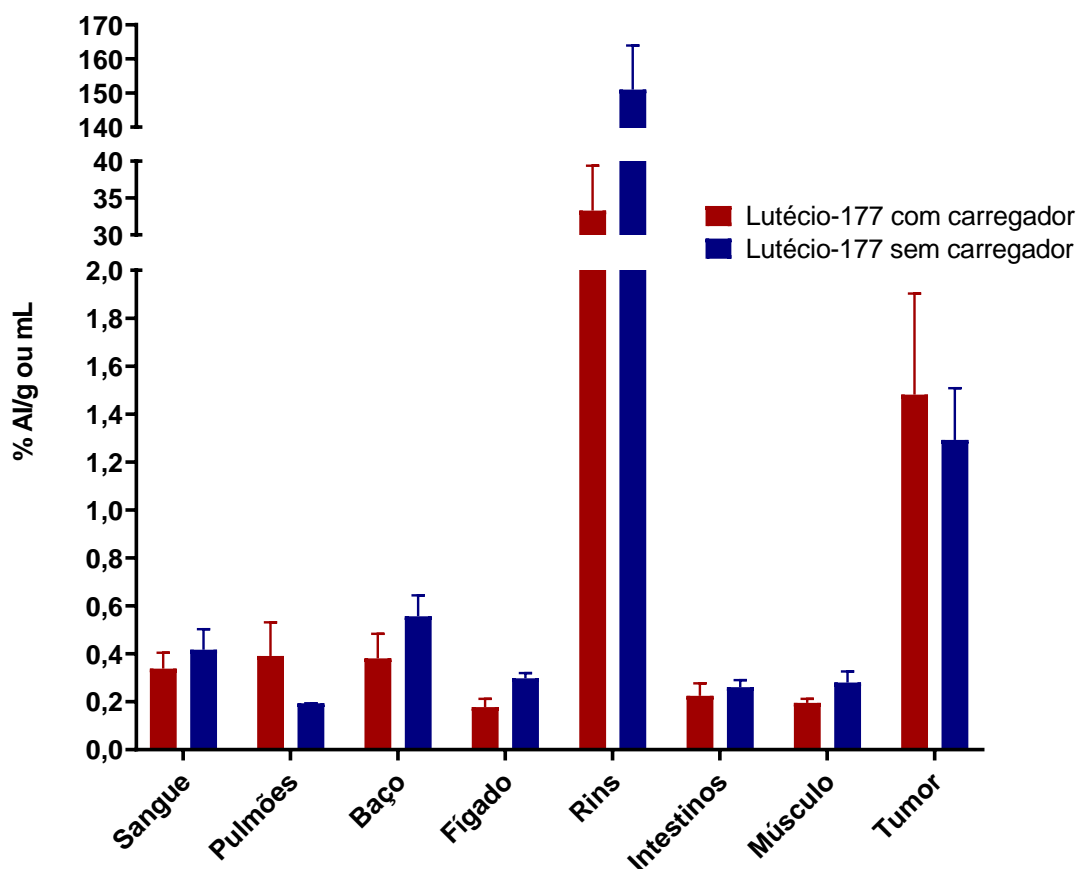
Para a comparação dos resultados obtidos com o PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 isento de carregador e lutécio-177 com carregador, foi escolhido o tempo de uma hora após a administração do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, pelo clareamento sanguíneo evidenciado, pelas relações tumor/órgão serem mais pronunciadas com uma hora, bem como o ensaio de bloqueio da captação do

radiofármaco, em camundongos SICD machos com câncer de próstata, foi realizado neste referido tempo.

Foi analisada estatisticamente a variação da captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nos órgãos com expressão de PSMA (pulmão, intestinos e rins), além de fígado e baço e músculo (como representativo do background).

Por meio de uma análise comparativa, avaliou-se a influência da atividade específica do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em função do tipo de lutécio-177 utilizado (com e sem carregador) no sangue, órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, intestinos e rins), músculo e tumor. Observou-se maior captação do radiofármaco marcado com lutécio-177 sem carregador no fígado ( $P = 0,0238$ ) e rins ( $P = 0,0023$ ). A captação tumoral foi semelhante, independentemente do lutécio-177 utilizado ( $P = 0,3582$ ) (figura 59).

**Figura 59** – Comparação da captação do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador no sangue, órgãos de interesse (pulmões, fígado, rins e intestinos), músculo e tumor, após 1 hora da administração (n=4).



Fonte: autor da tese.

Sob o aspecto de minimização de doses em órgãos não alvo, a utilização de lutécio-177 sem carregador poderia aumentar a dosimetria dos rins, sem melhorar a captação tumoral. Todavia o dano renal poderia ser prevenido por meio da administração de bolsa de aminoácidos carregados positivamente que promoveriam a redução imediata da captação renal (PILLAI; KNAPP, 2015).

A alta captação renal do PSMA-617, marcado com o lutécio-177 (Perkin Elmer, EUA, sem carregador) foi relatada em 2015 por meio de experimento de biodistribuição em camundongos machos *Nude*. Neste experimento os autores administraram 1 MBq em aproximadamente 0,06 nmoles do peptídeo radiomarcado (1,92 MBq/ $\mu$ g) que resultou em uma captação renal de  $113,3 \pm 23,4$  %AI/g após 1 hora de experimento (BENESOVA et al., 2015b). A alta captação renal era esperada em função da característica hidrofílica do PSMA-617 (Log P experimental de  $-2,11 \pm 0,03$ ), pelo rápido clareamento sanguíneo observado na farmacocinética (tempo de meia vida plasmática inferior a 18 minutos) e pela presença de receptores de PSMA no túbulo proximal nos rins (VIRGOLINI et al., 2018).

Observou-se alta captação renal do PSMA-617 marcado com lutécio-177 sem carregador no tempo de 1 hora ( $150,9 \pm 12,91$  %AI/g). Na literatura consultada, os análogos de PSMA com eliminação predominantemente renal apresentaram valores elevados em %AI/g nos rins, em estudos pré-clínicos, para o PSMA-11- $^{68}\text{Ga}$  ( $139,4 \pm 24,1$  %AI/g), PSMA-I&F- $^{68}\text{Ga}$  ( $105 \pm 22,7$  %AI/g), PSMA-I&S- $^{111}\text{In}$  ( $191 \pm 24$  %AI/g), PSMA-I&T- $^{111}\text{In}$  ( $122 \pm 27$  %AI/g), CA003- $^{64}\text{Cu}$  ( $67,04 \pm 20,89$  %AI/g) e DCFPyL- $^{18}\text{F}$  ( $140 \pm 30$  %AI/g). Apesar destes dados, a princípio, não serem comparáveis em função das diferenças do radioisótopo empregado, precursor e linhagem animal, auxiliaram na compreensão da elevada captação renal (CHATALIC et al., 2016; CHEN et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2019; EDER et al., 2012; ROBU et al., 2017; SCHOTTELIUS et al., 2019).

Notadamente, há uma diferença na captação renal nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas do PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador (tabela 26).

**Tabela 26** – Comparação da captação renal (%AI/g) do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador e com carregador em camundongos machos *SCID* com tumor de próstata. Valores expressos pela média e erro padrão (n=4).

<b>Tempo</b>	<b>Com carregador</b>	<b>Sem carregador</b>
30 minutos	60,2 ± 3,94	153,3 ± 31,72
1 hora	33,3 ± 6,09	150,9 ± 12,91
2 horas	32,4 ± 2,44	52,6 ± 24,91

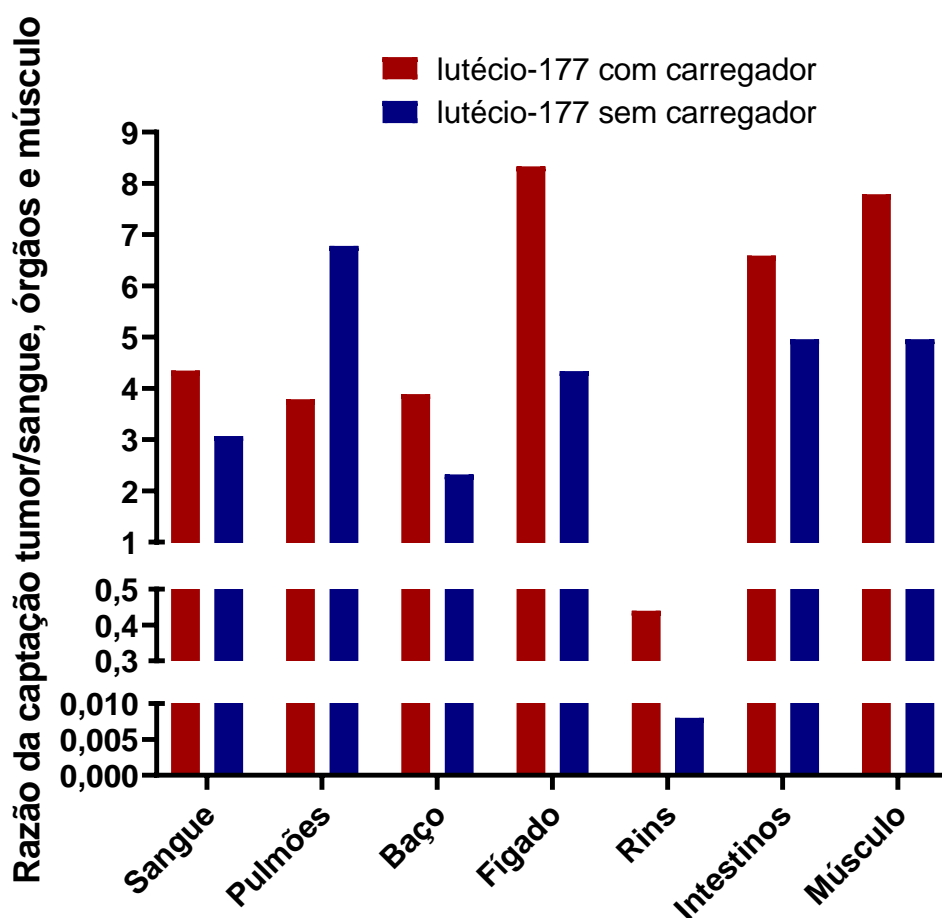
Fonte: autor da tese.

CHATALIC e colaboradores (2016), descreveram elevada captação renal ( $122 \pm 27$  %AI/g), após 1 hora da administração de 0,3 nmoles de PSMA-I&T- $^{111}\text{In}$ . Com administração de excesso molar de 3,3 vezes (administração de 1 nmol), observou-se decréscimo na captação renal de aproximadamente 2,5 vezes. Em comparação, na presente tese, o ensaio com PSMA-617 obtido com lutécio-177 sem carregador correspondeu a administração de 0,1 nmol (7,4 MBq), enquanto no ensaio com lutécio-177 com carregador resultou em inoculação de 0,18 nmoles (7,4 MBq). Este acréscimo de 1,8 vezes na quantidade de peptídeo injetado resultou na redução da captação renal de 2,55 vezes no tempo de 30 minutos, em 4,54 vezes no tempo de 1 hora e de 1,6 vezes no tempo de 2 horas.

A partir da análise dos valores da razão tumor/sangue, órgãos de interesse e músculo, foram observados valores mais elevados para o radiofármaco com menor atividade específica (lutécio-177 com carregador) no sangue (1,42 vezes), baço (1,68 vezes), fígado (1,92 vezes), rins (4 vezes), intestino (1,33 vezes) e músculo (1,57 vezes).

As maiores razões para o radiofármaco marcado com o lutécio-177 com carregador certamente promoverão uma melhor relação tumor/background e maior possibilidade de detecção/acompanhamento de tratamento de lesões. Em contrapartida, o emprego de lutécio-177 sem carregador demonstrou melhor clareamento nos pulmões (1,79 vezes) (figura 60).

**Figura 60** – Comparação da influência da atividade específica na razão de captação tumoral *versus* órgãos e músculo, sendo este representativo da captação não específica (background) na biodistribuição com 1 hora. Dados expressos pela média.



Fonte: autor da tese.

Estes experimentos e a análise comparativa demonstraram que a captação tumoral não foi afetada pela administração do radiofármaco com atividade específica mais baixa em função da necessidade de correção molar na marcação com o lutécio-177 com carregador. Estatisticamente, foi demonstrado haver poucas variações entre as duas biodistribuições, a se destacar os rins, principal via de eliminação do PSMA-617. É importante mencionar que a captação tumoral do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no tempo de 2 horas com o lutécio-177 com carregador ( $1,10 \pm$

0,16 %Al/g) e lutécio-177 sem carregador ( $0,67 \pm 0,16$  %Al/g) foi considerada sem significância estatística ( $P = 0,1018$ ).

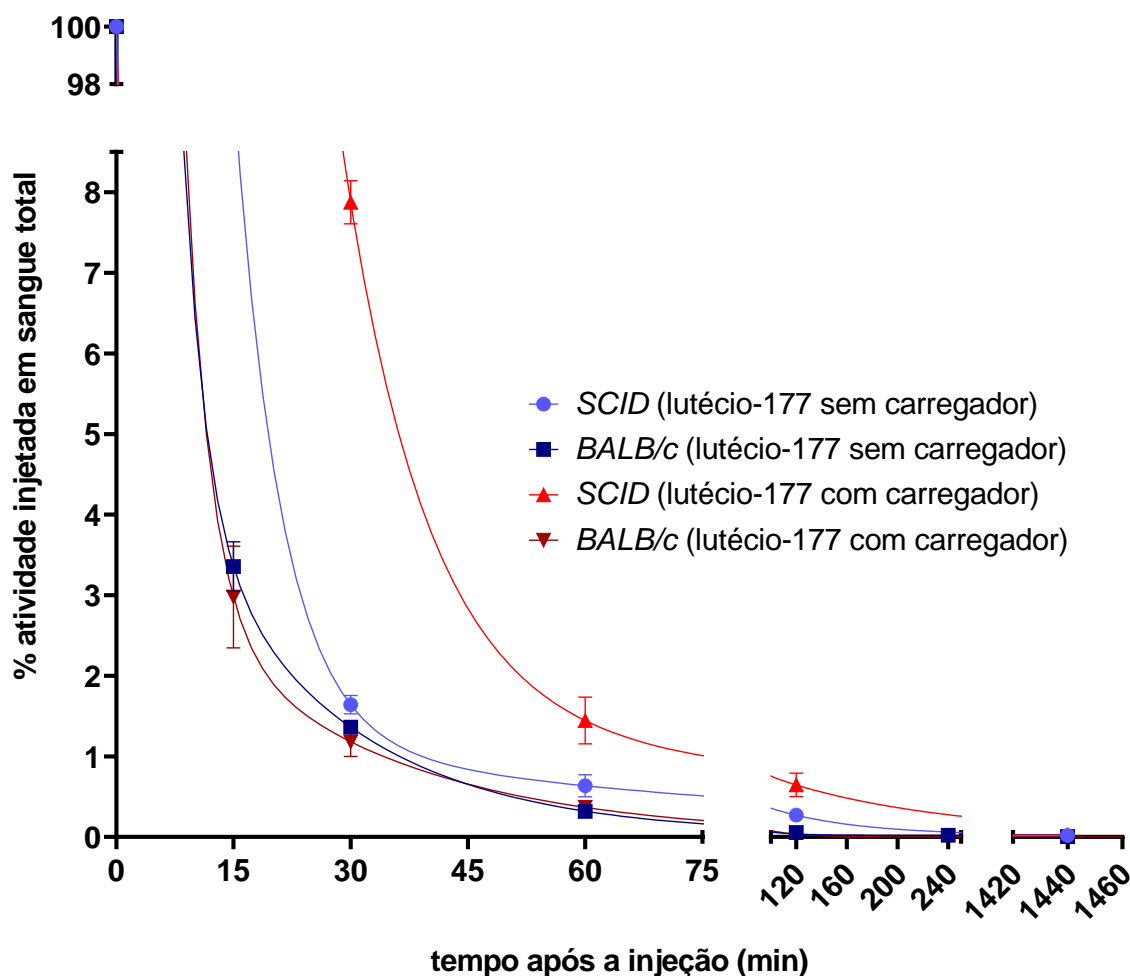
Em 2011, um grupo de pesquisadores avaliou o efeito da octreotida (liga-se ao mesmo receptor de somatostatina que o DOTATATO) na capacidade de identificação do tumor neuroendócrino e de metástases quando administrado DOTATATO-<sup>68</sup>Ga. Para tanto, dois grupos foram avaliados, pacientes que possuíam a octreotida na corrente sanguínea e pacientes sem octreotida. Este estudo demonstrou que a presença do medicamento octreotida não afetou a capacidade do radiofármaco, bem como melhorou a relação tumor/fígado, o que facilitaria a localização de lesões metastáticas (HAUG et al., 2011).

A relação tumor/fígado encontrada para o PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carregador, no geral mostrou-se maior (baço, fígado, intestinos e músculo) de forma que facilitaria a visualização da captação do radiofármaco em metástases localizadas nestes órgãos. Neste sentido, se fez necessário destacar o tempo de 1 hora, no qual visualizou-se melhores relações tumor/órgãos e tecido de interesse. Destacou-se também a menor captação renal, que diminuiria o impacto sobre o órgão causado pela radiação.

A diferença no comportamento de eliminação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu em virtude da presença ou ausência de carregador no radioisótopo lutécio-177 culminou em variação no tempo de meia vida plasmática. Para o lutécio-177 sem carregador, esta constante foi de 46,81 minutos, enquanto com o lutécio-177 com carregador apresentou meia vida plasmática de 91,77 minutos, ambos para animais com tumor. As curvas obtidas foram consideradas estatisticamente distintas ( $P < 0,0001$ ).

Com a comparação das curvas de farmacocinética obtidas com os camundongos *BALB/c*, sem carregador (meia-vida plasmática de 13,86 minutos) e com carregador (meia-vida plasmática de 17,89 minutos) foi evidenciado o deslocamento da curva para a direita no modelo tumoral, em especial quando utilizado o lutécio-177 com carregador (figura 61).

**Figura 61** – Comparação das curvas de farmacocinética obtidas a partir de injeção de 7,4 MBq de PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 sem carregador e com carregador em camundongos *BALB/c* e *SCID* com tumor de próstata. Dados expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

A diferença de massa inoculada nos camundongos em função do tipo de lutécio-177 empregado na radiomarcagem resultou em alteração na quantidade de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu presente no sangue (%AI em sangue total). Esta variação foi justificada pelo excesso molar administrado na marcação com menor atividade específica (lutécio-177 com carregador, 40,01 MBq/μg). Foi constatado



significância no tempo de 30 minutos ( $P = 0,0107$ ) entre os dois ensaios realizados (tabela 27).

**Tabela 27** – Comparação da %AI em sangue total observada na biodistribuição do PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador e sem carregador em camundongos machos *SCID* com tumor de próstata. Dados expressos pela média e erro padrão ( $n=4$ ).

<b>Tempo</b>	<b>Com carregador (IDB)</b>	<b>Sem carregador (INM)</b>	<b>Valor P</b>
30 minutos	7,877 ± 0,268	1,641 ± 0,114	0,0107
1 hora	1,444 ± 0,290	0,636 ± 0,136	0,0907
2 horas	0,646 ± 0,147	0,271 ± 0,024	0,1221

Fonte: autor da tese.

Independentemente do tipo de lutécio-177 utilizado (com ou sem carregador), não houve impacto na captação tumoral. Foi constatado que há vantagem no emprego de lutécio-177 com carregador quanto à relação tumor/músculo, fígado, baço, intestinos e rins, as quais minimizariam o impacto da dosimetria nos referidos tecido e órgãos. Em contrapartida, pela análise farmacocinética, foi evidenciado um clareamento sanguíneo mais lento do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com carregador, cujo reflexo na dosimetria do paciente necessitaria ser avaliado.

A marcação do PSMA-617 com lutécio-177 sem carregador possibilitou a padronização da atividade específica do radiofármaco (74 MBq/μg), de forma que não haveria variação da massa do peptídeo nas doses terapêuticas produzidas. Ao contrário, no caso do radiofármaco produzido com lutécio-177 com carregador, a massa de peptídeo variaria de acordo com a atividade específica do radioisótopo, não sendo possível manter uma especificação de atividade específica do radiofármaco, mas sim uma especificação baseada em faixa de atividade específica.

Em um aspecto global, o emprego do lutécio-177 com carregador implica em uma maior adição de peptídeo na formulação, que encareceria o processo de produção. Sob outro aspecto, a obtenção de lutécio-177 sem carregador costuma resultar em um radioisótopo mais caro do que comparado com a irradiação direta (PILLAI; KNAPP, 2015). Sendo assim, seria necessária uma análise de custos de produção envolvida para os dois tipos de lutécio-177, para que fosse possível

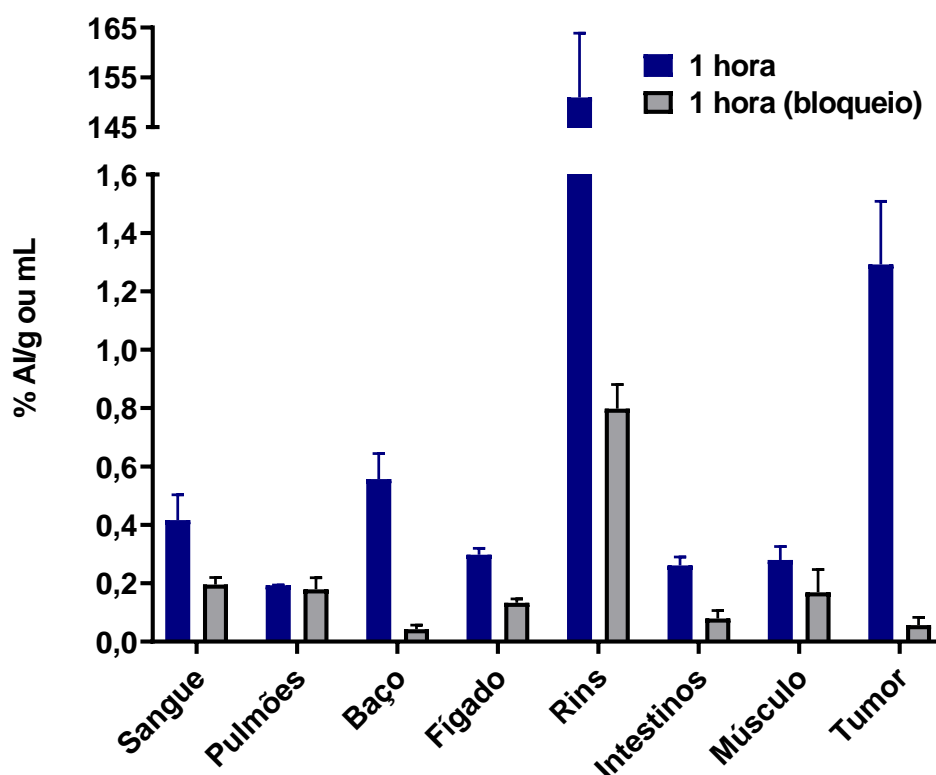
definir, sob o ponto de vista financeiro, se a ausência de carregador no radioisótopo encareceria o processo de produção do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu.

O estudo *in vivo* com animais com tumor de próstata desenvolvido a partir da inoculação de células LNCaP demonstrou que para as duas atividades específicas estudadas houve captação tumoral. Nas duas situações após 2 horas da administração houve redução significativa na captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu. Foi observado neste mesmo tempo que a presença de radiofármaco com menor atividade específica no tumor, apesar de ter sido superior, não foi significativa. A diferença na atividade específica resultou uma farmacocinética mais lenta para o PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 com carregador. Notadamente, a menor atividade específica foi responsável por uma eliminação mais lenta, o que resultou em menor captação renal. O clareamento do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu observados nos órgãos e sangue em relação ao tumor, até 2 horas após a administração do radiofármaco, revelou a especificidade da ligação.

### 7.13 Ensaio de bloqueio de captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu com administração de excesso de peptídeo não marcado em camundongos *SCID* machos com tumor de LNCaP

O ensaio de biodistribuição com bloqueio foi realizado conjuntamente com o ensaio descrito no item 7.12. Os resultados da biodistribuição do PSMA-617 marcado com lutécio-177 sem carregador, para o sangue, órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, rins e intestinos), músculo e tumor, em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata foram dispostos na figura 62.

**Figura 62** – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu sob a atividade específica de 74 MBq/μg (lutécio-177 sem carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata de células LNCaP. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e desvio padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

Este ensaio demonstrou diminuição da captação do radiofármaco no sangue ( $P = 0,0389$ ) e bloqueio efetivo no baço ( $P = 0,0044$ ), fígado ( $P = 0,0007$ ), rins ( $P = 0,0037$ ), intestino ( $P = 0,0020$ ) e tumor ( $P = 0,0138$ ) (tabela 28).

**Tabela 28** – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu sob a atividade específica de 74 MBq/μg (lutécio-177 sem carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue	
	Sem bloqueio	Com bloqueio
Sangue	0,42 ± 0,07	0,19 ± 0,02
Pulmões	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,04
Baço	0,56 ± 0,09	0,04 ± 0,01
Fígado	0,30 ± 0,02	0,13 ± 0,01
Rins	150,9 ± 12,91	0,80 ± 0,08
Intestinos*	0,26 ± 0,03	0,08 ± 0,03
Músculo	0,28 ± 0,05	0,17 ± 0,08
Tumor	1,29 ± 0,22	0,06 ± 0,03

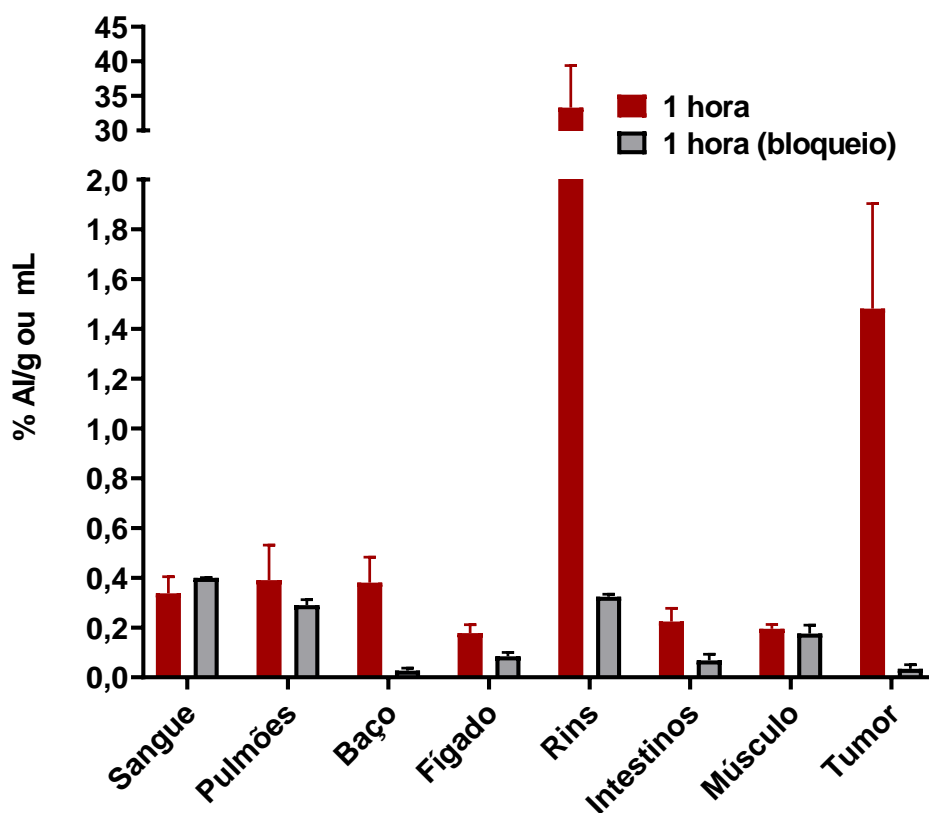
\* com conteúdo

Fonte: autor da tese.

Com base nas médias obtidas, foi evidenciado um deslocamento de 189 vezes do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu nos rins, que expressam receptor de PSMA no túbulo proximal. Este experimento também demonstrou a especificidade da ligação do radiofármaco no tumor de próstata, uma vez que o excesso de PSMA-617 não radiomarcado resultou em um deslocamento de 22,7 vezes.

Da mesma forma, os resultados da biodistribuição com 1 hora após a administração de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu de baixa atividade específica (40,01 MBq/ $\mu$ g) em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata, com injeção previa de peptídeo não radiomarcado, foram demonstrados na figura 63.

**Figura 63** – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu sob a atividade específica de 40,04 MBq/ $\mu$ g (lutécio-177 com carregador) com a administração de excesso de 100  $\mu$ g de PSMA-617 frio em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4).



Fonte: autor da tese.

A administração prévia de competidor (peptídeo não marcado) demonstrou a ligação específica do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu no tumor, uma vez que houve um bloqueio significativo da captação ( $P = 0,0376$ ). Este efeito foi igualmente observado para o baço ( $P = 0,0366$ ), fígado ( $P = 0,0469$ ), apesar de não haver relato da presença de receptores específicos nestes órgãos, e nos rins ( $P = 0,0162$ ) e intestinos ( $P = 0,0258$ ). Não foi evidenciado um deslocamento em função do excesso de peptídeo não radiomarcado no músculo. Neste caso, a captação do radiofármaco no sangue não foi influenciada pela presença do competidor,

conforme observado para os animais que receberam o radiofármaco com alta atividade específica após bloqueio (tabela 29).

**Tabela 29** – Ensaio de biodistribuição com 1 hora após o bloqueio da captação de PSMA-617-<sup>177</sup>Lu sob a atividade específica de 40,04 MBq/μg (lutécio-177 com carregador) com a administração de excesso de 100 μg de PSMA-617 frio em camundongos *SCID* machos com tumor de próstata. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL) expressos pela média e erro padrão (n=4).

Material biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue	
	Sem bloqueio	Com bloqueio
Sangue	0,34 ± 0,07	0,35 ± 0,05
Pulmões	0,39 ± 0,14	0,29 ± 0,02
Baço	0,38 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Fígado	0,19 ± 0,03	0,08 ± 0,01
Rins	33,29 ± 6,09	0,32 ± 0,01
Intestinos*	0,22 ± 0,05	0,07 ± 0,01
Músculo	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Tumor	1,48 ± 0,42	0,03 ± 0,02

\* com conteúdo

Fonte: autor da tese.

O bloqueio promovido pela ligação de PSMA-617 não radiomarcado resultou em uma captação renal 102 vezes inferior, assim como captação discreta no tumor, sendo 43,6 vezes menor do que a captação observada no experimento sem bloqueio.

O efeito do deslocamento da captação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu (com ou sem carregador), sendo expresso pela eficiência em porcentagem, foi calculado a partir das médias obtidas de captação nos ensaios realizados. Com o lutécio-177 sem carregador o deslocamento mostrou-se mais efetivo no sangue em 53,78%, baço em 13,9%, rins em 0,43%, intestinos em 1,05% e músculo em 34,02%. O bloqueio da ligação com lutécio-177 com carregador mostrou-se mais efetiva no pulmão em 20,38%, fígado em 1,22% e tumor em 2,57% (tabela 30).

**Tabela 30** – Efeito do bloqueio/deslocamento expresso a partir das médias de porcentagem para o sangue, órgãos de interesse (pulmões, baço, fígado, intestinos e rins), músculo e tumor estudados nas biodistribuições de PSMA-617 radiomarcados com lutécio-177 com carregador e lutécio-177 sem carregador.

<b>Material biológico</b>	<b>Com carregador</b>	<b>Sem carregador</b>
Sangue	0,99%	54,77%
Pulmões	25,64%	5,26%
Baço	78,95%	92,85%
Fígado	57,89%	56,67%
Rins	99,04%	99,47%
Intestinos*	68,18%	69,23%
Músculo	5,26%	39,28%
Tumor	97,92%	95,35%

\*com conteúdo

Fonte: autor da tese.

Em ambos os estudos de bloqueio, observou-se diminuição intensa na captação do tumor e dos rins. Excluindo-se o resultado discrepante encontrado no sangue, pode-se afirmar que o bloqueio da ligação do PSMA-617 foi semelhante entre os dois tipos de lutécio-177 estudados, de forma que não é possível atribuir superioridade ao emprego do lutécio-177 sem carregador, da mesma forma não foi possível afirmar que a radiomarcção respeitando a razão molar de 2,1/1 (moles de PSMA-617/mol de lutécio-176) que resultou em atividade específica inferior (cerca de 1,84 vezes menor) culminou em resultado inferior ao obtido com a maior atividade específica.

## 8 CONCLUSÃO

Com base nos dados epidemiológicos do câncer de próstata no Brasil e no mundo, que aumentam a cada ano, ficou evidente a necessidade de estudar a marcação do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu como uma nova opção terapêutica para a medicina nuclear brasileira. Desta forma, a principal contribuição deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento deste radiofármaco, em escala piloto de produção, e analisar o impacto da atividade específica de marcação (em função da presença ou ausência de carregador no lutécio-177) *in vitro* e *in vivo*.

Na presente tese foi possível propor um modelo de kit para pronta marcação composto por dois frascos, sendo um para o PSMA-617 congelado em água purificada e outro para o tampão de marcação o congelado, o qual se mostrou adequado e empregado no estudo de escalonamento de lotes piloto de produção até 37 GBq. As condições de simulação de transporte comprovaram a estabilidade do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu obtido a partir deste kit para pronta marcação.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a radiomarkação do PSMA-617 com lutécio-177 sob duas diferentes atividades específicas, influenciadas pela presença ou não do carregador no radioisótopo, não influenciou na captação tumoral do radiofármaco.

Durante o percurso do trabalho presente nesta tese, o grupo farmacêutico Novartis comprou a patente do PSMA-617 e impediu a sua comercialização, impossibilitando a aquisição de novos lotes do peptídeo para condução de ensaios clínicos controlados no Brasil. Os resultados pré-clínicos obtidos com o PSMA-617 radiomarcado com lutécio-177 de baixa e alta atividade específica serão utilizados como base para futuros estudos com outros derivados de PSMA comercialmente disponíveis para marcação com lutécio-177.

Dentre os derivados de PSMA para tratamento do câncer de próstata, o PSMA-I&T-<sup>177</sup>Lu, que tem se mostrado uma alternativa utilizada por centros clínicos europeus para a terapia no lugar do PSMA-617-<sup>177</sup>Lu, será adquirido pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN. Os resultados descritos nesta tese foram importantes



no sentido de servirem como base de conhecimento para as condições de produção, controle de qualidade e estabilidade do PSMA-I&T-<sup>177</sup>Lu.

## 9 BIBLIOGRAFIA

ABD-ELGALIEL, W. R.; GALLAZZI, F.; GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; HOFFMAN, T. J.; LEVER, S. Z. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of an Antagonist–Bombesin Analogue as Targeting Vector. *Bioconjugate Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 2040–2048, 15 out. 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc800290c>.

AFSHAR-OROMIEH, A.; HABERKORN, U.; ZECHMANN, C.; ARMOR, T.; MIER, W.; SPOHN, F.; DEBUS, N.; HOLLAND-LETZ, T.; BABICH, J.; KRATOCHWIL, C. Repeated PSMA-targeting radioligand therapy of metastatic prostate cancer with <sup>131</sup>I-MIP-1095. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 44, n. 6, p. 950–959, 9 jun. 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-017-3665-9>.

AFSHAR-OROMIEH, A.; HOLLAND-LETZ, T.; GIESEL, F. L.; KRATOCHWIL, C.; MIER, W.; HAUFE, S.; DEBUS, N.; EDER, M.; EISENHUT, M.; SCHÄFER, M.; NEELS, O.; HOHENFELLNER, M.; KOPKA, K.; KAUCZOR, H. U.; DEBUS, J.; HABERKORN, U. Diagnostic performance of <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 (HBED-CC) PET/CT in patients with recurrent prostate cancer: evaluation in 1007 patients. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 44, n. 8, p. 1258–1268, 2017.

AHMADZADEHFAR, H.; RAHBAR, K.; KÜRPIG, S.; BÖGEMANN, M.; CLAESENER, M.; EPPARD, E.; GÄRTNER, F.; ROGENHOFER, S.; SCHÄFERS, M.; ESSLER, M. Early side effects and first results of radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Research*, v. 5, n. 1, p. 36, 20 dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13550-015-0114-2>.

AHMADZADEHFAR, H.; WEGEN, S.; YORDANOVA, A.; FIMMERS, R.; KÜRPIG, S.; EPPARD, E.; WEI, X.; SCHLENKHOFF, C.; HAUSER, S.; ESSLER, M. Overall survival and response pattern of castration-resistant metastatic prostate cancer to multiple cycles of radioligand therapy using [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 44, n. 9, p. 1448–1454, 9 ago. 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-017-3716-2>.

ALLEN JR, L. V. *Remington: an Introduction to Pharmacy*. 1. ed., London: Pharmaceutical Press, 2013. 672 p.

ALONSO, O.; DOS SANTOS, G.; GARCÍA FONTES, M.; BALTER, H.; ENGLER, H. <sup>68</sup>Ga-PSMA and <sup>11</sup>C-Choline comparison using a tri-modality PET/CT-MRI (3.0 T) system with a dedicated shuttle. *European Journal of Hybrid Imaging*, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2018.

ATCC. **LNCaP clone FGC (ATCC CRL-1470)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1740.aspx#generalinformation>. Acesso em: 03 abr. 2020.

AWANG, Z. H.; ESSLER, M.; AHMADZADEHFAR, H. Radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: current approaches. **Radiation Oncology**, v. 13, n. 1, p. 98, 23 dez. 2018. Disponível em: <https://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-018-1037-7>.

BANDER, N. H.; TRABULSI, E. J.; KOSTAKOGLU, L.; YAO, D.; VALLABHAJOSULA, S.; SMITH-JONES, P.; JOYCE, M. A.; MILOWSKY, M.; NANUS, D. M.; GOLDSMITH, S. J. Targeting Metastatic Prostate Cancer With Radiolabeled Monoclonal Antibody J591 to the Extracellular Domain of Prostate Specific Membrane Antigen. **Journal of Urology**, v. 170, n. 5, p. 1717–1721, nov. 2003. Disponível em: <http://www.jurology.com/doi/10.1097/01.ju.0000091655.77601.0c>.

BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; KNAPP, F. F. (Russ). Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 8, p. 2934–2974, 22 abr. 2015. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500171e>.

BARKHAUSEN, C. **Production of non carrier added (n.c.a.) 177 Lu for radiopharmaceutical applications**. 2011. 120 p. Technische Universitat Munchen, 2011. Disponível em: <https://d-nb.info/1019587458/34>.

BARRETT, J. A.; COLEMAN, R. E.; GOLDSMITH, S. J.; VALLABHAJOSULA, S.; PETRY, N. A.; CHO, S.; ARMOR, T.; STUBBS, J. B.; MARESCA, K. P.; STABIN, M. G.; JOYAL, J. L.; ECKELMAN, W. C.; BABICH, J. W. First-in-Man Evaluation of 2 High-Affinity PSMA-Avid Small Molecules for Imaging Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 3, p. 380–387, 1 mar. 2013. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.112.111203>.

BAUM, R. P.; KULKARNI, H. R.; SCHUCHARDT, C.; SINGH, A.; WIRTZ, M.; WIESSALLA, S.; SCHOTTELIUS, M.; MUELLER, D.; KLETTE, I.; WESTER, H.-J. 177Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 7, p. 1006–1013, 1 jul. 2016. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.115.168443>.

BEGUM, N. J.; GLATTING, G.; WESTER, H.-J.; EIBER, M.; BEER, A. J.; KLETTING, P. The effect of ligand amount, affinity and internalization on PSMA-targeted imaging and therapy: A simulation study using a PBPK model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20041, 27 dez. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56603-8>.

BENESOVA, M.; SCHAFFER, M.; BAUDER-WUST, U.; AFSHAR-OROMIEH, A.; KRATOCHWIL, C.; MIER, W.; HABERKORN, U.; KOPKA, K.; EDER, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 6, p. 914–920, 1 jun. 2015. Disponível em:

<http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.114.147413>.

BENESOVA, M.; SCHAFER, M.; BAUDER-WUST, U.; AFSHAR-OROMIEH, A.; KRATOCHWIL, C.; MIER, W.; HABERKORN, U.; KOPKA, K.; EDER, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 56, n. 6, p. 914–920, 1 jun. 2015. b. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.114.147413>.

BERLINER, C.; SAUER, M.; KOBAYASHI, Y.; BUCHERT, R.; MESTER, J.; MAURER, T.; STOLZENBACH, F.; WESTER, H.; APOSTOLOVA, I.; BANNAS, P. Detection rate of Tc-99 m-PSMA I&S SPECT/CT in comparison to Ga-68-PSMA PET/CT in patients with biochemically recurrent prostate cancer planned for radioguided surgery. In: 57. JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR NUKLEARMEDIZIN, 2019, v. 58, Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0039-1683604>.

BRASIL. Instrução Normativa IN Nº 37, de 21 de agosto de 2019. Brasil, p. 8, 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-37-de-21-de-agosto-de-2019-211914085>. Acesso em: 14 abr. 2020.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira 6º Edição. Brasília, Brasil, p. 867, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 10 abr. 2020.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 301, de 21 de agosto de 2019. Brazil, p. 47, 2019. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/RDC\\_301\\_2019\\_.pdf/2e049461-1e8a-4bbb-8e09-8d3c04dea07d](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/RDC_301_2019_.pdf/2e049461-1e8a-4bbb-8e09-8d3c04dea07d). Acesso em: 05 jan. 2020.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 12 nov. 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>.

BREEMAN, W. A. P.; JONG, M.; VISSER, T. J.; ERION, J. L.; KRENNING, E. P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In and <sup>177</sup>Lu at high specific activities. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 30, n. 6, p. 917–920, 4 jun. 2003. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-003-1142-0>.

CALAIS, J.; CECI, F.; EIBER, M.; HOPE, T. A.; HOFMAN, M. S.; RISCHPLER, C.; BACH-GANSMO, T.; NANNI, C.; SAVIR-BARUCH, B.; ELASHOFF, D.; GROGAN, T.; DAHLBOM, M.; SLAVIK, R.; GARTMANN, J.; NGUYEN, K.; LOK, V.; JADVAR, H.; KISHAN, A. U.; RETTIG, M. B.; REITER, R. E.; FENDLER, W. P.; CZERNIN, J. <sup>18</sup>F-fluciclovine PET-CT and <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 PET-CT in patients with early biochemical recurrence after prostatectomy: a prospective, single-centre, single-arm, comparative imaging trial. *The Lancet Oncology*, v. 20, n. 9, p. 1286–1294, set. 2019. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30415-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30415-2).

CARDINALE, J.; MARTIN, R.; REMDE, Y.; SCHÄFER, M.; HIENZSCH, A.;

HÜBNER, S.; ZERGES, A.-M.; MARX, H.; HESSE, R.; WEBER, K.; SMITS, R.; HOEPPING, A.; MÜLLER, M.; NEELS, O.; KOPKA, K. Procedures for the GMP-Compliant Production and Quality Control of [18F]PSMA-1007: A Next Generation Radiofluorinated Tracer for the Detection of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 4, p. 77, 27 set. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/10/4/77>.

CECI, F.; CASTELLUCCI, P.; CERCI, J. J.; FANTI, S. New aspects of molecular imaging in prostate cancer. *Methods*, v. 130, p. 36–41, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.07.009>.

CHATALIC, K. L. S.; HESKAMP, S.; KONIJNENBERG, M.; MOLKENBOER-KUENEN, J. D. M.; FRANSSSEN, G. M.; GRONINGEN, M. C. C.; SCHOTTELIUS, M.; WESTER, H.-J.; VAN WEERDEN, W. M.; BOERMAN, O. C.; DE JONG, M. Towards Personalized Treatment of Prostate Cancer: PSMA I&T, a Promising Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Theranostic Agent. *Theranostics*, v. 6, n. 6, p. 849–861, 2016. Disponível em: <http://www.thno.org/v06p0849.htm>.

CHEN, Y.; PULLAMBHATLA, M.; FOSS, C. A.; BYUN, Y.; NIMMAGADDA, S.; SENTHAMIZHCHELVAN, S.; SGOUROS, G.; MEASE, R. C.; POMPER, M. G. 2-(3- -Ureido)-Pentanedioic Acid, [18F]DCFPyL, a PSMA-Based PET Imaging Agent for Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 24, p. 7645–7653, 15 dez. 2011. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-1357>.

CHEN, Y.; PULLAMBHATLA, M.; RAY BANERJEE, S.; BYUN, Y.; STATHIS, M.; ROJAS, C.; SLUSHER, B. S.; MEASE, R. C.; POMPER, M. G. Synthesis and Biological Evaluation of Low Molecular Weight Fluorescent Imaging Agents for the Prostate-Specific Membrane Antigen. *Bioconjugate Chemistry*, v. 23, n. 12, p. 2377–2385, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23157641/>.

CIMADAMORE, A.; CHENG, M.; SANTONI, M.; LOPEZ-BELTRAN, A.; BATTELLI, N.; MASSARI, F.; GALOSI, A. B.; SCARPELLI, M.; MONTIRONI, R. New Prostate Cancer Targets for Diagnosis, Imaging, and Therapy: Focus on Prostate-Specific Membrane Antigen. *Frontiers in Oncology*, v. 8, n. DEC, p. 1–11, 21 dez. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00653/full>.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 2, p. 165–173, 2009. Disponível em: [https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n\\_55/v02/pdf/11\\_revisao\\_literatura2.pdf](https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_55/v02/pdf/11_revisao_literatura2.pdf).

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Radiofarmácia*. Disponível em: <https://www.crfsp.org.br/images/cartilhas/radiofarmacia.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2020.

CONWAY, R. E.; ROJAS, C.; ALT, J.; NOVÁKOVÁ, Z.; RICHARDSON, S. M.; RODRICK, T. C.; FUENTES, J. L.; RICHARDSON, N. H.; ATTALLA, J.; STEWART, S.; FAHMY, B.; BARINKA, C.; GHOSH, M.; SHAPIRO, L. H.; SLUSHER, B. S. Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-mediated laminin proteolysis generates a pro-angiogenic peptide. *Angiogenesis*, v. 19, n. 4, p. 487–500, 8 out.

2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10456-016-9521-x>.

COUTINHO, E. L.; DE SOUSA ANDRADE, L. N.; CHAMMAS, R.; MORGANTI, L.; SCHOR, N.; BELLINI, M. H. Anti-tumor effect of endostatin mediated by retroviral gene transfer in mice bearing renal cell carcinoma. *The FASEB Journal*, v. 21, n. 12, p. 3153–3161, out. 2007. Disponível em: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.07-8412com>.

DAS, T.; GULERIA, M.; PARAB, A.; KALE, C.; SHAH, H.; SARMA, H. D.; LELE, V. R.; BANERJEE, S. Clinical translation of <sup>177</sup>Lu-labeled PSMA-617: Initial experience in prostate cancer patients. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 43, n. 5, p. 296–302, maio. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2016.02.002>.

DASH, A.; KNAPP, F. F.; PILLAI, M. Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Current Radiopharmaceuticals*, v. 6, n. 3, p. 152–180, 31 out. 2013. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4710&volume=6&issue=3&spage=152>.

DASH, A.; PILLAI, M. R. A.; KNAPP, F. F. Production of <sup>177</sup>Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 49, n. 2, p. 85–107, 17 jun. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13139-014-0315-z>.

DASH, A.; SEN, I. B.; CHAKRABORTY, S.; CHAKRAVARTY, R.; SHETTY, P.; VIMALNATH, K. V. Prospects of medium specific activity <sup>177</sup>Lu in targeted therapy of prostate cancer using <sup>177</sup>Lu-labeled PSMA inhibitor. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, v. 59, n. 9, p. 364–371, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3414>.

DE BLOIS, E.; DE ZANGER, R. M. S.; CHAN, H. S.; KONIJNENBERG, M.; BREEMAN, W. A. P. Radiochemical and analytical aspects of inter-institutional quality control measurements on radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 3, 28 dez. 2019. Disponível em: <https://ejnmmipharmchem.springeropen.com/articles/10.1186/s41181-018-0052-1>.

DE ZANGER, R. M. S.; CHAN, H. S.; BREEMAN, W. A. P.; DE BLOIS, E. Maintaining radiochemical purity of [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTA-PSMA-617 for PRRT by reducing radiolysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 321, n. 1, p. 285–291, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06573-y>.

DELKER, A.; FENDLER, W. P.; KRATOCHWIL, C.; BRUNEGRAF, A.; GOSEWISCH, A.; GILDEHAUS, F. J.; TRITSCHLER, S.; STIEF, C. G.; KOPKA, K.; HABERKORN, U.; BARTENSTEIN, P.; BÖNING, G. Dosimetry for <sup>177</sup>Lu-DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 43, n. 1, p. 42–51, 29 jan. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-015-3174-7>.

DIETLEIN, F.; KOBE, C.; NEUBAUER, S.; SCHMIDT, M.; STOCKTER, S.;

FISCHER, T.; SCHOMÄCKER, K.; HEIDENREICH, A.; ZLATOPOLSKIY, B. D.; NEUMAIER, B.; DRZEZGA, A.; DIETLEIN, M. PSA-Stratified Performance of 18 F- and 68 Ga-PSMA PET in Patients with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 58, n. 6, p. 947–952, jun. 2017. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.116.185538>.

DONG, C.; LIU, Z.; WANG, F. Radioligand saturation binding for quantitative analysis of ligand-receptor interactions. *Biophysics Reports*, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s41048-016-0016-5>.

DOS SANTOS, J. C.; BEIJER, B.; BAUDER-WÜST, U.; SCHÄFER, M.; LEOTTA, K.; EDER, M.; BENEŠOVÁ, M.; KLEIST, C.; GIESEL, F.; KRATOCHWIL, C.; KOPKA, K.; HABERKORN, U.; MIER, W. Development of Novel PSMA Ligands for Imaging and Therapy with Copper Isotopes. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 61, n. 1, p. jnumed.119.229054, 2019.

DRKS. *Evaluating the feasibility and accuracy of novel intra-operative molecular imaging with two PSMA-tracers in prostate cancer*. Disponível em: [https://www.drks.de/drks\\_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL\\_ID=DRKS00020942](https://www.drks.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00020942). Acesso em: 06 jun. 2020.

DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of Bombesin-Like Peptide with 99m Tc: 99m Tc-Litorin and Biodistribution in Rats †. *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 1516–1520, set. 2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bc060400x>.

EDER, M.; NEELS, O.; MÜLLER, M.; BAUDER-WÜST, U.; REMDE, Y.; SCHÄFER, M.; HENNRICH, U.; EISENHUT, M.; AFSHAR-OROMIEH, A.; HABERKORN, U.; KOPKA, K. Novel preclinical and radiopharmaceutical aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A new PET tracer for imaging of prostate cancer. *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 7, p. 779–796, 2014.

EDER, M.; SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; HULL, W. E.; WÄNGLER, C.; MIER, W.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M. 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjugate Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 688–697, 2012.

EMMETT, L.; CRUMBAKER, M.; HO, B.; WILLOWSON, K.; EU, P.; RATNAYAKE, L.; EPSTEIN, R.; BLANKSBY, A.; HORVATH, L.; GUMINSKI, A.; MAHON, K.; GEDYE, C.; YIN, C.; STRICKER, P.; JOSHUA, A. M. Results of a Prospective Phase 2 Pilot Trial of 177 Lu-PSMA-617 Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Including Imaging Predictors of Treatment Response and Patterns of Progression. *Clinical Genitourinary Cancer*, v. 17, n. 1, p. 15–22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.09.014>.

EMMETT, L.; WILLOWSON, K.; VIOLET, J.; SHIN, J.; BLANKSBY, A.; LEE, J. Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *Journal of Medical Radiation Sciences*, v. 64, n. 1, p. 52–60, 2017.

ENDERLE, J. D.; BRONZINO, J. D. *Introduction to Biomedical Engineering*. 3<sup>a</sup>,

Burlington: Academic Press, 2012. 1173 p. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123749796/introduction-to-biomedical-engineering>.

EPSTEIN, J. I.; EGEVAD, L.; AMIN, M. B.; DELAHUNT, B.; SRIGLEY, J. R.; HUMPHREY, P. A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 40, n. 2, p. 1, out. 2015. Disponível em: <http://journals.lww.com/00000478-900000000-98357>.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **LUTETIUM (177 Lu) SOLUTION FOR RADIOLABELLING**. 10. ed., . [S.l.]: Council of Europe. 2020. 4436–4437 p.

EVANS, J. C.; MALHOTRA, M.; CRYAN, J. F.; O'DRISCOLL, C. M. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 21, p. 3041–3079, nov. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/bph.13576>.

EVANS, J. D.; JETHWA, K. R.; OST, P.; WILLIAMS, S.; KWON, E. D.; LOWE, V. J.; DAVIS, B. J. Prostate cancer–specific PET radiotracers: A review on the clinical utility in recurrent disease. *Practical Radiation Oncology*, v. 8, n. 1, p. 28–39, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prro.2017.07.011>.

FARSTAD, B. S.; PEÑUELAS, I. Radiopharmaceutical Manufacturing. In: GAD, S. C. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. 1. ed., Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. cap. Radiopharm, p. 59–96. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470571224>.

FOSP. **Registro Hospitalar de Câncer de São Paulo: Registro Hospitalar de Câncer de São Paulo: Análise dos dados e indicadores de qualidade**. Disponível em: [http://www.fosp.saude.sp.gov.br:443/epidemiologia/docs/Dados\\_de\\_Cancer.pdf](http://www.fosp.saude.sp.gov.br:443/epidemiologia/docs/Dados_de_Cancer.pdf). Acesso em: 01 jun. 2020.

GHOSH, A.; WOOLUM, K.; KOTHANDARAMAN, S.; TWEEDLE, M. F.; KUMAR, K. Stability Evaluation and Stabilization of a Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) Targeting Imaging Pharmaceutical. *Molecules*, v. 24, n. 16, p. 2878, 8 ago. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/16/2878>.

GIESEL, F. L.; WILL, L.; LAWAL, I.; LENGANA, T.; KRATOCHWIL, C.; VORSTER, M.; NEELS, O.; REYNEKE, F.; HABERKON, U.; KOPKA, K.; SATHEKGE, M. Intraindividual Comparison of 18 F-PSMA-1007 and 18 F-DCFPyL PET/CT in the Prospective Evaluation of Patients with Newly Diagnosed Prostate Carcinoma: A Pilot Study. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 59, n. 7, p. 1076–1080, jul. 2018. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.117.204669>.

GINJ, M.; ZHANG, H.; WASER, B.; CESCATO, R.; WILD, D.; WANG, X.; ERCHEGYI, J.; RIVIER, J.; MACKE, H. R.; REUBI, J. C. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 44, p.



16436–16441, 31 out. 2006. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607761103>.

GOFFIN, K. E.; JONIAU, S.; TENKE, P.; SLAWIN, K.; KLEIN, E. A.; STAMBLER, N.; STRACK, T.; BABICH, J.; ARMOR, T.; WONG, V. Phase 2 study of <sup>99m</sup>Tc-Trofolostat SPECT/CT to identify and localize prostate cancer in intermediate- and high-risk patients undergoing radical prostatectomy and extended pelvic LN dissection. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 58, n. 9, p. 1408–1413, 2017.

GOURNI, E.; CANOVAS, C.; GONCALVES, V.; DENAT, F.; MEYER, P. T.; MAECKE, H. R. (R)-NODAGA-PSMA: A Versatile Precursor for Radiometal Labeling and Nuclear Imaging of PSMA-Positive Tumors. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, p. e0145755, 23 dez. 2015. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145755>.

GOURNI, E.; HENRIKSEN, G. Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules*, v. 22, n. 4, p. 523–557, 24 mar. 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/523>.

GUSMAN, M.; AMINSHARIFI, J. A.; PEACOCK, J. G.; ANDERSON, S. B.; CLEMENSHAW, M. N.; BANKS, K. P. Review of <sup>18</sup>F-Fluciclovine PET for Detection of Recurrent Prostate Cancer. *RadioGraphics*, v. 39, n. 3, p. 822–841, maio. 2019. Disponível em: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.2019180139>.

HAUG, A. R.; ROMINGER, A.; MUSTAFA, M.; AUERNHAMMER, C.; GOKE, B.; SCHMIDT, G. P.; WANGLER, B.; CUMMING, P.; BARTENSTEIN, P.; HACKER, M. Treatment with Octreotide Does Not Reduce Tumor Uptake of <sup>68</sup>Ga-DOTATATE as Measured by PET/CT in Patients with Neuroendocrine Tumors. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 52, n. 11, p. 1679–1683, 1 nov. 2011. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.111.089276>.

HECK, M. M.; TAUBER, R.; SCHWAIGER, S.; RETZ, M.; D'ALESSANDRIA, C.; MAURER, T.; GAFITA, A.; WESTER, H.-J.; GSCHWEND, J. E.; WEBER, W. A.; SCHWAIGER, M.; KNORR, K.; EIBER, M. Treatment Outcome, Toxicity, and Predictive Factors for Radioligand Therapy with <sup>177</sup>Lu-PSMA-I&T in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*, v. 75, n. 6, p. 920–926, jun. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030228381830873X>.

HEIN, P.; MICHEL, M. C.; LEINWEBER, K.; WIELAND, T.; WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Receptor and Binding Studies. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. cap. Receptor a, p. 723–783. Disponível em: [http://eknygos.lsmuni.lt/springer/374/Part 2/6/8 Item.pdf](http://eknygos.lsmuni.lt/springer/374/Part%202/6/8%20Item.pdf).

HILLIER, S. M.; MARESCA, K. P.; LU, G.; MERKIN, R. D.; MARQUIS, J. C.; ZIMMERMAN, C. N.; ECKELMAN, W. C.; JOYAL, J. L.; BABICH, J. W. <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small-Molecule Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen for Molecular Imaging of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 54, n. 8, p. 1369–1376, 1 ago. 2013. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.112.116624>.

HOFMAN, M. S.; VIOLET, J.; HICKS, R. J.; FERDINANDUS, J.; THANG, S. P.; AKHURST, T.; IRAVANI, A.; KONG, G.; RAVI KUMAR, A.; MURPHY, D. G.; EU, P.; JACKSON, P.; SCALZO, M.; WILLIAMS, S. G.; SANDHU, S. [ 177 Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 6, p. 825–833, jun. 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30198-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30198-0).

HUANG, S. S.; WANG, X.; ZHANG, Y.; DOKE, A.; DIFILIPPO, F. P.; HESTON, W. D. Improving the Biodistribution of PSMA-T targeting racers With a Highly Negatively Charged Linker. **The Prostate**, v. 74, p. 702–713, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pros.22789>.

HUCLIER-MARKAI, S.; ALLIOT, C.; VARMENOT, N.; S. CUTLER, C.; BARBET, J. Alpha-Emitters for Immuno-Therapy: A Review of Recent Developments from Chemistry to Clinics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 23, p. 2642–2654, 2013.

HULME, E. C.; TREVETHICK, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 6, p. 1219–1237, nov. 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>.

HUMPHREY, P. A. Histopathology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 10, p. a030411, out. 2017. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a030411>.

IDB. **Lutetium 177 - LuMarkR Lu-177 chloride**. Disponível em: <https://www.idb-holland.com/our-products/lutetium-177-lumark/>. Acesso em: 09 abr. 2020.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2020.

INM. **Certificate of Compliance**. Zarechny: [s.n.], 2019.

ISRAELI, R. S.; POWELL, C. T.; FAIR, W. R.; HESTON, W. D. W. Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen. **Cancer Research**, v. 53, n. 2, p. 227–230, 1993.

JACKSON, P. F.; COLE, D. C.; SLUSHER, B. S.; STETZ, S. L.; ROSS, L. E.; DONZANTI, B. A.; TRAINOR, D. A. Design, Synthesis, and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated  $\alpha$ -Linked Acidic Dipeptidase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 619–622, jan. 1996. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm950801q>.

JADVAR, H. Is There Use for FDG-PET in Prostate Cancer? **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 46, n. 6, p. 502–506, nov. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. **Basic Pharmacokinetics**. 1. ed., Chicago: Pharmaceutical Press, 2009. 407 p. Disponível em:

<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>.

JAX. **The Jackson Laboratory**. Disponível em: <https://www.jax.org/mouse-search>. Acesso em: 09 abr. 2020.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, mar. 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20107>.

JÍMENEZ, Y. V. **Dosimetria interna aplicada a farmacos marcados con 177Lu**. 2007. Instituto Balseiro, 2007.

JURISSON, S.; CUTLER, C.; SMITH, S. V. Radiometal Complexes: characterization and relevant in vitro studies. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 52, n. 3, p. 222–234, 2008.

KABASAKAL, L.; ABUQBEITAH, M.; AYGÜN, A.; YEYIN, N.; OCAK, M.; DEMIRCI, E.; TOKLU, T. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of 177Lu-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 42, n. 13, p. 1976–1983, 31 dez. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-015-3125-3>.

KASSIS, A. I.; ADELSTIEN, S. J. Considerations in the selection of radionuclides for cancer therapy. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. **Handbook of Radiopharmaceuticals**. [S.l.]: Wiley, 2002. p. 767–794. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470846380>.

KHAWAR, A.; EPPARD, E.; SINNES, J. P.; ROESCH, F.; AHMADZADEHFAR, H.; KÜRPIG, S.; MEISENHEIMER, M.; GAERTNER, F. C.; ESSLER, M.; BUNDSCHUH, R. A. Prediction of Normal Organ Absorbed Doses for [177Lu]Lu-PSMA-617 Using [44Sc]Sc-PSMA-617 Pharmacokinetics in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Carcinoma. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 43, n. 7, p. 486–491, 2018.

KHOJASTEH, S. C.; WONG, H.; HOP, C. E. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide**. 1. ed., [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2011.

KIM, C. H.; AXUP, J. Y.; LAWSON, B. R.; YUN, H.; TARDIF, V.; CHOI, S. H.; ZHOU, Q.; DUBROVSKA, A.; BIROC, S. L.; MARSDEN, R.; PINSTAFF, J.; SMIDER, V. V.; SCHULTZ, P. G. Bispecific small molecule-antibody conjugate targeting prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 17796–17801, 29 out. 2013. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1316026110>.

KOPKA, K.; BENEŠOVÁ, M.; BAŘINKA, C.; HABERKORN, U.; BABICH, J. Glu-Ureido-Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-Molecular-Weight Theranostic Radiotracers. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. Supplement 2, p. 17S-26S, 1 set. 2017. Disponível em:

<http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.116.186775>.

KOROLKOVAS, A.; H., J. B. **Química Farmacêutica**. 1ª, Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 783 p.

KRATOCHWIL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; GIESEL, F. L.; WEIS, M.; VERBURG, F. A.; MOTTAGHY, F.; KOPKA, K.; APOSTOLIDIS, C.; HABERKORN, U.; MORGENSTERN, A. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-targeted  $\alpha$ -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 12, p. 1941–1944, 2016.

KRATOCHWIL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; RATHKE, H.; BRONZEL, M.; APOSTOLIDIS, C.; WEICHERT, W.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L.; MORGENSTERN, A. Targeted  $\alpha$ -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with 225 Ac-PSMA-617: Dosimetry Estimate and Empiric Dose Finding. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 10, p. 1624–1631, out. 2017. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.117.191395>.

KRATOCHWIL, C.; GIESEL, F. L.; EDER, M.; AFSHAR-OROMIEH, A.; BENEŠOVÁ, M.; MIER, W.; KOPKA, K.; HABERKORN, U. [177Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 42, n. 6, p. 987–988, 9 maio. 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-014-2978-1>.

KRATOCHWIL, C.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. 225Ac-PSMA-617 for Therapy of Prostate Cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**, p. 1–8, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2020.02.004>.

KRYVENKO, O. N.; EPSTEIN, J. I. Changes in prostate cancer grading: Including a new patient-centric grading system. **The Prostate**, v. 76, n. 5, p. 427–433, abr. 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.23142>.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins and Cotran: pathologic basis of disease**. 7. ed., Philadelphia: Elsevier, 2005. 940 p.

KUO, H.-T.; MERKENS, H.; ZHANG, Z.; URIBE, C. F.; LAU, J.; ZHANG, C.; COLPO, N.; LIN, K.-S.; BÉNARD, F. Enhancing Treatment Efficacy of 177 Lu-PSMA-617 with the Conjugation of an Albumin-Binding Motif: Preclinical Dosimetry and Endoradiotherapy Studies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 11, p. 5183–5191, 5 nov. 2018. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00720>.

LAILER, P.; DULIŃSKA, J.; LEKKA, M.; LEKKI, J. Expression of prostate specific membrane antigen in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 1, p. 1–14, mar. 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986104006836>.

LAVERY, A.; KIRBY, R. S.; CHOWDHURY, S. Prostate cancer. **Medicine**, v. 44, n. 1, p. 47–51, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.10.001>.

LIU, S.; EDWARDS, D. S. Stabilization of  $^{90}\text{Y}$ -labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chemistry*, v. 12, n. 4, p. 554–558, 2001.

LIU, Shuang; ELLARS, C. E.; EDWARDS, D. S. Ascorbic acid: Useful as a buffer agent and radiolytic stabilizer for metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*, v. 14, n. 5, p. 1052–1056, 2003.

LOWENTHAL, G.; AIREY, P. *Practical Applications of Radioactivity and Nuclear Radiations*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2001. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=-A3L1Aw0sK8C>.

LU, G.; MARESCA, K. P.; HILLIER, S. M.; ZIMMERMAN, C. N.; ECKELMAN, W. C.; JOYAL, J. L.; BABICH, J. W. Synthesis and SAR of  $^{99\text{mTc}}$ / $\text{Re}$ -labeled small molecule prostate specific membrane antigen inhibitors with novel polar chelates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 5, p. 1557–1563, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.014>.

MACHULKIN, A. E.; IVANENKOV, Y. A.; ALADINSKAYA, A. V.; VESELOV, M. S.; ALADINSKIY, V. A.; BELOGLAZKINA, E. K.; KOTELIANSKY, V. E.; SHAKHBAZYAN, A. G.; SANDULENKO, Y. B.; MAJOUGA, A. G. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. *Journal of Drug Targeting*, v. 24, n. 8, p. 679–693, 13 set. 2016. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1061186X.2016.1154564>.

MAFRA, R. S.-C.; FERNANDES, F. L.; BATALHA, A. X. F.; CARNEIRO, P. S.; VELOSO, D. F. M.; OLIVEIRA, R. S.-C. P. M. De; ALBERTI, L. R. Precisão da estimativa do peso prostático por ultrassonografia transretal e exame de toque retal em comparação ao peso real da próstata após prostatectomia radical. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 42, n. 3, p. 20–23, 2013.

MANSI, R.; WANG, X.; FORRER, F.; WASER, B.; CESCATO, R.; GRAHAM, K.; BORKOWSKI, S.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 38, n. 1, p. 97–107, 18 jan. 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-010-1596-9>.

MANYAK, M. J. Indium-111 capromab pendetide in the management of recurrent prostate cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 8, n. 2, p. 175–181, 10 fev. 2008. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737140.8.2.175>.

MARESCA, K. P.; HILLIER, S. M.; FEMIA, F. J.; KEITH, D.; BARONE, C.; JOYAL, J. L.; ZIMMERMAN, C. N.; KOZIKOWSKI, A. P.; BARRETT, J. A.; ECKELMAN, W. C.; BABICH, J. W. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 2, p. 347–357, 2009.

MASSICANO, A. V. F. *Desenvolvimento farmacotécnico de um radioimunoconjugado para terapia de linfoma não-hodgkin*. 2016. 207 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e

Nucleares, São Paulo.

MAURER, T.; EIBER, M.; SCHWAIGER, M.; GSCHWEND, J. E. Current use of PSMA–PET in prostate cancer management. *Nature Reviews Urology*, v. 13, n. 4, p. 226–235, 23 abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.26>.

MAUS, S.; BLOIS, E. De; AMENT, S. J.; SCHRECKENBERGER, M.; BREEMAN, W. A. P. Aspects on radiolabeling of <sup>177</sup>Lu-DOTA-TATE: After C18 purification re-addition of ascorbic acid is required to maintain radiochemical purity. *International Journal of Diagnostic Imaging*, v. 1, n. 1, p. 5, 2014.

MCBEAN, R.; O’KANE, B.; PARSONS, R.; WONG, D. Lu177- <scp>PSMA</scp> therapy for men with advanced prostate cancer: Initial 18 months experience at a single Australian tertiary institution. *Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology*, v. 63, n. 4, p. 538–545, 25 ago. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1754-9485.12891>.

MCCARTHY, M.; LANGTON, T.; KUMAR, D.; CAMPBELL, A. Comparison of PSMA-HBED and PSMA-I&T as diagnostic agents in prostate carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 44, n. 9, p. 1455–1462, 4 ago. 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-017-3699-z>.

MEYRICK, D. P.; ASOKENDARAN, M.; SKELLY, L. A.; LENZO, N. P.; HENDERSON, A. The role of <sup>68</sup>Ga-PSMA-I&T PET/CT in the pretreatment staging of primary prostate cancer. *Nuclear Medicine Communications*, v. 38, n. 11, p. 956–963, nov. 2017. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006231-201711000-00010>.

MICHALSKA, M.; SCHULTZE-SEEMANN, S.; BOGATYREVA, L.; HAUSCHKE, D.; WETTERAUER, U.; WOLF, P. *In vitro* and *in vivo* effects of a recombinant anti-PSMA immunotoxin in combination with docetaxel against prostate cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 16, p. 22531–22542, 19 abr. 2016. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/8001>.

MIKOLAJCZAK, R.; VAN DER MEULEN, N. P.; LAPI, S. E. Radiometals for imaging and theranostics, current production, and future perspectives. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, v. 62, n. 10, p. 615–634, ago. 2019. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlcr.3770>.

MILLER, J. C. *Radiopharmaceutical Development at the Massachusetts General Hospital*. Disponível em: [https://web.archive.org/web/20150211233851/http://www2.massgeneral.org/imagingintranet/pdf/news/miller\\_janet\\_4\\_17\\_09.pdf](https://web.archive.org/web/20150211233851/http://www2.massgeneral.org/imagingintranet/pdf/news/miller_janet_4_17_09.pdf). Acesso em: 10 ago. 2020.

MIYAHIRA, A. K.; PIENTA, K. J.; MORRIS, M. J.; BANDER, N. H.; BAUM, R. P.; FENDLER, W. P.; GOECKELER, W.; GORIN, M. A.; HENNEKES, H.; POMPER, M. G.; SARTOR, O.; TAGAWA, S. T.; WILLIAMS, S.; SOULE, H. R. Meeting report from the Prostate Cancer Foundation PSMA-directed radionuclide scientific working group. *The Prostate*, v. 78, n. 11, p. 775–789, ago. 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.23642>.

MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C.; KRATOCHWIL, C.; SATHEKGE, M.; KROLICKI, L.; BRUCHERTSEIFER, F. An Overview of Targeted Alpha Therapy with  $^{225}\text{Ac}$  and  $^{213}\text{Bi}$ . ***Current Radiopharmaceuticals***, v. 11, n. 3, p. 200–208, 22 out. 2018. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/161764/article>.

MOTULSKY, H.; NEUBIG, R. Analyzing Radioligand Binding Data. ***Current Protocols in Protein Science***, v. 21, n. 1, p. A.3H.1-A.3H.55, set. 2000. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.psa03hs21>.

NAN, F.; BZDEGA, T.; PSHENICHKIN, S.; WROBLEWSKI, J. T.; WROBLEWSKA, B.; NEALE, J. H.; KOZIKOWSKI, A. P. Dual function glutamate-related ligands: Discovery of a novel, potent inhibitor of glutamate carboxypeptidase II possessing mGluR3 agonist activity [3]. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 43, n. 5, p. 772–774, 2000.

NANABALA, R.; SASIKUMAR, A.; JOY, A.; PILLAI, M. Preparation of [ $^{177}\text{Lu}$ ]PSMA-617 Using Carrier Added (CA)  $^{177}\text{Lu}$  for Radionuclide Therapy of Prostate Cancer. ***Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy***, v. 7, n. 5, , 2016. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/preparation-of-177lupsma617-using-carrier-added-ca-177lu-for-radionuclide-therapy-of-prostate-cancer-2155-9619-1000306.php?aid=80220>.

NEDELCOVYCH, M. T.; DASH, R. P.; WU, Y.; CHOI, E. Y.; LAPIDUS, R. S.; MAJER, P.; ABOU, D.; PENET, M.-F.; NIKOLOPOULOU, A.; AMOR-COARASA, A.; BABICH, J.; THOREK, D. L.; RAIS, R.; KRATOCHWIL, C.; SLUSHER, B. S. JHU-2545 Selectively Shields Salivary Glands and Kidneys during PSMA-Targeted Radiotherapy. ***Biophysics Reports***, p. 457085, 2019. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/457085v2>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. ***Lehninger Principles of Biochemistry***. 7. ed., New York: W. H. Freeman, 2017. 1312 p.

NIH.  ***$^{177}\text{Lu}$ -PSMA-I&T PSMA Radioligand Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer***. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04188587>. Acesso em: 10 jun. 2020.a.

NIH. ***Phase I Trial of  $^{225}\text{Ac}$ -J591 in Patients With mCRPC***. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03276572>. Acesso em: 05 jun. 2020.a.

NIH. ***PSMA Imaging of Localized Prostate Cancer***. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03675451?term=iab2m&draw=2&rank=4>. Acesso em: 05 jun. 2020.b.

NIH. ***Radio Guided Lymph Node Dissection in Oligometastatic Prostate Cancer Patients (DETECT)***. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04300673>. Acesso em: 10 jun. 2020.

NIH. ***Study to Evaluate  $^{99m}\text{Tc}$ -MIP-1404 SPECT/CT Imaging in Men With Biopsy Proven Low-Grade Prostate Cancer (proSPECT-AS)***. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02615067>. Acesso em: 08 jun. 2020.b.

NIH. **Techneium Based Radioguided Surgery for Prostate Cancer (TRACE) Study (TRACE)**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03857113>. Acesso em: 09 jun. 2020.c.

NIH. **Use of an Experimental Radiopharmaceutical (131I-MIP-1095) in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC)**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03030885>. Acesso em: 08 jun. 2020.c.

NOMURA, N.; PASTORINO, S.; JIANG, P.; LAMBERT, G.; CRAWFORD, J. R.; GYMNOPOULOS, M.; PICCIONI, D.; JUAREZ, T.; PINGLE, S. C.; MAKALE, M.; KESARI, S. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 26, 2014. Disponível em: Cancer Cell International.

NTP. **Lu-177 QC Results**. [S.l: s.n.], 2017.

O'KEEFE, D. S.; BACICH, D. J.; HUANG, S. S.; HESTON, W. D. W. A perspective on the evolving story of PSMA biology, PSMA-based imaging, and endoradiotherapeutic strategies. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 7, p. 1007–1013, 2018.

OH, S. W.; CHEON, G. J. Prostate-Specific Membrane Antigen PET Imaging in Prostate Cancer: Opportunities and Challenges. **Korean Journal of Radiology**, v. 19, n. 5, p. 819, 2018. Disponível em: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3348/kjr.2018.19.5.819>.

OKARVI, S. M. Recent developments of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific radiopharmaceuticals for precise imaging and therapy of prostate cancer: an overview. **Clinical and Translational Imaging**, v. 7, n. 3, p. 189–208, 18 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40336-019-00326-3>.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151–165, jun. 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322006000200002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).

PANDIT-TASKAR, N.; ODOGHOUE, J. A.; RUAN, S.; LYASHCHENKO, S. K.; CARRASQUILLO, J. A.; HELLER, G.; MARTINEZ, D. F.; CHEAL, S. M.; LEWIS, J. S.; FLEISHER, M.; KEPLER, J. S.; REITER, R. E.; WU, A. M.; WEBER, W. A.; SCHER, H. I.; LARSON, S. M.; MORRIS, M. J. First-in-Human Imaging with 89Zr-Df-IAB2M Anti-PSMA Minibody in Patients with Metastatic Prostate Cancer: Pharmacokinetics, Biodistribution, Dosimetry, and Lesion Uptake. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 12, p. 1858–1864, 1 dez. 2016. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.116.176206>.

PANTALEO, M. A.; NANNINI, M.; MALEDDU, A.; FANTI, S.; AMBROSINI, V.; NANNI, C.; BOSCHI, S.; BIASCO, G. Conventional and novel PET tracers for imaging in oncology in the era of molecular therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 2, p. 103–121, abr. 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737207001533>.



PILLAI, A.; KNAPP, F. Evolving Important Role of Lutetium-177 for Therapeutic Nuclear Medicine. **Current Radiopharmaceuticals**, v. 8, n. 2, p. 78–85, 19 ago. 2015. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4710&volume=8&issue=2&spage=78>.

PILLAI, M. R. A. **Metallic Radionuclides and Therapeutic Radiopharmaceuticals**. Warszawa: [s.n.], 2010. 248 p.

POMPER, Martin Gilbert; ZHANG, Jiazhong; KOZIKOWSKI, Alan P.; MUSACHIO, John L. **Imaging agents and methods of imaging NAALADase or PSMA. US7408079B2**. US 7,408,079 B2. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US7408079B2/en>.

PRICE, E. W.; ORVIG, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 1, p. 260–290, 2014.

PUJATTI, P.B.; MASSICANO, A. V. F.; MENGATTI, J.; DE ARAÚJO, E. B. Preparation of [In-111]-labeled-DTPA-bombesin conjugates at high specific activity and stability: Evaluation of labeling parameters and potential stabilizers. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 70, n. 5, p. 856–863, maio. 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969804312001121>.

PUJATTI, Priscilla Brunelli; COSTA, A. F. E.; JONES, B. D.; COSTA, I. A.; MELLO, J. N. R. De; SANTOS, L. O. Dos. Tratamento De Tumores Neuroendócrinos Por Medicina Nuclear: Revisão Sistemática Da Eficácia E Segurança Do Radiofármaco Dotatate-177Lu. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 6, p. 16, 2014. Disponível em: <https://riee.ufjf.emnuvens.com.br/riee/article/viewFile/2856/1065>.

RAHBAR, K.; SCHMIDT, M.; HEINZEL, A.; EPPARD, E.; BODE, A.; YORDANOVA, A.; CLAESENER, M.; AHMADZADEHFAR, H. Response and Tolerability of a Single Dose of 177Lu-PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Multicenter Retrospective Analysis. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 9, p. 1334–1338, 1 set. 2016. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.116.173757>.

RAHBAR, Kambiz; AFSHAR-OROMIEH, A.; BÖGEMANN, M.; WAGNER, S.; SCHÄFERS, M.; STEGGER, L.; WECKESSER, M. 18F-PSMA-1007 PET/CT at 60 and 120 minutes in patients with prostate cancer: biodistribution, tumour detection and activity kinetics. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 45, n. 8, p. 1329–1334, 14 jul. 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-018-3989-0>.

RAHBAR, Kambiz; AHMADZADEHFAR, H.; KRATOCHWIL, C.; HABERKORN, U.; SCHÄFERS, M.; ESSLER, M.; BAUM, R. P.; KULKARNI, H. R.; SCHMIDT, 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. **Journal of Nuclear**

**Medicine**, v. 58, n. 1, p. 85–90, jan. 2017. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.116.183194>.

RAHBAR, Kambiz; MORRIS, M. J. Is the “VISION” of Radioligand Therapy for Prostate Cancer becoming reality? An Overview of the Phase III trial and the Importance for the Future of Theranostics. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 11, p. jnumed.119.234054, 2019.

RASUL, S.; HACKER, M.; KRETSCHMER-CHOTT, E.; LEISSER, A.; GRUBMÜLLER, B.; KRAMER, G.; SHARIAT, S.; WADSAK, W.; MITTERHAUSER, M.; HARTENBACH, M.; HAUG, A. R. Clinical outcome of standardized 177Lu-PSMA-617 therapy in metastatic prostate cancer patients receiving 7400 MBq every 4 weeks. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 47, n. 3, p. 713–720, 28 mar. 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-019-04584-1>.

RATHKE, H.; AFSHAR-OROMIEH, A.; GIESEL, F. L.; KREMER, C.; FLECHSIG, P.; HAUFE, S.; MIER, W.; HOLLAND-LETZ, T.; DE BUCOURT, M.; ARMOR, T.; BABICH, J. W.; HABERKORN, U.; KRATOCHWIL, C. Intraindividual Comparison of 99m Tc-Methylene Diphosphonate and Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand 99m Tc-MIP-1427 in Patients with Osseous Metastasized Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 9, p. 1373–1379, set. 2018. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.117.200220>.

RAUSCHER, I.; KRÖNKE, M.; KÖNIG, M.; GAFITA, A.; MAURER, T.; HORN, T.; SCHILLER, K.; WEBER, W. A.; EIBER, M. Matched-pair comparison of 68 Ga-PSMA-11 and 18 F-PSMA-1007 PET/CT: frequency of pitfalls and detection efficacy in biochemical recurrence after radical prostatectomy. **Journal of Nuclear Medicine**, p. jnumed.119.229187, 2019.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/423644>.

RAYN, K. N.; ELNABAWI, Y. A.; SHETH, N. Clinical implications of PET/CT in prostate cancer management. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 5, p. 844–854, out. 2018. Disponível em: <http://tau.amegroups.com/article/view/21144/21409>.

REILLY, R. M. **Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 659 p. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470613214>.

RISTAU, B. T.; O'KEEFE, D. S.; BACICH, D. J. The prostate-specific membrane antigen: Lessons and current clinical implications from 20 years of research. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 3, p. 272–279, abr. 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143913003463>.

ROBU, S.; SCHMIDT, A.; EIBER, M.; SCHOTTELIUS, M.; GÜNTHER, T.; HOOSHYAR YOUSEFI, B.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H.-J. Synthesis and

preclinical evaluation of novel 18F-labeled Glu-urea-Glu-based PSMA inhibitors for prostate cancer imaging: a comparison with 18F-DCFPyl and 18F-PSMA-1007. **EJNMMI Research**, v. 8, n. 1, p. 30, 12 dez. 2018. Disponível em: <https://ejnmires.springeropen.com/articles/10.1186/s13550-018-0382-8>.

ROBU, S.; SCHOTTELIUS, M.; EIBER, M.; MAURER, T.; GSCHWEND, J.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H.-J. Preclinical Evaluation and First Patient Application of 99m Tc-PSMA-I&S for SPECT Imaging and Radioguided Surgery in Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 2, p. 235–242, fev. 2017. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.116.178939>.

RUIGROK, E. A. M.; VAN WEERDEN, W. M.; NONNEKENS, J.; DE JONG, M. The Future of PSMA-Targeted Radionuclide Therapy: An Overview of Recent Preclinical Research. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 560, 29 out. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/11/11/560>.

SATHEKGE, M.; BRUCHERTSEIFER, F.; KNOESEN, O.; REYNEKE, F.; LAWAL, I.; LENGANA, T.; DAVIS, C.; MAHAPANE, J.; CORBETT, C.; VORSTER, M.; MORGENSTERN, A. 225Ac-PSMA-617 in chemotherapy-naive patients with advanced prostate cancer: a pilot study. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 46, n. 1, p. 129–138, 19 jan. 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-018-4167-0>.

SATHEKGE, M.; BRUCHERTSEIFER, F.; VORSTER, M.; LAWAL, I. O.; KNOESEN, O.; MAHAPANE, J.; DAVIS, C.; REYNEKE, F.; MAES, A.; KRATOCHWIL, C.; LENGANA, T.; GIESEL, F. L.; VAN DE WIELE, C.; MORGENSTERN, A. Predictors of Overall and Disease-Free Survival in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Receiving 225 Ac-PSMA-617 Radioligand Therapy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 1, p. 62–69, 17 jan. 2020. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.119.229229>.

SAUTER, G.; CLAUDITZ, T.; STEURER, S.; WITTMER, C.; BÜSCHECK, F.; KRECH, T.; LUTZ, F.; LENNARTZ, M.; HARMS, L.; LAWRENZ, L.; MÖLLER-KOOP, C.; SIMON, R.; JACOBSEN, F.; WILCZAK, W.; MINNER, S.; TSOURLAKIS, M. C.; CHIRICO, V.; WEIDEMANN, S.; HAESE, A.; STEUBER, T.; SALOMON, G.; MATIU, M.; VETTORAZZI, E.; MICHL, U.; BUDÁUS, L.; TILKI, D.; THEDERAN, I.; PEHRKE, D.; BEYER, B.; FRAUNE, C.; GÖBEL, C.; HEINRICH, M.; JUHNKE, M.; MÖLLER, K.; BAWAHAB, A. A. A.; UHLIG, R.; HULAND, H.; HEINZER, H.; GRAEFEN, M.; SCHLOMM, T. Integrating Tertiary Gleason 5 Patterns into Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. **European Urology**, v. 73, n. 5, p. 674–683, maio. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283817300301>.

SBMN. **Conheça a medicina nuclear**. Disponível em: <https://sbmn.org.br/comunicacao/conheca-a-medicina-nuclear/>. Acesso em: 02 jun. 2020.

SBU. **Diretrizes para o câncer de próstata**. Disponível em: <http://portaldaurologia.org.br/medicos/wp-content/uploads/2017/06/50.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2020.

SCHMIDT-HEGEMANN, N.-S.; STIEF, C.; KIM, T.-H.; EZE, C.; KIRSTE, S.; STROUTHOS, I.; LI, M.; SCHULTZE-SEEMANN, W.; ILHAN, H.; FENDLER, W. P.; BARTENSTEIN, P.; GROSU, A.-L.; GANSWINDT, U.; BELKA, C.; MEYER, P. T.; ZAMBOGLOU, C. Outcome After PSMA PET/CT–Based Salvage Radiotherapy in Patients with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy: A 2-Institution Retrospective Analysis. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 60, n. 2, p. 227–233, fev. 2019. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.118.212563>.

SCHOTTELIUS, M.; WURZER, A.; WISSMILLER, K.; BECK, R.; KOCH, M.; GORPAS, D.; NOTNI, J.; BUCKLE, T.; VAN OOSTEROM, M. N.; STEIGER, K.; NTZIACHRISTOS, V.; SCHWAIGER, M.; VAN LEEUWEN, F. W. B.; WESTER, H. J. Synthesis and preclinical characterization of the PSMA-targeted hybrid tracer PSMA-I&F for nuclear and fluorescence imaging of prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 60, n. 1, p. 71–78, 2019.

SCHWENCK, J.; REMPP, H.; REISCHL, G.; KRUCK, S.; STENZL, A.; NIKOLAOU, K.; PFANNENBERG, C.; LA FOUGÈRE, C. Comparison of 68 Ga-labelled PSMA-11 and 11 C-choline in the detection of prostate cancer metastases by PET/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 44, n. 1, p. 92–101, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-016-3490-6>.

SCUTTI, J. A. B.; MATSUO, A. L.; PEREIRA, F. V.; MASSAOKA, M. H.; FIGUEIREDO, C. R.; MOREIRA, D. F.; BELIZÁRIO, J. E.; TRAVASSOS, L. R. Role of SOCS-1 Gene on Melanoma Cell Growth and Tumor Development. *Translational Oncology*, v. 4, n. 2, p. 101–109, abr. 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936523311800343>.

SEIFERT, R.; SEITZER, K.; HERRMANN, K.; KESSEL, K.; SCHÄFERS, M.; KLEESIEK, J.; WECKESSER, M.; BOEGEMANN, M.; RAHBAR, K. Analysis of PSMA expression and outcome in patients with advanced Prostate Cancer receiving 177 Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy. *Theranostics*, v. 10, n. 17, p. 7812–7820, 2020. Disponível em: <https://www.thno.org/v10p7812.htm>.

SHARIATI, F.; HOSSEINNEZHAD, T.; ARYANA, K.; ZAKAVI, S. R.; FATTAHI, A. S.; TEHRANI, D. F.; SADRI, K.; SADEGHI, R. The Role of Nuclear Medicine in the Diagnosis and Management of Hepatobiliary and Pancreatic Diseases. *Journal of Cardio Thoracic Medicine*, v. 1, n. 3, p. 73–78, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416032564500272>.

SHARIFI, M.; JALILIAN, A. R.; YOUSEFNIA, H.; ALIREZAPOUR, B.; BAHRAMI-SAMANI, A.; ZOLGHADRI, S. Production, quality control, biodistribution and imaging studies of 177Lu-PSMA-617 in breast adenocarcinoma model. *Radiochimica Acta*, v. 106, n. 6, p. 507–513, 27 jun. 2018. Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/ract.2018.106.issue-6/ract-2017-2874/ract-2017-2874.xml>

SHARP, P. F.; GEMMELL, H. G.; MURRAY, A. D. *Practical Nuclear Medicine*. Third Edit, London: Springer, 2005. 382 p.

SIB. *SwissADME*. Disponível em: <http://www.swissadme.ch/index.php>. Acesso em:

11 nov. 2020.

SILVA, J. J. **Radiomarcção de Inibidor de PSMA com 177Lu e Avaliação Biológica do Potencial para Aplicação no Tratamento do Câncer de Próstata**. 2017. 131 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SITTAMPALAM, G.; COUSSENS, N.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; IVERSEN, P.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; MINOR, L.; NAPPER, A.; PELTIER, J. M.; RISS, T.; TRASK, O.; WEIDNER, J. **Assay Guidance Manual**. Bethesda: Eli Lilly & Company and National Center for Advancing Translational Sciences, 2020. 1267 p. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf\\_NBK53196.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf). Acesso em: 06 abr. 2020.

SONG, H.; HARRISON, C.; DUAN, H.; GUJA, K.; HATAMI, N.; FRANC, B. L.; MORADI, F.; APARICI, C. M.; DAVIDZON, G. A.; IAGARU, A. Prospective Evaluation of 18 F-DCFPyL PET/CT in Biochemically Recurrent Prostate Cancer in an Academic Center: A Focus on Disease Localization and Changes in Management. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 4, p. 546–551, abr. 2020. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.119.231654>

STERZING, F.; KRATOCHWIL, C.; FIEDLER, H.; KATAYAMA, S.; HABL, G.; KOPKA, K.; AFSHAR-OROMIEH, A.; DEBUS, J.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. 68Ga-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 43, n. 1, p. 34–41, 25 jan. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-015-3188-1>.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R. De; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1ª, Rio de: Guanabara Koogan, 2011. 240 p.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 01, n. 02, p. i–iv, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927383/pdf/nihms226784.pdf>.

SWEAT, S. D.; PACELLI, A.; MURPHY, G. P.; BOSTWICK, D. G. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. **Urology**, v. 52, n. 4, p. 637–640, out. 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090429598002787>.

TÖNNESMANN, R.; MEYER, P.; EDER, M.; BARANSKI, A.-C. [177Lu]Lu-PSMA-617 Salivary Gland Uptake Characterized by Quantitative In Vitro Autoradiography. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 18, 24 jan. 2019. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/12/1/18>.

TURKBAY, B.; MENA, E.; LINDENBERG, L.; ADLER, S.; BEDNAROVA, S.; BERMAN, R.; TON, A. T.; MCKINNEY, Y.; ECLARINAL, P.; HILL, C.; AFARI, G.; BHATTACHARYYA, S.; MEASE, R. C.; MERINO, M. J.; JACOBS, P. M.; WOOD, B. J.; PINTO, P. A.; POMPER, M. G.; CHOYKE, P. L. 18F-DCFBC Prostate-Specific

Membrane Antigen–Targeted PET/CT Imaging in Localized Prostate Cancer. *Clinical Nuclear Medicine*, v. 42, n. 10, p. 735–740, out. 2017. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00003072-201710000-00001>.

UMBRICHT, C. A.; BENEŠOVÁ, M.; HASLER, R.; SCHIBLI, R.; VAN DER MEULEN, N. P.; MÜLLER, C. Design and Preclinical Evaluation of an Albumin-Binding PSMA Ligand for 64 Cu-Based PET Imaging. *Molecular Pharmaceutics*, v. 15, n. 12, p. 5556–5564, 3 dez. 2018. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00712>.

UMBRICHT, C. A.; BENEŠOVÁ, M.; SCHMID, R. M.; TÜRLER, A.; SCHIBLI, R.; VAN DER MEULEN, N. P.; MÜLLER, C. 44Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with 177Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with 68Ga-PSMA-11 and 68Ga-PSMA-617. *EJNMMI Research*, v. 7, n. 1, p. 9, 19 dez. 2017. Disponível em: <http://ejnmires.springeropen.com/articles/10.1186/s13550-017-0257-4>.

VIRGOLINI, I.; DECRISTOFORO, C.; HAUG, A.; FANTI, S.; UPRIMNY, C. Current status of theranostics in prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 45, n. 3, p. 471–495, 2018.

WAHL, R. L.; WISSING, J.; DEL ROSARIO, R.; ZASADNY, K. R. Inhibition of autoradiolysis of radiolabeled monoclonal antibodies by cryopreservation. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 31, n. 1, p. 84–89, 1990.

WANG, Z.; TIAN, R.; NIU, G.; MA, Y.; LANG, L.; SZAJEK, L. P.; KIESEWETTER, D. O.; JACOBSON, O.; CHEN, X. Single Low-Dose Injection of Evans Blue Modified PSMA-617 Radioligand Therapy Eliminates Prostate-Specific Membrane Antigen Positive Tumors. *Bioconjugate Chemistry*, v. 29, n. 9, p. 3213–3221, 19 set. 2018. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.8b00556>.

WÄNGLER, B.; SCHIRRMACHER, R.; BARTENSTEIN, P.; WÄNGLER, C. Chelating Agents and their Use in Radiopharmaceutical Sciences. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 968–983, 2011.

WEINEISEN, M.; SCHOTTELIUS, M.; SIMECEK, J.; BAUM, R. P.; YILDIZ, A.; BEYKAN, S.; KULKARNI, H. R.; LASSMANN, M.; KLETTE, I.; EIBER, M.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H.-J. 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 56, n. 8, p. 1169–1176, 2015. a. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.115.158550>.

WEINEISEN, M.; SCHOTTELIUS, M.; SIMECEK, J.; BAUM, R. P.; YILDIZ, A.; BEYKAN, S.; KULKARNI, H. R.; LASSMANN, M.; KLETTE, I.; EIBER, M.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H.-J. 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 56, n. 8, p. 1169–1176, 1 ago. 2015. b. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.115.158550>.

WEINEISEN, Martina; SIMECEK, J.; SCHOTTELIUS, M.; SCHWAIGER, M.;

WESTER, H.-J. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *EJNMMI Research*, v. 4, n. 1, p. 63, 25 dez. 2014. Disponível em: <http://www.ejnmmires.com/content/4/1/63>.

WERNER, P.; NEUMANN, C.; EIBER, M.; WESTER, H. J.; SCHOTTELIUS, M. [<sup>99m</sup>Tc]Tc-PSMA-I&S-SPECT/CT: experience in prostate cancer imaging in an outpatient center. *EJNMMI Research*, v. 10, n. 1, p. 45, 7 dez. 2020. Disponível em: <https://ejnmmires.springeropen.com/articles/10.1186/s13550-020-00635-z>.

WHO. **Cancer Tomorrow**. Disponível em: [https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&type\\_sex=0&mode=population&sex=1&populations=900&cancers=27&age\\_group=value&apc\\_male=0&apc\\_female=0&single\\_unit=5000&print=0](https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=1&type_sex=0&mode=population&sex=1&populations=900&cancers=27&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=5000&print=0). Acesso em: 03 jun. 2020.

WINTER, G.; VOGT, A.; JIMÉNEZ-FRANCO, L. D.; RINSCHIED, A.; YOUSEFZADEH-NOWSHAHR, E.; SOLBACH, C.; BEER, A. J.; GLATTING, G.; KLETTING, P. Modelling the internalisation process of prostate cancer cells for PSMA-specific ligands. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 72–73, p. 20–25, maio. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.05.003>.

WIRTZ, M.; SCHMIDT, A.; SCHOTTELIUS, M.; ROBU, S.; GÜNTHER, T.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity. *EJNMMI Research*, v. 8, n. 1, p. 84, 22 dez. 2018. Disponível em: <https://ejnmmires.springeropen.com/articles/10.1186/s13550-018-0440-2>.

WOLF, P. Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Prostate Cancer - Diagnostic and Therapeutic Advances*, p. 81–100, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/prostate-specific-membrane-antigen-as-biomarker-and-therapeutic-target-for-prostate-cancer>.

WRIGHT, G. L.; HALEY, C.; BECKETT, M. Lou; SCHELLHAMMER, P. F. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 1, n. 1, p. 18–28, jan. 1995. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/107814399500002Y>.

WÜSTEMANN, T.; BAUDER-WÜST, U.; SCHÄFER, M.; EDER, M.; BENESOVA, M.; LEOTTA, K.; KRATOCHWIL, C.; HABERKORN, U.; KOPKA, K.; MIER, W. Design of internalizing PSMA-specific glu-ureido-based radiotherapeutics. *Theranostics*, v. 6, n. 8, p. 1085–1095, 2016.

WÜSTEMANN, T.; HABERKORN, U.; BABICH, J.; MIER, W. Targeting prostate cancer: Prostate-specific membrane antigen based diagnosis and therapy. *Medicinal Research Reviews*, v. 39, n. 1, p. 40–69, jan. 2019. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.21508>.

ZALUSTKY, M. R. *Handbook of Nuclear Chemistry*. Boston, MA: Springer US, 2011. 3049 p. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0720-2>.

ZANG, J.; FAN, X.; WANG, H.; LIU, Q.; WANG, J.; LI, H.; LI, F.; JACOBSON, O.; NIU, G.; ZHU, Z.; CHEN, X. First-in-human study of <sup>177</sup>Lu-EB-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 46, n. 1, p. 148–158, 8 jan. 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-018-4096-y>.

ZHANG, J.; KULKARNI, H. R.; SINGH, A.; SCHUCHARDT, C.; NIEPSCH, K.; LANGBEIN, T.; BAUM, R. P. <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 radioligand therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer patients with a single functioning kidney. *Journal of Nuclear Medicine*, p. jnumed.118.223149, 2019.

ZLATOPOLSKIY, B. D.; ENDEPOLS, H.; KRAPF, P.; GULIYEV, M.; URUSOVA, E. A.; RICHARZ, R.; HOHBERG, M.; DIETLEIN, M.; DRZEZGA, A.; NEUMAIER, B. Discovery of <sup>18</sup>F-JK-PSMA-7, a PET Probe for the Detection of Small PSMA-Positive Lesions. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 60, n. 6, p. 817–823, jun. 2019. Disponível em: <http://jnm.snmjournals.org/lookup/doi/10.2967/jnumed.118.218495>.



## ANEXO A



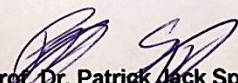
Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**OBTENÇÃO DE KIT DE PSMA-617 PARA PRONTA MARCAÇÃO COM 177LU E AVALIAÇÃO DA SUA APLICABILIDADE NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**”, registrada com o nº 179/16 sob a responsabilidade de **ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN–CNEN/SP), em reunião de 24/10/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro/2017 a Janeiro/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /BALB/c <i>Mus musculus</i> / BALB/c Nude
Nº de animais	68 camundongos
Peso/Idade	12 a 24 semanas
Sexo	68 Machos
Origem	Biotério IPEN

São Paulo, 3 de novembro de 2016.

  
**Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**  
 Vice coordenador da CEUA-IPEN

---

IPEN-CNEN/SP  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**  
 Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP  
 Telefone: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709  
 E-mail: ceuaipen@ipen.br

---

---

**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.

---

---

---