INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**^{89}Zr -Imuno-PET/ ^{111}In -Imuno-SPECT:
desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular
para receptores EGF.**

RAQUEL BENEDETTO

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

**Orientadora:
Prof^ª. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**São Paulo
2017**

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 e Inovação.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**^{89}Zr -Imuno-PET/ ^{111}In -Imuno-SPECT:
desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular
para receptores EGF.**

RAQUEL BENEDETTO

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

Orientadora:

Prof^a. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN**

**São Paulo
2017**

Fonte de Financiamento: 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

BENEDETTO, R. *⁸⁹Zr-Imuno-PET/ ¹¹¹In-Imuno-SPECT: desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular para receptores EGF*. 2017. 200 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

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

Benedetto, Raquel
89 Zr-Imuno-PET/ 111 In-Imuno-SPECT: desenvolvimento
radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular para
receptores EGF / Raquel Benedetto; orientadora ELAINE de
Araújo. -- São Paulo, 2017.
200 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2017.

1. Radiofarmácia. 2. Radioimunodiagnóstico. 3. Medicina
Nuclear. 4. PET. 5. SPECT. I. de Araújo, ELAINE, orient. II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAQUEL BENEDETTO

^{89}Zr -Imuno-PET/ ^{111}In -Imuno-SPECT: Desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular para receptores EGF

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: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Profa. Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo.
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CR.

Julgamento: _____

Profa. Dra.: Lea Mirian Barbosa da Fonseca
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Julgamento: _____

Prof. Dr.: Gerson Antônio Pianetti
Universidade Federal de Minas Gerais.

Julgamento: _____

Prof. Dr.: Fabio Luiz Navarro Marques
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____

Prof. Dr.: Carlos Roberto Jorge Soares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CB.

Julgamento: _____

RESUMO

BENEDETTO, Raquel. *⁸⁹Zr-Imuno-PET/ ¹¹¹In-Imuno-SPECT: desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular para receptores EGF*. 200 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo: 2017.

A baixa seletividade dos métodos convencionais para diagnóstico e terapia de neoplasias, bem como o fato de nem sempre alcançarem o sucesso terapêutico desejado, configuram dificuldades para a prática oncológica. Diante disso, os anticorpos monoclonais (AcMs) radiomarcados, aplicados em técnicas diagnósticas, têm se destacado, visto que permitem a entrega seletiva da radiação ao alvo de interesse. A metodologia Radioimunodiagnóstico (RID), utilizando AcM anti-EGFR radiomarcado, possibilita triagem prévia, avaliando a resistência ao tratamento e estratificando pacientes que possam apresentar benefícios à imunoterapia com cetuximabe. Além disso, permite monitorar a progressão da terapia, visando tratamento mais efetivo e direcionado, promulgando a abordagem da medicina personalizada. No Brasil, ainda não há radioimunoconjugado disponível para diagnóstico e seguimento do câncer. Nesse contexto, o objetivo com este trabalho foi o de desenvolver uma formulação farmacêutica para padronizar uma rotina de produção dos radiofármacos para radioimunodiagnóstico de câncer de cabeça e pescoço e de câncer colorretal: cetuximabe-DTPA-¹¹¹In e cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr. Em adição, corroborar na elucidação dos mecanismos de resistência das células tumorais à terapia com o cetuximabe, através da realização de estudos de ligação do radioimunoconjugado à receptores celulares. Em relação aos radiofármacos estudados, destaca-se que os processos de conjugação do cetuximabe com os quelantes DTPA, na razão molar 1:20, e com o DFO, 1:5, foram bem-sucedidos e otimizados, demonstrando boa reprodutibilidade. Os imunoconjugados apresentaram preservação da imunorreatividade e alta estabilidade quando armazenados a -20°C por até seis meses. Esses imunoconjugados, quando radiomarcado com ¹¹¹In e ⁸⁹Zr, exibiram pureza radioquímica superior a 95%, sem necessidade de purificação pós-marcação, e estabilidade por tempo que possibilita seu transporte às clínicas distantes do centro produtor. As análises *in vitro* do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In em células FaDu-C10 (linhagem resistente) demonstraram percentual inexpressivo de ligação e internalização do radioimunoconjugado, congruindo na explanação do modelo de resistência conferido à linhagem. O estudo de corpo inteiro em MicroPET/TC revelou redução no perfil de captação no grupo de bloqueio, com excesso de cetuximabe não marcado, e intensa captação do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr pelo tumor de células escamosas no grupo sem bloqueador, confirmando a especificidade *in vivo*

do radioimunoconjugado. Os estudos de biodistribuição dos radiofármacos foram compatíveis com os descritos em literatura e validaram os resultados obtidos por imagens em MicroSPECT/TC e MicroPET/TC, além de apresentarem apreciável captação tumoral, considerando os tempos analisados. A estabilidade alta *in vivo* e a eficácia da marcação foram confirmadas pela baixa captação óssea e em tecidos não alvos. O melhor intervalo pós-injeção do radiofármaco para avaliação *in vivo* foi após cinco dias da administração. Conclui-se, portanto, que os radioimunoconjugados para imuno-SPECT e imuno-PET, cetuximabe-DTPA-¹¹¹In e cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, são ferramentas promissoras para diagnóstico e monitoramento de câncer receptor específico (EGFR) e para estratificação de pacientes à terapia anti-EGFR, encorajando a continuidade deste projeto para futuros estudos clínicos.

Palavras-chave: radioimunodiagnóstico; cetuximabe; índio-111; zircônio-89; imagem molecular.

ABSTRACT

BENEDETTO, Raquel. *⁸⁹Zr immuno-PET/¹¹¹In imuno-SPECT: Radiopharmaceutical development of molecular imaging agents for EGF receptors*. 200 p. Thesis (Doutorado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo: 2017.

The low selectivity of conventional methods for cancer diagnosis and therapy, as well as the fact that these methods could not achieve the desired therapeutic success, constitute difficulties for the oncological practice. In this regard, radiolabeled monoclonal antibodies (mAbs) applied in diagnostic techniques have been highlighted, since they allow the selective delivery of the radiation to the specific target. The radioimmunodiagnosis methodology (RID), using radiolabeled anti-EGFR mAbs, enables previous screening, evaluating resistance to treatment and stratifying patients who may present benefits to cetuximab immunotherapy. In addition, it allows monitoring the progression of the therapy, aiming for a more effective and directed treatment, leading the personalized medicine approach. A radioimmunoconjugate is not yet available for diagnosis and management of cancer in Brazil. In this context, this research was carried out to develop a pharmaceutical formulation to standardize a routine production of radiopharmaceuticals for diagnosis and monitoring head and neck cancer and colorectal carcinoma: ¹¹¹In-DTPA-cetuximab and ⁸⁹Zr-DFO-cetuximab. In addition, corroborate in the elucidation of the tumor cells resistance mechanisms to EGFR-targeted therapy, through *in vitro* and *in vivo* radioimmunoconjugate binding studies to cellular receptors. Regarding to the radiopharmaceuticals studied, cetuximab was conjugated to DTPA chelator at 1:20 molar ratio and to DFO at 1: 5, and these processes were successful and optimized, showing good reproducibility. Immunoconjugates showed preservation of immunoreactivity and high stability when stored at -20 °C for up to 6 months. These immunoconjugates when radiolabeled with ¹¹¹In and ⁸⁹Zr have exhibited radiochemical purity above 95%, without any post-labeling purification, and the radioimmunoconjugates have demonstrated stability for a time that allows them to be transported to clinics far from the producer center. ¹¹¹In-DTPA-cetuximab *in vitro* analyzes in FaDu-C10 cells (resistant cell line) has presented an inexpressive percentage of binding and internalization of the radioimmunoconjugate, ensuring the resistance model conferred to this cell line. The MicroPET/CT imaging study has revealed a reduction in uptake profile for "Blocking" group, with an excess of unlabeled cetuximab, and an intense ⁸⁹Zr-DFO-cetuximab uptake in squamous cell tumor for "Non-blocking" group, that evidenced the *in*

in vivo radioimmunoconjugate specificity. The biodistribution studies of the radiopharmaceuticals were well-matched with those described in the literature and they validated the results obtained through the MicroSPECT/CT and MicroPET/ CT images. In addition, these studies *in vivo* have displayed a substantial tumor uptake, according with the analyzed time points. The radioimmunoconjugate showed high *in vivo* stability and labeling procedures efficiency, which were confirmed by low bone and non-target tissues uptake. The best post-injection interval for *in vivo* evaluation is after 5 days of radioimmunoconjugate administration. In conclusion, the radioimmunoconjugates for immuno-SPECT and immuno-PET, ^{111}In -DTPA-cetuximab and ^{89}Zr -DFO-cetuximab, are promising tools for diagnosis and monitoring of specific receptor cancer (EGFR), as well as for stratification of patients to anti-EGFR therapy, and thus encourages the continuity of this project for future clinical trials.

Key words: radioimmunodiagnosis; cetuximab; indium-111; zirconium-89; molecular imaging.

DEDICATÓRIA

Às peças fundamentais de minha vida:
meus pais, irmãos, meu companheiro,
Sofia, Valentina, Helena,
amigos, e à toda “Big Family”.
Sem vocês, nada faria sentido.
Vocês tornam possível o que parecia ser inatingível!

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de existência e direcionador de minhas decisões!

Aos meus pais, Fernando e Jeaneth, exemplos de perseverança, união a todos os momentos, carinho, suporte e incentivo constante.

Aos meus irmãos, Renata e Rodrigo, os “volts” da minha vida, vocês me energizam e proporcionam-me força para prosseguir.

Ao meu eterno companheiro, Paulo Henrique, pela paciência e apoio incondicional, obrigada por ser minha potência motriz e por estar sempre a meu lado, auxiliando-me na concretização dessa etapa.

À grande orientadora, Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo. A senhora é ímpar, pessoa em quem busco inspirações para me aprimorar. Tenho orgulho em dizer que fui sua orientanda!

À Marycel Figols de Barboza, personalidade ilustre na história da radiofarmácia, meus sinceros agradecimentos pela confiança e por impulsionar-me ao doutorado.

À Dra. Suzanne Lapi e sua equipe, por receber-me tão prontamente em St. Louis, na Universidade Washington, e em Birmingham, na Universidade do Alabama, e por todo auxílio prestado.

Ao MSc. Jair Mengatti, por toda contribuição a pesquisa.

À Dra. Adriana Massicano, pela parceria, amizade e pelos ensinamentos primordiais para viabilizar este projeto. Obrigada por “segurar minha mão” e confortar-me!

À Dra. Miriam Fussae Suzuki e demais colegas do Laboratório de Cultura Celular, por ajudar-me no cultivo das células.

Aos funcionários do Biotério por cuidarem e disponibilizarem os animais utilizados nesta pesquisa (a estes, obrigada por suas contribuições à ciência).

Ao Dr. Rui Reis, ao Dr. Euclides Timoteo, ao Dr. Renato Oliveira, e demais colaboradores do Hospital de Câncer de Barretos, por fornecerem as células e por acreditarem no potencial deste projeto.

A todos os funcionários do Centro de Radiofarmácia:

À Dra. Maria Tereza Colturato, por acompanhar este estudo e pelo constante bom humor.

À Dra. Neuza Takeo O. Fukumori e a Dra. Margareth Mie N. Matsuda, por compreenderem as necessidades da pesquisa e possibilitarem o uso dos equipamentos indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Jorge, Rosana, Adriano, José Antônio pelo cuidado e comprometimento ao separarem minhas amostras de índio-111.

Aos colegas do Controle de Qualidade: Jurandi, Alcides, Fábio, Waldir, Domingos, Marcelo, Patrícia, Ideli, Ademar, Laércio, Mário, Magela, Evandro, Eduardo, Vivian, por me auxiliarem no uso dos equipamentos e pela promoção dos eventos que tornaram o clima de trabalho mais harmonioso.

Ao Natanael, por todo auxílio durante os estudos com animais. Sem você a qualidade das imagens e análises de biodistribuição não seriam as mesmas. Muito obrigada!

À Dra. Lorena, Peterson e Walter pelo suporte nos estudos de imagem.

Aos amigos de pós-graduação Adriana, Dani, Lais, Thaís, Ricardo, Cristian, Jefferson, Luis Alberto, Ana Cláudia. Vocês são pessoas memoráveis que contribuíram de maneira singular para a conclusão dessa etapa. Agradeço-lhes pelo apoio, atenção, pelas conversas, alegrias e trocas de experiência. Vocês confortaram-me e tornaram esta trajetória muito mais “leve”.

Às minhas amigas Maysa, Cinthia, Erika, Carol, Michelle; à república Mistura Fina; às minhas primas Isa, Regina, Dani, Fe, Lu, Jack, Ju e Chris, por estarem a meu lado e compreenderem pelos inúmeros eventos a que não pude estar presente.

À Mary e a Lucy, pelos sorrisos e por me ajudarem nas diversas situações.

Aos meus “irmãos e irmãs pela lei”, pelos momentos de descontração.

Aos meus presentinhos de Deus, minha afilhada Sofia, motivo de orgulho, e sobrinhas Valentina e Helena, a alegria de vocês me transmite paz e proporciona-me força para prosseguir!

Aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite.

Ao IPEN, pelo auxílio financeiro.

À CNEN, pela bolsa concedida.

A todos que fizeram parte desta etapa de minha vida e contribuíram para concretização deste sonho.

“Não descobriremos terras novas se não nos
atrevermos a perder de vista as margens
durante longo tempo.”

André Gide

FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Representação esquemática das etapas de separação química do Zircônio-89.	47
Figura 2	Representação esquemática do processo de radiomarcção do anticorpo conjugado ao p-SCN-Bn-DTPA com o radionuclídeo ^{111}In .	48
Figura 3	Representação esquemática do anticorpo marcado com ^{89}Zr utilizando DFO como quelante.	49
Figura 4	Representação esquemática das etapas de preparo do radioimunoconjugado: conjugação do anticorpo ao quelante p-SCN-Bz-Deferoxamina (DFO) seguido do processo de radiomarcção com o radionuclídeo emissor de pósitron (^{89}Zr).	50
Figura 5	Esquema do delineamento experimental deste trabalho.	59
Figura 6	Análises realizadas, os marcos da experimentação (<i>Milestone</i>) e as argumentações estratégicas da primeira fase (FASE I) do trabalho.	60
Figura 7	Análises realizadas, os marcos da experimentação (<i>Milestone</i>) e as argumentações estratégicas da segunda fase (FASE II) do trabalho.	60
Figura 8	Análises realizadas, os marcos da experimentação (<i>Milestone</i>) e as argumentações estratégicas da terceira etapa do trabalho.	61
Figura 9	Fluxograma das etapas e métodos empregados no desenvolvimento do imunoconjugado (FASE I – Etapa 1).	66
Figura 10	Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do imunoconjugado (FASE I – Etapa 2).	71
Figura 11	Eletroforese em gel 4-20% Tris-Glicina, corado com colorimétrico <i>Imperial Protein Stain</i> .	76
Figura 12	Tempos de retenção correspondentes ao cetuximabe e aos imunoconjugados nas diferentes razões molares: 1:10 e 1:20.	78
Figura 13	Perfil de CLAE do AcM não conjugado (A) e do imunoconjugado (1:20) purificado e concentrado (B), com os respectivos TR.	79
Figura 14	Absorbância (UV, 280 nm) das frações de purificação do imunoconjugado em coluna de exclusão molecular (PD-10), utilizando de tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5 como eluente (N=5).	79
Figura 15	Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do imunoconjugado após purificação em coluna de exclusão molecular, utilizando tampão acetato de amônio 0,25 M pH 6,5 como eluente, segregado conforme a fração correspondente.	80
Figura 16	Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do ultrafiltrado após purificação em tubos Amicon® para remoção do quelante DTPA remanescente.	81
Figura 17	Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do imunoconjugado após purificação em tubos Amicon®.	82
Figura 18	Curva de absorbância a 570 nm obtida a partir de diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida (BSA 2 mg/mL).	83

		Pág.
Figura 19	Curva de absorvância a 652 nm obtida a partir de uma solução de 2 mg/mL de p-SCN-Bn-DTPA.	84
Figura 20	Espectro MALDI/TOF dos imunoconjugados (espectrômetro Bruker Autoflex Speed, CEFAP ICB / USP).	86
Figura 21	Perfil cromatográfico do imunoconjugado, na razão molar 1:10, conservado em frações de 0,1 ml, a -20 °C por período de 7 dias (A); 3 meses (B) e 6 meses (C).	88
Figura 22	Perfil cromatográfico do imunoconjugado, na razão molar 1:20, conservado em frações de 0,1 ml, à - 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).	89
Figura 23	Estudo de estabilidade das amostras de imunoconjugados, em diferentes razões molares: 1:10 (A) e 1:20 (B), armazenadas entre 2 °C e 8 °C e a -20 °C.	90
Figura 24	Porcentagem de pureza radioquímica do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In, 37 MBq/mg, nas razões molares 1:10 e 1:20. Resultados expressos em média ± EPM (n ≥ 3).	92
Figura 25	Perfil de CLAE dos imunoconjugados em diferentes razões molares, 1:10 (A) e 1:20 (B) e dos respectivos radioimunoconjugados, 37 MBq/mg, (C) pureza radioquímica superior a 93% e (D) pureza radioquímica > 98%.	93
Figura 26	A): Estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (1:10), 259 MBq/mg, em células FaDu-P. (B): Estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ (1:20), 259 MBq/mg, em células FaDu-P.	95
Figura 27	Análise através da equação da reta e determinação da fração imunorreativa do anticorpo conjugado em diferentes razões molares. Resultados expressos em média ± EPM (n ≥ 3).	95
Figura 28	Análise comparativa da ligação específica (LE) do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In, 259 MBq/mg, à diferentes concentrações de células FaDu-P.	96
Figura 29	Ensaio de ligação específica do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In, nas razões molares 1:10 e 1:20, às células FaDu-P (3 x 10 ⁵) e FaDu-C10 (3 x 10 ⁵).	97
Figura 30	Ensaio de internalização do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In, nas razões AcM:quelante 1:10 e 1:20, às células FaDu-P (3 x 10 ⁵) e FaDu-C10 (3 x 10 ⁵).	98
Figura 31	Fluxograma dos métodos adotados no desenvolvimento do radioimunoconjugado (FASE II).	102
Figura 32	Estudo de estabilidade do radioimunoconjugado (48 horas) por meio de análise da pureza radioquímica do cetuximabe-DTPA (1:20) radiomarcado com índio-111, com diferentes atividades específicas (MBq/mg).	106
Figura 33	Estudo da influência da atividade específica na ligação do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In às células FaDu-P.	107
Figura 34	Análise da estabilidade <i>in vitro</i> do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ (259 MBq/mg) em soro humano (com precipitação de proteínas plasmáticas).	108
Figura 35	Análise da ligação <i>in vitro</i> do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (259 MBq/mg) em relação às proteínas plasmáticas.	110
Figura 36	Estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In, 259 MBq/mg, em células FaDu-C10, em diferentes razões molares, 1:10 e 1:20.	110

		Pág.
Figura 37	Representação esquemática dos estudos <i>in vivo</i> abordados na FASE III.	114
Figura 38	Estudo de Corpo inteiro realizado em MicroSPECT/TC, obtendo-se imagens dos camundongos BALB/c 24 horas (A) e 7 dias (B) após a administração do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (259 MBq/mg; PR ≥ 95%).	118
Figura 39	Estudo de Biodistribuição do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (55 MBq) em camundongos BALB/c após períodos de administração do radiofármaco (n=4).	119
Figura 40	Curva de clareamento sanguíneo do Cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In em camundongos BALB/c (N=4).	121
Figura 41	Corte histopatológico do tumor representando fragmento nodular.	123
Figura 42	Imagens obtidas por MicroSPECT/TC após sete dias da injeção do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (55 MBq) em camundongos SCID implantados com células FaDu-P (flanco esquerdo) e FaDu-C10 (flanco direito).	124
Figura 43	Estudo de Biodistribuição do Cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In (55 MBq) em camundongos SCID modelo tumoral FaDu-P e FaDu-C10 (R-resistente) após diferentes intervalos de administração do radiofármaco (n=3).	125
Figura 44	Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do cetuximabe-DFO (FASE I – Etapa 1).	130
Figura 45	Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do imunoconjugado (FASE I – Etapa 2).	133
Figura 46	Eletroforese em gel.	138
Figura 47	Perfil cromatográfico do cetuximabe (A) e dos imunoconjugados com DFO nas diferentes razões molares: (B) 1:5; (C) 1:20. O quelante livre está indicado com seta.	140
Figura 48	Tempos de retenção correspondentes ao cetuximabe e aos imunoconjugados com DFO nas diferentes razões molares.	141
Figura 49	Curva de absorbância a 570 nm obtida por diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida (BSA 2 mg/mL)	141
Figura 50	Espectro MALDI/TOF dos imunoconjugados (espectrômetro Bruker Autoflex Speed, CEFAP ICB / USP).	143
Figura 51	Estudo de estabilidade das amostras de imunoconjugados, cetuximabe-DFO, em diferentes razões molares. (A) 1:5; (B) 1:10, armazenadas de 2 °C a 8 °C e à -20 °C., representado pelo percentual do pico de CLAE do imunoconjugado integro por intervalo de tempo, em dias.	144
Figura 52 (I)	Perfil cromatográfico dos imunoconjugados, na razão molar 1:5, armazenados a - 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).	145
Figure 52 (II)	Perfil cromatográfico dos imunoconjugados, na razão molar 1:10, armazenados a - 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).	146
Figura 53	Perfil cromatográfico do imunoconjugado, na razão molar 1:10, armazenado em temperatura de 2 °C a 8 °C por período de 6 meses	147
Figura 54	Perfil de CCD obtido em radiocromatógrafo (TLC scanner – AR-2000) indicando os picos do cetuximabe-DFO- ⁸⁹ Zr e o contaminante ⁸⁹ Zr livre.	148
Figura 55	Pureza radioquímica do cetuximabe-DFO- ⁸⁹ Zr em diferentes razões molares.	149

		Pág.
Figura 56	Imagens relacionadas ao estudo <i>in vitro</i> com células FaDu.	149
Figura 57	Resultado da viabilidade celular (95,1%) e contagem de células ($1,82 \times 10^8$) obtidos pelo sistema Cellometer Auto TX4.	150
Figura 58	Estudo de ligação total do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 148 MBq/mg, comparando diferentes razões molares (DFO:AcM), em células FaDu e determinação da fração imunorreativa (r) através da equação da reta.	151
Figura 59	Estudo de ligação total (LT) e não específica (LNE) do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 148 MBq/mg, comparando diferentes razões molares (DFO:AcM), em células FaDu.	152
Figura 60	Fluxograma dos métodos adotados no desenvolvimento do radioimunoconjugado (FASE II).	156
Figura 61	Pico de energia do ^{89}Zr a partir de uma amostra de 0,037 MBq do radioisótopo.	161
Figura 62	Estudo de estabilidade dos radioimunoconjugados (48 horas), armazenados em 2 °C a 8 °C, por meio de análise da pureza radioquímica do Cetuximabe-DFO (1:5) radiomarcado com zircônio-89, em diferentes atividades específicas (MBq/mg)	162
Figura 63	Estudo de imunorreatividade do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 259 MBq/mg, em células FaDu. Determinação da fração imunorreativa (r) por meio da equação da reta.	163
Figura 64	Perfil cromatográfico do radioimunoconjugado, 148 MBq/mg, em CLAE.	164
Figura 65	Perfil cromatográfico obtido em radiocromatógrafo indicando a estabilidade do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 148 MBq/mg, em soro humano.	165
Figura 66	Estudo de internalização por período de incubação (1, 2, 4 e 24h). Percentual de ligação total do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 148 MBq/mg, em superfície e internalizado em células FaDu.	166
Figura 67	Curva representativa da saturação da ligação do radioimunoconjugado às células FaDu-P.	167
Figura 68	Estudo comparativo de ligação total (LT) e não específica (LNE) cetuximabe-DFO- ^{89}Zr (148 MBq/mg) em diferentes linhagens celulares: FaDu parental e a FaDu-R (modelo induzido a resistência).	169
Figura 69	Representação esquemática dos estudos <i>in vivo</i> abordados na FASE III para o Cetuximabe-DFO- ^{89}Zr .	173
Figura 70	Representação esquemática do estudo comparativo <i>in vivo</i> com uso de bloqueador.	175
Figura 71	(A) Foto do modelo tumoral subcutâneo desenvolvidos em camundongos NUDE representando um bom crescimento sem a necessidade de estímulos exógenos. (B) Foto do processo de medição dos diâmetros dos tumores por paquímetro digital.	177
Figura 72	Estudo de corpo inteiro em camundongos NUDE, modelos tumorais com células FaDu. Análise comparativa do perfil de captação observado entre os grupos bloqueados (B) e não-bloqueados (NB), nos tempos de 5 e 7 dias pós-administração do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr .	178
Figura 73	Estudo de Biodistribuição do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr (3,7 MBq) em camundongos NUDE modelo tumoral FaDu-P após 5 e 7 dias da administração do radiofármaco ($n \geq 3$).	180

TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Radionuclídeos SPECT, suas meias-vidas, modo de decaimento e energias dos fótons.	36
Tabela 2	Emissores de pósitrons mais comumente utilizados.	38
Tabela 3	Anticorpos monoclonais aprovados pela ANVISA para tratamento oncológico.	42
Tabela 4	Resumo das publicações relacionadas à marcação de cetuximabe com diferentes elementos radioativos.	52
Tabela 5	Análise por CLAE do anticorpo não conjugado e conjugado.	77
Tabela 6	Representação dos cálculos para determinar o número de quelantes acoplados ao cetuximabe, baseando-se nos dados obtidos pelo espectrômetro de massas Autoflex MALDI-TOF/ TOF.	86
Tabela 7	Análise comparativa entre o método MALDI/TOF com os demais ensaios descritos para calcular o número de quelantes acoplados ao cetuximabe.	87
Tabela 8	Parâmetros farmacocinéticos do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In determinados em camundongos BALB/c (N=4).	122
Tabela 9	Análise do percentual de recuperação proteica em relação a razão molar do imunoconjugados. Resultados expressos em média e DP.	142
Tabela 10	Representação dos cálculos para determinar o número de quelantes acoplados ao cetuximabe, baseando-se nos dados obtidos pelo espectrômetro de massas Autoflex MALDI-TOF/ TOF.	143
Tabela 11	Parâmetros de ligação dos radioimunoconjugados às células FaDu-P após ajuste das curvas de saturação por regressão não-linear (n = 3). Os valores representam média + EPM.	168
Tabela 12	Análise comparativa entre os radioimunoconjugados estudos.	183

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μCi – microcurie;

AAIII – arsenazo III;

AcMs – anticorpos monoclonais;

ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo;

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ARCAL – *Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe*;

ASCO – *American Society of Clinical Oncology*;

B – camundongos do grupo de bloqueio (que receberam uma dose prévia de cetuximabe);

BALB/c – linhagem genética do rato (*Mus musculus*) albino c;

BCA – ácido bicinconínico;

BP – potencial de ligação;

BPF – boas práticas de fabricação;

BRAF – *proto-oncogene B-Raf* (proteína quinase serina/treonina);

CAM – complexo de ataque à membrana;

CCD – cromatografia em camada delgada;

CCR – câncer colorretal;

CCRm – carcinoma colorretal metastático;

CD20 – grupamento de diferenciação 20;

CD38 – grupamento de diferenciação 38;

CD52 – grupamento de diferenciação 52;

CDC – citotoxicidade dependente de complemento;

CDR – *complementarity determining regions*;

CHX-A"-DTPA – ácido [(R)-2-amino-3-(4-isotiocianatofenil)propil]-trans-(S,S)-ciclohexano-1,2-diamino-pentaacético;

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência;

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear;

CNPC – câncer de pulmão de não pequenas células;

Cps – contagens por segundo;

CSF – fator de crescimento de macrófagos;

CTLA4 – antígeno 4 associado ao linfócito C citotóxico;

DMEM – *dulbecco's modified eagle's medium*;

DFO – p-isotiocianatobenzil-deferoxamina;

DMSO – dimetilsulfóxido;

DOTA – ácido tetracético 1,4,7,10-tetrazaciclododecano-N,N',N'',N''';
DP – desvio padrão;
DTPA – ácido dietilenotriamino pentaacético;
EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético;
EGF – fator de crescimento epidérmico;
EGFR – receptor de fator de crescimento epidérmico;
EMT – transição epitélio-mesenquimal;
EPM – erro padrão da média;
ERK – *extracellular signal-regulated*;
Fab – fragmentos ligantes de antígeno;
Fc – fragmento cristalizável;
FDA – *Food and Drug Administration*;
FDG – 2-fluorodeoxiglicose ;
GAPs – proteínas ativadoras de GTPase;
GTP – trifosfato de guanosina;
HAMA – *human anti-mouse antibodies*;
HER2 – receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano;
HNSCC – carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço;
IACUC – *Institutional Animal Care and Use Committee*;
IgG1 – imunoglobulina série 1;
IM – imagem molecular;
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares;
IV – intravenoso;
KDa – Quilodalton;
KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*;
LT – ligação total;
LE – ligação específica;
LNE – ligação não específica;
MALDI-TOF – *matrix associated laser desorption-ionization - time of flight*;
mAU – *milli absorption units*;
MBq – megaBecquerel;
MEK – *mitogen-activated protein kinase*;
MicroPET/CT – *Positron emission tomography/ computed tomography*;
MicroSPECT/CT – *Single photon emission/ computed tomography*;

NB – camundongo do grupo não-bloqueado;
NOTA – ácido 2-S-(4-aminobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético;
N-sucDf – N-succil-deferoxamina;
OMS – Organização Mundial de Saúde;
PBS – tampão fosfato salino;
PD-1 – receptor de morte programada 1;
PIK3CA – *phosphoinositide-3-kinase, catalytic alpha polypeptide*;
Rf – fator de retenção;
RAF - proteínas quinases citoplasmáticas, quinase específica para Serina / Treonina)
RID – radioimunodiagnóstico;
RIT – radioimunoterapia;
RM – ressonância magnética;
SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.
SCID – *severe combined immunodeficient*;
SUV – *standardized uptake value*;
TC – tomografia computadorizada;
TLC – *thin layer chromatography*;
TR – tempo de retenção;
Vd – volume de distribuição;
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
3.1	Neoplasias.....	32
3.1.1	Câncer de cólon e reto	33
3.1.2	Câncer de cabeça e pescoço	33
3.2	Medicina Nuclear em Oncologia	34
3.2.1	Radiofarmácia	35
3.2.2	Métodos de obtenção de imagens em medicina nuclear	36
3.3	Os anticorpos monoclonais e a imunoterapia do câncer	39
3.3.1	Cetuximabe	42
3.4	Radioimunodiagnóstico	44
3.5	Radionuclídeos aplicados em radioimunodiagnóstico.....	45
3.5.1	Índio-111	45
3.5.2	Zircônio-89.....	46
3.6	Quelantes bifuncionais macrocíclicos e o processo de conjugação	46
3.7	Cetuximabe no radioimunodiagnóstico	51
3.8	Outros anticorpos monoclonais radiomarcados com índio-111 e zircônio-89	55
3.8.1	Trastuzumabe	55
3.8.2	Pertuzumabe	56
3.8.3	Bevacizumabe	57
3.8.4	Rituximabe	57
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
4.1	Delineamento experimental.....	58
5	CETUXIMABE-DTPA: ANÁLISE DO ACM E ESTUDOS DE CONJUGAÇÃO.....	62
5.1	Objetivos específicos	62
5.2	Materiais	62
5.2.1	Infraestrutura	62
5.2.2	Reagentes	62
5.2.3	Implementos	63
5.2.4	Equipamentos e sistemas	64

5.2.5	Células tumorais	64
5.3	Método	65
5.3.1	Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 1.....	65
5.3.2	Análise da integridade estrutural do anticorpo e do imunoconjugado	65
5.3.3	Preparo do imunoconjugado.....	65
5.3.4	Fluxograma da Metodologia FASE I – Etapa 2	71
5.3.5	Desenvolvimento do Imunoconjugado	72
5.3.6	Análise estatística	75
5.4	Resultados e discussão Fase I	75
5.4.1	Análise da integridade do cetuximabe	75
5.4.2	Preparo do imunoconjugado.....	76
5.4.3	Análise da estabilidade do imunoconjugado por CLAE.....	88
5.4.4	Análise da pureza radioquímica	91
5.4.5	Estudos <i>in vitro</i> com células FaDu	94
5.5	Conclusão	99
6	CETUXIMABE-DTPA-¹¹¹IN: ESTUDOS DE RADIOMARCAÇÃO	100
6.1	Objetivos específicos	100
6.2	Materiais	100
6.2.1	Infraestrutura	100
6.2.2	Reagentes	100
6.2.3	Implementos.....	101
6.2.4	Equipamentos e sistemas	101
6.2.5	Células tumorais	101
6.3	Método	101
6.3.1	Fluxograma da metodologia FASE II.....	102
6.3.2	Desenvolvimento do radioimunoconjugado	103
6.3.3	Estudos <i>in vitro</i> – modelo de resistência.....	104
6.3.4	Análise estatística	105
6.4	Resultados e discussão Fase II.....	105
6.4.1	Determinação da melhor atividade específica.....	105
6.4.2	Análise do coeficiente de partição	107
6.4.3	Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano	108
6.4.4	Ligação do cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In às proteínas plasmáticas	108
6.4.5	Estudos <i>in vitro</i> – modelo de resistência.....	110
6.5	Conclusão	111

7	CETUXIMABE-DTPA-¹¹¹IN: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	112
7.1	Objetivos específicos	112
7.2	Materiais	112
7.2.1	Infraestrutura	112
7.2.2	Reagentes	112
7.2.3	Implementos	113
7.2.4	Equipamentos	113
7.2.5	Células tumorais	113
7.2.6	Animais	113
7.3	Método	114
7.3.1	Esquema dos estudos abordados na FASE III.....	114
7.3.2	Estudo de corpo inteiro em camundongos BALB/c	115
7.3.3	Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c	115
7.3.4	Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c.....	115
7.3.5	Desenvolvimento do Modelo Xenográfico	116
7.3.6	Estudo de corpo inteiro em camundongos SCID	117
7.3.7	Estudo de biodistribuição em camundongos SCID	117
7.4	Resultados e discussão	117
7.4.1	Estudo de corpo inteiro em camundongos BALB/c	117
7.4.2	Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c	119
7.4.3	Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c.....	120
7.4.4	Desenvolvimento do modelo xenográfico	122
7.4.5	Estudo de corpo inteiro em camundongos SCID	124
7.4.6	Estudo de biodistribuição em camundongos SCID	125
7.5	Conclusão	126
8	CETUXIMABE-DFO: ANÁLISE DO ACM E ESTUDOS DE CONJUGAÇÃO.....	127
8.1	Objetivos específicos	127
8.2	Materiais	127
8.2.1	Infraestrutura	127
8.2.2	Reagentes	127
8.2.3	Implementos	128
8.2.4	Equipamentos e sistemas	128
8.2.5	Cultivo Celular	129
8.3	Método	129
8.3.1	Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 1.....	129
8.3.2	Análise da integridade estrutural do anticorpo.....	131

8.3.3	Preparo do Imunoconjugado	131
8.3.4	Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 2.....	133
8.3.5	Desenvolvimento do Imunoconjugado	134
8.3.6	Análise estatística	137
8.4	Resultados e discussão Fase I	138
8.4.1	Análise da integridade do cetuximabe e dos imunoconjugados.....	138
8.4.2	Preparo do imunoconjugado.....	139
8.4.3	Análise da estabilidade do imunoconjugado por CLAE.....	143
8.4.4	Análise da pureza radioquímica	147
8.4.5	Estudos <i>in vitro</i> com células FaDu	149
8.5	Conclusão	153
9	CETUXIMABE-DFO-⁸⁹Zr: ESTUDOS DE RADIOMARCAÇÃO.....	154
9.1	Objetivos específicos	154
9.2	Materiais	154
9.2.1	Infraestrutura	154
9.2.2	Reagentes	154
9.2.3	Materiais.....	155
9.2.4	Equipamentos e sistemas	155
9.2.5	Cultivo Celular	155
9.3	Método	156
9.3.1	Fluxograma da metodologia FASE II.....	156
9.3.2	Desenvolvimento do radioimunoconjugado	157
9.3.3	Estudos <i>in vitro</i> – modelo de resistência.....	159
9.3.4	Análise estatística	160
9.4	Resultados e discussão Fase II.....	161
9.4.1	Análise da pureza radionuclídica.....	161
9.4.2	Determinação da melhor atividade específica.....	161
9.4.3	Análise do coeficiente de partição	164
9.4.4	Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano	164
9.4.5	Estudo de internalização	166
9.4.6	Estudo de Saturação.....	167
9.4.7	Estudos <i>in vitro</i> – modelo de resistência.....	168
9.5	Conclusão	170
10	CETUXIMABE-DFO-⁸⁹Zr: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	171
10.1	Objetivos específicos	171
10.2	Materiais	171

10.2.1	Infraestrutura	171
10.2.2	Reagentes	171
10.2.3	Implementos	172
10.2.4	Equipamentos	172
10.2.5	Cultivo Celular	172
10.2.6	Animais	172
10.3	Método	173
10.3.1	Esquema dos estudos abordados na FASE III.....	173
10.3.2	Medição dos diâmetros e cálculo do volume dos tumores.....	174
10.3.3	Estudo comparativo com uso de bloqueador	174
10.4	Resultados e discussão	176
10.4.1	Medição dos diâmetros e cálculo do volume dos tumores.....	176
10.4.2	Estudo de imagem MicroPET/TC em camundongos NUDE.....	177
10.4.3	Estudo de biodistribuição em camundongos NUDE	179
10.5	Conclusão	181
11	CONCLUSÕES FINAIS	182
	REFERÊNCIAS	186
	ANEXOS	196
1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	196
2	CARTA DA CEUA-IPEN/SP SOBRE ALTERAÇÃO DO PLANO DE TRABALHO....	197
3	LAUDO DO CENTRO VETERINÁRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA	198
4	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – IACUC- ALABAMA	199
5	DECLARAÇÃO – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO	200

1 INTRODUÇÃO

A longevidade da população tem contribuído para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, incluindo neoplasias malignas. Com base no documento **Estimativa 2016-Incidência de Câncer no Brasil**, do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva (2016) (INCA), é inquestionável que o câncer seja caracterizado como problema de saúde pública e, espera-se para as próximas décadas, que o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025¹.

Com o advento de novas tecnologias, o tratamento do câncer tem evoluído no sentido de tornar-se mais seletivo e direcionado às células tumorais². Nesse cenário, os anticorpos monoclonais (AcMs) vêm se destacando, devido ao êxito na aplicação terapêutica, sendo responsáveis por parcela significativa dos medicamentos biológicos em desenvolvimento^{2,3}.

A utilização de AcMs como agentes terapêuticos contra o câncer tem sido amplamente explorada, visto que, em contraste à quimioterapia, os anticorpos possuem suficiente especificidade pelo antígeno e se ligam preferencialmente ao tecido tumoral. Essa propriedade dos anticorpos tem sido grande ferramenta da indústria farmacêutica para aumentar a ação do fármaco e minimizar seus efeitos colaterais³.

O cetuximabe é um anticorpo monoclonal (AcM) quimérico (IgG1) direcionado ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um receptor tirosina-quinase, superexpresso na maioria das malignidades epiteliais, que desempenha um papel central na proliferação celular, no sistema de reparo do DNA e na regulação de resposta à hipóxia⁴.

Esse AcM foi aprovado pela organização norte americana de controle de alimentos e drogas (*Food and Drug Administration*, FDA) no ano de 2004, como monoterapia ou em associação a: (i) quimioterapia, para tratamento de carcinoma de células escamosas colorretais e de cabeça e pescoço e (ii) radioterapia, para tratamento de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço⁵.

Com o objetivo de aumentar o efeito citotóxico, radionuclídeos têm sido conjugados aos AcMs para radioimunoterapia (RIT). A RIT consiste na administração sistêmica de um elemento radiativo, radionuclídeos que possuem emissão de partículas α ou β^- , conjugado a um AcM dirigido seletivamente contra antígenos tumorais, evitando danos

ao tecido normal⁶. A radiação pode agir sinergicamente com a imunoterapia, aumentando a resposta imune, diminuindo a imunossupressão e alterando o fenótipo das células tumorais^{7,9}.

A radioimunoterapia tem se mostrado modalidade terapêutica promissora, especialmente para terapia de tumores hematológicos, o que tem impulsionado o desenvolvimento desse tipo de radiofármaco. Muitos trabalhos foram realizados com anticorpos monoclonais já disponíveis no mercado, alguns já utilizados em imunoterapia, apresentando resultados incentivadores. É possível citar o trastuzumabe¹⁰ e o pertuzumabe¹¹, para tratamento de câncer de mama, o rituximabe¹², para terapia de linfoma indolente, o nimotuzumabe¹³, para tratamento de câncer colorretal.

Os anticorpos radiomarcados também podem ser aplicados em técnicas diagnósticas¹⁴. Considerando os métodos de imagem em Medicina Nuclear, há dois tipos de tomografia computadorizada (TC) por emissão: Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) ou Tomografia por emissão de pósitrons (PET)¹⁵. O índio-111 é metal radioativo produzido por ciclotron, e um dos radionuclídeos para SPECT, sendo bastante aplicado para marcação de AcM, devido a sua meia-vida física (2,8 dias). O zircônio-89 (meia-vida de 3,3 dias) decai, inicialmente, via emissão de pósitrons e captura eletrônica a ^{89m}Y (meia-vida de 15,7 s) que, por sua vez, decai via emissão de raios gama (909 keV) para o ⁸⁹Y estável. Com seus pósitrons de energia relativamente baixa (média de energia 395 keV), o ⁸⁹Zr fornece imagens PET de alta resolução. Além disso, a disparidade entre os fótons de energia (511 KeV) e os raios gama (909 KeV) impede este último de interferir com a detecção dos fótons de 511 keV. Sendo assim, a reconstrução de exames PET baseados em ⁸⁹Zr apresenta boa qualidade de imagem¹⁶.

A imagem molecular (IM) tem grande relevância para detecção e caracterização das propriedades biológicas de tumores¹⁷. Os anticorpos radiomarcados, aplicados em técnicas diagnósticas, permitem a entrega seletiva da radiação ao alvo de interesse, proporcionando a combinação entre a sensibilidade do método diagnóstico, SPECT ou PET, e a especificidade do anticorpo¹⁸.

Essa metodologia, radioimunodiagnóstico (RID), visa estratificar pacientes que possam apresentar benefícios com a imunoterapia, monitorar a progressão da terapia, além de avaliar a resistência aos medicamentos¹⁸. Nesse cenário, o uso do cetuximabe radiomarcado favorece a triagem prévia, selecionando pacientes candidatos ou resistentes ao tratamento com o imunoterápico. Em adição, possibilitaria monitorar a progressão da

terapia, visando tratamento mais efetivo e direcionado, promovendo a abordagem da medicina personalizada.

Neste estudo, pretendeu-se obter uma formulação farmacêutica para padronizar a rotina de produção do radiofármaco baseado no cetuximabe. A translação de um agente de IM, do desenvolvimento farmacêutico ao direcionamento clínico, envolve múltiplas etapas e desafios. Para definir um novo radiofármaco a ser aplicado em estudos clínicos, é necessária a compreensão das fases críticas de preparo do “composto químico” (fase pré-clínica) até a obtenção do radiofármaco, projetado conforme requisitos de qualidade e segurança necessários à investigação em seres humanos.

No Brasil, ainda não há disponível um radioimunoconjugado para diagnóstico e seguimento do câncer. Pensando nessa necessidade nacional, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), maior desenvolvedor e produtor de radiofármacos no país, pretende, por intermédio deste trabalho, disponibilizar à sociedade os radioimunoconjugados cetuximabe-DTPA-¹¹¹In e cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, para que contribuam no diagnóstico e monitoramento de câncer de cabeça e pescoço e câncer colorretal, com SPECT e PET, respectivamente.

Conforme dados apontados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, o valor estimado do “custo-câncer” no mundo é de US\$1,1 trilhão, entre gastos com saúde e perda de produtividade, e a OMS reforça que a atuação em serviços diagnósticos é fundamental para frear a expansão da doença. Segundo o INCA¹, o custo referente ao tratamento dessa doença supera em oito vezes os valores destinados às ações de prevenção secundária, que envolvem a detecção de câncer subclínico pelo diagnóstico.

Além disso, o direcionamento de terapia mais efetiva e personalizada, por meio de triagem precedente por métodos de imagem, favorece não apenas a redução de custos, mas principalmente a sobrevida dos pacientes.

Nesse sentido, o estudo contou com a parceria do Hospital de Câncer de Barretos – SP, visando corroborar na elucidação dos mecanismos de resistência das células tumorais à terapia com o cetuximabe, pela realização de estudos de ligação do cetuximabe radiomarcado à receptores celulares. A utilização do método de RID, aplicando os radioimunoconjugados desenvolvidos neste projeto, possibilitará selecionar previamente os pacientes que apresentam resistência à terapia anti-EGFR, evitando custos com tratamento ineficiente que compromete a sobrevida desses indivíduos e, assim, favorecendo a definição da terapia mais eficaz e específica.

De forma inédita, este trabalho avaliou a influência do agente quelante e do radionuclídeo selecionado na imunorreatividade do anticorpo radiomarcado e a interferência da atividade específica na capacidade de ligação do radioimunoconjugado à receptores tumorais. Em adição, analisou-se a biodistribuição, farmacocinética e estabilidade *in vivo* do cetuximabe radiomarcado.

Parte deste projeto foi desenvolvida na Universidade de Washington, St. Louis e na Universidade do Alabama, Birmingham, onde foi possível acompanhar o processo de produção do radioelemento zircônio-89 em ciclotron, de grande interesse para o IPEN, que pretende produzir este radionuclídeo no futuro.

Por fim, ressaltando o ineditismo do projeto, definiu-se formulações farmacêuticas para produção nacional de radioimunoconjugados, aplicados em RID, até então, não disponíveis no Brasil, e avaliou-se a estabilidade deste radiofármaco, visando determinar o prazo de validade do radiofármaco e as condições ideais para armazenamento, possibilitando seu transporte aos centros de medicina nuclear, para estabelecer futuros estudos clínicos.

2 OBJETIVOS

Neste capítulo, apresentam-se os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver no IPEN o método de produção de radioimunocombinados, a partir do AcM anti-EGFR (cetuximabe) para aplicações em radioimunodiagnóstico SPECT e PET, resultando em formulações que possibilitem padronizar a rotina de produção dos radiofármacos cetuximabe-DTPA- ^{111}In e cetuximabe-DFO- ^{89}Zr .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as técnicas de conjugação dos quelantes DTPA e DFO ao AcM cetuximabe;
- Avaliar a influência de número de quelantes por AcM na estabilidade e imunorreatividade dos radioimunocombinados;
- Definir a melhor atividade específica dos radioimunocombinados a ser aplicada em estudos clínicos;
- Estudar a estabilidade dos imunocombinados e radioimunocombinados em diferentes condições de armazenamento;
- Aperfeiçoar as condições de radiomarcagem dos imunocombinados com os radionuclídeos ^{111}In e ^{89}Zr de modo a obter alta pureza radioquímica e estabilidade;
- Avaliar a influência da atividade específica na estabilidade e imunorreatividade do radioimunocombinado;
- Analisar a biodistribuição e farmacocinética do cetuximabe-DTPA- ^{111}In e cetuximabe-DFO- ^{89}Zr ;
- Desenvolver estudos comparativos *in vivo*, em modelos tumorais de resistência (cetuximabe-DTPA- ^{111}In) e em grupos de bloqueio com AcM anti-EGFR (cetuximabe-DFO- ^{89}Zr).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, serão revisadas as principais publicações relacionadas ao tema deste trabalho.

3.1 NEOPLASIAS

Segundo dados da OMS¹, o câncer é responsável por 13% das mortes anuais e estima-se, para o ano de 2020, mais de 16 milhões de novos casos, com 10 milhões de óbitos. No Brasil, foram registradas 189.454 fatalidades por câncer em 2013¹. Para 2017, estima-se a ocorrência de mais de 596 mil casos da doença no País. Entre os homens, são esperados 295.200 novos casos e, entre as mulheres, 300.870. O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não melanoma (175.760 casos novos a cada ano), o que corresponde a 29% do total estimado. Depois desse, para os homens, os cânceres mais incidentes serão os de próstata (61.200 novos casos/ano), pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920), cavidade oral (11.140), esôfago (7.950), bexiga (7.200), laringe (6.360) e leucemias (5.540). Entre as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860), estômago (7.600), corpo do útero (6.950), ovário (6.150), glândula tireoide (5.870) e linfoma não-Hodgkin (5.030)¹.

Antigamente, o câncer era conceituado como um conjunto de células alteradas em proliferação. Atualmente, é caracterizado como um microambiente no qual as interações entre os elementos celulares e moleculares que o compõem são determinantes na progressão tumoral. Como resultado, a compreensão do evento neoplásico ganha complexidade crescente¹⁹. A dinâmica das células tumorais passa a ser avaliada como parte do verdadeiro tecido tumoral, sujeita a condições de vascularização, de oxigenação, de pressão intersticial e de necrose tecidual que influenciam na cinética tumoral. Essas células têm propriedades bioquímicas, morfológica e funcionais variadas²⁰.

No modelo atual da oncogênese, o câncer surge a partir de células que sofrem sequência de mutações ou alterações genéticas. Tais alterações podem ser resultados de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios

na replicação do DNA, quanto extrínsecos, como o dano e instabilidade genética, que vão progressivamente interferir nos mecanismos responsáveis por proliferação, diferenciação e morte celular²¹.

Alterações importantes podem ser observadas na membrana plasmática de células tumorais, tornando-as menos aderentes entre si e favorecendo o deslocamento da colônia neoplásica. Com isso, elas podem se deslocar, infiltrar-se em tecidos adjacentes, penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos e, então, migrar para regiões distantes do organismo, propiciando surgimento de novos tumores, é o processo denominado metástases²².

O processo de carcinogênese pode induzir ao aparecimento ou alterações de macromoléculas não encontradas em células normais, associadas à ocorrência, progressão e prognóstico do tumor. Esses marcadores tumorais podem ser proteínas (ou fragmentos), incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios. Essas macromoléculas indicadoras favorecem o manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, monitoramento, avaliação de resposta terapêutica e detecção de recidivas²³.

3.1.1 Câncer de cólon e reto

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia que se origina de qualquer porção do cólon, reto ou canal anal. A doença começa na camada superficial do revestimento intestinal e, com o tempo, vai atingindo as camadas mais profundas²⁴.

O câncer de cólon e reto está entre os tumores malignos mais comuns. Segundo a última estimativa mundial, o câncer de cólon e reto é o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo nas mulheres¹.

No Brasil, o câncer de cólon e reto é o terceiro tipo mais comum da doença, sendo registrados cerca de 34 mil casos no ano de 2016. Apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento, a mortalidade causada por esses tumores continua alta e mantêm-se praticamente no mesmo nível nos últimos 40 anos, de tal forma que a sobrevida média global de cinco anos tem sido descrita como em torno de 55% nos países desenvolvidos e de 40% para países em desenvolvimento¹.

3.1.2 Câncer de cabeça e pescoço

Câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo definido por bases anatômico-topográficas para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região

anatômica inclui a cavidade oral, faringe e laringe. Um subgrupo frequente dos carcinomas de cabeça e pescoço é referido como “câncer oral” surgindo nas mucosas da boca (lábios, base da língua, língua, assoalho bucal e palato duro) e faringe (compreende a orofaringe, a hipofaringe e a nasofaringe). Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e o restante nos demais sítios remanescentes (glândulas salivares, tireóide)²⁵. O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular, presente em mais de 90% dos casos²⁶.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) constitui o quinto tipo de câncer mais comum mundialmente, com incidência anual global de 780.000 novos casos²⁷. Essa doença é responsável por grande incidência de óbitos em todo o mundo, constituindo a sexta causa de morte por câncer. No mundo, aproximadamente 200 mil casos novos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados por ano²⁸.

No Brasil, estima-se em aproximadamente 13.470 novos casos de câncer de cavidade oral por 100 mil habitantes, com taxas de 10.060 para o sexo masculino e 3.410 para o sexo feminino. A incidência do câncer bucal no Brasil representa 2% de todos os cânceres, sendo uma das mais altas do mundo e de importante expressividade na América Latina. A taxa de mortalidade é estimada em aproximadamente 12.300 mortes por ano, e a sobrevida é de apenas 40% a 50% para pacientes diagnosticados²⁹.

A importância do câncer de cabeça e pescoço estabelece-se pelo alto número de sequelas ou deformidades associadas à própria doença ou pelo tratamento. O maior impacto é devido ao diagnóstico tardio, pois o paciente encontra-se com doença avançada e, como consequência, piora o prognóstico em termos de cura ou sobrevida em cinco anos²⁷.

3.2 MEDICINA NUCLEAR EM ONCOLOGIA

Progressivamente, esforços têm sido direcionados visando o diagnóstico precoce e o estadiamento preciso para tratamento eficaz de pacientes com cânceres³⁰. A imagem molecular (IM), especialmente obtida com técnicas de SPECT e PET, é ferramenta importante para a detecção de câncer e para caracterização das propriedades biológicas de tumores. A definição da biologia do tumor no paciente pode auxiliar na seleção ideal do alvo específico para terapia contra o câncer¹⁷.

A IM também pode avaliar a entrega de agentes terapêuticos aos tumores e monitorar a progressão do tratamento, a fim de prever a resposta tumoral e a eficácia

terapêutica¹⁷. Dessa forma, as pesquisas radiofarmacêuticas referentes ao desenvolvimento de agentes de IM para o câncer têm apresentado um rápido crescimento.

3.2.1 Radiofarmácia

A Radiofarmácia é ciência multidisciplinar e essencial, diretamente vinculada a Medicina Nuclear. Suas funções estão relacionadas ao planejamento, preparo e controle de qualidade de radiofármacos. A medicina nuclear é a especialidade médica que, utilizando radionuclídeos incorporados a compostos específicos (radiofármacos), avalia a fisiologia e funções metabólicas, mediante o registro da radioatividade detectada em curvas de atividade em função do tempo, tanto para fins de diagnóstico quanto terapêuticos³¹.

A medicina nuclear obtém imagens cintilográficas por meio da administração de radiofármacos e medindo externamente a radiação emitida que atravessa o organismo, ao contrário das técnicas radiológicas convencionais, que medem a absorção da radiação aplicada externamente.

A ação da maioria dos radiofármacos é derivada de dois componentes: um componente não radioativo (um carregador ou ligante) e um componente radioativo (ou radionuclídeo). Os ligantes ou carregadores dirigem o radionuclídeo a um órgão específico ou processo, onde o componente radionuclídico pode ser detectado. Os mecanismos que promovem a ligação do radiofármaco ao sítio alvo podem ser diversos, envolvendo desde a simples perfusão sanguínea do composto pelos órgãos de interesse, até a ligação a receptores celulares específicos ou participação na via metabólica ou processo bioquímico. Essa particularidade dos radiofármacos distingue a técnica diagnóstica da medicina nuclear de outras técnicas como a ressonância magnética ou tomografia convencional que se limitam, na maioria das vezes, a obter imagens da estrutura anatômica, sem correlação funcional³².

O componente radioativo caracteriza a aplicabilidade diagnóstica ou terapêutica do radiofármaco. Para diagnóstico em medicina nuclear, utilizam-se radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) ou emissores de pósitron (β^+), já que o decaimento destes radionuclídeos resulta em radiação eletromagnética penetrante, que consegue atravessar os tecidos e, então, ser detectada externamente. Para os radiofármacos usados em terapia, aplicam-se radionuclídeos emissores de partículas ionizantes alfa (α) e beta (β^-), pois sua ação se baseia na destruição seletiva de tecidos³³.

Os radionuclídeos comumente utilizados na clínica são produzidos artificialmente por reatores ou aceleradores de partículas. Podem, ainda, ser obtidos por geradores de radioisótopos. Os radionuclídeos que decaem por emissão de partículas β^- são

geralmente produzidos em reator por fissão do ^{235}U ou por reações de captura de nêutrons (n,γ ou n,p) em amostra alvo apropriada³⁶. Os radionuclídeos que decaem por captura eletrônica ou emissão de pósitrons (partículas β^+) são produzidos em ciclotrons³⁴.

3.2.2 Métodos de obtenção de imagens em medicina nuclear

Métodos de imagem buscam auxiliar no diagnóstico e prognóstico do quadro clínico do paciente por meio do uso de tecnologias de produção e análise de imagens³⁵. Atualmente, numerosos dispositivos e equipamentos capazes de produzir imagens clínicas estão disponíveis no mercado.

Essencialmente podem-se destacar duas técnicas para obtenção de imagens em medicina Nuclear: a técnica de SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton único) e a tecnologia PET (tomografia por emissão de pósitrons).

No primeiro caso, os radiofármacos utilizados têm na sua composição radionuclídeos emissores de radiação γ e, na segunda técnica, utilizam-se radiofármacos emissores de pósitrons (β^+)³⁶.

3.2.2.1 Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)

Em um sistema SPECT, o detector gira 360° ao redor do paciente para aquisição de imagens bidimensionais, da mesma forma que nas gama-câmaras planares. A reconstrução da imagem permite a visualização em três planos ortogonais: transversal, sagital e coronal. Fatias eletrônicas de cada órgão são produzidas em cada plano de forma que a distribuição da radioatividade possa ser visualizada em três dimensões. Uma câmara SPECT pode ser utilizada para obtenção de imagens planares ou SPECT³⁷.

Na tabela 1, apresentam-se os principais radioisótopos utilizados para diagnóstico por imagem SPECT, com algumas de suas características físicas.

Tabela 1 – Radionuclídeos SPECT, suas meias-vidas, modo de decaimento e energias dos fótons.

Radionuclídeo	Tempo de Meia-Vida (h)	Modo de Decaimento	Energia dos Raios γ (KeV)
^{99m}Tc	6	Transição Isomérica	140
^{201}Tl	73	Captura Eletrônica	135, 167
^{67}Ga	78	Captura Eletrônica	93, 185, 300, 394
^{123}I	13	Captura Eletrônica	159
^{111}In	67	Captura Eletrônica	171, 245

Adaptado de Oliveira *et al*³⁴.

As câmaras para SPECT podem ser conjugadas ao equipamento de tomografia computadorizada (TC), formando o sistema híbrido SPECT/CT. As imagens de cada modalidade são adquiridas sequencialmente, no mesmo procedimento e, então, fundidas. Essa modalidade de representação auxilia na interpretação das imagens de medicina nuclear, uma vez que a localização da captação anormal do radiofármaco pode ser precisamente determinada pela TC³⁸.

O tecnécio-99m é um dos principais elementos radioativos empregados na elaboração de radiofármacos, sendo utilizado para procedimentos diagnósticos por SPECT. Paralelamente ao desenvolvimento do gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, inúmeros reagentes liofilizados para marcação com tecnécio-99m foram desenvolvidos e disponibilizados para a classe médica nuclear. Cada reagente liofilizado, reagindo com o tecnécio-99m oriundo do gerador de radionuclídeo, origina um radiofármaco com propriedades específicas para o diagnóstico de determinados órgãos ou doenças³². Além dos radiofármacos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, outros aplicados a procedimentos diagnósticos por SPECT podem ser destacados: o cloreto de ^{201}Tl , para estudo da viabilidade cardíaca, a metaiodobenzilguanidina marcada com iodo-123, para feocromocitomas e neuroblastomas, o octreotídeo-DTPA- ^{111}In , para diagnósticos de tumores neuroendócrinos.³⁹

3.2.2.2 *Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET)*

A PET é baseada na detecção de fótons coincidentes de 511 keV a 180°. Esses fótons são produzidos por processo de aniquilação, no qual o pósitron emitido por um radionuclídeo combina com um elétron do meio, emitindo dois fótons, na mesma direção, mas com sentidos opostos, que são recolhidos externamente num detector circular, originando imagens tridimensionais. A detecção simultânea dos raios γ que têm sentidos opostos evita a presença de um colimador para limitar o campo de detecção³⁶.

A imagem cintilográfica obtida permite conhecer a distribuição do radiofármaco no organismo e quantificar sua fixação em vários órgãos ou tecidos, permitindo o diagnóstico clínico³⁸.

Alguns parâmetros são essenciais para boa qualidade de formação de imagem. A resolução espacial do PET depende do tipo de detector e do radionuclídeo utilizado. A energia da partícula β^+ emitida pelo radionuclídeo determina a distância que o pósitron percorre no tecido até a aniquilação. Emissores de pósitron de menor energia conferem melhor resolução às imagens³⁷.

A sensibilidade do PET é definida como o número de contagens por unidade de tempo detectado pelo equipamento por cada unidade de atividade presente na fonte. Isso é normalmente expresso por contagens por segundo por microcurie ou megabecquerel (cps/ μ Ci ou cps/MBq). A sensibilidade depende da eficiência geométrica, eficiência de detecção e o *dead time* do sistema. A eficiência de detecção depende do tempo de decaimento, densidade, número atômico e espessura do material detector³⁵.

O contraste nas imagens surge a partir de variações relativas em densidades de contagem entre áreas adjacentes na imagem do objeto, favorecendo as medidas de detecção da anormalidade relativa ao tecido normal. Vários fatores interferem na captação do radiofármaco, e, dessa forma, na imagem obtida: densidade de contagem, tamanho da lesão e movimento do paciente, além da radiação de fundo (*background*)³⁵.

A tabela 2 apresenta os emissores de pósitrons mais comumente utilizados, suas meias-vidas e a energia máxima do pósitron.

Tabela 2 – Emissores de pósitrons mais comumente utilizados

Radionuclídeo	Tempo de meia-vida	Energia máxima do pósitron (MeV)
¹¹ C	20,4min	0,96
¹³ N	10min	1,19
¹⁵ O	2,07min	1,72
¹⁸ F	110min	0,64
¹²⁴ I	4,2d	0,97
⁶⁴ Cu	13h	1,92
⁶⁸ Ga	68min	1,89
⁸⁹ Zr	3,2d	0,39

TOYOKUNI, 2004⁴⁰.

Assim como SPECT, há também sistemas híbridos que combinam o PET ao CT (PET/CT) ou a ressonância magnética (RM). Sua vantagem é a habilidade de adquirir a imagem anatômica com o CT ou RM e, na sequência, a imagem funcional com o PET³⁷. Para estabelecer correspondência entre as imagens, o tamanho da matriz, a intensidade do voxel e a rotação são ajustados no co-registro, pelo processo de alinhamento de imagens. Diferentes sistemas de softwares podem ser aplicados para estabelecer a correlação e sobreposição das imagens⁴⁰.

O ¹⁸F é o radioisótopo emissor de pósitrons mais utilizado para diagnóstico de tumores por PET. O radiofármaco fluorodeoxiglicose-¹⁸F (FDG-¹⁸F) representou importante avanço para imagem PET em oncologia. O FDG-¹⁸F é análogo da glicose, sendo, também, absorvido nas células por um sistema de transporte celular. No interior das células, o

radiofármaco FDG- ^{18}F sofre fosforilação pela enzima hexoquinase, formando FDG- ^{18}F -6-fosfato. Enquanto a glicose-6-fosfato é novamente metabolizada pela enzima seguinte da via glicolítica – a fosfoglicose isomerase, a FDG- ^{18}F -6-fosfato não é reconhecida pela mesma, uma vez que esta molécula está marcada com o ^{18}F na posição do carbono 2, onde seria encontrado um grupo hidroxila na molécula natural da glicose. Desta forma, a FDG- ^{18}F -6-fosfato fica retida no interior celular ⁴¹.

A concentração celular de FDG- ^{18}F é, portanto, representativa do acúmulo de FDG- ^{18}F e da atividade glicolítica de glicose exógena. O uso de FDG- ^{18}F PET em oncologia é baseado nas taxas diferenciais de metabolismo de glicose nos tecidos benignos e malignos. O FDG-PET tornou-se indispensável para o diagnóstico, estadiamento, prognóstico e avaliação de estratégias de tratamento em oncologia⁴².

Entretanto, o FDG- ^{18}F apresenta algumas limitações por não ser seletivo ao tumor e pelo fato de acumular-se em lesões inflamatórias. Sendo assim, há a necessidade de desenvolver moléculas mais específicas, a serem aplicadas como radiofármacos na área de medicina nuclear. Nesse sentido, novos radiofármacos tumor-específicos baseados em peptídeos e AcM estão sendo desenvolvidos visando aumentar a especificidade do fármaco e contribuir na elucidação mais direcionada de distúrbios oncológicos e estados de doença.

3.3 OS ANTICORPOS MONOCLONAIS E A IMUNOTERAPIA DO CÂNCER

Atualmente, a imunoterapia compreende o maior grupo de moléculas em desenvolvimento para a composição de novos fármacos em todo o mundo. Essas moléculas versáteis são investigadas para o tratamento de grande número de comorbidades como câncer, doenças inflamatórias e infecciosas⁴³.

A imunoterapia contra os tumores consiste de diferentes estratégias como a produção de anticorpos dirigidos contra antígenos tumorais, vacinação com extratos obtidos do tumor e métodos não específicos como vacinação com BCG ou com extratos bacterianos e administração de toxinas^{43, 44}. Dentre essas moléculas, destacam-se os anticorpos, que podem ser usados para exercer diferentes atividades biológicas ou como veículos, quando conjugados a diferentes substâncias como radioisótopos, fármacos, toxinas ou peptídeos. A capacidade de o anticorpo, carregando um agente terapêutico, se ligar especificamente ao antígeno de uma determinada célula ou tecido tumoral tem sido grande ferramenta da indústria farmacêutica para aumentar a ação do fármaco e minimizar seus efeitos colaterais³.

Anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas produzidas por linfócitos B e, principalmente por plasmócitos, após estímulo de um imunógeno, que ocorrem naturalmente como parte do sistema imuno-adaptativo pelo reconhecimento de antígenos⁵.

Os anticorpos possuem duas regiões distintas capazes de fixar antígenos, células e complemento.

- Fragmentos Fab (*fragment antigen binding*) ou CDR (*complementarity determining regions*);
- Fragmentos Fc (fragmento cristalizável): incapaz de ligar antígeno. É responsável pelas funções biológicas do anticorpo após a ligação do antígeno com as partes de Fab da molécula intacta. A região Fc permite ligação às proteínas séricas como o complemento ou às células por meio dos receptores para FcγR.

Os anticorpos, ao se ligarem a receptores celulares específicos, promovem ativação de diferentes mecanismos imunológicos capazes de bloquear o crescimento ou, até mesmo, a morte celular³.

Os anticorpos livres ou não conjugados podem ser utilizados como moléculas efetoras e exercer citotoxicidade principalmente por dois mecanismos. No primeiro, denominado citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ligação específica da região Fab ao antígeno presente na superfície da célula tumoral produz modificação conformacional na região Fc do anticorpo, capaz de fixar e ativar o complemento, gerando o complexo de ataque à membrana (CAM) que, ao produzir poros sobre a superfície celular, provoca sua morte. No segundo mecanismo, conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), o anticorpo se liga ao antígeno tumoral fazendo a ponte entre a célula tumoral e células imunocompetentes recrutadas, como os linfócitos T citotóxicos (LT/CD8+) que produzem a sua morte^{2,3}.

Nesse sentido, a escolha do antígeno é de extrema importância para a imunoterapia. Deseja-se que esse alvo esteja presente em grande quantidade nas células tumorais, para que a toxicidade seja reduzida nas células normais⁴⁵.

Os anticorpos monoclonais podem ser murínicos, quiméricos, humanizados ou humanos. Em cerca de 30% dos pacientes, uma simples administração do AcM murínico (AcM de camundongos) pode estimular o sistema imune a produzir anticorpos contra o agente terapêutico^{46,47}. Esta resposta imune a AcM murínicos chama-se resposta HAMA (do inglês *Human anti-mouse antibodies*) e ela destrói os AcMs administrados em doses subsequentes. Na prática a eficácia terapêutica dos AcMs murínicos é limitada à primeira ou no máximo à segunda administração. Além da resposta HAMA, as sequências não humanas

dos AcMs provocavam reações do tipo alérgicas que consistiam no principal efeito colateral observado⁴³.

A partir de 1980, o advento da tecnologia do DNA recombinante permitiu reduzir a imunogenicidade destes anticorpos murínicos⁴³. Desde então, iniciou-se o desenvolvimento de AcMs quiméricos e humanizados. Os AcM quiméricos são construídos combinando-se os domínios V, que são responsáveis pela ligação ao antígeno e localizados na porção Fab, de AcMs murínicos com os domínios C, localizados na cadeia constante (Fc), de moléculas IgG humanas. Em AcMs humanizados, grande parte das sequências de aminoácidos é de origem humana, com parcela inferior a 5% correspondendo à origem murina, nos domínios V, já que eles estão envolvidos no reconhecimento do antígeno^{46, 47}. Os anticorpos humanos possuem sequências de origem 100% humana⁴⁶.

Com o desenvolvimento de AcMs quiméricos, a chance de induzir resposta alérgica diminuiu significativamente em comparação aos AcM murínicos.

A nomenclatura padrão para os AcMs segue as seguintes regras: o sufixo genérico para nomear um AcM é “mab”. AcMs murínicos são “momab”; as moléculas quiméricas são “ximab” e as moléculas humanizadas são “zumab”. Quando o AcM é direcionado a um antígeno tumoral, utiliza-se a sílaba “tu” antes do sufixo (tumomab, tuximab e tuzumab)⁴⁷.

O primeiro anticorpo monoclonal aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para o tratamento de tumor foi o Rituximabe (Rituxan[®]), em sequência o Trastuzumabe (Herceptin[®]), o Bevacizumabe (Avastin[®]) e o cetuximabe (Erbix[®]) específico contra o receptor do fator de crescimento epidérmico. Na tabela 3 são apresentados os 11 AcMs aprovados pela ANVISA.

Os anticorpos monoclonais radiomarcados representam uma classe de agentes de IM em crescente atenção, devido ao sucesso dos mesmos na terapia oncológica¹⁶. Contudo, nenhum dos radioimunoconjugados, aplicados em técnicas diagnósticas e terapêuticas, possui registro na ANVISA. Considerando esse cenário, vale ressaltar a importância do desenvolvimento de tecnologia nacional de produção de radioimunoconjugados visando contribuir no diagnóstico mais específico e ampliar opções terapêuticas, além de favorecer o monitoramento da evolução do quadro clínico do paciente. Dentre os AcMs citados, destaca-se, para este estudo, o cetuximabe.

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais aprovados pela ANVISA para tratamento oncológico.

Anticorpo	Antígeno-Alvo ^a	Indicação Principal	Tipo	Laboratório	Ano da Primeira Aprovação (ANVISA)
Alentuzumabe	CD52	Leucemia linfocítica crônica	Humanizado	Bayer/ Cambridge	2007
Bevacizumabe	VEGF	Câncer colorretal, pulmonar, de mama, glioblastoma e renal	Humanizado	Roche/ Genentech	2005
Cetuximabe	EGFR	Câncer colorretal e de cabeça e pescoço	Quimérico	Merck/ ImClone	2006
Daratumumabe	CD38	Mieloma múltiplo	Humano	Vetter Pharma/ Alemanha	2017
Ipilimumabe	CTLA-4	Melanoma metastático	Humano	BMS/BMS	2012
Nimotuzumabe	EGFR	Astrocitoma	Humanizado	Eurofarma/ CIM, Cuba	2009
Nivolumabe	PD-1	Melanoma avançado e de câncer de pulmão	Humano	Bristol-Myers Pharma	2016
Panitumumabe	EGFR	Câncer colorretal	Humano	Amgen/ Amgen	2010
Pertuzumabe	HER2	Câncer de mama metastático	Humanizado	NA/ Genentech	2013
Rituximabe	CD20	Linfoma não Hodgkin e leucemia linfocítica crônica	Quimérico	Roche/IDEC Pharm.	1998
Trastuzumabe	HER2	Câncer de mama metastático e gastroesofágico	Humanizado	Roche/ GenentechUCLAE	1999

Adaptado de CARVALHO, 2013⁴⁷ e ANVISA, 2017.^a **CD52** – Grupamento de diferenciação 52; **VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular; **EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidérmico; **CD38** – Grupamento de diferenciação 38; **CTLA4** – Antígeno 4 associado ao linfócito C citotóxico; **PD-1** – Receptor de morte programada 1; **HER2** – Receptor tipo 2 para fator de crescimento epidérmico humano; **CD20** – Grupamento de diferenciação 20.

3.3.1 Cetuximabe

O cetuximabe, um anticorpo monoclonal quimérico (IgG1) anti-EGFR, foi aprovado pela organização norte americana de controle de alimentos e drogas (FDA) no ano de 2004, como monoterapia ou em associação a: (i) quimioterapia para tratamento de carcinoma de células escamosas colorretais e de cabeça e pescoço e (ii) radioterapia para tratamento de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço⁵.

O receptor EGF, de tirosina-quinase, é altamente expresso na maioria das neoplasias epiteliais, como câncer de pulmão de não pequenas células (CNPC), câncer de ovário epitelial, câncer de cabeça e pescoço⁴. Além disso, a superexpressão do EGFR está associada ao estágio avançado do tumor e ao mau prognóstico em vários tipos de câncer epitelial. Macrófagos perivasculares secretam EGF, captado pela célula tumoral, que expressa EGFR, e assim realiza a quimiotaxia até o vaso sanguíneo. As células neoplásicas então secretam fator de crescimento de macrófagos (CSF-1), atraindo-os e os estimulando a produzir mais EGF. A sinalização entre as células também afeta a atividade de reguladores

de actina, resultando na formação de podossomos nos macrófagos e de processos invasores nas células tumorais, com consequente intravasamento das células neoplásicas¹⁹. Sendo assim, o EGFR desempenha um papel importante na proliferação celular, no sistema de reparo do DNA e na regulação de resposta à hipóxia – através do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), da sinalização de hipóxia angiogênica e da indução de metástase via transição epitélio-mesenquimal (EMT)⁴⁸.

O cetuximabe se liga especificamente à porção extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico com afinidade cerca de dez vezes superior à de ligantes endógenos e, assim, bloqueia a ligação destes ao EGFR, resultando em inibição da função do receptor⁴⁹.

Um estudo fase III com 424 pacientes foi realizado entre 1999-2002 e confirmou a sobrevida de 10% para pacientes com CNPC avançado que receberam cetuximabe com radioterapia, quando comparado àqueles tratados unicamente com radioterapia⁵⁰.

Em 2007-2008, estudos clínicos fase II compararam a quimioterapia (cisplatina ou carboplatina; cisplatina/vinorelbina) com o tratamento associado de quimioterapia e cetuximabe, em pacientes com carcinoma avançado de pulmão de não pequenas células, e descreveram benefícios da terapia associada ao cetuximabe^{51, 53}.

Apesar dos ganhos clínicos decorrentes do uso do cetuximabe, mecanismos de resistência intrínsecos e o desenvolvimento de resistência adquirida foram identificados e têm sido avaliados⁵⁴.

Um dos biomarcadores preditivos mais notáveis da resposta ao cetuximabe é o estado mutacional do gene KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). KRAS é uma pequena GTPase (uma enzima que hidrolisa o GTP – trifosfato de guanosina) responsável por acoplar EGFR à via RAF / MEK / ERK. A ligação de KRAS ao GTP leva a alterações conformacionais na RAF e a ativação da via de sinalização de fluxo descendente. Embora o KRAS seja uma GTPase, sua atividade catalítica é lenta e dramaticamente aprimorada por proteínas acessórias chamadas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) e, portanto, desativam a sinalização mediada por RAF. As mutações no códon 12 ou 13 de KRAS prejudicam a atividade de GTPase intrínseca e conferem resistência a GAPs, causando, assim, acúmulo de proteínas Ras mutante associadas ao câncer. Lievre *et al* relataram que KRAS com mutações no códon 12 ou 13 pode ser preditivo para resistência à terapêutica com cetuximabe. Naquele estudo, eles analisaram 30 pacientes com carcinoma colorretal metastático (CCRM) tratado com cetuximabe para a presença de mutações KRAS, BRAF e PIK3CA. As mutações KRAS foram encontradas em 43% dos tumores (13 tumores)

e foram significativamente associados à resistência à terapêutica com cetuximabe ($p = 0,002$)⁵⁴. Além disso, Di Fiore *et al*⁵⁵ estudaram 59 pacientes com CCRm tratado com quimioterapia em associação com o cetuximabe e relataram que as mutações KRAS eram preditivas para resistência à quimioterapia combinada ao cetuximabe⁵⁵.

Em 2009, a ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), através da Opinião Clínica Provisória, relatou que, para todos os pacientes com CCRm, candidatos à imunoterapia anti-EGFR, testes para mutações de KRAS deveriam ser realizados em laboratórios credenciados. Caso fossem detectadas mutações nos códons 12 ou 13 de KRAS, os pacientes não deveriam receber terapia com cetuximabe. No entanto, estudos clínicos relataram alguns pacientes oncológicos, portadores de mutações KRAS, que responderam à imunoterapia anti-EGFR⁵⁴. Segundo Brand *et al*⁵⁴, a elucidação de métodos que possam distinguir esses indivíduos sensíveis ao cetuximabe é extremamente relevante para investigação clínica, visando tratamento mais efetivo ao paciente.

As técnicas de diagnóstico por imagem podem contribuir para selecionar pacientes candidatos à terapia com o cetuximabe. A metodologia de radioimunodiagnóstico, utilizando cetuximabe radiomarcado, permite avaliar a resistência ao tratamento e estratificar pacientes que possam apresentar benefícios à imunoterapia anti-EGFR.

3.4 RADIOIMUNODIAGNÓSTICO

O uso de anticorpos para transportar substâncias tóxicas seletivamente até as células tumorais foi desenvolvido no início do século por Ehrlich⁵⁶. A radioimunoterapia (RIT) consiste na aplicação de radionuclídeos que possuam emissão de partículas alfa ou beta, conjugados a AcM para dirigirem-se seletivamente aos antígenos tumor-específico, combinando os princípios do tratamento sistêmico com a deposição da radiação no local de interesse, poupando os tecidos sadios^{8,9}.

Os anticorpos monoclonais também podem ser conjugados a elementos radioativos emissores de pósitrons e de radiação γ , e aplicados em técnicas diagnósticas, combinando a especificidade do anticorpo com a sensibilidade dos métodos de imagem funcional, PET ou SPECT, uma modalidade médica conhecida como radioimunodiagnóstico (RID)¹⁸.

As imagens de diagnóstico adquiridas após injeção do radiofármaco têm potencial para prever a eficácia da radioimunoterapia, uma abordagem designada como teranóstico⁵⁷. Teranóstico é um conceito aplicável ao desenvolvimento personalizado de

terapias-alvo de radionuclídeos, associa simultaneamente diagnóstico e terapia. Informações diagnósticas, obtidas a partir de PET ou SPECT pré-terapia, podem garantir tratamento direcionado aos tumores¹⁵.

Esse tipo de informação pode auxiliar na seleção dos pacientes e tem potencial para prever a relação risco-benefício da terapia planejada com radionuclídeos, pela análise dosimétrica. Além disso, os dados de imagem podem avaliar a resposta terapêutica a determinado tratamento, visando direcionar de maneira específica o planejamento e a condução terapêutica⁶.

3.5 RADIONUCLÍDEOS APLICADOS EM RADIOIMUNODIAGNÓSTICO

No desenvolvimento de um radioimunoconjugado, devem-se considerar muitos aspectos do radioisótopo. Os principais são meia-vida física, tipo de emissão radioativa, energia da radiação, radionuclídeos filhos produzidos após o decaimento, método de produção e pureza radionuclídica^{58,59}.

Muitos radionuclídeos já foram descritos para marcação de anticorpos aplicados à radioimunodiagnóstico: ^{124}I , ^{76}Br , ^{52}Mn , ^{55}Co , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$. No entanto, a grande limitação que desafia a metodologia RID é a meia-vida dos radionuclídeos, que deve ser compatível à meia-vida biológica (de até vários dias) e os lentos parâmetros farmacocinéticos dos anticorpos íntegros⁵⁹.

Os radionuclídeos selecionados para desenvolvimento do presente trabalho foram o índio-111, para aplicação em diagnóstico SPECT, e o zircônio-89, para imagem PET.

3.5.1 Índio-111

O índio-111 é um metal radioativo produzido por ciclotron, e um dos radionuclídeos SPECT mais utilizados em marcação de AcM devido a sua meia-vida física (2,8 dias)¹⁸. Apesar de emitir elétrons Auger e de conversão interna de baixa energia, que pode ser interessante para abordagens terapêuticas, a principal aplicação é diagnóstica, por meio da radiação γ : 171,3 keV e 245,4 keV⁶.

A reação nuclear aplicada comercialmente para produzir ^{111}In é a reação de próton em cádmio natural: $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$. (*In-111 Fact Sheet Nordion-Canada*). O material alvo, cádmio natural enriquecido em ^{112}Cd (24,07 %), é prensado em um porta-alvo de cobre. O porta-alvo é irradiado com 20 MeV, 10-40 μA feixe de prótons. A parte traseira do alvo é arrefecida com jato de água de baixa condutividade. Após o processamento do alvo por extração por solventes, o índio-111 é dissolvido em ácido clorídrico 0,05 M⁶⁰.

3.5.2 Zircônio-89

Progressivamente, o isótopo radiometálico ^{89}Zr tem se destacado como radiomarcador para tomografia por emissão de pósitrons. Esse isótopo é particularmente atraente para as pesquisas de câncer devido a sua meia-vida (3,27 dias) ser adequada para estudos *in vivo* de macromoléculas-alvo para antígenos de superfície celular, expressos em células cancerígenas.

Além disso, o zircônio-89 emite um pósitron de baixa energia ($E_{\beta^+, \text{média}} = 0,40$ MeV), o que é favorável à alta resolução espacial em PET. Porém, também emite um raio gama de alta energia característico (909 keV)^{58, 59, 61}.

A reação nuclear $^{nat}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ é a mais aplicada para produção de zircônio. O material alvo (ítrio natural – 99,9% de pureza) é posicionado em um disco e, durante o bombardeio, o porta-alvo é arrefecido por um jato de gás hélio (no lado do feixe) e água gelada (em posição reversa – $T \approx 2,2^\circ\text{C}$). Após a irradiação, o alvo permanece na estação durante, aproximadamente, 15 horas para permitir o decaimento de contaminantes de meia-vida curta, como ^{89m}Zr . Posteriormente, é executada a separação química envolvendo diversas etapas, conforme figura 1⁶².

O alvo é dissolvido em solução de ácido clorídrico 2 M. A solução contendo zircônio-89 é transferida para uma coluna de hidroxamato. Após algumas lavagens da coluna com 30 mL de ácido clorídrico 2 M para remoção do ítrio, o radionuclídeo ^{89}Zr é eluído em ácido oxálico 1,25 M. Conforme procedimento adotado na Universidade do Alabama, Birmingham, a primeira eluição em 200 μL de ácido oxálico é descartada (fração 1), devido ao baixo rendimento, e as duas frações subsequentes são armazenadas para os procedimentos de radiomarcção posteriores.

3.6 QUELANTES BIFUNCIONAIS MACROCÍCLICOS E O PROCESSO DE CONJUGAÇÃO

A marcação de anticorpos monoclonais com radionuclídeos metálicos é possível geralmente pelo uso de agentes quelantes bifuncionais, que possuem uma porção reativa para ligação covalente às proteínas e uma porção capaz de se ligar fortemente ao radiometal, formando, assim, um complexo fisiologicamente estável. No entanto, é necessário encontrar o equilíbrio entre as condições de acoplamento necessárias para obter-se um conjugado estável, sem degradação, sem perda de afinidade e imunorreatividade⁶³. Tal estabilidade *in vivo* é desejável para RID e RIT, a fim de reduzir os danos da radiação e toxicidade aos órgãos e tecidos normais.

Figura 1 – Representação esquemática das etapas de separação química do Zircônio-89.

Procedimentos de conjugação e a avaliação do número de quelantes por anticorpo devem ser estabelecidos para obtenção do acoplamento estável de radiometais aos anticorpos e a preservação de suas características e propriedades, como a estabilidade termodinâmica e cinética, dissociação dependente do pH e estabilidade em soro⁶⁴.

Diferentes quelantes bifuncionais já foram utilizados na conjugação do cetuximabe incluindo a deferoxamina succinilada (N-sucDf), deferoxamina-p-SCN (DFO-Bz-NCS), p-SCN-Bn-DTPA, CHX-A''-DTPA, DOTA-NHS-ester, p-SCN-Bn-DOTA e p-SCN-Bn-NOTA¹⁸.

Segundo Sihver *et al*¹⁸, o complexo DOTA- ^{111}In é cineticamente mais estável do que DTPA- ^{111}In , porém a estabilidade termodinâmica do DTPA- ^{111}In é aproximadamente cinco vezes mais elevada quando comparada ao complexo DOTA- ^{111}In ¹⁸.

Outro estudo revelou que CHX-A"-DTPA, conjugado com um anticorpo HER2 específico, apresentou uma melhor retenção celular do radiomarcado, melhor acúmulo tumoral e melhores razões tumor:órgãos em comparação à conjugação com DOTA. O anticorpo conjugado com DTPA demonstrou eficiência tumor-órgão satisfatória^{64, 82}.

O trabalho de Reilly *et al*¹⁷ descreve o uso do p-SCN-Bn-DTPA, ao invés do CHX-A"-DTPA, uma vez que este quelante favorece a formação de um complexo mais estável com o ^{111}In e evita ligações cruzadas com AcM (*cross-linking*), já que apresenta apenas uma fração reativa¹⁷.

O anticorpo conjugado ao p-SCN-Bn-DTPA e sua radiomarcação com o radionuclídeo ^{111}In são apresentados, esquematicamente, na figura 2.

Figura 2– Representação esquemática do processo de radiomarcação do anticorpo conjugado ao p-SCN-Bn-DTPA com o radionuclídeo ^{111}In .

Adaptado de SIHVER e outros¹⁸.

Com relação ao zircônio-89, ao longo dos anos, vários quelantes têm sido aplicados, tais como o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido 1,4,7,10-tetra-acético (DOTA), e deferoxamina-p-SCN (DFO). A formação de $^{89}\text{Zr}^{4+}$ não marcado deve ser minimizada, visto que, o radionuclídeo livre pode acumular nos ossos e pode associar-se às proteínas plasmáticas, conduzindo a deposição de doses significativas para a medula óssea. Portanto, um sistema de agente quelante adequado é necessário para evitar a dissociação de ^{89}Zr a partir dos anticorpos. A estabilidade dos complexos de zircônio-89 formados com os quelantes DOTA, DTPA e EDTA demonstrou limitações em estudos anteriores, enquanto que o DFO é o

quelante mais proeminente de $[^{89}\text{Zr}]^{4+}$. O DFO é um sideróforo hexadentado contendo três grupos hidroxamato para quelar metais e uma cauda amina primária para conjugação a uma biomolécula (figura 3)^{16, 59, 61, 65}.

Figura 3 – Representação esquemática do anticorpo marcado com ^{89}Zr utilizando DFO como quelante.

ZHANG, 2011⁶⁵.

Atualmente, o DFO tem sido o quelante mais empregado nos processos de radiomarcagem de anticorpos monoclonais com ^{89}Zr ⁶⁶. Vários métodos de conjugação do quelante bifuncional com o AcM já foram descritos:

- introdução do DFO via conjugação de grupo tiol: utilizando deferoxamina B preparada com N-succinimidil-S-acetiltioacetato;
- via química *Click*: N-succinil-deferoxamina B inicialmente reagem com uma solução de norborneno e tetrazina antes da conjugação;
- via formação de ácido-amida ou tiouréia: consiste em 5 etapas: (i) succinilação da deferoxamina B; (ii) complexação de Fe^{+3} para evitar reações secundárias envolvendo os grupos hidroxamato; (iii) formação do éster tetrafluorofenólico ativo; (iv) conjugação do quelante éster-ativo ao anticorpo; (v) remoção de Fe^{+3} do quelante complexado por transquelação com EDTA (ácido etilenodiamina tetraacético)⁶⁷.

Essas técnicas são baseadas na reação de um quelante bifuncional ativado com um resíduo de lisina ou cisteína do AcM⁶⁸.

Esses procedimentos de conjugação em múltiplas etapas são relativamente complexos, dispendiosos e, portanto, desafiadores em relação ao cumprimento das boas práticas de fabricação (BPF), podendo inviabilizar uma rotina de produção^{68, 69, 91}.

Em 2010, Perk *et al*⁶⁹ descreveram um estudo com um novo agente

quelante, o p-isotiocianatobenzil-deferoxamina B (Df-Bz-NCS), que favoreceu uma conjugação rápida e eficiente, estimulando a expansão do ^{89}Zr -imuno-PET ^{69, 91}.

As técnicas de conjugação podem afetar a eficiência da radiomarcagem, a imunorreatividade e, também, a biodistribuição do radioimunoconjugado. Nesse sentido, o presente trabalho utilizou um derivado p-isotiocianatobenzil (DFO-Bz-NCS; Macrocylics, TX) visando obter um processo de conjugação mais padronizado e facilitar a rotina de produção (figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática das etapas de preparo do radioimunoconjugado: conjugação do anticorpo ao quelante p-SCN-Bz-Deferoxamina (DFO) seguido do processo de radiomarcagem com o radionuclídeo emissor de pósitron (^{89}Zr).

Adaptado de WEI et al ⁷¹.

Apesar de alguns estudos celulares terem sido desenvolvidos, demonstrando boa estabilidade do complexo $\text{DFO-}^{89}\text{Zr}$ ^{58, 67, 68, 70, 71, 72}, resultados conclusivos referentes à influência do número de quelantes (DFO) acoplados ao cetuximabe e da atividade específica na imunorreatividade do radioimunoconjugado não foram identificados na literatura. Esses estudos foram avaliados no presente trabalho.

3.7 CETUXIMABE NO RADIOIMUNODIAGNÓSTICO

Tendo em vista a importância do anticorpo monoclonal cetuximabe na imunoterapia de pacientes com câncer de cólon e carcinoma de cabeça e pescoço, alguns estudos de marcação deste AcM com diferentes radionuclídeos foram desenvolvidos, visando (i) produzir um radiofármaco específico para seleção de candidatos à terapia, (ii) monitorar a eficácia à imunoterapia, bem como (iii) avaliar a resistência aos medicamentos^{5, 18}.

A tabela 4 apresenta um resumo das publicações relacionadas à marcação do cetuximabe com diferentes radionuclídeos com propriedades para aplicação em diagnóstico (PET e SPECT) bem como para terapia radionuclídica.

Vários estudos utilizando ^{64}Cu ($T_{1/2} = 12,7$ horas) na marcação de anticorpos foram reportados para radioimunoimagem PET e radioimunoterapia. Anticorpos monoclonais clinicamente aprovados, como Cetuximab e Abegrin, foram radiomarcados com ^{64}Cu e aplicados em estudos pré-clínicos. O estudo pré-clínico, biodistribuição e microPET, de Ping *et al*⁷³, abordou o uso de cetuximabe na concepção de radioimunoconjugado para a imagem de superexpressão de EGFR em tumores, através da tecnologia PET.

No trabalho de Cai *et al*⁸⁶, o cetuximabe-DOTA- ^{64}Cu foi injetado em camundongos com tumores EGFR positivos e EGFR negativos e as imagens PET quantitativas foram avaliadas. Naquele estudo, o cetuximabe-DOTA- ^{64}Cu mostrou uma absorção proeminente em tumores que expressam EGFR, mas baixo acúmulo em tumores EGFR-negativos. Observou-se boa correlação linear entre os valores calculados de % DI / g (dose injetada), pelos estudos de imagem PET e o nível de expressão de EGFR, analisados pelo *western blot*⁵⁹.

Os anticorpos marcados com ^{86}Y foram avaliados para realizar a dosimetria para AcM- ^{90}Y , aplicados em radioimunoterapia. Além do cetuximabe, outros AcM foram radiomarcados com ^{86}Y , incluindo trastuzumabe (Herceptin), anti-Lewis Y. O cetuximabe-CHX-A"-DTPA- ^{86}Y foi estudado em camundongos com carcinoma de cólon LS-174T, carcinoma de ovário SKOV3 e carcinoma de próstata DU-145. Todos os tumores foram visualizados no primeiro dia após a injeção, com absorção aproximada de 20 a 30 % DI/g⁷⁴.

No entanto, esses radioisótopos possuem limitações significativas que dificultam sua adequação à imagem clínica, devido à incompatibilidade com a farmacocinética lenta e a depuração do cetuximabe (nos seres humanos $T_{1/2} \approx 112$ h)⁴.

Tabela 4 – Resumo das publicações relacionadas à marcação de cetuximabe com diferentes elementos radioativos.

Radionúclido	Meia-vida	Principais tipos de decaimento (probabilidade) – Emax (MeV)	Produção	Quelantes	Publicações de Referência
⁶⁴ Cu	12,7h	β ⁺ (17,5%)-0,653	Ciclotron	DOTA	Cai <i>et al.</i> , 2007 ⁸⁶
		β ⁻ (38,5%)-0,579		TETA	Niu <i>et al.</i> , 2009 ⁸⁷
		EC (43,5%) -1675	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu		Ping Li <i>et al.</i> , 2008 ⁷³
					Anderson; Ferdani, 2009 ⁸⁸
⁶⁸ Ga	1,13h	β ⁺ (87,7%)-1899	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga gerador	p-SCN-Bn-DOTA	Velikyan <i>et al.</i> , 2005 ⁸⁹
		EC (8,9%)-2921		p-SCN-Bn-NOTA	Evans <i>et al.</i> , 2014 ⁷⁶
		γ (3,2%) -1077		p-NH ₂ -Bn-NOTA	
⁸⁶ Y	14,7h	β ⁺ (11,9/5,6%)-1,221/1,545	Ciclotron	p-SCN-Bz-DTPA	Lövqvist <i>et al.</i> , 2001 ⁹⁰
		γ (83/32,6%)-1,077/0,628	⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y	Deferoxamina succinilada B	Perk <i>et al.</i> , 2005 ⁸²
⁸⁹ Zr	3,3d	γ(100%)-0,902/0,909	Ciclotron	DFO-Bz-NCS	Nayak; Brechbiel, 2009 ⁵⁹
		β ⁺ (22,7%)	⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr	p-SCN-Bz-DTPA	Vosjan <i>et al.</i> , 2010 ⁹¹
				Deferoxamina B	Aerts <i>et al.</i> , 2009 ⁸¹
				TFP-N-sucDf	Perk <i>et al.</i> , 2005 ⁸²
					V.d. Watering <i>et al.</i> , 2014 ¹⁶
^{99m} Tc	6h	γ (99%) – 0,141	⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc gerador		Even <i>et al.</i> , 2017 ⁸⁵
			Ciclotron		Schechter <i>et al.</i> , 2003 ⁹³
					Schechter <i>et al.</i> , 2004 ⁷⁷
					Milenic <i>et al.</i> , 2008 ¹⁴
¹¹¹ In	2,8d	γ (100%)-0,245	¹¹¹ Cd(p,n) ¹¹¹ In	p-CHX-A''-DTP	Huhtala <i>et al.</i> , 2010 ⁹⁴
		EC (99,99%)-0,417		DOTA-NHS-ester	Divgi <i>et al.</i> , 1991 ⁸⁰
					Sihver <i>et al.</i> , 2014 ¹⁸
				p-SCN-Bz-DTPA	van Dijk <i>et al.</i> , 2013 ⁹⁵
					Hoeben <i>et al.</i> , 2011 ⁴
					Shih <i>et al.</i> , 2015 ⁷⁹
¹²⁴ I	4,2d	β ⁺ (11,7/10,8%) – 1,535/2,135	Ciclotron	peptídeo IMP-R4	Lee <i>et al.</i> , 2010 ⁹⁶
		γ (63/10,9%) – 0,603/1,691	¹²⁴ Te(p,n) ¹²⁴ I	3F8 monoclonal antibody	Daghighian <i>et al.</i> , 1993 ⁹⁷
		β ⁻ (66,2/30,8%) – 1,423/0,983			
¹²⁵ I	59,4d	γ (100%) - 0,035	Reator nuclear		Nestor <i>et al.</i> , 2007 ⁹⁸
		EC (100%) - 0,15	¹²⁴ Xe(n,γ) ¹²⁵ Xe → ¹²⁵ I		Nordberg <i>et al.</i> , 2007 ⁹⁹
					Hoeben <i>et al.</i> , 2011 ⁴

Os radioimunoconjugados marcados com ⁸⁶Y e ⁶⁴Cu provaram ser promissores nas investigações pré-clínicas, porém, esses radionuclídeos possuem meia-vida física muito curta para serem efetivos no uso em pacientes^{58, 59, 67}.

Estudos de viabilidade e quantificação, comparando a aplicabilidade do ¹²⁴I ao ¹⁸F na radiomarcagem de anticorpos monoclonais, foram realizados por Pentlow *et al.*⁷⁵. Naquele trabalho, concluiu-se que a resolução espacial foi ligeiramente reduzida quando se

utilizou o radioimunoconjugado com ^{124}I ⁷⁵. Apesar da meia-vida física ideal para imagens com anticorpos ($T_{1/2} = 100, 2$ horas), o iodo-124 apresenta complexo esquema de decaimento, com apenas 23% das desintegrações resultando em emissão de pósitrons de alta energia (687 e 975 keV), além de exibir muitos raios gama, alguns em cascata com as emissões de pósitrons. Essas características de decaimento desfavoráveis levam a imagens clínicas de baixa resolução. Além disso, os radioimunoconjugados marcados com ^{124}I estão sujeitos a desalogenação *in vivo*, um processo que pode diminuir a taxa de captação de atividade no tumor^{59, 65}.

O gálio-68 é também um emissor de pósitrons e forma complexos estáveis com os quelantes DOTA e NOTA (ácido 2-S-(4-aminobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético). Porém, o radionuclídeo ^{68}Ga é mais apropriado para moléculas menores, cuja biocinética e biodisponibilidade sejam mais rápidas que para os anticorpos monoclonais⁷⁶.

Da mesma forma, a meia-vida física de seis horas do radionuclídeo tecnécio-99m é muito curta para obtenção da imagem do cetuximabe, visto que o “pico ótimo” da concentração do anticorpo no tumor é esperado após três dias da administração⁷⁷.

O índio-111 apresenta meia-vida física favorável para imagens com AcM (2,8 dias), sendo um dos radionuclídeos SPECT mais aplicados para radioimunoimagem. Em estudo pré-clínico recente, Cheng *et al*⁷⁸ avaliaram o potencial diagnóstico do cetuximabe-DTPA- ^{111}In para tumor EGFR positivo em modelo xenográfico HCT15 induzido e concluíram sobre o potencial deste radiofármaco no diagnóstico de carcinoma de colorretal.

Shih *et al*⁷⁹ utilizaram três linhagens celulares HCT-116, HT-29 e SW-620, com diferentes níveis de expressão de receptor EGF visando averiguar a função do cetuximabe-DTPA- ^{111}In como radioimunofármaco para diagnóstico de adenocarcinoma de colorretal. Naquele estudo, concluíram que o cetuximabe-DTPA- ^{111}In apresentou especificidade elevada para receptor de EGF superexpresso em tumores metastáticos e, *in situ*, para modelos tumorais de CCR, confirmando o potencial deste radiofármaco na prática clínica⁷⁹.

Um estudo comparativo foi realizado radiomarcando o cetuximabe com os radionuclídeos ^{111}In e ^{125}I . O cetuximabe-DTPA- ^{111}In exibiu maior captação tumoral, com eficiente acúmulo em modelos tumorais desenvolvidos pela linhagem celular FaDu de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁴.

O cetuximabe radiomarcado com índio-111 foi utilizado em um estudo clínico, fase I, em pacientes com carcinoma de células escamosas inoperável do pulmão, que expressavam, invariavelmente, altos níveis de receptores de EGF. Não foi observada toxicidade relacionada à aplicação do radiofármaco⁸⁰.

Considerando a longa meia-vida biológica do cetuximabe, 63h a 230h, o zircônio-89 é apropriado para aplicação em imuno-PET e oferece alta sensibilidade, resolução e quantificação precisa⁵⁸. Além disso, esse radionuclídeo é visto como um dos mais promissores para desenvolvimento de radioimunoconjugados, com anticorpos íntegros, direcionados à imagem de processos tumorais *in vivo*, por meio da tecnologia PET⁷². Apesar de emitir raios γ de alta energia, 909 keV com 99% de eficiência, eles não interferem energeticamente com os fótons emitidos de 511 keV, e, assim, não alteram a qualidade da imagem PET¹⁸.

Essas características de decaimento significam que o ^{89}Zr , além de apresentar meia-vida mais favorável para imagens com anticorpos que a dos radionuclídeos ^{86}Y e ^{64}Cu , pode produzir imagens de maior resolução quando comparado ao ^{124}I (que emite pósitrons com alta energias, bem como uma série de fótons). Além disso, o ^{89}Zr é mais seguro para manipulação e sua produção é menos onerosa^{58, 61, 62, 67, 68}.

Na última década, estudos pré-clínicos em imunoPET com ^{89}Zr têm sido cada vez mais difundidos⁶⁸. Aerts *et al*⁸¹ realizaram estudos de imagem *in vivo* com cetuximabe-DFO- ^{89}Zr para avaliar níveis de expressão de EGFR em diferentes linhagens celulares. Aquele estudo demonstrou que a captação de cetuximabe em tumores pode ser avaliada pelo método de imagem PET, com o cetuximabe-DFO- ^{89}Zr . Além disso, concluiu sobre o potencial deste radioimunoconjugado na avaliação dos efeitos clínicos biológicos e farmacocinéticos dos inibidores do EGFR, como o imunoterápico cetuximabe⁸¹.

Considerando a abordagem teranóstica, o ^{89}Zr pode ser utilizado para prever biodistribuição e dosimetria de AcM radiomarcados com ^{177}Lu e ^{90}Y . A farmacocinética e a estabilidade *in vivo* podem alterar conforme o quelante empregado no processo de conjugação, no entanto, ^{89}Zr e ^{90}Y , bem como ^{89}Zr e ^{177}Lu parecem ser bons pares RID-PET/RIT⁸².

Em estudo clínico, dez pacientes com câncer colorretal (KRAS selvagem) e indicados para imunoterapia com cetuximabe foram submetidos a exames PET, com cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , a fim de avaliar a biodistribuição e a captação do radioimunoconjugado nos tumores, bem como analisar se o cetuximabe-DFO- ^{89}Zr seria capaz de selecionar aqueles pacientes que responderiam ao tratamento com cetuximabe.

Nenhuma toxicidade relativa ao uso desse radiofármaco foi relatada. Em seis dos dez pacientes, detectou-se captação do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr nas lesões tumorais, e quatro deles, sensíveis ao radioimunoconjugado, apresentaram benefícios clínicos na terapia anti-EGFR. A progressão da doença foi observada em três dos quatro pacientes que não

apresentaram captação pelo cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr. Sendo assim, os autores concluíram que a imagem PET com cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr é viável, possibilitando a aplicação desse método diagnóstico para selecionar o tratamento em potencial, no entanto, estudos complementares são necessários⁸³.

Um estudo clínico fase I em imuno-PET com cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr foi realizado em nove pacientes com câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão. Os resultados foram satisfatórios para toxicidade e captação do radiofármacos pelos tumores. Uma dose de 60 MBq foi descrita como referência para futuros estudos clínicos⁸⁴.

Recentemente, Even *et al*⁸⁵ quantificaram a captação do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em tumores e linfonodos de 17 pacientes com carcinoma avançado de células escamosas de cabeça e pescoço localizado. Pelas imagens imuno-PET, observou-se perfil variável na razão tumor-irradiação de fundo entre os pacientes. Sendo assim, o estudo concluiu que é possível selecionar tumores-alvo para anticorpos monoclonais e, assim, favorecer no direcionamento de pacientes à imunoterapia com cetuximabe. O intervalo de seis ou sete dias pós-injeção do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, para obtenção das imagens, foi recomendado para estudos clínicos futuros⁸⁵.

3.8 OUTROS ANTICORPOS MONOCLONAIS RADIOMARCADOS COM ÍNDIO-111 E ZIRCÔNIO-89

Atualmente, muitos anticorpos monoclonais estão em investigação clínica devido a seu excelente potencial para diagnóstico, direcionamento de terapia específica, monitoramento progressivo de condições patológicas do câncer e tratamento.

A seguir, destacam-se alguns dos anticorpos monoclonais radiomarcados com índio-111 e zircônio-89 para aplicação em radioimunodiagnóstico.

3.8.1 Trastuzumabe

O trastuzumabe é um AcM humanizado que se liga aos receptores HER2 presentes no câncer de mama. Comercialmente ele é disponível para imunoterapia de câncer de mama HER2 positivo¹⁷.

No estudo descrito por Gaykema *et al*¹⁰⁰, o trastuzumabe foi radiomarcado com índio-111 visando descrever quantitativamente a biodistribuição e captação do trastuzumabe-DTPA-¹¹¹In durante o período de tratamento com o imunoterápico. Em 12 pacientes, 25 lesões tumorais foram detectadas tanto na primeira cintilografia quanto nas

séries subsequentes realizadas ao longo do tratamento. Além disso, o tratamento com trastuzumabe reduziu a captação do trastuzumabe-DTPA- ^{111}In por lesão no decorrer das 12 semanas em aproximadamente 20%¹⁰⁰.

Em 2010, o primeiro estudo com trastuzumabe-DTPA- ^{89}Zr para imagem de lesões positivas para HER2 em pacientes com câncer de mama metastático foi publicado. Foram incluídos naquele estudo 14 pacientes. Como resultado, todas as lesões conhecidas e, até mesmo desconhecidas, foram detectadas pelo PET. Além disso, lesões cerebrais metastáticas foram identificadas em vários pacientes, apesar da impossibilidade de o trastuzumabe atravessar a barreira hematoencefálica, provavelmente pela perda da integridade dela em pacientes com metástase cerebral¹⁰¹.

3.8.2 Pertuzumabe

O pertuzumabe é um AcM humanizado que se liga aos receptores HER2 presentes no câncer de mama. Comercialmente, ele é disponível para imunoterapia de câncer de mama HER2 positivo¹⁰².

O radiofármaco está sendo desenvolvido para monitorar o decréscimo da expressão de HER2 em pacientes que estão fazendo tratamento com trastuzumabe, ou seja, acompanhar a eficácia do tratamento. Como ele se liga aos domínios II dos receptores HER2 e o trastuzumabe aos domínios IV, o trastuzumabe não interfere na ligação do pertuzumabe¹⁰².

O pertuzumabe foi radiomarcado com índio-111 (pertuzumabe-BzDTPA- ^{111}In) para avaliar a resposta do câncer de mama HER2-positivo ao tratamento com trastuzumabe (Herceptin) em pacientes com metástases HER2-positivas. As imagens clínicas demonstraram boa captação tumoral em metástases hepática, 48 horas após a injeção de 111 MBq (5 mg) do pertuzumabe-BzDTPA- ^{111}In . Além disso, o estudo revelou não haver reações adversas graves atribuíveis à administração do radiofármaco^{17, 102}.

Em um estudo realizado em 2014, Marquez *et al*⁷⁰ radiomarcaram o pertuzumabe com ^{89}Zr via quelante bifuncional DFO e realizaram estudos pré-clínicos em animais implantados com tumor xenográfico. O pertuzumabe-DFO- ^{89}Zr foi administrado aos animais e a imagem foi realizada sete dias depois. O radiofármaco apresentou captação de $47,5 \pm 32,9\%$ AI/g nos tumores HER2+ comparada a $9,5 \pm 1,7\%$ AI/g de captação no tumor HER2 negativo. Além disso, eles observaram que a captação no tumor foi significativamente maior em presença de trastuzumabe não radiomarcado. Eles concluíram

que o radiofármaco é muito promissor para realizar o acompanhamento não invasivo da diminuição da expressão de HER2 em tumores tratados com trastuzumabe⁷⁰.

3.8.3 Bevacizumabe

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é angiogênico e desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, cuja superexpressão está associada a prognóstico comprometido na formação vascular sistêmica. O bevacizumabe é anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF capaz de bloquear a angiogênese pela depleção do VEGF e, assim, evitando sua ligação ao receptor VEGF¹⁰³.

Estudo clínico foi realizado em 23 pacientes para avaliar o bevacizumabe -DFO-⁸⁹Zr na visualização de VEGF em câncer de mama primário. Uma dose de 37MBq foi injetada nos pacientes e eles foram submetidos ao exame PET/TC de mamas e regiões axilares. Como resultado, 25 dos 26 nódulos de câncer de mama (96,1%) foram detectados pelo bevacizumabe -DFO-⁸⁹Zr, demonstrando seu potencial para identificação de tumores mamários e para prever e monitorar o efeito das terapias direcionadas ao VEGF¹⁰⁴.

3.8.4 Rituximabe

O CD20 é um marcador celular de células B que é expresso durante a diferenciação das células pró-B em células B¹². O rituximabe é um anticorpo anti-CD20 que demonstrou efeito antitumoral quando usado como agente único ou em combinação com uma variedade de regimes quimioterapêuticos. É um anticorpo monoclonal quimérico (murínico-humano) que se liga seletivamente com alta afinidade ao antígeno CD20, uma proteína transmembranar hidrofóbica que é expressa em linfócitos B e em mais de 90% das células B de Linfoma não-Hodgkin (LNH)¹⁰⁵.

No estudo de Natarajan *et al*⁷², o rituximabe foi radiomarcado com zircônio-89 para monitorar a terapia LNH. O rituximabe-Df-Bz-⁸⁹Zr apresentou boa estabilidade *in vitro* durante 5 dias a 37°C em solução salina a 0,9%, DTPA 50 mM e em soro humano. Os estudos pré-clínicos com modelo huCD20TM indicaram que esse radioimunoconjugado é direcionado especificamente ao antígeno huCD20 e tem potencial para aplicação em pacientes⁷².

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo, apresenta-se o planejamento experimental adotado para desenvolvimento dos radioimunoconjugados com aplicação diagnóstica e monitoramento terapêutico do câncer de cabeça e pescoço e câncer colorretal, por SPECT e PET.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho foi separada em três fases, com diversas etapas, que foram desenvolvidas para cada radioimunoconjugado, a serem abordadas com detalhes nos capítulos 5 a 10.

Anteriormente à primeira fase, fez-se uma avaliação da integridade do anticorpo, visto que é o fármaco direcionador e a qualidade desse componente impacta diretamente em todo processo de desenvolvimento dos radioimunoconjugados. Para cada etapa, várias análises foram realizadas, visando obter respostas para argumentações estratégicas que definiram a progressão dos estudos. Os estudos realizados, juntamente com as análises específicas, os marcos da experimentação (*Milestone*) e as argumentações estratégicas estão descritos nas figuras 6, 7 e 8.

Na primeira fase do trabalho, determinou-se qual a razão molar ideal AcM:Quelante para cada imunoconjugado. Sendo assim, o cetuximabe foi conjugado com DTPA, em diferentes razões molares (1:10 e 1:20) e também com DFO, nas razões molares 1:3; 1:5; 1:8, 1:10 e 1:20. Posteriormente, o cetuximabe-DTPA e o cetuximabe-DFO foram radiomarcados com ^{111}In e ^{89}Zr , respectivamente. A estabilidade dos imunoconjugados também foi avaliada.

A razão molar escolhida foi aquela que promoveu a incorporação de certo número de grupamentos quelantes ao anticorpo, de modo a garantir pureza radioquímica elevada, estabilidade da marcação e com preservação da imunorreatividade. Um esquema do delineamento experimental, identificando os “macro-estudos” estabelecidos neste trabalho é representado na figura 5.

Figura 5– Esquema do delineamento experimental deste trabalho.

Figura 6 –Análises realizadas, os marcos da experimentação (*Milestone*) e as argumentações estratégicas da primeira fase (FASE I) do trabalho.

Adaptado de MASSICANO, 2016¹⁰⁵.

Na segunda fase (FASE II), analisou-se a radiomarcção dos anticorpos conjugados utilizando-se diferentes atividades específicas. Além disso, analisou-se a influência da atividade específica na imunorreatividade e estabilidade dos radioimunoconjugados. Nessa fase também foram realizados estudos *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas e estabilidade em soro.

Figura 7 – Análises realizadas, os marcos da experimentação (*Milestone*) e as argumentações estratégicas da segunda fase (FASE II) do trabalho.

Adaptado de MASSICANO, 2016¹⁰⁵.

Já na terceira fase (FASE III) do trabalho realizaram-se os estudos *in vivo* a fim de caracterizar a farmacocinética dos radiofármacos e estabilidade *in vivo*. Para o cetuximabe-DTPA- ^{111}In avaliou-se sua biodistribuição e estudos de imagem em camundongos BALB/c. Para o desenvolvimento de modelos tumorais, os camundongos foram implantados com linhagens de células FaDu parentais e linhagens resistentes (cedidas pelo Hospital de Câncer de Barretos). Por meio dos estudos de imagem e biodistribuição, comparou-se a captação nos diferentes tumores, visando confirmar o modelo de resistência.

Os estudos de biodistribuição e estudos de imagem em camundongos implantados com tumor também foram realizados com cetuximabe-DFO- ^{89}Zr . No entanto, o estudo comparativo foi desenvolvido pela técnica “*Blocking*” (de bloqueio dos receptores), com injeção prévia do cetuximabe não marcado, para saturar os receptores do tumor, no grupo 1, e o grupo 2, “*Non-Blocking*” (sem bloqueio), cujos camundongos não foram submetidos ao procedimento descrito.

Figura 8 – Análises realizadas, os marcos da experimentação (*Milestone*) e as argumentações estratégicas da terceira fase do trabalho.

Estudo <i>in vivo</i>				
Análises	^{111}In : Biodistribuição em camundongos sadios	^{111}In : Farmacocinética em camundongos sadios	^{111}In e ^{89}Zr : Estudos de imagem em modelos tumorais	^{111}In e ^{89}Zr : Biodistribuição camundongos implantados com tumor
Milestone	% de captação nos órgãos	Parâmetros Farmaco- cinéticos	Análise do perfil de captação nos diferentes tumores	Comparativo entre os grupos
Argumentações estratégicas	<ol style="list-style-type: none"> 1. O radioimunoconjugado preserva suas características <i>in vivo</i> e é capaz de diagnosticar o processo tumoral? 2. ^{111}In : Houve diferença na captação do radiofármaco pelos tumores desenvolvidos por células FaDu quando comparado ao modelo de resistência (FaDu-C10)? 3. ^{89}Zr: Houve diferença na captação do radiofármaco quando comparou-se os grupos de estudo: Modelo “sem bloqueio ” com o “bloqueador ”? 4. A especificidade do radioimunoconjugado pelo receptor foi demonstrada nos modelos tumorais <i>in vivo</i>? 			

Adaptado de MASSICANO, 2016¹⁰⁵.

5 CETUXIMABE-DTPA: ANÁLISE DO AcM E ESTUDOS DE CONJUGAÇÃO

No presente capítulo, estão descritos os estudos de análise do anticorpo e de conjugação com o quelante p-SCN-Bn-DTPA. Relacionam-se os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à primeira etapa da FASE I do trabalho.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta FASE do trabalho foram:

- Conjugar o cetuximabe ao p-SCN-Bn-DTPA utilizando diferentes razões molares AcM:DTPA;
- Avaliar a influência do número de quelantes/AcM na pureza radioquímica e imunorreatividade;
- Analisar a estabilidade do imunoconjugado quando armazenado entre 2 °C e 8 °C e a -20 °C.

5.2 MATERIAIS

5.2.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia, no IPEN e, parte dos estudos no laboratório do Instituto Mallinckrodt, Universidade de Washington, MO. Para o preparo das células utilizou-se, além do laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia, o Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital de Câncer de Barretos. Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para as análises descritas.

5.2.2 Reagentes

- Anticorpo monoclonal anti-EGFR -cetuximabe (Erbix®) (Bristol);
- Ácido isotiocianatobenzil-dietilenotriaminopentaacético (p-SCN-Bn-DTPA (Macrocylics, EUA);

- Cloreto de índio – 111 (AMY Polatom/Polônia);
- Água purificada – Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- Tampão Laemmli – 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad, EUA);
- Tampão de corrida – 10x Tris/Glycine/SDS (BioRad, EUA);
- Padrão de Proteína – Protein Ladders and Standards (BioRad, EUA);
- PBS (Tampão Fosfato Salino) (Sigma Aldrich, EUA);
- Reagente colorimétrico Imperial Protein Stain (Thermo Scientific, EUA);
- Arsenazo III (Sigma Aldrich, EUA);
- Azida sódica (Merck, Alemanha);
- Bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha);
- Carbonato de sódio (Merck, Alemanha);
- Acetato de amônio PA (Merck, Alemanha);
- Ácido etilenodiaminotetraacético (Merck, Alemanha);
- Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- Etanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);
- HEPES (Sigma Aldrich, EUA);
- Fosfato de sódio monobásico hidratado (Merck, Alemanha);
- Kit para ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, EUA);
- Albumina bovina sérica – BSA (Thermo Scientific, EUA);
- Tripsina -EDTA 0,25%; (Cultilab, Brasil);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Meios de cultura DMEM (Cultilab, Brasil);
- Penicilina, estreptomicina (Cultilab, Brasil);
- Gentamicina para uso celular (Sigma Aldrich, EUA).

5.2.3 Implementos

- Dispositivo de ultrafiltração (Amicon® Ultra) 10.000 MWCO (Millipore, EUA);
- Gel para eletroforese – 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µL (BioRad, EUA);
- Coluna BioSep SEC-S 3000 para cromatografia líquida de alta eficiência – 300 x 7,8 mm, 5 µm (Phenomenex, EUA);
- Coluna Protein-Pak™ 300SW para cromatografia líquida de alta eficiência – 300 x 7,5 mm, 5 µm (Waters, Japão);
- Coluna Sephadex G25 – PD-10 (Pharmacia Biotech, Alemanha / Reino Unido);
- Cartucho de pré-coluna SEC-S 3000 – 4 x 3,0 mm (Phenomenex, EUA);
- Suporte cromatográfico TLC sílica gel e ITLC (Merck, Alemanha);

- Placa de 96 poços (Thermo Scientific, EUA);
- Câmara hemocitométrica de Neubauer (HBG, Alemanha);
- Frascos de cultura celular;
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo Eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

5.2.4 Equipamentos e sistemas

- Agitador/aquecedor Thermomixer Comfort 1,5mL (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- Centrífuga refrigerada Mikro 220 (Hettich, Alemanha);
- Cuba de eletroforese vertical (BioRad, EUA);
- Espectrofotômetro Evolution 160 (Thermo Scientific, EUA);
- GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- Medidor de pH (Mettler Toledo, EUA);
- Espectrofotômetro Autoflex Speed Bruker (CEFAP-ICB/USP);
- Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 cobra II (Packard-Camberra, EUA);
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência – CLAE, modelo 1260 Infinity (Agilent Technologies, EUA);
- TLC scanner – AR-2000 radio-TLC Imaging Scanner (Eckert & Ziegler/ EUA).

5.2.5 Células tumorais

- Células de FaDu P (parental);
- Células de FaDu C10 (R -resistente).

As células FaDu, carcinoma humano de células escamosas, foram fornecidas pelo Hospital de Câncer de Barretos e cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN e no Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital, a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo penicilina (100.000 unidades/L), estreptomicina (100 mg/L) e gentamicina (40 mg/L).

5.3 MÉTODO

Para definir um novo agente de IM a ser aplicado em estudos clínicos, é necessária a compreensão das etapas críticas do desenvolvimento do agente. O desenvolvimento do imunoc conjugado (cetuximabe-DTPA) foi baseado em referências bibliográficas, além de experiências prévias e interação com outros grupos pelo projeto ARCAL (*Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe*), da Agência Internacional de Energia Atômica.

5.3.1 Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 1

O preparo do imunoc conjugado se deu em duas etapas, envolvendo metodologias específicas. A fim de apresentar um panorama desse processo, descreve-se, com a figura 9, a sequência lógica da obtenção do imunoc conjugado – Etapa 1.

5.3.2 Análise da integridade estrutural do anticorpo e do imunoc conjugado

O cetuximabe (5 mg/mL) foi analisado por eletroforese ¹⁰⁶ a fim de verificar a integridade do anticorpo. A eletroforese foi realizada com sistema BioRad usando gel 4-20 % Tris-Glicina. O anticorpo foi diluído em tampão não redutor Laemmli e o gel correu a 200 V por 30 minutos. Posteriormente, o gel foi corado e analisado.

Os imunoc conjugados, AcM-DTPA, nas diferentes razões molares, 1:10 e 1:20, também foram analisados visando averiguar se os procedimentos de conjugação (conforme descrito no item 5.3.3.2- pág. 67) e purificação (item 5.3.3.3 – pág .67) comprometeram a estrutura do anticorpo, interferindo no tamanho molecular do cetuximabe.

5.3.3 Preparo do imunoc conjugado

5.3.3.1 Purificação do cetuximabe (troca de tampão)

O anticorpo foi submetido à purificação, para retirar os estabilizantes e conservantes, que poderiam interferir na ligação proteína – agente quelante, e foi feita a troca de tampão, favorecendo o rendimento de conjugação^{107, 108}.

Adicionou-se à solução do anticorpo (20 mg; 4 mL), 200 µL de solução de EDTA 50 mmol/L em tampão acetato de amônio 0,1 mol/L, pH=5,5, e incubou por 30 minutos a temperatura ambiente¹⁰⁷.

Figura 9 – Fluxograma das etapas e métodos empregados no desenvolvimento do imunoc conjugado cetuximabe-DTPA (FASE I – Etapa 1).

Posteriormente, a solução foi transferida para um tubo cônico (Vivaspin®) com poro da membrana no tamanho de 10.000 g.mol⁻¹, e acrescentou-se 5 mL de tampão bicarbonato 0,2 mol/L pH 8,5. O tubo foi centrifugado a 700 g por 30 minutos sob refrigeração (4 °C). Após a centrifugação, o volume foi novamente completado para 5 mL com o mesmo tampão e o tubo foi novamente centrifugado^{79, 107}.

Em seguida, o AcM foi concentrado até aproximadamente 20 mg/mL. Para isso, o tubo foi submetido à centrifugação sob as mesmas condições, sem adicionar tampão, pelo número de vezes necessário para se obter a concentração desejada (20 mg/mL). A solução concentrada foi então retirada da parte superior do tubo e utilizada no processo de conjugação^{79, 107}.

A concentração do anticorpo foi estimada por espectrofotometria a 280 nm, multiplicando-se a absorbância, o valor de μ (inverso do coeficiente de extinção $\mu=0,712$ mg/mL.cm) e o fator de diluição^{107, 108}.

O processo de conjugação requer atenção especial no preparo dos tampões e soluções utilizados na síntese, pois, até mesmo concentrações muito baixas de metais são capazes de interagir com o quelante interferindo na posterior radiomarcagem. Para minimizar a quantidade de metais, todos os tampões utilizados foram preparados com água purificada por osmose reversa e tratada com resina trocadora de íons (Chelex 100)^{109, 110}.

5.3.3.2 Conjugação do cetuximabe com p-SCN-Bn-DTPA

O quelante utilizado foi o p-SCN-Bn-DTPA, doravante denominado DTPA. O procedimento de imunoconjugação do AcM ao quelante DTPA teve como referência métodos adaptados da literatura^{107, 108, 109, 111, 112}.

O quelante DTPA, em excesso molar de 10 e 20 vezes (razões molares: 1:10 e 1:20) foi solubilizado em 200 μ L de água Chelex. Adicionou-se o agente quelante ao AcM purificado, volume equivalente a 20 mg, em tampão bicarbonato 0,2 mol/L pH 8,5. A mistura permaneceu sob agitação (400 rpm) a 37 °C durante duas horas.

5.3.3.3 Purificação do imunoconjugado

O processo de conjugação foi realizado com excesso molar de quelante que precisa ser retirado para não interferir na radiomarcagem. Decorrido o tempo de conjugação, o imunoconjugado foi purificado por coluna de gel de exclusão molecular (PD-10).

A coluna foi equilibrada com 50 mL de tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5. O volume do imunocjugado foi ajustado para 2,5 mL, adicionado no topo da coluna e eluído com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. Dez tubos de 0,5 mL foram coletados e as absorbâncias das amostras foram analisadas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. Além deste controle em espectrofotômetro, todas as frações foram submetidas à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de identificar aquelas que continham o anticorpo. Alíquotas de 20 µL de cada fração foram analisadas em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5 µm). As análises foram realizadas à 280 nm. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min utilizando como fase móvel tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,0 por 15 minutos.

As frações que continham o anticorpo foram selecionadas e posteriormente concentradas por ultrafiltração, conforme descrito no item 5.3.3.1 (pág. 65) ¹⁰⁷.

5.3.3.4 Determinação da concentração proteica do imunocjugado

O método espectrofotométrico utilizando ácido bicinonínico (BCA) ¹¹³ baseia-se na conversão de cobre (II) para cobre (I) em condições básicas, denominada reação de biureto. O reagente ácido bicinonínico é cromogênico e apresenta influência com alguns resíduos de aminoácidos e a ligação peptídica.

Duas moléculas de ácido bicinonínico reagem com um íon cobre (I), formando um complexo de cor púrpura. A quantidade de cobre (II) reduzido – cobre (I) – é proporcional à concentração de proteína. A absorbância medida a 570 nm é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra. A mudança de cor para púrpura, que absorve a cerca de 570 nm, foi analisada espectrofotometricamente. Diferentes concentrações de soro albumina bovino foram utilizadas como padrão e misturadas com reagente BCA em Eppendorff para construir uma curva analítica. Uma alíquota de 5 µL do imunocjugado também foi separada em Eppendorff e reagiu com o reagente BCA. Os Eppendorfs foram incubados a 37 ° C durante 30 minutos. A quantidade de proteína foi estimada utilizando a curva analítica e, por meio da equação da reta, os resultados de determinação de concentração de proteína na amostra foram extrapolados.

Com base na determinação da concentração de proteínas, a solução do imunocjugado foi fracionada em alíquotas de 1 mg e armazenadas em tubos Eppendorf sob refrigeração (2 °C a 8 °C) e também à -20 °C.

5.3.3.5 Determinação do número de quelantes por anticorpo

Para determinação do número de quelantes acoplados ao AcM três métodos foram utilizados de forma comparativa: método espectrofotométrico^{14, 114}, o método radioativo, utilizando $^{111}\text{In}^{109}$ e o método por espectrometria de massas (MALDI/TOF)^{63, 115}.

5.3.3.5.1 Método espectrofotométrico

O método proposto por Dadachova *et al*¹¹⁴ foi adaptado para determinar o número de quelantes DTPA por AcM. Uma solução estoque de Pb(II)-AA(III) (chumbo-arsenazo) em tampão acetato de amônio 0,15 mol/L pH 7,0 foi preparada contendo 10 μM AAIII (Arsenazo) e 5 μM de Pb(II), e mantida em frasco âmbar sob refrigeração.

Uma curva analítica foi construída a partir de uma solução de 2 mg/mL de p-SCN-Bn-DTPA. Desta forma, 0 – 40 μL de p-SCN-Bn-DTPA foram adicionados à 850 μL de solução de Pb(II)-AA(III), 110 – 150 μL de tampão acetato de amônio 0,15 M pH 7,0, de forma a obter um volume final de 1000 μL . As misturas reagiram por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o tempo de reação, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 652 nm. Um gráfico foi construído relacionando-se a concentração de quelante *versus* a absorbância, e a equação da reta foi calculada. A solução amostra foi preparada adicionando-se 5 μL de cada amostra a ser testada; 145 μL de tampão acetato de amônio 0,15 M pH 7,0 e 850 μL de solução de Pb(II)-AA(III) e a mesma foi analisada em espectrofotômetro da mesma forma que as soluções da curva analítica. A concentração de quelante presente na amostra foi calculada por meio da equação da reta. O valor encontrado foi dividido pela massa de AcM presente na amostra e desta forma obteve-se o número de quelantes incorporado ao anticorpo.

5.3.3.5.2 Método radioativo utilizando $^{111}\text{InCl}_3$

Previamente a etapa de purificação, duas alíquotas de 10 μL foram coletadas das soluções dos imunoconjugados e acrescentou-se 37 MBq (1 mCi) de $^{111}\text{InCl}_3$ ¹³⁷. A reação de radiomarcagem ocorreu em pH ligeiramente ácido (6,5) e sob agitação leve de 350 rpm por 30 minutos a 42°C.

As amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada em dois sistemas: em TLC – SG (sílica gel) 1x12 cm com fase móvel metanol: acetato de amônio 10% 50:50 (v/v). Para o sistema 2, utilizou-se iTLC-SG 1x12 cm e solução de EDTA 50 mmol/L em tampão acetato de amônio 0,1 mol/L, pH=5,5-6,0 como fase móvel.

A relação DTPA / cetuximabe foi determinada de acordo com a seguinte equação (EQ.5.1):

$$\frac{\text{DTPA}}{\text{AcM}} = \frac{\% \text{ de radioatividade na origem da fita}}{(\% \text{ de radioatividade na origem fita EDTA X } \text{X \% de radioatividade no fronte da fita Met:Amônia})} \text{X razão molar} \quad (\text{EQ.5.1})$$

Sendo:

- % de radioatividade na origem fita EDTA: % de cetuximabe- DTPA-¹¹¹In;
- % de radioatividade na frente da fita Met:Amônia: % de impureza DTPA-¹¹¹In.

5.3.3.5.3 Método por espectrometria de massas (MALDI/TOF)

O número de quelantes acoplados ao anticorpo foi definido pelo método de espectrometria de massas (MALDI/TOF)^{63, 115, 125}, utilizando espectrofotômetro Autoflex Speed Bruker (CEFAP-ICB/USP), em amostras do imunoconjugado purificado.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. Basicamente, essa técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas (quebrar os átomos ou moléculas para que fiquem carregadas com mais ou menos elétrons do que o original) de uma amostra, na separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga (m/z) e, em seguida, sua identificação e quantificação¹¹⁵.

Considerando que a amostra do imunoconjugado estava em solução tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5, a mesma foi previamente preparada, visando reduzir a quantidade de sal que poderia comprometer no processo de cristalização com a matriz e, conseqüentemente, a aquisição do espectro. Sendo assim, trocou-se o tampão por HEPES 0,1 mol/L e, posteriormente, a amostra foi concentrada em tubos Amicon a 0,5 nmol/μL e 10 μL foi aplicada para análise.

5.3.3.6 Análise da Estabilidade do imunoconjugado por CLAE

A fim de avaliar a integridade proteica, o possível desacoplamento do quelante e, assim, o prazo de validade dos imunoconjugados para rotina de produção, as amostras de 0,2 mL de cetuximabe-DTPA purificado (concentração de 5 mg/mL), conjugadas nas razões molares 1:10 e 1:20 e fracionadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL, foram armazenadas sob refrigeração (2 – 8 °C) e também à -20 °C, por 6 meses. Uma alíquota de 20 μL foi retirada, a cada intervalo de tempo determinado, para análise em CLAE, conforme descrito no item 5.3.3.3 (pág. 67).

5.3.4 Fluxograma da Metodologia FASE I – Etapa 2

A etapa 2 da FASE I refere-se aos procedimentos de radiomarcagem e estudos *in vitro* visando determinar a razão molar ideal AcM:Quelante para o imunoc conjugado. O cenário para definição do imunoc conjugado – Etapa 2 é descrito na figura 10.

Figura 10 – Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do imunoc conjugado (FASE I – Etapa 2).

5.3.5 Desenvolvimento do Imunoconjugado

5.3.5.1 Radiomarcção do imunoconjugado

O processo de radiomarcção do cetuximabe-DTPA com índio-111 aplicado neste estudo foi adaptado da literatura ^{4,14, 18,79,100,107-110}, baseando-se nos trabalhos desenvolvidos por Massicano (2016)¹⁰⁵. A massa de 1mg de cetuximabe-DTPA purificado foi radiomarcada com diferentes atividades de ¹¹¹InCl₃. O tempo de reação foi de 60 minutos à 42°C e pH 6,5, sob agitação leve^{4, 14, 79, 105, 107}.

5.3.5.2 Análise da Pureza Radioquímica

Segundo a RDC 64, de 18 de dezembro de 2009, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pureza radioquímica é a razão expressa em porcentagem de radioatividade do radionuclídeo de interesse no seu estado químico indicado, em relação à radioatividade total da preparação radiofarmacêutica¹¹⁶. Neste trabalho, dois procedimentos foram adotados para determinação da pureza radioquímica: cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.3.5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada aplicando-se uma alíquota do radiomarcado sobre as fitas de camada delgada TLC sílica gel 60 (1,0 x 12 cm) utilizando como fase móvel tampão metanol: NH₃ 10% (1:1 v/v) – sistema 1. Neste sistema, o anticorpo radiomarcado e o radioisótopo livre permanecem na origem da fita (R_f 0,0 – 0,1) enquanto a impureza DTPA-¹¹¹In migra para a frente com o solvente (R_f 1,0).

Para o sistema 2, utilizou-se fita de camada delgada ITLC-SG 1x12 cm e solução de EDTA 50 mmol/L em tampão acetato de amônio 0,1 mol/L, pH=5,5-6,0, como fase móvel. Neste sistema, o anticorpo radiomarcado permanece na origem da fita (R_f 0,0 – 0,1), enquanto as impurezas (radioisótopo livre e DTPA-¹¹¹In) migram para a frente com o solvente (R_f 1,0)^{102, 107}.

5.3.5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para determinar a pureza radioquímica do radioimunoconjugado e avaliar a estabilidade das marcações. Procedeu-se à cromatografia por exclusão molecular em um sistema Agilent equipado com detector UV 280 nm, coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5 µm), detector de

radiação gama (Raytest). Foi utilizado como fase móvel tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0 por 15 minutos, a um fluxo de 1mL/minuto.

5.3.5.3 Estudos *in vitro* com células FaDu

Os estudos *in vitro* do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In foram realizados com células FaDu (P – Parental e C10 – linhagem resistente), de carcinoma humano de células escamosas, e teve como base o método descrito em literatura¹¹².

As células FaDu foram cedidas pelo Hospital de Câncer de Barretos. A linhagem resistente foi desenvolvida no laboratório do Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital, por exposição a longo período de doses crescentes de cetuximabe, intervaladas por períodos de recuperação para repovoamento da cultura celular.

5.3.5.3.1 Ensaio de ligação específica

O anticorpo marcado foi diluído em meio de cultura contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (v/v) a uma concentração radioativa de 900 cpm/ μ L. O anticorpo não radiomarcado (4 μ M em meio de cultura contendo 10 % de SFB v/v) foi utilizado como competidor. O ensaio foi realizado por meio da adição de diferentes quantidades de células FaDu-P (0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 x 10⁶ células) em 0,5 mL de meio de cultura contendo 10 % v/v SFB, a tubos cônicos de 1,5 mL, seguido da adição de 250 μ L de meio de cultura (1% SFB) (ligação total) ou 250 μ L da solução do competidor (ligação não-específica) e 250 μ L da solução contendo o cetuximabe radiomarcado diluído. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, centrifugadas a 1.000 g por 5 minutos, lavadas duas vezes com 1 mL de meio de cultura contendo 10% v/v SFB e contadas em contador gama, com um padrão da atividade total adicionada. Esse procedimento foi realizado para o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, conjugado nas diferentes razões molares 1:10 e 1:20.

As curvas de porcentagem de ligação total, ligação específica e não específica em relação ao número de células foram construídas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®].

5.3.5.3.2 Avaliação da imunorreatividade

A análise da imunorreatividade do cetuximabe radiomarcado baseou-se no método descrito por Lindmo *et al*¹¹⁷. O radioimunoconjugado foi diluído em BSA 1% (diluído em PBS) à concentração de aproximadamente 0,77 μ g/mL. Como competidor, foi

utilizado o próprio anticorpo não conjugado e não radiomarcado, diluído à concentração de 1mg/mL.

Volumes diferentes de uma solução de 3×10^7 células FaDu-P em 6 mL de PBS foram recolhidos em tubos Eppendorf (1,5 mL) a fim de obter as seguintes quantidades de células: 2,5; 2,0; 1,5; 1,25; 1,0; 0,75; 0,25 $\times 10^6$ células. Esse processo foi realizado seis vezes, para cada radioimunoconjugado, sendo um grupo (em triplicata) utilizado para determinar a porcentagem de ligação específica (LE) e o outro, também em triplicata, para determinar a porcentagem de ligação não específica (LNE).

Posteriormente, adicionou-se 50 μ L (50 μ g) da solução de competidor ao grupo referentes à ligação não-específica, e 50 μ L de PBS ao grupo LE, seguido de incubação por 30 minutos a 4°C sob agitação branda. Em seguida, adicionou-se 250 μ L da solução do anticorpo radiomarcado a todos os tubos (ligação específica e ligação não- específica). As células foram homogeneizadas e incubadas por uma hora a 4°C sob leve agitação.

Decorrido o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 1.000 g por cinco minutos, lavadas três vezes com PBS gelado e os botões celulares foram contados em contador gama, com um padrão da atividade total adicionada. Esse procedimento foi realizado para cada radioimunoconjugado, nas razões molares 1:10 e 1:20.

As curvas de porcentagem de ligação total, ligação específica e não específica em relação ao número de células foram construídas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00®. O experimento foi realizado em triplicata.

As porcentagens da ligação total, ligação não específica, e ligação específica, foram calculadas e utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0; foram construídos gráficos relacionando a concentração de células (mL/milhão de células) *versus* a atividade/ligação total e os dados foram ajustados para uma curva de regressão linear. O valor de Y quando X foi igual a zero, corresponde à fração imunorreativa (r) expressa em 1/r.

5.3.5.3.3 Estudo de internalização

Neste ensaio, as células foram preparadas em placas de seis poços e aguardou-se 48 horas para permitir a aderência delas às placas. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS e adicionou-se 150 μ L da solução do competidor (cetuximabe não marcado 1 mg/mL em meio de cultura, SFB 10%, sem antibióticos) nos poços correspondentes à ligação não específica e 150 μ L de meio de cultura (SFB 10%, sem antibióticos) naqueles referentes a ligação total. As placas foram agitadas levemente e, então,

acrescentou-se 150 μ L do radioimunoconjugado (0,77 μ g/mL em meio de cultura, SFB 10%, sem antibióticos) em cada poço. O período de incubação foi de uma hora a 37°C.

Após incubar as placas, elas foram lavadas com PBS e tratadas com 1mL de tampão glicina 0,05 M / NaCl 0,1 M (pH 2,8) por cinco minutos, seguido de mais duas lavagens de cinco minutos com a mesma solução. As lavagens ácidas foram coletadas para tubos de contagem para avaliação do total ligado à membrana celular.

Para análise da internalização, as células foram lisadas com 1 mL de NaOH 1 M e o conteúdo foi removido para tubos de contagem após 15 minutos, com mais duas lavagens da mesma solução. Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem de internalização específica foi calculada em função do total de radioatividade na célula (ligada + internalizada) e do total de radioatividade adicionado⁴.

5.3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou média $\pm$ desvio padrão (DP).

Para comparar até dois grupos (amostras pareadas ou não), o teste t de Student foi utilizado com distribuição bicaudal. Para a comparação entre três ou mais grupos foi utilizado o teste de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ou dois fatores (*two-way* ANOVA). Quando necessário, os dados foram submetidos a pós-teste (teste de Bonferroni de comparações múltiplas). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor do que 0,05.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO FASE I

5.4.1 Análise da integridade do cetuximabe

A integridade do cetuximabe foi confirmada por meio da análise de eletroforese¹⁰⁶ em gel 4-20% Tris-Glicina, pelo sistema BioRad. Essa técnica é comumente utilizada para comparar as bandas do AcM conjugado com o AcM não conjugado^{100, 102, 111, 112, 118}.

Conforme demonstrado por Chang *et al*¹¹⁸, o cetuximabe possui tamanho molecular de aproximadamente 150 KDa¹¹⁹. Mostra-se, com a figura 11, o padrão de peso molecular conhecido (KDa) e as amostras de cetuximabe (A1 e A3) e dos imunoconjugados com DTPA em diferentes razões molares, 1:10 (A2) e 1:20 (A4). Observa-se uma banda

única na posição indicada pelo marcador próximo a 150 KDa. Na análise comparativa com o padrão, as amostras do AcM não conjugado (A1 e A3) apresentaram peso molecular compatível à molécula íntegra^{118, 119}.

Esta análise por eletroforese demonstrou que os processos de conjugação e purificação não comprometeram a estrutura do anticorpo, visto que não foi observado outras bandas de menor e maior tamanho molecular, indicando quebra e aglutinação do AcM.

Figura 11 – Eletroforese em gel 4-20% Tris-Glicina, corado com colorimétrico *Imperial Protein Stain*, do cetuximabe e dos imunocjugados em diferentes razões molares.

Os marcadores de peso molecular (padrão) estão demonstrados em KDa. As amostras de cetuximabe indicadas por A1 e A3, do imunocjugado com DTPA na razão molar de 1:10 (A2) e do imunocjugado com DTPA 1:20 (A4).

5.4.2 Preparo do imunocjugado

Os procedimentos de conjugação e a avaliação do número de quelantes por anticorpo devem ser estabelecidos para obtenção de acoplamento estável de radiometais aos anticorpos e a preservação de suas características e propriedades, como a estabilidade termodinâmica e cinética, dissociação dependente do pH e estabilidade em soro⁶⁴.

Os parâmetros de marcação dependem primariamente do agente quelante ligado. Além disso, o tipo de quelante interfere diretamente na capacidade de ligação do marcador molecular às células tumorais *in vitro* e *in vivo*¹¹¹. Considerando os trabalhos de Sihver¹⁸, Tolmachev⁶⁴, Cooper¹⁰⁷, Sabbah¹¹¹ e respectivos colaboradores, o DTPA foi o quelante selecionado para radiomarcagem com índio-111 neste trabalho.

A conjugação de anticorpos monoclonais à quelantes bifuncionais normalmente envolve o uso de química complexa e com múltiplas etapas¹⁰⁷. Sendo assim, concentrações muito baixas de metais são capazes de interagir com o quelante, dificultando o processo de radiomarcção. No sentido de minimizar a quantidade de metais, as soluções utilizadas no processo de conjugação foram preparadas com água purificada por osmose reversa e tratadas com resina trocadora de íons (Chelex 100)^{109, 110}.

O processo de conjugação do grupo isotiocianato do agente quelante com a amina do AcM ocorre tradicionalmente em meio básico (pH 8,0 – 8,5) e com excesso molar de quelante, já que a reação com grupos carboxílicos do quelante pode levar à diminuição da estabilidade do complexo. Dessa forma, é possível tornar a reação das aminas dos AcM mais seletivas pelo grupamento isotiocianato poupando os grupamentos carboxílicos presentes no DTPA¹²⁰.

A identificação da melhor razão molar é análise importante e deve ser estudada, uma vez que dependendo da razão molar empregada, pode haver incorporação baixa de quelantes resultando em eficiência baixa de radiomarcção ou comprometimento da estabilidade do radiomarcado. Por outro lado, um grande número de quelantes por anticorpo pode interferir na imunorreatividade do AcM, aspecto a ser discutido no próximo capítulo.

Considerando as experiências prévias e a interação com outros grupos de estudo do exterior, duas razões molares AcM:DTPA, 1:10 e 1:20, foram avaliadas neste trabalho.

Conforme descrito no item 5.3.3.3 (pág. 67), a cromatografia líquida de alta eficiência foi o controle em processo utilizado para avaliar a integridade estrutural do imunoconjugado. Pelo sistema de exclusão molecular, substâncias com alto peso molecular são primeiramente eluídas, sendo assim, os imunoconjugados apresentam menor tempo de retenção (TR) quando comparados aos AcM não conjugados¹²¹.

A referida alteração nos TR foi observada para ambas razões molares estudadas (tabela 5). A diferença entre o TR do cetuximabe e do AcM conjugado com DTPA foi significativa: para DTPA 1:10 ($P < 0,001$) e para DTPA 1:20 ($P < 0,001$).

Tabela 5 – Análise por CLAE do anticorpo não conjugado e conjugado.

Razão molar	TR do anticorpo não conjugado (minutos)	TR anticorpo conjugado (minutos)
DTPA 1:10	7,20 ± 0,06	6,76 ± 0,03
DTPA 1:20	7,20 ± 0,06	6,74 ± 0,05

Tempo de retenção (TR). Resultados expressos em média ± DP

Os tempos de retenção correspondentes ao AcM não conjugado e aos imunoconjugados, nas diferentes razões molares, são representados pela figura 12. Já, com a figura 13, o perfil cromatográfico do cetuximabe e do imunoconjugado (1:20), nos respectivos tempos de retenção, são demonstrados. Observa-se diferença significativa entre os TR do AcM não conjugado quando comparado aos imunoconjugados, porém, não há diferença significativa entre os imunoconjugados nas referidas razões molares.

Figura 12 – Tempos de retenção correspondentes ao cetuximabe e aos imunoconjugados nas diferentes razões molares: 1:10 e 1:20.

Como já citado, a reação de conjugação ocorre com excesso molar de quelante e ele, quando não acoplado à proteína, torna-se um contaminante, interferindo diretamente na eficiência de radiomarcagem.

Portanto, após a conjugação e antes da radiomarcagem, o imunoconjugado foi purificado em uma coluna de exclusão molecular (PD-10). As frações de 0,5 mL foram coletadas em tubos Eppendorf e analisadas por espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm (figura 14) e CLAE (figura 15).

Figura 13– Perfil de CLAE do AcM não conjugado (A) e do imunoconjugado (1:20) purificado e concentrado (B), com os respectivos TR.

Figura 14 - Absorbância (UV, 280 nm) das frações de purificação do imunoconjugado em coluna de exclusão molecular (PD-10), utilizando de tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5 como eluente (N=5).

Em (1) frações descartadas (2) frações correspondentes ao AcM-DTPA; e em (3) frações correspondentes ao AcM-DTPA + DTPA.

Figura 15 – Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do imunoc conjugado após purificação em coluna de exclusão molecular, utilizando tampão acetato de amônio 0,25 M pH 6,5 como eluente, segregado conforme a fração correspondente.

As análises por CLAE (figura 15) representam os picos correspondentes às frações recolhidas após PD10. As frações 3,5 a 5,0 correspondem ao imunoconjugado puro, já as de 5,5 a 8,0 indicam a presença do quelante juntamente com o AcM-DTPA. Após esse processo de purificação, as frações que indicaram maior presença do imunoconjugado (3,5 a 6,0) foram concentradas, utilizando-se tubos de ultrafiltração Amicon®. Apesar das frações 5,5 e 6,0 apresentarem uma pequena quantidade do DTPA, estas foram adicionadas devido à grande quantidade de imunoconjugado indicada e, além disso, por serem submetidas ao processo de concentração em dispositivo de ultrafiltração, capaz de remover esses quelantes remanescentes.

O perfil de CLAE do ultrafiltrado, apresentado na figura 16, indica pequena perda do imunoconjugado e grande concentração do quelante nesta fase.

Figura 16 – Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do ultrafiltrado após purificação em tubos Amicon® para remoção do quelante DTPA remanescente.

Cooper *et al*¹⁰⁷ utilizaram como método de purificação e concentração apenas os tubos concentradores. A principal vantagem desse método é que, com a utilização de centrifugas refrigeradas, o anticorpo permanece o tempo todo sob temperatura ideal (entre 2°C e 8°C). No entanto, a quantidade necessária de ciclos de centrifugação para se obter um imunoconjugado puro consiste na maior desvantagem. Quase sempre são necessários de seis a oito ciclos, cada ciclo com duração de 30 minutos em média.

O método aplicado neste trabalho utilizou purificação prévia por cromatografia de exclusão molecular em coluna PD-10 com posterior concentração em tubos de ultrafiltração Amicon[®]. A combinação destes dois métodos reduziu em mais de 50% o tempo de purificação, uma vez que foram necessários apenas dois ciclos de centrifugação para concentrar o imunocjugado. Além disso, este método forneceu um imunocjugado puro, sem a presença de DTPA livre (N=37), tendo se mostrado reprodutível, conforme figura 17.

Figura 17 – Perfil cromatográfico (UV, 280 nm) do imunocjugado após purificação combinando cromatografia de exclusão molecular e ultrafiltração.

A definição da concentração proteica, após a conjugação e purificação, é imprescindível para cálculo da atividade específica do radiofármaco e análise das condições de radiomarcagem.

O método espectrofotométrico utilizando ácido bicinonínico (BCA)¹¹³ foi empregado para medida do conteúdo de proteína. A quantidade de proteína foi estimada utilizando a curva analítica com uma proteína de concentração conhecida, a albumina bovina sérica (BSA) 2 mg/mL (figura 18) e, pela equação da reta, os resultados de determinação de concentração de proteína na amostra foram extrapolados.

Figura 18– Curva de absorvância a 570 nm obtida a partir de diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida (BSA 2 mg/mL).

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizaram o método de diálise em tampão acetato de amônio para remoção de quelantes livres^{4, 14, 95}. Porém, segundo o estudo de Wojdowska *et al*¹²², a recuperação proteica referente a esse procedimento é de 50,5%. Cooper *et al*¹⁰⁷ relataram perda de proteína variável de 10% a 50%, ao utilizarem apenas o método de purificação por ultrafiltração.

Neste trabalho, para os imunocombinados AcM-DTPA, nas razões molares 1:10 e 1:20, a concentração de proteínas foi $4,43 \pm 0,14$ mg/mL e $4,54 \pm 0,12$ mg/mL, respectivamente, mostrando que o método utilizado foi bastante reprodutivo. Partindo da amostra de anticorpo de 5 mg/mL, obteve-se uma recuperação proteica média de $85 \pm 2,42\%$ (N=37). Esses resultados demonstram que o método aplicado no presente estudo possibilitou maior recuperação proteica que aqueles descritos na literatura^{4, 14, 95, 107}.

5.4.2.1 Determinação do número de quelantes por anticorpo

O número de quelantes acoplados ao AcM é parâmetro determinante para eficiência de marcação e imunorreatividade, podendo interferir na ligação do radioimunocombinado ao tecido tumoral alvo, comprometendo os estudos *in vivo*¹²³. Sendo assim, a fim de padronizar o processo de conjugação e garantir um perfil reprodutível do AcM radiomarcado em estudos clínicos, é necessário estabelecer a relação entre a eficiência de ligação do AcM com o número de quelantes ligados à molécula de AcM¹²⁴.

Os resultados dos estudos de determinação do número de quelantes por AcM são apresentados a seguir.

5.4.2.1.1 Ensaio espectrofotométrico com complexo Arsenazo III

O ensaio com método espectrofotométrico, com Arsenazo III (AAIII), foi realizado para obter a estimativa do número de quelantes por AcM^{14, 114, 124}. O AAIII forma complexos estáveis com metais como o Pb, Cu e Y. Esses complexos mudam de cor ao reagirem com quelantes como o DTPA, e essa mudança de cor é proporcional à quantidade de quelante¹²⁶.

A curva de calibração para determinação do número de quelantes por anticorpo para os imunocjugados, em diferentes razões molares, é apresentada na figura 19. A equação da reta foi determinada e os cálculos do número de quelantes por AcM foram obtidos para cada amostra do imunocjugado, nas diferentes razões molares: 1:10 (n=2) e 1:20 (n=3).

Figura 19 – Curva de absorvância a 652 nm obtida a partir de uma solução de 2 mg/mL de p-SCN-Bn-DTPA.

Por esse procedimento se obteve $1,9 \pm 0,2$, ou seja, aproximadamente 2 quelantes por cetuximabe, para razão molar 1:10 e $2,5 \pm 0,3$ (2 a 3) quelantes acoplados ao AcM para razão molar AcM:DTPA 1:20. Os resultados foram compatíveis aos descritos na literatura¹⁴, utilizando o mesmo método, em que os autores relataram número de quelantes por AcM de 1,8 e 2,7, respectivamente.

5.4.2.1.2 Método radioativo, utilizando $^{111}\text{InCl}_3$

Considerando o método radioativo¹⁰⁹, o número de grupamentos quelantes/cetuximabe apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) para as diferentes razões molares: $2,0 \pm 0,3$, na razão 1:10 ($n=6$) e $3,0 \pm 0,4$ ($n=6$), para o cetuximabe conjugado em excesso molar de 20 vezes (1:20).

Diferentes trabalhos^{105, 109, 137} foram descritos utilizando esse método para avaliação do número de quelantes acoplados ao anticorpo, sendo possível identificar incremento no número de quelantes acoplados ao AcM, relacionado ao aumento da razão molar de conjugação.

5.4.2.1.3 Método por espectrômetro de massas (MALDI/TOF)

A técnica da MALDI-TOF consta da deposição de determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H^+) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando essa matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e, ao mesmo tempo, desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso.

Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados ao analisador TOF, onde são acelerados por um campo elétrico em tubo a vácuo (sem qualquer gás ou molécula presente, como o espaço sideral), até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas m/z , chegando ao detector em diferentes tempos^{64, 115}.

A massa molecular do imunconjugado foi determinada pelo espectrômetro de massas (MALDI/TOF) (figura 20) e o número de quelantes ligados ao AcM foi calculado pela subtração da massa molecular do anticorpo não conjugado (tabela 6). As massas moleculares do cetuximabe-DTPA nas diferentes razões molares foram estabelecidas: AcM:DTPA 1:10 foi 154.260 g/mol e AcM:DTPA 1:20 foi 154.850 g/mol.

Figura 20 – Espectro MALDI/TOF dos imunocombinados (espectrômetro Bruker Autoflex Speed, CEFAP ICB / USP).

O espectrômetro de massas é o método mais preciso para determinar a relação Quelante/AcM. Os resultados demonstraram que houve incremento no número de quelantes acoplados ao cetuximabe quando se dobrou o excesso molar de p-SCN-Bn-DTPA. Entre 3-4 quelantes foram introduzidos no cetuximabe, na razão molar 1:10, já em 1:20 obteve-se a faixa de 4 a 5 quelantes DTPA acoplados ao AcM.

Tabela 6 – Representação dos cálculos para determinar o número de quelantes acoplados ao cetuximabe, baseando-se nos dados obtidos pelo espectrômetro de massas Autoflex MALDI-TOF/ TOF.

Massa Molecular do DTPA (g/mol)	Razão Molar do quelante	MALDI/TOF Massa molecular (g/mol)	Diferença [imunocombinado(g/mol)-cetuximabe (152.000g/mol)]	Número de Quelantes/AcM
649,9	DTPA 10	154260	2260	3,5
649,9	DTPA 20	154850	2850	4,4

Os três métodos permitiram observar incremento no número de quelantes acoplados ao AcM, relacionado ao aumento da razão molar de conjugação. Ao comparar o número de quelantes obtidos em cada método, observa-se diferença significativa entre o espectrômetro de massas e os demais ensaios (tabela 7).

Tabela 7 – Análise comparativa entre o método MALDI/TOF com os demais ensaios descritos para calcular o número de quelantes acoplados ao cetuximabe.

Método	Número de DTPA acoplados ao AcM para cada razão molar		P valor (referência o método MALDI/TOF)
	1:10	1:20	
Método MALDI/TOF	3,5	4,4	Referência
Ensaio espectrofotométrico com complexo Arsenazo III	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,3	P=0,001 P=0,002
Método radioativo	2,0 ± 0,3	3,0 ± 0,4	P=0,004 P=0,002

Resultados expressos pelo p valor.

O processo de conjugação aplicado neste trabalho foi otimizado pelo tempo de purificação (redução de 50% quando comparado à literatura¹⁰⁷) e também pelo período de incubação (duas horas a 37°C). A redução no tempo de incubação não afetou no número de quelantes acoplados ao AcM, visto que os resultados obtidos foram similares aos descritos por Milenic *et al*¹⁴, para o mesmo método de análise (ensaio espectrofotométrico com complexo Arsenazo III), em que a amostra foi incubada por quatro horas.

5.4.3 Análise da estabilidade do imunoc conjugado por CLAE

Os resultados do estudo de estabilidade dos imunoc conjugados (1:10 e 1:20) armazenados à -20°C, por até seis meses, estão apresentados nas figuras 21 e 22.

Figura 21 – Perfil cromatográfico do imunoc conjugado, na razão molar 1:10, conservado em frações de 0,1 mL, a -20 °C por período de 7 dias (A) 3 meses (B) e 6 meses (C).

Figura 22 – Perfil cromatográfico do imunoc conjugado, na razão molar 1:20, conservado em frações de 0,1 mL, à – 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).

Demonstra-se, com a figura 23, o percentual de imunoconjugado íntegro, obtido por análise em CLAE, das amostras de cetuximabe:DTPA, nas diferentes razões molares, armazenadas entre 2 °C e 8 °C e a -20 °C, por até 180 dias.

Figura 23– Estudo de estabilidade das amostras de imunoconjugados, em diferentes razões molares: 1:10 (A) e 1:20 (B), armazenadas entre 2 °C e 8 °C e a -20 °C.

Durante o período analisado, as amostras permaneceram com percentual do pico correspondente ao imunoc conjugado íntegro superior a 98% ($m=98,7\%$; $DP=0,9$; $N=36$), quando armazenadas a -20°C .

O período de estabilidade do imunoc conjugado foi superior ao descrito por Reilly *et al*¹⁷, cujo prazo de validade foi de 4 meses, considerando as mesmas condições de armazenamento (-20°C).

Na temperatura entre 2°C e 8°C observa-se redução no percentual do imunoc conjugado íntegro, porém, manteve-se superior a 90% em ambas as razões molares ($1:10 - 91,68 \pm 2,29\%$ e $1:20 - 93,3 \pm 2,26$). Esses resultados foram compatíveis aos relatados por Lam *et al*¹⁰², que obtiveram um imunoc conjugado pertuzumabe-DTPA com estabilidade ($>90\%$) por até quatro meses quando armazenados sob refrigeração.

A análise da estabilidade do imunoc conjugado é imprescindível para determinar o prazo de validade, frente às condições de armazenamento. Considerando as múltiplas etapas e o tempo considerável envolvidos no processo de conjugação e purificação, é importante manter imunoc conjugados purificados, prontos para serem utilizados nos procedimentos de radiomarcção, a fim de agilizar a rotina de produção dos radiofármacos.

Os imunoc conjugados cetuximabe-DTPA produzidos nas duas razões molares apresentaram estabilidade frente ao armazenamento, especialmente quando armazenados à -20°C , tal característica é fundamental para estabelecer uma rotina de produção.

5.4.4 Análise da pureza radioquímica

Isótopos trivalentes metálicos, tais como ^{111}In , ^{90}Y ou ^{177}Lu normalmente não formam interações fortes diretas com estruturas proteicas, porém, geram complexos altamente estáveis com os agentes quelantes¹⁰⁸. A abordagem para a marcação da biomolécula com um metal envolve, primeiramente, a conjugação do agente quelante adequado à proteína seguido da formação de um complexo entre o metal e a molécula conjugada¹⁰⁷.

Nesse sentido, a radiomarcção de anticorpos conjugados à quelantes bifuncionais com metais trivalentes como ^{111}In pode ser obtida por incubação prolongada do imunoc conjugado com solução de metal radioativo à temperatura ambiente (já que as proteínas sofrem desnaturação quando submetidas a altas temperaturas por longos intervalos de tempo). Entretanto, a exposição prolongada de um anticorpo à solução concentrada de radioisótopo pode resultar em radiólise significativa da proteína. Sendo assim, a incorporação rápida e eficaz do metal radioativo ao imunoc conjugado é desejável⁶³.

O processo de radiomarcção aplicado neste estudo foi adaptado da literatura, baseando-se nos trabalhos desenvolvidos por Massicano (2016)¹⁰⁵, que avaliou três diferentes parâmetros de radiomarcção: tempo, temperatura e pH. Segundo a autora, um pH ácido, à temperatura de 43°C e tempo de reação de uma hora foram as melhores condições para a radiomarcção do AcM conjugado com DOTA¹⁰⁵. Esses parâmetros foram ajustados ao quelante DTPA e ao radioisótopo ¹¹¹In, considerando os dados publicados por Reilly *et al*¹⁷ e Cooper *et al*¹⁰⁷. Assim, para o processo de marcação do cetuximabe-DTPA purificado com ¹¹¹InCl₃ adotou-se, no presente estudo, um tempo de reação de 60 minutos à 42°C e pH 6,5, sob agitação leve.

Um miligrama de anticorpo conjugado nas razões molares (1:10; 1:20) foi radiomarcado com 37 MBq (1 mCi) de ¹¹¹In. A pureza radioquímica foi satisfatória (> 90%) para ambas razões molares (figura 24), no entanto, apesar de superior na razão molar 1:20 ($95,83 \pm 2,26\%$), essa diferença não foi significativa ($P=0,33$).

Figura 24 – Porcentagem de pureza radioquímica do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, 37 MBq/mg, nas razões molares 1:10 e 1:20. Resultados expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

Figura 25 – Perfil de CLAE dos imunoconjugados em diferentes razões molares, 1:10 (A) e 1:20 (B) e dos respectivos radioimunoconjugados, 37 MBq/mg, (C) pureza radioquímica superior a 93% e (D) pureza radioquímica > 98%.

Cromatografia por exclusão molecular em um sistema Agilent equipado com detector UV 190 – 300nm, coluna de exclusão molecular, detector de radiação gama (Raytest); fase móvel tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 por 15 minutos, a um fluxo de mL/minuto.

Alguns estudos descrevem uma etapa adicional ao processo de radiomarcção, que seria a purificação do radioimunoconjugado em coluna PD-10, visando aumentar o percentual de pureza radioquímica^{14,63,95,108}. Esse procedimento, além de reduzir o rendimento médio, pode contribuir para o aumento de exposição à radiação do operador. As condições de marcação empregadas no presente trabalho possibilitaram obter pureza radioquímica elevada, sem a necessidade de purificação pós-marcação, conforme mostram os perfis de CLAE dos radioimunoconjugados (figura 25).

5.4.5 Estudos *in vitro* com células FaDu

5.4.5.1 Ensaio de ligação específica

As razões molares 1:10 e 1:20 foram estudadas em ensaio de ligação específica do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In a células FaDu-P (Parental) e FaDu resistente (clone 10), FaDu-C10.

O cetuximabe-DTPA, produzido com excesso molar de quelante 10x e 20x, foi radiomarcado com ¹¹¹In, 259 MBq/mg, e aplicado no estudo de ligação celular. Essa atividade específica foi definida pelos estudos de radiomarcção, descritos no item 6.4.1. Os imunoconjugados obtidos em ambas razões molares demonstraram capacidade de ligação às células FaDu -P e observou-se aumento de ligação total (e específica) às células conforme o número de células aumentou (figura 26 – A e B), apresentando diferença significativa entre 0,25, 0,5 e 1,0 x 10⁶ células (P < 0,05).

Conforme descrito anteriormente, a manutenção da imunorreatividade é importante controle de qualidade de anticorpos radiomarcados. A perda de imunorreatividade pode ser causada pelo processo de conjugação, radiomarcção e radiólise durante o armazenamento do anticorpo radiomarcado⁶³. As frações imunorreativas foram determinadas para ambas razões molares (figura 27). Considerando-se que o anticorpo não conjugado possui imunorreatividade de 100%, foi possível observar que a imunorreatividade foi consideravelmente preservada para as razões 1:10 e 1:20, sendo de 90,6% e 93,1%, respectivamente.

Figura 26– Estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA- ^{111}In 259 MBq/mg, em células FaDu-P. (A) 1:10 (B) 1:20.

Figura 27- Determinação da fração imunorreativa do anticorpo conjugado em diferentes razões molares. Resultados expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

Uma análise comparativa foi realizada a fim de avaliar a influência da razão molar na ligação específica do cetuximabe-DTPA- ^{111}In (259 MBq/mg) às células FaDu-P (figura 28). Por meio da análise da atividade (cpm) de ligação específica por quantidade de células,

observou-se aumento na ligação específica do cetuximabe-DTPA- ^{111}In com o aumento do número de células FaDu-P, corroborando resultados apresentados pelo estudo anterior (figura 26).

Figura 28 – Análise comparativa da ligação específica (LE) do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , 259 MBq/mg, à diferentes concentrações de células FaDu-P.

A atividade presente nas diversas concentrações celulares, para razões molares 1:10 e 1:20 (AcM:Quelante), foi mensurada em contagens por minuto (cpm). Resultados expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

Considerando as diferentes razões molares descritas no estudo, para a razão molar 1:20 (AcM:quelante DTPA) observa-se uma maior atividade de ligação específica (LE), em 10×10^5 células, quando comparada a taxa de LE para razão molar de 1:10 (figura 28), reportando diferença significativa ($P < 0,005$). Esses resultados sugerem que a razão molar 1:20 seria aquela de escolha para continuidade dos estudos de marcação e estudos *in vivo*.

5.4.5.2 Estudo de Internalização

A internalização do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , 259 MBq/mg, foi analisada em $0,3 \times 10^6$ de células FaDu-P e FaDu-C10 aderentes. Essa atividade específica foi selecionada conforme resultados descritos no item 6.4.1. A análise comparativa do percentual de ligação específica do cetuximabe-DTPA- ^{111}In em células FaDu-P indicou maior taxa de ligação para o radiofármaco conjugado na razão molar 1:20, com diferença significativa, sendo $P < 0,005$ (figura 29). Por este ensaio, observa-se inexpressivo percentual de ligação específica do radioimunoconjugado às células FaDu-C10, corroborando o modelo de resistência conferido à linhagem.

Figura 29 – Ensaio de ligação específica do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , nas razões molares 1:10 e 1:20, às células FaDu-P (3×10^5) e FaDu-C10 (3×10^5).

Resultados expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

O estudo de internalização do cetuximabe-DTPA- ^{111}In demonstrou que o maior percentual da ligação específica do radiofármaco às células FaDu-P corresponde à fração da ligação de superfície ($86,09 \pm 0,72$ %). Por sua vez, a internalização do radiofármaco, conjugado na razão molar de 1:20, foi de $18,00 \pm 1,22$ % (figura 30). Esse percentual foi superior ao apresentado pelo radioimunoconjugado na razão AcM:quelante 1:10 ($14,87 \pm 1,02$ %), indicando diferença significativa no percentual de internalização do cetuximabe-DTPA- ^{111}In conjugado nas diferentes razões molares.

O resultado referente ao percentual de internalização do radioimunoconjugado em células FaDu-C10 foi em congruência ao esperado, e conforme o perfil de ligação de superfície, indicando inexpressiva taxa de internalização do radiofármaco, o que validou a resistência ao cetuximabe induzida à linhagem celular.

Figura 30 – Ensaio de internalização do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, nas razões AcM:quelante 1:10 e 1:20, às células FaDu-P (3×10^5) e FaDu-C10 (3×10^5).

Resultados expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

O processo de internalização do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às células FaDu é lento. Os resultados de ligação à superfície e internalização foram superiores aos descritos na literatura⁴. Segundo trabalho de Hoebe *et al*⁴, após duas horas de incubação (no presente estudo foi utilizado o período de uma hora), o percentual de ligação do radioimunoconjugado à superfície celular foi de 64,2 %, já o de internalização foi 15,8 %. Essa diferença pode ser decorrente da razão molar adotada pelo autor, que utilizou excesso molar de quelante de 50 vezes.

Os estudos *in vitro* descritos neste trabalho favoreceram na definição da razão molar, 1:20, que foi referência para as análises subsequentes.

5.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos na FASE I deste estudo conclui-se:

- O cetuximabe exibiu perfil de integridade satisfatório, favorecendo o desenvolvimento do imunoconjugado;
- O processo de conjugação foi otimizado, reduzindo em mais de 50% o tempo dispendido para o preparo do imunoconjugado;
- O tempo de retenção em CLAE do AcM conjugado foi reduzido, comparando-se ao TR do AcM não conjugado, corroborando o aumento de massa decorrente da incorporação de quelantes ao cetuximabe;
- O método de conjugação seguido de purificação apresentou reprodutibilidade, resultando em recuperação proteica alta quando comparada com resultados de literatura;
- Na razão molar 1:10, aproximadamente, três quelantes foram acoplados ao AcM; já na razão AcM:DTPA 1:20, cerca de quatro quelantes foram incorporados ao cetuximabe;
- Os imunoconjugados apresentaram estabilidade por um período estudado de seis meses, quando conservados a -20°C;
- A melhor razão molar AcM:DTPA foi 1:20, pois apresentou melhores resultados de pureza radioquímica e ligação específica às células FaDu com manutenção da imunorreatividade.

6 CETUXIMABE-DTPA-¹¹¹IN: ESTUDOS DE RADIOMARCAÇÃO

Neste capítulo, estão descritos os estudos de análise do radioimunoconjugado com ¹¹¹In, com os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à FASE II deste trabalho.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta fase foram:

- Analisar a estabilidade do radioimunoconjugado de modo a obter alta pureza radioquímica;
- Definir a melhor atividade específica para o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In;
- Analisar a estabilidade do radioimunoconjugado em soro humano;
- Determinar a porcentagem de ligação do radioimunoconjugado às proteínas plasmáticas.

6.2 MATERIAIS

6.2.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia, no IPEN. Para o preparo das células utilizou-se, além do laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia, o Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital de Câncer de Barretos.

6.2.2 Reagentes

- Cetuximabe-DTPA, 1:20;
- Cloreto de índio – 111 (AMY Polatom/Polônia);
- Água purificada – Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- PBS (Tampão Fosfato Salino) (Sigma Aldrich, EUA);
- Azida sódica (Merck, Alemanha);
- Acetato de amônio PA (Merck, Alemanha);

- EDTA (Merck, Alemanha);
- Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- Etanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio monobásico hidratado (Merck, Alemanha);

6.2.3 Implementos

- Coluna BioSep SEC-S 3000 para cromatografia líquida de alta eficiência – 300 x 7,8 mm, 5 µm (Phenomenex, EUA);
- Suporte cromatográfico TLC sílica gel e ITLC (Merck, Alemanha);

6.2.4 Equipamentos e sistemas

- Agitador/aquecedor Thermomixer Comfort 1,5mL (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- Centrífuga refrigerada Mikro 220 (Hettich, Alemanha);
- Cartucho de pré-coluna SEC-S 3000 – 4 x 3,0 mm (Phenomenex, EUA);
- GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., USA);
- Medidor de pH (Mettler Toledo, EUA);
- Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 cobra II (Packard-Camberra, EUA);
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência – CLAE, modelo 1260 Infinity (Agilent Technologies, EUA);
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo Eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

6.2.5 Células tumorais

Conforme descrito no item 5.2.5 (pág. 64).

6.3 MÉTODO

Para o desenvolvimento de um radioimunoconjugado é fundamental avaliar a influência da atividade do radionuclídeo na estabilidade e no percentual de ligação do agente de IM às células tumorais. Esse processo de radiomarcção foi baseado em referências

bibliográficas, além de experiências prévias e interação com outros grupos de estudo do exterior, como o projeto ARCAL (*Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe*), da Agência Internacional de Energia Atômica.

6.3.1 Fluxograma da metodologia FASE II

Os procedimentos adotados na FASE II deste estudo para obtenção do radioimunoconjugado com índio-111 estão representados na figura 31.

Figura 31 – Fluxograma dos métodos adotados no desenvolvimento do radioimunoconjugado (FASE II).

6.3.2 Desenvolvimento do radioimunoconjugado

6.3.2.1 Análise da atividade específica

A massa de 1mg de cetuximabe-DTPA purificado, na concentração de 5 mg/mL e razão molar de 1:20, foi radiomarcada com 8 atividades diferentes de $^{111}\text{InCl}_3$: 37 – 740 MBq (1 – 20 mCi), a fim de avaliar a melhor atividade específica e acompanhar a estabilidade do radiomarcado. As condições de marcação foram descritas no item 5.3.5.1.

A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada. As marcações foram armazenadas sob refrigeração (2°C a 8°C) por 48 horas. Uma alíquota foi recolhida em intervalos de tempo específicos e submetida a controle de pureza radioquímica por CCD, como descrito no item 5.3.5.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.2.2 Influência da atividade específica na ligação às células FaDu *in vitro*

A massa de 1 mg de cetuximabe-DTPA (1:20) foi radiomarcada em cinco diferentes atividades específicas: 111 MBq (3 mCi); 185 MBq (5 mCi); 222 MBq (6 mCi); 259 MBq (7 mCi); 314 MBq (8 mCi), a fim de comparar a capacidade de ligação dos radioimunoconjugados às células FaDu-P.

O estudo de ligação do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , em diferentes atividades específicas, foi realizado conforme descrito no item 5.3.5.3.1 (pág. 73), porém, fixando o número de células FaDu-P em $1,5 \times 10^6$.

6.3.2.3 Análise do coeficiente de partição

O coeficiente de partição de determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio da substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema¹³³.

O coeficiente de partição do radioimunoconjugado foi determinado conforme descrito por Durkan *et al*¹³⁴. Adicionou-se, em triplicata, 40 μCi de cetuximabe-DTPA- ^{111}In a um tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de n-octanol (fase orgânica) e 0,5 mL de solução fosfato-salina pH 7,4 (PBS) (fase aquosa), pré-saturados por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora à temperatura ambiente e, após a separação das fases aquosa e orgânica, coletou-se 10 μL da fase aquosa e 10 μL da fase orgânica para contagem em contador gama 2480

Wizard (PerkinElmer). O coeficiente de partição (log P) foi determinado pela equação (EQ. 6.1):

$$\log P = \log_{10} \frac{\text{cpm na fase orgânica}}{\text{pm na fase aquosa}} \quad (\text{EQ. 6.1})$$

6.3.2.4 *Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano*

Para obtenção do soro humano, foram coletados 10 mililitros de sangue humano de doador sadio e, em seguida, centrifugados a 1000 g por 10 minutos para separação do plasma.

O AcM radiomarcado (37 MBq), com atividade específica de 259 MBq/mg (adotada conforme resultados do item 6.4.1) foi adicionado a 1 mililitro de soro em triplicata. Essa mistura foi incubada à 37°C e 350 rpm por 72 horas. Para cada intervalo de tempo (1, 24, 48 e 72 horas), retirou-se uma amostra das misturas (200 µL); adicionou-se etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas plasmáticas e centrifugou-se a 9.720 g (10.000 rpm). Uma alíquota do sobrenadante foi segregada para análise por CCD (item 5.3.5.2.1) ⁶³.

6.3.2.5 *Ligação do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às proteínas plasmáticas*

Para obtenção do soro humano, foram coletados dez mililitros de sangue humano de doador sadio e, em seguida, centrifugados a 3.000rpm por dez minutos para separação do plasma.

O experimento foi realizado em triplicata, no qual 37 MBq do radioimunoconjugado, 259 MBq/mg (atividade específica definida no item 6.4.1.), foi adicionado à 1mL de soro humano. A mistura foi incubada a 37°C e 350 rpm por 72 horas. Após intervalos de tempo determinados (1, 24, 48 e 72 horas), foi retirada uma alíquota das misturas (200 µL) e adicionou-se etanol (1:1 v/v) para a precipitação de proteínas. A amostra foi centrifugada a 9720 g (10000 rpm) e a radioatividade do precipitado e do sobrenadante foi determinada em contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. O percentual de ligação às proteínas plasmáticas foi calculado dividindo-se a atividade (cpm) do precipitado pelo somatório das atividades no precipitado, no sobrenadante e na solução de etanol utilizada para lavagem do *pellet* ⁶³.

6.3.3 *Estudos in vitro – modelo de resistência*

Os estudos de ligação específica, item 5.3.5.3.1, e internalização, item 5.3.5.3.3, também foram aplicados à linhagem celular resistente (FaDu-C10). Conforme relatado anteriormente, essas células FaDu foram enviadas pelo Hospital do Câncer de Barretos, e

essa linhagem resistente foi desenvolvida por exposição a longo período de doses incrementais de cetuximabe, intervaladas por períodos de recuperação para repovoamento da cultura celular.

6.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., EUA), e com base no item 5.3.6.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO FASE II

6.4.1 Determinação da melhor atividade específica

A atividade específica é um “fator chave” para seleção de um agente de imagem e para obter-se um ensaio de performance ótimo para determinado radioimunoconjugado¹⁰⁸. Para um anticorpo radiomarcado, pode ser definida como a relação entre a atividade do radionuclídeo pela massa do imunoconjugado. De forma geral, radiofármacos com baixa atividade específica têm baixo valor em termos de aplicação clínica, uma vez que as moléculas não radiomarcadas competem com as radiomarcadas pela ligação *in vivo* com o receptor, bem como aumenta a toxicidade devido aos efeitos fisiológicos dessa ligação. Em contraste, a atividade específica muito elevada pode promover a desnaturação da proteína, em decorrência da radiólise³⁶.

Revela-se, com a figura 32, a porcentagem de pureza radioquímica (% PR) para diferentes atividades específicas do radioimunoconjugado, obtidas por análise de CCD das alíquotas retiradas imediatamente após a marcação, e nos períodos de 24 e 48 horas pós-marcação (armazenamento de 2°C a 8°C).

A média da pureza radioquímica imediata foi ≥ 90 % para as atividades específicas 37 MBq/mg ($96,1 \pm 3,28$ %); 74 MBq/mg ($95,01 \pm 1,89$ %); 111 MBq/mg ($95,5 \pm 3,25$ %); 185 MBq/mg ($96,9 \pm 2,30$ %); 222 MBq/mg ($95,3 \pm 2,25$ %); 259 MBq/mg ($97,4 \pm 2,12$ %); 314 MBq/mg ($90,3 \pm 2,82$). Não houve diferença significativa entre as atividades específicas, apenas com relação a 314 MBq/mg e 740 MBq/mg ($P < 0,05$). Quando se compara a pureza radioquímica obtida em função do tempo, para as atividades específicas com percentual próximo a 95%, não se observa diferença significativa ($P > 0,05$), demonstrando a estabilidade dos radioimunoconjugados por um período de 48 horas, fato

que viabilizaria a comercialização da molécula marcada, mesmo para regiões mais distantes do centro de produção.

Figura 32 – Estudo de estabilidade do radioimunoconjugado (48 horas) por meio de análise da pureza radioquímica do cetuximabe-DTPA (1:20) radiomarcado com índio-111, com diferentes atividades específicas (MBq/mg).

Resultados obtidos por CCD e expressos em média ($n \geq 3$).

O estudo de ligação do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , em diferentes atividades específicas, foi realizado em $1,5 \times 10^6$ de células Fadu-P (figura 33). O percentual de ligação específica foi superior a $90 \pm 3,8\%$ da ligação total, para todas as atividades específicas analisadas. O maior percentual de ligação total foi obtido para atividade específica de 259 MBq/mg ($19,88 \pm 0,12\%$).

Esse resultado corrobora ao descrito na avaliação da pureza radioquímica e estudos de estabilidade do radiomarcado. Sendo assim, a atividade específica 259 MBq/mg (7 mCi/mg) foi adotada como referência por apresentar os melhores rendimentos de pureza radioquímica e por obter superior percentual de ligação às células FaDu-P dentre aquelas atividades específicas selecionadas para o estudo *in vitro*.

No estudo de Shin *et al*⁷⁹, a atividade específica utilizada foi superior à relatada neste estudo (370 MBq/mg), no entanto, o percentual de pureza radioquímica reportado foi $> 85\%$.

Figura 33 – Estudo da influência da atividade específica na ligação do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às células FaDu-P.

Alguns trabalhos adotaram atividades específicas maiores, próximas de 450 MBq/mg, no entanto, o processo de radiomarcção contou com a etapa adicional de purificação em coluna PD-10, apresentando como resultado pureza radioquímica inferior a 90%^{14,63,108}. Hoebe *et al*⁴ descreveram atividade específica de 200 MBq/mg como referência para estudos *in vivo*. Já Cooper *et al*¹⁰⁶ indicaram a faixa de atividade/mg do imunocorrelato de 40 MBq a 400 MBq. Sendo assim, os resultados de análise da atividade específica representados no presente estudo demonstraram alto percentual de pureza radioquímica e encontram-se em conformidade com os dados de literatura.

6.4.2 Análise do coeficiente de partição

O valor do coeficiente de partição ($\log P$) é parâmetro frequentemente usado como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos. O $\log P$ de um composto pode ser interpretado como sendo a somatória de dois termos: um relacionado a volume (estérico) e o outro com interações intermoleculares (interações dipolo-dipolo e ligações por hidrogênio). A investigação da natureza e grandeza desses termos pode contribuir para a compreensão do comportamento farmacocinético de drogas candidatas a fármacos¹²¹.

Para avaliação dos resultados, caso o valor de $\log P$ seja menor que 0, a tendência do produto é de se dissolver preferencialmente na fase aquosa. Quanto menor $\log P$, mais hidrofílico é o produto. Por outro lado, se $\log P > 0$, a afinidade do composto é maior pela fase orgânica (mais hidrofóbica)¹²¹.

O anticorpo monoclonal é uma substância apolar⁵, porém, a interação de grupos quelante interfere na polaridade do anticorpo, reduzindo a lipofilicidade do cetuximabe¹²⁰.

O valor de log P foi de $-3,04 \pm 0,09$ confirmando a hidrofilicidade do radioimunoconjugado.

6.4.3 Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano

O estudo de estabilidade em soro humano (figura 34) demonstrou que o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In não ligado às proteínas plasmáticas, sofreu degradação, provavelmente relacionada às enzimas plasmáticas, e, após período de 48 horas de incubação, aproximadamente 62% do radioimunoconjugado permaneceu íntegro.

Esse resultado foi inferior aos dados descritos em literatura^{102, 108}, que descreveu estabilidade superior, com 88 % do anticorpo radiomarcado íntegro para o mesmo intervalo de tempo.

Figura 34 - Análise da estabilidade *in vitro* do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (259 MBq/mg) em soro humano (com precipitação de proteínas plasmáticas).

Resultados expressos em média $\pm$ DP (N=4).

No entanto, o método adotado pelos autores não preconiza a etapa de precipitação prévia das proteínas, fato relevante para estudo com anticorpos, visto que, estas biomoléculas se ligam em grande proporção às proteínas do plasma¹⁰⁹. Dessa forma, essa particularidade de procedimentos pode justificar a diferença dos resultados apresentados.

6.4.4 Ligação do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às proteínas plasmáticas

Após ser absorvido ou injetado na corrente sanguínea, o fármaco pode ligar-se, em diferentes proporções, às proteínas plasmáticas. Essa ligação representa a afinidade do

fármaco pelas proteínas do plasma. A fração do fármaco não ligado atravessa as membranas tornando-se disponível para interações com receptores, exercendo o efeito farmacológico esperado¹²⁷.

A interação do fármaco com a proteína plasmática é processo rapidamente reversível e, à medida que o fármaco não ligado difunde-se dos capilares para os tecidos, mais fármaco ligado dissocia-se da proteína até que seja alcançado o equilíbrio, ou seja, concentrações relativamente constantes de forma ligada e não ligada¹²⁷.

O complexo fármaco-proteína age como reservatório temporário na corrente sanguínea retardando a chegada de fármacos aos órgãos alvo e sítios de eliminação. Sendo assim, a ligação a proteínas influencia na meia-vida biológica do fármaco¹²⁷. Da mesma maneira, a ligação às proteínas do plasma afeta diretamente a biodistribuição dos radiofármacos aos tecidos de interesse⁵. Portanto, avaliar o percentual dessa ligação em um radioimunoconjugado é parâmetro importante para predizer ou prever o comportamento *in vivo*.

Os resultados de ligação do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às proteínas plasmáticas estão representados na figura 35.

O estudo demonstrou alta fração do radioimunoconjugado ligado às proteínas séricas, o que pode contribuir para o lento clareamento sanguíneo *in vivo*. Além disso, evidencia-se o aumento significativo do percentual de ligação às proteínas plasmáticas em função do tempo, após 24 horas ($P=0,005$) e 48 horas de incubação ($P<0,05$).

Segundo Wang *et al*⁵, biomoléculas de alto peso molecular, como os anticorpos monoclonais, exibem elevada taxa de ligação às proteínas séricas, baixo volume de distribuição, lenta cinética de eliminação, além de longa meia-vida plasmática.

Figura 35 - Análise da ligação *in vitro* do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (259 MBq/mg) às proteínas plasmáticas.

Resultados expressos em média $\pm$ DP (N=4).

6.4.5 Estudos *in vitro* – modelo de resistência

Conforme apresentado anteriormente, uma parte deste estudo foi dedicada aos estudos de ligação do cetuximabe radiomarcado a receptores de uma linhagem celular modificada, FaDu-C10 (que foi conferida resistência ao cetuximabe). Essa linhagem celular foi desenvolvida pelo Centro de Oncologia do Hospital de Câncer de Barretos – SP.

Os resultados do estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, 259 MBq/mg, em células FaDu-C10, nas diferentes razões molares, 1:10 e 1:20, são demonstrados na figura 36.

Figura 36 – Estudo de ligação total, específica e não específica do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, 259 MBq/mg, em células FaDu-C10, em diferentes razões molares, 1:10 e 1:20.

Resultados expressos em média $\pm$ EPM (n $\geq$ 3).

Os estudos de internalização do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, 259 MBq/mg, também foram analisados em $0,3 \times 10^6$ de FaDu-C10 aderentes (figura 30). Por análises *in vitro*, observou-se inexpressivo percentual de ligação e internalização do radioimunoconjugado às células FaDu-C10, corroborando a elucidação do modelo de resistência conferido à linhagem.

6.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos na FASE II deste estudo conclui-se:

- O procedimento de radiomarcção foi eficiente, resultando em pureza radioquímica superior a 95%, sem necessidade de purificação pós-marcção;
- A atividade específica 259 MBq/mg (7 mCi/mg) foi adotada como referência pois apresentou os melhores rendimentos de pureza radioquímica e demonstrou estabilidade por 48 horas pós marcação, o que viabilizaria a logística de distribuição desse radioimunoconjugado;
- Nos estudos de influência da atividade específica na ligação do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In às células FaDu-P, o maior percentual de ligação total foi obtido para atividade específica de 259 MBq/mg ($19,88 \pm 0,12\%$).
- O cetuximabe-DTPA-¹¹¹In revelou boa estabilidade em soro, por 24 horas, e alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas;
- As análises *in vitro* em células FaDu-C10 demonstraram inexpressivo percentual de ligação e internalização do radioimunoconjugado, corroborando a elucidação do modelo de resistência conferido a esta linhagem.

7 CETUXIMABE-DTPA-¹¹¹IN: ESTUDOS *IN VIVO*

O presente capítulo aborda os estudos *in vivo* com cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, apresentando os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à FASE III deste trabalho.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A seguir estão descritos os objetivos específicos referentes a FASE III:

- Desenvolver um modelo tumoral de carcinoma de células escamosas pela implantação de células FaDu;
- Caracterizar o perfil farmacocinético e a biodistribuição do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In em camundongos BALB/c;
- Realizar estudos de corpo inteiro em camundongos BALB/c, através do MicroSPECT/TC;
- Avaliar a biodistribuição do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In em camundongos com tumor;
- Proceder com os estudos de corpo Inteiro em camundongos SCID com tumor, através do MicroSPECT/TC;
- Avaliar o modelo de resistência *in vivo*, por meio de estudo comparativo entre as linhagens celulares.

7.2 MATERIAIS

7.2.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia e no Biotério, ambos no IPEN. Para o preparo das células, utilizou-se, além do laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia do IPEN, o Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital de Câncer de Barretos.

7.2.2 Reagentes

- Cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (IPEN, Brasil);
- Água purificada – Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);

- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- Etanol (Merck, Alemanha);
- Anestésico para uso animal cloridrato de quetamina – Dopalen (Ceva, Brasil);
- Relaxante muscular para uso animal cloridrato de xilasina – Ansedan (Vetbrands, Brasil);
- Isoflurano (Forane – Abbott).

7.2.3 Implementos

- Seringa de insulina com agulha de 12,7 x 0,33 mm (BD, EUA);
- Kit para biodistribuição: tesouras, pinças;
- Tubos de vidro;
- Tubos capilares com heparina (Biosystems, Brasil)
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, pipetas, tubos cônicos tipo Falcon e placas de cultura.

7.2.4 Equipamentos

- GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- Software para processamento das imagens: pMOD, AMIDE e Volview
- Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 cobra II (Packard-Camberra, EUA);
- microSPECT/TC Albira (Bruker, EUA);
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

7.2.5 Células tumorais

Conforme descrito no item 5.2.5 (pág. 64).

7.2.6 Animais

As linhagens de camundongos BALB/c (isogênicos) e SCID (camundongos homozigotos para o gene autossômico recessivo mutante “scid”, que não apresentam linfócitos maduros e funcionais¹²⁸) foram utilizadas nesta fase do trabalho.

Esses animais foram fornecidos pelo biotério do IPEN – CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN (Protocolo nº122/13 CEUA/IPEN) como consta no Anexo 1 e 2, e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Os animais foram mantidos no biotério nas seguintes condições de criação e estas condições foram reproduzidas quando os animais estiveram em experimentação:

- Temperatura ambiente: $22 \pm 2^\circ \text{C}$;
- Iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- Ração e água *ad libitum*.

7.3 MÉTODO

7.3.1 Esquema dos estudos abordados na FASE III

Revela-se, com a figura 37, uma representação esquemática dos estudos *in vivo* adotados na FASE III deste estudo.

Figura 37 - Representação esquemática dos estudos *in vivo* abordados na FASE III.

7.3.2 Estudo de corpo inteiro em camundongos BALB/c

Para o estudo de corpo inteiro adotou-se o método de imagem não invasivo em equipamento MicroSPECT/TC Albira. Injetou-se, por via endovenosa caudal, uma dose de 55,5 MBq em 25,3 µL (0,21 mg do radioimunoconjugado) diluída em 100 µL de solução salina 0,9 %. Após a administração, os animais (N = 3 animais por tempo) foram posicionados sob o SPECT para determinação das contagens de eventos radioativos durante 90 minutos, nos tempos de 24, 72 horas, 5 e 7 dias após a injeção do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (PR ≥ 95%).

Durante o período em equipamento, os camundongos permaneceram em indução anestésica com isoflurano inalatório a 5% em oxigênio.

7.3.3 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c

Para os estudos de biodistribuição adotou-se o método invasivo. Uma dose de 55,5 MBq em 25,3 µL (0,21 mg do radioimunoconjugado) diluída em 100 µL de solução salina 0,9% foi injetada por via endovenosa caudal. Os camundongos foram eutanasiados (com solução de quetamina e xilasina), por deslocamento cervical, após 24, 72 horas, 5 e 7 dias, para o estudo de atividade captada por grama de tecido (% AI/g) (N = 4 animais por tempo). Após cada intervalo de tempo de eutanásia, os principais órgãos foram cuidadosamente retirados e pesados, então, a radioatividade presente em cada órgão foi mensurada em contador gama tipo poço.

As porcentagens de atividade injetada por grama de órgão (% AI/g, EQ. 7.1) foram calculadas, considerando a média das contagens do padrão da atividade administrada (triplicata).

$$\% \frac{AI}{g} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{Peso órgão (g)} \times \text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{EQ.7.1})$$

7.3.4 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c

Uma dose de 55,5 MBq em 25,3 µL (0,21 mg do radioimunoconjugado) diluída em 100 µL de solução salina 0,9 % foi injetada por via endovenosa caudal. Após 0, 3, 24, 48, 72 horas, 5 e 7 dias, os animais (N = 4 animais por tempo) foram anestesiados (com solução de quetamina e xilasina) e coletaram-se 60 µL de sangue pelo plexo orbital dos camundongos utilizando um tubo capilar heparinizado. A radioatividade do sangue foi

analisada em contador gama tipo poço e os dados foram ajustados no programa GraphPad Prism 5.00[®], para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. Os parâmetros farmacocinéticos de meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), constante de distribuição (α) e constante de eliminação (β), bem como a área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo, foram calculados utilizando o mesmo programa. A depuração (CL) foi calculada pela equação:

$$CL = \frac{\text{Dose Injetada (cpm)}}{\text{Área sob a curva}} \quad (\text{EQ.7.2})$$

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

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \times \text{peso do animal (Kg)} \quad (\text{EQ.7.3})$$

Para o cálculo da meia-vida efetiva, o tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação foi considerado como tempo de meia-vida biológica e a equação é apresentada a seguir:

$$t_{1/2} = \frac{\frac{1}{2} \text{ biológica} \times t_{1/2} \text{ física}}{\frac{1}{2} \text{ biológica} + t_{1/2} \text{ física}} \quad (\text{EQ.7.4})$$

7.3.5 Desenvolvimento do Modelo Xenográfico

O modelo xenográfico foi desenvolvido pela inoculação de 2×10^6 e 3×10^6 células de tumor humano de carcinoma de células escamosas (FaDu-P) no tecido subcutâneo de cada camundongo SCID fêmeas (N=2), de quatro a oito semanas de idade e 15 g a 30 g de peso, nas áreas dorso laterais do flanco esquerdo.

As células foram preparadas em 100 μL de tampão PBS. Os animais foram observados periodicamente a fim de avaliar o crescimento de massa sólida. Após a constatação de crescimento tumoral, os camundongos foram eutanasiados e a massa sólida foi removida e encaminhada para o Centro Veterinário de Anatomia Patológica para análise histopatológica.

7.3.6 Estudo de corpo inteiro em camundongos SCID

O estudo de corpo inteiro em camundongos SCID foi realizado para duas linhagens celulares: FaDu Parental (P) e FaDu Resistente (C10). O modelo tumoral foi desenvolvido conforme item 7.3.5, inoculando-se 3×10^6 células FaDu- P, por via subcutânea, no flanco esquerdo e FaDu-C10 resistente no flanco direito dos camundongos SCID.

Para o estudo de corpo inteiro, adotou-se o método de imagem não invasivo em equipamento microSPECT/TC Albira. Injetou-se, por via endovenosa caudal, uma dose de 55,5 MBq diluída em 100 μ L de solução salina 0,9 %. Após a administração, os animais foram posicionados sob o tomógrafo para determinação das contagens de eventos radioativos durante 90 minutos, nos tempos de 24, 72 horas, 5 e 7 dias após a injeção do cetuximabe-DTPA- ^{111}In (PR $\geq$ 95%).

Durante o período em equipamento, os camundongos permaneceram em indução anestésica com isoflurano inalatório a 5% em oxigênio.

7.3.7 Estudo de biodistribuição em camundongos SCID

Uma dose de 55,5 MBq diluída em 100 μ L de solução salina 0,9 % foi injetada por via endovenosa caudal. Os camundongos (N= 4 camundongos por tempo) foram eutanasiados (com solução de quetamina e xilasina), por deslocamento cervical, após 3, 24, 72 horas, 5 e 7 dias, para o estudo de atividade captada por grama de tecido (% AI/g). Após cada intervalo de tempo de eutanásia, os principais órgãos e os tumores foram cuidadosamente retirados e pesados e, então, a radioatividade presente em cada órgão foi mensurada em contador gama tipo poço. Os cálculos foram realizados conforme item 7.3.3.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 Estudo de corpo inteiro em camundongos BALB/c

As imagens dos camundongos BALB/c obtidas pelo microSPECT/TC, 24 horas (A) e 7 dias (B) após a administração do cetuximabe-DTPA- ^{111}In (259 MBq/mg; PR $\geq$ 95%) são apresentadas na figura 38 ¹²⁹.

Os resultados deste estudo foram comparados aos dados apresentados pelo Gene Atlas U133A, BioGPS, que descreve sobre a expressão do gene EGFR em tecidos saudáveis¹³⁰. O Gene Atlas U133A demonstrou que o fator de expressão do receptor de crescimento epidérmico é prevalente nas células epiteliais bronquiais (611,95), pulmão (358,65), fígado (507,60). As imagens obtidas em MicroSPECT/TC, da distribuição do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In indicam captação hepática e também na região dos pulmões.

Figura 38 – Estudo de Corpo inteiro realizado em MicroSPECT/TC, obtendo-se imagens dos camundongos BALB/c 24 horas (A) e 7 dias (B) após a administração do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (259 MBq/mg; PR ≥ 95%).

Tratando os dados de maneira qualitativa, observa-se redução no perfil de captação (SUV) ao comparar a atividade presente nos respectivos camundongos em função do tempo (24 horas e 7 dias). No entanto, conforme descrito anteriormente, o cetuximabe apresenta meia-vida biológica longa (63 a 230 horas), sendo assim, constatou-se captação ainda intensa, mesmo após o intervalo de sete dias, correlacionada ao lento clareamento sanguíneo do radioimunoconjugado⁵.

Esses dados foram comparados aos resultados obtidos pelo estudo de biodistribuição, descritos no item 7.4.2.

7.4.2 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c

Os resultados dos estudos de biodistribuição do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , 259 MBq/mg, em camundongos BALB/c podem ser visualizados na figura 39.

Figura 39 – Estudo de Biodistribuição do cetuximabe-DTPA- ^{111}In (55 MBq) em camundongos BALB/c em função do tempo após administração do radiofármaco (n=4).

Os AcMs são biomoléculas de alto peso molecular e apresentam uma lenta difusão através das células do endotélio vascular.⁵ Os mecanismos de eliminação de fármacos mais comuns são: (i) filtração, eliminando o fármaco pela urina; (ii) secreção, eliminando o fármaco pela bile e consequentemente pelas fezes e (iii) biotransformação por meio de metabolismo ou catabolismo¹⁰⁵.

A captação renal observada está relacionada à elevada captação no fígado, indicando que o radiofármaco sofre acentuado metabolismo hepático e posterior eliminação dos metabólitos pela urina. Isso porque os AcM íntegros não são filtrados com eficiência pelos glomérulos^{5, 79}.

A secreção pela bile é importante via de eliminação de IgA, mas não significativa para IgG¹⁰⁵, explicando assim a baixa captação do cetuximabe-DTPA- ^{111}In nos intestinos.

A eliminação do IgG ocorre, especialmente, por catabolismo intracelular seguido de endocitose mediada por receptor. Esse tipo de mecanismo pode ocorrer após a interação dos domínios Fab do anticorpo com os epítomos encontrados nas superfícies das células¹⁰⁵. Tal mecanismo explica a captação esplênica, pois, como o baço possui muitos linfócitos B, eles seriam responsáveis, em partes, pelo catabolismo do AcM.

O maior percentual AI/g ($62,5 \pm 2,5\%$) foi obtido no sangue após 24 horas. A atividade captada no fígado e pulmões foi considerável, resultando percentuais de $21,5 \pm 1,3\%$ e $19,3 \pm 0,8\%$, respectivamente (24 horas). Além do processo de metabolização, o fígado apresenta acentuada expressão do receptor de crescimento epidérmico. Esses resultados foram compatíveis aos apresentados pelo estudo de imagem.

Shih e autores⁷⁹ descreveram um estudo de biodistribuição comparativo entre cetuximabe-DTPA-¹¹¹In e DTPA-¹¹¹In e reportaram diferença significativa ($P < 0,05$) na captação óssea desses compostos 24 horas pós-injeção. O acúmulo de DTPA-¹¹¹In nesse órgão foi consideravelmente superior. Sendo assim, a captação óssea pode ser assumida como bom indicador da pureza radioquímica das marcações e da estabilidade *in vivo* dos radioimunoconjugados com índio-111. De acordo com a figura 39, constatou-se que a captação óssea foi baixa, evidenciando baixo percentual de ¹¹¹In livre (ou DTPA-¹¹¹In) presente na dose do radiofármaco administrado, corroborando os resultados de pureza radioquímica apresentados e a boa estabilidade *in vivo*.

O trabalho publicado por Milenic *et al*¹⁴, descreveu um estudo de biodistribuição em animais BALB/c, com cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, e revelou maior captação em fígado (9,3% AI/g) e pulmão (5,9% AI/g), 5 dias após a administração do radioimunoconjugado. Hoebe *et al*⁴ obtiveram conclusões semelhantes, validando os resultados apresentados neste estudo.

7.4.3 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c

O estudo farmacocinético é ferramenta importante para descrição dos processos de distribuição do composto no organismo. Processos como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção são descritos pelos parâmetros farmacocinéticos¹⁰⁵.

Apresenta-se, com a figura 40, a curva de concentração plasmática mensurada pela atividade (cpm/mL de sangue) *versus* tempo após a administração do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , que representa o clareamento sanguíneo do imunoc conjugado radiomarcado.

Figura 40 – Curva de clareamento sanguíneo do cetuximabe-DTPA- ^{111}In em camundongos BALB/c (N=4).

Para se obter estes parâmetros farmacocinéticos, é necessário construir uma curva de concentração plasmática *versus* tempo e aplicar à curva certos modelos matemáticos. Os modelos podem ser compartimentais ou não compartimentais e permitem a simulação dos processos de absorção, distribuição e eliminação de um fármaco¹²⁷.

Essa curva de clareamento sanguíneo foi utilizada para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos do cetuximabe-DTPA- ^{111}In , os quais são apresentados na tabela 8. Os parâmetros foram calculados após ajuste dos dados para um modelo de decaimento em duas exponenciais ou modelo bicompartimental.

O cetuximabe-DTPA- ^{111}In apresentou meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) de 1,71 horas e meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) de 65,83 horas (tabela 8).

A depuração (CL) de um fármaco do organismo descreve a eficiência do processo de eliminação, que é irreversível, e pode ser considerado como o parâmetro que relaciona sua velocidade de eliminação à concentração plasmática¹²⁷. O cetuximabe-DTPA- ^{111}In apresentou depuração lenta, o que influencia diretamente na $t_{1/2\beta}$.

Tabela 8 – Parâmetros farmacocinéticos do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In determinados em camundongos BALB/c (N=4).

Parâmetro Farmacocinético	Símbolo	Valor
Tempo de meia-vida da fase rápida ou distributiva	$t_{1/2} \alpha$	1,711 h
Tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação	$t_{1/2} \beta$	65,83 h
Constante de distribuição	A	0,405 h ⁻¹
Constante de eliminação	B	0,001 h ⁻¹
Depuração	CL	0,012 mL.h ⁻¹
Volume de distribuição	Vd	0,004 L
Tempo de meia-vida efetiva	$t_{1/2} E$	33,25 h

Outro parâmetro a ser avaliado é o volume de distribuição (Vd), que não é um volume real, mas um volume hipotético de fluido corporal que seria necessário para dissolver a quantidade total de droga na mesma concentração em que é encontrada no sangue. É uma constante que relaciona a concentração plasmática e a quantidade de fármaco no organismo em dado tempo. O volume de distribuição reflete, portanto, a extensão em que o fármaco está presente nos tecidos extravasculares¹⁰⁵. O radioimunoconjugado apresentou baixo volume de distribuição (0,004 L), indicando que ele permanece por mais tempo no espaço vascular e se distribui lentamente para os tecidos⁵.

No sistema biológico, a eliminação de um fármaco do organismo é dependente da meia-vida física do radionuclídeo, que decai independentemente de qualquer processo, e da meia-vida biológica, que é ditada pelo perfil farmacocinético e farmacodinâmico da molécula carreadora. A associação destes dois processos fornece a meia-vida efetiva de um radiofármaco. Sendo assim, o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In apresentou meia-vida efetiva de aproximadamente 33 horas (tabela 8).

7.4.4 Desenvolvimento do modelo xenográfico

Os camundongos SCID são homozigotos para o gene autossômico recessivo mutante “scid”, que é localizado na extremidade centromérica do cromossomo 16, portanto, apresentam imunodeficiência severa (*SCID – severe combined immunodeficient*).

A maioria dos homozigotos não possuem imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM ou IgG, mas alguns animais têm baixíssimos níveis de alguma delas ou até das três. Os órgãos linfóides desses animais se apresentam com um décimo do seu tamanho normal. Timo, linfonodos e o baço estão completamente destituídos de linfócitos. Os animais

homozigotos são totalmente deficientes de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T; por esta razão, não rejeitam transplantes.

Considerando as características desta linhagem, esses camundongos foram selecionados para o desenvolvimento do modelo xenográfico. Observou-se crescimento tumoral após três semanas em ambos os camundongos (implantados com concentrações celulares diferentes), porém, com maior volume de massa sólida naquele implantado com 3×10^6 células em 100 μ L. A massa tumoral foi removida e encaminhada para o Centro Veterinário de Anatomia Patológica para análise histopatológica.

Conforme laudo anátomo-patológico (Anexo 3), o fragmento nodular foi medido em 1,0 cm de diâmetro de superfície irregular e coloração esbranquiçada. Pela avaliação microscópica, revelou-se proliferação neoplásica de células epiteliais escamosas, com índice mitótico moderado, confirmando “quadro morfológico compatível com Carcinoma de células escamosas”. O corte histopatológico do tumor é representado pela figura 41.

Figura 41 – Corte histopatológico do tumor representando fragmento nodular.

(A) aumento de 10x: Proliferação de células neoplásicas epiteliais escamosas arranjadas em ninhos sólidos, por vezes com queratinização central (seta). (B) aumento de 40x: Células neoplásicas epiteliais escamosas apresentando citoplasma eosinofílico de contornos indefinidos, núcleo ovalado e um ou dois nucléolos evidentes. Figuras de mitoses atípicas (setas).

7.4.5 Estudo de corpo inteiro em camundongos SCID

O estudo de corpo inteiro em modelos tumorais foi desenvolvido em camundongos SCID pela implantação, por via subcutânea, de células FaDu-P no flanco esquerdo e FaDu-C10 resistente no flanco direito dos camundongos SCID.

Demonstra-se, com a figura 42, as imagens obtidas através do microSPECT/TC Albira (software Volview)¹²⁹.

Figura 42– Imagens obtidas por MicroSPECT/TC após sete dias da injeção do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In (55 MBq) em camundongos SCID implantados com células FaDu-P (flanco esquerdo) e FaDu-C10 (flanco direito). Imagem anatômica obtida por TC (A). Imagem metabólica - MicroSPECT/TC (B).

Após extensa busca bibliográfica, não há descrito na literatura analisada um estudo *in vivo* comparativo entre linhagens celulares, resistentes e parentais, direcionado ao cetuximabe-DTPA-¹¹¹In. Pela análise das imagens, pode-se concluir que houve captação do radioimunoconjugado apenas no tumor desenvolvido pela FaDu-P, indicando potencial sensibilidade e especificidade do radiofármaco para imunodiagnóstico.

A ausência de captação no tumor de células resistentes (FaDu-C10) corrobora o modelo de resistência desenvolvido e confirma o potencial do radiofármaco para seleção de paciente candidatos à terapia anti-EGFR.

7.4.6 Estudo de biodistribuição em camundongos SCID

Os resultados do estudo de biodistribuição do cetuximabe-DTPA- ^{111}In em camundongos com tumor de células FaDu-P e FaDu-C10 (R-resistente) podem ser visualizados na figura 43. Os dados foram expressos em porcentagem de atividade administrada em relação à atividade captada por grama de tecido (% AI/g).

Figura 43 –Estudo de Biodistribuição do cetuximabe-DTPA- ^{111}In (55 MBq) em camundongos SCID modelo tumoral FaDu-P e FaDu-C10 (R-resistente) após diferentes intervalos de administração do radiofármaco (n=3).

Por este estudo, confirmou-se o lento clareamento sanguíneo (superior a 40%, 72 horas após a administração do radiofármaco), compatível com os resultados apresentados anteriormente (amostras de sangue não foram recolhidas nos tempos de 3 e 24 horas).

A alta captação no fígado indica que o cetuximabe-DTPA- ^{111}In sofre intenso metabolismo hepático e consequente eliminação urinária. Conforme apresentado no perfil de biodistribuição em BALB/c (item 7.4.2 – pág. 119), no estudo com camundongos SCID também visualizou-se elevada captação esplênica.

Observa-se que o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In apresentou elevada captação tumoral ($18,62 \pm 0,46$ %) após 24 horas da administração endovenosa do radiofármaco, porém, captação significativa em fígado ($17,78 \pm 0,42$ %) e pulmões ($18,75 \pm 0,23$ %).

Segundo trabalho descrito por Shih *et al*⁷⁹, a impureza DTPA-¹¹¹In pode acumular-se no tumor 24 horas após a injeção do radiofármaco, mas reduz drasticamente 72 horas depois.

Pelo estudo de biodistribuição em modelos tumorais, reportou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre a atividade captada pelo tumor de FaDu-P e FaDu-C10, que configura linhagem resistente ao cetuximabe, corroborando as imagens obtidas nos estudos de corpo inteiro no MicroSPECT/TC (figura 42).

Dessa forma, conclui-se que o melhor intervalo pós-injeção do radioimunoconjugado para avaliação pré-clínica e, posteriormente, para estudos clínicos, é após cinco dias da administração do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, visto que, a captação tumoral manteve-se em elevado percentual ($12,62 \pm 1,57$ %) e a atividade nos demais órgãos atingiu níveis inferiores a 4,5% (pulmões $3,41 \pm 0,28$ % e fígado $3,58 \pm 0,79$ %).

7.5 CONCLUSÃO

Considerando a FASE III deste trabalho, pode-se concluir que:

- O estudo de corpo inteiro em animais BALB/c exibiu perfil comparável às referências literárias;
- Os estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c validaram os resultados obtidos pela análise das imagens;
- A eficiência da radiomarcção ($PR \geq 95$ %) e a estabilidade *in vivo* do radioimunoconjugado foram confirmadas pela baixa captação óssea;
- O modelo xenográfico confirmou quadro morfológico compatível com carcinoma de células escamosas;
- A diferença de captação entre os tumores de FaDu-P e FaDu-C10 foi confirmada pelos estudos de biodistribuição em modelos tumorais e das imagens obtidas nos estudos de corpo inteiro no MicroSPECT/TC, indicando potencial sensibilidade e especificidade do radiofármaco para imunodiagnóstico;
- O melhor intervalo pós-injeção do radiofármaco para avaliação pré-clínica é de cinco dias da administração do cetuximabe-DTPA-¹¹¹In;
- Os estudos demonstram que a obtenção do radiofármaco para radioimunodiagnóstico SPECT, cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, é viável, com potencial para aplicação no diagnóstico de cânceres de cabeça e pescoço e colorretal.

8 CETUXIMABE-DFO: ANÁLISE DO ACM E ESTUDOS DE CONJUGAÇÃO

No presente capítulo estão descritos os estudos de análise do anticorpo e de conjugação com o quelante DFO. Neste constam os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à primeira etapa da FASE I do trabalho.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos da FASE I do trabalho foram:

- Analisar a integridade do anticorpo monoclonal;
- Conjugar o cetuximabe ao quelante p-SCN-Bz-deferoxamina utilizando diferentes razões molares AcM:DFO;
- Avaliar a influência do número de quelantes/AcM na pureza radioquímica e imunorreatividade;
- Analisar a estabilidade do imunoconjugado quando armazenado de 2°C a 8°C e a -20°C.

8.2 MATERIAIS

8.2.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia, no IPEN, no laboratório do Instituto Mallinckrodt, Universidade de Washington, MO e na Universidade do Alabama (Birmingham, Al). Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para as análises descritas.

8.2.2 Reagentes

- Anticorpo monoclonal anti-EGFR -cetuximabe (Erbix®) (Bristol);
- p-SCN-Bz-deferoxamina (DFO-Bz-NCS, Macrocyclics cat # B-705)
- ⁸⁹Zr (St.Louis, MO, EUA/ Birmingham, Al, EUA)
- Água purificada – Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);

- Tampão Laemmli – 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad, EUA);
- Tampão de corrida – 10x *Tris/Glycine/SDS* (BioRad, EUA);
- Padrão de Proteína – Protein Ladders and Standards (BioRad, EUA);
- PBS (tampão fosfato salino) (Sigma Aldrich, EUA);
- Reagente colorimétrico Imperial Protein Stain (Thermo Scientific, EUA);
- Azida sódica (Merck, Alemanha);
- Carbonato de sódio (Merck, Alemanha);
- Acetato de amônio PA (Merck, Alemanha);
- Tampão HEPES (Sigma Aldrich, EUA);
- Dimetilsulfóxido grau CG (Sigma Aldrich, EUA);
- EDTA (Merck, Alemanha);
- Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- Etanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio monobásico hidratado (Merck, Alemanha);
- Kit para ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, EUA);
- Albumina bovina sérica – BSA (Thermo Scientific, EUA).

8.2.3 Implementos

- Coluna de exclusão molecular - *Zeba Spin Desalting column* (Thermo Scientific);
- Gel para eletroforese – 4–20% *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50μL* (BioRad, EUA);
- Coluna TSK gel super SW 3000, 4,6 mm X 30 cm, 4 μm para cromatografia líquida de alta eficiência (TOSOH Bioscience, EUA);
- Suporte cromatográfico ITLC (Merck, Alemanha);
- Placa de 12 poços (Thermo Scientific, EUA);
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo Eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

8.2.4 Equipamentos e sistemas

- Agitador/aquecedor Thermomixer Comfort 1,5mL (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- Cuba de eletroforese vertical (BioRad, EUA);
- Software GEN5 2.09 (Bioteck, EUA);
- GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);

- Espectrofotômetro Autoflex Speed Bruker (CEFAP-ICB/USP)
- Calibrador de atividade CRMTM-35R (Capintec, EUA);
- Gamma Counter 2480 Wizard (PerkinElmer, EUA)
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência – CLAE, UV, 280nm, detector de radiação (Agilent Technologies, EUA);
- TLC scanner – AR-2000 radio-*TLC Imaging Scanner* (Eckert & Ziegler/ EUA);
- Contador celular *Cellometer Auto TX4* (Nexcelom, EUA);
- Câmera para microscópio (OMAX 14.0MP Digital USB);
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA).

8.2.5 Cultivo Celular

- Software Cellometer (Nexcelom, EUA);
- Azul de Trypan (Thermo Scientific, EUA);
- Centrífuga refrigerada Mikro 220 (Hettich, Alemanha);
- Células FaDu (HTB-43/ATCC);
- Frascos de cultura celular;
- PBS estéril (Thermo Scientific, EUA);
- Tripsina -EDTA 0,25% (Thermo Scientific, EUA);
- Soro fetal bovino ((Thermo Scientific, EUA);
- Meios de cultura IMDM ((Thermo Scientific, EUA);
- Gentamicina para uso celular (Sigma Aldrich, EUA).

As células FaDu de carcinoma de células escamosas, foram adquiridas da ATCC e cultivadas no laboratório de pesquisa da Universidade do Alabama, a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM e IMDM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e contendo gentamicina (40 mg/L).

8.3 MÉTODO

O desenvolvimento do imunoconjugado cetuximabe-DFO foi baseado em referências bibliográficas^{58, 69 a 72, 91,107,108}, além de interação com outros grupos de estudo do exterior, como a Universidade de Washington (Saint Louis, MO) e a Universidade do Alabama (Birmingham, Al).

8.3.1 Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 1

O desenvolvimento do imunoconjugado contou com duas etapas, as quais requereram métodos complexos. Para visualizar um panorama deste processo, descreve-se, com a figura 44, a sequência lógica da obtenção do cetuximabe-DFO – Etapa 1.

Figura 44 - Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do cetuximabe-DFO (FASE I – Etapa 1).

*Coluna Zeba: coluna de gel de exclusão molecular

8.3.2 Análise da integridade estrutural do anticorpo

O cetuximabe (2 mg/mL) foi analisado por eletroforese¹⁰⁶, conforme item 5.3.2, a fim verificar a integridade do anticorpo.

Os imunoconjugados, AcM-DFO, nas diferentes razões molares, 1:3; 1:5; 1:8; 1:10, também foram analisando visando averiguar se os procedimentos de conjugação (conforme descrito no item 8.3.3.2 - pág. 131) e purificação (item 8.3.3.3 - pág. 131) comprometeram a estrutura do anticorpo, interferindo no tamanho molecular do cetuximabe.

8.3.3 Preparo do Imunoconjugado

8.3.3.1 Ajuste de pH

Previamente, o pH da solução de anticorpo foi ajustado com tampão de conjugação a fim de atender à condição ideal para este procedimento^{58, 69 a 72, 91}.

O anticorpo foi submetido à purificação, para retirar os estabilizantes e conservantes que poderiam interferir na ligação proteína – agente quelante, e à troca de tampão, favorecendo o rendimento de conjugação^{107, 108}.

Adicionou-se à solução do anticorpo (0,25 mL), aproximadamente 200 µL de tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,0. O tampão utilizado foi preparado com água purificada por osmose reversa e tratada com resina trocadora de íons (Chelex 100)^{109, 110}.

8.3.3.2 Conjugação do cetuximabe com *p*-SCN-Bz-Deferoxamina (DFO)

O procedimento de imunoconjugação do AcM ao quelante DFO teve como referência métodos adaptados da literatura^{58, 69 a 72, 91}.

O quelante DFO foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 8mg/mL. A conjugação foi performada em excesso molar de quelante (razões molares AcM:DFO = 1:3; 1:5; 1:8; 1:10 e 1:20).

Adicionou-se o agente quelante DFO, em diferentes razões molares, à solução de cetuximabe em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 e incubou-se a mistura por 60 minutos a 37 °C, sob agitação (400 - 500 rpm)^{69, 70, 71, 91}.

8.3.3.3 Purificação do imunoconjugado

O processo de conjugação foi realizado com excesso molar de quelante e ele precisa ser retirado para não interferir na radiomarcação. Decorrido o tempo de conjugação, o imunoconjugado foi purificado por coluna de gel de exclusão molecular 5 mL, limite de exclusão de 7,0 KDa. (*Zeba Spin Desalting column*).

Após o tempo de reação de conjugação, a solução do imunoc conjugado foi transferida para coluna previamente preparada e lavada três vezes com 2,5 mL de tampão HEPES 1 M pH 7,0 e centrifugou-se a 1.000 g por 4 minutos.

O cetuximabe-DFO purificado foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese a fim de confirmar sua integridade.

Uma alíquota de 20 µL do imunoc conjugado foi analisada em sistema Agilent equipado com uma coluna de exclusão molecular (TSK gel super SW 3000, 4,6 mm X 30 cm, 4 µm). As análises foram realizadas à 280 nm. O fluxo utilizado foi de 0,35 mL/min utilizando como fase móvel tampão de corrida (solução fosfato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,1%) por 20 minutos.

O ensaio de eletroforese foi realizado conforme item 5.3.2 (pág. 65).

8.3.3.4 Determinação da concentração proteica do imunoc conjugado

Para determinação da concentração de proteínas do cetuximabe-DFO utilizou-se o método do ácido bicinonínico (BCA) ¹¹³, conforme descrito no item 5.3.3.4 (pág. 68).

Posteriormente, a solução do imunoc conjugado foi fracionada (25 µg) e armazenadas em tubos Eppendorf a -20 °C.

8.3.3.5 Determinação do número de quelantes por anticorpo

O número de quelantes acoplados ao AcM foi determinado pelo método de espectrometria de massas (MALDI/TOF)^{63, 115}, conforme item 5.3.3.5.3 (pág. 70).

8.3.3.6 Análise da estabilidade do imunoc conjugado por CLAE

A fim de avaliar a integridade proteica, o possível desacoplamento do quelante e, assim, o prazo de validade dos imunoc conjugados para rotina de produção, as amostras de 0,2 mL de cetuximabe-DFO purificado (concentração de 5 mg/mL), conjugadas nas razões molares 1:5 e 1:10 e fracionadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL, foram armazenadas sob refrigeração (2 °C a 8 °C) e também à -20 °C, por 6 meses. Uma alíquota de 20 µL foi retirada, a cada intervalo de tempo determinado, para análise em CLAE, conforme descrito no item 5.3.3.3 (pág. 67).

Este procedimento foi realizado no IPEN, previamente às análises de radiomarcção e estudos *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos na Universidade do Alabama. Sendo assim, naquele momento, apenas as razões molares 1:5 e 1:10 estavam sendo consideradas.

8.3.4 Fluxograma da metodologia FASE I – Etapa 2

A etapa 2 da FASE I refere-se aos procedimentos de radiomarcagem e estudos *in vitro* visando determinar a razão molar ideal AcM:Quelante para o imunoc conjugado. O cenário para definição do imunoc conjugado – Etapa 2 é descrito na figura 45.

Figura 45 – Fluxograma dos métodos empregados no desenvolvimento do imunoc conjugado (FASE I – Etapa 2).

8.3.5 Desenvolvimento do Imunoconjugado

8.3.5.1 Radiomarcção do imunoconjugado

O procedimento de radiomarcção do cetuximabe-DFO com zircônio aplicado neste estudo foi baseado nos dados de literatura^{4, 58, 69 a 72, 82, 91}.

Conforme processo de produção do zircônio-89, este foi eluído em ácido oxálico (pH≈1) e, portanto, torna-se necessário neutralizar a solução do radionuclídeo para as condições ideais de radiomarcção (pH 6,8 – 7,1), adicionando-se NaOH 2M e tampão HEPES 1M pH 7,0^{58, 70, 82}.

A massa de 25 µg de cetuximabe-DFO purificado foi radiomarcada com diferentes atividades de ⁸⁹Zr. O tempo de reação foi de 60 minutos à 37 °C e pH 7,0 (tampão HEPES 1M, aproximadamente 15 µL), sob agitação 400 rpm^{4, 58, 69 a 72, 91}. Conforme procedimento adotado para cetuximabe-DTPA radiomarcado com índio-111, também não foi efetuada purificação em PD-10 pós-marcção para o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr.

8.3.5.2 Análise da pureza radioquímica

A pureza radioquímica é definida como a porcentagem de radioatividade do radionuclídeo na forma química desejada em relação à radioatividade total do radiofármaco, ou seja, a porcentagem de cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (radioimunoconjugado)³⁶. Neste trabalho, dois procedimentos foram adotados para determinação da pureza radioquímica: cromatografia em camada delgada (CCD em ITLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

8.3.5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada aplicando-se uma alíquota do radiomarcado sobre as fitas de camada delgada ITLC-SG 2 x 8 cm e solução de DTPA 50 mM pH=7,0 como fase móvel. Nesse sistema, o anticorpo radiomarcado encontra-se próximo à origem da fita ($R_f < 0,5$), enquanto as impurezas (radioisótopo livre e DFO-⁸⁹Zr) migram para a frente com o solvente ($R_f > 0,5$)^{58, 71}.

8.3.5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para determinar a pureza radioquímica do imunoconjugado. Procedeu-se à cromatografia por exclusão molecular em sistema Agilent equipado com detector UV 190 – 300 nm, coluna de exclusão molecular TSK gel super SW 3000, 4,6 mm X 30 cm, 4 µm, detector de radiação gama (Raytest). As análises foram

realizadas à 280 nm. O fluxo utilizado foi de 0,35 mL/min utilizando como fase móvel tampão de corrida (solução fosfato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 150 mM e Tween-20 0,1%) por 30 minutos^{62, 70}.

8.3.5.3 Estudos *in vitro* com células FaDu

Os estudos *in vitro* do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr foram realizados com células FaDu (P – Parental) e teve como base métodos descritos em literatura^{69, 70, 72, 82}. A contagem e viabilidade celular foram avaliadas previamente aos ensaios, utilizando o Cellometer Auto TX4.

O Auto T4 utiliza imagens de “campo brilhante” e um software de reconhecimento para identificação e contagem de células. As propriedades, tais como, concentração, diâmetro, percentual de viabilidade e número de células são calculados e reportados automaticamente. A integridade da membrana é avaliada, para determinação da viabilidade celular, por meio do método de exclusão com azul de tripan. O corante é incapaz de penetrar em células saudáveis, já nas células mortas, com membrana celular comprometida, o azul de tripan é permeável e estas são coradas em azul e identificadas pelo software Cellometer.

Para análise da viabilidade celular, o azul de tripan (50 µL) foi diluído em PBS (50 µL). Uma alíquota de 5 µL de células foi transferida à um Eppendorf contendo 95 µL de PBS. Em um terceiro tubo, 30 µL do azul de tripan diluído foi adicionado à 30 µL da solução diluída de células e homogeneizou-se lentamente. Uma amostra desta solução, 20 µL, foi aplicada para contagem de células e determinação da viabilidade celular, por meio do contador automático Cellometer Auto TX4.

8.3.5.3.1 Avaliação da imunorreatividade

Para análise da imunorreatividade do cetuximabe adaptou-se o método descrito por Lindmo *et al*¹¹⁷. O radioimunoconjugado foi diluído em BSA 1% (diluído em PBS) a uma concentração de aproximadamente 0,03 µg/mL ($\approx$ 800 cpm).

Volumes diferentes de uma solução de 3×10^6 células em 6 mL de PBS foram recolhidos em tubos Eppendorf (1,5 mL) a fim de obter as seguintes quantidades de células: 2,5; 2,0; 1,5; 1,25; 1,0; 0,75; 0,25 x 10^5 células. Esse processo foi realizado em triplicata, para cada radioimunoconjugado, obtido nas razões molares 1:3; 1:5; 1:8 e 1:10, para determinar a porcentagem de ligação total.

Posteriormente, adicionou-se 50 μL da solução do anticorpo radiomarcado diluído a todos os tubos. As células foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora a 4 °C sob leve agitação.

Decorrido o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 1.000 g por 2 minutos, lavadas três vezes com PBS gelado e os precipitados de células foram contados em contador gama, juntamente a um padrão da atividade total adicionada.

As curvas de porcentagem de ligação total em relação ao número de células foram construídas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®]. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração celular e para cada radioimunoconjugado.

As porcentagens da ligação total foram calculadas e, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, foram construídos gráficos relacionando a concentração de células (mL/milhão de células) *versus* a atividade/ligação total e os dados foram ajustados para a curva de regressão linear. O valor de Y quando X foi igual a zero, corresponde à fração imunorreativa (r) expressa em 1/r.

8.3.5.3.2 Ensaio de ligação celular (“Cell Uptake”)

O anticorpo marcado foi diluído em meio de cultura contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (v/v) à concentração de aproximadamente 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (0,017 nmol/mL). O anticorpo não radiomarcado (8,3 nmol/mL em meio de cultura contendo 10% de SFB v/v) foi utilizado como competidor. O ensaio foi realizado em placas de 12 poços e $3,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas 48 horas antes do experimento.

Dado o prazo para aderência celular, os poços foram lavados com PBS e adicionou-se 1mL de meio de cultura contendo 10 % SFB (sem antibióticos) nos poços correspondentes à ligação total (LT) e 1 mL da solução do competidor nos poços referentes à ligação não específica (LNE). A solução do cetuximabe radiomarcado (1 mL) foi adicionada em todos os poços (LT e LNE).

As placas foram incubadas em estufa 37 °C e 5 % de CO₂, por 3 horas. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS e as células foram removidas das placas com NaOH 1M para leitura da atividade em contador gama.

Esse procedimento foi realizado para o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 148 MBq/mg conjugado nas diferentes razões molares 1:3; 1:5; 1:8.

As curvas de porcentagem de ligação total e não específica em relação ao número de células foram construídas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®].

8.3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou média $\pm$ desvio padrão (DP).

Para comparar até dois grupos (amostras pareadas ou não), o teste t de Student foi utilizado com distribuição bicaudal. Para a comparação entre três ou mais grupos foi utilizado o teste de variância de um fator (*one-way* ANOVA) ou dois fatores (*two-way* ANOVA). Quando necessário, os dados foram submetidos a pós-teste (teste de Bonferroni de comparações múltiplas). As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor do que 0,05.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO FASE I

8.4.1 Análise da integridade do cetuximabe e dos imunokonjugados

Wei *et al*⁷¹ reportaram a presença de traços de impureza (de alto peso molecular) no radioimunokonjugado, provavelmente derivada do anticorpo original. Sendo assim, é fundamental averiguar a integridade do AcM previamente ao processo de conjugação.

Essa análise foi realizada por eletroforese em gel 4-20 % Tris-Glicina, pelo sistema BioRad¹⁰⁶.

O padrão de peso molecular conhecido (KDa) e as amostras de cetuximabe, (S1) e dos imunokonjugados (S2 a S5) são apresentados pela figura 46. Observa-se uma banda única na posição indicada pelo marcador próximo a 150 KDa.

Figura 46 – Eletroforese em gel.

S1: cetuximabe; **S2:** AcM-DFO-1:3; **S3:** AcM-DFO-1:5; **S4:** AcM-DFO-1:8; **S5:** AcM-DFO-1:10.

Apesar de haver aumento de massa na incorporação de quelantes ao AcM (conforme resultados apresentados posteriormente), esse método não apresenta sensibilidade suficiente para distinguir os imunokonjugados dos AcM não conjugado. No entanto, é possível confirmar o perfil íntegro do cetuximabe e do cetuximabe-DFO (em diferentes razões molares), mostrando que o processo de conjugação e purificação não promoveu quebra nem aglutinação do AcM.

8.4.2 Preparo do imunoconjugado

Para preparar um agente imunoPET estável, a escolha do quelante é um critério importante⁷². De acordo com trabalhos prévios^{58, 69 a 72, 81 a 85, 91, 101, 104}, o quelante DFO-Bz-SCN permite preparação eficiente e com desempenho ótimo para marcação de AcM com zircônio-89, o que motivou sua seleção para os procedimentos de imunoconjugação deste trabalho.

Em pH básico (pH 9), o grupo isotiocianato do DFO reage com NH₂ do AcM formando ligação estável de tioureia⁷¹. A relação quelante por anticorpo é ditada pelo número de grupamentos amina modificados no AcM. Sendo assim, estabelecer a razão de DFO acoplado ao cetuximabe é importante visto que essa alteração pode comprometer a biodistribuição, e a imunorreatividade do imunoconjugado.

Considerando referências literárias^{58, 68 a 72, 81, 82} e a interação com outros grupos de estudo do exterior, cinco razões molares AcM:DFO, 1:3; 1:5; 1:8; 1:10 e 1:20, foram avaliadas durante a FASE I deste trabalho.

Representa-se, com a figura 47, o perfil cromatográfico do cetuximabe e exemplos de alguns imunoconjugados, em diferentes razões molares, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Observa-se expressiva quantidade de quelante DFO livre (25,2% $\pm$ 4,7) para o cetuximabe conjugado com excesso molar de 20 vezes (figura 47-D), quando utilizou-se um ciclo de purificação em coluna de gel de exclusão molecular e centrifugação. Segundo Perk *et al*⁶⁹, elevadas razões molares AcM:DFO podem alterar drasticamente a farmacocinética do anticorpo. A necessidade de mais ciclos de purificação, associado aos resultados prévios de literatura foram fatores que desencorajaram o uso da razão molar 1:20 nos estudos posteriores. Com base nessa referência e nos resultados obtidos por CLAE, considerando o método adotado de um ciclo de purificação, essa razão molar não foi aplicada.

Os tempos de retenção (TR) dos imunoconjugados foram comparados ao TR do cetuximabe, utilizando a CLAE (figura 48)¹²¹.

Figura 47 - Perfil cromatográfico do cetuximabe (A) e dos imunocombinados com DFO nas diferentes razões molares: (B) 1:5; (C) 1:20. O quelante livre está indicado com seta.

Sistema Agilent equipado com detector UV 190 – 300 nm, coluna de exclusão molecular TSK gel super SW 3000, 4,6 mm X 30 cm, 4 μ m, fluxo de 0,35 mL/min por 30 minutos.

Os tempos de retenção correspondentes ao AcM não combinado ($TR = 7,56 \pm 0,04$) e aos imunocombinados: 1:3 ($TR = 6,67 \pm 0,04$); 1:5 ($TR = 6,62 \pm 0,03$); 1:8 ($TR = 6,64 \pm 0,05$) e 1:10 ($TR = 6,66 \pm 0,06$) estão representados na figura 48. Observa-se diferença significativa entre os TR do cetuximabe quando comparado aos imunocombinados

($P < 0,001$), porém, não há diferença significativa entre os imunocombinados nas referidas razões molares ($P > 0,05$).

Figura 48 – Tempos de retenção correspondentes ao cetuximabe e aos imunocombinados com DFO nas diferentes razões molares.

A concentração de proteínas foi mensurada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) ¹¹³, conforme descrito no item 5.3.3.4 (pág. 68), e a curva de absorvância a 570 nm obtida a partir de diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida (BSA 2 mg/mL) está representada na figura 49.

Figura 49 – Curva de absorvância a 570 nm obtida por diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida (BSA 2 mg/mL).

A equação da reta foi determinada e os cálculos da concentração proteica dos imunocombinados foram extrapolados (software Gen 5.209 Program).

A tabela 9 indica os percentuais médios de recuperação proteica para cada razão molar. Perk *et al*⁶⁹ reportaram rendimento de conjugação superior a 80 %. Já no trabalho descrito por Wei *et al*⁷¹, o percentual calculado pelo método cromatográfico (CLAE) foi superior à 70%. Conforme resultados apresentados, a perda de proteína pelo processo de conjugação foi inferior à 12%, em todas as razões molares avaliadas. Esses resultados foram superiores aos descritos pela literatura. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre o percentual de recuperação proteica das diferentes razões molares estudadas.

Tabela 9 –Análise do percentual de recuperação proteica em relação a razão molar do imunoconjugados. Resultados expressos em média e DP.

Razão Molar AcM/DFO	Recuperação Proteica Média (%)	DP (%)	N
1/3	90,8	2,3	6
1/5	88,1	3,8	12
1/8	91,8	6,5	9
1/10	89,9	5,9	12

DP: Desvio Padrão; N: número de amostras

8.4.2.1 Determinação do número de quelantes por anticorpo

O número de quelantes acoplados ao AcM é parâmetro determinante para eficiência de marcação e imunorreatividade, podendo interferir na ligação do radioimunoconjugado ao tecido tumoral alvo, comprometendo os estudos *in vivo*¹²³.

A biodistribuição de um radiofármaco pode ser afetada por vários fatores, dentre eles (i) alteração da farmacocinética, derivada da ineficiência da radiomarcagem; (ii) estabilidade do radioimunoconjugado *in vivo*, devido a modificações no complexo radionuclídeo-quelate; (ii) perda da imunorreatividade interferindo no processo de internalização do radioimunoconjugado às células tumorais⁸². Sendo assim, torna-se necessário avaliar a influência do número de quelantes acoplados ao AcM, na eficiência de marcação e na manutenção da imunorreatividade ¹²⁴.

Neste estudo, a massa molecular do imunoconjugado foi determinada pelo espectrômetro de massas (MALDI/TOF) ^{63,72,115,125} (figura 50) e o número de quelantes ligados ao AcM foi calculado pela subtração da massa molecular do anticorpo não conjugado e, então, dividindo-se o resultado pelo peso molecular do DFO (tabela 10).

Figura 50 –Espectros MALDI/TOF dos imunoconjugados obtidos nas razões molares 1:5 (DFO 5) e 1:10 (DFO 10). Espectrômetro Bruker Autoflex Speed, CEFAP ICB / USP).

Tabela 10 –Representação dos cálculos para determinar o número de quelantes acoplados ao cetuximabe, baseando-se nos dados obtidos pelo espectrômetro de massas Autoflex MALDI-TOF/ TOF.

Massa Molecular do DFO (g/mol)	Razão Molar do quelante	MALDI/TOF Massa molecular (g/mol)	Diferença [imunoconjugado (g/mol)-cetuximabe (152.000g/mol)]	Número de DFO/ AcM
752,9	DFO 5	153.626	1626	2,1
752,9	DFO 10	153.921	1921	2,6

Os resultados demonstraram que houve diferença significativa entre o número de quelantes acoplados ao cetuximabe quando se dobrou o excesso molar de DFO-Bz-NCS ($P < 0,0001$). O número de quelantes acoplados ao AcM, para razão molar 1:10, foi comparável aos resultados obtidos por Natarajan *et al*⁷² que reportaram relação de $2,6 \pm 0,57$ quelantes por anticorpo.

Segundo Perk *et al*⁶⁹, o número de quelantes acoplados ao AcM deve ser mantido próximo de 2 para evitar alterações da farmacocinética e imunorreatividade do AcM.

8.4.3 Análise da estabilidade do imunoconjugado por CLAE

Para determinar o prazo de armazenamento do imunoconjugado, parâmetro importante para uma rotina de produção, os imunoconjugados foram analisados quanto à

estabilidade. Amostras de cetuximabe-DFO (concentração de 5 mg/mL), nas razões molares 1:5 e 1:10 foram fracionadas em tubos cônicos (tipo Eppendorf) e armazenadas de 2°C a 8°C e à -20°C. Uma alíquota de 20 µL de cada imunoconjugado foi retirada para leitura em CLAE em diferentes intervalos de tempo (7 a 180 dias).

Demonstra-se, com a figura 51, o percentual de imunoconjugado íntegro, obtido por análise em CLAE, das amostras de cetuximabe:DFO, nas diferentes razões molares, armazenadas à 2 °C a 8 °C e à -20 °C, por até 6 meses.

Figura 51 – Estudo de estabilidade das amostras de imunoconjugados, cetuximabe-DFO, em diferentes razões molares. (A) 1:5; (B) 1:10, armazenadas de 2 °C a 8 °C e à -20 °C, representado pelo percentual do pico de CLAE do imunoconjugado íntegro por intervalo de tempo, em dias.

As figuras 52 (I) e 52 (II) representam os perfis cromatográficos dos imunocombinados, nas razões molares 1:5 e 1:10, respectivamente, obtidos após 7 dias, 3 meses e 6 meses de armazenamento à -20 °C.

Figura 52 (I) – Perfil cromatográfico dos imunocombinados, na razão molar 1:5, armazenados a - 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).

Sistema Shimadzu; coluna BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5 µm), 280 nm, fluxo de 1 mL/min utilizando como fase móvel tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 por 15 minutos.

Figure 52 (II)– Perfil cromatográfico dos imunocombinados, na razão molar 1:10, armazenados a - 20 °C por período de 7 dias (A) ; 3 meses (B) e 6 meses (C).

Sistema Shimadzu; coluna BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5 µm), 280 nm, fluxo de 1 mL/min utilizando como fase móvel tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 por 15 minutos.

Durante o período analisado de 6 meses, as amostras permaneceram com percentual do pico correspondente ao imunoc conjugado íntegro superior a 99% ($m=99,6\%$; $DP=0,3$; $N=36$), quando armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mostrando-se uma condição adequada para preservação do imunoc conjugado. Entretanto, o armazenamento em temperatura de $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, promoveu diminuição progressiva do percentual do pico íntegro, com aumento do percentual do pico correspondente ao quelante DFO, demonstrando o desligamento do quelante da estrutura do cetuximabe (figura 53).

Figure 53 – Perfil cromatográfico do imunoc conjugado, na razão molar 1:10, armazenado em temperatura de $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ por período de 6 meses.

8.4.4 Análise da pureza radioquímica

A presença de grupamentos hidroxamato, torna o quelante DFO adequado e eficaz para a radiomarcção com zircônio- ^{89}Zr . Nas primeiras investigações utilizando ^{89}Zr como radionuclídeo PET, Meijs *et al*¹³¹ reportaram rápida e eficiente radiomarcção de AcM conjugado com DFO, demonstrando boa estabilidade do complexo.

O processo de radiomarcção do cetuximabe-DFO com ^{89}Zr aplicado neste estudo foi baseado em dados de literatura^{4, 58, 69 a 72, 82, 91}. No trabalho descrito por Natarajan *et al*⁷², diferentes condições de pH e tempo de reação foram comparadas, à 37°C , visando otimizar o processo de radiomarcção. Este estudo reportou que os resultados mais

satisfatórios de rendimento radioquímico foram em pH = 7,0, durante 60 minutos. Marquez *et al*⁷⁰ também relataram percentuais elevados de pureza radioquímica ($\geq 95\%$), aplicando condições similares às reportadas por Natarajan e demais autores⁷².

Sendo assim, neste estudo, adotou-se um tempo de reação de 60 minutos à 37°C e pH 7,0, sob agitação leve para o processo de marcação do cetuximabe-DFO purificado com ^{89}Zr .

Um dos métodos para avaliação da pureza radioquímica é a cromatografia em CCD. Representa-se, com a figura 54, o perfil cromatográfico obtido por radiocromatógrafo, em que o anticorpo radiomarcado encontra-se próximo à origem da fita ($R_f < 0,5$; ponto de aplicação ≈ 50 mm), enquanto as impurezas (radioisótopo livre e DFO- ^{89}Zr) migram para a frente com o solvente ($R_f > 0,5$)^{58, 71}, conforme descrito no item 8.3.5.2.1 (pág. 134).

Figura 54 –Perfil de CCD obtido em radiocromatógrafo (TLC scanner – AR-2000) indicando os picos do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr e o contaminante ^{89}Zr livre .

Um miligrama dos imunoconjugados nas razões molares (1:3; 1:5; 1:8 e 1:10) foram radiomarcados com 37 MBq (1 mCi) de ^{89}Zr . A pureza radioquímica foi analisada por TLC scanner – AR-2000 radio e apresentou resultados superiores a 95% para todas as razões molares analisadas (figura 55). Apesar do erro padrão da média (EPM) ter sido maior para as razões molares 1:8 e 1:10, não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

Figura 55 – Pureza radioquímica do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 37 MBq/mg, em diferentes razões molares.

Resultados obtidos por CCD e expressos em média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

8.4.5 Estudos *in vitro* com células FaDu

Para a realização dos estudos *in vitro* do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (figura 56 A e B), a viabilidade das células FaDu foi avaliada previamente aos ensaios, utilizando o contador automático *Cellometer Auto TX4* (figura 57).

Figura 56 – Imagens relacionadas ao estudo *in vitro* com células FaDu.

(A) Foto da etapa de preparo das células no laboratório de cultivo celular. (B) Foto em aumento de 400X das células FaDu.

Aliquotas de 20 μL de cada solução celular diluída em PBS com adição de azul de tripan, preparadas conforme item 8.3.5.3, foram analisadas em contador automático *Cellometer Auto TX4* para determinar o número de células e viabilidade celular. Todas as culturas celulares utilizadas nos estudos *in vitro* apresentaram percentuais de viabilidade celular superiores à 93%.

Figura 57 – Resultado da viabilidade celular (95,1%) e contagem de células ($1,82 \times 10^8$) obtidos pelo sistema automatizado de contagem de células *Cellometer Auto TX4*.

8.4.5.1 Ensaio de imunorreatividade

As razões molares 1:3; 1:5; 1:8 e 1:10 foram selecionadas para os ensaio de imunorreatividade do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr em células FaDu-P.

O cetuximabe-DFO, produzido com diferentes excessos molares de quelante, foi radiomarcado com ^{89}Zr , 148 MBq/mg, e aplicado no estudo *in vitro*. Essa atividade específica foi selecionada tendo como base os resultados descritos no item 9.4.2. (pág. 161). A equação da reta e fração imunorreativa para cada razão molar estão apresentadas na figura 58.

Figura 58 – Estudo de ligação total do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 148 MBq/mg, comparando diferentes razões molares (DFO:AcM), em células FaDu e determinação da fração imunorreativa (r) através da equação da reta.

Resultados expressos pela média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

Todas as razões molares analisadas demonstraram capacidade de ligação às células FaDu e observou-se aumento do percentual de ligação total em relação a crescente concentração celular. Essa diferença foi significativa quando se analisou a relação de ligação total por número de células intragrupos ($P < 0,001$).

No trabalho descrito por Natarajan *et al*⁷², a fração imunorreativa média do rituximabe-Df-Bz-⁸⁹Zr (1:5) em células Ramos (CD20 positiva) foi de 84 ± 7 % ($N=6$). Os autores avaliaram o efeito de ligação nas mesmas células, porém, pré-bloqueadas com rituximabe não-marcado, e relataram valores de imunorreatividade próximos a 5 %.

Perk e autores⁶⁹ descreveram resultados similares para o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, com excesso molar de quelante em três vezes, obtendo uma fração imunorreativa média em células A431 superior a 0,84 (84%).

As conclusões reportadas pelos autores supracitados foram comparáveis às observadas por este estudo, com frações imunorreativas superiores a 0,85 para as razões molares 1:3; 1:5 e 1:8.

Marquez *et al*⁷⁰ apresentaram o desenvolvimento do radioimunoconjugado pertuzumabe- DFO-⁸⁹Zr. Os autores utilizaram a razão molar quelante:AcM de 1:8 e obtiveram fração imunorreativa em células SKBR3 de 0,72.

Assim como Perk *et al*⁶⁹, Vosjan *et al*⁹¹ também reportaram sobre a interferência de um excesso molar muito elevado de quelantes DFO na imunorreatividade e

biodistribuição do radioimunoconjugado. Considerando essas referências, os dados apresentados pelos autores e os resultados obtidos neste trabalho, a razão molar 1:10, com fração imunorreativa inferior a 80%, não foi utilizada nos ensaios subsequentes.

8.4.5.2 Ensaio de ligação celular

Um estudo comparativo foi realizado a fim de avaliar a influência da razão molar empregada na obtenção do imunoconjugado, no percentual de ligação total (LT) e na ligação não-específica (LNE) do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, quando o imunoconjugado foi marcado com atividade específica de 148 MBq/mg, às células FaDu-P (figura 59). Essa atividade específica foi adotada conforme resultados descritos no item 9.4.2.

Figura 59 – Estudo de ligação total (LT) e não específica (LNE) do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 148 MBq/mg, comparando diferentes razões molares (DFO:AcM), em células FaDu.

Análise em percentual de ligação por μg de proteína. Resultados expressos pela média ± EPM (n ≥ 3).

Considerando as diferentes razões molares descritas no estudo, em 1:5 (AcM:DFO) o percentual de ligação total foi superior às demais razões molares, 1:3 e 1:8 ($P < 0,0001$). Ao comparar o percentual de ligação total e ligação não específica (intragrupos), observa-se uma taxa de ligação total significativamente maior ($P < 0,0001$).

Natarajan *et al*⁷², no estudo de radiomarcagem do rituximabe-DFO com zircônio-89, concluíram que, apesar de altas concentrações de quelante (excesso molar de

10 vezes) culminarem em um maior número de quelantes DFO acoplados ao AcM, corroborando resultado apresentado no item 8.4.2.1, a razão molar 1:5 foi selecionada por manter as propriedades biológicas do imunocjugado bem próximas às do AcM não modificado.

Os estudos descritos nesta fase favoreceram na definição da razão molar, 1:5, que foi referência para os estudos posteriores.

8.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos na FASE I deste estudo conclui-se:

- O cetuximabe 2 mg/mL exibiu perfil de integridade satisfatório, favorecendo o desenvolvimento do imunocjugado com DFO;
- O tempo de retenção, em CLAE, do AcM conjugado foi reduzido, comparando-se ao TR do AcM não conjugado, o que se justifica pelo aumento de massa decorrente da incorporação de quelantes ao cetuximabe;
- O método de conjugação apresentou boa reprodutibilidade, resultando na recuperação proteica desejável;
- Aproximadamente 2 quelantes DFO foram acoplados ao AcM;
- Os imunocjugados apresentaram estabilidade por 6 meses, quando conservados a -20°C;
- A melhor razão molar AcM:DFO foi 1:5, visto que apresentou fração imunorreativa de 0,95 e um maior percentual de ligação total e específica às células FaDu.

9 CETUXIMABE-DFO-⁸⁹Zr: ESTUDOS DE RADIOMARCAÇÃO

Neste capítulo estão descritos os estudos de análise do radioimunoconjugado com ⁸⁹Zr, juntamente com os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à FASE II deste trabalho.

9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta fase foram:

- Definir a melhor atividade específica para o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr;
- Analisar a estabilidade do radioimunoconjugado de modo a definir o prazo de validade do radiofármaco;
- Analisar a estabilidade do radioimunoconjugado em soro humano;
- Averiguar o coeficiente de partição do radioimunoconjugado.

9.2 MATERIAIS

9.2.1 Infraestrutura

Os ensaios envolvendo radiomarcacão com ⁸⁹Zr foram realizados na Universidade de Washington (Saint Louis, MO) e nos laboratórios de Pesquisa, *Wallace Tumor Institute*, na Universidade do Alabama (Birmingham, Al). Todos os recursos e reagentes necessários as análises descritas foram fornecidos pelas respectivas instituições.

9.2.2 Reagentes

- Cetuximabe-DFO, 1:5;
- ⁸⁹Zr (St.Louis,MO,EUA/ Birmingham,Al,EUA)
- PBS (Tampão Fosfato Salino) (Sigma Aldrich, EUA);
- HEPES (Sigma Aldrich, EUA);
- Soro humano (Sigma Aldrich, EUA);
- Dimetilsulfóxido grau CG (Sigma Aldrich, EUA);
- EDTA (Merck, Alemanha);

- Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- Etanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Metanol grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio monobásico hidratado (Merck, Alemanha).

9.2.3 Materiais

- Coluna de exclusão molecular – Zeba Spin Desalting column (Thermo Scientific);
- Coluna TSK gel super SW 3000, 4.6mmX30cm, 4µm para cromatografia líquida de alta eficiência (TOSOH Bioscience, EUA);
- Suporte cromatográfico ITLC (Merck, Alemanha);
- Placa de 12 poços (Thermo Scientific, EUA).

9.2.4 Equipamentos e sistemas

- Agitador/aquecedor Thermomixer Comfort 1,5mL (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- Cuba de eletroforese vertical (BioRad, EUA);
- Software GEN5 2.09 (Biotech, EUA);
- GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- Gamma Counter 2480 Wizard (PerkinElmer, EUA)
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência – CLAE, UV, 280nm, detector de radiação (Agilent Technologies, EUA);
- Radiocromatógrafo TLC scanner – AR-2000 radio (Eckert & Ziegler, EUA);
- Detector de Germânio, MCA model 707M (Canberra, Alemanha);
- Contador celular cellometer Auto TX4 (Nexcelom, EUA);
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo Eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

9.2.5 Cultivo Celular

Conforme descrito no item 8.2.5 (pág. 129).

9.3 MÉTODO

O desenvolvimento do radioimunoconjugado cetuximabe-DFO- ^{89}Zr foi baseado em referências bibliográficas^{4, 58, 69 a 72, 82, 91, 116, 132}, além de interação com outros grupos de estudo do exterior.

9.3.1 Fluxograma da metodologia FASE II

Os procedimentos adotados na FASE II deste estudo para obtenção do radioimunoconjugado com zircônio-89 estão representados na figura 60.

Figura 60 –Fluxograma dos métodos adotados no desenvolvimento do radioimunoconjugado (FASE II).

9.3.2 Desenvolvimento do radioimunoconjugado

9.3.2.1 *Análise da pureza radionuclídica*

A pureza radionuclídica do zircônio-89 foi analisada para os procedimentos de marcação¹³². Esse parâmetro é dado pela razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo em relação à radioatividade total da amostra¹¹⁶.

O zircônio-89 foi diluído em água purificada (5 µL de ⁸⁹Zr, ≈ 2 MBq) e uma alíquota de 1µL foi separada em tubo Eppendorf.

O ensaio foi realizado em equipamento multicanal, detector de Germânio, MCA Canberra modelo 707M, por um tempo de análise de cinco minutos.

9.3.2.2 *Análise da atividade específica*

A massa de 25 µg de cetuximabe-DFO purificado, na concentração de 2 mg/mL e razão molar de 1:5, foi radiomarcada com 7 atividades diferentes de ⁸⁹Zr neutralizado: 37 – 370 MBq (1 – 10 mCi), a fim de avaliar a melhor atividade específica e acompanhar a estabilidade do radiomarcado. As condições de marcação foram descritas no item 8.3.5.1.

Os radioimunoconjugados foram armazenadas sob refrigeração (2°C a 8°C) por 48 horas. Uma alíquota foi recolhida em intervalos de tempo específicos e submetida a controle de pureza radioquímica por CCD, como descrito no item 8.3.5.2.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

9.3.2.3 *Análise do coeficiente de partição*

O coeficiente de partição do radioimunoconjugado foi determinado conforme descrito por Durkan *et al*¹³⁴. Adicionou-se, em triplicata, 40 µCi de cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr a um tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de n-octanol (fase orgânica) e 0,5 mL de solução fosfato-salina pH 7,4 (PBS) (fase aquosa), pré-saturados por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora à temperatura ambiente e, após a separação das fases aquosa e orgânica, coletou-se 10 µL da fase aquosa e 10 µL da fase orgânica para contagem em contador gama 2480 Wizard (PerkinElmer). O coeficiente de partição (log P) foi determinado pela equação (EQ. 9.1):

$$\log P = \log_{10} \frac{\text{cpm na fase orgânica}}{\text{cpm na fase aquosa}} \quad (\text{EQ. 9.1})$$

9.3.2.4 *Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano*

O cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (50 μ Ci), com atividade específica de 148 MBq/mg foi adicionado a 100 μ L de soro em triplicata. Esta mistura foi incubada à 37°C e 350 rpm por 72 horas. Para cada intervalo de tempo (24, 48 e 72 horas), retirou-se uma alíquota do sobrenadante para análise por CCD em radiocromatógrafo (item 8.3.5.2.1) ⁶³.

9.3.2.5 *Estudo de internalização*

Neste ensaio, as células foram preparadas em placas de 12 poços e aguardaram-se 48 horas para permitir a aderência delas às placas. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS e adicionou-se 1 mL do radioimunoconjugado, 148 MBq/mg, (250 ng/mL em meio de cultura, 10 % SFB, sem antibióticos) e 1 mL de meio de cultura (10 % SFB, sem antibióticos) em cada poço. As placas foram agitadas levemente e, incubadas à 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂, por 1, 2, 4 e 24 horas.

Após incubar as placas, elas foram lavadas com PBS e tratadas com as soluções de ácido cítrico 10 nM, a fim de obter a atividade unida à membrana, e, em seguida, com NaOH 0,1 N, para determinar a atividade internalizada nas células⁷⁰.

9.3.2.6 *Estudo de saturação*

O estudo da farmacodinâmica baseia-se no conceito da ligação fármaco-receptor. Quando um fármaco ou um ligante endógeno liga-se a seu receptor, pode ocorrer uma resposta como consequência dessa interação

Em reações de ligação à proteína, a constante de equilíbrio é uma representação quantitativa da afinidade de ligação do fármaco pelo receptor celular: alta afinidade de ligação significa um K_{eq} maior. Essa constante demonstra que metade dos sítios de ligação estarão ocupados pelo ligante quando a concentração de ligante alcançar um valor igual a $1/K_{eq}$. O inverso da constante de equilíbrio é chamado de constante de dissociação (K_d). Um grande K_d indica uma baixa afinidade de ligação, e uma maior quantidade de receptores em estado desacoplado.¹²⁷

Considerando um número suficiente de receptores ligados, o efeito cumulativo dessa ocupação pode tornar-se aparente em determinada linhagem celular. Em algum momento, todos os receptores podem estar ocupados, e pode-se observar então uma resposta máxima, densidade máxima de receptores (B_{max})¹²⁷.

O potencial de ligação (BP) é dado pela razão entre o B_{max} (densidade de receptor) e a constante de dissociação (K_d), (EQ. 9.2) ⁵:

$$BP = \frac{B_{max}}{Kd} \quad (EQ. 9.2)$$

O estudo de saturação com o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr foi realizado em células FaDu aderentes, semeadas em placas de 12 poços ($3,0 \times 10^5$ células/poço) e mantidas a 37 °C por 48 horas em estufa com ar umidificado contendo 5 % de CO₂. O imunoconjugado (0,5 nmol) foi radiomarcado com 2,78 MBq de ⁸⁹Zr (atividade específica de 37 MBq/mg). O cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr foi diluído para 1,5 mL com meio de cultura, 10 % SFB, sem antibióticos (concentração final 0,02 nM) e, posteriormente, 4 soluções diluídas com meio de cultura (10% SFB, sem antibióticos) foram preparadas a fim de obter diferentes concentrações do radioimunoconjugado: 0,0180 nM; 0,0090 nM; 0,0045 nM; 0,0018 nM. O cetuximabe não marcado (4,63 nM) foi utilizado como competidor.

O ensaio foi realizado da seguinte forma: o meio de cultura das células foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS. Adicionou-se, a cada poço, 150 µL de meio de cultura (SFB 10 %, sem antibióticos) naqueles correspondentes à ligação total ou 150 µL da solução do competidor (ligação não-específica), em triplicata. As placas foram agitadas levemente e, então, acrescentou-se 150 µL das concentrações crescentes do radioimunoconjugado (0,0180 nM; 0,0090 nM; 0,0045 nM; 0,0018 nM), em triplicata. Cada concentração de cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (150 µL) foi também adicionada a tubos de contagem para medida do total de atividade correspondente a cada concentração. As placas foram incubadas a 37°C por 1,5 horas e, decorrido o tempo, removeu-se o meio de incubação e lavou-se as células duas vezes com PBS. O conteúdo dos poços foi removido com NaOH 1 M e recolhido em tubos de contagem e contados no contador gama. Além disso, a concentração de proteína foi determinada em três poços (tratados com tripsina-EDTA 0,25 %), por meio da análise de BCA (item 8.3.3.4). A constante de dissociação (Kd) e o número máximo de receptores para cada marcador molecular em cada célula (Bmax) foram calculados por regressão não linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00®. Os experimentos foram realizados em triplicata.

9.3.3 Estudos *in vitro* – modelo de resistência

Pretendeu-se desenvolver a linhagem resistente no laboratório de cultivo celular da UAB, atendendo às orientações dos pesquisadores do Centro de Oncologia do Hospital de Câncer de Barreto.

As células FaDu foram expostas a doses de cetuximabe, intervaladas por período de recuperação para favorecer o repovoamento da cultura celular. Para indução de resistência, geralmente, é necessário um longo período de tratamento da linhagem. No entanto, considerando o prazo limite dos estudos no exterior, doses agudas foram aplicadas na tentativa de promover celeridade ao processo.

Sendo assim, a linhagem celular foi submetida a doses de 250 µg /mL, com intervalo de recuperação de três dias, durante dois meses.

Os estudos de ligação específica, item 8.3.5.3.2, foram realizados nesta linhagem tratada, a fim de averiguar a resposta do modelo de resistência e, então, avaliar a possibilidade de aplicá-la nos estudos *in vivo*.

9.3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., EUA), e com base no item 5.3.6.

9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO FASE II

9.4.1 Análise da pureza radionuclídica

Conforme apresentado anteriormente, o zircônio-89 decai, inicialmente, via emissão de pósitrons e captura eletrônica a $^{89\text{m}}\text{Y}$ (meia-vida de 15,7 s), que, por sua vez, decai via emissão de raios gama (909 keV) para o ^{89}Y estável.

Apresenta-se, com a figura 61, os picos de energia do ^{89}Zr , obtidos por meio do sistema multicanal – detector de Germânio, para análise da pureza radionuclídica. Pode-se observar a presença do pico 909 KeV, característico deste radionuclídeo.

Figura 61 –Pico de energia do ^{89}Zr a partir de uma amostra de 0,037 MBq do radioisótopo.

Tempo de análise: 5min de análise (Ge Detector – MCA Canberra modelo 707M).

9.4.2 Determinação da melhor atividade específica

A atividade de ^{89}Zr incorporada por massa do anticorpo, ou seja, a atividade específica do radioimunoconjugado é grandeza importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos radiofármacos³⁶.

Revela-se, com a figura 62, a porcentagem de pureza radioquímica (% PR) para diferentes atividades específicas do radioimunoconjugado, obtida por análise de CCD das alíquotas retiradas nos períodos de 1, 24 e 48 horas pós-marcação (armazenamento de 2 °C a 8 °C).

Figura 62 – Estudo de estabilidade dos radioimunoconjugados (48 horas), armazenados de 2 °C a 8 °C, por meio de análise da pureza radioquímica do cetuximabe-DFO (1:5) radiomarcado com zircônio-89, em diferentes atividades específicas (MBq/mg).

Resultados obtidos por TLC Scanner e expressos em média ($n \geq 3$).

A média da pureza radioquímica foi $\geq 98\%$ para todas as atividades específicas, durante o período de 48 horas de análise, com exceção à 296 MBq/mg ($89,09 \pm 2,02\%$) e 370 MBq/mg ($87,53 \pm 2,16\%$). Essa redução significativa ($P < 0,01$) na pureza radioquímica pode ser justificada pelo início do efeito de radiólise (uma hora pós marcação). O estudo de estabilidade dos radioimunoconjugados nessas atividades específicas foi descontinuado. Não houve diferença significativa entre as atividades específicas, apenas quando comparadas a 296 MBq/mg e 370 MBq/mg ($P < 0,01$).

Quando se compara a pureza radioquímica obtida em função do tempo, para as atividades específicas cujo percentual foi superior a 98 %, não se observa diferença significativa ($P > 0,05$), demonstrando a estabilidade dos radioimunoconjugados por período de 48 horas, armazenadas de 2 °C a 8 °C, parâmetro essencial para viabilizar a distribuição do radioimunoconjugado aos centros clínicos.

Wei *et al*⁷¹, descreveram as etapas do desenvolvimento do panitumumabe-DFO-⁸⁹Zr, conforme padrões das boas práticas de fabricação (BPF), e estabeleceram como prazo de validade do radioimunoconjugado 48 horas pós marcação, para o produto armazenado a 4 °C.

Considerando que a atividade específica 259 MBq/mg (7 μ Ci/ μ g) foi a maior dentre aquelas que apresentaram pureza radioquímica ≥ 95 % e estabilidade por até 48 horas, ela foi aplicada em estudos de imunorreatividade. No entanto, os resultados de fração imunorreativa não foram satisfatórios, $r = 0,55$ (figura 63).

Figura 63 –Estudo de imunorreatividade do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr , 259 MBq/mg, em células FaDu. Determinação da fração imunorreativa (r) por meio da equação da reta.

Resultados expressos pela média $\pm$ EPM ($n \geq 3$).

Zeglis *et al*⁵⁸ reportaram faixa de 37 – 222 MBq (1,0 - 6,0 mCi) para 0,5-2,0 mg do imunoconjugado (o AcM J591 com DFO). Perk e autores⁶⁹ utilizaram em seus estudos, com diferentes AcM (cU36, cetuximabe e rituximabe), a atividade específica de 67-86 MBq/mg (1,8-2,3 mCi/mg), bem próxima à reportada por Perk *et al*⁸², na radiomarcagem do cetuximabe com zircônio-89 (78 MBq/mg). A atividade descrita por Wei *et al*⁷¹, para panitumumabe-DFO- ^{89}Zr , foi de 150 MBq/mg a 180 MBq/mg (4,0-4,8 mCi/mg) para 1-1,2 mg do imunoconjugado. Com base em referências bibliográficas e nos melhores resultados de pureza radioquímica e estabilidade obtidos neste trabalho, a atividade específica de 148 MBq/mg (4 mCi/mg) foi selecionada para os estudos subsequentes, visto que apresentou rendimentos de pureza radioquímica superiores a 98%, imunorreatividade satisfatória ($r=0,95$), conforme figura 58 e estabilidade por 48 horas pós marcação (figura 62). A estabilidade do radioimunoconjugado é um parâmetro relevante para rotina de produção, e permite o planejamento de distribuição do radiofármaco para centros de medicina nuclear.

O perfil cromatográfico do radioimunoconjugado em CLAE está representado pela figura 64. O pico do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr apresentou-se em congruência àquele descrito para o imunoconjugado, na razão molar 1:5, item 8.4.2 (pág.140), demonstrando a integridade do radioimunoconjugado.

Figura 64 –Perfil cromatográfico do radioimunoconjugado, 148 MBq/mg, em CLAE.

Sistema Agilent, detector UV 280nm, coluna TSK gel super SW 3000, 4,6 mm X 30 cm, 4 μ m, detector de radiação gama (Raytest), fluxo de 0,35 mL/min, 30 minutos fase móvel solução fosfato de sódio 50 mM.

9.4.3 Análise do coeficiente de partição

O valor do coeficiente de partição ($\log P$) revela a polaridade dos compostos bioativos. Quando $\log P > 0$ a afinidade do composto é maior pela fase orgânica (mais hidrofóbico). Para produtos mais hidrofílicos, o coeficiente de partição apresenta-se menor que zero.

O valor de $\log P$ foi de $-1,84 \pm 0,11$ confirmando a hidrofilicidade do radioimunoconjugado. Apesar dos AcM serem substâncias apolares⁵, a interação de grupamentos quelante DFO, hexadentado e hidrofílico¹³⁴, pode contribuir para aumento da polaridade do anticorpo e consequente redução da lipofilicidade.

9.4.4 Análise da estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano

Conforme descrito no item 9.3.2.4 (pág. 158), neste método não se utilizou a etapa de precipitação prévia das proteínas e os resultados de estabilidade do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em soro humano podem ser visualizados na figura 65.

O radioimunoconjugado exibiu perfil no radiocromatógrafo que demonstra a estabilidade em soro humano pelo período de análise demonstrando que não houve desligamento do radionuclídeo. Menos de 2% (média $99,21 \pm 0,31$ %) do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr foi dissociado ao longo do período de incubação. Os ensaios realizados indicando média

e DP entre as amostras do radioimunoconjugado (N=3) estão representados pela figura 65. Esses resultados foram comparáveis aos descritos em literatura^{869,82,109,131}.

Figura 65 – Perfil cromatográfico obtido em radiocromatógrafo indicando a estabilidade do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 148 MBq/mg, em soro humano.

Resultados dados em percentual de pureza radioquímica em função do tempo de incubação: 24 horas (A); 48 horas (B) e 72 horas (C).

Meijs *et al*¹³¹ reportaram rápida e eficiente radiomarcagem com DFO, demonstrando boa estabilidade do complexo em soro, com resultados inferiores a 0,2 % de dissociação do radioimunoconjugado em soro, após o período de 24 horas. Perk *et al*⁸² relataram estabilidade em soro do cetuximabe-N-sucDf-⁸⁹Zr de 97 %, por período de três dias de incubação. No mesmo período de incubação, Perk *et al*⁶⁹ obtiveram resultados de percentual de dissociação do cU36-Df-Bz-NCS-⁸⁹Zr inferiores a 2,5 % ($2,3 \pm 0,1\%$).

O cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr apresentou melhores resultados de estabilidade em soro quando comparado ao cetuximabe-DTPA-¹¹¹In ($62,3 \pm 4,2$, para período de incubação de 48 horas). Essa diferença pode ser justificada pelo método adotado, que para o radioimunoconjugado com zircônio-89 não se realizou a etapa de precipitação prévia das proteínas, fato relevante para estudo com anticorpos, visto que, estas biomoléculas se ligam em grande proporção às proteínas do plasma¹⁰⁹.

9.4.5 Estudo de internalização

A internalização do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (148 MBq/mg) foi analisada em $0,3 \times 10^6$ de células FaDu aderentes (figura 66), para diferentes intervalos de incubação 1, 2, 4 e 24 horas.

Figura 66 – Estudo de internalização por período de incubação (1, 2, 4 e 24h). Percentual de ligação total do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, 148 MBq/mg, em superfície e internalizado em células FaDu.

Resultados expressos em média $\pm$ DP (N=3).

O maior percentual de ligação em superfície foi observado após 24 horas de incubação. O processo de internalização do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr às células FaDu é lento. Porém, houve diferença significativa nos percentuais de internalização para todos os tempos ($P < 0,001$). Após 24 horas de incubação, o estudo demonstrou $57,38 \% \pm 0,73 \%$ de taxa de internalização do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr (148 MBq/mg). Marquez *et al*⁷⁰ reportaram percentual de internalização do pertuzumabe-DFO- ^{89}Zr , após 23 horas, de 50%.

Não foi encontrado na literatura consultada resultado de estudo de internalização do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr . A internalização é uma propriedade importante para a terapia utilizando anticorpos monoclonais, visto que potencializa o tempo de ação do imunoterápico nas células.

9.4.6 Estudo de Saturação

A célula FaDu-P, à qual o cetuximabe-DFO- ^{89}Zr (37 MBq/mg) foi capaz de se ligar especificamente, foi submetida a ensaios de saturação com o radioimunoconjugado, a fim de avaliar a afinidade do radiofármaco pelo receptor. A curva representativa da saturação da ligação do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr às células FaDu-P está apresentada na Figura 67.

Figura 67 – Curva representativa da saturação da ligação do radioimunoconjugado às células FaDu-P.

A afinidade (K_{eq}), a constante de dissociação (K_d) do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr pelos receptores presentes nas células, bem como o número deles na linhagem celular (B_{max}) encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros de ligação dos radioimunoconjugados às células FaDu-P após ajuste das curvas de saturação por regressão não-linear (n = 3). Os valores representam média + EPM.

Cetuximabe-DFO- ⁸⁹ Zr	
Linhagem Celular	FaDu-P
Bmax (nmol/mg)	186,5 ± 16,4
Kd (nM)	0,038 ± 0,002
k _{eq} (L/nmol)	26,3 ± 1,4
BP (m ³ /mg)	4907,9 ± 412,0

A curva de ligação define a relação existente entre a concentração e a quantidade de fármaco ligado, demonstrando a afinidade do fármaco pelos receptores, assim como sua capacidade de ligação (Bmax) que representa a densidade dos receptores no tecido. O número máximo de receptores para o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em células FaDu-P foi de 186,5 ± 16,4 nmol/mg.

O elevado potencial de ligação reflete o perfil de ligação total e específica comparado ao de ligação não específica, apresentado pelo gráfico da figura 67. Estes dados corroboram resultados anteriores obtidos em estudos de ligação (item 8.4.5.2), que apresentaram baixas taxas de ligação não-específica.

9.4.7 Estudos *in vitro* – modelo de resistência

As células FaDu foram induzidas à adquirirem resistência e os estudos de ligação específica (*cell uptake*) foram realizados a fim de averiguar a resposta do modelo de resistência. Demonstra-se, com a figura 68, significativa redução do percentual de ligação do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em células FaDu induzidas à resistência (P < 0,0001). No entanto, considerando que ainda havia expressão de receptores nesta linhagem, ela não foi utilizada como modelo de resistência nos estudos *in vivo*.

Este resultado corrobora a especificidade de ligação do anticorpo radiomarcado pelas células receptor-específicas. No modelo de resistência induzida, a ligação do anticorpo radiomarcado às células foi reduzida significativamente sugerindo que a resistência está relacionada a diminuição na ligação do AcM às células.

Figura 68 – Estudo comparativo de ligação total (LT) e não específica (LNE) do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (148 MBq/mg) em diferentes linhagens celulares: FaDu parental e a FaDu-R – modelo induzido a resistência.

Resultados expressos em média $\pm$ DP (N=3).

9.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados descritos na FASE II deste estudo conclui-se:

- Na análise de pureza radionuclídica, observou-se o pico de 909 KeV, característico do radionuclídeo zircônio-89;
- O procedimento de radiomarcção foi eficiente, conduzindo à pureza radioquímica superior à 95%, sem necessidade de purificação pós-marcação;
- A atividade específica de 148 MBq/mg (4 mCi/mg) foi selecionada como referência pois apresentou rendimentos de pureza radioquímica superiores a 98%, imunorreatividade satisfatória e estabilidade por 48 horas pós marcação, o que viabilizaria a logística de distribuição desse radioimunoconjugado;
- A análise de coeficiente de partição confirmou a hidrofiliabilidade do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr;
- O radioimunoconjugado exibiu perfil estável em soro humano por 72 horas;
- O estudo de internalização *in vitro* demonstrou expressiva taxa de internalização $57,4 \pm 0,7$ % do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (148 MBq/mg) após 24 horas de incubação;
- As análises *in vitro* demonstraram significativa redução do percentual de ligação do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em células FaDu induzidas à resistência, corroborando a especificidade do anticorpo radiomarcado.

10 CETUXIMABE-DFO-⁸⁹Zr: ESTUDOS *IN VIVO*

O presente capítulo aborda os estudos *in vivo* com cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, apresentando os objetivos específicos, materiais, métodos, resultados, discussões e conclusões referentes à FASE III deste trabalho.

10.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A seguir estão descritos os objetivos específicos referentes a FASE III:

- Desenvolver um modelo tumoral de carcinoma de células escamosas pela implantação de células FaDu;
- Avaliar a biodistribuição do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em camundongos com tumor;
- Proceder com os estudos de corpo inteiro em camundongos NUDE com tumor, através do microPET/TC;
- Avaliar a especificidade do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr *in vivo* através do estudo com bloqueador.

10.2 MATERIAIS

10.2.1 Infraestrutura

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de pesquisa do Wallace Tumor Institute, na Universidade do Alabama (Birmingham, AL). Todos os recursos e reagentes necessários as análises descritas foram fornecidos pela instituição.

10.2.2 Reagentes

- Cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (produzido na UAB);
- Água purificada – Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- Etanol (Merck, Alemanha);
- Isoflurano (Forane – Abbott).

10.2.3 Implementos

- Seringa de insulina com agulha de 12,7 x 0,33 mm (BD, EUA);
- Kit para biodistribuição: tesouras, pinças;
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, pipetas, tubos cônicos tipo Falcon e placas de cultura.

10.2.4 Equipamentos

- GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- Software para processamento das imagens: Inveon (Siemens, EUA);
- Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- Contador Gama 2480 Wizard (PerkinElmer, EUA)
- MicroPET/TC Triumph II TriFoil (Northridge, CA);
- Paquímetro digital 784EC (SAE&Metric, EUA);
- Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

10.2.5 Cultivo Celular

Conforme descrito no item 8.2.5 (pág. 129).

10.2.6 Animais

As linhagens de camundongos NUDE (homozigotos para o gene autossômico recessivo situado no cromossomo 11, com timo rudimentar ou ausente¹²⁸) foram utilizadas nesta fase do trabalho.

Os animais foram ambientalizados em salas climatizadas e classificadas localizadas no laboratório biológico da Universidade do Alabama (Birmingham, EUA). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo *University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee* – IACUC 21026 como consta no Anexo 4.

Os animais foram mantidos no laboratório biológico conforme condições de criação:

- Temperatura ambiente: $22 \pm 2^\circ \text{C}$;
- Iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- Ração e água *ad libitum*.

10.3 MÉTODO

10.3.1 Esquema dos estudos abordados na FASE III

Revela-se, com a figura 69, a representação esquemática dos estudos *in vivo* adotados na FASE III deste trabalho.

Figura 69 – Representação esquemática dos estudos *in vivo* abordados na FASE III para o cetuximabe-DFO- ^{89}Zr .

10.3.2 Medição dos diâmetros e cálculo do volume dos tumores

Para os estudos *in vivo* com cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, o modelo tumoral foi desenvolvido conforme item 7.3.5, porém inoculando-se 5 X 10⁶ células FaDu- P, por via subcutânea, no ombro esquerdo dos camundongos NUDE.

A medição dos diâmetros dos tumores foi efetuada por um paquímetro digital, mensurando o comprimento e a largura dos tumores em diferentes intervalos de tempo pós implantação das células FaDu: 13 dias (antes da administração do radioimunoconjugado); 18 e 20 dias (5 e 7 dias após a administração do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr).

O volume dos tumores foi calculado pela equação (EQ.10.1)¹³⁶:

$$T_{vol} = \frac{\pi}{6} \times \text{diâmetro maior} \times \text{diâmetro menor} \quad (\text{EQ.10.1})$$

10.3.3 Estudo comparativo com uso de bloqueador

Os camundongos foram separados em dois grupos: “*non-blocking*” (sem bloqueador); e o grupo com bloqueador (“*blocking*”), que recebeu uma dose de 0,15 mL de cetuximabe não marcado, na concentração de 10 mg/mL, 60 minutos da injeção do radioimunoconjugado)⁷⁰.

Em ambos grupos, após o período de 13 dias para crescimento do tumor, injetou-se, por via endovenosa caudal, uma dose de 3,7 MBq (100 µCi) do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (148 MBq/mg; PR ≥ 98%) diluída em 100 µL de solução salina 0,9%.

Os estudos de imagem em microPET/TC e estudos de biodistribuição foram realizados 5 dias após a injeção do radiofármaco (grupo com bloqueador: 3 camundongos; grupo sem bloqueador: 4 animais) e 7 dias pós administração do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (4 camundongos para cada grupo). A representação esquemática do experimento é demonstrada na figura 70.

Figura 70 – Representação esquemática do estudo comparativo *in vivo* com uso de bloqueador

10.3.3.1 Estudo de imagem microPET/TC em camundongos NUDE

Conforme prazos pós injeção do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, os animais foram posicionados sob o tomógrafo para determinação das contagens de eventos radioativos durante 30 minutos, em MicroPET/TC Triumph II TriFoil.

Durante o período em equipamento, os camundongos permaneceram em indução anestésica com isoflurano inalatório a 5% em oxigênio.

10.3.3.2 Estudo de biodistribuição em camundongos NUDE

Após o estudo de imagem, os camundongos foram eutanasiados (pós indução anestésica com isoflurano), por deslocamento cervical, para o estudo de atividade captada por grama de tecido ou tumor (% AI/g). Após cada intervalo de tempo de eutanásia, 5 e 7 dias, os principais órgãos foram cuidadosamente retirados e pesados e, então, a radioatividade presente em cada órgão foi mensurada em contador gama (*Gama Counter 2480 Wizard*). Os cálculos foram realizados conforme item 7.3.3.

10.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.4.1 Medição dos diâmetros e cálculo do volume dos tumores

Os camundongos do tipo NUDE (*Mus musculus*) não apresentam pelagem (alopecia) e possuem timo deteriorado ou inexistente (atimia). Essas características são devidas à mutação no gene Foxn1 (Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}), responsável por fator de transcrição que regula a expressão de genes relacionados à queratina¹²⁸. Devido a atimia, os animais possuem sistema imune deficiente pela diminuição de células T CD4⁺ e CD8⁺, o que favorece o crescimento tumoral.

Modelos tumorais subcutâneos desenvolvidos em camundongos imunossuprimidos apresentam boas taxas tumorais sem a necessidade de estímulos exógenos, como matrigel⁷⁰ (figura 71 A). A medição dos diâmetros dos tumores foi efetuada por um paquímetro digital (figura 71B).

O volume dos tumores entre os grupos de bloqueio (B) e não-bloqueados (NB) foi comparado e não apresentou diferença significativa (P=0,719). Para o primeiro grupo a média foi de $44,7 \pm 13,75 \text{ mm}^3$, já o grupo sem bloqueador, obteve volume tumoral médio de $36,0 \pm 16,1 \text{ mm}^3$.

Figura 71- (A) Foto do modelo tumoral subcutâneo desenvolvidos em camundongos *NUDE* representando um bom crescimento sem a necessidade de estímulos exógenos. (B) Foto do processo de medição dos diâmetros dos tumores por paquímetro digital.

10.4.2 Estudo de imagem MicroPET/TC em camundongos NUDE

O estudo de corpo inteiro foi realizado em modelos tumorais, desenvolvidos pela implantação, por via subcutânea, de células FaDu-P no ombro esquerdo dos camundongos NUDE e atendendo aos procedimentos de um estudo de bloqueio. As imagens obtidas em microPET/TC (Triumph II TriFoil) está demonstrada na figura 72.

Por meio de uma análise comparativa observou-se uma diferença no perfil de captação do radioimunoconjugado entre os grupos de bloqueio (B), com excesso de cetuximabe não marcado, e aqueles não-bloqueados (NB), para os intervalos de 5 e 7 dias pós administração do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr .

Tratando os dados de maneira qualitativa, observa-se redução no perfil de captação no grupo com bloqueio, em relação àqueles do grupo não-bloqueado, que demonstraram intensa captação do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr pelo tumor células escamosas. Esses resultados confirmam a especificidade *in vivo* do radioimunoconjugado pelo receptor EGF.

Figura 72 – Estudo de corpo inteiro em camundongos NUDE, modelos tumorais com células FaDu. Análise comparativa do perfil de captação observado entre os grupos bloqueados (B) e não-bloqueados (NB), nos tempos de 5 e 7 dias pós-administração do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr.

10.4.3 Estudo de biodistribuição em camundongos NUDE

Os resultados do estudo de biodistribuição do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr em camundongos com tumor de células FaDu-P podem ser visualizados na figura 73. Os dados foram expressos em porcentagem de atividade administrada em relação à atividade captada por grama de tecido (% AI/g).

Conforme observado para o cetuximabe-DTPA-¹¹¹In, item 7.4.2., a captação renal relaciona-se à elevada captação hepática. Este fato é decorrente do intenso metabolismo hepático do radiofármaco com posterior eliminação dos metabólitos pela urina, já que os AcM íntegros não são filtrados com eficiência pelos glomérulos^{5, 79}.

Observa-se diferença significativa ($P < 0,001$) da captação em fígado entre os grupos não-bloqueados (NB) e aqueles com bloqueador (B). Isso se deve ao fato de, no modelo de bloqueio, o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr não estar ligado aos receptores EGF tumoral, uma vez que eles se encontram bloqueados pelo cetuximabe não marcado e, assim, o radioimunoconjugado torna-se mais disponível para metabolização hepática.

De maneira semelhante, esse evento ocorre nos pulmões: % AI/g no modelo “bloqueado” é de $8,8 \pm 0,7$ e para aqueles sem bloqueio de $4,1 \pm 0,6$ (dia 5). Conforme descrito no item 7.4.1 (pág. 117), o fator de expressão do receptor de crescimento epidérmico é prevalente neste órgão. Sendo assim, no grupo com bloqueio, o cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, por não estar ligado ao tumor, interage mais facilmente com os receptores EGF dos pulmões.

Nos estudos comparativos, Fischer *et al*⁶⁷ reportaram um acúmulo maior de ⁸⁹Zr em ossos quando comparado ao ⁸⁸Y e ¹⁷⁷Lu. A liberação de Zr^{4+} osteofílico *in vivo* leva ao acúmulo deste cátion no osso, resultando no comprometimento das imagens⁶⁸.

No artigo publicado por Deri *et al*⁶⁸, foram discutidos alguns estudos de biodistribuição cujos resultados apresentaram uma % AI/g de até 10% em osso. Neste trabalho o valor de % AI/g foi inferior a 6% (figura 73), e essa captação em osso não interferiu na qualidade da imagem.

No estudo de biodistribuição em modelos de bloqueio verificou-se uma diferença significativa ($P < 0,001$) na atividade captada pelo tumor de camundongos NUDE do grupo não-bloqueado ($25,9 \pm 0,6$ % no 5^o dia e $35,9 \pm 2,2$ % no 7^o dia), quando comparada à captação tumoral observada nos animais do grupo de bloqueio, com administração prévia de cetuximabe não marcado ($10,7 \pm 1,1$ % no 5^o dia e $11,5 \pm 0,7$ % no 7^o dia), corroborando para especificidade do AcM radiomarcado.

Figura 73 –Estudo de Biodistribuição do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr (3,7 MBq) em camundongos NUDE modelo tumoral FaDu-P após 5 e 7 dias da administração do radiofármaco (n≥3).

Esses resultados corroboram aqueles obtidos pelo estudo de imagem em MicroPET/TC, validando a especificidade *in vivo* do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr.

10.5 CONCLUSÃO

Considerando a FASE III deste trabalho, pode-se concluir que:

- O modelo tumoral subcutâneo desenvolvido em camundongos NUDE apresentou bom crescimento sem a necessidade de estímulos exógenos;
- O estudo de corpo inteiro em MicroPET/TC demonstrou redução no perfil de captação no grupo de bloqueio, com excesso de cetuximabe não marcado, e uma intensa captação do cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr pelo tumor células escamosas no grupo sem bloqueador, confirmando a especificidade *in vivo* do radioimunoconjugado;
- Nos estudos de biodistribuição observou-se diferença significativa da captação em fígado e pulmões entre os grupos estudados;
- Os valores de captação óssea foram inferiores a 6% e não interferiram na qualidade das imagens;
- Os estudos de biodistribuição corroboram os obtidos por imagens em MicroPET/TC;
- Os estudos demonstram que a obtenção do radiofármaco para radioimunodiagnóstico PET, cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, é viável, sendo agente promissor para aplicação no diagnóstico de cânceres de cabeça e pescoço e colorretal.

11 CONCLUSÕES FINAIS

A longevidade da população tem contribuído para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, incluindo neoplasias malignas. Sendo assim, inovações científicas aplicadas a métodos diagnósticos são estratégias fundamentais para prevenção e controle do câncer.

Informações diagnósticas podem auxiliar na seleção dos pacientes, e prever, potencialmente, a relação risco-benefício da terapia planejada com radionuclídeos².

Com o advento de novas tecnologias, o tratamento do câncer tem evoluído no sentido de tornar-se mais seletivo e direcionado às células tumorais. Neste cenário, a utilização de AcMs, como agentes terapêuticos contra o câncer, tem sido uma grande ferramenta da indústria farmacêutica para aumentar a ação do fármaco e minimizar seus efeitos colaterais³.

A IM tem grande relevância para detecção e caracterização das propriedades biológicas de tumores¹⁷. Os anticorpos radiomarcados, aplicados em técnicas diagnósticas, permitem a entrega seletiva da radiação ao alvo de interesse, proporcionando uma combinação entre a sensibilidade do método diagnóstico, SPECT (Tomografia por Emissão de Fóton Único) ou PET (Tomografia por emissão de pósitrons), com a especificidade do anticorpo.

A metodologia do radioimunodiagnóstico permite estratificar pacientes que possam apresentar benefícios com a imunoterapia. Neste cenário, o uso do cetuximabe radiomarcado com índio-111 e zircônio-89 favorece a triagem prévia, selecionando pacientes resistentes ao tratamento com o imunoterápico, além de atuar no monitoramento da progressão da terapia, visando tratamento mais efetivo e direcionado, promovendo a abordagem da medicina personalizada.

A tabela 12 apresenta uma descrição comparativa entre os radioimunoconjugados estudados neste projeto. Pode-se destacar que os processos de conjugação do cetuximabe com os quelantes DTPA, na razão molar 1:20 e DFO, 1:5, foram bem-sucedidos e otimizados, demonstrando boa reprodutibilidade. Os imunoconjugados apresentaram preservação da imunorreatividade e estabilidade alta quando armazenado a -20 °C por até 6 meses.

Tabela 12 – Análise comparativa entre os radioimunoconjugados estudados.

Parâmetros do processo	Cetuximabe-DTPA- ¹¹¹ In	Cetuximabe-DFO- ⁸⁹ Zr
Concentração do cetuximabe	Cetuximabe 5 mg/mL	Cetuximabe 2 mg/mL
Análise da integridade do cetuximabe	Peso molecular compatível à molécula íntegra	Peso molecular compatível à molécula íntegra
TR do cetuximabe (CLAE)	7,20 ± 0,06 em min	7,56 ± 0,04 em min
Processo de conjugação	Tampão bicarbonato 0,2 mol/L pH 8,5. Agitação 500 rpm. Temperatura: 37°C. Tempo: duas horas.	Tampão carbonato de sódio 0,1M pH 9,0. Agitação 500 rpm. Temperatura: 37°C. Tempo: uma hora.
Imunoconjugado razão molar	Quelante DTPA razão molar 1:20	Quelante DFO razão molar 1:05
Solubilização do quelante	Água Chelex	Dimetilsulfóxido (DMSO)
Ciclos de centrifugação para o imunoconjugado	Dois	Um
Purificação do imunoconjugado	Coluna de gel de exclusão molecular (PD-10). Tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5.	Coluna de gel de exclusão molecular (<i>Zeba Spin Desalting column</i>). Tampão HEPES 1 M pH 7,0
TR do imunoconjugado	6,74 ± 0,05 em min	6,62 ± 0,03 em min
Recuperação proteica	85,07 ± 2,42%	88,13 ± 3,75%
Número de quelantes por AcM - MALDI/TOF	4,4	2,1
Estabilidade do imunoconjugado -20 °C	6 meses	6 meses
Processo de marcação	Tampão acetato de amônio 0,25 mol/L pH 6,5. 60 minutos à 42°C e agitação 300-400 rpm	Tampão HEPES 1M pH 7,0. 60 minutos à 37°C e agitação 400 rpm
CCD	ITLC-SG 1x12 cm e solução de EDTA 50 mmol/L em tampão acetato de amônio 0,1 mol/L, pH=5,5-6.	ITLC-SG 2x8 cm e solução de 50 Mm DTPA pH=7,0 como fase móvel.
Linhagem celular	FaDu-P e FaDu-R	FaDu-P e FaDu-R
Fração Imunorreativa	93%	95%
Fração da ligação de superfície (para 1 hora)	86,09 ± 0,72%	79,88 ± 2,85%
Internalização do radiofármaco (para 1 hora)	18 ± 1,22%	20,12 ± 2,34%
Melhor atividade específica	259 MBq/mg	148 MBq/mg
Coeficiente de partição (log P)	-3,04 ± 0,09 (Hidrofílico)	-1,84 ± 0,05 (Hidrofílico)
Estabilidade do cetuximabe radiomarcado em soro humano	62,3 ± 4,2 % do radioimunoconjugado íntegro após 48 horas de incubação	99,14 ± 0,21% do radioimunoconjugado íntegro após 48 horas de incubação
Biodistribuição em camundongos	BALB/c	Não realizado pela indisponibilidade de animais na UAB
Camundongos modelo tumoral	SCID	NUDE
Biodistribuição em camundongos - modelo tumoral	Uso de duas linhagens celulares - FaDu-P e FaDu-C10 (R)	Modelo de Bloqueio - FaDu-P
Captação Tumoral no 5º dia (%AI/g)	FaDu- P - 12,62 ± 1,57 % FaDu-C10 - 1,79 ± 0,5 % (P < 0,05) entre os grupos.	grupo não-bloqueado - 25,9 ± 0,6 % grupo de bloqueio, 10,7 ± 1,1% - (P < 0,001) entre os grupos.

Estes imunokonjugados, quando radiomarcado com ^{111}In e ^{89}Zr , exibiram pureza radioquímica superior a 95%, sem necessidade de purificação pós-marcação, e estabilidade por tempo que possibilita seu transporte às clínicas distantes do centro produtor, favorecendo o desenvolvimento dos estudos clínicos posteriores.

A hidrofiliabilidade dos radioimunokonjugados foi constatada pela avaliação do coeficiente de partição.

Considerando o método adotado para análise da estabilidade em soro, o cetuximabe-DFO- ^{89}Zr apresentou melhores resultados quando comparado ao cetuximabe-DTPA- ^{111}In ($62,3 \pm 4,2$, para período de incubação de 48 horas), visto que, para o radioimunokonjugado com zircônio-89 não se realizou a etapa de precipitação prévia das proteínas.

As análises *in vitro* do cetuximabe-DTPA- ^{111}In em células FaDu-C10 (linhagem resistente) demonstraram inexpressivo percentual de ligação e internalização do radioimunokonjugado, colaborando na elucidação do modelo de resistência conferido a esta linhagem.

O estudo de corpo inteiro, em MicroPET/TC, demonstrou redução no perfil de captação no grupo de bloqueio, com excesso de cetuximabe não marcado, e intensa captação do cetuximabe-DFO- ^{89}Zr pelo tumor de células escamosas no grupo não-bloqueado, confirmando a especificidade *in vivo* do radioimunokonjugado.

Os estudos de biodistribuição dos radiofármacos foram compatíveis aos descritos em literatura e validaram os resultados obtidos por imagens em MicroSPECT/TC e MicroPET/TC, além de apresentarem apreciável captação tumoral, considerando os tempos analisados. A estabilidade alta *in vivo* e a eficácia da marcação foram confirmadas pela baixa captação óssea e em tecidos não alvos.

A diferença de captação entre os tumores de FaDu-P e FaDu-C10, quando se aplicou o cetuximabe-DTPA- ^{111}In , foi confirmada por estudos de biodistribuição em modelos tumorais, e das imagens obtidas nos estudos de corpo inteiro no MicroSPECT/TC, indicando potencial sensibilidade e especificidade do radiofármaco para imunodiagnóstico.

O melhor intervalo pós-injeção do radiofármaco para avaliação pré-clínica foi de 5 dias após a administração. Esse dado tem grande relevância para posteriores estudos clínicos.

A translação de um agente de IM, do desenvolvimento farmacêutico ao direcionamento clínico, envolve múltiplas etapas e desafios. Para definir um novo radiofármaco a ser aplicado em estudos clínicos, é necessária a compreensão das fases

críticas do preparo do “composto químico” (fase pré-clínica) até a obtenção do radiofármaco, projetado conforme requisitos de qualidade e segurança necessários para investigação em seres humanos.

Os radiofármacos desenvolvidos neste trabalho estimulam a progressão da Medicina Nuclear, promulgando a abordagem da Oncologia de Precisão.

No entanto, a principal contribuição deste trabalho, não foi apenas obter uma formulações farmacêuticas que possibilitem padronizar a rotina de produção dos radiofármacos, mas colaborar, junto ao Hospital de Câncer de Barretos, na elucidação dos mecanismos de resistência das células tumorais à terapia com o cetuximabe, pela realização de estudos de ligação, *in vitro* e *in vivo*, do radioimunoconjugado a receptores celulares. A instituição demonstrou grande interesse na aplicação clínica destes radioimunoconjugados.

No Brasil, não há disponível um radioimunoconjugado para diagnóstico e seguimento do câncer. Sendo assim, este trabalho demonstrou que a obtenção dos radiofármacos para imuno-SPECT e imuno-PET, cetuximabe-DTPA-¹¹¹In e cetuximabe-DFO-⁸⁹Zr, é viável, com potencial para aplicação no diagnóstico de cânceres de cabeça e pescoço ou colorretal e seleção de pacientes à imunoterapia anti-EGFR, e encoraja a continuidade deste projeto para futuros estudos clínico.

REFERÊNCIAS

- 1- INCA. *Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Inca: 26 p. 2016.
- 2- STROME, S. E.; SAUSVILLE, E. A.; MANN, D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist*, v. 12, p. 1084 -1095, 2007.
- 3- MCCARRON, P. A.; OLWILL, S. A.; MAROUF, W. M.; BUICK, R. J.; WALKER, B.; SCOTT, C. J. Antibody conjugates and therapeutic strategies. *Molecular Interventions*, v. 5, p. 368 -380, 2005.
- 4- HOEBEN, B. A. W.; MOLKENBOER-KUENEN, J. D. M.; OYEN, W. J. G.; PEETERS, W. J. M.; KAANDERS, J. H. A. M.; BUSSINK, J.; BOERMAN, O. C. Radiolabeled cetuximab: dose optimization for epidermal growth factor receptor imaging in a head-and-neck squamous cell carcinoma model. *International Journal of Cancer*, v. 129, p. 870 – 878, 2011.)
- 5- WANG, W.; WANG, E. Q.; BALTHASAR, J. P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.*, v. 84, n. 5, p. 548-558, 2008.
- 6- DENARDO, G. L.; SYSKO, V. V.; DENARDO, S. J. Cure of incurable lymphoma. *Journal of Radiation Oncology Biology*, v. 66, n. 2, p. S46-S56, 2006.
- 7- ACAR, C.; TEKSOZ, S.; UNAK, P.; MUFTULER, F. Z.; MEDINE, E. I. Somatostatin with ^{99m}Tc and biodistribution studies in rats. *Cancer Biotherapy Radiopharm*, v. 22, p. 748 – 54, 2007.
- 8- RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M. H.; DAHA, F. J. ¹⁷⁷Lu labeling of Herceptin and preclinical validation as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 37, p. 949 - 955, 2010.
- 9- ORCUTT, K. D.; SLUSARCZYK, A. L.; CIESLEWICZ, M.; RUIZ-YI, B.; BHUSHAN, K. R.; FRANGIONI, J. V.; WITTRUP, K. D. Engineering an antibody with picololar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 38, p. 223 - 233, 2011.
- 10- RASANEH, S.; RAJABI, H.; BABAEI, M. H.; DAHA, F. J.; SALOUTI, M. Radiolabeling of trastuzumab with ¹⁷⁷Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol.*, v. 36, n. 4, p. 363-369, 2009.
- 11- PERSSON, M.; TOLMACHEV, V.; ANDERSSON, K.; GEDDA, L.; SANDSTRÖM, M.; CARLSSON, J. [(177)Lu]pertuzumab: experimental studies on targeting of HER-2 positive tumour cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, v. 32, n. 12, p. 1457-1462, 2005.
- 12- FORRER, F.; OECHSLIN-OBERHOLZER, C.; CAMPANA, B.; HERRMANN, R.; MAECKE H. R.; MUELLER-BRAND J.; LOHRI A. Radioimmunotherapy with ¹⁷⁷Lu-DOTA-rituximab: final results of a phase I/II Study in 31 patients with relapsing follicular, mantle cell, and other indolent B-cell lymphomas. *J Nucl Med*. Mar;55(3):521, 2014.
- 13- VERA, D. R.; EIGNER, S.; BERAN, M.; HENKE, K. E.; LAZNICKOVA, A.; LAZNICEK, M.; MELICHAR, F.; CHINOL, M. Preclinical evaluation of (177)lu-nimotuzumab: a potential tool for radioimmunotherapy of epidermal growth factor receptor-overexpressing tumors. *Cancer Biother Radiopharm.*, v. 26, n. 3, p. 287-297, 2011.
- 14- MILENIC, D. E.; WONG, K. J.; BAIDOO, K. E.; RAY, G. L.; GARMESTANI, K.;

- WILLIAMS, M.; BRECHBIEL, M. W. Cetuximab: preclinical evaluation of a monoclonal antibody targeting EGFR for radioimmunodiagnostic and radioimmunotherapeutic applications. *Cancer Biother Radiopharm.*, v. 23, n. 5, p. 619-631, 2008.
- 15- VAN DONGEN, G. A. M. S.; VISSER, G. W. M.; LUB-DE HOOGE, M. N.; VRIES, E. G.; PERK, L. R. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications. *The Oncologist*, v. 12, p. 1379-89, 2007.
 - 16- VAN DE WATERING, F. C. J.; RIJPKEMA, M.; PERK, L.; BRINKMANN, U.; OYEN, W. J. G.; BOERMAN, O. C. . Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-13, 2014.
 - 17- REILLY, R. M.; LAM, K.; CHAN, C.; LEVINE, M. Advancing novel molecular imaging agents from preclinical studies to first-in-humans phase I clinical trials in academia--a roadmap for overcoming perceived barriers. *Bioconjug Chem* v. 26, n. 4, p. 625-32, 2015.
 - 18- SIHVER, W.; PIETZSCH, J.; KRAUSE, M.; BAUMANN, M.; STEINBACH, J.; PIETZSCH, H. Radiolabeled Cetuximab Conjugates for EGFR Targeted Cancer Diagnostics and Therapy. *Pharmaceuticals*, v. 7, p. 311-38, 2014.
 - 19- ONUCHIC A. C.; CHAMMAS. R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med* (São Paulo). jan.-mar.;89(1):21-31, 2010,
 - 20- BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R.; MAGNUSSON, R. Global cancer prevention: an important pathway to global health and development. *Public Health*, v. 125, n. 12, p. 821-831, 2011.
 - 21- TANNOCK, I. F. *The basic science of oncology*. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2005.
 - 22- AZMI, A. S.; BAO, B.; SARKAR, F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* Dec. 32(3-4): 623-42, 2013.
 - 23- NAGPAL, M.; SINGH, S.; SINGH, P.; CHAUHAN, P.; ZAIDI, M. A. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg*. Jan-Jun; 7(1): 17-20, 2016.
 - 24- DEANS, G. T.; HEATLEY, M.; PATTERSON, C. C; MOOREHEAD, R. J.; PARKS, T. G.; ROWLANDS B. J.; SPENCE. R. A. J. Colorectal carcinoma: importance of clinical and pathological factors in survival. *Ann R Coll Surg Engl*, 76:59-64, 1994.
 - 25- DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 24, p. 9 - 17, 2005.
 - 26- DEDIVITIS, R. A.; FRANÇA, C. M.; MAFRA, A. C. B.; GUIMARÃES, F. T.; GUIMARÃES, A. V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, p. 35 – 40, 2004.
 - 27- COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 55, n. 2, p. 165 – 174, 2009.
 - 28- WALKER, D. M.; BOEY, G.; MCDONALD, L. A. The pathology of oral cancer. *Pathology*, v. 35, p. 376 – 383, 2003.
 - 29- ALVARENGA, L. M.; RUIZ, M. T.; BERTELLI, E. C. P.; RUBACK, M. J. C.; MANIGLIA, J. V.; BERTOLLO, E. M. G. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 74, n. 1, p. 68 – 73, 2008.

- 30- HUSSAIN, T.; NGUYEN, Q. T. Molecular Imaging for Cancer Diagnosis and Surgery. *Adv Drug Deliv Rev.* Feb; 66: 90–100, 2014.
- 31- BUCHPIGUEL, C. A.; SAPIENZA, M. T. Imagem funcional e metabólica (PET-CT e outros). In: HOFF, P. M. G.; KATZ, A.; CHAMMAS, R.; FILHO, V. O.; NOVIS, Y. S. N. *Tratado de Oncologia.* v. 1. p. 1031-1048. São Paulo: Atheneu, 2013.
- 32- ARAUJO, E. B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.T.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, vol. 44, n. 1 pp. 1-12, 2008.
- 33- PUJATTI, P. B. **Marcadores moleculares derivados da bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT e PET.** Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2012.
- 34- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA D.; COELHO P.; VEIGA F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 42, n. 2, abr. /jun., 2006.
- 35- BENEDETTO, R. **FDG-18F na distinção de placa aterosclerótica: Inovação em Tecnologia PET/CT.** Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- 36- SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy.* 5 ed. New York: Springer, 2003.
- 37- KOWALSKY, R. J.; FALEN, S. W. Radiation detection and measurement. In: LANDIS, N. T. (Ed.). *Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine.* Washington: American Pharmacists Association, 2004. p. 39-70.
- 38- PAPATHANASSIOU, D.; LIEHN, J. C. The growing development of multimodality imaging in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*, v. 68, n. 1, p. 60-65, 2008.
- 39- CHOWDHURY, F. U.; SCARSBROOK, A. F. The role of hybrid SPECT-CT in oncology: current and emerging clinical applications. *Clin Radiol*, v. 63, n. 3, p. 241-251, 2008.
- 40- SAHA, G. B. *Basics of PET Imaging.* Ohio: Springer, 2004.
- 41- TOYOKUNI T.; KUMAR J. S. D.; GUNAWAN P.; BASARAH E. S.; LIU J.; BARRIO J.R.; SATYAMURTHY, N. Practical and Reliable Synthesis of 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethanesulfonyl- β -D-mannopyranose, a Precursor of 2-Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (FDG). *Molecular Imaging and Biology*, 6:324-330, 2004.
- 42- ROHREN E. M.; TURKINGTON, T. G.; COLEMAN, R. E. Clinical applications of PET in oncology. *Radiology*; 231:305–32, 2004.
- 43- ANDRADY, C.; SHARMA, S. K.; CHESTER, K. A. Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy. *Immunotherapy*, v. 3, p. 193 - 211, 2011.
- 44- BHARDWA, J.; GOLDSTRAW, M.; TZORTZIS, S.; KIRBY, R. Finasteride and doxazosin alone or in combination for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Pharmacother*, v. 8, p. 1337 - 1344, 2007.
- 45- PRESS, O. W.; LEONARD, J. P.; COIFFIER, B.; LEVY, R.; TIMMERMAN, J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Hematology American Society of Hematology Education Program*, p. 221 - 240, 2001.

- 46- LIGIERO, T. B.; DE SOUZA ALBERNAZ, M.; DE CARVALHO, S. M.; DE OLIVEIRA, S. M.; SANTOS- OLIVEIRA, R. Monoclonal antibodies: application in radiopharmacy. *Curr Radiopharm.*, v. 6, n. 4, p. 231-248, 2013.
- 47- CARVALHO, P. A. **Estudos clínicos e patentes de anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer**: um estudo exploratório. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2013,
- 48- WIECHEC, E.; HANSSON K. T.; ALEXANDERSSON, L.; JONSSON J. L.; ROBERG, K. Hypoxia mediates differential response to anti-egfr therapy in HNSCC cells . *Int. J. Mol. Sci.* 29;18(5), 2017.
- 49- BERNIER, J. e SCHNEIDER, D. Cetuximabe combined with radiotherapy: An alternative to chemoradiotherapy for patients with locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *European Journal of Cancer*, v. 43, p. 35 – 45, 2007.
- 50- BONNER, J. A.; GIRALT, J.; HARARI, M. Cetuximab prolongs survival in patients with loco regionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: A phase III study of high dose radiation therapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 22, 489s, (suppl; abstr 5507), 2004.
- 51- ROSELL, R.; ROBINET, G.; SZCZESNA, A.; RAMLAU, R.; CONSTENLA, M.; MENNECIER, B. C. *et al.* Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 19:362-9, 2008.
- 52- HERBST, R. S.; CHANSKY, K.; KELLY, K.; ATKINS, J. N.; DAVIES, A. M.; DAKHIL, S. R. *et al.* Phase II randomized selection trial evaluating concurrent chemotherapy plus cetuximab or chemotherapy followed by cetuximab in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Final report of SWOG 0342*. ASCO 2007.
- 53- BUTTS, C. A.; BODKIN, D.; MIDDLEMAN, E. L.; ENGLUND, C. W.; ELLISON D.; ALAM Y. *et al.* Randomized phase II study of gemcitabine plus cisplatin or carboplatin [corrected], with or without cetuximab, as first-line therapy for patients with advanced or metastatic non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25:5777-84, 2007.
- 54- BRAND, T. M.; IIDA, M. AND WHEELER D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biology & Therapy* 11:9, 777-792; May 1, 2011,
- 55- DI FIORE F.; BLANCHARD F.; CHARBONNIER F.; LE PESSOT F.; LAMY A.; GALAIS, M. P.; *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*; 96:1166–1169, 2007.
- 56- GENSINI, F.; SESTINI, R.; PIAZZINI, M.; VIGNOLI, M.; CHIARUGI, A.; BRANDANI, P. The p. G23S CDKN2A founder mutation in high-risk melanoma families from Central. *Melanoma Research*, v. 17, p. 387 – 392, 2007.
- 57- KRAEBER-BODÉRE, F.; BARBET, J. Challenges in nuclear medicine: innovative theranostic tools for personalized medicine. *Front. Med.* v. 1, p. 1-3, 2014.
- 58- ZEGLIS, B.M.; LEWIS, J. S. The bioconjugation and radiosynthesis of 89Zr-DFO-labeled antibodies. *J Vis Exp.* Feb 12;(96), 2015.
- 59- NAYAK, T. K. AND BRECHBIEL M. W. Radioimmunoimaging with longer-lived positron-emitting radionuclides: potentials and challenges. *Bioconj Chem.* May 20; 20(5): 825–841, 2009

- 60- IAEA (International Atomic Energy Agency Vienna). Cyclotron produced radionuclides: physical characteristics and production methods. *Technical Reports Series* No. 468., 2009.
- 61- VEREL, I.; VISSER, G. W.; BOELLAARD, R.; STIGTER-VAN, W. M.; SNOW, G. B.; VAN DONGEN, G. A. ^{89}Zr immuno-PET: Comprehensive procedures for the production of ^{89}Zr -labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.*, v. 44, p. 1271-1281, 2003.
- 62- WOOTEN, L.; MADRID, E.; SCHWEITZER, G. D.; LAWRENCE, L. A.; MEBRAHTU, E.; LEWIS, B. C. and LAPI, S. E. Routine Production of ^{89}Zr Using an Automated Module A. *Appl. Sci.*, 3, 593-613; 2013.
- 63- LEWIS, M. R.; RAUBITSCHKE, A.; SHIVELY, J. E. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjug Chem.*, n. 5, v. 6, p. 565-576, 1994.
- 64- TOLMACHEV, V.; WÄLLBERG, H.; ANDERSSON, K.; WENNBORG, A.; LUNDQVIST, H.; ORLOVA, A. The influence of Bz-DOTA and CHX-A''-DTPA on the biodistribution of ABD-fused anti-HER2 Antibody molecules: implications for ^{114}mIn -mediated targeting therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. v. 36, 1460–1468, 2009.
- 65- ZHANG, Y.; HONG, H.; CAI, W. Curr PET tracers based on Zirconium-89. *Radiopharm.* V. 2, 131-139, 2011.
- 66- YVONNE W. S. JAUW, VAN OORDT, C. W. M.-VAN DER H. H.; O. S.; HENDRIKSE, N. H.; VUGTS, D. J.; ZIJLSTRA, J. M.; HUISMAN, M. C. and VAN DONGEN, G. A. M. S. Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? *Front Pharmacol.* 7: 131. 2016.
- 67- FISCHER, G.; SEIBOLD, U.; SCHIRRMACHER, R.; WÄNGLER. B. and WÄNGLER. C. Radiometal Nuclide with High Potential for Molecular Imaging with PET: Chemistry, Applications and Remaining Challenges. *Molecules*, 18, 6469-6490; 2013.
- 68- DERI, M. A.; ZEGLIS, B. M.; FRANCESCONI, L. C.; LEWIS, J. S. PET imaging with ^{89}Zr : From radiochemistry to the clinic. *Nuclear Medicine and Biology*, V. 40, p. 3–14, 2013.
- 69- PERK, L.; VOSJAN, M. W. D.; VISSER. G. W. *et al.* P-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 37, no. 2, pp. 250–259, 2010.
- 70- MARQUEZ, B. V.; IKOTUN, O. F.; ZHELEZNYAK, A.; WRIGHT, B.; HARI-RAJ, A.; PIERCE, R. A.; LAPI, S. E. Evaluation of (^{89}Zr)-pertuzumab in Breast cancer xenografts. *Mol Pharm.*, v. 11, n. 11, p. 3988-3995, 2014.
- 71- WEI, L.; SHI, J.; AFARI. G. BHATTACHARYYA S. Preparation of clinical-grade (^{89}Zr)-panitumumab as a positron emission tomography biomarker for evaluating epidermal growth factor receptor-targeted therapy. 2014.
- 72- NATARAJAN, A.; HABTE, F.; AND GAMBHIR, S. S. Development of a Novel Long-Lived ImmunoPET Tracer for Monitoring Lymphoma Therapy in a Humanized Transgenic Mouse Model. *Bioconjugate Chem.*, 23 (6), pp 1221–1229), 2012.
- 73- PING, LI W.; MEYER, L. A.; CAPRETTO, D. A.; SHERMAN, C. D.; ANDERSON, C. J. Receptor-binding, biodistribution, and metabolism studies of ^{64}Cu -DOTA-cetuximab, a

- PET-imaging agent for epidermal growth-factor receptor-positive tumors. *Cancer Biother. Radiopharm.*, v. 23, p. 158–171, 2008.
- 74- NAYAK, T. K. and BRECHBIE, M. W. ^{86}Y based PET radiopharmaceuticals: radiochemistry and biological applications. *Med Chem.* Sep 1; 7(5): 380–388, 2011.
 - 75- PENTLOW, K. S.; GRAHAM, M. C.; LAMBRECHT, R. M.; DAGHIGHIAN, F.; BACHARACH, S. L.; BENDRIEM B. *et al.* Quantitative imaging of iodine-124 with PET. *J Nucl Med.* 37:1557–1562, 1996.
 - 76- EVANS, H. L.; NGUYEN, Q.; CARROLL, L. S.; KALISZCZAK M.; TWYMAN F. J.; SPIVEY A. C. *et al.* A bioorthogonal ^{68}Ga -labeling strategy is alive rapidin imaging. *Chem Commun.* 50:9557-60, 2014.
 - 77- SCHECHTER, N. R.; WENDT, R. E.; YANG, D. J.; AZHDARINIA, A.; ERWIN, W. D.; STACHOWIAK, A. M.; BROEMELING, L. D.; KIM, E. E.; COX, J. D.; PODOLOFF, D. A. *et al.* Radiation dosimetry of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled C225 in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Nucl. Med.*, v. 45, p. 1683-1687, 2004.
 - 78- CHENG, C.; HO, A. S. SPECT Imaging Evaluation of ^{111}In -Chelated Cetuximab for Diagnosing EGFR-Positive Tumor in a HCT15-Induced Colorectal Xenograft. *Gastroenterology*, Volume 152, Issue 5, April, Volume 152, Issue 5, Supplement 1, Page S551, 2017.
 - 79- SHIH, Y. H.; PENG, C. L.; LEE, S. Y.; CHIANG, P. F.; YAO, C. J.; LIN, W. J.; LUO, T. Y.; SHIEH, M. J. ^{111}In -cetuximab as a diagnostic agent by accessible epidermal growth factor (EGF) receptor targeting in human metastatic colorectal carcinoma. *Oncotarget*, v. 6, p. 16601-10, 2015.
 - 80- DIVGI, C. R.; WELT, S.; KRIS, M.; REAL, F. X.; YEH, S. D.; GRALLA, R.; MERCHANT, B.; SCHWEIGHART, S.; UNGER, M.; LARSON, S. M. *et al.* Phase I and imaging trial of indium-111 labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 83, p. 97-104, 1991.
 - 81- AERTS, H. J. W. L.; DUBOIS, L.; PERK, L.; VERMAELEN, P.; VAN DONGEN, G. A. M. S.; WOUTERS, B. G.; LAMBIN, P. Disparity Between In Vivo EGFR Expression and (^{89}Zr)-Labeled Cetuximab Uptake Assessed with PET. *J. Nucl. Med.* 50, 123–131, 2009.
 - 82- PERK, L. R.; VISSER, G. W. M.; VOSJAN, M. J. W. D.; WALSUM, M. S.; TIKINK, B. M.; LEEMANS, R.; VAN DONGEN, G. A. M. S. ^{89}Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ^{90}Y and ^{177}Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody Cetuximab. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 46, p. 1898 - 1906, 2005.
 - 83- MENKE-VAN DER HOUVEN VAN OORDT, C. W.; GOOTJES, E. C.; HUISMAN, M. C.; VUGTS, D. J.; ROTH, C.; LUIK, A. M.; MULDER, E. R.; SCHUIT, R. C.; BOELLAARD, R.; HOEKSTRA, O. S.; VAN DONGEN, G. A.; VERHEUL, H. M. ^{89}Zr -cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget*. 6: 30384-93. doi: 10.18632/oncotarget.4672, 2015.
 - 84- VAN LOON J.; EVEN, A. J. G.; AERTS, H. J. W. L.; ÖLLERS, M.; HOEBERS, F.; VAN ELMPT, W.; DUBOIS, L.; DINGEMANS, A. C.; LALISANG, R. I.; KEMPERS, P.; BRANS, B.; WINNEPENINCKX, V.; SPEEL, E. J.; *et al.* PET imaging of zirconium-89 labelled cetuximab: A phase I trial in patients with head and neck and lung cancer. *Radiother Oncol.* doi: 10.1016/j.radonc.2016.11.020, 2016.

- 85- EVEN, A. J. G.; HAMMING-VRIEZE, O.; VAN ELMPT, W.; WINNEPENINCKX, V. J. L.; HEUKELOM, J.; TESSELAAR, M. E. T.; VOGEL, W. V.; HOEBEN, A.; ZEGERS, C. M. L.; VUGTS, D. J.; VAN DONGEN, G. A. M. S.; BARTELINK, H.; MOTTAGHY, F. M. *et al.* Data from: Quantitative assessment of Zirconium-89 labeled cetuximab using PET/CT imaging in patients with advanced head and neck cancer: a theragnostic approach. **Cancer Data**. 2017.
- 86- CAI, W.; CHEN K.; HE, L.; CAO, Q.; KOONG, A.; CHEN, X. Quantitative PET of EGFR expression in xenograft-bearing mice using ^{64}Cu -labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v. 34, p. 850–858, 2007.
- 87- NIU, G.; LI, Z.; XIE, J.; LE, Q. T.; CHEN, X. PET of EGFR antibody distribution in head and neck squamous cell carcinoma models. **J. Nucl. Med.**, v. 50, p. 1116–1123, 2009.
- 88- ANDERSON, C. J.; FERDANI, R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. **Cancer Biother Radiopharm.** v. 4, p. 379–393, 2009.
- 89- VELIKYAN, I.; SUNDBERG, A. L.; LINDHE, O.; HÖGLUND, A. U.; ERIKSSON, O.; WERNER, E.; CARLSSON, J.; BERGSTRÖM, M.; LÅNGSTRÖM, B.; TOLMACHEV, V. Preparation and evaluation of ^{68}Ga -DOTA-hEGF for visualization of EGFR expression in malignant tumors. **J. Nucl. Med.**, v. 46, p. 1881–1888, 2005.
- 90- LÖVQVIST, A.; HUMM, J. L.; SHEIKH, A.; FINN, R. D.; KOZIOROWSKI, J.; RUAN, S.; PENTLOW, K. S.; JUNGBLUTH, A.; WELT, S.; LEE, F. T. *et al.* PET imaging of ^{86}Y -labeled anti-Lewis Y monoclonal antibodies in a nude mouse model: Comparison between ^{86}Y and (111)In radiolabels. **J. Nucl. Med.**, v. 42, p. 1281–1287, 2001.
- 91- VOSJAN, M. J. W. D.; PERK, L. R.; VISSER, G. W. M.; BUDDE, M.; JUREK, P.; KIEFER, G. E.; VAN DONGEN, G. A. M. S. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. **Nature Protocols**, v. 5, p. 739–743, 2010.
- 92- VAN DE WATERING, F. C. J.; RIJPKEMA, M.; PERK, L.; BRINKMANN, U.; OYEN, W. J. G.; BOERMAN, O. C. . Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. **BioMed Research International**, v. 14, p. 1–13, 2014.
- 93- SCHECHTER, N. R.; YANG, D. J.; AZHDARINIA, A.; KOHANIM, S.; WENDT, R.; OH, C. S.; HU, M.; YU, D. F.; BRYANT, J.; ANG, K. K. *et al.* Assessment of epidermal growth factor receptor with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ethylenedicysteine-C225 monoclonal antibody. **Anticancer Drugs**, v. 14, p. 49–56, 2003.
- 94- HUHTALA, T.; LAAKKONEN, P.; SALLINEN, H.; YLÄ-HERTTUALA, S.; NÄRVÄNEN, A. *In vivo* SPECT/CT imaging of human orthotopic ovarian carcinoma xenografts with 111In-labeled monoclonal antibodies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 37, p. 957–964, 2010.
- 95- VAN DIJK, L. K.; HOEBEN, B. A. W.; KAANDERS, J. H. A. M.; FRANSSEN, G. M.; BOERMAN, O. C.; BUSSINK, J. Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Head and Neck Cancer with SPECT/CT and 111In-Labeled Cetuximab-F(ab')₂. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, p. 2118–2124, 2013.
- 96- LEE, F. T.; O'KEEFE, G. J.; GAN, H. K.; MOUNTAIN, A. J.; JONES, G. R.; SAUNDER, T. H.; SAGONA, J.; RIGOPOULOS, A.; SMYTH, F. E.; JOHNS, T. G. *et al.* Immuno-PET quantitation of de2-7 epidermal growth factor receptor expression in glioma using ^{124}I -IMP-R4-labeled antibody ch806. **J. Nucl. Med.**, v. 51, p. 967–972, 2010.

- 97- DAGHIGHIAN, F. D.; PENTLOW, K. S.; LARSON, S. M, *et al.* Development of a method to measure kinetics of radiolabeled monoclonal antibody in human tumor with applications to microdosimetry: positron emission tomography studies of iodine-124-labeled 3F8 monoclonal antibody in glioma. *Ear J NucÃ-Med.*, 20:402-409, 1993.
- 98- NESTOR, M.; EKBERG, T.; DRING, J.; VAN DONGEN, G. A.; WESTER, K.; TOLMACHEV, V.; ANNIKO, M. Quantification of CD44v6 and EGFR expression in head and neck squamous cell carcinomas using a single-dose radioimmunoassay. *Tumour Biol.*, v. 28, p. 253-263, 2007.
- 99- NORDBERG, E.; FRIEDMAN, M.; GÖSTRING, L.; ADAMS, G. P.; BRISMAR, H.; NILSSON, F. Y.; STAHL, S.; GLIMELIUS, B.; CARLSSON, J. Cellular studies of binding, internalization and retention of a radiolabeled EGFR-binding affibody molecule. *Nucl. Med. Biol.*, v. 34, p. 609-618, 2007.
- 100- GAYKEMA, S. B.; DE JONG, J. R.; PERIK, P. J.; BROUWERS, A. H.; SCHRÖDER, C. P.; OUDE MUNNINK, T. H.; BONGAERTS, A. H.; DE VRIES, E. G.; LUB-DE HOOGE, M. N. (. doi: 10. 2310/7290. 2014. 00011. (111)In-trastuzumab scintigraphy in HER2-positive metastatic breast cancer patients remains feasible during trastuzumab treatment. *Mol Imaging.*;13(5), 2014.
- 101- DIJKERS, E. C.; T. H.; MUNNINK, O.; KOSTERINK, J. G. *et al.*, Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 87, no. 5, pp. 586–592, 2010.
- 102- LAM, K.; SCOLLARD, D. A.; CHAN, C.; LEVINE, M. N.; REILLY, R. M. Kit for the preparation of (111)In-labeled pertuzumab injection for imaging response of HER2-positive breast cancer to trastuzumab (Herceptin). *Appl Radiat Isot.*, v. 95C, p. 135-142, 2014.
- 103- MARU, D.; VENOOK, A. P. AND ELLIS, L. M. Predictive biomarkers for bevacizumab: are we there yet? *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 11, pp. 2824–2827, 2013.
- 104- GAYKEMA, S. B. M.; BROUWERS, A. H.; HOOGE, M. N. L. *et al.*, ⁸⁹Zr-bevacizumab PET imaging in primary breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 54, no. 7, pp. 1014–1018, 2013.
- 105- MASSICANO, A. V. F. **Desenvolvimento farmacotécnico de um radioimunoconjugado para terapia de linfoma não-Hodgkin.** Tese (Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2016.
- 106- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 107- COOPER, M. S.; SABBAAH, E.; MATHER, S. J. Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. *Nature Protocols*, v. 1, n. 1, p. 314 - 317, 2006.
- 108- BREEMAN, W. A. P.; JONG, M.; VISSER, T. J.; ERION, J. L.; KRENNING, E. P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ⁹⁰Y, ¹¹¹In and ¹⁷⁷Lu at high specific activities. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 30 (6): 917–920, 2003.
- 109- NIKULA, T. K.; CURCIO, M. J.; BRECHBIEL, M. W.; GANSOW, O. A.; FINN, R. D.; SCHEINBERG, D. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol.*, v. 22, n. 3, p. 387-90, 1995.

- 110- HENS, M.; VAIDYANATHAN, G.; WELSH, P.; ZALUTSKY, M. R. Labeling internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody with ^{177}Lu : *in vitro* comparison of acyclic and macrocyclic ligands. ***Nuclear Medicine and Biology***, v. 36, p. 117 - 128, 2009.
- 111- SABBAH, E. N.; KADOUCHE, J.; ELLISON, D.; FINUCANE, C.; DECAUDIN, D.; MATHER, S. J. *In vitro* and *in vivo* comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer. ***Nucl Med Biol.***, v. 34, n. 3, p. 293-304, 2007.
- 112- MISRI, R.; SAATCHI, K.; NG, S. S.; KUMAR, U.; HÄFELI, U. O. Evaluation of (^{111}In) labeled antibodies for SPECT imaging of mesothelin expressing tumors. ***Nucl Med Biol.***, v. 38, n. 6, p. 885-896, 2011.
- 113- BROWN, R., *et al.* Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. ***Anal Biochem.***, 180:136-9, 1989.
- 114- DADACHOVA, E.; CHAPPELL, L. L.; BRECHBIEL, M. W. Spectrophotometric method for determination of bifunctional macrocyclic ligands in macrocyclic ligand-protein conjugates. ***Nucl Med Biol.***, v. 26, n. 8, p. 977-982, 1999.
- 115- SIEGEL M.M.; HOLLANDER I.J.; HAMANN P.R.; JAMES J.P.; HINMAN L.; SMITH B.J. Matrix-assisted laser desorption-UV/ionization mass spectrometric analysis of monoclonal antibodies for the determination of carbohydrate, conjugated chelator and conjugated drug content. ***Anal Chem.***, 63:2470-81, 1991.
- 116- ANVISA. ***Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 64***, 18 de dezembro de 2009.
- 117- LINDMO, T.; BOVEN, E.; CUTTITTA, F.; FEDORKO, J.; BUNN, P. A. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. ***J Immunol Methods.***, v. 72, n. 1, p. 77-89, 1984.
- 118- CHANG, A. J.; SILVA, R. A.; LAPI, S. Development and Characterization of ^{89}Zr -Labeled Panitumumab for Immuno-Positron Emission Tomographic Imaging of the Epidermal Growth Factor Receptor. ***Mol Imaging.*** v. 12, n. 1, p. 17-27, 2013.
- 119- FDA acess data Erbitux. Disp, em: <<https://goo.gl/GLp6RR>>.
- 120- LIU, S.; EDWARDS, D. S. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. ***Bioconjug Chem.***, v. 12, n. 1, p. 7-34, 2001.
- 121- NELSON, D. L.; COX, M. M. ***Lehninger Principios de Bioquímica***. 3 ed. São Paulo: Savier, 2002.
- 122- WOJDOWSKA, W.; KARCZMARCZYK, U.; MAURIN, M.; GARNUSZEK, P.; MIKOLAJCZAK, R. Standardization of Procedures for the Preparation of (^{177}Lu) - and (^{90}Y) -labeled DOTA- Rituximab Based on the Freeze-dried Kit Formulation. ***Curr Radiopharm.***, v. 8 n. 1, p. 62-68, 2015.
- 123- SHIN, I. S.; LEE, S. M.; KIM, H. S.; YAO, Z.; REGINO, C.; SATO, N. *et al.* Effect of chelator conjugation level and injection dose on tumor and organ uptake of ^{111}In -labeled MORAb-009, an anti-mesothelin antibody. ***Nucl Med Biol.***, 38:1119–27, 2011.
- 124- PIPPIN, C. G.; PARKER, T. A.; MCMURRY, T. J.; BRECHBIEL, M. W. Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. ***Bioconjug Chem.***, v. 3, n. 4, p. 342-5, 1992.
- 125- WAKANKAR, A.; CHEN, Y.; GOKARN, Y.; JACOBSON, F. S. Analytical methods for

- physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs*. 3(2):161–172. doi: 10.4161/mabs.3.2.14960, 2011.
- 126- BRADY, E. D. *et al.* Development of a spectroscopic assay for bifunctional ligand-protein conjugates based on copper. *Nucl Med Biol*, v. 31, n. 6, p. 795-802, 2004.
- 127- KHOJASTEH, S. C.; WONG, W.; HOP, C. E. C. A. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics Quick Guide*. Nova York: Springer, 2011.
- 128- SANTOS, B. F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Ed.) *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p 308.
- 129- LOENING, A. M.; GAMBHIR, S. S. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging*. 2:131–37, 2003,
- 130- GENE ATLAS U133A. *BioGPS*, disp. em: <<http://biogps.org/dataset/1/>>. Acesso: 14 de novembro de 2015.
- 131- MEIJS, W. E.; HERSCHEID, J. D. M.; HAISMA, H. J.; PINEDO, H. M. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *Appl Radiat Isotopes*., 43:1443–7, 1992.
- 132- WRIGHT, B. D.; LAPI, S. E. Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use. *J Nucl Med*., v. 54, n. 8, p. 1171-1174, 2013.
- 133- TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. *Quím. Nova*, vol. 27 no. 4 São Paulo July/Aug. 2004.
- 134- DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. *Bioconjug Chem*, v. 18, n. 5, p. 1516-1520, 2007.
- 135- PEREZ, L. R. AND FRANZ, K. J. Minding metals: Tailoring multifunctional chelating agents for neurodegenerative disease. *Dalton Trans*. March 7; 39(9): 2177–2187, 2010.
- 136- BAROK, M.; TANNER, M.; KÖNINKI, K. AND ISOLA J. Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Research*,13:R46, 2011.
- 137- THAKRAL, P.; SINGLA, S.; YADAV, M. P.; VASISHT, A.; SHARMA, A.; GUPTA, S. K.; BAL, C. S.; SNEHLATA and MALHOTRA, A. An approach for conjugation of ¹⁷⁷Lu-DOTA-SCN- Rituximab (BioSim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins lymphoma patients. *Indian J Med Res*. Apr; 139(4): 544–554, 2014.

ANEXOS

1 Aprovação do Comitê de Ética

Comitê de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 122/13/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“METAIODOBENZILGUANIDINA (MIBG) MARCADA COM 124I: INOVAÇÃO EM TECNOLOGIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS”** de responsabilidade da pesquisadora **DR^a ELAINE BORTOLETI DE ARAUJO** foi considerado **APROVADO**.

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

São Paulo, 31 de outubro de 2013.

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

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ 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: nnascime@ipen.br

2 Carta da CEUA-IPEN/SP sobre alteração do Plano de Trabalho

Comissão de Ética no Uso de Animais

DECLARAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUAIPEN) declara estar ciente de que o projeto intitulado "Metaiodobenzilguanidina (MIBG) marcada com ^{124}I : Inovação em tecnologia por emissão de pósitrons", cuja aprovação por esta comissão foi registrada pelo Parecer 122/13, foi alterado e passou a ser intitulado " ^{89}Zr -Imuno-PET/ ^{111}In -Imuno-SPECT: Desenvolvimento radiofarmacêutico de agentes de imagem molecular para receptores EGF", observado que o número de animais e devidos procedimentos serão mantidos para o novo projeto.

São Paulo, 9 de novembro de 2017.

Patrick Jack Spencer
Vice-coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IPEN

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP

Telefones: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709

E-mail: ceuaipen@ipen.br

3 Laudo do Centro Veterinário de Anatomia Patológica

Daniel Soares Sanches
CRMV - SP 17.021

Carolina G. Pires
CRMV - SP 18.634

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

Número	H-006965								
Nome	Scid	Espécie	Roedor	Raça	Camundongo	Sexo	F	Idade	03
Proprietário(a)	Raquel Benedetto								
Veterinário(a)	Raquel Benedetto			Clínica	Raquel Benedetto				
Material	Fragmento de Nódulo								

LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO.

Avaliação Macroscópica

Encaminhado fragmento nodular medindo 1,0 cm de diâmetro de superfície irregular e coloração esbranquiçada. Ao corte consistência macia, superfície irregular, coloração esbranquiçada e aspecto homogêneo.

Técnica Histológica

Hematoxilina & Eosina

Avaliação Microscópica

A análise microscópica do fragmento nodular encaminhado revela proliferação neoplásica de células epiteliais escamosas arranjadas de forma sólida por vezes contendo queratinização central (perla córnea) sustentadas por discreto estroma colagenoso. Essas células exibem abundante citoplasma eosinofílico de contornos indefinidos, núcleo ovalado e um ou dois nucléolos evidentes. O pleomorfismo é moderado, e verifica-se anisocitose e anisocariose moderados. O índice mitótico é moderado, com figuras de mitoses atípicas. Entre as células neoplásicas nota-se moderado infiltrado linfoplasmocítico.

Diagnóstico:

Fragmento cutâneo: quadro morfológico compatível com Carcinoma de células escamosas.

Conferido e assinado eletronicamente por: Carolina G. Pires CRMV - SP 18.634

São Paulo, quinta-feira, 5 de novembro de 2015

4 Carta de aprovação do Protocolo para experimentação animal – IACUC- Alabama

THE UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM
Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

MEMORANDUM

DATE: 24-Aug-2017

TO: Lapi, Suzanne E.

FROM:

Robert A. Kesterson, Ph.D., Chair

Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

SUBJECT: NOTICE OF APPROVAL

The following application was approved by the University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on 24-Aug-2017.

Protocol PI: Lapi, Suzanne E.

Title: Development of radioimmunoconjugate for diagnosis and management of head-and-neck subclinical cancer and colorectal carcinoma

Sponsor: UAB DEPARTMENT

Animal Project Number (APN): IACUC-21026

This institution has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), is registered as a Research Facility with the USDA, and is accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC).

This protocol is due for full review by 23-Aug-2020.

Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)	Mailing Address:
CH19 Suite 403	CH19 Suite 403
933 19th Street South	1530 3rd Ave S
(205) 934-7692	Birmingham, AL 35294-0019
Fax (205) 934-1188	

5 Declaração – Publicação do Artigo

DECLARATION

We declare the manuscript: **“Development of radioimmunoconjugate for diagnosis and management of head-and-neck subclinical cancer and colorectal carcinoma”**, authors **Raquel Benedetto, Adriana Vidal Fernandes Massicano, Jefferson Jesus Silva, Cristian Antonio Wieczorek Villas Boas, Jair Mengatti and Elaine Bortoleti de Araújo** has been accepted for publication in *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. It will be published in v.53, n.4, Article e17039, 2017.

September 13th, 2017

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Daniela Pires'.

Daniela Pires
Editorial Board