



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

**Desenvolvimento farmacotécnico de kit liofilizado para pronta marcação com
68Ga e avaliação pré-clínica**

MARIA RENATA VALENTE BRANDÃO FREIRE

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

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

**São Paulo
2024**

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

**Desenvolvimento farmacotécnico de kit liofilizado para pronta marcação com
68Ga e avaliação pré-clínica**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

MARIA RENATA VALENTE BRANDÃO FREIRE

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

Orientadora:

Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo
2024

Fonte de Financiamento: FAPESP (PROCESSO FAPESP número- 2019/04172-7) e CNEN

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

Como citar:

FREIRE, M. R. V. B. **DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE KIT LIOFILIZADO PARA PRONTA MARCAÇÃO COM 68Ga E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA**. 2024. 190 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

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

Freire, Maria Renata Valente Brandão
DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE KIT LIOFILIZADO PARA PRONTA MARCAÇÃO COM 68Ga E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA / Maria Renata Valente Brandão Freire; orientador Elaine Bortoleti de Araújo. -- São Paulo, 2024.
190 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2024.

1. Câncer de próstata metastático. 2. Gerador 68Ge/68Ga (BPF). 3. PSMA-11-68Ga. 4. kit liofilizado. 5. Imagem Molecular PET/CT. I. de Araújo, Elaine Bortoleti, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Maria Renata Valente Brandão Freire

Título: Desenvolvimento farmacotécnico de kit liofilizado para pronta marcação com ^{68}Ga e avaliação pré-clínica

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

Data: 14/03/2024

Banca Examinadora

Prof^a. Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CECRF

Presidente

Prof^a. Dra.: Camila Motta Venchiarutti Moniz

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP

Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dra.; Margareth Mie Nakamura Matsuda

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CR

Julgamento: Aprovado

Prof^a. Dra.: Ana Cláudia Camargo Miranda

Hospital Israelita Albert Einstein

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Ruy e Cleusa.

EPÍGRAFE

"Uma coisa eu aprendi: que toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e ainda assim é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, especialmente à minha mãe Cleusa, meu pai Ruy “in memorian”, minha irmã Daniela e meu amado Luiz Alexandre Brandão Freire que sempre me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Infelizmente, no ano de 2020 e em meio à Pandemia de Covid-19 meu pai veio a falecer em função de uma doença rara, terrível e silenciosa. Meu pai sempre acreditou na ciência e valorizou o conhecimento. Me lembro com carinho e saudades de seu especial interesse por bioquímica metabólica e grande admiração pelos trabalhos de pesquisa de bioquímicos que levaram à identificação de ciclos metabólicos importantes e metabolismo de células tumorais. Em seu tempo livre passava horas desenhando as vias metabólicas dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Meu interesse, admiração e curiosidade científica certamente vieram do meu pai. A saudade e a falta são enormes e este trabalho é dedicado em especial ao meu pai e a todo o seu esforço e dedicação de anos para que os filhos tivessem acesso à melhor educação que pôde oferecer.

Gostaria de expressar o meu muito especial agradecimento à minha filha Gabriella, que é uma das minhas maiores incentivadoras na pesquisa científica.

À minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, pela confiança e oportunidade de desenvolver este projeto de Doutorado. Durante os meus anos de trajetória de mestrado e doutorado no Centro de Radiofarmácia sempre a vi orientar e ensinar com uma incrível paciência todos os seus alunos.

Gostaria de agradecer à toda equipe do Centro de Radiofarmácia (CECRF): Margareth Mie Nakamura Matsuda, Dulcila Bernardes, Patricia Martins, Flávia Zanella, Vivian Mendonça, Zé, Ideli Moraes de Oliveira, Laércio, Carlos Felgueiras, Lígia Benito, Cabral, Luan, Jânio, Joel Mendes dos Santos e Natanael pela amizade sincera, apoio durante todos esses anos e toda a ajuda com as análises com eluatos do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.

À equipe da produção da Radiofarmácia, em especial Luís Alberto, Rosana Herreiras e Jamil, sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar a fornecer as amostras de ^{177}Lu para as radiomarcações.

Gostaria de agradecer a todos do Centro de Biotecnologia, especialmente à, Carlos Roberto Jorge Soares, gerente do CEBIO, Felipe Douglas Silva, Johnny Oliveira pela disponibilidade e aprendizagem com os ciclos de liofilização que precisei realizar em equipamento do Centro.

À equipe de proteção radiológica do Centro de Radiofarmácia Eduardo Gerulis e Olavo, por todo auxílio com os rejeitos radioativos no laboratório de pesquisa.

Ao departamento de Tecnologia Farmacêutica chefiado pelo Dr. Marco Antônio Stephano e à especialista Natália Marchesan Bexiga pelo auxílio com os estudos de caracterização das temperaturas críticas.

À equipe do departamento de Medicina Nuclear do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial à Marycel Barboza, Ana Carolina e Ana Cláudia Camargo Miranda por terem me recebido num momento tão difícil de falta do radionuclídeo ^{68}Ga no Centro de Radiofarmácia do IPEN. Esse apoio foi fundamental para continuidade do trabalho e testar a radiomarcagem do produto liofilizado.

Ao pessoal do CEBIO Cibele Peroni, Maria Helena Bellini, Laura Garcia e Felipe pela parceria com os estudos biológicos.

Gostaria de agradecer por toda a amizade, apoio e parceria do grupo de pesquisa cuja maioria já defendeu brilhantemente seus trabalhos Cristian, Bianca, Luiza, Joel, Ana Cláudia e Fábio.

À toda equipe do Biotério, Alex Alves Rodrigues, Neide, Cecília, Ismária, pela atenção, fornecimento dos animais e cuidados com os mesmos.

À banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos funcionários da pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) sempre muito atenciosos.

Agradeço imensamente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (PROCESSO FAPESP número- 2019/04172-7), à Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, à Universidade de São Paulo, (USP) pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos durante o Doutorado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do mecanismo de ação de Quimeras Direcionadas à Proteólise (PROTACs) e Degradadores Seletivos de AR (SARD). (PROTACs : Proteolysis-Targeting Chimeras e SARs: Selective AR degraders).42
- Figura 2** - Mecanismo de ação dos inibidores de PARP. PARPi evitam que PARP repare quebras de DNA de fita simples. As proteínas BRCA mutadas perdem a capacidade reparar quebras de DNA de fita dupla, resultando em morte celular. (PARP: Poly ADP-ribose polymerase, BRCA: breast cancer gene, mBRCA: mutated BRCA gene).43
- Figura 3** - Mecanismo de ação dos inibidores PD-L1 e PD-1. A interação entre PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células T resulta na inativação da evasão do sistema imunológico e na sobrevivência das células tumorais. (PD-L1: Programmed-Death Ligand 1, PD-1: Programmed Cell Death Protein 1).45
- Figura 4** - Mecanismo de ação do PSMA-617 marcado com lutécio-177, direcionado ao antígeno de membrana específico da próstata: a molécula direcionada ao PSMA radiomarcada com Lu-177 liga-se ao receptor PSMA na membrana celular do câncer de próstata. O Lu-177 emite partículas β - e γ causando danos ao DNA e morte celular. (PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen).46
- Figura 5** – Representação do mecanismo de ação do acoplador de células T biespecífico (BiTE®: Bispecific T cell Engager, CD: complexo de diferenciação)..47
- Figura 6** - Mecanismo de ação da via PI3K/AKT/mTOR. O fator de crescimento se liga ao receptor de fator de crescimento na membrana da célula tumoral resultando na ativação da via PI3K, AKT e mTOR. A ativação de mTOR resulta em síntese de proteína e crescimento celular. PTEN regula negativamente o PI3K e resulta na diminuição da ativação da via PI3K/AKT/mTOR. Os inibidores PI3K, AKT e mTOR bloqueiam a ativação desta via e resulta em morte celular. (PI3K: fosfoinosítídeo 3-quinase, AKT: proteína quinase B, mTOR: mecanístico alvo da rapamicina, PTEN: fosfatase e homólogo de tensina). (PI3K: phosphoinositide 3-kinase, AKT: protein kinase B, mTOR: mechanistic target of rapamycin, PTEN: phosphatase and tensin homolog).49

Figura 7 - Representação esquemática da proteína transmembrana PSMA/GCPII.	57
Figura 8 - Arranjo estrutural do sítio de ligação dos radionuclídeos: porção carregadora do radionuclídeo (quelante), espaçador funcional e sítio de ligação ao receptor PSMA (grupo farmacofórico).....	59
Figura 9 - Estrutura química do PSMA-11- ⁶⁸ Ga. Em vermelho o radionuclídeo ⁶⁸ Ga, em verde estrutura química do quelante (HBED-CC) e em preto estrutura química do sítio de ligação (grupo farmacofórico) (glu-ureia-lys).	61
Figura 10 - Estrutura química do PSMA-617. A estrutura do espaçador naftílico é destacada em vermelho e a estrutura do ligante ciclohexil em azul.	63
Figura 11 - Estrutura química do PSMA I&T.	65
Figura 12 - Representação da interação ligante-receptor entre SST e SSTR (chave e fechadura), que desencadeia uma cascata de sinais dentro da célula.	66
Figura 13 - Estruturas moleculares de a, DOTATOC; b, DOTATATO e c, DOTA	68
Figura 14 - Esquema de decaimento de ⁶⁸ Ga para ⁶⁸ Zn estável.....	71
Figura 15 - Representação esquemática de aquisição de imagem PET.....	72
Figura 16 - Geradores de germânio-68 (⁶⁸ Ge) /gálio-68 (⁶⁸ Ga) de grau radiofarmacêutico BPF. Em A da esquerda para a direita: Gallipharm® do fabricante Eckert & ziegler, Galli Ad® do fabricante IRE e em B GeGant® do fabricante ITG.	75
Figura 17 – Esquema simplificado do decaimento do ¹⁷⁷ Lu.....	81
Figura 18 - Duas rotas diferentes para a produção de ¹⁷⁷ Lu em reatores nucleares.	82
Figura 19 - Diagrama de fases da água.....	88
Figura 20 - Aspecto das pastilhas formadas após o ciclo de liofilização (colapso). Em (A), a formulação por frasco consiste em 130 mg de tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 5,0. Em (B), a formulação foi acrescida de 5 mg de manitol por frasco.	118
Figura 21 - Escala de cor montada para o indicador Vermelho do Congo para pH entre 1,0 e 8,0. Os frascos continham meios com pH 1,0; 3,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,24; 6,36 e 8,0 respectivamente da esquerda para a direita.	120
Figura 22 – Frascos com as formulações após ciclo de liofilização. Em (A) apenas 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0. Em (B) acréscimo de 5 mg de manitol /frasco e em (C) acréscimo de 20 mg de manitol /frasco.....	121

Figura 23 – Frascos com as formulações após ciclo de liofilização. Em (A) solução com 5 mg/frasco de manitol (pH 6,24). Em (B) solução de 20 mg/frasco de manitol (pH 6,24) e em (C) 1 mL tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 com acréscimo de 5 mg/frasco de manitol a formulação.	122
Figura 24 - Curva DSC obtida para a formulação de PSMA-11 com manitol. A amostra foi esfriada até - 60 °C a 5 °C/ minuto e depois aquecida até 20 °C com taxa de 10 °C/ minuto. Pode-se observar as temperaturas críticas: fusão eutética = 5,10 °C e Tg” = - 42,90 °C.....	126
Figura 25 - Imagem obtida do processo de liofilização observado ao microscópio de liofilização. Imagem da formulação seca de PSMA-11 com 20 mg de manitol.	127
Figura 26 - Aspecto homogêneo e íntegro das pastilhas obtidas após liofilização da formulação proposta de PSMA-11 com 20 mg de manitol (N=15 frascos).....	127
Figura 27 - Porcentagem da impureza de ⁶⁸ Ge (⁶⁸ Ge “breakthrough”) do gerador ITG no período de 18 meses após data de calibração, expresso como porcentagem da atividade ⁶⁸ Ge presente no gerador no momento da eluição (N=12).	130
Figura 28 – Cromatograma do padrão de referência do PSMA-11 (detector UV:280nm). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % Ácido trifluoroacético-TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 padrão de referência como porcentagem do total da área (ROI: %).	131
Figura 29 – Cromatograma do precursor PSMA-11 (detector UV:280nm). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 precursor como porcentagem do total da área (ROI: %).	132
Figura 30 – Cromatograma de CLAE do ⁶⁸ Ga livre (detector radioativo). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ⁶⁸ Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %).	132
Figura 31 – Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11- ⁶⁸ Ga obtido com marcação em pH 4,5, aquecimento 90 °C por 10 minutos (detector radioativo).	

Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %). 134

Figura 32 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido com marcação em pH 5,0, aquecimento 90°C por 10 minutos (detector radioativo).

Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %). 134

Figura 33 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido com marcação em pH 5,5, aquecimento 90°C por 10 minutos (detector radioativo).

Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %). 135

Figura 34 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga representativo da marcação em pH 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %). 136

Figura 35 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga acrescido de 5 mg de manitol à formulação marcado em pH 4,5, Temperatura Ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters 250mm X 4,6. fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água ultrapura (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V sob fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como uma porcentagem do total de área (ROI: %). 140

Figura 36 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga acrescido de 20 mg de manitol à formulação marcado em pH 4,5, Temperatura Ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters 250mm X 4,6. fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água ultrapura (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V sob fluxo de 0,6 mL/ min.

<i>Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).</i>	140
Figura 37 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11- ⁶⁸ Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 congelado (formulação 1) após 1 mês de armazenamento sob congelamento a – 20 °C (T = 1 mês). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11- ⁶⁸ Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).	142
Figura 38 - Pureza radioquímica do kit PSMA-11 congelado 2 (detector radioativo) durante estudos de estabilidade após 1 mês de congelamento sob congelamento a – 20°C (T = 1 mês). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 - ⁶⁸ Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).	143
Figura 39 - Porcentagem de pureza radioquímica da marcação do kit de PSMA-11 congelado (formulação 1) determinada durante um período de 6 meses.	144
Figura 40 - Porcentagem de pureza radioquímica da marcação do kit de PSMA-11 congelado (formulação 2) determinada durante um período de 6 meses.	144
Figura 41 - Perfil de CLAE (UV:280nm) análise da integridade do peptídeo PSMA-11 após ciclo de liofilização (descrito na seção 6.2.3). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 liofilizado como porcentagem do total de área (ROI: %).	146
Figura 42 – Cromatograma de CLAE do PSMA-11- ⁶⁸ Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 imediatamente após liofilização. Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 - ⁶⁸ Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).	148
Figura 43 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11- ⁶⁸ Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 40 dias após liofilização. Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters,	

fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 ⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %). 149

Figura 44 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 75 dias após liofilização. Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 ⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %). 150

Figura 45 - Cromatograma do padrão de referência do DOTATATO (detector UV:220nm). As condições de CLAE utilizadas foram: fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO padrão de referência como porcentagem do total de área (ROI: %). 152

Figura 46 – Cromatograma do precursor DOTATATO (detector UV:220nm). As condições de CLAE utilizadas foram fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO precursor como porcentagem do total de área (ROI: %). 153

Figura 47 – Cromatograma do ⁶⁸Ga livre (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ⁶⁸Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %). 154

Figura 48 – Cromatograma DOTATATO-⁶⁸Ga marcado em tampão acetato de sódio 0,25 M pH 4,0, 40% V/V de etanol absoluto, aquecimento a 95 °C por 30 minutos (pH final entre 1,0 e 2,0) (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram: fase móvel (A) ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9

V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO-⁶⁸Ga e ⁶⁸Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %). 155

Figura 49 - Cromatograma do precursor PSMA-I&T (detector UV:214nm). As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-I&T precursor como porcentagem do total de área (ROI: %). 157

Figura 50 – Cromatograma ¹⁷⁷Lu livre (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ¹⁷⁷Lu livre como uma porcentagem do total de área (ROI: %). 158

Figura 51 - Perfil de análise por CLAE do radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu. As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Tempo de retenção (TR) de 12m:31s e pureza radioquímica de 98,5 % (ROI). 159

Figura 52 - Ligação do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (18,94 MBq/poço; 0,67nmol/poço) após 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos de incubação (n=3). A captação é expressa em fmol como média ± desvio padrão das triplicatas. As barras de erro indicam desvio padrão. 161

Figura 53 - Ensaio de saturação. O PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu foi incubado com 2×10^5 células/poço a 4 °C por 60 minutos em concentrações crescentes (variando de 0,01 a 3 nM). Cada ponto representa média ± desvio padrão (n=3). 162

Figura 54 - Ensaio de competição em células LNCaP-PSMA+, empregando PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (5 nM) como ligante e PSMA-11 (75 nM) como competidor, meio RPMI 1640 + 10% de soro fetal bovino, 1 hora de incubação a 4°C. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3 para cada condição). 164

Figura 55 - Biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu em camundongos machos SCID-BALB/c com modelo de tumor de células LNCap PSMA+, expressa em

porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5)..... 167

Figura 56 - Biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu sem e com administração de 100µg/camundongo do PSMA-11 liofilizado reconstituído (competidor) 30 minutos antes do radiofármaco. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5). Os asteriscos indicam significância (***) $P \leq 0,001$). 172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela comparativa dos principais geradores disponíveis no mercado.	76
Tabela 2 - Formulações avaliadas no estudo de variação de pH durante liofilização.	97
Tabela 3 - Condições de liofilização do estudo de variação de pH.....	98
Tabela 4 - Temperaturas de prateleira do ciclo de liofilização, rampas de resfriamento e aquecimento e tempo de manutenção (holding) de cada passo.	100
Tabela 5 – Características dos geradores: ITG X Eckert & Ziegler	101
Tabela 6 – Ensaio de controle de qualidade e os correspondentes critérios de aceitação farmacopeicos da solução de cloreto de galio-68 para radiomarcção.	103
Tabela 7 - Capacidade tamponante do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M e no pH de 5,0 e ascorbato de sódio na concentração 2,5 M e pH 5,0 frente à adição de 4 mL de HCl 0,05 M.....	117
Tabela 8 - Resultados do controle de qualidade do eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador ^{68}Ge - ^{68}Ga ITG e critérios de aceitação. (N=18).	129
Tabela 9 - Concentração da impureza metálica (Fe) do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG nos eluatos de ^{68}Ga expressos como média \pm desvio padrão de três períodos diferentes: (1) primeiros 6 meses iniciais, (2) 6 meses intermediários e (3) 6 meses finais. A concentração de Fe é expressas em $\mu\text{g}/\text{GBq}$	129
Tabela 10 - Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) de PSMA-11- ^{68}Ga : radiomarcção em diferentes pH (5,5, 5,0 e 4,5). (N = 3).....	133
Tabela 11 – Resultados da confirmação do pH do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M (1 mL) após adição de 4 mL de eluato do gerador ITG (HCl 0,05 M).....	136
Tabela 12 - Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) de PSMA-11- ^{68}Ga : radiomarcção realizada com aquecimento a 90°C e em temperatura ambiente. (N = 3).	137
Tabela 13 - Porcentagem de pureza radioquímica (CCD) do PSMA-11- ^{68}Ga acrescido de 5 mg ou 20 mg de manitol à formulação. Marcado com tampão acetato de sódio 1,5 M e pH 5,0 e com pH final da reação de 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (N = 3).	139

Tabela 14 – Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) do kit PSMA-11 marcado com gálio-68 imediatamente, após 40 dias e 75 dias decorridos da liofilização (armazenamento a – 20 °C). pH final da reação de 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (N = 1; média triplicata das fitas).	147
Tabela 15 – Pureza radioquímica da marcação de kit liofilizado de PSMA-11 com 3,5 mL (43,03 GBq) de solução de ⁶⁸ GaCl ₃ eluída de Gerador Eckert & Ziegler com solução de HCl 0,1M. Marcação à temperatura ambiente por 10 minutos Análise por radio-CCD scanner. CCD (%): acetato de amônio/metanol 1:1. (N=4).	151
Tabela 16 - Biodistribuição do ¹⁷⁷ Lu-PSMA I&T (% Al/g ou % Al/mL) em camundongos SCID-BALB/c machos portadores de tumores de próstata subcutâneos após administração intravenosa e eutanásia aos 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5). .	168
Tabela 17 - Razão tumor-sangue (%Al/g/%Al/mL), tumor-órgãos (%Al/g/%Al/g) em função do tempo (30 minutos, 60 minutos e 120 minutos) na biodistribuição do PSMA-I&T- ¹⁷⁷ Lu em camundongos SCID portadores de tumor (células LNCaP). Calculado a partir das médias de %Al/ g ou mL (n=5).	169
Tabela 18 - Biodistribuição do PSMA-I&T- ¹⁷⁷ Lu sem e com administração de 100 µg/camundongo do PSMA-11 liofilizado reconstituído (competidor), 30 minutos antes do radiofármaco. Os dois grupos de animais foram eutanasiados 60 minutos pós-injeção. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5).	171

LISTA DE ABREVIATURAS

%AI	Porcentagem de atividade injetada
%AI/g	Porcentagem de atividade injetada por grama
%AI/mL	Porcentagem de atividade injetada por mL
%AI/sg total	Porcentagem de atividade injetada em sangue total
%PR	Porcentagem de Pureza Radioquímica
%PRn	Porcentagem de Pureza Radionuclídica
°C	Graus Celsius
μCi	MicroCurie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
¹⁷⁷ Lu	Radioisótopo de lutécio com número de massa 177
¹⁸ F	Radioisótopo de flúor com número de massa 18
⁶⁴ Cu	Radioisótopo de cobre com número de massa 64
⁶⁸ Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 68
AC	<i>Adenylate Cyclase</i> , Adenilato Ciclase
ADT	Androgen-Deprivation Therapy, Terapia de privação de Androgênio
AKT/	<i>Protein kinase B</i> , proteína quinase B
AMPC	<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i> , Adenosina monofosfato cíclico
AR	<i>Androgen Receptor</i> , Receptor de Andrógeno
AR-Vs	<i>AR-Variants</i> , Variantes de Receptores de Andrógenos
BCR	Biochemical Recurrence, Recorrência Bioquímica
BiTE®	<i>Bispecific T cell Engager</i> , envolvimento de células T biespecíficas de células T
B _{max}	Densidade máxima de receptores
Bq	Bequerel
BRCA1	Breast cancer 1, câncer de mama 1
BRCA2	Breast câncer 2, câncer de mama 2
CCD-SG	Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel
CEBIO	Centro de Biotecnologia
CECRF	Centro de Radiofarmácia

Ci	Curie
CL	Clareamento Sanguíneo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CPM	Contagens por minuto
CRPC	Castration (or hormone) Resistant Prostate Cancer, Câncer de Próstata Resistente à Castração
CSPC	Castration (or hormone) Sensitive Prostate Cancer, Câncer de Próstata Sensível à Castração
DHT	Diidrotestosterona
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DOTATANOC	1,4,7,10-tetraazociclododecanoídeo 1,4,7,10-tetra-acico
DOTATATO	DOTA-Tyr3-Octreotato
DOTATOC	DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotideo
DP	Desvio Padrão
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FDA	Food and Drug Administration
FDG- ¹⁸ F	fludesoxiglicose (¹⁸ F)
G	Grama
GBq	Giga Becquerel
GEP-NETs	<i>Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors</i> , Tumores Neuroendócrinos Gastro-Entero-Pancreáticos
GI	Gastro Intestinal (Trato)
GLOBOCAN	Observatório Mundial do Câncer
GMP	<i>Good Manufacture Practices</i> (Boas Práticas de fabricação)
H	Horas
HBED-CC	ácido N-N'-bis-[2-hidroxi-5-(carboxietil)benzil] etilenediamino- N-N' diacético
HR	<i>Homologous Recombination</i> , Recombinação Homóloga
IC ₅₀ %	Concentração inibitória 50%
iCCD-SG	Cromatografia instantânea em Camada Delgada de Sílica Gel
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITG	Isotopen Technologies Garching GmbH

K _d	Constante de dissociação em equilíbrio
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i> , Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i> , Domínio de ligação ao ligante
LNCaP	Célula de carcinoma prostático humano androgênio-dependente
LR	Local Recurrence, Recorrência Local
M	Molar
MBq	Mega Becquerel
mCi	Mili Curie
mCRPC	Metastatic Castration (or hormone) Resistant Prostate Cancer, Câncer de Próstata Metastático Resistente à Castração
mg	miligrama
min	Minutos
mL	mililitro
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i> , mecanístico alvo da rapamicina
n	Números
NECs	<i>Neuroendocrine Carcinomas</i> , Carcinomas Neuroendócrinos
NETs	<i>Neuroendocrine Tumors</i> , Tumores Neuroendócrinos
ng	Nano grama
nM	nano molar
nmol	nano mol
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Overall Survival, Sobrevida Global
PARPi	<i>Poly ADP-Ribose Polymerase Inhibitors</i> , Inibidores de Poli ADP-Ribose Polimerase
PBS	Tampão fosfato-salina
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i> , Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L1	<i>Programmed-Death Ligand 1</i> , Ligante de Morte Programada 1
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> , Tomografia por Emissão de Pósitrons
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K/	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> , fosfoinosítideo 3-quinase
PR	<i>Radiochemical purity</i> , Pureza Radioquímica
PROTACs	<i>Proteolysis-Targeting Chimeras</i> , Quimeras direcionadas a Proteólise
PSA	Prostate Specific Antigen, Antígeno Prostático Específico

PSMA	<i>Prostate Specific Membrane Antigen</i> , Antígeno de Membrana Prostático Específico
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> , fosfatase e homólogo de tensina
q.s.p	quantidade suficiente para
Rf	Retention Factor, Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROI	<i>Region of Interest</i> , Região de Interesse
rPFS	<i>radiographic Progression-Free Survival</i> , Sobrevida Livre de Progressão radiográfica
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SARDs	<i>Selective AR degraders</i> , Degradadores Seletivos de AR
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SCID-BALB/c	Camundongos <i>BALB/c</i> imunodeficientes a partir de modificação genética
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	<i>Single Photon Emission Computer Tomography</i> , Tomografia por Emissão de Fóton Único
SR	Systemic Recurrence, Recorrência Sistêmica
SSB	<i>Single Strand DNA break</i> , Quebra de fita simples de DNA
SST	<i>Somatostatin</i> , Somatostatina
SSTRs	Somatostatin Receptors, Receptores de Somatostatina
SUV	<i>Standardized uptake value</i> , valor de captação padronizado
T	Testosterona
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
TC	Tomografia Computadorizada
T _{col}	Temperatura de colapso
T _{eut}	Temperatura eutética
T' _g	Temperatura de transição vítrea
T _R	Tempo de retenção
UI	Unidades Internacionais
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Fator de Crescimento Endotelial Vascular

β^-	Radiação beta com carga negativa (elétron e^-)
β^+	Radiação beta com carga positiva (pósitron e^+)
γ	Radiação gama

RESUMO

FREIRE, Maria R.V.B. **Desenvolvimento farmacotécnico de kit liofilizado para pronta marcação com ^{68}Ga e avaliação pré-clínica.** 2024.190 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Atualmente, na detecção do câncer de próstata metastático, as moléculas alvo do receptor transmembrana tipo II, denominadas “PSMA”, em função do receptor ao qual se ligam, demonstram ser uma alternativa superior a outras modalidades de imagem convencionais, bem como a outros agentes de imagem PET como FDG- ^{18}F ou Colina- ^{18}F . O PSMA-11- ^{68}Ga foi aprovado nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration (FDA) como o primeiro radiofármaco marcado com ^{68}Ga para imagens PET de câncer de próstata positivo para PSMA em 2020. Este radiofármaco é considerado o mais promissor para detecção de micro e oligometástases no câncer de próstata avançado, sendo utilizado para o planejamento terapêutico, bem como para a avaliação da resposta ao tratamento. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um kit liofilizado de peptídeo receptor-específico para a marcação direta com ^{68}Ga para solucionar o problema de limitação de distribuição em função da distância.

As condições de radiomarkação direta de peptídeos receptor-específicos com ^{68}Ga foram avaliadas e padronizadas utilizando-se eluato de geradores $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ BPF de dois diferentes fabricantes. Os parâmetros de radiomarkação foram estudados, incluindo variação de pH, de concentração do tampão de acetato de sódio, da temperatura e uso de manitol, para definição da formulação de um kit para pronta marcação. O processo de liofilização da formulação de PSMA-11 foi estudado. A pureza radioquímica das marcações foi avaliada por CCD e CLAE. Foi realizada avaliação biológica com o PSMA-11 liofilizado para demonstrar a integridade do peptídeo e preservação da atividade biológica após o processo de liofilização.

Foi demonstrado que o PSMA-11- ^{68}Ga pode ser obtido com porcentagem de pureza radioquímica (%PR) > 95 % utilizando diretamente o eluato de ^{68}Ga do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ BPF da ITG ou Eckert & Ziegler e com pH da formulação final entre 4,0 e 4,5. Foi demonstrado também que o PSMA-11- ^{68}Ga pode ser obtido com %PR satisfatória utilizando aquecimento ou em condições de temperatura ambiente e sem necessidade de purificação final. Com relação à formulação

liofilizada do peptídeo PSMA-11 chegou-se à conclusão de que o peptídeo deve ser liofilizado sem a presença do tampão de marcação. Os resultados obtidos dos estudos biológicos de competição *in vitro* e *in vivo* confirmaram a preservação da afinidade do PSMA-11 pelo receptor após liofilização. Obteve-se com sucesso uma formulação liofilizada (Kit) de PSMA-11 que preservou a integridade e atividade biológica do peptídeo e garantiu eficiência de radiomarcção.

Palavras-chave: Câncer de próstata metastático, Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (BPF), PSMA-11- ^{68}Ga , kit liofilizado, Receptor PSMA, Imagem Molecular PET/CT.

ABSTRACT

FREIRE, Maria R.V.B. **Pharmacotechnical development of a freeze dried kit for ^{68}Ga labeling and preclinical evaluation.** 2024.190 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Currently, in the detection of metastatic prostate cancer, the target molecules of the type II transmembrane receptor, called "PSMA," due to the receptor they bind to, have been shown to be a superior alternative to other conventional imaging modalities, as well as to other PET imaging agents such as FDG- ^{18}F or Choline- ^{18}F . PSMA-11- ^{68}Ga was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States as the first ^{68}Ga -labeled radiopharmaceutical for PET imaging of PSMA-positive prostate cancer in 2020. This radiopharmaceutical is considered the most promising for detecting micro and oligometastases in advanced prostate cancer, being used for therapeutic planning as well as for treatment response evaluation. This work aimed to develop a lyophilized kit of receptor-specific peptide for direct labeling with ^{68}Ga to solve the problem of distribution limitation due to distance.

The conditions for direct radiolabeling of receptor-specific peptides with ^{68}Ga were evaluated and standardized using eluate from $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators from two different manufacturers. Radiolabeling parameters were studied, including variations in pH, concentration of sodium acetate buffer, temperature, and the use of mannitol, to define the formulation of a ready-to-use labeling kit. The lyophilization process of the PSMA-11 formulation was studied. The radiochemical purity of the labels was evaluated by CCD and HPLC. Biological evaluation was performed with lyophilized PSMA-11 to demonstrate the integrity of the peptide and preservation of biological activity after the lyophilization process.

It was demonstrated that PSMA-11- ^{68}Ga can be obtained with a radiochemical purity (%RP) > 95% using directly the ^{68}Ga eluate from the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators from ITG or Eckert & Ziegler and with a final formulation pH between 4.0 and 4.5. It was also shown that PSMA-11- ^{68}Ga can be obtained with satisfactory %RP using heating or at room temperature conditions and without the need for final purification. Regarding the lyophilized formulation of the PSMA-11 peptide, it was concluded that the peptide should be lyophilized without the presence of the labeling buffer. The results obtained from the *in vitro* and *in vivo* competitive biological

studies confirmed the preservation of PSMA-11's affinity for the receptor after lyophilization. A lyophilized formulation (Kit) of PSMA-11 was successfully obtained, preserving the integrity and biological activity of the peptide and ensuring labeling efficiency.

Keywords: Metastatic prostate cancer, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator (GMP), ^{68}Ga -PSMA-11-, Freeze-dried kit, PSMA receptor, PET/CT Molecular Imaging.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	31
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 REVISÃO DA LITERATURA	35
3.1 Câncer: visão geral.....	35
3.2 Câncer de Próstata.....	36
3.2.1 Curso clínico do câncer de próstata.....	36
3.2.2 Modalidades de imagens do câncer de próstata.....	37
3.2.3 Tratamentos para mCRPC.....	39
3.2.3.1 Degradadores de Receptores Androgênicos (AR)	40
3.2.3.2 Inibidores de PARP (PARPi)	42
3.2.3.3 Inibidores PD-1.....	44
3.2.3.4 Terapia alvo radionuclídica com PSMA-177Lutécio	45
3.2.3.5 Terapia BiTE.....	47
3.2.3.6 Inibidores PI3K/AKT/mTOR.....	48
3.3 Tumores Neuroendócrinos.....	50
3.3.1 Diagnóstico e modalidades de imagens (NETs)	51
3.3.2 Tratamentos para NETs.....	52
3.4 Imagem Molecular	54
3.5 Estrutura química dos receptores de membrana e ligantes.....	56
3.5.1 Estrutura do glutamato carboxipeptidase II (GCPII/ PSMA).....	56
3.5.2 Pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA	58
3.5.2.1 PSMA-11	60
3.5.2.2 PSMA-617	62
3.5.2.3 PSMA-I&T	64
3.5.3 Receptores de somatostatina	65
3.5.4 DOTA-PEPTÍDEOS análogos sintéticos de somatostatina.....	67
3.5.4.1 DOTATATO, DOTATOC e DOTANOC.....	67

3.5.5 Quelantes.....	69
3.7 Radionuclídeo para imagem: ⁶⁸Ga	70
3.7.1 Gerador de ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	73
3.7.2 Produção de galio-68 em Cíclotron.....	79
3.8 Radionuclídeo para terapia: ¹⁷⁷Lu	80
3.9 Preparo de radiofármacos de galio-68 baseado em kit x módulo de síntese automatizada	83
3.10 Kits comerciais aprovados	84
3.10.1 Kits liofilizados de PSMA-11relatados na literatura.....	85
3.10.1.1 Ilumet™	85
3.10.1.2 IsoPROTrace-11®	85
3.10.2 Kits liofilizados relatados na literatura com análogos de somatostatina	86
3.10.2.1 Somakit TOC®	86
3.10.2.2 NETSPOT®	86
3.11 Liofilização	87
3.11.1 Desenvolvimento da formulação	88
3.11.2 Ciclo de liofilização.....	89
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	90
5 MATERIAIS	91
5.1 Infraestrutura	91
5.2 Reagentes e soluções	91
5.3 Equipamentos, materiais e sistemas	93
5.4 Células.....	94
5.5 Animais.....	95
6 MÉTODOS.....	96
6.1 Estudo Pré- formulação	96
6.2 Formulação e estudos de liofilização	97
6.2.1 Desenvolvimento da formulação liofilizada	97

6.2.2	Caracterização da formulação	98
6.2.3	Desenho do ciclo de liofilização	99
6.3	Estudos de radiomarcção e controle de qualidade	100
6.3.1	Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$: ITG X Eckert & Ziegler	100
6.3.1.1	Eluição dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG e Eckert & Ziegler, Alemanha)	102
6.3.1.2	Controle de qualidade do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha)	103
6.3.2	Radiomarcção do PSMA-11 com ^{68}Ga	106
6.3.3	Estabilidade das formulações congeladas	107
6.3.4	Radiomarcção do kit PSMA-11 liofilizado	108
6.3.5	Radiomarcção do DOTATATO com ^{68}Ga	109
6.3.6	Radiomarcção do PSMA-I&T com ^{177}Lu	110
6.4	Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	111
6.4.1	Cultivo e preparo das células LNCaP	111
6.4.2	Cinética de ligação.....	112
6.4.3	Curva de saturação.....	112
6.4.4	Competição	113
6.4.5	Análise estatística	114
6.5	Ensaio de ligação <i>in vivo</i>.....	114
6.5.1	Desenvolvimento do modelo tumoral.....	114
6.5.2	Estudo de biodistribuição do PSMA-I&T- ^{177}Lu em camundongos portadores de tumor.....	114
6.5.3	Estudo de competição <i>in vivo</i> : PSMA-I&T- ^{177}Lu X PSMA-11 liofilizado	115
6.5.4	Análise estatística	115
7	RESULTADOS	116
7.1	Estudo pré-formulação	116
7.2	Formulação e estudos de liofilização	118
7.2.1	Desenvolvimento da formulação liofilizada	118
7.2.2	Caracterização da formulação	125
7.2.3	Desenho do ciclo de liofilização	127
7.3	Estudos de radiomarcção e controle de qualidade	128

7.3.1 Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$: ITG X Eckert & Ziegler	128
7.3.1.1 Controle de qualidade do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha)	128
7.3.2 Radiomarcção do PSMA-11 com ^{68}Ga	131
7.3.3 Estabilidade das formulações congeladas	141
7.3.4 Radiomarcção do kit de PSMA-11 liofilizado	146
7.3.5 Radiomarcção do DOTATATO com ^{68}Ga	152
7.3.6 Radiomarcção do PSMA-I&T com ^{177}Lu	157
7.4 Ensaios de ligação <i>in vitro</i>	160
7.4.1 Preparo das células LNCaP	161
7.4.2 Cinética de ligação.....	161
7.4.3 Curva de saturação.....	162
7.4.4 Competição	163
7.5 Ensaios de ligação <i>in vivo</i>.....	164
7.5.1 Desenvolvimento tumoral.....	166
7.5.2 Estudo de biodistribuição do PSMA I&T- ^{177}Lu em camundongos <i>SCID-BALB/c</i> portadores de tumor de células LNCaP	166
7.5.3 Estudo de competição: PSMA-I&T- ^{177}Lu X PSMA-11 liofilizado	171
8 CONCLUSÃO	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175
ANEXO A.....	190

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Medicina tem feito uso extensivo de várias modalidades de imagem como a tomografia computadorizada (TC), ultrassonografia, ressonância magnética (RM), imagem óptica ou imagem molecular SPECT ou PET em todas as fases do tratamento do câncer (FASS, 2008). Em especial, a imagem molecular permite a localização e a detecção da extensão de sítios metastáticos em pacientes oncológicos de forma não invasiva, com alta sensibilidade e especificidade, utilizando radiofármacos emissores de fóton único ou emissores de pósitrons (CALAIS et al., 2018) (MANKOFF, 2007)(WANG et al., 2013).

A imagem PET apresenta vantagens adicionais com relação ao SPECT como maior sensibilidade, resolução, quantificação e varredura dinâmica (ANDERSON; LEWIS, 2017). (BUCHMANN et al., 2007).

Atualmente, no Brasil, 90% dos exames PET ainda são realizados utilizando o radiofármaco análogo de glicose fludesoxiglicose (^{18}F) (FDG- ^{18}F) nos campos da oncologia, neurologia e cardiologia (GRIFFETH, 2005) (ELL; KAYANI; GROVES, 2006). No entanto, devido ao seu mecanismo de ação, o FDG- ^{18}F pode ser captado por um tumor, infecção ou inflamação, não sendo específico (HOFMAN; HICKS, 2016).

Com a expansão da imagem molecular e medicina nuclear, a procura por novos radionuclídeos PET ampliou-se aos radiometais, como ^{64}Cu , ^{68}Ga e ^{89}Zr , além do ^{18}F (BRANDT et al., 2018) (COENEN; ERMERT, 2021). Dentre os radionuclídeos emissores de pósitrons citados, o ^{68}Ga apresenta características físicas favoráveis para imageamento por PET e está disponível a partir de sistemas geradores de ^{68}Ge - ^{68}Ga , o que o torna mais acessível para preparações radiofarmacêuticas, no ambiente da Radiofarmácia Hospitalar (ASLANI et al., 2014) (KILIAN, 2014) (VELIKYAN, 2015a).

Atualmente, na detecção do câncer de próstata metastático, as moléculas alvo do receptor transmembrana tipo II, denominadas “PSMA” em função do receptor ao qual se ligam, demonstram ser uma alternativa superior, tanto a outras modalidades de imagem convencionais, bem como a outros agentes de imagem PET como FDG- ^{18}F ou Colina- ^{18}F (PRIVÉ et al., 2020) (MOKALENG et al., 2015).

Níveis altos de expressão de PSMA são encontrados em cânceres de próstata metastáticos e resistentes à terapia hormonal, indicando que a expressão do PSMA está correlacionada à progressão da doença, o que torna o PSMA um alvo ideal tanto para diagnóstico quanto para o tratamento dessa condição (RUIGROK et al., 2021).

Os tumores neuroendócrinos são um grupo de tumores originários de células neuroendócrinas, células que estão distribuídas por todo o corpo humano (HENNRICH; BENEŠOVÁ, 2020). Duas subcategorias principais são tumores neuroendócrinos intestinais e pancreáticos (DE KEIZER et al., 2008).

Análogos de somatostatina marcados com gálio-68, como DOTATOC-⁶⁸Ga [DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotídeo], DOTANOC-⁶⁸Ga [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-ido1,4,7,10-tetra-acico]-1-Na13-octreotídeo], e DOTATATO-⁶⁸Ga (DOTA-Tyr3-Octreotato) são considerados padrão-ouro no diagnóstico de tumores neuroendócrinos devido à frequente superexpressão tumoral de receptores de somatostatina (POEPPEL et al., 2011a) (XU; ZHANG, 2015).

Com relação à produção de radiofármacos com galio-68, os sistemas automatizados (módulos) de produção dos radiofármacos marcados com ⁶⁸Ga apresentam vantagens claras sobre os métodos manuais, como aumento da confiabilidade, da reprodutibilidade e da segurança dos produtos radiofarmacêuticos, reduzindo a dose de exposição à radiação pelo operador. Porém, a distribuição de um lote de produção industrial é limitada geograficamente, devido ao curto tempo de meia-vida física do radionuclídeo ⁶⁸Ga (meia-vida de 67,6 minutos). A produção local destes radiofármacos (produção “in house”) de forma automatizada também é limitada devido à necessidade de aquisição de módulo de síntese, o que requer grande investimento financeiro e recursos humanos com experiência radioquímica (LEPAREUR, 2022).

Uma alternativa à produção automatizada desses radiofármacos é a fabricação na forma de componentes liofilizados (kits) para pronta marcação. O desenvolvimento de kits liofilizados de peptídeos receptor-específicos em frascos individuais, para a marcação direta com ⁶⁸Ga, à semelhança do processo de marcação de kits liofilizados com ^{99m}Tc, torna-se uma alternativa

economicamente viável para solucionar o problema de limitação de distribuição em função da distância, possibilitando a aquisição e distribuição do radiofármaco para centros de medicina nuclear, em radiofarmácias hospitalares de todo território nacional. O kit liofilizado composto por um peptídeo receptor-específico também possibilitará expansão das aplicações do diagnóstico de tumores de próstata por PET no país.

A nacionalização da produção de radiofármaco PSMA-específico marcado com lutécio-177 representa a última opção de tratamento para pacientes com câncer de próstata, em estágio avançado da doença. Espera-se que as indicações para esta terapia se expandam para outros estágios iniciais da doença, visando prolongar a sobrevida de pacientes elegíveis, que podem se beneficiar desse tratamento alvo em comparação às terapias citotóxicas convencionais, como de privação de androgênio ou quimioterapia e seus efeitos colaterais potencialmente graves. A terapia radionuclídica, neste caso, é indicada após a identificação da presença de lesões metastáticas, através da imagem PET empregando PSMA-11-⁶⁸Ga.

A terapia radionuclídica alvo com moléculas como PSMA-617 e PSMA-I&T marcadas com lutécio-177 (emissor β^-) tem sido utilizada em pacientes diagnosticados com câncer de próstata resistente à castração, cujos regimes de tratamentos padrão não tem mais eficácia (HECK et al., 2019). Pacientes com um número limitado de metástases (≤ 5 metástases), identificados por imagem PET com ⁶⁸Ga-PSMA-11, também podem se beneficiar da terapia radionuclídica alvo com PSMA-617-¹⁷⁷Lu ou PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (PRIVÉ et al., 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma formulação liofilizada (Kit) de peptídeo receptor-específico (PSMA-11) para marcação direta com ^{68}Ga , com potencial para comercialização pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN, contribuindo para disseminar a metodologia PET no diagnóstico, estadiamento e acompanhamento de tratamento de pacientes com câncer de próstata receptor-específico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer a composição do kit para liofilização.
- b) Caracterizar e desenvolver o ciclo de liofilização.
- c) Avaliar as condições de radiomarkação direta de peptídeos receptor-específicos (PSMA-11 e DOTATATO) com ^{68}Ga .
- d) Avaliar a estabilidade e afinidade do peptídeo após liofilização por meio de ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer: visão geral

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento e disseminação descontrolados de células anormais no corpo. O câncer pode afetar praticamente qualquer parte do corpo e ser fatal se não for diagnosticado e tratado em seus estágios iniciais (KALIA, 2015). Essas células também podem perder a coesão intercelular, acessar a circulação sistêmica e crescer em órgãos distantes (MACEDO et al., 2017).

A maioria dos cânceres é causada por mutações genéticas que se acumulam ao longo do tempo. Essas mutações podem ser adquiridas (somáticas) ou herdadas (linhagem germinativa). Por exemplo, mutações nos genes de câncer de mama BRCA1 e BRCA2 (breast cancer) estão associadas a um risco aumentado de câncer de mama e ovário (KUCHENBAECKER et al., 2017). A exposição a agentes cancerígenos como fumaça de cigarro e comportamentos como dieta inadequada, falta de atividade física e consumo excessivo de álcool podem contribuir para o risco de câncer. A prevenção primária através de intervenções ambientais e de estilo de vida continua a ser a principal forma de reduzir o risco de desenvolver câncer (DANAIE et al., 2005).

Os tipos de câncer mais frequentemente diagnosticados são: câncer de mama em mulheres, câncer de pulmão em ambos os sexos (fortemente ligado ao tabagismo e a fatores ambientais, também é a principal causa de morte por câncer em homens e mulheres) e câncer de próstata em homens, geralmente de crescimento lento e com maiores chances de sucesso no tratamento se detectado precocemente (SMITH et al., 2019).

Exames de triagem, feitos regularmente, como mamografia, colonoscopia e colpocitologia oncótica cervical, podem ajudar a detectar o câncer em estágios iniciais. Exames de imagem como tomografia computadorizada, ressonância magnética e PET podem fornecer informações detalhadas sobre a localização e extensão da doença. Na biópsia, amostras de tecido são examinadas para confirmar a presença de câncer e determinar seu tipo e estágio (SMITH et al., 2019) (TANAKA et al., 2020).

As modalidades de tratamento incluem: cirurgia, quimioterapia citotóxica, radioterapia por feixe externo, imunoterapia, terapia direcionada radionuclídica, terapia com bloqueio ou supressão hormonal (ABBAS; REHMAN, 2018).

O câncer é um grande desafio de saúde global e a investigação contínua dedica-se à compreensão das suas causas subjacentes, ao desenvolvimento de novos tratamentos e à melhoria das estratégias de prevenção e detecção precoce.

3.2 Câncer de Próstata

O câncer de próstata é a doença maligna mais frequentemente diagnosticada e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em homens no mundo ocidental (SUNG et al., 2021). Em 2023, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que o câncer de próstata representou cerca de 30% de todos os casos de câncer em homens no país (exceto câncer de pele não melanoma). Estimou-se que, nesse mesmo ano, aproximadamente 71.730 novos casos de câncer de próstata surgiram no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2023).

A biologia e o curso clínico do câncer de próstata são altamente diversificados, variando desde doença localizada indolente a altamente agressiva e doença amplamente disseminada. Após prostatectomia radical, o câncer de próstata pode recorrer localmente ou progredir para doença metastática, eventualmente progredindo para a morte (TANAKA et al., 2020).

3.2.1 Curso clínico do câncer de próstata

Dos pacientes que se submetem à prostatectomia radical para o tratamento de lesões clinicamente localizadas de câncer de próstata, 25 a 40% terão recorrência da doença, manifestada inicialmente como um aumento do nível sérico de antígeno prostático específico, PSA (Prostate Specific Antigen), sem evidência radiográfica ou física da doença (STEPHENSON et al., 2004). Logo após prostatectomia radical o nível de PSA deve ser indetectável (< 0,10 ng/mL). O limiar específico para definir recorrência bioquímica pode variar, mas um critério comumente utilizado é um nível de PSA de 0,2 ng/mL ou mais após prostatectomia radical (TOUSSI et al., 2016).

Um ponto a se investigar no manejo de pacientes com recorrência bioquímica, BCR (Biochemical Recurrence), é se um PSA crescente representa recorrência local (LR-Local Recurrence), recorrência sistêmica (SR-Systemic Recurrence), ou ambas. Pacientes com recorrência local isolada podem potencialmente ser curados com radioterapia de resgate por feixe externo confinada à fossa prostática. Em contrapartida, não há evidências de que terapia sistêmica possa curar pacientes com doença metastática (STEPHENSON et al., 2004).

A maioria dos pacientes com câncer de próstata recorrente inicialmente respondem ao tratamento de privação de androgênio – ADT (Androgen Deprivation Therapy), que resulta na regressão da doença com redução da carga tumoral, bem como do nível de PSA. A condição em que os pacientes apresentam recorrência da doença ou progressão na ausência de ADT é referida como câncer de próstata sensível à castração (ou hormônio sensível) cuja sigla é CSPC (Castration Sensitive Prostate Cancer) (TANAKA et al., 2020).

Quando a doença progride apesar da castração cirúrgica ou química, os pacientes são reclassificados como tendo câncer de próstata resistente à castração, CRPC (Castration Resistant Prostate Cancer), com ou sem doença metastática (LABRIOLA et al., 2021). Para homens com CRPC, a sobrevida média varia de 9 a 30 meses, e para aqueles com câncer de próstata resistente à castração metastático mCRPC (Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer), essa sobrevida é reduzida para 9 a 13 meses (HE et al., 2020).

3.2.2 Modalidades de imagens do câncer de próstata

A identificação precisa do câncer de próstata em todos os diferentes estágios da doença representa um grande desafio entre a comunidade urológica, ou seja, identificação entre estadiamento primário, recorrência bioquímica e resistência à castração, com ou sem metástase (CALDERONI et al., 2020). No contexto clínico de aumento do nível sérico de antígeno específico da próstata (PSA) após tratamento inicial definitivo, exames de imagem são considerados para avaliação de recorrência e/ou progressão da doença. Modalidades de imagem convencionais, incluindo tomografia computadorizada das regiões abdominal e pélvica e a cintilografia óssea têm sido as modalidades solicitadas inicialmente

para pacientes assintomáticos com recorrência do nível de PSA (TANAKA et al., 2020).

Utiliza-se Tomografia Computadorizada do abdômen e/ou pelve para avaliar tecidos moles (gânglios linfáticos e órgãos viscerais) e ossos. A TC não é indicada para detectar tumor recorrente na fossa prostática e tem baixa sensibilidade para metástases de câncer de próstata em nódulos linfáticos, uma vez que muitos nódulos metastáticos apresentam tamanho normal. A TC é considerada útil na detecção de metástases ósseas e viscerais, embora varreduras ósseas por ressonância magnética são consideradas superiores à TC para diagnóstico e acompanhamento. A radiografia de tórax ou tomografia computadorizada é realizada para detecção de metástases no pulmão, pleura, mediastino e ossos dessa região (TANAKA et al., 2020).

Na cintilografia óssea, o aumento da captação do traçador nos ossos, pode ser causada por metástase do câncer de próstata ou condições benignas (por exemplo, fratura, alterações degenerativas, doença de Paget). Quando os resultados de cintilografia óssea são inconclusivos para metástase, radiografia esquelética, tomografia computadorizada, ressonância magnética, PET/CT com flúor-18 ou biópsia percutânea realizada com agulha guiada por imagem podem ser realizadas para melhor caracterização das lesões (TANAKA et al., 2020).

Ressonância magnética é a modalidade solicitada para investigação de recorrência local na fossa prostática. Indicada em recorrência bioquímica após tratamento com radiação e usada para guiar biópsia direcionada da próstata em pacientes com suspeita de tumor localmente recorrente após prostatectomia, exame de tomografia computadorizada ou ressonância magnética abdominopélvica e imagem do tórax, utilizando software de fusão MRI/US.

Exames PET com radiofármacos específicos para a identificação de metástases como a colina marcada com carbono-11 ou fluciclovina marcada com flúor-18 podem ser solicitados devido à sensibilidade e precisão muito maiores do que a imagem convencional (TANAKA et al., 2020).

No reestadiamento do câncer de próstata a colina-¹¹C apresenta uma taxa de detecção < 20% se o nível de PSA for < 1 ng/mL, 46% se o nível de PSA for de 1–3 ng/mL e 82% se o nível de PSA for > 3 ng/mL. As desvantagens da colina-¹¹C estão relacionadas com a meia-vida curta (20 minutos) deste radiofármaco e requer ciclotron para produção do ¹¹C. No caso do radiofármaco fluciclovina-

¹⁸F, a taxa de detecção é de 21% se o nível de PSA for <1 ng/mL, 45% se o nível de PSA for de 1–3 ng/mL, e 59% se o nível de PSA for >3 ng/mL. A fluciclovina-¹⁸F apresenta especificidade moderada e desempenho moderado em situações de níveis baixos de PSA. Para o radiofármaco PSMA-11-⁶⁸Ga a taxa de detecção no reestadiamento do câncer de próstata é de 58% se o nível de PSA for de 0,2–0,5 ng/mL, 73% se o nível de PSA for de 0,5–1,0 ng/mL e >90% se o nível de PSA for >1 ng/mL. Pode orientar a terapia alvo com PSMA-617-¹⁷⁷Lu (EIBER et al., 2015).

3.2.3 Tratamentos para mCRPC

O câncer de próstata metastático resistente à castração (mCRPC) tem se tornado um grave problema de saúde mundial (HE et al., 2020). As duas principais estratégias de terapia para mCRPC incluem quimioterapia citotóxica e terapias direcionadas a andrógenos, porém esses tratamentos permanecem como paliativos e não levam à cura (SCHURKO; OH, 2008) (LABRIOLA et al., 2021). As quimioterapias citotóxicas comumente utilizadas no tratamento do câncer de próstata metastático incluem as quimioterapias taxanas docetaxel e cabazitaxel, que se ligam reversivelmente à microtubulina para inibir a despolimerização de microtúbulos e, assim, prevenir a divisão celular e promover a morte celular (ZHAO; GUERCIO; SAHASRABUDHE, 2023).

Agentes direcionados aos andrógenos, incluindo acetato de abiraterona combinado com prednisona e enzalutamida também são amplamente utilizados para aumentar o tempo de sobrevivência de pacientes com mCRPC (LABRIOLA et al., 2021). Um estudo clínico randomizado publicado por Bono e colaboradores (2011), demonstrou o benefício do uso do acetato de abiraterona combinado com prednisona no aumento da sobrevivência global de pacientes com mCRPC, previamente tratados com quimioterapia citotóxica (provavelmente resultante de redução adicional nos níveis de andrógenos) (DE BONO et al., 2011).

Um estudo clínico randomizado publicado por Scher e colaboradores (2012), demonstrou que a sinalização do receptor de andrógeno contribui para progressão da doença, apesar dos níveis reduzidos de testosterona e tratamento antiandrogênio convencional prévio. Este estudo demonstrou que a terapia com enzalutamida, um inibidor da sinalização do receptor de andrógeno, foi capaz de

retardar a progressão da doença, mesmo na presença de baixos níveis de andrógenos circulantes (SCHER et al., 2012). No entanto, a resposta ao tratamento não é duradoura em pacientes com câncer avançado e, com o tempo, as concentrações de PSA aumentam, indicando reativação da sinalização do receptor de andrógeno e uma transição para um estado de resistência à castração que é invariavelmente fatal (DE BONO et al., 2011).

A biópsia líquida ou teste de biomarcador sanguíneo desempenha um papel vital na previsão da eficiência terapêutica ou resistência às terapias. Novas estratégias terapêuticas têm como alvo mecanismos celulares críticos de resistência às drogas, como a terapia radionuclídica alvo direcionada ao receptor transmembrana PSMA, com menos efeitos colaterais do que as terapias sistêmicas com quimioterápicos, e novas estratégias com imunoterapia, que têm como foco o reconhecimento dessas células tumorais e eliminação pelo sistema imunológico (HE et al., 2020).

Uma compreensão melhor da biologia das células tumorais, mecanismos de resistência às drogas e os avanços da análise genômica, permitiram o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas entre elas: degradadores de receptores androgênicos (AR), inibidores PARPi, inibidores PD-1, terapia radionuclídica com PSMA-¹⁷⁷Lu, terapia BiTE e inibidores da via PI3K-Akt-mTOR.

Com base na revisão da literatura realizada principalmente por Labriola e colaboradores (2020), mas também de outros autores, as novas estratégias terapêuticas para o tratamento do mCRPC são descritas de forma resumida a seguir.

3.2.3.1 Degradadores de Receptores Androgênicos (AR)

O receptor de andrógeno (AR - *Androgen Receptor*) é um fator de transcrição nuclear ativado por ligante que desempenha um papel vital na patogênese do câncer de próstata e está envolvido no crescimento e proliferação celular, ao mesmo tempo que afeta a estabilidade genômica e reparo do DNA. Os ligantes endógenos do AR, incluem principalmente a testosterona (T) e a diidrotestosterona (DHT), a qual é convertida a partir da testosterona pela 5 α -redutase nas células da próstata. Assim, a terapia de privação de andrógenos

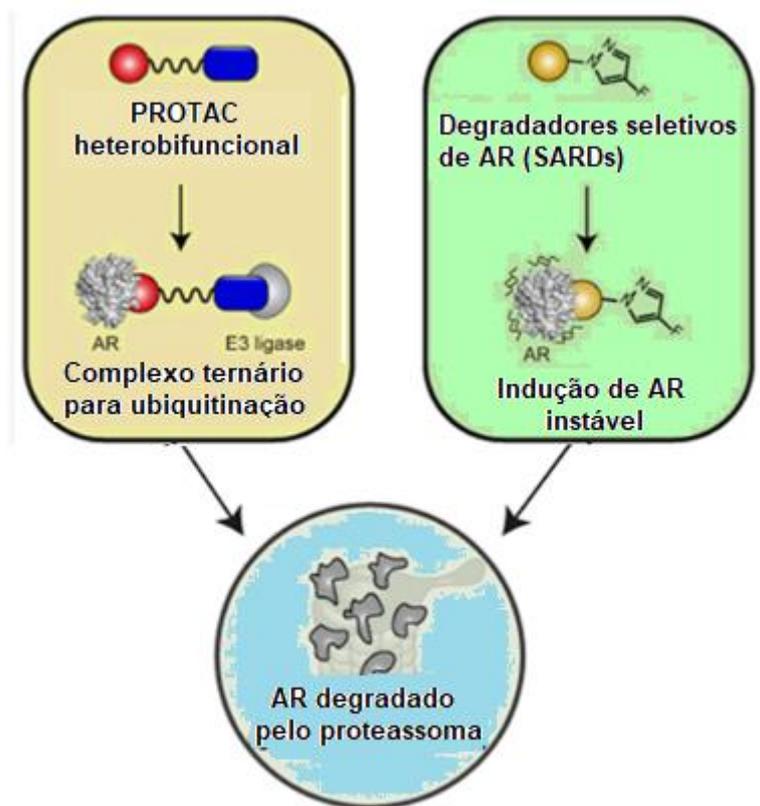
(ADT), continua sendo o padrão de tratamento para pacientes com câncer de próstata. Apesar dos benefícios satisfatórios no tratamento do câncer de próstata em estágio inicial pela ADT, como já mencionado anteriormente, a resistência à castração é geralmente inevitável dentro de dois anos, na maioria dos pacientes, levando eventualmente ao CRPC letal associado à morbidade e mortalidade altas (HA; LUO; XIANG, 2022).

A via de sinalização de AR permanece ativa na maioria dos pacientes com CRPC, e a inibição da mesma tem sido uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento do CRPC, sendo os antagonistas de AR classificados em antagonistas esteroides, antagonistas não esteroides de primeira e segunda geração (HA; LUO; XIANG, 2022). No entanto, a resistência adquirida aos antagonistas de AR ocorre em quase todos os pacientes na clínica e alguns dos mecanismos de resistência mais frequentes são a superexpressão de AR, amplificação do gene AR, as mutações ativadoras do domínio de ligação de AR ao ligante (LBD – *Ligand Binding Domain*) e as variantes de ligação de AR constitutivamente ativas (AR-Vs – *AR-Variants*) (HA; LUO; XIANG, 2022).

A terapia alvo de degradação de receptores de andrógenos é uma abordagem inovadora no tratamento mCRPC. O sistema ubiquitina-proteassoma desempenha um papel importante na degradação de AR (FANG; COLE; WANG, 2022). Atualmente, duas classes de medicamentos conhecida como Quimeras Direcionadas à Proteólise (PROTACs - *Proteolysis-Targeting Chimeras*) e Degradadores Seletivos de AR (SARDs - *Selective AR degraders*) têm sido estudadas para esse fim (**Figura 1**). PROTACs são moléculas bifuncionais projetadas para recrutar proteínas de ubiquitinação para o receptor de andrógeno. De forma resumida, a ligação das PROTACs ao receptor de andrógeno induz a ubiquitinação do receptor. O receptor ubiquitinado é então reconhecido pelo proteassoma, onde é degradado (MOREAU et al., 2020). O mecanismo de ação do SARDs de forma resumida consiste em se ligar ao receptor de andrógeno de forma seletiva e, em seguida, induzir sua ubiquitinação, marcando-o para degradação pelo proteassoma (NARAYANAN; PONNUSAMY; MILLER, 2017). O proteassoma é um complexo enzimático que desempenha um papel central na regulação de proteínas que controlam a progressão do ciclo celular e a apoptose. Antes de uma proteína ser degradada, ela é apresentada para destruição pelo sistema de conjugação da ubiquitina. O

proteassoma atua como um grande complexo de protease que decompõe seletivamente as proteínas em peptídeos menores (ADAMS, 2003).

Figura 1 – Esquema representativo do mecanismo de ação de Quimeras Direcionadas à Proteólise (PROTACs) e Degradares Seletivos de AR (SARD). (PROTACs : *Proteolysis-Targeting Chimeras* e SARDs: *Selective AR degraders*).



Fonte: Adaptado de (HA; LUO; XIANG, 2022).

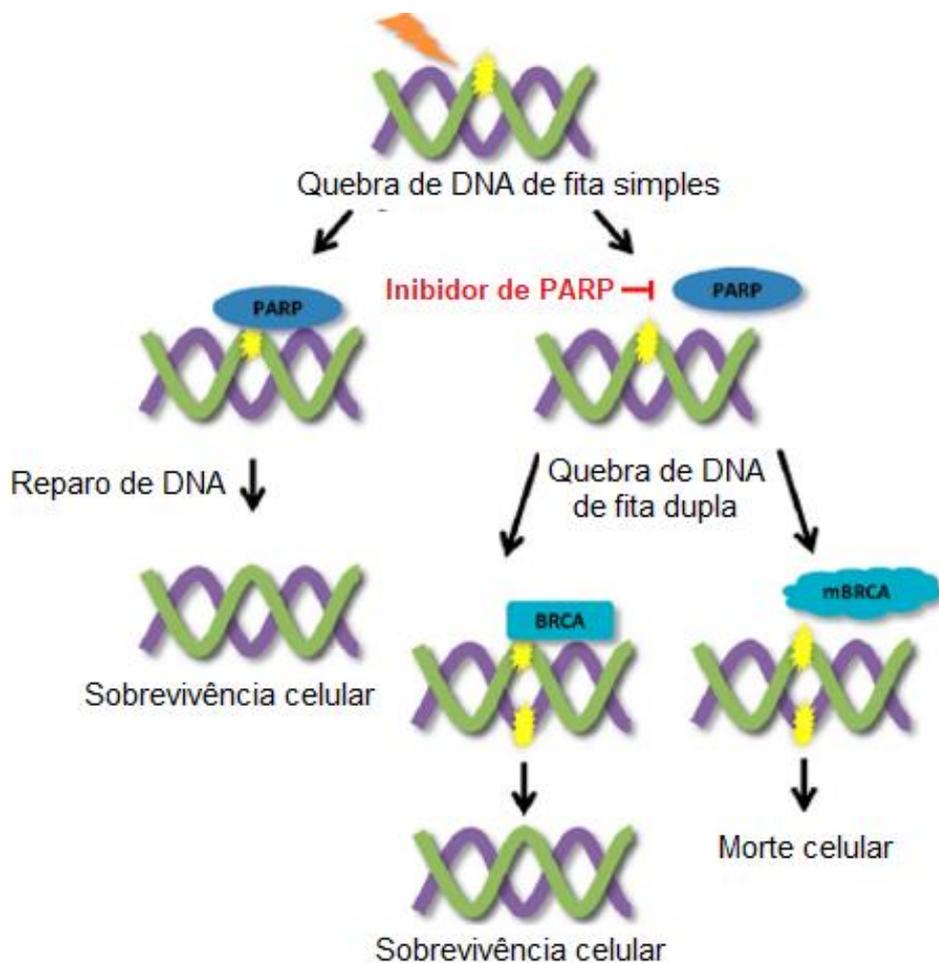
3.2.3.2 Inibidores de PARP (PARPi)

Os inibidores de poli ADP-ribose polimerase (PARPi - Poly ADP-ribose Polymerase Inhibitors) são uma nova classe de medicamentos que têm sido estudados e utilizados no tratamento do câncer, incluindo o CPRC que não responde mais à terapia hormonal (LABRIOLA et al., 2021).

Os inibidores de PARP (PARPi) consistem em pequenas moléculas direcionadas e se baseiam no princípio da "letalidade sintética", ou seja, afetam o processo de reparo do DNA ao inibir competitivamente a atividade da enzima PARP e, assim, levam as células cancerígenas à morte (LI; LIU; RAO, 2021).

Os inibidores de PARP atuam bloqueando a ação catalítica da enzima de reparo do DNA (PARP), assim proteínas de reparo não são recrutadas e a quebra da fita simples de DNA permanece. Células tumorais com proteínas BRCA mutadas perdem a capacidade de reparar quebras de DNA de fita dupla pela via de HR, resultando em instabilidade genômica e apoptose (**Figura 2**) (KAGIHARA et al., 2021).

Figura 2 - Mecanismo de ação dos inibidores de PARP. PARPi evitam que PARP repare quebras de DNA de fita simples. As proteínas BRCA mutadas perdem a capacidade reparar quebras de DNA de fita dupla, resultando em morte celular. (PARP: Poly ADP-ribose polymerase, BRCA: breast cancer gene, mBRCA: mutated BRCA gene).



Fonte: Adaptado de (KAGIHARA et al., 2021).

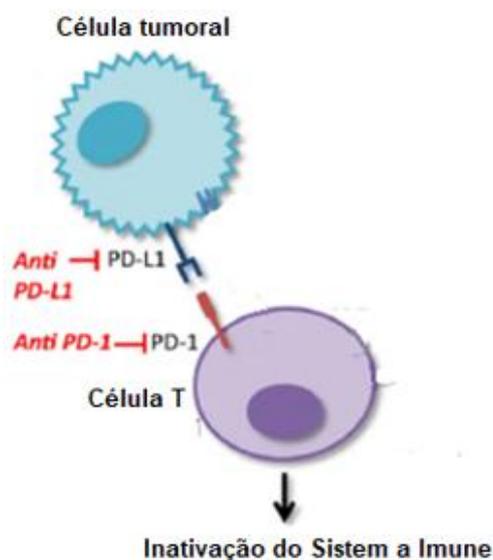
A principal função das enzimas PARP é detectar e iniciar uma resposta celular imediata a quebras na fita simples de DNA (*SSB-single strand DNA break*), sinalizando a maquinaria enzimática envolvida no reparo da SSB. Assim que o PARP detecta um SSB, ele se liga ao DNA, sofre uma mudança estrutural e começa a síntese de uma cadeia polimérica de adenosina difosfato ribose (poli (ADP-ribose) ou PAR), que atua como um sinal para o reparo do DNA. O reparo eficiente da SSB fornecido pelo PARP é essencial para a sobrevivência celular (KAGIHARA et al., 2021). As proteínas BRCA em células saudáveis reparam quebras de DNA de fita dupla por meio de recombinação homóloga (HR - homologous recombination) e permitem a sobrevivência celular. No caso de células de câncer com mutações específicas em genes supressores tumorais, como BRCA1 e BRCA2, a atividade da enzima PARP é essencial para sua sobrevivência (BRYANT et al., 2005). Essa abordagem é utilizada para conduzir a morte celular programada seletivamente de células tumorais deficientes em proteínas BRCA (defeituosas em HR) por PARPi (LI; LIU; RAO, 2021).

3.2.3.3 Inibidores PD-1

No microambiente tumoral, a proteína de morte celular programada 1 (PD-1 - Programmed Cell Death Protein) e seu ligante, Ligante de Morte Programada 1 (PD-L1 - Programmed-Death Ligand 1) desempenham um papel vital na progressão e sobrevivência do tumor, escapando da vigilância imunológica neutralizante do tumor (ALSAAB et al., 2017a). O PD-1 é expresso em uma variedade de células do sistema imunológico, como monócitos, células T, células B, células dendríticas e linfócitos infiltrantes de tumor. No entanto, o PDL-1 é expresso em células tumorais (**Figura 3**).

Os inibidores PD-1 são uma classe de medicamentos imunoterápicos usados no tratamento do câncer. Essas drogas atuam visando o receptor PD-1 nas células do sistema imunológico, principalmente células T, e bloqueando sua interação com seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, que são frequentemente superexpressos na superfície das células cancerígenas e de outras células do microambiente tumoral. Este bloqueio da interação PD-1/PD-L1 tem um impacto profundo na resposta imune contra o câncer pois previne a evasão imunológica (ALSAAB et al., 2017).

Figura 3 - Mecanismo de ação dos inibidores PD-L1 e PD-1. A interação entre PD-L1 nas células tumorais e PD-1 nas células T resulta na inativação da evasão do sistema imunológico e na sobrevivência das células tumorais. (PD-L1: Programmed-Death Ligand 1, PD-1: Programmed Cell Death Protein 1).



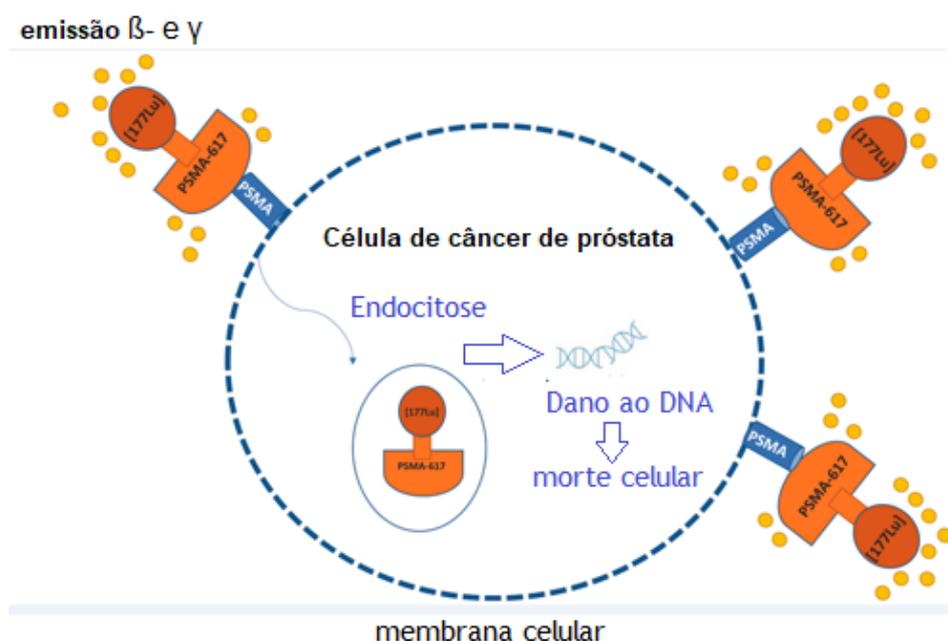
Fonte: Adaptado de (KAGIHARA et al., 2021).

3.2.3.4 Terapia alvo radionuclídica com PSMA-177Lutécio

A terapia PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*) com Lutécio-177 utiliza uma forma de radioterapia conhecida como terapia radionuclídica receptor específica (LABRIOLA et al., 2021). Essa abordagem emprega uma pequena molécula (peptídeo) que se liga ao receptor transmembrana PSMA nas células cancerígenas, ligada a um espaçador que por sua vez está ligado a um quelante marcado com um radionuclídeo que pode ser o Lu-177. O Lu-177, “entregue” à célula de câncer de próstata, emite radiação beta diretamente para as células cancerígenas, evitando ou reduzindo a radiação para outras áreas do corpo (AHMADZADEHFAR et al., 2015). Há uma série de ensaios clínicos em andamento investigando o papel da terapia empregando radiofármacos PSMA-específicos radiomarcados com lutécio-177. Dentre eles, VISION é um estudo clínico internacional conduzido em 9 países, prospectivo, aberto, multicêntrico e randomizado de fase 3 que investiga a nova terapia com PSMA-617-¹⁷⁷Lu no tratamento de pacientes com mCRPC (SARTOR et al., 2021). O objetivo

principal deste estudo é comparar dois desfechos primários: sobrevida livre de progressão radiográfica (rPFS - *radiographic Progression-Free Survival*) e sobrevida global (OS - overall survival) em pacientes com mCRPC progressivo, positivo para antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) que receberam PSMA-617-¹⁷⁷Lu além do melhor suporte/melhor padrão de cuidados em comparação à pacientes tratados apenas com melhor suporte/melhor padrão de cuidados (SARTOR et al., 2021). Com este estudo espera-se definir o papel da terapia com PSMA-617-¹⁷⁷Lu no mCRPC. O mecanismo de ação do PSMA-617-¹⁷⁷Lu encontra-se ilustrado na (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismo de ação do PSMA-617 marcado com lutécio-177, direcionado ao antígeno de membrana específico da próstata: a molécula direcionada ao PSMA radiomarcada com Lu-177 liga-se ao receptor PSMA na membrana celular do câncer de próstata. O Lu-177 emite partículas β - e γ causando danos ao DNA e morte celular. (PSMA: *Prostate Specific Membrane Antigen*).



Fonte: Adaptado de (HEIDEGGER et al., 2022)

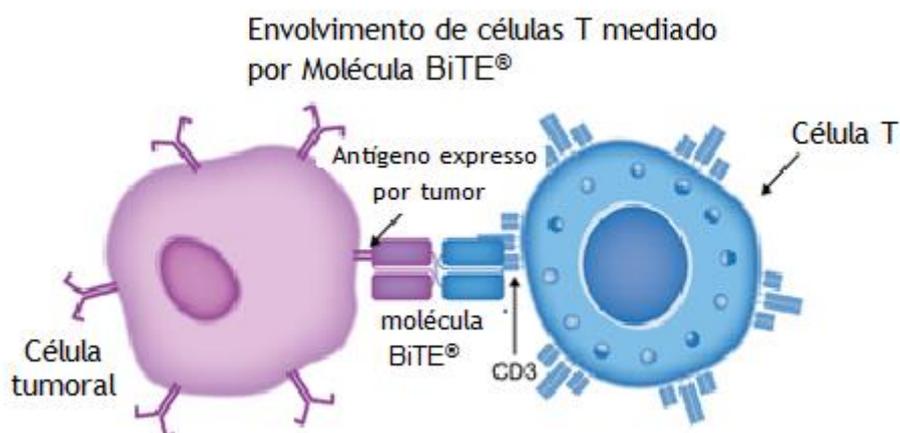
Vale ressaltar que os pacientes são selecionados para este tipo de terapia radionuclídica a partir do procedimento de imagem molecular, empregando-se radiofármaco análogo, PSMA-específico, porém radiomarcado, com radionuclídeos emissores gama ou pósitron-emissores, consolidando o par teranóstico para o diagnóstico e terapia de tumores específicos. Dentre eles,

destaca-se o PSMA-11-⁶⁸Ga, por sua especificidade e sensibilidade na detecção de lesões metastáticas do câncer de próstata (JONES et al., 2020).

3.2.3.5 Terapia BiTE

A tecnologia de envolvimento de células T biespecíficas de PSMA (BiTE[®] - Bispecific T cell Engager) é uma terapia imuno-oncológica que utiliza células T do próprio paciente para atacar células cancerígenas através de moléculas que têm como alvo antígenos específicos de tumores (LABRIOLA et al., 2021). As moléculas BiTE[®] possuem um domínio que reconhece antígenos específicos de tumor, que pode ser modificado para atingir qualquer antígeno de superfície, permitindo terapias contra vários tipos de tumores, e um segundo domínio que reconhece células T, recrutando-as para eliminação das células malignas (LABRIOLA et al., 2021). O mecanismo de ação encontra-se ilustrado na (Figura 5).

Figura 5 – Representação do mecanismo de ação do acoplador de células T biespecífico (BiTE[®]: Bispecific T cell Engager, CD: complexo de diferenciação)



Fonte: Adaptado de (EINSELE et al., 2020).

Pasotuxizumabe (também conhecido como AMG 212 ou BAY 2010112), uma terapia imunológica BiTE[®], foi desenvolvida para se ligar a CD3 em células T e a receptores PSMA em células de câncer de próstata, ativando assim as células

T do próprio paciente para eliminar células de câncer de próstata que expressam PSMA (EINSELE et al., 2020). Um estudo aberto, multicêntrico, de Fase I foi desenhado para determinar a segurança e a dose máxima tolerada de Pasotuxizumab administrado por injeção subcutânea ou infusão intravenosa contínua (HUMMEL et al., 2021). Objetivos secundários incluíram a avaliação da farmacocinética, níveis de PSA e imagem radiográfica do tumor; objetivos exploratórios incluíram a avaliação de biomarcadores, como células tumorais circulantes. Os dados apoiam a segurança do Pasotuxizumabe no câncer de próstata avançado resistente à castração e representam evidência da eficácia da monoterapia BiTE[®] em tumores sólidos. Registro de ensaio clínico: NCT01723475 (ClinicalTrials.gov).

3.2.3.6 Inibidores PI3K/AKT/mTOR

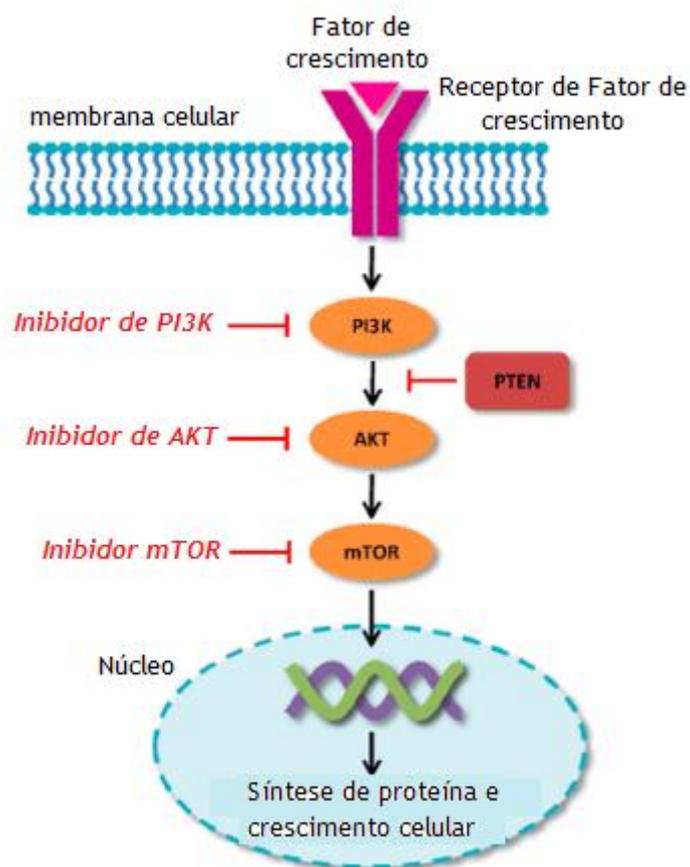
Como já mencionado anteriormente, os AR são expressos no CRPC e a sinalização AR pode ser ativada de forma autócrina ou independente de andrógeno, como por meio de interações cruzadas com outras vias de sobrevivência e proliferação celular. Observações clínicas sobre os níveis de AR levantam a possibilidade de que são heterogêneos e, em alguns casos, ausentes em doenças em estágio avançado (MULHOLLAND et al., 2011).

A perda da expressão ou atividade do AR serve como um meio alternativo de escapar da terapia de privação de andrógenos ou de terapias direcionadas à AR, possivelmente através da ativação concomitante de vias de sinalização compensatória. Uma das possíveis vias de sobrevivência e proliferação é a via PI3K/AKT/mTOR (*PI3K: phosphoinositide 3-kinase, AKT: protein kinase B, mTOR: mechanistic target of rapamycin, PTEN: phosphatase and tensin homolog*), que é regulada negativamente pelo gene supressor de tumor PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*). A perda de PTEN ou ativação da via PI3K / AKT leva ao aumento da proliferação celular, sobrevivência e migração, bem como evolução para a resistência à castração (MULHOLLAND et al., 2011).

O Mecanismo de ação da via PI3K/AKT/mTOR e a ação dos inibidores PI3K, AKT e mTOR no bloqueio de ativação desta via estão ilustrados na **Figura 6**. Portanto, a inibição da via PI3K-Akt-mTOR com ou sem inibição combinada de AR consiste em uma estratégia para tratamento do mCRPC. Os inibidores

PI3K/mTOR têm sido investigados em ensaios de fase inicial, incluindo dactolisibe, apitolisibe e buparlisibe mas mostraram eficácia limitada com perfis de toxicidade (LABRIOLA et al., 2021).

Figura 6 - Mecanismo de ação da via PI3K/AKT/mTOR. O fator de crescimento se liga ao receptor de fator de crescimento na membrana da célula tumoral resultando na ativação da via PI3K, AKT e mTOR. A ativação de mTOR resulta em síntese de proteína e crescimento celular. PTEN regula negativamente o PI3K e resulta na diminuição da ativação da via PI3K/AKT/mTOR. Os inibidores PI3K, AKT e mTOR bloqueiam a ativação desta via e resulta em morte celular. (PI3K: fosfoinosítídeo 3-quinase, AKT: proteína quinase B, mTOR: mecanístico alvo da rapamicina, PTEN: fosfatase e homólogo de tensina). (*PI3K: phosphoinositide 3-kinase, AKT: protein kinase B, mTOR: mechanistic target of rapamycin, PTEN: phosphatase and tensin homolog*).



Fonte: Adaptado de (KAGIHARA et al., 2021).

As diferentes modalidades de tratamento têm mecanismos de ação e perfis de efeitos colaterais variados, e consistem em um cenário em estudo e constante evolução para o tratamento do câncer de próstata avançado e metastático. A escolha do tratamento dependerá de fatores como disponibilidade e autorização para a estratégia emergente, estágio da doença, agressividade do câncer, presença de mutações, características do câncer e do paciente e tratamentos anteriores (LABRIOLA et al., 2021).

A abordagem teranóstica representa um avanço significativo na medicina personalizada. A identificação precisa das oligometástases com PSMA-11-⁶⁸Ga pode direcionar a terapia específica para essas áreas utilizando PSMA-617-¹⁷⁷Lu ou PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu. Isso não apenas otimiza o tratamento, mas também minimiza os efeitos colaterais ao focar o tratamento nas áreas afetadas. No entanto, é essencial observar que são necessárias pesquisas contínuas para estabelecer a eficácia e segurança a longo prazo (JONES et al., 2020).

A comparação da terapia radionuclídica alvo com outras estratégias convencionais e emergentes (terapias direcionadas a receptores de andrógenos, imunoterapias e outras terapias com radionuclídeos) é uma área ativa da pesquisa clínica (LABRIOLA et al., 2021).

3.3 Tumores Neuroendócrinos

Tumores neuroendócrinos (NETs- *Neuroendocrine Tumors*) são uma classe de tumores raros, de crescimento lento e surgem a partir de células do sistema neuroendócrino (células que liberam hormônios em nosso corpo), distribuídas principalmente nos pulmões, trato gastrointestinal ou pâncreas (AL-NAHHAS et al., 2007). O sistema neuroendócrino inclui as glândulas endócrinas, como a hipófise, as paratireoides e o tecido das ilhotas suprarrenais, assim como o tecido endócrino do tecido glandular (tireoide ou pancreático) e células esparsas no parênquima exócrino, como as células endócrinas do aparelho digestivo e vias respiratórias, que pertencem ao que é conhecido como sistema endócrino difuso (ORONSKY et al., 2017).

Embora os NETs sejam considerados tumores raros, a sua incidência tem aumentado muito nas últimas décadas, em parte devido ao melhor entendimento da doença e à melhoria das ferramentas de diagnóstico, particularmente

endoscopia e medicina nuclear (ROSSI; MASSIRONI, 2022). De acordo com um estudo recente de base populacional envolvendo 43.751 pacientes nos Estados Unidos, a taxa de incidência de Tumores Neuroendócrinos Gastro-Entero-Pancreáticos GEP-NETs (*Gastro-Entero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors*) aumentou 6,4 vezes no período de 1975 a 2015. O aumento da incidência foi particularmente relevante no estômago (15 vezes) e no reto (9 vezes), como reflexo do aumento da utilização de procedimentos endoscópicos, incluindo campanha de rastreio preventivo colorretal (XU et al., 2021). No Brasil, não há dados específicos do Instituto Nacional do Câncer, INCA, sobre a incidência de tumores neuroendócrinos no país.

A maioria dos TNEs surge no trato GI (por exemplo, intestino delgado, pâncreas, cólon) e no sistema bronco pulmonar. Outros locais incluem o timo, as glândulas suprarrenais e locais raros, como os ovários (MODLIN; LYE; KIDD, 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o câncer neuroendócrino em três níveis com base em características histológicas, grau de diferenciação celular, padrão de crescimento tumoral marcadores de proliferação celular (contagens mitóticas ou Ki-67). Neoplasias bem diferenciadas de grau baixo a intermediário (G1-G2) foram definidas como tumores neuroendócrinos (NETs). Neoplasias de alto grau (G3) pouco diferenciadas foram definidas como carcinomas neuroendócrinos (NECs- *Neuroendocrine Carcinomas*) (INZANI; PETRONE; RINDI, 2018).

3.3.1 Diagnóstico e modalidades de imagens (NETs)

A suspeita clínica da presença de tumores neuroendócrinos baseia-se na presença de sintomas característicos (os mais comuns incluem rubor, diarreia, respiração ofegante e dor abdominal) e/ou síndromes, o que requer para confirmação da doença uma avaliação de marcadores tumorais geral ou específica que atualmente oferecem alta sensibilidade em estabelecer o diagnóstico e pode ser importante para estabelecer o prognóstico do paciente.

As técnicas histopatológicas e moleculares atuais não apenas fornecem o diagnóstico preciso, mas também podem, de certa forma, prever o comportamento biológico do tumor. Para efetuar o diagnóstico e investigação de tumores neuroendócrinos, métodos de imagem anatômicos e funcionais estão

disponíveis. Os métodos anatômicos incluem tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética e ultrassonografia. Métodos funcionais incluem cintilografia e tomografia por emissão de pósitrons (PET). Uma combinação de métodos anatômicos e morfológicos resulta na chamada imagem híbrida, como PET / CT, o registro concomitante desses métodos, auxilia na localização do tumor e as imagens funcionais e anatômicas combinadas fornecem aos cirurgiões informações essenciais para orientar a tomada de decisão cirúrgica (KOOPMANS et al., 2009) (KARTALIS; MUCELLI; SUNDIN, 2015).

A tomografia por emissão de pósitrons, em combinação com agentes de imagem específicos, permite um diagnóstico não invasivo específico do tipo de tumor com delimitação precisa de tumores e metástases e, portanto, estadiamento da doença (VELIKYAN, 2015a). O princípio geral do imageamento em medicina nuclear é que a detecção das lesões depende principalmente da quantidade de radiofármaco localizado em uma lesão, e indiretamente do tamanho da lesão (KOOPMANS et al., 2009). Os métodos para imagem nuclear de tumores neuroendócrinos podem ser divididos em três categorias principais: (a) expressão seletiva de diferentes receptores, (b) propriedades metabólicas de tumores e (c) marcadores que exploram antígenos expressos pelos tumores. Diferentes análogos de somatostatina estão sendo investigados com relação a estabilidade e maior afinidade a receptores de somatostatina (KOOPMANS et al., 2009).

3.3.2 Tratamentos para NETs

A cirurgia é a única abordagem curativa para NETs. No entanto, a excisão cirúrgica não é sempre possível, pois 50–60% dos pacientes apresentam doença avançada e metastática no momento do diagnóstico. Em pacientes com NETs inoperáveis ou metastáticos, os objetivos do tratamento incluem controle do crescimento do tumor e alívio dos sintomas com terapia sistêmica, embora a cirurgia citorrredutora possa ser considerada (LA SALVIA et al., 2021).

O padrão de terapia sistêmica em pacientes com GEP-NETs inoperáveis ou metastáticos é a quimioterapia com cisplatina ou carboplatina, desde que os pacientes tenham função orgânica adequada. A carboplatina é geralmente preferida à cisplatina pois tem atividade antitumoral semelhante e melhor perfil

de toxicidade, sem nefrotoxicidade nem neurotoxicidade (GARCIA-CARBONERO et al., 2023).

A abordagem teranóstica inclui diagnóstico por imagem molecular seguido por tratamento alvo personalizado com base no valor preditivo da varredura diagnóstica. O uso de análogos de somatostatina radiomarcados para imagem funcional de NETs fornecem informações essenciais sobre a densidade de SSTR e avaliação da carga tumoral (metástases) que são relevantes para decisões de tratamento, e seleção de pacientes para terapia radionuclídica alvo. Os pares teranósticos mais comumente utilizados são ^{68}Ga e DOTATATO/DOTATOC- ^{90}Y -/ ^{177}Lu apresentando maiores taxas de resposta ao tratamento e melhoria da qualidade de vida em comparação com os efeitos colaterais potencialmente graves da terapia sistêmica com quimioterápicos (WERNER et al., 2015).

O mecanismo de ação de um análogo estável de somatostatina marcado com um radioisótopo emissor β menos (β^-) (^{90}Y ou ^{177}Lu) consiste em se ligar a receptores de somatostatina (SSTRs) superexpressos em células tumorais alvo. O complexo receptor-peptídeo é internalizado por endocitose, permitindo a entrega de radiação citotóxica diretamente às células-alvo. O peptídeo radiomarcado é retido nas células tumorais que expressam o receptor e, devido ao seu peso molecular relativamente baixo, é rapidamente eliminado do sangue (AMBROSINI et al., 2022).

O DOTATATO- ^{177}Lu foi investigado em um estudo clínico de fase III, em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados do intestino médio, progressivos, inoperáveis ou metastáticos (ensaio clínico NETTER-1). O tratamento com DOTATATO- ^{177}Lu resultou em taxa significativa de resposta tumoral de 18% em comparação com 3% do grupo que recebeu octreotida LAR (*Long Acting Release*) em altas doses, juntamente com uma redução de 79% do risco de progressão da doença ou morte. DOTATATO- ^{177}Lu foi aprovado para comercialização tanto na Europa como nos EUA (Lutathera®) (EYCHENNE et al., 2020).

Avanços na pesquisa com o par teranóstico DOTATATO- ^{68}Ga e DOTATATO- ^{177}Lu visam melhorar a segurança e eficácia do uso dessa abordagem, ampliar indicação, especialmente em GEP-NETs avançados e pouco diferenciados (WASEEM; APARICI; KUNZ, 2019).

Outras abordagens terapêuticas para tumores neuroendócrinos (NETs) permanecem sob investigação e constituem uma área ativa da pesquisa clínica. Exploram estratégias como Inibidores do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor*), Inibidores mTOR (cujos agentes têm como alvo a via de sinalização mTOR envolvida no crescimento e proliferação celular)(KULKE et al., 2008) (PAVEL et al., 2020).

O uso de terapia alvo radionuclídica com análogos de somatostatina é usada para o tratamento de NETs metastáticos e inoperáveis há aproximadamente 30 anos desde o cenário ensaios clínicos até aprovação para comercialização em 2020 nos EUA, Europa e Brasil (AMBROSINI et al., 2022).

3.4 Imagem Molecular

Técnicas de imagem molecular monitoram e registram, em espaço e tempo real, os processos biológicos *in vivo* ao nível molecular ou celular, através do uso de traçadores de imagem específicos. Tais técnicas apresentam a sensibilidade e especificidade necessárias para o diagnóstico precoce em oncologia (CLANTON; SANDLER, 2010).

Atualmente, as técnicas tomográficas de imagem molecular mais sensíveis são o SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography* – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único) e o PET (*Positron Emission Tomography* – Tomografia por emissão de pósitron), as quais diferem, portanto, no tipo de radiação emitida pelo radiofármaco utilizado. Essas técnicas permitem construir imagens por meio da obtenção de imagens planares dos órgãos e tecidos, em diferentes ângulos ao redor do paciente, e posterior reconstrução das mesmas para formação da imagem tridimensional (SAHA, 2010).

O sistema PET, por sua vez, proporciona maior resolução espacial da imagem reconstruída do que a gerada pelo SPECT, devido à emissão dos raios gama coincidentes pelos radionuclídeos emissores de pósitrons e o uso de detectores posicionados em círculos. Nas imagens geradas por PET, a resolução é somente afetada pela distância percorrida pelo pósitron antes da colisão com um elétron (aniquilação), fator dependente da energia do pósitron emitido pelo radionuclídeo (PIMLOTT; SUTHERLAND, 2011).

Dentre os vários radionuclídeos emissores de pósitrons, como o ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{68}Ga e ^{82}Rb , o Gálio-68 pode ser convenientemente obtido a partir de um gerador de germânio-68/gálio-68, que pode ser usado dentro de um departamento de medicina nuclear por cerca de 1 ano, graças ao tempo de meia-vida longo do radionuclídeo pai ($t_{1/2} \text{ Ge} = 270,8$ dias). O gálio-68 permite fácil radiomarcagem de moléculas para aquisição de imagens por PET. É compatível com a farmacocinética da maioria das moléculas para radiomarcagem, de baixo peso molecular, como pequenas moléculas orgânicas, peptídeos ou mesmo fragmentos de anticorpos e oligonucleotídeos. Outra vantagem é que ao submeter um paciente a uma injeção com atividade compatível com boa qualidade de imagem PET, a irradiação do paciente é limitada devido ao curto tempo de meia-vida (LEPAREUR, 2022).

Um estudo realizado por Emmett e colaboradores (2019) na Austrália, Canadá e Reino Unido comparou a capacidade dos exames PET/CT com injeção do radiofármaco fluorometilcolina- ^{18}F (FCH- ^{18}F), PET/CT com injeção do radiofármaco PSMA-11-HBED-CC- ^{68}Ga (PSMA-11- ^{68}Ga) e ressonância magnética multiparamétrica pélvica, em estratificar pacientes com recorrência bioquímica local e sistêmica do câncer de próstata. No presente estudo, a taxa de detecção de focos metastáticos extra fossa prostática da modalidade de imagem de ressonância magnética pélvica foi menor em comparação à taxa de detecção por imagens de corpo inteiro com PSMA- ^{68}Ga ou FCH- ^{18}F .

Os resultados das análises demonstraram que a especificidade foi elevada para as três modalidades de imagem (ressonância magnética pélvica, FCH- ^{18}F e PSMA- ^{68}Ga), no entanto a sensibilidade dos agentes PET foi maior do que o da ressonância magnética. Esses resultados dos exames de imagem alteraram o manejo e respostas ao tratamento em 47% dos pacientes avaliados, sugerindo um papel importante do exame PET na triagem de pacientes com metástase localizada na fossa prostática e potencial curativo com radioterapia de resgate (EMMETT et al., 2019).

Um estudo de Buchmann e colaboradores (2007) relatou maior precisão diagnóstica de exame PET/CT realizado com DOTATOC- ^{68}Ga para detectar lesões metastáticas nos pulmões e coluna vertebral provenientes de NETs em comparação ao exame SPECT realizado com DTPAOC- ^{111}In (BUCHMANN et al., 2007).

Um estudo de Putzer e colaboradores (2009) demonstrou que o PET/CT com DOTATOC-⁶⁸Ga foi mais sensível no diagnóstico de metástases ósseas provenientes de NETs do que CT ou cintilografia óssea (PUTZER et al., 2009). Um estudo de Frilling e colaboradores (2010) demonstrou que a acurácia diagnóstica do PET/CT com DOTATOC-⁶⁸Ga foi maior em comparação aos exames de imagem convencionais tomografia computadorizada e ressonância magnética em pacientes com NETs e os resultados levaram a uma mudança no manejo clínico em 60% dos pacientes examinados (FRILLING et al., 2010).

Em estudos de Poeppel e colaboradores (2011) e Kabasakal e colaboradores (2012) avaliando as sensibilidades e valores de absorção de ⁶⁸Ga-DOTATATO-⁶⁸Ga X DOTATOC⁶⁸Ga e de DOTATATO-⁶⁸Ga X DOTANOC-⁶⁸Ga, não foram encontradas diferenças na precisão do diagnóstico (POEPEL et al., 2011a) (KABASAKAL et al., 2012).

3.5 Estrutura química dos receptores de membrana e ligantes

3.5.1 Estrutura do glutamato carboxipeptidase II (GCPII/ PSMA)

Há aproximadamente duas décadas, o glutamato carboxipeptidase II (GCPII), também denominado PSMA, emergiu rapidamente como um novo e promissor alvo para o diagnóstico e terapia de câncer de próstata (MACHULKIN et al., 2016). O GCPII é uma metaloenzima de zinco inserido na membrana binuclear com moderada a baixa expressão em tecidos saudáveis e abundantemente expressos em células de câncer de próstata em todos os estágios e células metastáticas (KOPKA et al., 2017).

Três domínios estruturais são observados no GCPII/PSMA: a parte intracelular N-terminal curta (19 aa), a região transmembranar hidrofóbica (19 - 43 aa) e o domínio extracelular (44 - 750 aa) (**Figura 7**) (USPENSKAYA et al., 2022).

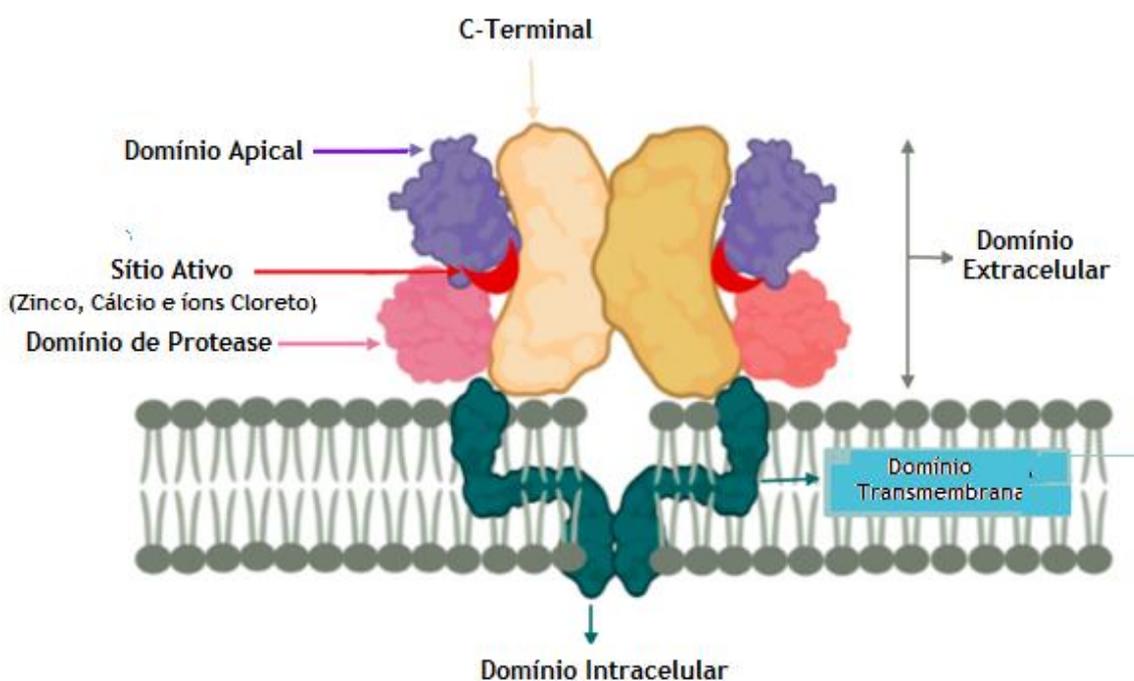
O domínio extracelular do GCPII por sua vez é composto por domínios entrelaçados: o domínio de protease abrange os aminoácidos 57 a 116 e 352 a 590, o domínio apical protege o sítio ativo e forma o amplo canal de ligação ao substrato com o domínio de protease. A cavidade de ligação do PSMA é um acessório em forma de funil com 20 Å de profundidade que leva ao sítio ativo,

que contém dois íons Zn^{2+} . Além do local ativo, várias sub bolsas foram identificadas dentro da cavidade de ligação. Estes incluem a chamada bolsa farmacofórica S10 com alta afinidade por glutamato, o sítio de ligação a arenos (compostos orgânicos baseados em um ou mais anéis aromáticos) e a bolsa não farmacofórica S1, que contém um “adesivo de arginina” carregado positivamente e uma “bolsa hidrofóbica” (LUNDMARK et al., 2022).

A interação entre o sítio ativo do PSMA (contendo dois átomos de zinco) e um grupo farmacofórico de um inibidor de PSMA envolve interações específicas com os átomos de zinco e o uso de vários núcleos centrais diferentes e grupos de ligação ao zinco na estrutura do inibidor. Esta interação é crucial para a capacidade do inibidor de se ligar ao PSMA e potencialmente inibir a função biológica catalítica da enzima (**Figura 7**) (NIK FARJAM et al., 2022).

O papel biológico do PSMA nas células cancerígenas é o metabolismo do folato, o que contribui para a progressão do câncer. O PSMA facilita o transporte de ácido fólico nas células de câncer de próstata. Devido aos danos no DNA e aos mecanismos de reparo do DNA, as células necessitam de altos níveis de PSMA para adquirir folato (USPENSKAYA et al., 2022).

Figura 7 - Representação esquemática da proteína transmembrana PSMA/GCPII.



Fonte: Adaptado de (NIK FARJAM et al., 2022).

Baseado nessa abordagem de ligação ao receptor, diferentes moléculas destinadas à detecção e visualização do PSMA (GCPII) foram desenvolvidas. Essas moléculas podem ser divididas em três categorias distintas: 1) anticorpos 2) aptâmeros e 3) pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA (peptídeos). Entre esses compostos, as pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA têm várias vantagens sobre os demais grupos, como farmacocinética e melhor depuração sanguínea (MACHULKIN et al., 2016). Conseqüentemente, o número de pesquisas neste campo continua significativo, e os inibidores de PSMA para aplicações em Medicina Nuclear permanecem promissores (HENNRICH; EDER, 2021).

3.5.2 Pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA

Atualmente, a imagem molecular por meio da tomografia por emissão de pósitrons (PET) do câncer de próstata, utilizando pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA, é uma realidade na prática clínica e fornece informações detalhadas sobre características moleculares individuais do câncer como por exemplo, a expressão de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos. (HENNRICH; EDER, 2021).

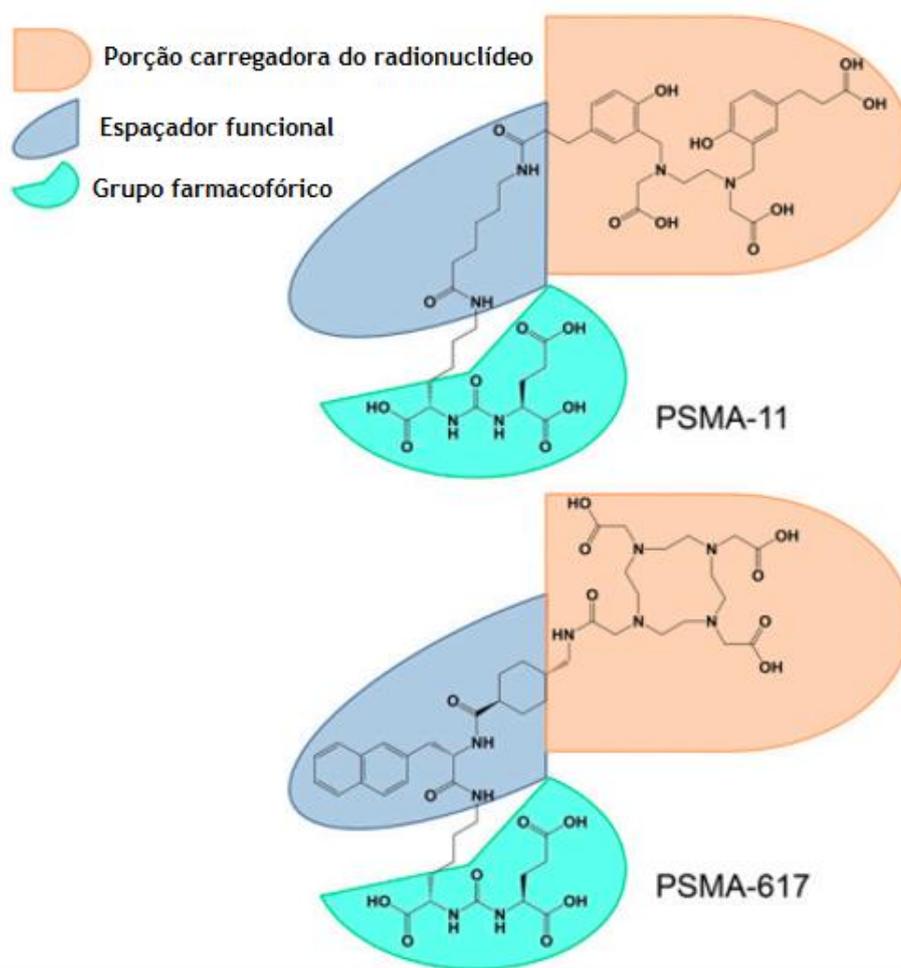
Geralmente, a estrutura química dessas pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA consiste em um sítio de ligação ao PSMA (grupo farmacofórico), um espaçador e um sítio de ligação ao radionuclídeo, como os quelantes 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-ácido tetraacético (DOTA) ou 1,4,7,10-tetraazaciclododecano,1-(glutárico ácido) ácido -4,7,10-triacético (DOTAGA) como pode ser observado na **Figura 8** (HENNRICH; KOPKA, 2019).

As pequenas moléculas inibidoras direcionadas ao PSMA podem ser divididas de acordo com o grupo farmacofórico em três tipos; compostos à base de ureia, à base de fósforo e à base de tiol. Os compostos à base de ureia demonstraram afinidade de ligação superior ao receptor PSMA em comparação com os outros dois tipos e simplicidade sintética (LUNDMARK et al., 2022). Conseqüentemente, a maioria das pequenas moléculas inibidoras específicas ao PSMA carregam o sítio de ligação à base de ureia (KOPKA et al., 2017).

Esses sítios de ligação ao PSMA baseados em ureia são presentes em três formas: glutamato-ureia-lisina (glu-ureia-lys), glutamato-ureia-glutamato (glu-ureia-glu), ou glutamato-ureia-cisteína (glu-ureia-cys) (DIAO et al., 2019).

O espaçador tem um impacto significativo na estrutura do conjugado de PSMA, influenciando a relação estrutura-atividade do composto inteiro e desempenhando duas funções primárias (USPENSKAYA et al., 2022). A primeira função consiste em separar as partes funcionais do conjugado e garantir a ligação do grupo farmacofórico da molécula ao sítio ativo do receptor PSMA, como também “transportar” a substância ativa (radionuclídeo) o mais próximo possível da superfície da membrana celular. Para desempenhar essa função o comprimento do espaçador deve ser escolhido de forma ideal.

Figura 8 - Arranjo estrutural do sítio de ligação dos radionuclídeos: porção carregadora do radionuclídeo (quelante), espaçador funcional e sítio de ligação ao receptor PSMA (grupo farmacofórico).



Fonte: Adaptado de (KOPKA et al., 2017a).

A segunda função dos espaçadores é aumentar a afinidade com o sítio ativo do PSMA através da presença de grupos aromáticos na estrutura do espaçador. Além da afinidade, o espaçador tem um efeito significativo nos parâmetros farmacocinéticos. A introdução de determinados grupos na estrutura também pode afetar a estabilidade dos conjugados na corrente sanguínea e células. (USPENSKAYA et al., 2022).

Hennrich e colaboradores (2021) relatam que a introdução de grupos aromáticos na região dos espaçadores dos inibidores de PSMA à base de ureia alteram drasticamente as propriedades de internalização e, conseqüentemente, a captação pelo tumor (HENNRICH; EDER, 2021). Caso a molécula seja totalmente alifática, a afinidade e a internalização são baixas ou não ocorre, respectivamente, e o traçador se dirige principalmente para o fígado sem qualquer sinal detectável no tumor. Ao introduzir grupos aromáticos no espaçador, o traçador passa a apresentar melhor afinidade e internalização significativa na célula tumoral, resultando em uma captação tumoral visível e um perfil farmacocinético alterado. O quelante HBED-CC apresenta os requisitos funcionais do espaçador por meio de suas porções aromáticas e, portanto, interage bem com o sítio de ligação (grupo farmacofórico), resultando em um desempenho *in vivo* promissor para toda a molécula como pode ser observado na (HENNRICH; EDER, 2021).

Os diversos quelantes DOTA, HBED-CC etc. permitem a complexação e transporte dos radionuclídeos com finalidades diagnósticas e/ou terapêuticas e serão discutidos no tópico 3.5.5

3.5.2.1 PSMA-11

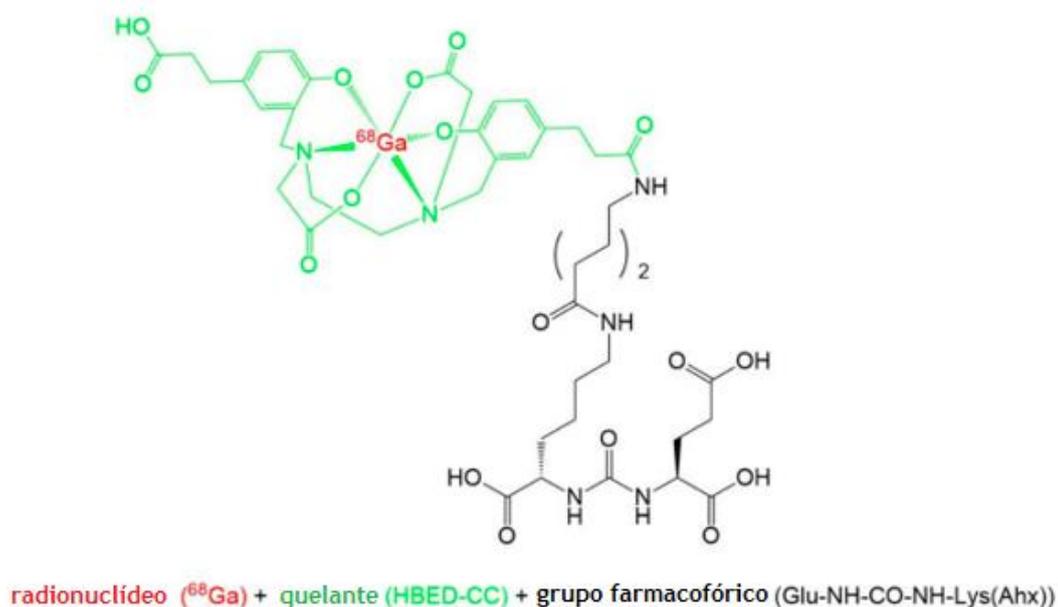
Em 2020, o PSMA-11-⁶⁸Ga (também denominado DKFZ-PSMA-11-⁶⁸Ga ou PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como o primeiro radiofármaco marcado com ⁶⁸Ga para imagens PET de câncer de próstata positivo para PSMA (HENNRICH; EDER, 2021). Esse radiofármaco é indicado na prática clínica para investigar suspeita de lesões metastáticas em pacientes com câncer de próstata avançado que podem ser potencialmente curáveis principalmente por radioterapia, bem como para pacientes com suspeita de câncer de próstata recorrente. Apresenta maior acurácia em detectar

oligometástases em pacientes com baixos valores de PSA em comparação aos exames de imagem convencionais e consiste numa ferramenta importante para implementação de terapia individualizada e avaliação de resposta à terapia (HENNRICH; EDER, 2021).

O precursor, PSMA-11, pertence à classe de inibidores de PSMA de baixo peso molecular e o grupo farmacofórico, glu-ureia-lys (Glu -NH-CO-NH- Lys), é composto por dois aminoácidos, glutamato e lisina, unidos por uma unidade de ureia. Esse grupo farmacofórico pode ser conjugado com vários quelantes para marcação com ^{68}Ga (LEPAREUR, 2022).

Este radiofármaco combina o peptidomimético Glu-NH-CO-NH-Lys (Ahx)-HBED-CC com o radionuclídeo ^{68}Ga , permitindo imagens específicas de células tumorais que expressam PSMA e a sua estrutura química é representada na **Figura 9** (HENNRICH; EDER, 2021).

Figura 9 - Estrutura química do PSMA-11- ^{68}Ga . Em vermelho o radionuclídeo ^{68}Ga , em verde estrutura química do quelante (HBED-CC) e em preto estrutura química do sítio de ligação (grupo farmacofórico) (glu-ureia-lys).



Fonte: Adaptado de (HENNRICH; EDER, 2021).

O sítio de ligação ao receptor (grupo farmacofórico) compreende uma porção terminal de glutamato conectada a uma parte ligante/efetora por meio da funcionalidade ureia de ligação ao zinco. O agente complexante N,N'-bis[2-

ácido hidroxí-5-(carboxietil)benzil]-etilenodiamina-N,N'-diacético (HBED-CC) é conjugado ao grupo farmacofórico glu-ureia-lys através do ligante ácido aminohexanóico. Uma das características únicas da estrutura química do PSMA-11 é que o quelante HBED-CC assume requisitos funcionais por meio de suas porções aromáticas e, portanto, interage bem com o sítio de ligação (grupo farmacofórico), resultando em um desempenho *in vivo* promissor para toda a molécula (HENNRICH; EDER, 2021).

O conjugado resultante, PSMA–HBED-CC (PSMA-11), pode ser facilmente radiomarcado com o radionuclídeo para diagnóstico ^{68}Ga , no entanto, não é possível realizar a marcação com radiometais terapêuticos clinicamente relevantes, como ^{177}Lu ou ^{225}Ac . Portanto, PSMA-11 pode ser usado apenas para fins de diagnóstico. No entanto, outros precursores inibidores de PSMA podem ser usados com sucesso e vem sendo estudados para terapia alvo radionuclídica com PSMA para câncer de próstata avançado (KOPKA et al., 2017).

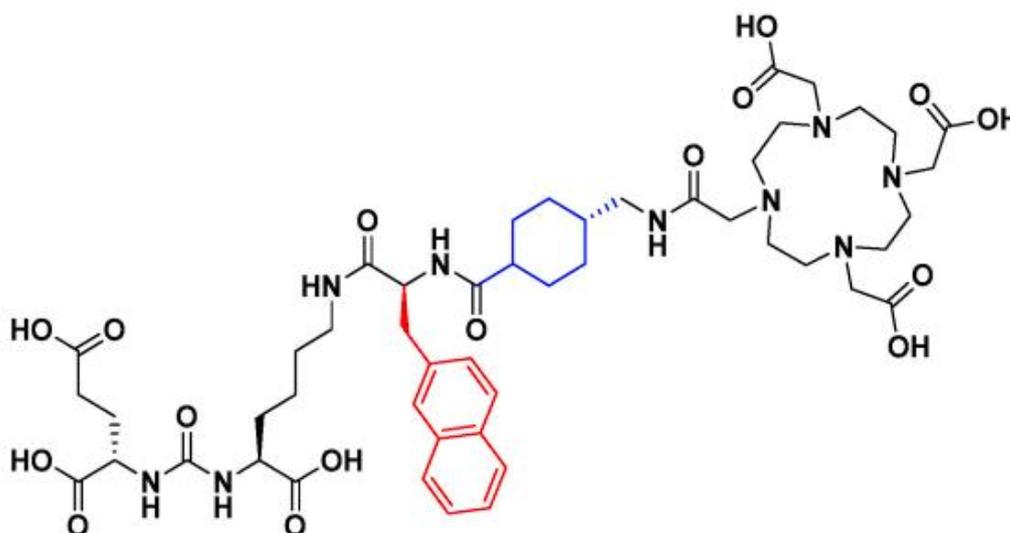
3.5.2.2 PSMA-617

Nos últimos anos, foram realizadas e investigadas modificações na estrutura do espaçador que resultaram em vários conjugados teranósticos diferentes clinicamente validados, como PSMA-617 e PSMA-I&T (KOPKA et al., 2017). Atualmente, o PSMA-617 e o PSMA-I&T são os traçadores mais frequentemente utilizados para terapia alvo radionuclídica em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos. Ambos compartilham o mesmo grupo farmacofórico de ligação glu-ureia-lys-PSMA e seus quelantes DOTA/DOTAGA permitem marcação com radionuclídeos terapêuticos (EVANS et al., 2018).

O PSMA-617 é composto por três fragmentos estruturais: o grupo farmacofórico glu-ureia-lys que é o fragmento de direcionamento ao receptor, espaçador (que conecta duas estruturas) e quelante DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), o qual é capaz de complexar os radionuclídeos ^{68}Ga ou ^{177}Lu (LUNDMARK et al., 2022). O espaçador consiste na estrutura do ácido 2-naftil-L-alanina-tranexâmico. O fragmento estrutural naftílico, além de conectar o grupo farmacofórico e o quelante DOTA, tem papel significativo no direcionamento, atividade biológica, contraste e farmacocinética

da estrutura (**Figura 10**). A presença do grupo 2-naftil-L-alanina na estrutura do espaçador interage favoravelmente com o sítio de ligação hidrofóbico S1 do receptor. A funcionalidade do grupo ciclohexil no ácido tranexâmico (destacado em azul, (**Figura 10**), está relacionada com propriedades farmacocinéticas e de afinidade(LUNDMARK et al., 2022).

Figura 10 - Estrutura química do PSMA-617. A estrutura do espaçador naftílico é destacada em vermelho e a estrutura do ligante ciclohexil em azul.



Fonte: (LUNDMARK et al., 2022).

A empresa farmacêutica Novartis conduziu um estudo clínico de fase III envolvendo PSMA-617-¹⁷⁷Lu e terapia alvo radionuclídica (RLT) de câncer de próstata e descreveu os resultados iniciais (USPENSKAYA et al., 2022). Recentemente o PSMA-617-¹⁷⁷Lu foi aprovado pelo FDA como a primeira terapia radionuclídica receptor específica para câncer de próstata metastático resistente à castração positivo para PSMA (LUNDMARK et al., 2022).

Estudos pré-clínicos demonstraram propriedades de direcionamento promissoras, como baixa captação renal, rápido clareamento sanguíneo e alta retenção tumoral (LUNDMARK et al., 2022). O Lu-177 emite partículas com energia máxima de 497 keV e energia média de 133 keV com penetração máxima nos tecidos moles de 1,5 mm (JUZENIENE et al., 2021). As partículas

betas negativas (β^-), resultantes do decaimento do ^{177}Lu , têm um alcance relativamente longo no tecido, o que significa que podem percorrer distâncias maiores em comparação com outras partículas ionizantes, como as partículas alfa. Para tumores maiores, o alcance mais longo das partículas β^- permite que elas penetrem profundamente no tecido. Isso é vantajoso para irradiar e depositar uma dose absorvida significativa em tumores macroscópicos, ajudando a danificar e destruir as células cancerígenas nesses tumores de tamanho considerável. Em contraste, pequenos aglomerados de células cancerígenas metastáticas únicas podem estar localizados em regiões mais superficiais ou profundas do tecido. O alcance mais longo das partículas β^- pode resultar em uma dispersão maior de energia ao longo do trajeto da partícula, o que pode resultar em uma dose absorvida mais diluída ao longo de um volume maior de tecido. Isso pode ser benéfico para evitar danos excessivos aos tecidos normais circundantes (JUZENIENE et al., 2021).

3.5.2.3 PSMA-I&T

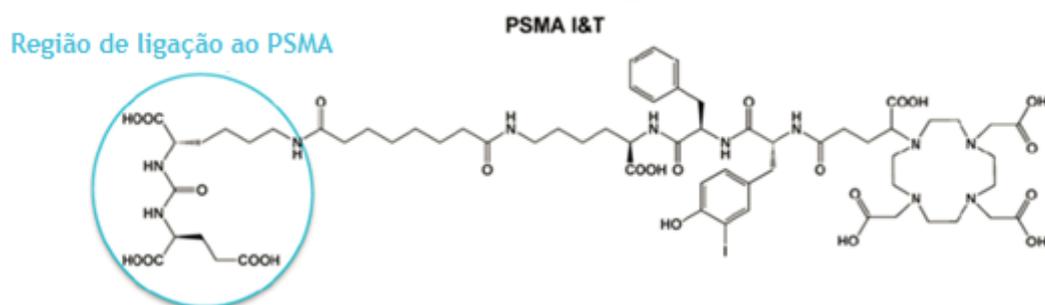
Outro radiofármaco teranóstico direcionado ao PSMA, o PSMA-I&T, vem sendo estudado e sua estrutura química está representada na **Figura 11** (DI IORIO et al., 2022).

No caso do PSMA-I&T, o grupo farmacofórico consiste na estrutura K-ureia-Glu (XuE) (composta por ureia, um resíduo de glutamato e um substituinte variável "X" que, neste caso, um espaçador para aumentar a afinidade de interação com bolsa hidrofóbica receptora e um quelante para ligar o radionuclídeo (DI IORIO et al., 2022).

A estrutura DOTAGA-FFK (SubKuE) representa uma espinha dorsal flexível e ajustável para o desenvolvimento de inibidores de PSMA baseados em KuE. No espaçador houve a substituição de um dos resíduos de D-fenilalanina por 3-iodo-D-tirosina melhorando a interação da molécula traçadora com um sítio de ligação. Outra modificação na molécula foi a substituição do quelante DOTA por DOTAGA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-(ácido glutárico)-4,7,10-ácido triacético) para facilitar o procedimento de marcação com ítrio-90 e lutécio-177, melhorar farmacocinética e a afinidade com o receptor (DI IORIO et al., 2022).

Derivados DOTAGA mostraram maior hidrofiliçidade ($\log P = -3,9 \pm 0,1$ em comparação com $-2,7 \pm 0,02$ para os derivados DOTA) e melhor afinidade com PSMA, em comparação com derivados DOTA, resultando em uma internalização específica duas vezes maior do análogo DOTAGA marcado com ^{68}Ga e ^{177}Lu (WEINEISEN et al., 2014a).

Figura 11 - Estrutura química do PSMA I&T.



Fonte: Adaptado de (CHATALIC et al., 2016).

3.5.3 Receptores de somatostatina

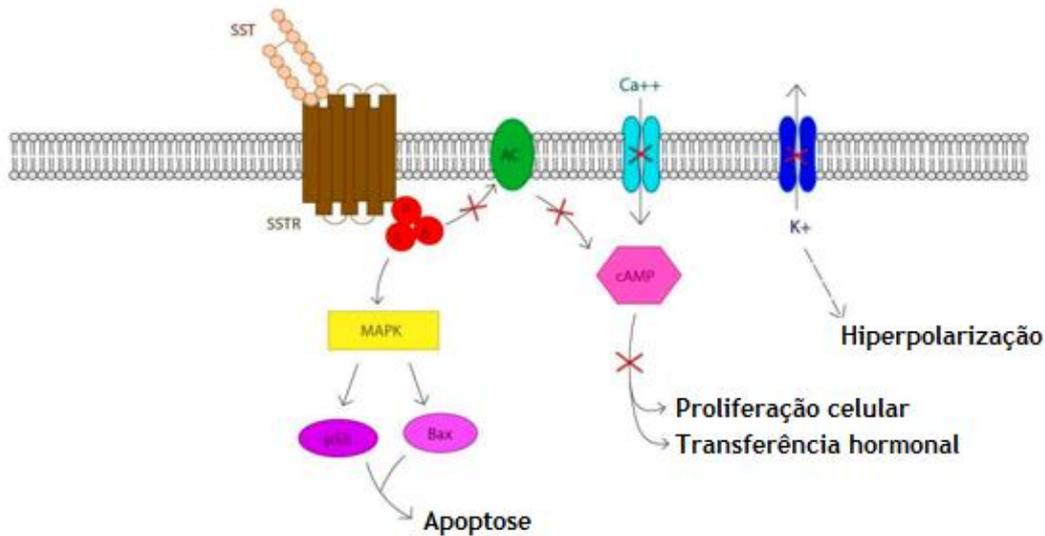
Tumores neuroendócrinos frequentemente expressam uma alta densidade de receptores de somatostatina (SSTRs- Somatostatin receptors) e essa característica os torna alvos moleculares únicos e específicos para imagens utilizando análogos de somatostatina (somatostatina corresponde ao ligante endógeno desses receptores) (KOOPMANS et al., 2009).

A somatostatina (SST- Somatostatin) é um pequeno hormônio peptídico cíclico de 14 aminoácidos produzida pelo hipotálamo inibindo a liberação de proteínas secretoras como hormônio do crescimento (somatotropina), glucagon, insulina e gastrina (BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK, 2013). A somatostatina também é expressa em outras partes do corpo, incluindo diferentes órgãos endócrinos, pâncreas, trato gastrointestinal e sistema imunológico (BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK, 2013).

Receptores de somatostatina são uma classe de receptores acoplados à proteína G consistindo em sete domínios transmembrana α -helicoidais, com ~20–25 aminoácidos (**Figura 12**) (DEL OLMO-GARCIA et al., 2021). Quando a

SST se encaixa no SSTR desencadeia uma cascata de sinais a jusante dentro do citoplasma da célula (DEL OLMO-GARCIA et al., 2021).

Figura 12 - Representação da interação ligante-receptor entre SST e SSTR (chave e fechadura), que desencadeia uma cascata de sinais dentro da célula. X = sinalização em cascata que é bloqueada quando o SST interage com o SSTR.



Fonte: Adaptado de (DEL OLMO-GARCIA et al., 2021).

Existem cinco subtipos de receptores de somatostatina, denominados SSTR1 a SSTR5, os quais são encontrados principalmente ao longo do trato gastrointestinal, no cérebro, nas glândulas suprarrenais e no pâncreas (DEL OLMO-GARCIA et al., 2021). Cada um desses receptores tem uma forte afinidade de ligação por determinada isoforma de SST, mas especificamente SSTR1–4 e SSTR5 possuem maior seletividade por SST-14 e SST-28, respectivamente. unidades que se dissociam do receptor quando ativadas pelo ligante (DEL OLMO-GARCIA et al., 2021).

Dentro da célula, ligado ao receptor, está um heterotrímero que consiste em subunidades α , β e γ que se dissociam do receptor quando ativadas pelo ligante endógeno SST. A interação do SST com seu respectivo receptor acoplado à proteína G leva à inibição do influxo intracelular de Ca^{2+} e da atividade da adenilato ciclase (AC- *Adenylate Cyclase*) dentro da célula, que regulam os níveis de AMP cíclico (AMPc- *cyclic Adenosine Monophosphate*). O AMPc está

envolvido na sinalização intracelular, como a transferência de hormônios dentro das células e a proliferação celular (CAKIR; DWORAKOWSKA; GROSSMAN, 2010).

Também pode inibir o efluxo de K^+ , levando à hiperpolarização da membrana, o que inibe o potencial de ação, impossibilitando-a de enviar sinais (no caso dos neurônios). Esses processos são equilibrados pela ativação de sinais de outros peptídeos, a fim de manter equilíbrio dentro da célula. O SST endógeno inibe a proliferação celular e altera a sinalização do fator de crescimento através da regulação de enzimas como a ativação da proteína tirosina fosfatase e a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Interação com estas e outras proteínas, como proteína tumoral (p53) e proteína X associada a Bcl-2 (Bax) leva as células a sofrerem apoptose (morte celular programada) (CAKIR; DWORAKOWSKA; GROSSMAN, 2010).

3.5.4 DOTA-PEPTÍDEOS análogos sintéticos de somatostatina

DOTATOC (DOTA-Tyr3-octreotídeo), DOTATATE (DOTA-tyr3-octreotato) e DOTANOC (DOTA-Nal3-octreotídeo) são exemplos de análogos da somatostatina que têm sido usados em combinação com ^{68}Ga para imagens PET de tumores neuroendócrinos. Esses peptídeos se ligam aos receptores de somatostatina na superfície das células tumorais, permitindo a visualização e caracterização de tais tumores por meio do exame PET (PRINCE et al., 2017). Peptídeos análogos sintéticos de somatostatina foram desenvolvidos em virtude da somatostatina apresentar como característica uma meia-vida plasmática muito curta, (de aproximadamente 3 minutos) (KOOPMANS et al., 2009).

3.5.4.1 DOTATATO, DOTATOC e DOTANOC

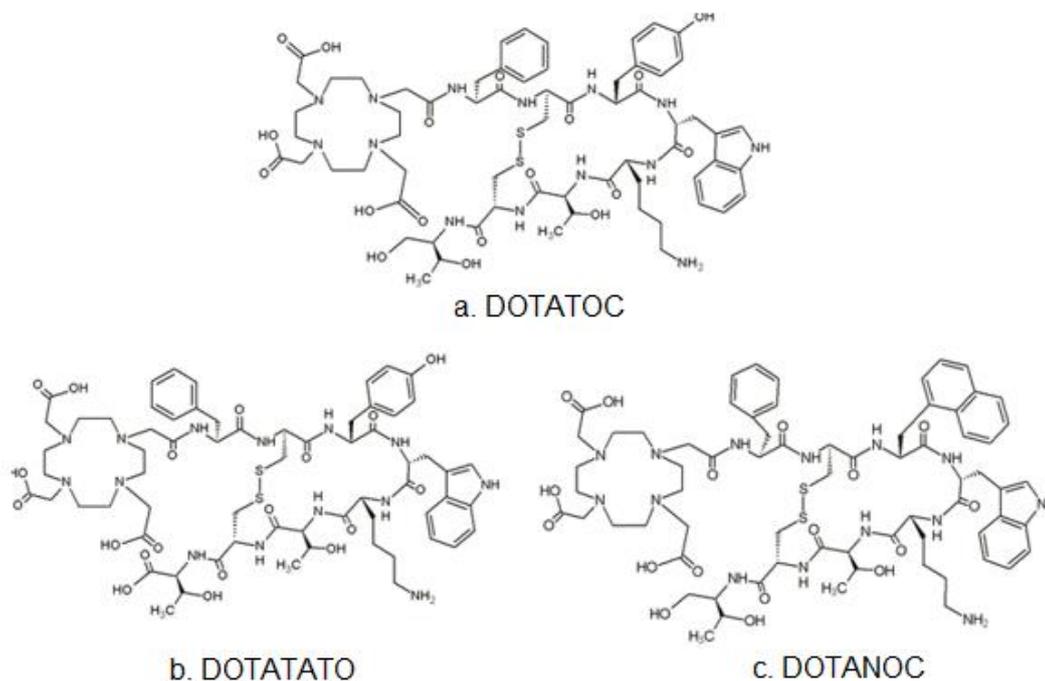
DOTATATO, DOTATOC e DOTANOC são peptídeos formados por oito aminoácidos ligados covalentemente ao quelante bifuncional DOTA, que pode quelar radionuclídeos como gálio-68, lutécio-177 e cobre-64, originando radiofármacos com finalidades para imagens de tomografia por emissão de pósitrons (PET) ou terapia alvo com radionuclídeos para tumores neuroendócrinos (BALLINGER, 2022). O quelante macrocíclico DOTA é o

mesmo para os três análogos de somatostatina e tem a vantagem de ser compatível com uma grande variedade de íons metálicos como, por ex. gálio, índio, ítrio, lutécio e cobre (BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK, 2013).

DOTA é um quelante mais forte que o DTPA de cadeia aberta. Esta característica faz com que se ligue a vários radionuclídeos que tenha uso em diversas aplicações em imagem e terapêutica (BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK, 2013).

A estrutura química dos três análogos ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA)-peptídeos - DOTA-Tyr3 - Thre8-octreotato, DOTA- [Tyr3]-octreotídeo e DOTA-[Nal3]-octreotídeo (DOTATATO, DOTATOC e DOTANOC) encontram-se esquematizados na **Figura 13**.

Figura 13 - Estruturas moleculares de a, DOTATOC; b, DOTATATO e c, DOTANOC.



Fonte: Adaptado de (BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK, 2013).

3.5.5 Quelantes

Quelantes promissores, como derivados fosfínicos NOTA macrocíclicos, HBED-CC e THP acíclicos e quelantes DATA híbridos, permitem uma rápida e fácil complexação com ^{68}Ga em condições de radiomarcção suaves (com ou sem aquecimento), o que favorece as radiomarcções baseadas em kit. O quelante HBED-CC é usado em dois kits comercialmente disponíveis para imagens de câncer de próstata (IllumetTM/Illuccix[®], Télix Produtos Farmacêuticos e IsoPROTrace-11[®], Isotopia, Israel) (LEPAREUR, 2022).

O radiometal acíclico HBED-CC (quelante) representa um agente complexante ao ^{68}Ga altamente eficaz principalmente para marcação radioativa à temperatura ambiente (EDER et al., 2014).

O HBED-CC têm uma coordenação de seis e sua estrutura inclui dois grupos hidroxibenzila ligados a uma estrutura de ácido etilenodiamina-N,N'-diacético. Os grupos hidroxibenzil no HBED-CC contribuem para suas propriedades quelantes, garantindo uma coordenação forte e estável com íons metálicos (Ga^{3+}). Esta complexação causa uma modificação na conformação do ligante que pode formar três diastereoisômeros distintos, cada um tendo dois enantiômeros. O aquecimento é necessário para aumentar a formação do isômero termodinamicamente mais estável, uma vez que a configuração pode impactar o comportamento biológico do radiofármaco (LEPAREUR, 2022).

O HBED-CC também apresenta uma natureza lipofílica o que favorece fortemente as propriedades de ligação ao receptor, uma vez que se descobriu que o “sítio de ligação ativo” do PSMA é composto de duas regiões estruturais, um representando uma bolsa lipofílica e o outro interagindo com inibidores à base de ureia (EDER et al., 2012). Devido às suas diferentes características químicas em comparação com NOTA ou DOTA, como maior lipofilicidade e presença de resíduos aromáticos, o HBED-CC tem um impacto positivo na farmacocinética e nas propriedades de ligação ao receptor, interagindo com a conhecida bolsa hidrofóbica acessória do PSMA(EDER et al., 2014).

Os quelantes macrocíclicos com três ou quatro átomos de nitrogênio em um anel tri e tetraaza formam complexos estáveis com gálio-68. Substituintes externos, geralmente na forma de grupos carboxila permitem conjugação conveniente com várias moléculas (KILIAN, 2014). De uma perspectiva

teranóstica, o DOTA e seus os derivados ainda continuam sendo o quelante de escolha, mesmo para radiomarcção com Ga-68. Peptídeos DOTA marcados com Ga-68 geralmente demonstram propriedades farmacológicas muito boas. A formulação de kit com precursores DOTA/DOTAGA ainda é uma área de pesquisa em andamento (LEPAREUR, 2022).

3.7 Radionuclídeo para imagem: ^{68}Ga

O Gálio está localizado no grupo 13 no 4^o período da tabela periódica e em solução aquosa, apenas o estado de oxidação +III é estável. Entretanto, a forma iônica Ga^{3+} é apenas estável em meio muito ácido abaixo de pH 3. Em pH acima de 3, a água atua como um ligante fraco e o gálio se associa a grupos hidróxido (LEPAREUR, 2022).

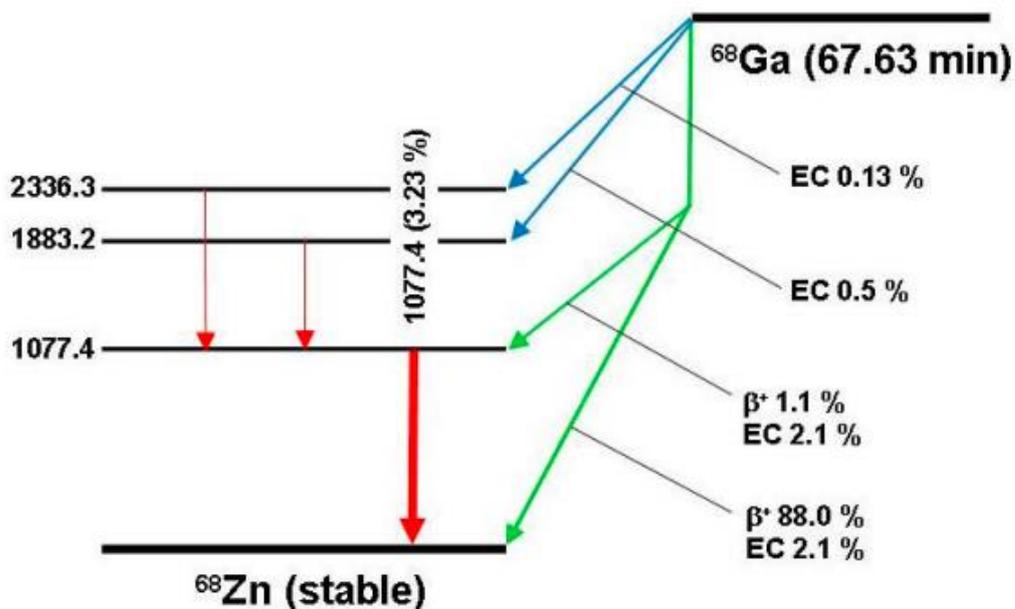
Em pH básico (> 7), o gálio forma o íon galato $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ que é solúvel, porém o gálio permanece indisponível para qualquer reação de complexação (KULPRATHIPANJA; HNATOWICH, 1977).

A hidrólise e formação de hidróxidos insolúveis na preparação dos radiofármacos ^{68}Ga continuam sendo um problema que pode ser contornado pelo uso de ligantes estabilizadores fracos, como citrato, acetato, oxalato e HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina 1-il]etanossulfônico) (BAUWENS et al., 2010). Este último, atuando tanto como tampão e um ligante quelante fraco, demonstrou desempenho superior ao radiomarcar com ^{68}Ga , no entanto, as limitações quanto ao seu uso estão relacionadas com sua toxicidade para uso humano e dessa forma, os tampões acetato são geralmente preferidos (LEPAREUR, 2022).

Gálio-68 é um radionuclídeo emissor de pósitrons utilizado para diagnóstico por PET, considerado ideal para pesquisa e uso hospitalar (ASLANI et al., 2014). Apresenta características físicas favoráveis com a maior parte do decaimento ocorrendo por emissão de pósitrons (89%) acompanhada por baixa emissão de fótons (1077 keV, 3,22%), parcialmente por captura de elétrons (11%) e meia vida de 67,63 minutos o que fornece níveis suficientes de radioatividade para captar imagens de alta qualidade, minimizando a dose de radiação ao paciente e aos profissionais que o manipulam.

A **Figura 14** apresenta o esquema de decaimento do galio-68 (BJØRNSTAD et al., 2013).

Figura 14 - Esquema de decaimento de ^{68}Ga para ^{68}Zn estável.

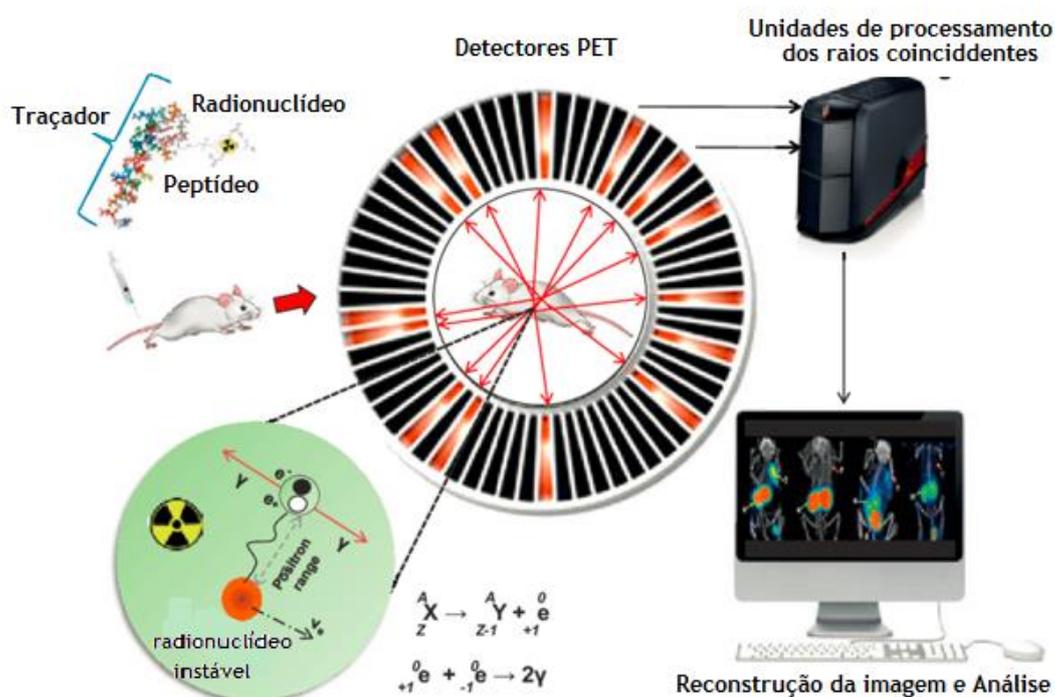


Fonte: (BJØRNSTAD et al., 2013).

No decaimento β^+ , um próton é convertido em um nêutron e um pósitron (um elétron carregado positivamente) é emitido do núcleo. O pósitron emitido percorre uma curta distância dentro do tecido antes de interagir com um elétron. Quando um pósitron encontra um elétron, as duas partículas se aniquilam. Essa aniquilação resulta na conversão de sua massa em energia na forma de dois raios gama de 511 keV emitidos em direções opostas. Esses raios gama são cruciais para imagens PET. Os equipamentos PET possuem detectores dispostos em anel ao redor do paciente. Quando os raios gama do evento de aniquilação de pósitrons atingem os detectores, eles interagem com os cristais de cintilação, produzindo flashes de luz. Os equipamentos PET são projetados para detectar raios gama que chegam aos detectores simultaneamente, no que é conhecido como detecção de coincidência. Isto ocorre porque a aniquilação de um pósitron produz dois raios gama que viajam em direções opostas. Os dados

coletados dos detectores são usados para reconstruir imagens tridimensionais da distribuição do radionuclídeo emissor de pósitrons dentro do corpo (**Figura 15**) (CHERRY; SORENSON; PHELPS, 2004).

Figura 15 - Representação esquemática de aquisição de imagem PET.



Fonte: Adaptado de (SELVARAJU, 2015).

Moléculas marcadas com ${}^{68}\text{Ga}$, com baixo peso molecular, como fragmentos de anticorpos e peptídeos, apresentam farmacocinética compatível com depuração elevada. O ${}^{68}\text{Ga}$ forma complexos estáveis com muitas moléculas contendo átomos doadores de elétrons como nitrogênio e oxigênio, o que significa que uma grande variedade de agentes quelantes pode ser usada para sua complexação (ROMERO et al., 2020). A natureza trivalente do ${}^{68}\text{Ga}$ também o torna adequado para radiomarcagem utilizando-se quelantes como o DOTA, conjugados a peptídeos (ASLANI et al., 2014).

Tem a vantagem de poder ser obtido no local a partir de um pequeno sistema gerador ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$, dentro de poucos minutos, a um custo muito menor do que outros radionuclídeos também emissores de pósitrons (ASLANI et al., 2014).

3.7.1 Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

O ^{68}Ga pode ser obtido a partir de um gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ pronto para uso na prática clínica em exames de tomografia por emissão de pósitrons (PET), permitindo aquisições de imagens moleculares em hospitais e clínicas e sem depender de um ciclotron no local (FANI; ANDRÉ; MAECKE, 2008).

Os geradores normalmente consistem em uma coluna que aloja uma mistura de radionuclídeos “pai” e “filho” em equilíbrio e uma fase estacionária (matriz) situada em um recipiente blindado (VELIKYAN, 2015a). Na clínica, um gerador pode ser eluído para obtenção do ^{68}Ga aproximadamente a cada 4 h (até 3 eluições/dia), dependendo da atividade inicial do gerador e de seu prazo de validade (após um tempo igual a três meias-vidas do ^{68}Ga , ou 3,4 h, quase 91% da atividade teórica máxima foi gerada) (LEPAREUR, 2022).

O ^{68}Ge , radionuclídeo “pai”, é produzido em um ciclotron de alta energia a partir do isótopo estável Ga-69 por meio da reação nuclear $^{69}\text{Ga}(p, 2n)^{68}\text{Ge}$. O ^{68}Ge é retido em uma coluna preenchida com matriz inorgânica, orgânica ou mista, onde espontaneamente decai para ^{68}Ga , radionuclídeo “filho”, que pode então ser extraído com um eluente. ^{68}Ga decai, por sua vez, para ^{68}Zn estável e dessa forma os elementos Ge, Ga e Zn estão presentes no gerador e podem ser encontrados no eluato (VELIKYAN, 2015).

Os primeiros geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ cromatográficos em fase sólida (baseados em troca iônica) usavam alumina (óxido de alumínio) como fase estacionária da matriz e EDTA como eluente (10 mL de solução de EDTA 0,005 M). Esses geradores apresentavam limitações, como baixa eficiência de eluição e presença de impurezas metálicas no eluato, o que interferia nos processos de radiomarcção. Com a evolução da pesquisa e desenvolvimento neste campo, materiais à base de sílica, como óxido de estanho (IV) e dióxido de titânio, foram investigados como fases estacionárias para melhorar o desempenho dos geradores. Esses materiais visam aumentar a eficiência de eluição e reduzir impurezas (RÖSCH, 2013).

O uso de materiais em escala nanométrica, como Zr^{IV} (zircônio) e Ce^{IV} (cério), têm sido explorados para melhorar ainda mais o desempenho dos geradores. Esses materiais oferecem maior área superficial e propriedades de

ligação aprimoradas e sem necessidade de pós-purificação do eluato de ^{68}Ga , aumentando potencialmente a eficiência de eluição do ^{68}Ga (CHAKRAVARTY et al., 2011).

Atualmente, os geradores de radionuclídeos $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ comercialmente disponíveis, utilizam como matriz da coluna dióxido de titânio (TiO_2), dióxido de estanho (SnO_2) ou resina orgânica. O $^{68}\text{Ga}^{3+}$ iônico é eluído a partir de geradores de dióxido de titânio (TiO_2) ou dióxido de estanho (SnO_2) em solução de HCl na concentração variando entre 0,1 e 1 M. A limitação da maioria dos geradores comercialmente disponíveis é que o ^{68}Ga obtido da coluna primária não é idealmente adequado para a síntese de rotina de compostos marcados com ^{68}Ga . Os eluatos da maioria dos geradores comerciais possuem baixo volume específico de ^{68}Ga e pode conter diferentes oligoelementos devido à solubilidade de sorvente de óxido metálico (ASTI et al., 2008). A presença destes íons metálicos no eluato que competem com o ^{68}Ga é um grande obstáculo na química de complexação de ^{68}Ga e, portanto, requer a inclusão de processamentos pós-eluição (OCAK et al., 2010).

O rendimento do ^{68}Ga eluído varia entre cerca de 70% a 80% para geradores novos, com decréscimo mais ou menos acentuado ao longo do tempo e apresentam níveis de ^{68}Ge “breakthrough” de cerca de 0,01-0,001%, com percentuais crescentes ao longo do uso do gerador. Os geradores são produzidos com atividades de ^{68}Ge de até 3,7 GBq / 100 mCi (ZHERNOSEKOV et al., 2007).

Os geradores comerciais com certificado de boas práticas de fabricação (grau BPF) surgiram para satisfazer as crescentes exigências das autoridades legais (RÖSCH, 2013). Alguns exemplos de geradores de radionuclídeos $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de grau BPF atualmente disponíveis no mercado estão apresentados na **Figura 16** (ROMERO et al., 2020).

Figura 16 - Geradores de germânio-68 (^{68}Ge) /gálio-68 (^{68}Ga) de grau radiofarmacêutico BPF. Em A da esquerda para a direita: Galliapharm[®] do fabricante Eckert & ziegler, Galli Ad[®] do fabricante IRE e em B GeGant[®] do fabricante ITG.



B



Fonte: adaptado de (LEPAREUR, 2022).

Tabela 1 apresenta as características dos principais geradores comerciais $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ atualmente disponíveis no mercado e consiste numa versão adaptada da publicada por Romero e colaboradores (2020) (ROMERO et al., 2020) .

Tabela 1 - Tabela comparativa dos principais geradores disponíveis no mercado.

Fabricante	Coluna	Eluente	(%) ⁶⁸ Ga inicial	(%) ⁶⁸ Ge breakthrough	Metais (ppm)
Cyclotron Co.,Ltd (Obninsk) Rússia	TiO ₂	0,1 M HCl	> 80	< 5×10 ⁻³	< 2
Eckert& Ziegler (GalliaPharm®)Berlin, Alemanha	TiO ₂	0,1 M HCl	> 70	3 – 5×10 ⁻³	1 – 10
iTemba LABS África do Sul	SnO ₂	0,6 M HCl	> 80	< 2×10 ⁻³	1 – 20
ITG GmbH Munique, Alemanha	Pyrogallol-SiO ₂	0,05 M HCl	> 80	< 5×10 ⁻³	< 0,2
IRE EliT (Galli Eo®) Bélgica	Não especificado	0,1 M HCl	> 65	< 1×10 ⁻³	< 1

Fonte: Adaptado de (ROMERO et al., 2020) .

A Cyclotron Co, Ltd. (Obninsk, Russia) desenvolveu um gerador baseado em TiO₂. Este gerador fornece gálio catiônico em 5 mL de HCl 0,1M, que pode ser facilmente tamponado para quelação (AMOR-COARASA et al., 2016). No entanto, o volume de eluição e teor de impurezas metálicas e de ⁶⁸Ge do eluato do gerador requer pré-concentração da atividade para marcação de quantidades nanomolares de peptídeos (ASTI et al., 2008). O eluato de ⁶⁸Ga deve ser passado diretamente por uma coluna de pré-purificação de fase reversa Strata-X ou C18. A coluna de pré-purificação deve ser lavada com uma mistura de HCl/acetona (20/80) e o ⁶⁸Ga retido eluído com uma solução de 0,05 M de HCl/acetona. A solução com acetona deve passar por evaporação utilizando fonte de calor até quase secar para remover os vestígios de acetona e ao final ser reconstituída com HCl 0,1 M. A purificação e concentração do eluato de ⁶⁸Ga antes da marcação são obrigatórias (CHAKRAVARTY et al., 2016). Este gerador

mostra um rendimento de eluição de ^{68}Ga superior a 80% com uma impureza de ^{68}Ge não superior a $5 \times 10^{-3} \%$ quando o gerador está novo. O rendimento de eluição do ^{68}Ga diminui com o tempo (após 400 eluições) para cerca de 45% e os níveis de impureza de ^{68}Ge por eluição aumentam para cerca de $10^{-2}\%$ com o tempo de uso do gerador. O conteúdo de íons metálicos no eluato não é superior a 2 ppm para alguns metais (Pt, Ba, Fe, Zn, Mn, Pb, Ti, Cr, Al, Cd, Co, Cu, Ni e V) (ROMERO et al., 2020).

A Eckert & Ziegler (Alemanha) fabrica um gerador também a base de TiO_2 que fornece características de eluição melhoradas e foi aprovado para uso clínico sob a marca 'GalliaPharm[®]' na Europa, Estados Unidos e Brasil. Trata-se de um gerador grau BPF que fornece $^{68}\text{GaCl}_3$ pronto para uso em radiomarcações se necessidade de pré-purificação utilizando colunas de fase reversa. Este gerador é eluído com 10mL ou 7mL de HCl 0,1 M (o volume de eluição pode variar) com eficiência de eluição de ^{68}Ga de cerca de 70% quando o gerador é novo. Para este gerador, as impurezas de ^{68}Ge normalmente são de $3 \times 10^{-5}\%$ quando novo a $5 \times 10^{-3}\%$ após eluições repetidas (por exemplo, 200) ou ao longo do tempo (por exemplo, após cerca de 1 ano). As impurezas metálicas no eluato de ^{68}Ga variam entre 1 e 10 ppm para íons Cu, Fe, Al, Mn e Ti (ROMERO et al., 2020).

A iTemba LABS (África do Sul) fabrica geradores de fase sólida baseados em SnO_2 ; este gerador é eluído com HCl 0,6 M e tem um rendimento de cerca de 80% em 5 mL de eluente. A impureza de ^{68}Ge para este gerador é menor que $2 \times 10^{-3}\%$ na data de referência de fabricação. O total de impurezas químicas (como íons metálicos) está em torno de 1–20 ppm para Sn, Fe, Cu, Mn e Al (AMOR-COARASA et al., 2016).

Um gerador grau BPF foi introduzido no mercado pela Isotopen Technologies Garching GmbH (ITG GmbH). O gerador ITG $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ é baseado em um dodecil-3,4,5-trihidroxibenzoato modificado hidrofobicamente, ligado a uma resina de sílica modificada com octadecil (resina C-18) (AMOR-COARASA et al., 2016). Trata-se também de um gerador grau BPF que fornece $^{68}\text{GaCl}_3$ pronto para uso em radiomarcações sem a necessidade de pré-purificação utilizando colunas de fase reversa. Este gerador é eluído com HCl 0,05 M e pode ser facilmente tamponado para marcação (AMOR-COARASA et al., 2016). O teor de impureza de ^{68}Ge consiste em 3×10^{-3} – $4 \times 10^{-4} \%$ com um rendimento global de eluição de ^{68}Ga superior a 80 %. A diminuição da impureza de ^{68}Ge com o uso

é uma característica única deste gerador. A concentração total de impurezas metálicas é menor que 0,2 ppm e $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ de ^{68}Ga para Ni, Zn, Nb, Pb, Fe e Cu (AMOR-COARASA et al., 2016).

Outro gerador emergente é Galli Eo (de IRE ELiT, Bélgica), no entanto, a coluna contém uma resina não especificada. O gerador é eluído com HCl 0,1 M e tem mais de 67 % de rendimento de eluição e menos de $1 \times 10^{-3} \%$ de impureza de ^{68}Ge . O conteúdo de metal por eluição é inferior a 1 ppm e $\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$ de ^{68}Ga para Fe, Cu, Ni, Zn, Pb e Al. Eckert & Ziegler GalliaPharm e IRE ELiT Galli Eo[®] são geradores de grau BPF aprovados pelo FDA (ROMERO et al., 2020). O gerador Eckert & Ziegler GalliaPharm é aprovado pela ANVISA, constituindo-se no único gerador de ^{68}Ga registrado no Brasil.

O eluato de ^{68}Ga é uma solução fortemente ácida, e é obtido usando HCl em várias quantidades e várias molaridades, dependendo do tipo de gerador. Também pode ser produzido em ciclotron, podendo apresentar outras características. Este é um desafio para formulação de kits. A adição de eluatos de ^{68}Ga com concentração ácida variável em uma quantidade fixa de tampão do kit, inevitavelmente leva a variações de pH da solução final. A química do gálio é muito sensível ao pH, dessa forma é essencial tamponar a solução dentro de um pH adequado para que alcance e estabilize o íon $^{68}\text{Ga}^{3+}$ nas diferentes concentrações ácidas do eluato. O preparo de kits específicos em frasco único requer estudos da quantidade de tampão no frasco liofilizado para permitir atingir o pH ideal de radiomarcção em função do volume de HCl e da molaridade necessária para eluir o gerador (LEPAREUR, 2022).

Devido ao constante aumento da demanda nos últimos anos, houve escassez na produção de geradores entre os anos 2017 e 2018, o que representou uma ameaça para o desenvolvimento do uso clínico de agentes de imagem baseados em ^{68}Ga (LEPAREUR, 2022). Outros problemas de abastecimento são esperados no futuro, com a demanda crescente por $^{68}\text{GaCl}_3$, especialmente quando novos agentes de imagiologia com PSMA são aprovados pelas agências regulatórias (LEPAREUR, 2022).

3.7.2 Produção de galio-68 em Cíclotron

A produção de ^{68}Ga em cíclotrons geralmente é feita através da reação nuclear $^{68}\text{Zn} (p, n)^{68}\text{Ga}$ e há duas maneiras pelas quais o ^{68}Ga pode ser gerado, ou seja, utilizando alvos líquidos (gerando ~ 3,7 GBq de ^{68}Ga) ou alvos sólidos (gerando até 194 GBq). Esta reação resulta na ejeção de dois nêutrons do núcleo ^{68}Zn , levando à formação de ^{68}Ga (LEPAREUR, 2022).

Alvos líquidos oferecem simplicidade de implementação, pois apresentam um fluxo de trabalho semelhante à produção de ^{18}F (RODNICK et al., 2022). A utilização de alvos líquidos (dissolução de ^{68}Zn em ácido nítrico) gera menores quantidades de material radioativo (^{68}Ga), mas oferece uma solução econômica alternativa à utilização de alvos sólidos, necessitando de investimentos menores. É considerado um método mais adequado para pequenas produções locais em instalações hospitalares de cíclotron (DO CARMO; SCOTT; ALVES, 2020).

Uma alternativa aos alvos líquidos são os alvos sólidos, pois estes podem produzir maior atividade de ^{68}Ga , mas a partir de infraestruturas complexas e caras (SVEDJEHED; PÄRNASTE; GAGNON, 2022). A produção rotineira de radionuclídeos em alvos sólidos em instalações clínicas de PET é, muitas vezes, um desafio o que se deve tanto à necessidade de experiência para desenvolver a própria química de purificação como para automatizar os processos de transferência, purificação e marcação (SVEDJEHED; PÄRNASTE; GAGNON, 2022).

As principais desvantagens da produção em cíclotron são a coprodução de outros radionuclídeos (potencialmente não removíveis, uma vez que possuem a mesma química como ^{66}Ga e ^{67}Ga) e a presença de impurezas metálicas que podem impedir a reação de radiomarcagem com $^{68}\text{GaCl}_3$ (LEPAREUR, 2022). Medidas de controle de qualidade devem então ser implementadas para garantir que o ^{68}Ga produzido atenda aos padrões exigidos para uso em produção de radiofármacos. Isto envolve a verificação da pureza radionuclídica, pureza química e outros parâmetros relevantes (LEPAREUR, 2022).

3.8 Radionuclídeo para terapia: ^{177}Lu

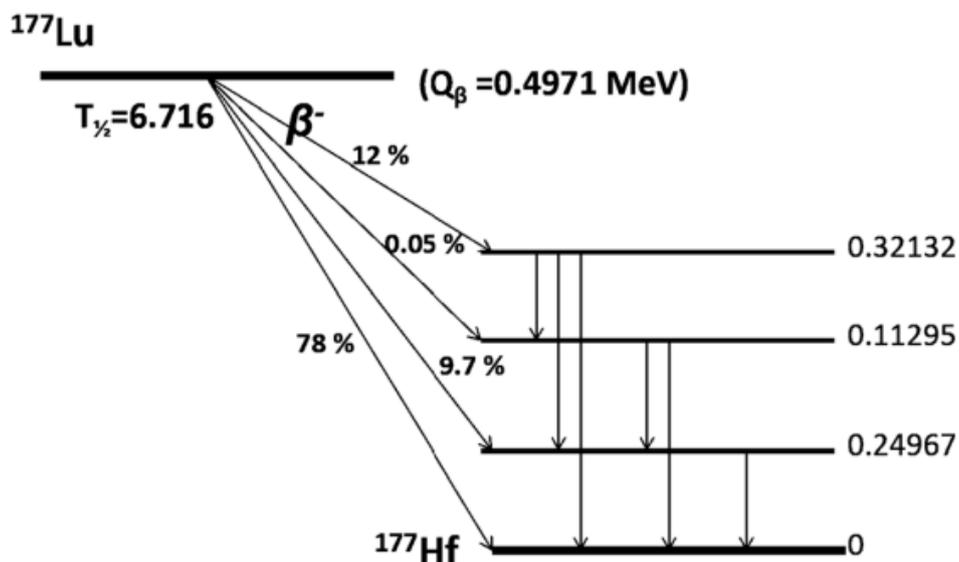
Radionuclídeos como ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{225}Ac e ^{212}Pb possuem diferentes tipos de emissões (beta menos (β^-) no caso do ^{177}Lu e ^{67}Cu e alfa (α) no caso do ^{225}Ac e ^{212}Pb) que podem causar danos celulares/DNA e, portanto, podem ser utilizados para fins terapêuticos. As moléculas radiomarcadas que transportam radionuclídeos com um alcance tão curto devem ser conduzidas muito próximo ou diretamente dentro/perto do núcleo da célula para causar danos ao DNA (RUIGROK et al., 2019).

Atualmente, o lutécio-177 é o radionuclídeo mais frequentemente utilizado em estudos pré-clínicos envolvendo terapia alvo radionuclídica. O uso do ^{177}Lu em terapia alvo radionuclídica é atribuído entre outras propriedades à faixa média de penetração de partículas β^- em tecidos moles de 670 μm , o que torna este radionuclídeo ideal para fornecer energia a pequenos volumes, incluindo doença micrometastática e células tumorais próximas à superfície (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015). O lutécio-177 é eficaz na emissão de radiação citotóxica em áreas relativamente pequenas e proficiente na destruição de pequenos tumores, bem como de tumores metastáticos com menores danos ao tecido normal circundante (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015). O lutécio-177 também emite raios γ durante seu decaimento, permitindo aquisição de imagens por tomografia computadorizada por emissão de um único fóton (SPECT) para acompanhamento de eficácia do tratamento (CHAKRAVARTY; CHAKRABORTY, 2021).

Durante a desintegração, um próton dentro do núcleo de lutécio se converte em um nêutron, resultando na emissão de um elétron (beta negativo) e um antineutrino (RUIGROK et al., 2019). O lutécio-177 decai em 76% dos eventos ($E_{\beta(\text{máx})}=0,497\text{ MeV}$) para o estado fundamental estável de ^{177}Hf com meia-vida de 6,65 dias e decai em 9,7% dos eventos ($E_{\beta(\text{máx})}=0,384\text{ MeV}$) e 12% do tempo ($E_{\beta(\text{máx})}=0,176\text{ MeV}$) para um estado excitado de ^{177}Hf que corresponde a 0,249 MeV e 0,321 MeV acima do estado fundamental, que desexcita para o estado fundamental com a emissão de fótons. Durante esses eventos de decaimento radioativo, ^{177}Lu emite partículas β^- e fótons gama de baixa energia ($E_{\gamma}=113\text{ keV}$, 6,6% e 208 keV , 11%) (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015). Um esquema do

decaimento simplificado do ^{177}Lu é mostrado na **Figura 17** (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015).

Figura 17 – Esquema simplificado do decaimento do ^{177}Lu .



Fonte: (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015)

As estratégias de produção do lutécio-177 em reatores de pesquisa visam obtê-lo com pureza radionuclídica e radioquímica adequadas para aplicações em medicina nuclear (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015). As rotas de produção em reatores nucleares de pesquisa podem ser “direta” e “indireta”. A rota de produção direta do ^{177}Lu em reator nuclear é baseada na irradiação de alvos de ^{176}Lu por nêutrons e envolve a seguinte reação nuclear $^{176}\text{Lu} (\eta, \gamma) ^{177}\text{Lu}$. O processo envolve a captura de nêutrons pelo ^{176}Lu , formando o ^{177}Lu . O alvo pode ser natural de Lu_2O_3 , com uma abundância de cerca de 2,6% de ^{176}Lu (^{176}Lu , 2,6%) ou alvo de Lu_2O_3 enriquecido (em ^{176}Lu). A atividade específica pode ser consideravelmente mais alta utilizando o alvo de Lu enriquecido em ^{176}Lu , irradiado em um reator de alto fluxo, com a otimização da duração de irradiação (PILLAI et al., 2003).

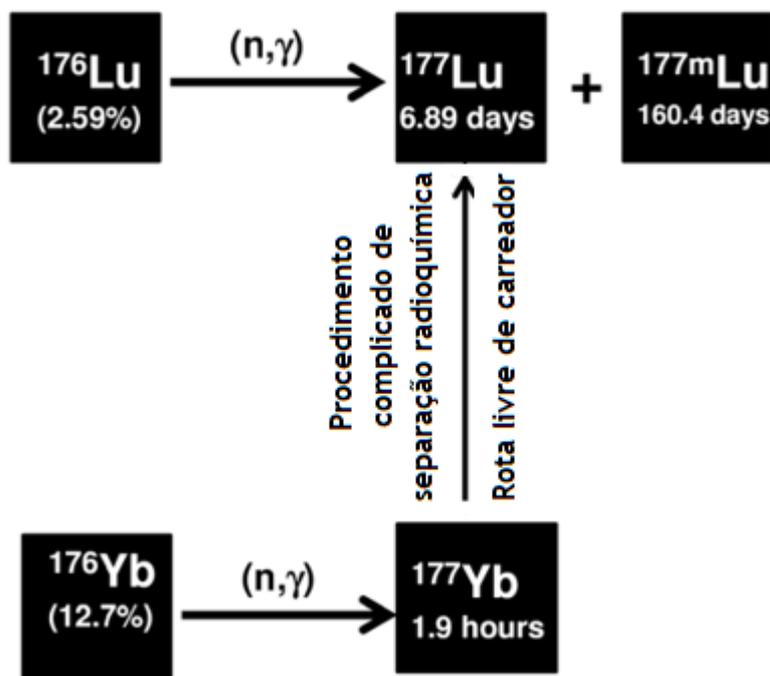
A produção de ^{177}Lu por meio de rota de produção indireta em reator nuclear envolve o bombardeio do ^{176}Yb (itérbio-176) com nêutrons para converter ^{176}Yb

em ^{177}Yb (itérbio-177), que subsequentemente decai para ^{177}Lu e é representada pela reação nuclear abaixo (CHAKRAVARTY; CHAKRABORTY, 2021).



O ^{177}Yb decai para ^{177}Lu por emissão β^- , com meia-vida de 6,89 dias. A rota indireta de produção $^{176}\text{Yb} (n,\gamma)^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$ requer um procedimento de separação radioquímica elaborado do ^{177}Lu dos átomos alvo de ^{176}Yb . O ^{177}Lu separado pode ser submetido a etapas adicionais de purificação para garantir a remoção completa de impurezas indesejadas. Cada rota tem vantagens específicas e desvantagens (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015). As rotas de produção em reatores nucleares de pesquisa “direta” e “indireta” são demonstradas na **Figura 18**.

Figura 18 - Duas rotas diferentes para a produção de ^{177}Lu em reatores nucleares.



Fonte: Adaptado de (DASH; PILLAI; KNAPP, 2015).

Outros radionuclídeos emissores β^- potentes e alternativos ao lutécio-177 são o cobre-67, escândio-47 e térbio-161. Esses radionuclídeos têm uma emissão de energia comparável à do lutécio-177 (CHAMPION et al., 2016). Muller e colaboradores (2019) estudaram a capacidade do térbio-161 para terapia alvo direcionado ao PSMA, que, além do decaimento beta, também emite uma considerável quantidade de elétrons Auger/conversão, levando a um possível aumento na dose total absorvida em comparação com lutécio-177 (MÜLLER et al., 2019).

Por outro lado, a terapia alfa direcionada tornou-se de grande interesse na terapia alvo radionuclídica. Partículas alfa têm transferência linear de energia (LET) muito maior e um alcance mais curto em comparação com partículas β^- , o que pode levar a vários processos de eventos de ionização próximos uns dos outros dentro do DNA, causando as chamadas trilhas alfa. Portanto, em comparação com o decaimento beta, o decaimento alfa pode causar uma grande quantidade de quebras de fita dupla de DNA em um curto alcance e mantém a promessa de um nível mais alto de dano induzido ao DNA por célula. Actínio-225, chumbo-212, tório-227, bismuto-213 e astato-211 são radionuclídeos emissores alfa que estão sendo explorado pré-clinicamente para terapia alvo com PSMA radiomarcado (NONNEKENS et al., 2017).

3.9 Preparo de radiofármacos de galio-68 baseado em kit x módulo de síntese automatizada

Diversos autores abordaram as vantagens e desvantagens associadas à preparação de radiofármacos com galio-68 baseada em kit ou síntese automatizada utilizando módulo (MEISENHEIMER et al., 2020)(KLEYNHANS et al., 2020) (CALDERONI et al., 2020).

As principais vantagens do kit abordadas são custo menor, tempo de produção menor, uso simplificado, nenhuma purificação necessária, nenhum teor de etanol ou outro solvente residual. As principais desvantagens são a maior exposição à radiação pelo manipulador, maior quantidade de precursor normalmente necessário, forte dependência de um gerador de qualidade (grau BPF), pois não há etapa de purificação e requer especificações muito rigorosas para os geradores em termos de impurezas de ^{68}Ge , visando evitar níveis altos

dessa impureza radionuclídica no produto final. Há poucos kits atualmente estabelecidos e disponíveis comercialmente, dentre os quais, os kits liofilizados para radiomarcção de PSMA-11 (por exemplo, illumet™) e DOTA-TOC (NETSPOT®; TOCScan). São uma possibilidade para radiofarmácias hospitalares oferecerem radiofármacos marcados com ⁶⁸Ga aos seus pacientes minimizando custos (MEISENHEIMER et al., 2020).

Um estudo de Kleynhans e colaboradores (2020) comparou os custos de produção do PSMA-11-⁶⁸Ga em um módulo de síntese e marcação de Kit liofilizado com fabricação própria os quais foram de 274 € e apenas 10 €, respectivamente. O ganho de tempo na produção também pode melhorar o fluxo de trabalho, melhorando, novamente, eficiência de custos (KLEYNHANS et al., 2020).

Em contrapartida, a produção de radiofármacos marcados com ⁶⁸Ga de forma automatizada envolve aquisição de módulos de síntese e cassetes com custos elevados, manutenção e até mesmo a necessidade de instalação de uma cela quente blindada e classificada. As vantagens dos módulos de síntese é que garantem maior reprodutibilidade e robustez, e menor exposição do manipulador em etapas críticas, como a eluição do gerador (LEPAREUR, 2022).

3.10 Kits comerciais aprovados

A Preparação de PSMA-11-⁶⁸Ga a partir de um kit liofilizado foi relatado pela primeira vez por Ebenhan e colaboradores em 2015 (EBENHAN et al., 2015). O radiofármaco foi convenientemente preparado em 15 minutos, à temperatura ambiente, a partir de um kit de frasco único contendo 5 µg de precursor PSMA-11. Um estudo com pacientes foi capaz para detectar lesões de câncer de próstata primário, bem como lesões metastáticas. Há dois kits comerciais disponíveis para estudos investigacionais (illumet™ e IsoPROTrace-11®), que serão discutidos a seguir (LEPAREUR, 2022).

A avaliação de uma preparação de kit de análogos da somatostatina marcados com ⁶⁸Ga foi descrita pela primeira vez por Mukherjee e colaboradores (2014) (MUKHERJEE et al., 2014). Consistiam em kits em frasco único contendo 50 µg de um peptídeo liofilizado acrescido de acetato de sódio para atingir pH na faixa de 3,5–4 após a adição do eluato de ⁶⁸Ga (1 mL em HCl 0,1 M).

Resultados clínicos positivos com esses radiofármacos levaram à aprovação do DOTATATO-⁶⁸Ga (NETSPOT™) nos Estados Unidos e DOTATOC-⁶⁸Ga (Somakit TOC^R) na Europa (HENNRICH; BENEŠOVÁ, 2020). As primeiras investigações clínicas com este kit DOTATOC-⁶⁸Ga validaram com sucesso sua segurança e utilidade clínica (MANOHARAN et al., 2020). No entanto, a radiomarcagem com peptídeos DOTA requer aquecimento acima de 90°C, e pode não representar uma opção prática para uso em radiofarmácia hospitalar por conta do aquecimento (LEPAREUR, 2022).

3.10.1 Kits liofilizados de PSMA-11 relatados na literatura

3.10.1.1 Illumet™

Illumet™ é o nome comercial do kit liofilizado para a preparação de PSMA-11-⁶⁸Ga. Foi desenvolvido pela ANMI, Bélgica e atualmente é comercializado pela Telix farmacêutica para o mercado dos EUA. Está disponível para uso experimental como Novo Medicamento Investigacional (IND) pelo FDA. O kit Illumet™ consiste em 3 frascos, sendo que um contém 25 µg do peptídeo liofilizado, um segundo frasco estéril contendo 150 mg de tampão acetato de sódio e um terceiro frasco de vácuo estéril. Pode ser radiomarcado com 5 mL do eluato de ⁶⁸Ga, temperatura ambiente com o tempo total de 5 minutos, sendo pH final de 4 a 5. Um estudo de Beheshti e colaboradores (2018) avaliou o tempo ideal para aquisição da imagem PET/CT com Illumet™-⁶⁸Ga para avaliação de câncer de próstata. Cinquenta pacientes com câncer de próstata foram incluídos e submetidos a imageamento PET/CT abdominopélvico, 20 minutos após a injeção de Illumet™-⁶⁸Ga e 100 minutos após a injeção Illumet™-⁶⁸Ga. O ⁶⁸GaCl₃ para marcação foi obtido a partir de um gerador grau BPF de 1,85 GBq (50 mCi) da IRE-Elit, Bélgica (BEHESHTI et al., 2018a).

3.10.1.2 IsoPROTrace-11®

O fabricante do IsoPROTrace-11®, kit liofilizado para a preparação de PSMA-11-⁶⁸Ga, é a empresa Isotopia Molecular Imaging LTD, Israel. O kit IsoPROTrace-11® consiste em frasco único contendo 10 µg do peptídeo

liofilizado. A radiomarcagem ocorre com 2,5 mL do eluato de ^{68}Ga , pH final de 4 a 5, à temperatura ambiente com o tempo total de 5 minutos. O estudo de Kurash e colaboradores (2020) forneceu dados de um estudo clínico de biodistribuição de isoPROtrace-11- ^{68}Ga em tecidos normais e achados patológicos, em 48 pacientes, mostrando a aplicabilidade clínica do traçador produzido como kit liofilizado. O $^{68}\text{GaCl}_3$ para marcação foi obtido a partir de um gerador fornecido pela Eckert & Zeigler (KURASH et al., 2020).

3.10.2 Kits liofilizados relatados na literatura com análogos de somatostatina

3.10.2.1 Somakit TOC[®]

SomaKit TOC[®] é um medicamento de diagnóstico que contém a substância ativa edotreotídeo indicado para pacientes com suspeita de tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos. Resultados clínicos positivos com esse radiofármaco eventualmente levou à aprovação de DOTATOC- ^{68}Ga (SomaKit TOC[®]) na Europa (MUKHERJEE et al., 2014). O kit Somakit TOC[®] consiste em 2 frascos, sendo que um deles contém 40 µg do peptídeo, manitol, 1,10 fenantrolina e ácido gntísico liofilizado. O frasco do tampão consiste em ácido fórmico e hidróxido de sódio. A radiomarcagem ocorre com 5 mL do eluato de ^{68}Ga , pH 3,2 a 3,8, à 95 °C com o tempo total de 7 a 10 min (LEPAREUR, 2022).

3.10.2.2 NETSPOT[®]

O kit NETSPOT[®] para marcação de dotatato com gálio Ga-68 é indicado para detecção por imagem PET de lesões tumorais neuroendócrinas positivas para receptores de somatostatina. Resultados clínicos positivos com esse radiofármaco eventualmente levou à aprovação de DOTATATO- ^{68}Ga (NETSPOT[™]) nos Estados Unidos (MUKHERJEE et al., 2014). Consiste em 2 frascos, sendo que um deles contém 40 µg do peptídeo liofilizado. O kit NETSPOT[®] vem acompanhado de um cartucho para purificação prévia do eluato do gerador. A radiomarcagem ocorre com 5 mL do eluato de ^{68}Ga , pH 3,2 a 3,8, à 95 °C com o tempo total de 7 a 10 min (LEPAREUR, 2022).

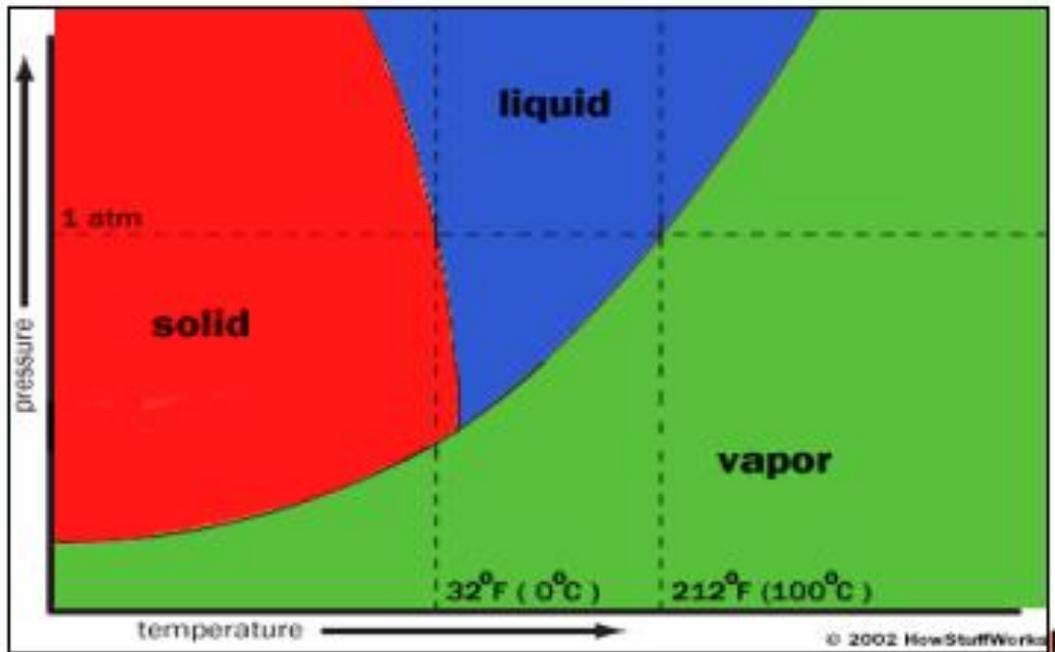
3.11 Liofilização

A liofilização é amplamente utilizada na indústria farmacêutica para melhorar a estabilidade e assim aumentar o tempo de armazenamento de medicamentos lábeis, especialmente medicamentos baseados em proteínas. As formulações liofilizadas também proporcionam fácil manuseio (transporte). A liofilização é uma tarefa que exige muito tempo e energia de processo que pode levar dias ou até semanas para ser concluído se o ciclo de liofilização não for otimizado. A estabilidade do medicamento durante a liofilização e armazenamento e a duração do ciclo são as duas principais considerações para otimização do processo de liofilização (TANG; PIKAL, 2004a).

Um processo de liofilização não otimizado pode comprometer a estabilidade do medicamento, demorar e custar mais do que o necessário (TANG; PIKAL, 2004a). Congelar uma solução proteica tamponada pode cristalizar seletivamente o tampão, causando alterações no pH e causar denaturação de proteínas sensíveis ao pH. Para desenhar um ciclo de liofilização robusto para formulações proteicas para garantir a eficiência do processo e a integridade do produto final é necessário a caracterização de parâmetros como temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de colapso (T_{col}) (WANG, 2000).

O princípio fundamental da liofilização é a sublimação, a mudança de um sólido diretamente para um gás. Assim como a evaporação, a sublimação ocorre quando uma molécula ganha energia suficiente para se libertar das moléculas ao seu redor. A água irá sublimar de um sólido (gelo) a um gás (vapor) quando as moléculas têm quantidade de energia suficiente para se libertar, mas as condições não são adequadas para que um líquido se forme. Existem dois fatores principais que determinarão em que fase (sólida, líquida ou gasosa) uma substância estará: calor e pressão atmosférica. Para uma substância assumir qualquer fase particular, a temperatura e pressão devem estar dentro de uma certa faixa. Sem estas condições, essa fase da substância não pode existir. A **Figura 19** mostra os valores necessários de pressão e temperatura de diferentes fases da água (SHUKLA, 2011).

Figura 19 - Diagrama de fases da água.



Fonte: (SHUKLA, 2011).

3.11.1 Desenvolvimento da formulação

Avaliar a estabilidade da proteína durante o processo de liofilização é crucial. É necessário entender como a proteína se comporta em diferentes condições de temperatura, pH e concentração durante as etapas de congelamento e liofilização. Escolher os excipientes corretos é fundamental para garantir a estabilidade da proteína. Excipientes como açúcares (manitol, sacarose, trealose), aminoácidos e sais podem ser aumentados para proteger a estrutura da proteína durante o processo de liofilização (BADAL TEJEDOR; FRANSSON; MILLQVIST-FUREBY, 2020).

Normalmente, utilizam-se de técnicas de análise térmica, como calorimetria diferencial de varredura (DSC), para avaliar a estabilidade térmica da proteína e melhorar as condições de liofilização. Desenvolver um ciclo de liofilização otimizado é crucial. Isso envolve congelamento controlado, sublimação e desorção. Um ciclo inadequado pode resultar em danos à proteína, formação de gelo e outras questões (TANG; PIKAL, 2004a).

3.11.2 Ciclo de liofilização

Existem três etapas no processo completo de liofilização:

a) Congelamento: Nesta fase inicial, o material a ser liofilizado é congelado a temperaturas muito baixas, geralmente entre -40°C e -50°C . O congelamento lento é crucial para evitar a formação de grandes cristais de gelo, que podem danificar a estrutura celular do material. Nesta etapa é importante resfriar o material abaixo do seu ponto eutético, a temperatura mais baixa na qual o sólido e o líquido podem coexistir. Isso garante que sublimação em vez de fusão ocorrerá nos seguintes passos (KONSTANTINIDIS et al., 2011).

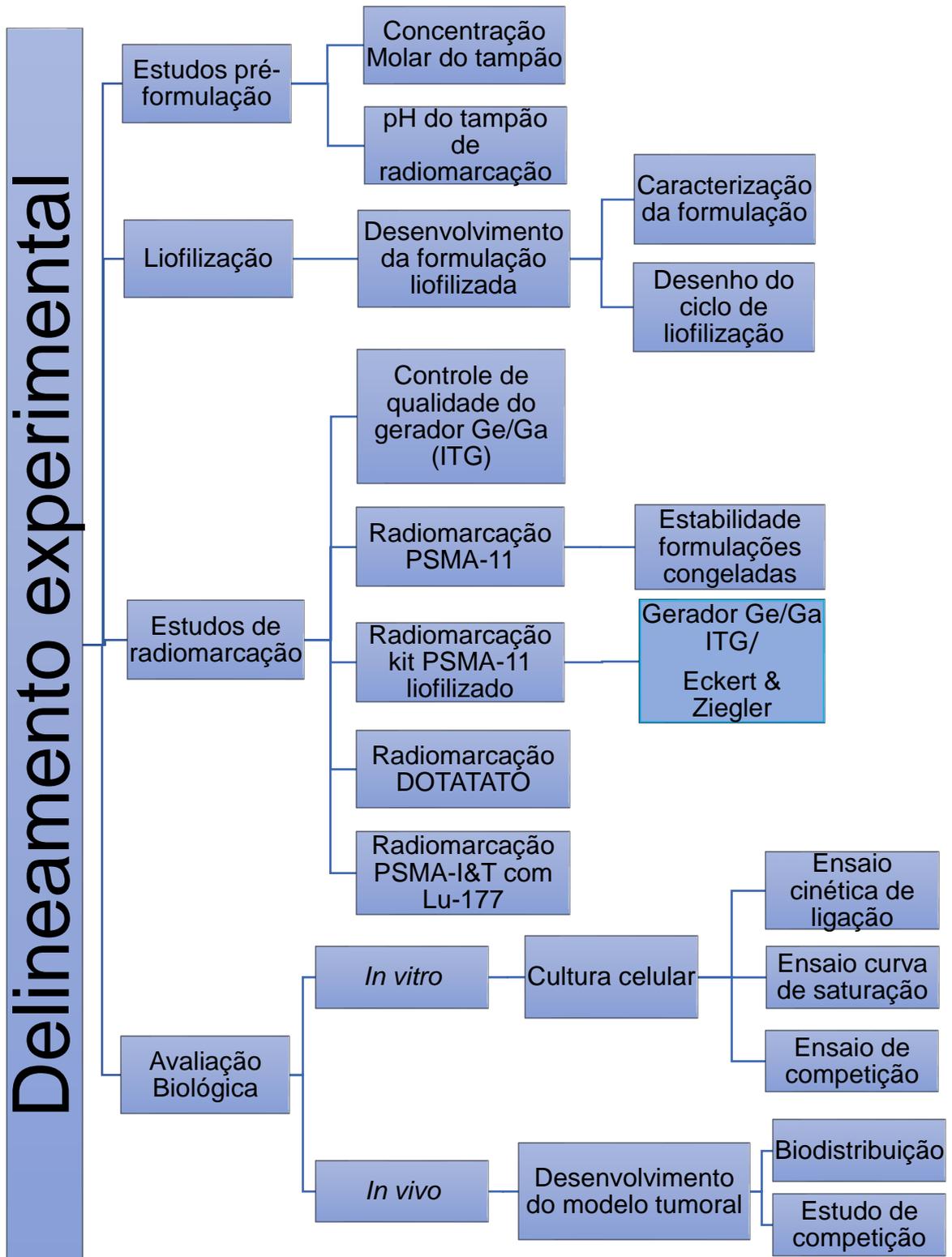
b) Secagem primária: Após o congelamento, o sistema é colocado em uma câmara de vácuo. A pressão reduzida na câmara (a pressão é controlada através da aplicação de vácuo) permite que a água congelada no material passe diretamente do estado sólido para o gasoso, sem passar pela fase líquida. Esse processo é conhecido como sublimação. É importante manter uma pressão baixa para facilitar a remoção eficiente da água, evitando que ela permaneça no estado líquido. Durante a fase de secagem primária, a pressão é reduzida (até a faixa de alguns milibares), e calor suficiente é fornecido ao material para a água sublimar. Nesta fase inicial de secagem, cerca de 95 % da água do material é sublimada. Essa fase pode ser lenta, pois se for adicionado muito calor a estrutura do material pode ser alterada (TANG; PIKAL, 2004a).

c) Secagem secundária: Nesta fase final, o produto liofilizado é submetido a um ligeiro aumento de temperatura para permitir a remoção final da umidade residual e estabilizar o material. Isso geralmente é feito elevando a temperatura da câmara de vácuo, mas ainda mantendo-a abaixo do ponto de congelamento do produto (TANG; PIKAL, 2004a).

O resultado da liofilização é um produto seco e estável, que pode ser armazenado por longos períodos sem deterioração, pois a remoção da água inibe a atividade microbiana e enzimática (TANG; PIKAL, 2004a).

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O esquema a seguir resume o delineamento experimental adotado neste projeto de pesquisa e objetiva facilitar o entendimento do mesmo.



5 MATERIAIS

5.1 Infraestrutura

Os experimentos de radiomarcção e controle de qualidade foram realizados nos laborat3rios de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarm3cia (CECRF) do Instituto de Pesquisas Energ3ticas e Nucleares (IPEN). Estudos de caracterizao das temperaturas cr3ticas para otimizaao do ciclo de liofilizaao foram realizados no departamento de Tecnologia Bioqu3mico-Farmac3utico da Faculdade de Ci4ncias Farmac3uticas (FCF) da USP. O ciclo de liofilizaao foi realizado no Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN. Foi estabelecida uma parceria com o departamento de Medicina Nuclear do Hospital Israelita Albert Einstein e Centro de Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein para radiomarc3oes e determinaao de pureza radioqu3mica do kit PSMA-11 liofilizado. Os estudos biol3gicos contaram com infraestrutura e apoio dos laborat3rios de Cultivo Celular, do Biot3rio do Centro de Biotecnologia (CEBIO) e laborat3rios de experimentaao animal do CECRF do IPEN. Esses laborat3rios possuem toda infraestrutura necess3ria para a manipulaao de materiais radioativos, c3lulas e animais, respectivamente.

5.2 Reagentes e soluaoes

Os principais reagentes e soluaoes utilizados neste trabalho foram:

- Acetato de am3nio (Merck, Alemanha);
- Acetato de s3dio anidro (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila para CLAE (Merck, Alemanha);
- 3cido ac3tico glacial 100% (Merck, Alemanha);
- 3cido asc3rbico (Merck, Alemanha);
- 3cido c3trico (Merck, Alemanha);
- 3cido clor3drico 37% (Merck, Alemanha);
- 3cido trifluoroac3tico (Merck, Alemanha);
- 3gua purificada (purificador Milli-XR, EUA);
- 3gua para injet3vel (Hypofarma, Brasil);
- 3lcool et3lico (Merck, Alemanha);

- Antibiótico e antimicótico (Gibco, Life technologies, MD, EUA)
- Ascorbato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA);
- Azul de Tripan (LGC Biotecnologia, Brasil);
- Citrato de sódio tri-hidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- Cloreto de Ga-68 (Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, ITG, Alemanha; Gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, Eckert & Ziegler, Alemanha);
- Cloreto de lutécio-177 (INM-JSC, Rússia; Isotopia, Israel);
- Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- Cloridrato de cetamina – anestésico para uso animal (Ceva, Brasil);
- Cloridrato de xilazina – relaxante muscular para uso animal (Vetbrands, Brasil);
- Heparina (Roche, Brasil);
- Indicador ácido-base vermelho do Congo, (Merck, Alemanha);
- Isoflurano – anestésico (Cristália, Brasil);
- Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano LNCaP (ATCC[®] CRL-1740[™], EUA);
- Matrigel (Corning[®], Matrigel[®], EUA);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Life technologies, MD, EUA);
- Peptídeo DOTATATO (ABX Advanced Biochemical Compounds, Alemanha);
- Peptídeo PSMA-11 (ABX- Advanced Biochemical Compounds, Alemanha);
- Peptídeo PSMA-I&T (CMR, Russia);
- Solução NaOH 1M; hidróxido de sódio em lentilhas (Merck, Alemanha);
- Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS, pH 7,4): cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio (Merck, Alemanha);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Tripsina EDTA 0,25% (Cultilab, Brasil);

5.3 Equipamentos, materiais e sistemas

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

- Agitador magnético com aquecimento 725^a (Fisatom, EUA);
- Agitador e aquecedor para microtubos de 1,5 mL, Thermomixer Comfort (Eppendorf, EUA);
- Balança analítica (Shimadzu, Japão);
- Bloco de aquecimento
- Cabine de fluxo laminar para cultivo de células Classe 2 (Scanlaf, EUA);
- cartucho de troca catiônica SCX (Agilent, EUA);
- Coluna de fase reversa C18 para CLAE- 250 mm X 4,6 mm, 5 µm Symmetry[®] (Waters, Ireland);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 Cobra II (Packard- Canberra, EUA);
- Calibrador de atividade (CRC- 15R- Capintec[®], EUA);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-LC 10 A Shimadzu, Japão) equipado com detector UV SPD-10^a e detector radioativo Lab Logic;
- Detector de germânio hiperpuro (HPGe) modelo GX1518, acoplado a um sistema de aquisição multicanal (Canberra, EUA). Dados são tratados pelo software GENIE-PC (Mirion Technologies, EUA);
- DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), DSC 4000 (Perkin Elmer, EUA);
- Estufa incubadora de CO₂ (Blinder, EUA);
- Filtro esterilizante 0,22 µm Millex GV (Merck, Alemanha);
- Frasco para cultivo de células (Costar, EUA);
- Frascos tipo penicilina de 20 mL (Forthmed, Brasil);
- Garrafa T175 (JET BIOFIL[®], China);
- Garrafa T 75 (JET BIOFIL[®], China);

- GraphPad Prism 5.0®; (GraphPad Software, EUA);
- ICP-OES, Vista, MPX (Agilent Technologies, EUA);
- Laura 4.0 – software para controle do Sistema de CLAE (Lablogic, Inglaterra);
- Liofilizador de bancada modelo Advantage Pro com controlador Intellitronics (SP Scientific, EUA);
- Micropipetas automáticas; (Eppendorf, Brasil);
- Microscópio acoplado a módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196, (Linkam Instruments, Surrey, UK) e microscópio de luz polarizada, modelo Eclipse E600 (Nikon, Japão);
- Pipetas sorológicas de 5mL, 10mL e 25mL (JET BIOFIL®, Brasil);
- Placas para cultivo de células aderentes com seis poços (JET BIOFIL®, C
- Ponteiras de 1 mL, 200µL e 10µL com filtro (BIOPOINTE scientific, EUA)
- Radiocromatógrafo, CCD-scanner AR-2000 (Eckert & Ziegler Radiopharma Inc., EUA);
- Radiocromatógrafo Scan-RAM Radio-CDC Detector (Lablogic, Inglaterra);
- Seringa de insulina (Descarpak, Brasil);
- Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina- CCD – SD (Merck, Alemanha);
- Tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);
- Tubos Falcon de 15mL e 50mL (JET BIOFIL®, China);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas;

5.4 Células

A linhagem celular utilizada foi de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP) PSMA-positiva e foram doadas pelo Hospital de Amor (antigo Hospital do Câncer de Barretos). As células LNCaP foram cultivadas no

laboratório do Centro de Biotecnologia sob orientações específicas para a linhagem celular (ATCC® CRL-1740™).

5.5 Animais

Os camundongos machos, *SCID-BALB/c* (camundongos *BALB/c* imunodeficientes a partir de modificação genética), utilizados neste trabalho, com quatro a cinco semanas de idade e 18 a 25 gramas de peso, 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 (Projeto N°225/18/CEUA-IPEN/SP) e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais foram mantidos no biotério nas seguintes condições de criação: temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz /12 horas de escuridão e receberam ração e água *ad libitum*.

6 MÉTODOS

6.1 Estudo Pré- formulação

Um dos principais desafios para desenvolver formulações liofilizadas (kits) para marcação com $^{68}\text{GaCl}_3$ está relacionado ao fato de que os geradores com grau de pureza compatível para marcação direta (aqui denominados geradores BPF) comercialmente disponíveis diferem entre si pela composição da matriz (material sólido que constitui o gerador e onde está retido o Ge-68), o volume e concentração de solução de ácido clorídrico (HCl) utilizada para eluição do gerador, variando de 0,01 M a 1 M, a depender da composição da matriz e fabricante.

Dessa forma, um ponto chave consiste em determinar a concentração ideal, bem como o volume de tampão necessário para obter o pH da radiomarkação na faixa de 4 a 5, e preservar o estado de oxidação do $^{68}\text{Ga}^{+3}$, possibilitando a sua complexação com o ligante, após a adição do volume pretendido da solução ácida de $^{68}\text{GaCl}_3$ em determinada concentração.

Foram realizados estudos pré-formulação para obtenção do kit liofilizado de PSMA-11 para marcação com galio-68, para determinar o tampão ideal, concentração e pH de marcação, para obtenção de pH entre 4 e 5 após a adição da solução ácida de $^{68}\text{GaCl}_3$, obtida a partir da eluição do gerador de ^{68}Ge - ^{68}Ga com HCl 0,1 M ou 0,05 M de diferentes geradores. Esses estudos foram realizados com base em publicações relacionadas (MUKHERJEE et al., 2014) (TWOROWSKA et al., 2016) (MA et al., 2015) (PRINCE et al., 2017) (YU et al., 2018).

Foram preparados e testados os tampões acetato de sódio e ascorbato de sódio nas concentrações 0,5 M, 1,5M, 2,0 M e 2,5 M e nos pH de 5,0 e 5,5.

6.2 Formulação e estudos de liofilização

6.2.1 Desenvolvimento da formulação liofilizada

Para avaliar a possível alteração de pH durante o processo de liofilização, realizou-se um estudo no qual um indicador ácido-base (Vermelho do Congo) foi adicionado à cinco formulações diferentes, descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Formulações avaliadas no estudo de variação de pH durante liofilização.

Formulações estudadas (1 mL)	Número de frascos	Indicador ácido-base
Tampão acetato de sódio 1,5M pH 5,0	3	Vermelho do Congo
Tampão acetato de sódio 1,5M pH 5,0 + 5 mg manitol	3	Vermelho do Congo
Tampão acetato de sódio 1,5M pH 5,0 + 20 mg manitol	3	Vermelho do Congo
Solução com 5 mg de manitol pH 6,24	3	Vermelho do Congo
Solução com 20 mg de manitol pH 6,24	3	Vermelho do Congo

Fonte: autora da tese.

O indicador ácido-base selecionado foi o Vermelho do Congo, cuja zona de viragem está entre 3,0 e 5,2, e dessa forma sua cor varia de acordo com o pH do meio. Se o meio é ácido ($\text{pH} < 3$), a cor é azul; entre pH 3,0 e pH 5,2, a cor é roxo (zona de viragem) e com $\text{pH} > 5,2$, a cor é vermelho. A solução indicadora foi preparada dissolvendo 0,5 g de Vermelho Congo em 90 mL de água purificada (Elix 10 Millipore, Merck) e 10 mL de álcool etílico. (ORII; MORITA, 1977).

Para avaliar a alteração de cor, foram preparadas soluções de pH conhecidos, de modo a cobrir uma faixa de pH entre 1,0 e 8,0. A cada frasco contendo 2 mL de solução de pH previamente conhecido foram acrescentadas 2 gotas do indicador Vermelho do Congo para montar uma escala de cor comparativa que variou do azul (pH ácido) ao vermelho (pH básico). A 2 mL de cada formulação

(Tabela 2), em triplicata, foram adicionadas duas gotas do indicador Vermelho do Congo e os frascos foram submetidos ao ciclo de liofilização conforme indicado na

Tabela 3. Após o término do ciclo de liofilização a mudança de cor foi registrada por foto.

Tabela 3 - Condições de liofilização do estudo de variação de pH.

Passo	Rampa (minutos)	Temperatura da prateleira (°C)	Tempo (minutos)	Vácuo (mTorr)
Congelamento	90	- 40	60	-
Secagem primária	90	- 22	480	200
Secagem secundária	360	20	60	10
Secagem secundária	60	8	360	10

Fonte: autora da tese.

6.2.2 Caracterização da formulação

Com a finalidade de desenvolver um ciclo de liofilização robusto, foram determinados os parâmetros que caracterizam a formulação. Esses parâmetros incluem temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura eutética (T_{eut}) e temperatura de colapso (T_{col}) (WANG, 2000).

A formulação estudada e selecionada previamente foi submetida à análise térmica por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) em equipamento da marca Perkin Elmer precisely, DSC 4000 (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP), para determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e eutética (T_{eut}) da amostra contendo PSMA-11. A amostra da formulação do kit de PSMA-11 foi preparada contendo 20 µg de PSMA-11 e 20 mg de manitol/mL de água para injetável. Uma alíquota de 30 µL da amostra foi pipetada para um recipiente de alumínio (“cadinho”). As análises foram submetidas ao programa de resfriamento

e aquecimento com taxa de 5 °C/minuto com a inserção de etapas de manutenção de temperatura (*holding times*).

A temperatura de colapso (T_c) da amostra de PSMA-11 foi determinada através de microscópio acoplado ao módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196, (Linkam Instruments, Surrey, UK) (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP). Uma alíquota de 1 μ L foi pipetada sobre placa de quartzo de 16 mm e coberta por placa de vidro. A amostra foi congelada até - 60 °C e a pressão do sistema reduzida. A observação direta do congelamento e da liofilização foi feita utilizando microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

6.2.3 Desenho do ciclo de liofilização

O ciclo de liofilização teste ocorreu em liofilizador de bancada modelo Advantage Pro com controlador Intellitronics da empresa SP Scientific, Pensilvânia (EUA), do Centro de Biotecnologia do IPEN. O lote inicial com 15 frascos foi preparado, alíquotando-se em cada frasco 1 mL de uma solução contendo 20 mg de manitol e 20 μ g de PSMA-11. O ciclo de liofilização foi desenhado com base em resultados obtidos do DSC e microscópio de liofilização.

A **Tabela 4** fornece as informações detalhadas sobre as temperaturas de prateleira (°C), rampas de resfriamento e aquecimento para cada passo (minutos) e manutenção (*holding* em minutos). A temperatura do produto foi acompanhada com dois termopares em dois frascos de referência. Uma vez concluído o ciclo de liofilização no equipamento, os frascos foram imediatamente recolhidos da câmara e lacrados com selo de alumínio. Os frascos foram identificados e armazenados em freezer à - 20°C. As pastilhas liofilizadas foram fotografadas dentro dos frascos com uma câmera digital de modo manual (BADAL TEJEDOR; FRANSSON; MILLQVIST-FUREBY, 2020).

Tabela 4 - Temperaturas de prateleira do ciclo de liofilização, rampas de resfriamento e aquecimento e tempo de manutenção (*holding*) de cada passo.

Temperatura de prateleira (°C)/passo	Rampa/ <i>holding</i> (número/passos)	Rampa/ <i>holding</i> (minutos)	Tempo total do passo (minutos)	Taxa de congelamento (°C/minuto)	Vácuo (mTorr)
Congelamento De 0 a -40°C	Rampa 1	40	310	0,5	-
	Holding 1	30			
	Rampa 2	60			
	Holding 2	30			
	Rampa 3	90			
	Holding 3	60			
Secagem primária De -40°C a 2°C	Rampa 1	40	610	-	200
	Holding 1	30			
	Rampa 2	60			
	Holding 2	480			
Secagem secundária De 2°C a 20°C	Rampa 1	450	630	-	20
	Holding 1	60			
	Rampa 2	60			
	Holding 2	60			

Fonte: autora da tese.

6.3 Estudos de radiomarcção e controle de qualidade

6.3.1 Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$: ITG X Eckert & Ziegler

Os eluatos de $^{68}\text{GaCl}_3$ para as radiomarcções foram obtidos a partir de dois geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (grau BPF) de fabricantes diferentes. Primeiramente, foi adquirido um gerador da Isotopen Technologies Garching GmbH (ITG GmbH,

Alemanha), com o qual foram realizados ensaios de controle de qualidade do eluato e acompanhamento por um período de um ano e meio. Com os eluatos de $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador da ITG foram padronizadas as condições de radiomarcagem dos precursores PSMA-11 e DOTATATO. Os testes de radiomarcagem com o kit liofilizado de PSMA-11 foram realizados com eluatos de $^{68}\text{GaCl}_3$ obtidos a partir de geradores (BPF) de dois diferentes fabricantes: ITG (Alemanha) e da Eckert & Ziegler (Alemanha). Os testes de radiomarcagem realizados com eluatos da Eckert & Ziegler foram realizados no departamento de Medicina Nuclear do Hospital Israelita Albert Einstein.

Nesta seção será retomada, de forma breve, as principais características e diferenças entre os dois geradores grau BPF (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Características dos geradores: ITG X Eckert & Ziegler

Fabricante	Coluna	Solução Eluente	^{68}Ga inicial (%)	^{68}Ge breakthrough (%)	Metais (ppm)
ITG GmbH Alemanha	Derivado Pirogalol- SiO_2	0,05 M HCl	> 80	$< 5 \times 10^{-3}$	< 0,2
Eckert & Ziegler (GalliaPharm ®) Alemanha	TiO_2	0,1 M HCl	> 70	$3 - 5 \times 10^{-3}$	1 - 10

Fonte: Adaptado e resumido de ROMERO et al., 2020.

A ITG (Alemanha) fabrica um gerador no qual uma molécula orgânica é anexada ao adsorvente à base de sílica, retendo eficientemente o germânio-68. O nuclídeo filho, gálio-68, é eluído seletivamente da coluna com solução de HCl 0,05 M. A coluna do gerador é isenta de metal, proporcionando alta pureza química do Ga-68 eluído. A eficiência de eluição de ^{68}Ga é de cerca de 80 % e a impureza de ^{68}Ge é da ordem de $< 5 \times 10^{-3}$ %. A concentração total de impurezas metálicas é menor que 0,2 ppm para Ni, Zn, Nb, Pb, Fe e Cu (AMOR-COARASA et al., 2016).

A Eckert & Ziegler (Alemanha) fabrica um gerador de coluna à base de TiO_2 o qual é eluído com 7 mL de solução de HCl 0,1 M e com eficiência de eluição de ^{68}Ga de cerca de 70 %. Para este gerador, as impurezas de ^{68}Ge normalmente são de $3 \times 10^{-5} \%$ quando novo a $5 \times 10^{-3} \%$ após cerca de 1 ano. As impurezas metálicas no eluato de ^{68}Ga variam entre 1 e 10 ppm para íons Cu, Fe, Al, Mn e Ti (ROMERO et al., 2020).

Ambos fornecem a solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ pronta para uso em radiomarcações, atendendo aos critérios estabelecidos em monografia da Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024).

6.3.1.1 Eluição dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG e Eckert & Ziegler, Alemanha)

O gerador de $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha) foi eluído conforme instruções do fabricante, com 4 mL de solução de ácido clorídrico 0,05 M estéril, previamente preparada, empregando-se HCl 37 % ultrapuro (99,99%, Merck, Alemanha) e água para injetável. A solução de ácido clorídrico 0,05 M foi filtrada em membrana de 0,22 μm para esterilização, Thermo Scientific Nalgene, sob fluxo laminar qualificado e fracionada em frascos de vidro estéreis (20 mL por frasco), que foram lacrados e armazenados à temperatura ambiente. Parte dos frascos de solução de ácido clorídrico 0,05 M preparados foi submetido a testes de controle microbiológico de endotoxinas bacterianas e esterilidade, da mesma forma descrita a seguir para a solução de $^{68}\text{GaCl}_3$.

Após a instalação do gerador de $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha), a primeira eluição foi realizada com 40 mL de solução de ácido clorídrico 0,05 M estéril, conforme instrução do fabricante. Após cada intervalo entre eluições superior a dois dias (por exemplo finais de semana), o gerador foi eluído com 20 mL de solução de HCl 0,05 M estéril. Para os ensaios de radiomarcações e de controle de qualidade, o gerador foi eluído com volume de 4 mL de HCl 0,05 M sob fluxo aproximadamente de 4 mL/min.

O gerador de $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ (Eckert & Ziegler, Alemanha) foi eluído conforme instruções do fabricante, com 7 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M estéril, preparada conforme descrito anteriormente.

6.3.1.2 Controle de qualidade do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha)

Foram realizados ensaios de controle de qualidade no eluato do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG), conforme previstos na monografia do cloreto de galio-68 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024). Os ensaios foram realizados por um período de um ano e meio. Os ensaios e critérios de aceitação farmacopeicos encontram-se descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Ensaios de controle de qualidade e os correspondentes critérios de aceitação farmacopeicos da solução de cloreto de galio-68 para radiomarcção.

ENSAIO	Eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ Critérios de aceitação farmacopeicos*
Aparência	Solução Límpida, incolor
Identidade	Picos principais de 0,511 e 1,077 MeV; o pico soma
Radionuclídica	de 1,022 MeV pode ser observado; Meia-vida física de 62 a 74 minutos
pH	máximo 2,0
Esterilidade [2]	Estéril
Endotoxinas bacterianas - LAL (Teste <i>Limulus amebocyte lysate</i>)	< 175 UE/V ^[1]
Pureza química metal (Fe)	$\leq 10 \mu\text{g}/\text{GBq}$
Pureza Radionuclídica	$\geq 99,9 \%$ do total da radioatividade atribuída ao ^{68}Ga A radioatividade total atribuída ao ^{68}Ge e outras impurezas radionuclídica com meia-vida maior que 5 horas $\leq 0,001 \%$
Pureza Radioquímica	$\geq 95\%$ da radioatividade atribuída ao $^{68}\text{Ga}^{+3}$

Fonte: *(EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024).

[1] V= máximo volume a ser usado para preparação de uma dose para um paciente

[2] a Farmacopeia Europeia não estabelece critério de esterilidade para a solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ para radiomarcção. Este parâmetro foi observado neste trabalho, considerando-se que o gerador adquirido e analisado apresentava grau BPF e para avaliar a situação de armazenamento e eluição do gerador.

A solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ obtida em 4 mL de HCl 0,05 M a partir da eluição do gerador ITG foi analisada quanto: sua aparência, identificação radionuclídica, testes de pH, controle microbiológico, conteúdo de germânio-68 e metal, pureza radionuclídica e pureza radioquímica conforme descrição a seguir.

- **Aparência:** identificação visual como solução límpida, incolor e sem partículas.
- **Identificação radionuclídica e meia vida física:** a identificação radionuclídica foi realizada por meio de espectrometria de raios gama em detector de Germânio Hiper-Puro, GX1518, Camberra Mirion, para os picos principais (fótons) de 0,511 MeV e 1,077 MeV e um pico de 1,022 MeV. A meia vida física foi determinada por 4 medidas da atividade da amostra nas mesmas condições geométricas em equipamento Capintec qualificado, realizadas dentro do tempo de 30 minutos.
- **pH:** utilizou-se fitas indicadoras de pH (Merck, Alemanha).
- **Controle microbiológico de endotoxinas bacterianas e de esterilidade:** o método empregado para a detecção e quantificação de pirogênios do tipo endotoxinas bacterianas nos eluatos de $^{68}\text{GaCl}_3$ foi o teste de lisado de amebócitos do *Limulus*- LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*). Este método utiliza o lisado de amebócitos do sangue do caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*. O princípio do teste é baseado na formação de um gel opaco pela reação do LAL com endotoxinas, em temperatura de 37 ± 1 °C. O teste consiste na adição à amostra teste de 0,1 mL de LAL em pH 6-8. A reação ocorre em 15 a 60 minutos após a mistura e depende da concentração de endotoxinas bacterianas. A formação de um gel indica a presença de endotoxinas bacterianas. O teste LAL é realizado utilizando amostras a serem testadas, bem como amostras de endotoxina *E. coli* (controle positivo) e água (controle negativo). Um volume de 0,1 mL de cada amostra de solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ e LAL foram incubados a 37 °C por 60 minutos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024) (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

O teste de esterilidade foi realizado em condições assépticas, sob fluxo laminar qualificado e com a finalidade de comprovar que os eluatos de

$^{68}\text{GaCl}_3$ eram isentos de microrganismos (incluindo fungos e bactérias). Um volume do eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ foi inoculado diretamente nos meios de cultura adequados, fluido de tioglicolato (Tio) e meio Digestivo de Soja-Caseína (TSB), seguido de incubação a $32,5 \pm 2,5$ ° C e $22,5 \pm 2,5$ ° C, respectivamente, por 14 dias. Em intervalos durante o período de incubação, examinou-se os meios de cultura quanto à presença de crescimento microbiano (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024) (MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

- **Metal:** o conteúdo de metal (Fe) do eluato do gerador foi determinado por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) (ICP-OES, Vista, MPX, Agilent Technologies). Impurezas metálicas podem competir com o ^{68}Ga durante o processo de marcação e, assim, diminuir o rendimento radioquímico. Para determinar o conteúdo desse metal, um padrão de referência contendo esse elemento foi preparado na seguinte concentração (20 ppm Fe). O eluato do gerador foi diluído por um fator de 10 com solução de HCl 0,05 M, também utilizada como branco do ensaio.
- **Pureza radionuclídica:** Para determinação e quantificação de germânio-68 e outras impurezas radionuclídicas nos eluatos, as amostras foram armazenadas por 48 horas após a eluição para decaimento do gálio-68 permitindo a detecção de impurezas radionuclídicas. Utilizou-se um detector de Germânio Hiper-Puro, GX1518, Canberra Mirion para detectar picos de raios gama correspondentes a fótons com energias diferentes de 0,511 MeV, 1,077 MeV, 1,022 MeV e 1,883, que não devem representar mais do que 0,1% do total da radioatividade.
- **Pureza radioquímica:** a determinação da pureza radioquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando tiras de suporte cromatográfico de sílica gel em camada delgada (TLC-SG) (Merck, Reino Unido) e o solvente acetato de amônio em água 77g/L / metanol (1: 1) $R_F, ^{68}\text{Ga}^{3+} = 0,0 - 0,2$. Cada ensaio foi realizado em triplicata e aplicado volume de 5 μL na fita cromatográfica TLC-SG. Após término das corridas dos solventes as fitas foram secas em estufa, encapadas com fita crepe, cortadas em 10 segmentos e a radioatividade de cada

segmento contada em equipamento Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) – D5002 Cobra II (Packard- Canberra).

6.3.2 Radiomarcção do PSMA-11 com ^{68}Ga

Os estudos de radiomarcção para obtenção do radiofármaco PSMA-11- ^{68}Ga e as análises de controle de qualidade foram baseados em resultados anteriores do grupo de pesquisa (VIVALDINI; DE ARAÚJO, 2021), na monografia para a solução de “Gallium (^{68}Ga) PSMA-11” injetável da Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a) e em referências bibliográficas com algumas modificações (CALDERONI et al., 2020) (MOKALENG et al., 2015) (CHAKRAVARTY et al., 2017).

Para o preparo da solução estoque do padrão de referência ou peptídeo precursor, 1 mg de PSMA-11-Ga padrão de referência (1013,69 g/mol, ABX) ou precursor PSMA-11 (947 g/mol) foi dissolvido em 1 mL de água purificada (Elix 10 Millipore, Merck) (1 mg/mL) e alíquotas de 20 μL (20 μg , correspondendo a 19,73 nmols e 21,1 nmols, respectivamente) foram armazenadas em tubos cônicos de 1,5 mL, e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para obtenção do radiofármaco PSMA-11- ^{68}Ga e definição da formulação do kit, alguns parâmetros da marcação foram estudados, como pH, volume e temperatura da marcação. O precursor PSMA-11 (20 $\mu\text{g}/20\text{ }\mu\text{L}$, 21,1 nmols, ABX) foi diluído para 1 mL em tampão acetato de sódio 1,5 M em 3 diferentes pH (5,5, 5,0 e 4,5) para avaliação da eficiência de radiomarcção. Em seguida, foi adicionado 1 mL ou 4 mL do eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ em HCl 0,05M (cerca de 388 MBq/10,5 mCi) e a mistura reacional foi aquecida à $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um bloco de aquecimento ou um bloco seco para aquecimento e agitação (Eppendorf ThermoMixer[®]) ou ainda mantida à temperatura ambiente por 10 minutos.

Para cada condição de marcação estudada, a eficiência de marcação foi determinada por meio da avaliação da porcentagem de pureza radioquímica empregando-se cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O método de análise por CLAE utilizado na determinação do tempo de retenção do padrão de referência de PSMA-11, do $^{68}\text{GaCl}_3$ e do radiofármaco PSMA-11- ^{68}Ga foi o seguinte: Fase móvel (A): ácido trifluoroacético (Sigma-

Aldrich, Brasil), água purificada (0,1:99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Brasil), acetonitrila (Sigma-Aldrich, Brasil) (0,1:99,9 V/V). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5µm, Waters 250mm X 4,6. A corrida cromatográfica foi realizada sob fluxo de 0,6 mL/min, utilizando o gradiente de 0 a 0,5 minutos 95% de A e 5% de B, de 0,5 a 10 minutos 60% A e 40% B, de 10 a 11 minutos 95% A e 5% B e de 11 a 16 minutos 95% A e 5% B, detecção UV a 280 nm e volume de injeção 100 µL (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a).

Para determinação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas tiras de suporte cromatográfico de sílica gel em camada delgada (TLC-SG) (Merck, Reino Unido) e o seguinte solvente: solução de acetato de amônio 77g/L / metanol (1: 1) ($R_f^{68\text{Ga-coloidal}} = 0,0 - 0,1$ e $R_f^{68\text{Ga-peptídeo}} = 0,7 - 1,0$) (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a). Adicionalmente foi utilizado como solvente tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Neste sistema de CCD, o $R_F^{68\text{Ga livre}}$ é 0,8 - 1,0 e o $R_F^{68\text{Ga-Peptídeo}}$ é 0,0 - 0,4.

A técnica de CCD possibilita identificar a porcentagem de galio-68 livre, enquanto a técnica de CLAE possibilita avaliar a presença de outros picos além do pico principal de PSMA-11-⁶⁸Ga.

6.3.3 Estabilidade das formulações congeladas

As formulações para o kit de PSMA-11 na forma congelada foram definidas em frasco único. A formulação 1 foi definida contendo 20 µL (21,1 nmols) de solução de PSMA-11 (1 mg/mL) e q.s.p 1 mL de solução tampão acetato de sódio 1,5 M, pH= 5,0. A formulação 2 é igual à formulação 1, porém, acrescida de 5 mg de manitol. Frascos com estas formulações foram preparados e armazenados sob congelamento a -20 ± 5 °C. A avaliação da estabilidade das formulações, a partir da realização de procedimentos de radiomarcção, em intervalos regulares, por um período de 6 meses, foi realizada por meio de análise da pureza radioquímica em CLAE, conforme descrito na seção 6.3.2 (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a).

6.3.4 Radiomarcção do kit PSMA-11 liofilizado

A radiomarcção para obtenção do PSMA-11-⁶⁸Ga a partir do kit do PSMA-11 liofilizado foi realizada com solução de cloreto de galio-68 obtida do gerador ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga da Eckert & Ziegler, bem como do gerador ITG.

A formulação liofilizada com o precursor PSMA-11 foi instantaneamente dissolvida com 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 e adicionado diretamente 4 mL do eluato de ⁶⁸GaCl₃ em HCl 0,05 M obtido do gerador ITG ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga (cerca de 223,8 MBq/ 6,0 mCi). A reação ocorreu por 10 minutos a temperatura ambiente. A eficiência de marcação foi determinada, por meio da avaliação da porcentagem de pureza radioquímica empregando-se cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito na seção 6.3.2 (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a)..

A formulação liofilizada com o precursor PSMA-11 foi marcada com eluato de ⁶⁸GaCl₃ obtido do gerador da Eckert & Ziegler após pré-purificação e sem purificação do eluato. Para purificação do eluato, o volume de 7 mL de solução de ⁶⁸GaCl₃ em HCl 0,1 M foi passado por um cartucho de troca catiônica SCX (Agilent, EUA) para retenção do gálio-68. O cartucho SCX foi eluído com um volume de 0,5 mL de uma solução eluente de NaOH 5M / HCl 5,5M (1:1). A radiomarcção também foi avaliada tamponando o kit liofilizado com 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 e pH 4,5 e adicionando 3,5 mL do eluato de ⁶⁸GaCl₃ em HCl 0,1M (cerca de 43,03 GBq/ 11,63 mCi). Cada eluição de 7 mL do eluato de ⁶⁸GaCl₃ obtido do gerador da Eckert & Ziegler foi dividida para avaliar duas condições de radiomarcção.

. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos em todas as condições avaliadas. Para determinação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD), expressa como a quantidade de radioatividade de PSMA-11-⁶⁸Ga, foi empregado o sistema utilizando tiras de suporte cromatográfico de sílica gel em camada delgada (TLC-SG) e solvente acetato de amônio em água 77g/L / metanol (1: 1) $R_F, {}^{68}\text{Ga-coloidal} = 0,0 - 0,1$; $R_F, {}^{68}\text{Ga-peptídeo} = 0,7 - 1,0$ como descrito no item 2.2.27 (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024a). Adicionalmente foi utilizado como solvente

tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Neste sistema de CCD, o R_F , ^{68}Ga livre é 0,8 - 1,0 e o R_F , ^{68}Ga -Peptídeo é 0,0 - 0,4.

Após a corrida, as fitas foram contadas em equipamento radio-CCD-scanner AR-2000 (Eckert & Ziegler Radiopharma Inc., EUA).

6.3.5 Radiomarcagem do DOTATATO com ^{68}Ga

Os experimentos de radiomarcagem para obtenção do radiofármaco DOTATATO- ^{68}Ga e as análises de controle de qualidade foram baseadas em artigos publicados (AGHANEJAD AYUOB et al., 2016) (ASLANI et al., 2014) (BREEMAN et al., 2005) (TWOROWSKA et al., 2016) (VELIKYAN et al., 2012) (VIS; LAVALAYE; VAN DE GARDE, 2015) (MOKALENG et al., 2015) (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2022). Para o preparo da solução estoque do padrão de referência, 1 mg do padrão de referência de Ga-DOTATATO (1502,32 g/mol, ABX) foi dissolvido em 1 mL de água purificada (Elix 10 Millipore, Merck) (1 mg/mL) e alíquotas de 20 μL (20 μg , 13,31 nmols) foram preparadas. Para o preparo da solução estoque do precursor, 1 mg do precursor DOTATATO (1435,6 g/mol, ABX) foi dissolvido em 1 mL de água purificada (Elix 10 Millipore, Merck) (1 mg/mL) e alíquotas de 40 μL (40 μg , 28 nmols) foram preparadas. Todas as alíquotas foram armazenadas em tubos cônicos de 1,5 mL, e congeladas a -20°C .

Para obtenção do DOTATATO- ^{68}Ga a partir do precursor, a solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ (4,0 mL, 592 MBq/16 mCi) eluída do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha) foi diretamente adicionada ao frasco contendo 40 μg (28 nmols) do precursor e 1 mL de tampão acetato de sódio 0,25 M pH 4,0. A mistura reacional foi aquecida a 95°C durante 30 minutos e finalizada a reação, a pureza radioquímica foi examinada por CCD e CLAE, conforme procedimentos descritos na monografia para a solução de "Gallium (^{68}Ga) Edotreotide" injetável (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2022).

O método de análise por CLAE utilizado na determinação do tempo de retenção do padrão de referência, do $^{68}\text{GaCl}_3$ e do radiofármaco DOTATATO- ^{68}Ga foi o seguinte: Fase móvel (A): ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Brasil), água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, Brasil), acetonitrila (Sigma-Aldrich, Brasil) (0,1: 99,9 V/V). Foi utilizada

uma coluna cromatográfica Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm. A corrida cromatográfica foi realizada sob fluxo de 0,6 mL/minuto, utilizando o gradiente de 24% a 60% de acetonitrila em 14 minutos, detecção U.V. a 220 nm e volume de injeção de 100 µL de acordo com a monografia (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2022).

Para determinação da pureza radioquímica por CCD foram utilizadas tiras de suporte cromatográfico de sílica gel em camada delgada (TLC-SG) (Merck, Reino Unido) e como solvente uma solução de acetato de amônio em água 77g/L / metanol (1: 1) (R_f , ^{68}Ga -coloidal = 0,0 - 0,1 e R_f , ^{68}Ga -peptídeo = 0,8 - 1,0) (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2024b) , (OCAK et al., 2010). Adicionalmente foi utilizado como solvente tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Neste sistema de CCD, o R_F , ^{68}Ga livre é 0,8 - 1,0 e o R_F , ^{68}Ga -Peptídeo é 0,0 - 0,4.

6.3.6 Radiomarcção do PSMA-I&T com ^{177}Lu

O peptídeo precursor para radiomarcção com ^{177}Lu , PSMA I&T (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1- (ácido glutâmico) -4,7,10-triacético ácido- DOTAGA) (1498,37g/mol e CAS: 2192281-54-0) foi adquirido da empresa CMR, Russia. O radioisótopo Lutécio-177 (na forma de cloreto de lutécio), foi obtido da empresa Isotopia (Israel).

O radiofármaco ^{177}Lu -PSMA-I&T para uso em estudos *in vivo* foi preparado após incubação de 20 µg (13,3 nmols) de PSMA-I&T com 429,2 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$ a 95 °C por 30 min e 450 rpm, em tampão ascorbato de sódio 0,52 M (200 µL, pH 4,7). Após aquecimento, a eficiência de marcação e a pureza radioquímica foram examinadas por CCD e CLAE. O método de análise por CLAE foi realizado com as seguintes condições: coluna Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA, gradiente 10% a 45% de (B) em 20 minutos sob fluxo de 1 mL/minuto (WEINEISEN et al., 2014a).

Para determinação da pureza radioquímica por CCD foram utilizadas tiras de suporte cromatográfico de sílica gel em camada delgada (TLC-SG) (Merck, Reino Unido) e o seguinte solvente: tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5 (R_f ^{177}Lu livre = 0,9 - 1,0 e R_f , PSMA-I&T- ^{177}Lu = 0,1 - 0,2) (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2021).

6.4 Ensaios de ligação *in vitro*

O principal objetivo dos estudos pré-clínicos deste trabalho foi demonstrar a integridade e estabilidade do peptídeo PSMA-11 após o processo de liofilização, a partir da avaliação da afinidade pelo sítio de ligação (receptor PSMA transmembrana). Foi utilizado o radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu para realização dos estudos pré-clínicos, sendo o PSMA-11 liofilizado empregado como competidor. Os ensaios de captação *in vitro* foram baseados em protocolos experimentais previamente descritos, executados no Centro de Radiofarmácia do IPEN, empregando PSMA-617-¹⁷⁷Lu e a mesma linhagem celular LNCaP (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022). Outros autores da literatura também foram revisados para o desenvolvimento dos protocolos experimentais com as células tumorais (KHORAMJOUY et al., 2021) (RUIGROK et al., 2021).

6.4.1 Cultivo e preparo das células LNCaP

Células LNCaP PSMA⁺ foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies, MD, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 300 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As culturas foram mantidas em 37 °C sob uma atmosfera de 5 % CO₂/ar umidificado. Um dia antes dos experimentos, as células foram colhidas utilizando Tripsina/EDTA (0,05 % e 0,02 %), centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura, contadas e 2 X 10⁵ células LNCaP PSMA⁺ foram semeadas por poço em placas de 6 poços e as placas foram mantidas a 37 °C sob uma atmosfera de 5 % CO₂/ar umidificado em estufa. Em cada dia de experimento e antes do início dos trabalhos foram verificadas visualmente a aderência e confluência das células LNCaP em cada poço, utilizando um microscópio invertido (aumento de 100X ou 400X) para garantir a aderência, homogeneidade entre os poços e confluência em torno de 80 %.

6.4.2 Cinética de ligação

No dia do experimento, as células aderentes foram incubadas com q.s.p 1 mL/poço de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 10 μ L da solução do radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (0,67 nmol/mL, 18,94 MBq/mL / 512 μ Ci/mL) pelos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas a 2-8 °C (temperatura de geladeira) para evitar a internalização celular do radiofármaco.

Após a incubação, o meio radioativo foi removido e as células foram lavadas com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), duas vezes, antes da lise com solução de NaOH 1M. O sobrenadante, as lavagens e os lisados celulares foram coletados em diferentes tubos e a radioatividade dos tubos foi medida usando um contador gama automático com cristais NaI (TI) (D5002 Cobra II, Packard Camberra). Foi preparada uma triplicata do padrão, contendo 1 mL da solução do radiofármaco preparada anteriormente (0,67 nmol) e 2 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, para manter o volume de 3 mL idêntico em todos os tubos de contagem. Os valores obtidos no contador gama, em contagens por minuto (CPM), foram convertidos para fmol do radiofármaco (a partir do valor de CPM do padrão, considerado 100% da quantidade adicionada nos poços) e o gráfico foi produzido com o software Graphpad Prism (versão 5.00[®]). O ensaio de cinética de ligação foi realizado como dois experimentos independentes em triplicata para cada tempo.

6.4.3 Curva de saturação

Neste experimento, a afinidade do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu pelos receptores transmembrana PSMA (K_d) e a densidade dos receptores (B_{max}) foram determinadas (KHORAMJOUY et al., 2021). No ensaio de saturação, 2×10^5 células LNCaP PSMA⁺ por poço, em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino foram incubadas com quantidades crescentes de PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu: 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,6 nM, 2,0 nM e 3,0 nM, a 4 °C por 1 hora. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração. Ao final de 1 hora, o meio de incubação foi removido e as células foram lavadas com

1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), duas vezes, antes da lise com solução de NaOH 1M. O sobrenadante, as lavagens e os lisados celulares foram coletados em diferentes tubos e a radioatividade dos tubos foi medida usando um contador gama automático com cristais NaI (TI) (D5002 Cobra II, Packard Camberra). Um gráfico de concentração da ligação específica versus concentração do radiofármaco foi gerado como uma curva de saturação. Os parâmetros de afinidade de ligação (K_d) e densidade de receptores (B_{max}) para o PSMA-I&T- ^{177}Lu foram calculados a partir da análise de regressão não linear dos dados da curva de saturação utilizando a atividade em CPM obtida do contador gama convertida para fmol e o software Graphpad Prism (versão 5.00[®]).

6.4.4 Competição

Nos experimentos de competição, a concentração final do radiofármaco PSMA-I&T- ^{177}Lu em cada tubo foi de 5 nM/mL e do competidor PSMA-11 liofilizado foi de 75 nM/mL, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB conforme descrito previamente, em estudos com PSMA-617- ^{177}Lu (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022). O PSMA-11 utilizado como competidor estava liofilizado há um mês. Os experimentos foram realizados em triplicata para os poços sem e com competidor e como dois experimentos independentes. As células LNCaP-PSMA⁺ (2×10^5 /poço) foram incubadas com o radiofármaco PSMA-I&T- ^{177}Lu com e sem o competidor PSMA-11 a 4 °C por 60 minutos. A incubação foi encerrada pela remoção do radiofármaco e competidor e lavagem dos poços com 1 mL de PBS por duas vezes. As células foram então lisadas usando 1 mL de solução de NaOH 1M. O lisado foi transferido para tubos de contagem e combinado com 1 mL de PBS, usado para lavar os poços por duas vezes. A quantificação da radioatividade em CPM foi realizada em contador gama automático com cristais NaI (TI) (D5002 Cobra II, Packard Camberra) e os valores foram convertidos para fmol de PSMA-I&T- ^{177}Lu . Por fim, os dados foram analisados com o software Graphpad Prism (versão 5.00[®]) como nos experimentos anteriores. Este estudo foi repetido duas vezes, em triplicata para cada condição.

6.4.5 Análise estatística

Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o software Graphpad Prism (versão 5.00®). Os dados quantitativos encontram-se expressos na forma de média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram avaliadas usando o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey ou teste t. Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6.5 Ensaio de ligação *in vivo*

Avaliou-se a biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu quanto à captação no tumor e órgãos não-alvo que expressam PSMA, com o intuito de avaliar a integridade do peptídeo PSMA-11 após a liofilização, quanto à propriedade de ligação aos receptores tumor-específicos, através de um estudo de competição *in vivo*, empregando-se o radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu e o PSMA-11 liofilizado como competidor.

6.5.1 Desenvolvimento do modelo tumoral

Para induzir o crescimento do tumor, células LNCaP (5×10^6 células/100 μ L) foram suspensas em PBS com adição de 20 % de Matrigel (Corning® Matrigel®, EUA) e foram inoculadas por via subcutânea no dorso de camundongos *SCID* (4–5 semanas de idade; Biotério do IPEN). Os camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano.

6.5.2 Estudo de biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu em camundongos portadores de tumor

A biodistribuição do PSMA-I&T marcado com Lutécio-177 foi realizada de acordo com protocolos previamente descritos (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022) (RUIGROK et al., 2021). O estudo foi conduzido em grupos de camundongos *SCID* (N = 5), após desenvolvimento de modelo tumoral (células LNCaP). Os animais foram eutanasiados nos tempos de 30, 60 e 120 minutos

após administração intravenosa de aproximadamente 7,4 MBq /300 pmol do peptídeo radiomarcado em 100 µL de solução salina 0,9%. O sangue, coração, pulmões, pâncreas, baço, estômago, fígado, rins, intestinos, músculo, ossos (fêmur), cérebro, tumor e cauda foram coletados. Todos os camundongos foram pesados antes da eutanásia e os órgãos retirados foram pesados e contados em contador gama automático com cristais NaI (TI) (D5002 Cobra II, Packard Camberra). A quantidade de radioatividade no sangue, tumor e órgãos de interesse foi determinada e expressa como porcentagem da atividade injetada por grama de tecido (%IA/g).

6.5.3 Estudo de competição in vivo: PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu X PSMA-11 liofilizado

Um segundo grupo de animais (n=5) para o tempo de biodistribuição de 60 minutos recebeu um excesso de PSMA-11 (100 µg / camundongo), a partir da reconstituição do PSMA-11 liofilizado com solução de cloreto de sódio 0,9%, 30 minutos antes da administração do radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu. Decorrido o tempo de interesse após administração, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e os órgãos de interesse foram retirados (coração, pulmão, estômago, baço, fígado, rins, intestino, pâncreas, cérebro, amostra de músculo e osso), assim como o tumor, e as porcentagens da atividade administrada por grama de órgão ou tumor foram determinadas, em relação a um padrão de dose administrada, em um contador gama automático com cristais NaI (TI) (D5002 Cobra II, Packard Camberra).

6.5.4 Análise estatística

Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o software Graphpad Prism (versão 5.00®). Os dados quantitativos encontram-se expressos na forma de média ± desvio padrão. Diferenças significativas foram avaliadas usando o teste two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

7 RESULTADOS

7.1 Estudo pré-formulação

O pH de reações de marcação com gálio-68 encontra-se na faixa levemente ácida a neutra. De acordo com a literatura uma faixa de pH de aproximadamente 4 a 5 é adequada para reações de complexação envolvendo gálio-68 e o quelante HBED-CC (BEHESHTI et al., 2018b) (EBENHAN et al., 2015) (SATPATI et al., 2016).

Como já mencionado anteriormente um dos principais desafios para desenvolver formulações liofilizadas (kits) para marcação com $^{68}\text{GaCl}_3$ está relacionado ao fato de que os geradores com grau de pureza BPF de diferentes fabricantes divergem entre si pela composição da matriz, o volume e concentração de solução de ácido clorídrico (HCl) utilizada para eluição do gerador. O gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG é eluído com um volume de 4 mL de HCl 0,05 M enquanto o da Eckert & Ziegler é eluído com 7 mL de HCl 0,1 M.

Com base nesses conhecimentos os objetivos do estudo pré-formulação do trabalho foram:

- Definir o tampão ideal para composição do kit.
- Definir o volume, concentração e pH ideais do tampão para garantir a complexação com gálio-68 (pH de aproximadamente 4 a 5) frente à adição de eluatos de dois geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (grau BPF) dos fabricantes ITG e Eckert & Ziegler.

A etapa inicial consistiu em avaliar a capacidade dos tampões acetato de sódio e ascorbato de sódio nas concentrações 0,5 M, 1,5M, 2,0 M e 2,5 M e nos pH de 5,0 e 5,5 para tamponar o volume de 4 mL de solução de HCl 0,05 M (condição de radiomarcção direta com todo o volume do eluato do gerador ITG). Um volume de 1 mL do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M e pH 5,0 manteve o pH desejado entre 4 e 5 ao adicionar um volume de 4 mL de solução de HCl 0,05 M. Um volume de 1 mL do tampão ascorbato de sódio na concentração de 2,5 M e pH 5,0 manteve o pH desejado entre 4 e 5 ao adicionar

um volume de 4 mL de HCl 0,05M, conforme resultados apresentados de forma resumida na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Capacidade tamponante do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M e no pH de 5,0 e ascorbato de sódio na concentração 2,5 M e pH 5,0 frente à adição de 4 mL de HCl 0,05 M.

Condição do Tampão (1 mL)	pH medido com a adição de 4 mL HCl 0,05M
Acetato de sódio 1,5 M pH 5,0	4,5
Ascorbato de sódio 2,5 M pH 5,0	4,5

Fonte: autora da tese.

Embora tenham sido avaliados os tampões acetato de sódio e ascorbato de sódio em diferentes concentrações para formulação do kit de PSMA-11, o tampão ascorbato de sódio mostrou algumas desvantagens. O tampão ascorbato de sódio é fotossensível e pode se decompor facilmente quando exposto a luz (LIU; ELLARS; EDWARDS, 2003). Também apresentou um prazo de validade de uso bastante reduzido (≤ 1 mês) em relação ao tampão acetato de sódio nos estudos de radiomarcações com PSMA e ^{177}Lu . Um estudo de Baudhuin e colaboradores (2021) demonstrou que a pureza radioquímica diminuiu significativamente com o uso de tampão ascorbato de sódio, sugerindo que o ácido ascórbico presente no tampão compete com o quelante pela complexação com o ^{68}Ga (BAUDHUIN et al., 2021).

Verificou-se então que a menor concentração de tampão acetato de sódio e menor pH para a manutenção do pH desejado entre 4 e 5 após a adição de 4 mL da solução de ^{68}Ga eluída do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG foi de 1,5 M com pH 5,0. Uma menor concentração de sais do tampão é desejada para reduzir a probabilidade de interferência na reação de complexação com o ^{68}Ga . Optou-se pelo tampão acetato de sódio para compor o kit liofilizado pelas vantagens mencionadas além do fato de não ser fotossensível.

A avaliação da capacidade do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M pH 5,0 para tamponar o HCl na concentração 0,1 M usado para eluir o gerador da Eckert & Ziegler será apresentada e discutida na seção 7.3.4 (Radiomarcção do kit de PSMA-11 liofilizado com ^{68}Ga).

7.2 Formulação e estudos de liofilização

7.2.1 Desenvolvimento da formulação liofilizada

Inicialmente, a formulação proposta para o kit de PSMA-11 liofilizado seria um frasco único contendo a massa do peptídeo em tampão acetato de sódio 1,5 M, podendo ou não ser acrescentada uma massa de manitol, à semelhança do kit congelado. Liofilizando-se um lote com essa formulação proposta inicialmente, observou-se colapso das pastilhas (**Figura 20**). A massa do tampão acetato (130 mg/frasco) com ou sem adição de 5 mg de manitol/frasco, produziu uma massa liofilizada visível, porém não constituindo uma pastilha uniforme em todos os frascos liofilizados. Deste modo, a massa de manitol foi aumentada para 20 mg.

Figura 20 - Aspecto das pastilhas formadas após o ciclo de liofilização (colapso). Em (A), a formulação por frasco consiste em 130 mg de tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 5,0. Em (B), a formulação foi acrescida de 5 mg de manitol por frasco.



Tampão Acetato de sódio 1,5M pH 5,0 (130 mg/frasco)



Fonte: autora da tese.

O colapso das pastilhas foi resultado da alta concentração de sais do tampão. As concentrações dos sais do tampão elevam-se ainda mais durante a etapa de congelamento, aumentando o pKa do tampão e alterando seu pH, o que pode ter causado o colapso das pastilhas, podendo ainda causar um efeito deletério aos peptídeos. Os parâmetros utilizados no ciclo de liofilização encontram-se na tabela 3 da seção 6.2.1 da metodologia.

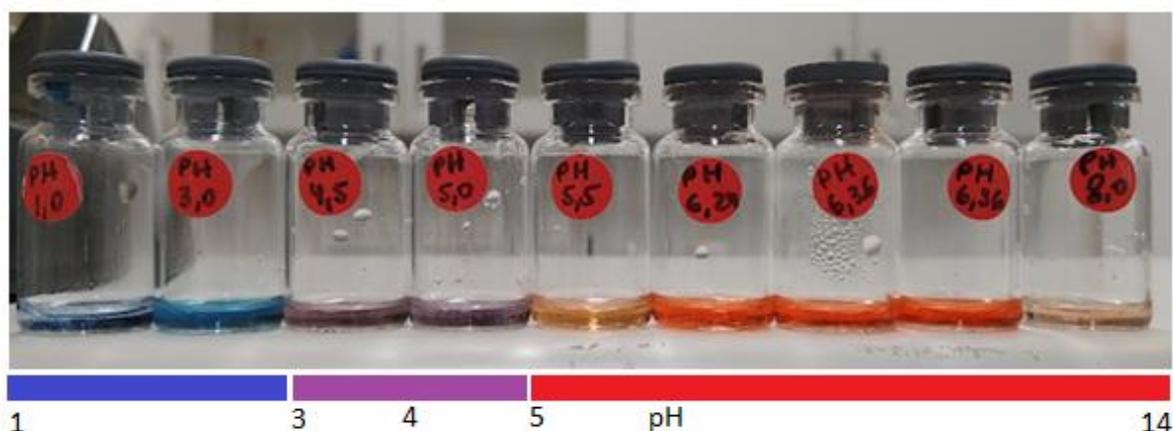
O resultado observado da liofilização da formulação contendo tampão acetato de sódio 1,5 M corrobora dados encontrados na literatura sobre o impacto da liofilização e congelamento extremo no pH de soluções proteicas tamponadas que podem resultar na desnaturação das proteínas com possibilidade de geração de agregados irreversíveis (KOLHE; AMEND; SINGH, 2010).

Um estudo de Mukherjee e colaboradores (2014) demonstrou que o tampão acetato de sódio com concentração de 0,5 M (concentração do sal mais baixa) se revelou adequada para ser submetida a processo de liofilização, uma vez que o pH permaneceu inalterado mesmo após o processo (MUKHERJEE et al., 2014). No entanto, os resultados do estudo de pré-formulação do presente trabalho demonstraram que o tampão acetato de sódio com concentração de 0,5 M não manteve o pH desejado entre 4 e 5 após adição de 4 mL de HCl 0,05M.

De acordo com o método estabelecido para avaliar a mudança de pH das formulações com ou sem tampão acetato de sódio no congelamento, utilizando

indicador Vermelho do Congo, dentre as 5 formulações examinadas as que continham tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 5,0, com ou sem manitol exibiram uma mudança de cor e, portanto, alteração de pH após serem submetidas a ciclo de liofilização com etapa de congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. As formulações sem tampão acetato de sódio 1,5 M e que continham apenas manitol (pH 6,24) mantiveram a cor e o pH após serem submetidas ao ciclo de liofilização com etapa de congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A escala de cor comparativa que variou do azul (pH ácido) ao vermelho (pH básico), está demonstrada na (**Figura 21**). O indicador de pH Vermelho do Congo apresenta coloração azul em solução com pH abaixo de 3,0 e coloração vermelha em solução com pH acima de 5,2. Entre o pH 3,0 e 5,2 consiste na zona de viragem cuja coloração é roxa.

Figura 21 - Escala de cor montada para o indicador Vermelho do Congo para pH entre 1,0 e 8,0. Os frascos continham meios com pH 1,0; 3,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,24; 6,36 e 8,0 respectivamente da esquerda para a direita.



Fonte: autora da tese.

Após o término do ciclo de liofilização, a mudança de cor foi registrada por foto, conforme **Figura 22** e **Figura 23**. A escala de cor preparada ajudou a observar se houve ou não mudança de cor nos frascos das 5 formulações após liofilização.

Na **Figura 22** pode-se observar a mudança de cor e, portanto, de pH das formulações contendo tampão acetato de sódio 1,5 M (pH 5,0) com ou sem manitol após serem submetidas a ciclo de liofilização com etapa de congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em (A) (Formulação 1), o primeiro frasco contendo

apenas tampão acetato de sódio 1,5 M (pH 5,0) e o indicador vermelho do congo tem cor roxa e após liofilização dos frascos, realizada em triplicata, passam a ter coloração avermelhada indicando mudança de pH (para meio básico). Em (B) (Formulação 2), o primeiro frasco contendo tampão acetato de sódio 1,5 M (pH 5,0) + 5 mg de manitol e o indicador Vermelho do Congo tem cor roxa e após liofilização dos frascos, em triplicata, passam a ter coloração avermelhada indicando mudança de pH (para meio básico). Em (C) (Formulação 3), o primeiro frasco contendo tampão acetato de sódio 1,5 M (pH 5,0) + 20 mg de manitol e Vermelho do Congo tem cor roxa e após liofilização dos frascos, em triplicata, passam a ter coloração vermelha indicando mudança de pH (meio básico).

Figura 22 – Frascos com as formulações após ciclo de liofilização. Em (A) apenas 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0. Em (B) acréscimo de 5 mg de manitol /frasco e em (C) acréscimo de 20 mg de manitol /frasco.



Fonte: autora da tese.

Na **Figura 23** pode-se observar em (A) e (B) a permanência de cor e, portanto, de pH das formulações contendo apenas manitol após serem submetidas a ciclo de liofilização com etapa de congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em (A) (Formulação 4), o primeiro frasco contendo apenas solução com 5 mg de manitol (pH 6,24) e Vermelho do Congo tem cor avermelhada e após liofilização dos frascos, realizada em triplicata, permanecem com coloração avermelhada indicando que não houve alteração de pH. Em (B) (Formulação 5), o primeiro frasco contendo apenas solução com 20 mg de manitol (pH 6,24) e Vermelho do Congo tem cor avermelhada e após liofilização dos frascos, em triplicata, permanecem com coloração avermelhada indicando que não houve alteração de pH. Em C, apenas para comparação, registro da formulação 2, contendo tampão acetato de sódio

1,5 M pH 5,0 e Vermelho do Congo e a alteração de cor de roxo em pH 5,0 antes da liofilização no primeiro frasco para avermelhado nos frascos após liofilização.

Figura 23 – Frascos com as formulações após ciclo de liofilização. Em (A) solução com 5 mg/frasco de manitol (pH 6,24). Em (B) solução de 20 mg/frasco de manitol (pH 6,24) e em (C) 1 mL tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 com acréscimo de 5 mg/frasco de manitol a formulação.



Fonte: autora da tese.

Os resultados destes estudos serviram para avaliar o impacto potencial da mudança de pH induzida pelo processo de liofilização, incluindo congelamento a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, na estabilidade do peptídeo. A mudança de pH indicada com as formulações contendo tampão acetato de sódio para meio básico também afetaria o rendimento da reação de radiomarcção com ^{68}Ga , pois ela é favorecida em meio ácido, que preserva o estado de oxidação do $^{68}\text{Ga}^{+3}$. Dessa forma, a formulação do kit de PSMA-11 foi desenvolvida em dois frascos: frasco 1, contendo o peptídeo e manitol e frasco 2, contendo o tampão de radiomarcção em pH 5,0, alterando a estratégia inicial de desenvolver o kit liofilizado de PSMA-11 em frasco único.

O tampão em frasco separado é necessário para estabilizar o pH. A finalidade do manitol na composição do kit foi servir como agente de volume e dessa forma fornecer um grau substancial à formulação. Isto é importante em casos em que concentrações do princípio ativo usado são muito baixas e tem a função de evitar a perda de massa do peptídeo do frasco durante a secagem (CARPENTER et al., 2002). Agentes de volume cristalinos como manitol produzem uma pastilha de boa aparência, intacta, de consistência uniforme e com boas propriedades mecânica (SHUKLA, 2011). Outra propriedade desejada é que o manitol (ou glicina) é considerado uma boa escolha como modificador de tonicidade no desenvolvimento de uma formulação isotônica (CARPENTER et al., 2002).

Com relação à formulação liofilizada dos peptídeos chegou-se à conclusão de que o peptídeo deve ser liofilizado sem a presença do tampão de marcação. A elevada concentração de sais do tampão de marcação resultou em colapso das pastilhas em testes iniciais de ciclos de liofilização. Os resultados de pastilhas colapsadas, como já mencionado anteriormente, corroboram com dados encontrados na literatura sobre o impacto da liofilização e congelamento extremo no pH de soluções proteicas tamponadas que podem resultar na desnaturação das proteínas com possibilidade de geração de agregados irreversíveis (KOLHE; AMEND; SINGH, 2010; ORII; MORITA, 1977).

O kit comercial Illumet™ desenvolvido pela ANMI (Bélgica) e mencionado na seção 3.10.1.1 consiste em 3 frascos, sendo que um deles contém 25 µg do peptídeo PSMA-11 liofilizado, um segundo frasco estéril contendo 150 mg de acetato de sódio e um terceiro frasco de vácuo estéril para coletar diferentes volumes de solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ (concentração de solução de HCl variando de 0,05 M a 0,2 M) de diferentes geradores $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ BPF comerciais (ITG, Eckert & Ziegler, iThemba e IRE-ELiT). A empresa ANMI recomenda que para manter o pH da radiomarcação dentro da faixa de 4,0 a 4,5, o pH deve ser ajustado com a chamada solução de ajuste de pH frente à adição de eluato dos diferentes geradores. O volume e concentração do HCl da solução de ajuste de pH dependerá do gerador utilizado. Por exemplo, para cada gerador de determinado fabricante, há uma recomendação de volume de eluição do gerador com o HCl na concentração descrita pelo fabricante (o volume de HCl pode ser diferente do descrito pelo fabricante do gerador) a ser inserido diretamente no kit liofilizado e a adição de determinado volume e concentração do HCl da solução de ajuste de pH.

A necessidade de utilização da solução de ajuste de pH neste produto indica que a concentração empregada de acetato de sódio não foi otimizada ou formulada como tampão, para possibilitar o uso de soluções de HCl com diferentes concentrações.

O conceito empregado no produto comercial Illumet™ foi semelhante ao empregado no desenvolvimento do kit deste projeto, ou seja, o peptídeo liofilizado em frasco separado da solução de marcação, porém, sem a utilização do manitol. Quanto à solução tampão empregada, a proposta apresentada neste

projeto possui a vantagem de permitir a utilização de diferentes volumes de eluato de geradores em diferentes concentrações de HCl, sem a necessidade de utilização de ajuste de pH.

O kit comercial IsoPROTrace-11[®] desenvolvido pela empresa Isotopia (Israel) consiste em frasco único contendo 10 µg do peptídeo liofilizado para marcação direta e compatível com solução de ⁶⁸GaCl₃ em HCl 0,05 M ou HCl 0,1 M. O volume de solução de ⁶⁸GaCl₃ adicionado ao frasco com o peptídeo liofilizado pode variar entre 1,1 e 5 mL quando em HCl 0,1 M e entre 2,2 e 4,0 mL quando em HCl 0,05 M, ou seja, não possibilita a marcação utilizando todo o volume (7,0 mL) de eluição do gerador da Eckert & Ziegler. Considerando as condições de marcação deste kit, que possibilita a variação da concentração e volume de solução de HCl, esta formulação provavelmente possui um agente tamponante, porém esta informação não está disponível. Por ter sido liofilizado juntamente com o peptídeo, o tampão empregado provavelmente apresenta baixa concentração molar, para evitar a alteração de pH durante o processo de liofilização.

Como já mencionado anteriormente Mukherjee e colaboradores (2014) liofilizou em frasco único uma mistura de análogos de somatostatina e tampão acetato de sódio na concentração 0,5 M e não observou alteração de pH (MUKHERJEE et al., 2014a).

Comparativamente, a formulação proposta para o kit de PSMA-11 no presente trabalho, considera a possibilidade de liofilizar o peptídeo na presença de manitol para promover a formação de uma pastilha liofilizada consistente, prevenindo a perda de massa do peptídeo durante o processo de liofilização. Como já mencionado também de acordo com a literatura, a liofilização empregando massa muito pequena do soluto pode acarretar perda de massa do peptídeo do frasco durante o processo (CARPENTER et al., 2002).

Ainda na proposta do kit no presente trabalho, o tampão acetato de sódio é apresentado em frasco separado, para ser preservado em suas propriedades tamponantes, sendo adicionado ao frasco liofilizado no momento da marcação. Conforme os resultados dos estudos realizados com o indicador vermelho do Congo, o processo de liofilização promoveu alteração do pH do tampão acetato de sódio 1,5 M, fato que definiu a apresentação do kit em dois frascos.

A força molar do tampão e o pH do mesmo foram investigados de modo a possibilitar a utilização de diferentes volumes de solução de HCl em diferentes concentrações, sendo possível realizar marcação com o volume total de eluição do gerador da ITG (4,0 mL) em HCl 0,05M e até 3,5 mL de volume de eluição do gerador da Eckert & Ziegler em HCl 0,1M, sem a necessidade de utilização de solução de ajuste de pH. Em ambos os casos, o pH da marcação ficou entre 4,0 e 4,5.

7.2.2 Caracterização da formulação

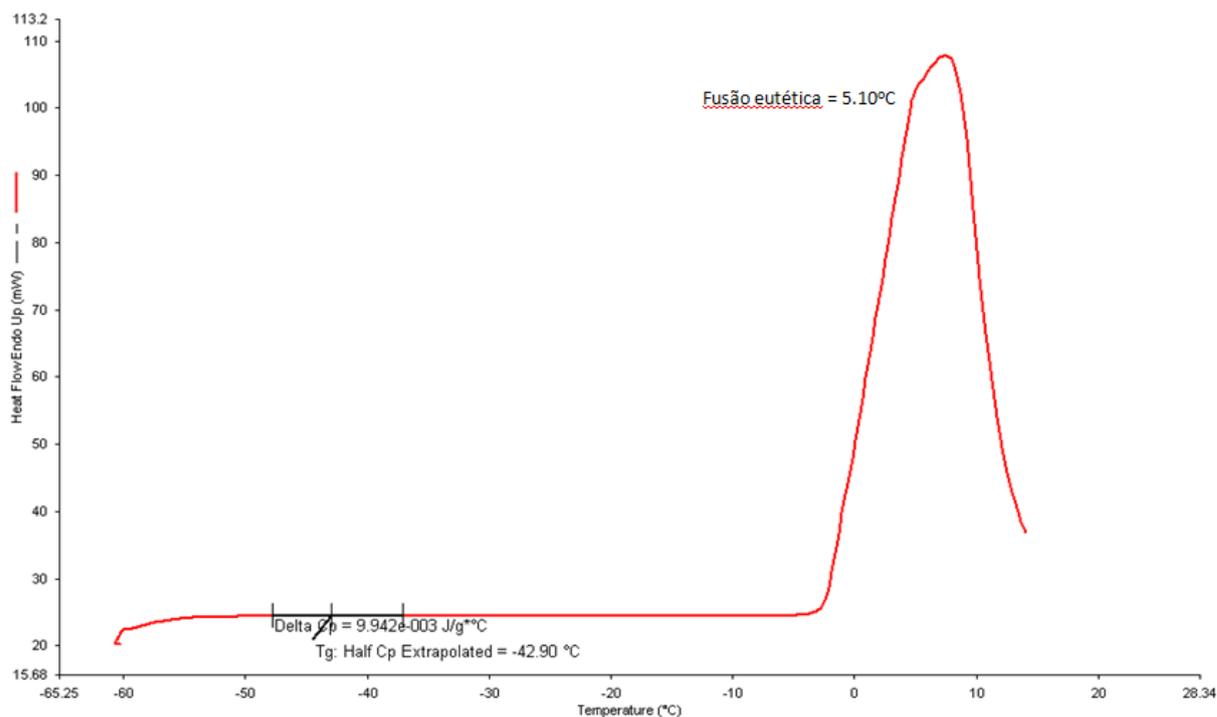
Um ciclo de liofilização deve ser muito bem desenhado por representar uma sequência de etapas críticas (taxa e temperatura de congelamento, taxa e temperatura de secagem e teor de umidade final), que podem resultar na desnaturação de peptídeos e proteínas. As formulações de peptídeos e proteínas, uma vez definidas, precisam de caracterização completa e todas as temperaturas críticas devem ser determinadas por estudos específicos para o desenvolvimento de um ciclo de liofilização robusto (WANG, 2000).

A temperatura de transição vítrea (T_g') e temperatura eutética (T_{eut}) da formulação contendo 20 μ g de peptídeo e 20 mg de manitol/mL foram determinadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Para o desenvolvimento do ciclo de liofilização para formulações do tipo cristalinas (como é o caso da formulação do kit de PSMA-11 com manitol) a etapa do congelamento deve ser conduzida de 3 a 5 °C abaixo da T_g'' (WANG, 2000).

Sendo assim, como o resultado obtido por DSC para a T_g'' foi de - 42,9 °C, a formulação deve ser, idealmente, congelada a uma temperatura de - 45,0 °C ou - 50,0 °C (**Figura 24**). Já a secagem primária deve ser conduzida com base na temperatura eutética (T_{eut}). Como o resultado obtido por DSC para a T_{eut} foi de 5 °C, a secagem primária deve ser conduzida entre 2 °C a 5 °C abaixo dessa temperatura (**Figura 24**). De forma geral, quando o congelamento ocorre de forma mais lenta, ocorre formação de poros e cristais de gelo maiores facilitando a sublimação do gelo. Dessa forma, é recomendado uma taxa de congelamento de 0,5 °C por minuto. Também é recomendado para o desenvolvimento do ciclo de liofilização desta formulação a inserção de dois *Holding times* e *Annealing*

antes de descer até a temperatura de congelamento para formação de poros e cristais maiores (AWOTWE-OTOO et al., 2013).

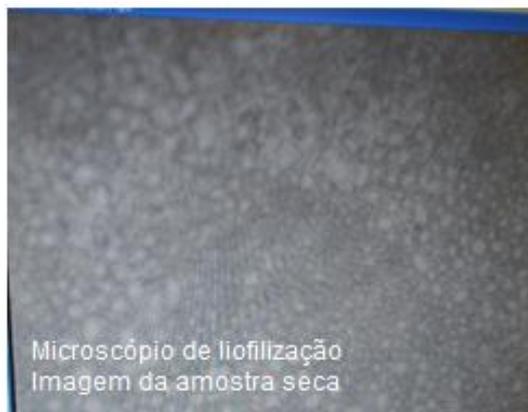
Figura 24 - Curva DSC obtida para a formulação de PSMA-11 com manitol. A amostra foi esfriada até -60 °C a 5 °C/ minuto e depois aquecida até 20 °C com taxa de 10 °C/ minuto . Pode-se observar as temperaturas críticas: fusão eutética = $5,10\text{ °C}$ e $T_g'' = -42,90\text{ °C}$.



Fonte: autora da tese.

Foi realizada a microscopia ótica acoplada à liofilização para determinar a temperatura de colapso (T_c) da formulação contendo $20\text{ }\mu\text{g}$ de PSMA-11 e 20 mg de manitol/mL. Obteve-se temperatura de colapso acima de 8 °C , ou seja, até a temperatura de 8 °C não houve colapso (**Figura 25**). A microscopia ótica acoplada à liofilização é uma ferramenta que corrobora os resultados do DSC, proporcionando visualização em tempo real das etapas de congelamento e secagem (WANG, 2000).

Figura 25 - Imagem obtida do processo de liofilização observado ao microscópio de liofilização. Imagem da formulação seca de PSMA-11 com 20 mg de manitol. Amostra seca (temperatura de 8 °C) aumento de 100 X.



Fonte: autora da tese.

7.2.3 Desenho do ciclo de liofilização

A formulação contendo manitol e o peptídeo PSMA-11 (20 mg e 20 µg, respectivamente) em um ciclo de liofilização contendo *holding times* foi avaliada ao longo deste estudo (ver ciclo descrito na Tabela 4 da seção 6.2.3).

A aparência das pastilhas liofilizadas foi avaliada a olho nu. As pastilhas apresentavam aspecto uniforme e homogêneo entre todos os frascos (N=15 frascos) e não foi observado sinais de colapso em nenhum deles (**Figura 26**).

Figura 26 - Aspecto homogêneo e íntegro das pastilhas obtidas após liofilização da formulação proposta de PSMA-11 com 20 mg de manitol (N=15 frascos).



Fonte: autora da tese.

Com base nos estudos de caracterização das temperaturas críticas em equipamento DSC e microscópio de liofilização, o ciclo de liofilização foi definido para atingir temperatura de congelamento de -45 °C (na prática o equipamento atingiu até -40 °C) e a secagem primária foi realizada a 2 °C. Utilizou-se taxa de congelamento de 0,5 °C/minuto, e recurso de *holding time* antes na etapa de congelamento, para formação de poros e cristais maiores visando facilitar a sublimação (TANG; PIKAL, 2004a).

7.3 Estudos de radiomarcção e controle de qualidade

7.3.1 Gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$: ITG X Eckert & Ziegler

O gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG continha 1995 MBq (53,92 mCi) de ^{68}Ge na data da calibração. Os eluatos de $^{68}\text{GaCl}_3$ foram submetidos a ensaios de controle de qualidade por um período de 18 meses, totalizando análise de 18 eluatos. Para a quantificação de germânio-68 foram contabilizadas 12 análises com os resultados completos das áreas dos picos de ^{68}Ga da primeira e segunda contagens.

7.3.1.1 Controle de qualidade do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (ITG, Alemanha)

O rendimento inicial de eluição de ^{68}Ga do gerador ITG foi de 83 %.

Os resultados obtidos atenderam aos critérios de aceitação descritos na monografia de cloreto de galio-68 para marcação da Farmacopeia Europeia conforme descrito na (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2024).

Todas as amostras de $^{68}\text{Ga}^{3+}$ fornecidas pelo gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG (N = 18) em solução de HCl 0,05 M apresentaram-se estéreis e atendendo ao critério de aceitação para endotoxinas bacterianas. A aparência, pH e os controles de identidade radionuclídica, meia vida física, pureza radionuclídica, pureza radioquímica também atenderam aos critérios de aceitação da Farmacopeia Europeia para todas as amostras (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 11.0., 2021).

Tabela 8 - Resultados do controle de qualidade do eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador ^{68}Ge - ^{68}Ga ITG e critérios de aceitação. (N=18).

Ensaio	Resultados	Crítérios de aceitação farmacopeicos*
Aparência	Límpido, incolor e sem partículas	Límpido, incolor e sem partículas
Identidade Radionuclídica	0,511 e 1,077 MeV	0,511 e 1,077 MeV
Meia vida física	68 a 74 minutos	62 a 74 minutos
pH	1 a 2	máximo 2,0
Esterilidade	Estéril	N.A.
Endotoxinas bacterianas - LAL	< 12,5 UE/mL	< 175 UE/V^[1]
Impureza ^{68}Ge	$\leq 0,001$ %	$\leq 0,001$ %
Conteúdo de Fe	máximo 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$	≤ 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$
Pureza Radionuclídica	$\geq 100\%$	$\geq 99,9$ %
Pureza Radioquímica	$\geq 98,9\%$	$\geq 95\%$

Fonte: (*EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2021)

[1] V= máximo volume a ser usado para preparação de uma dose para um paciente

O conteúdo metálico de Fe, quantificado em 18 eluatos no período de 18 meses, foi organizado como média \pm desvio padrão de três períodos: primeiros 6 meses, 6 meses intermediários e 6 meses finais, conforme. O conteúdo de Fe determinado nos eluatos foi sempre ≤ 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ e atendeu aos critérios de aceitação descritos na Farmacopeia Europeia (expresso em $\mu\text{g}/\text{GBq}$) (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2021).

Tabela 9 - Concentração da impureza metálica (Fe) do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG nos eluatos de ^{68}Ga expressos como média \pm desvio padrão de três períodos diferentes: (1) primeiros 6 meses iniciais, (2) 6 meses intermediários e (3) 6 meses finais. A concentração de Fe é expressas em $\mu\text{g}/\text{GBq}$.

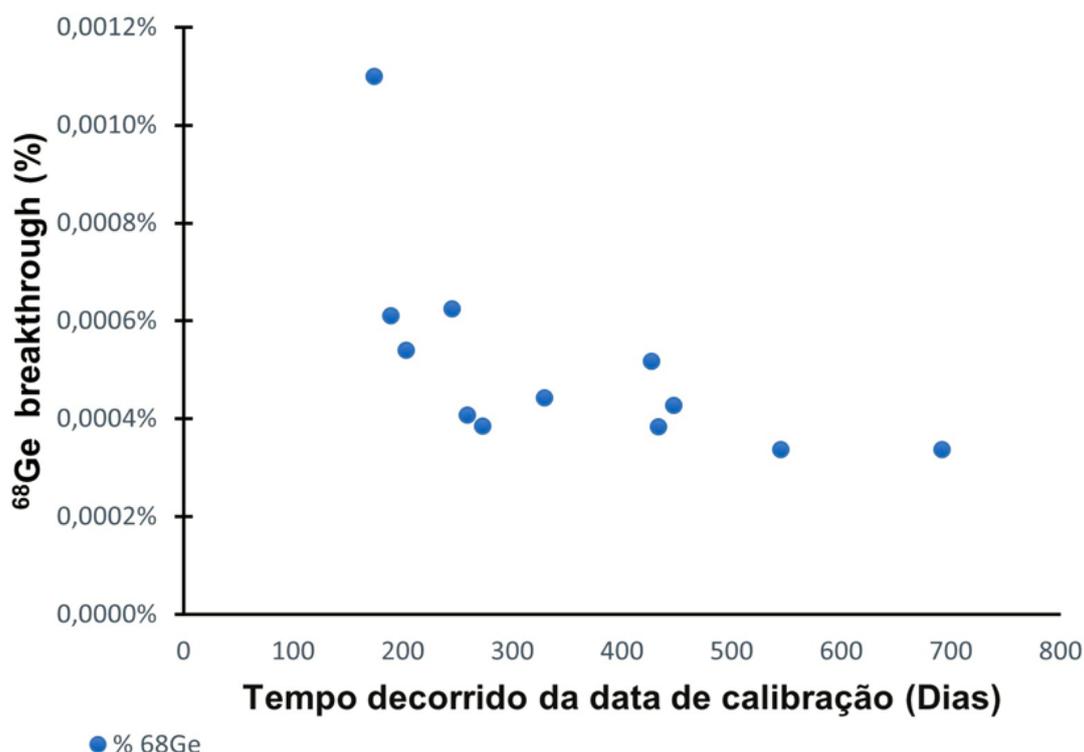
Metal	(1) 6 meses iniciais ($\mu\text{g}/\text{GBq}$)	(2) 6 meses intermediários ($\mu\text{g}/\text{GBq}$)	(3) 6 meses finais ($\mu\text{g}/\text{GBq}$)	Crítérios de aceitação Farmacopeico*
Ferro	1,0 \pm 0,4	1,6 \pm 0,8	3,7 \pm 1,3	≤ 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$

*Fonte: (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0., 2023).

A impureza de ^{68}Ge determinada nos eluatos foi sempre $\leq 0,001\%$, atendendo aos critérios de aceitação, expresso como porcentagem da atividade ^{68}Ge presente no gerador no momento da eluição (N=12).

A porcentagem de ^{68}Ge no eluato foi de $0,001\%$ após 170 dias decorridos da data de calibração para o gerador ITG e reduziu para $0,0003\%$ após 692 dias da data de calibração (**Figura 27**). A redução da porcentagem da impureza de ^{68}Ge com o tempo é uma característica única para o gerador deste fabricante (ITG) e pode ser atribuído à diminuição geral na radiólise e concentração de atividade com diminuição da atividade total conforme descrição da literatura (AMOR-COARASA et al., 2016).

Figura 27 - Porcentagem da impureza de ^{68}Ge (^{68}Ge “breakthrough”) do gerador ITG no período de 18 meses após data de calibração, expresso como porcentagem da atividade ^{68}Ge presente no gerador no momento da eluição (N=12).

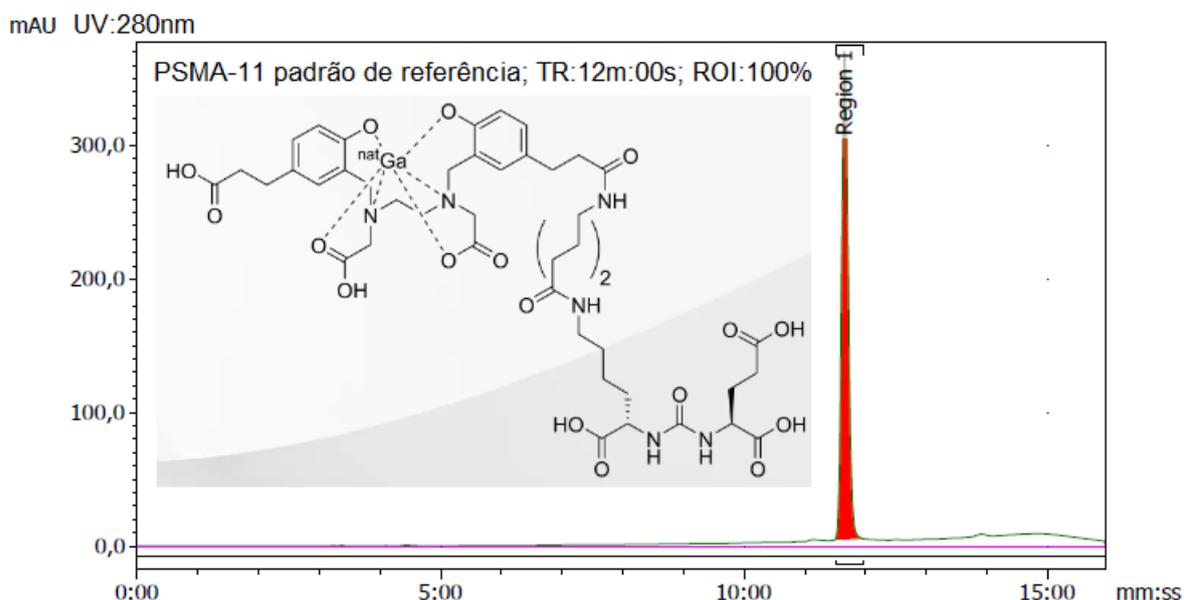


Fonte: autora da tese.

7.3.2 Radiomarcagem do PSMA-11 com ^{68}Ga

A padronização das análises iniciou-se pela determinação do tempo de retenção por CLAE do padrão de referência do PSMA-11 que foi de 12:00 minutos, como demonstrados na **Figura 28**.

Figura 28 – Cromatograma do padrão de referência do PSMA-11 (detector UV:280nm). Coluna Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % Ácido trifluoroacético-TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 padrão de referência como porcentagem do total da área (ROI: %).

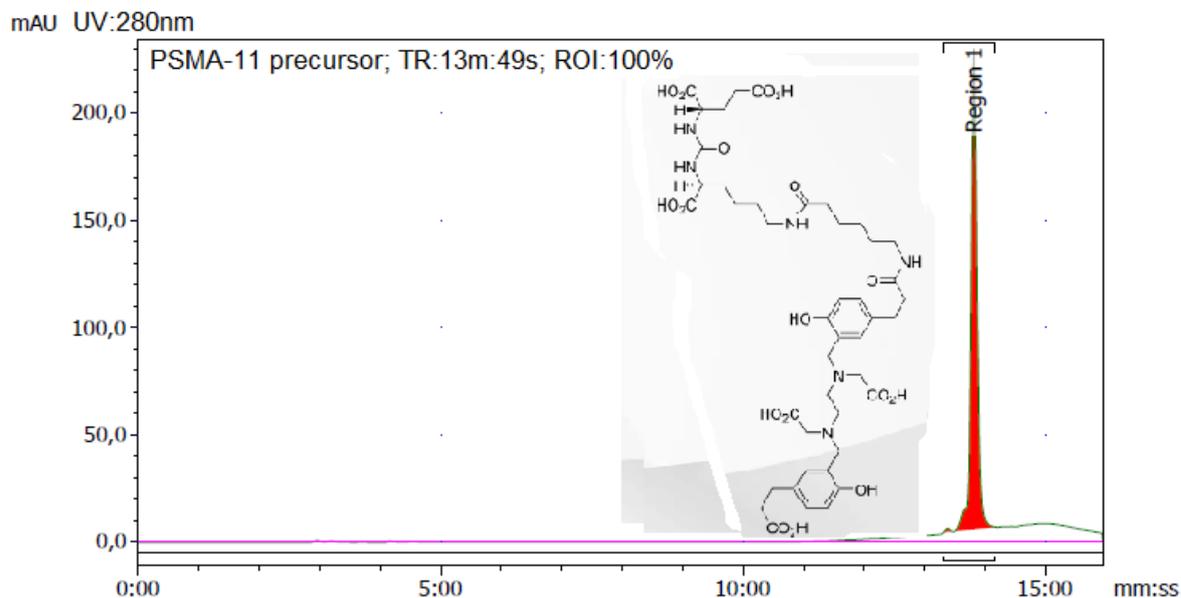


Fonte: autora da tese.

Foi determinado o tempo de retenção por CLAE do precursor PSMA-11 (TR:13:49 minutos), como demonstrado na **Figura 29**. Foram empregadas as mesmas condições usadas na determinação do tempo de retenção por CLAE do padrão de referência do PSMA-11.

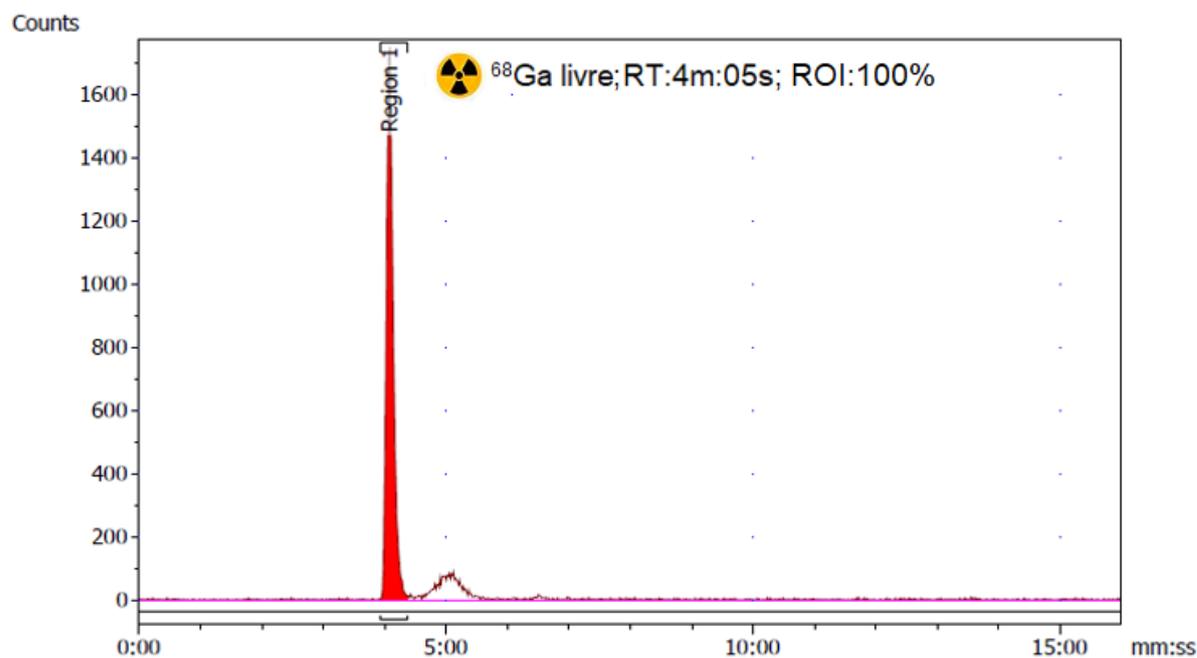
Na sequência foi determinado o tempo de retenção da impureza ^{68}Ga livre por CLAE (TR:4:05 minutos), para as mesmas condições empregadas na determinação da pureza radioquímica do produto de interesse, **Figura 30**.

Figura 29 – Cromatograma do precursor PSMA-11 (detector UV:280nm). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 precursor como porcentagem do total da área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Figura 30 – Cromatograma de CLAE do ⁶⁸Ga livre (detector radioativo). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ⁶⁸Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Os estudos de radiomarcção tiveram por objetivo otimizar o pH da reação, avaliar a temperatura de radiomarcção e a influência da adição de duas diferentes concentrações de manitol à formulação.

O pH da reação em tampão acetato de sódio 1,5 M foi avaliado na radiomarcção do PSMA-11 para alcançar complexação quantitativa ideal de ^{68}Ga ao PSMA-11, sem necessidade de purificação da mistura reacional ao final da marcação, corroborando com o conceito de “kit para pronta marcação”. Dessa forma, foi avaliada a eficiência de radiomarcção em pH 5,5, 5,0 e 4,5 e os resultados estão resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) de PSMA-11- ^{68}Ga : radiomarcção em diferentes pH (5,5, 5,0 e 4,5). (N = 3).

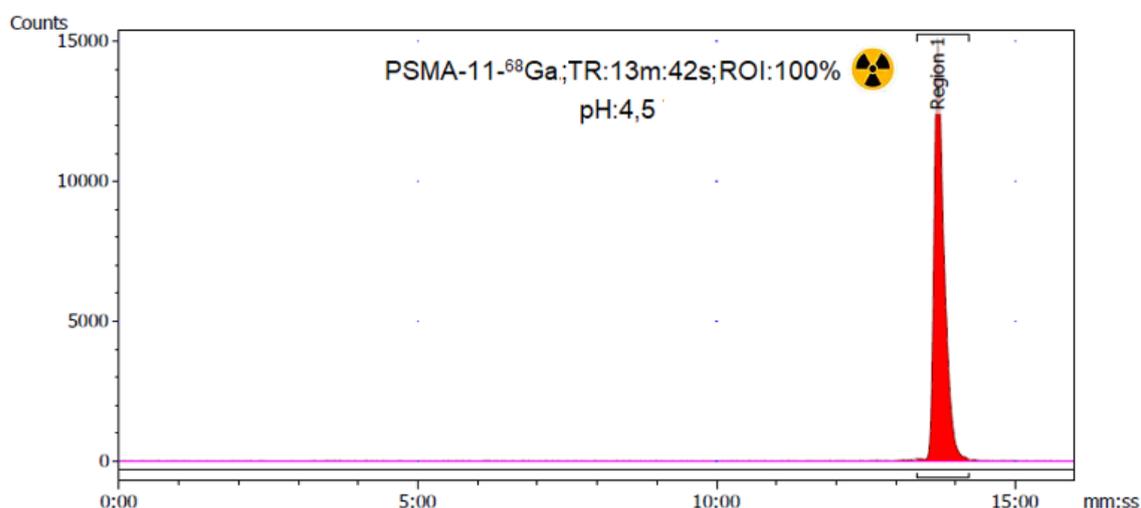
Condição de Marcação pH do tampão acetato de sódio 1,5M	CLAE (%)	CCD (%) citrato de sódio 0,1M pH 5,0	CCD (%) acetato de amônio/metanol 1:1	Critério de aceitação CLAE e CCD (%)
pH 5,5	100,0	98,4 ± 0,0	98,2 ± 0,0	≥ 95,0
pH 5,0	100,0	98,7 ± 0,0	98,5 ± 0,0	≥ 95,0
pH 4,5	100,0	99,2 ± 0,0	98,8 ± 0,0	≥ 95,0

*Nota: Os valores estão expressos como “média ± DP”: (N = 3) e (p > 0,05).
Fonte: autora da tese.

Os resultados das reações de radiomarcção demonstraram que 20 µg de PSMA-11 (21,1 nmols) em tampão acetato de sódio 1,5 M em pH de reação variando entre 4,5 e 5,5 com adição do eluato de $^{68}\text{Ga}^{3+}$ (101,01 MBq - 2,73mCi), 10 minutos de incubação à 90 °C, garantiu uma complexação de 100 % de ^{68}Ga , quando analisado por CLAE **Figura 31, 32 e 33**, não sendo identificados picos adicionais além do pico principal correspondente ao produto marcado.

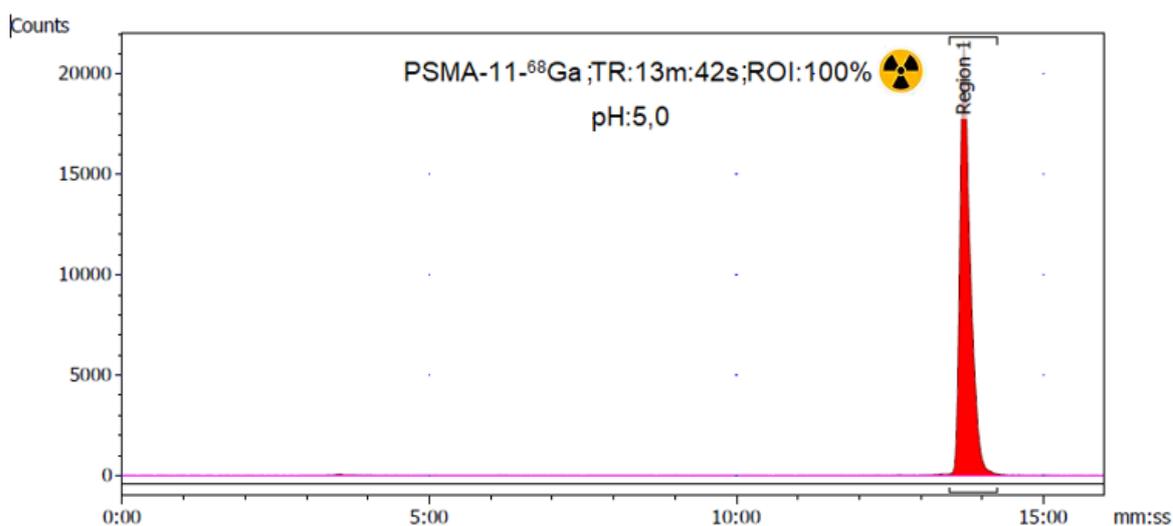
Quando analisado por CCD, a porcentagem de pureza radioquímica para o pH 4,5 foi discretamente maior na eficiência de complexação do ^{68}Ga em relação ao pH 5,0 e 5,5 (apesar da diferença não ser significativa (P>0,05)). Dessa forma ficou estabelecido que o pH ideal do tampão de reação para obter o PSMA-11- ^{68}Ga é de 4,5.

Figura 31 – Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido com marcação em pH 4,5, aquecimento 90 °C por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).



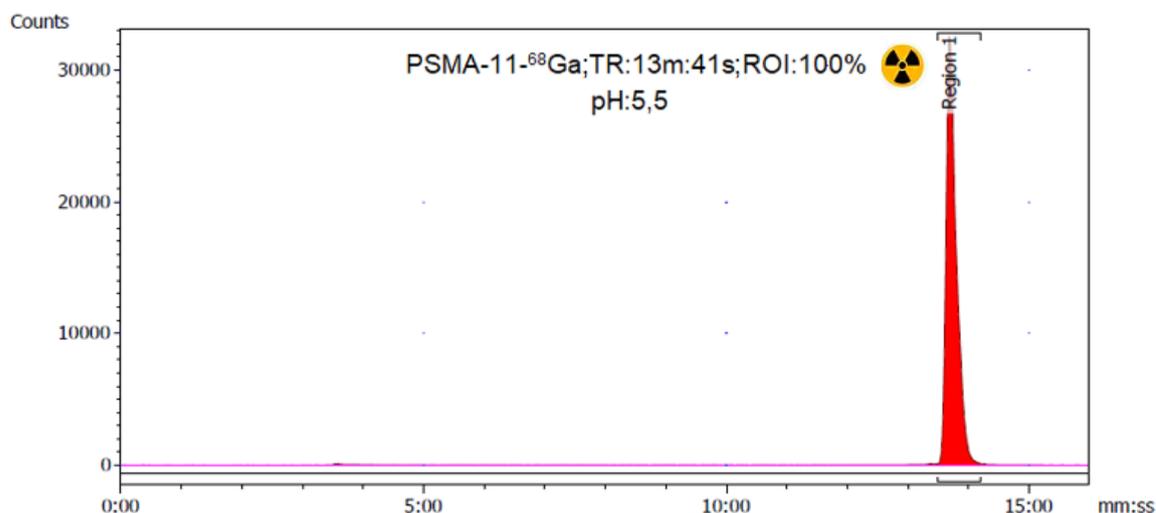
Fonte: autora da tese.

Figura 32 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido com marcação em pH 5,0, aquecimento 90°C por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Figura 33 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido com marcação em pH 5,5, aquecimento 90°C por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Uma vez identificado que o melhor pH de reação para obtenção do ⁶⁸Ga-PSMA-11 é o pH 4,5, foi estudado se o volume de 1 mL do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M manteria o pH desejado (4,5) ao se adicionar 4 mL de HCl 0,05 M do eluato de ⁶⁸Ga³⁺ ao frasco da reação. Essa condição foi estudada previamente no estudo pré-formulação com as soluções não radioativas e nesta etapa os resultados foram confirmados com a reação radioativa.

Os resultados obtidos, verificados por fitas de pH encontram-se descritos na **Tabela 11**. Dessa forma ficou estabelecido que o volume de tampão a ser utilizado é 1 mL de acetato de sódio 1,5 M pH 5,0, que ao acrescentar 4 mL de HCl 0,05 M, mantém o pH de reação desejado em 4,5.

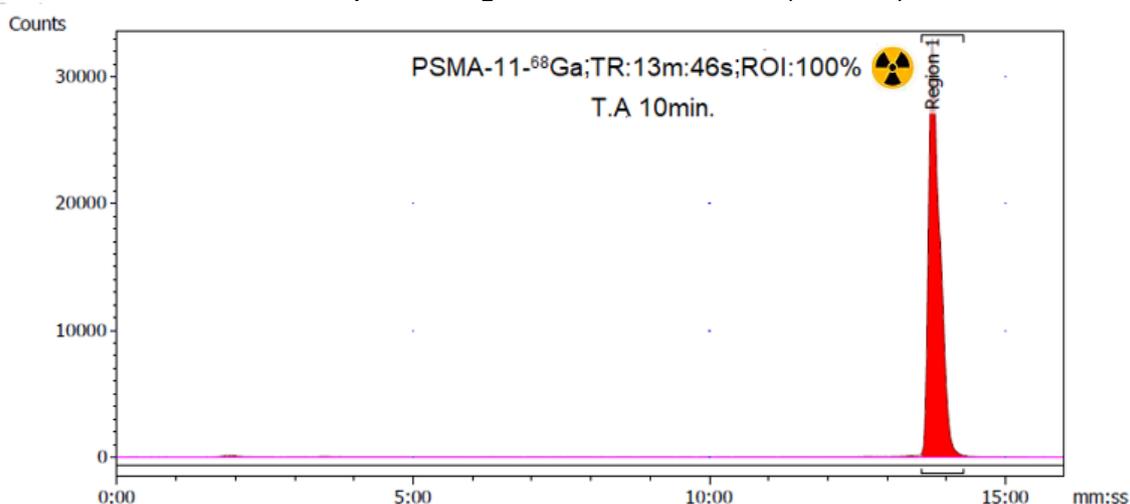
Tabela 11 – Resultados da confirmação do pH do tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M (1 mL) após adição de 4 mL de eluato do gerador ITG (HCl 0,05 M).

Tampão acetato de sódio (1 mL)	pH inicial	pH após a adição de 4 mL do eluato do gerador (HCl 0,05 M)
Acetato sódio de 1,5M	5,5	5,0
Acetato sódio de 1,5M	5,0	4,5
Acetato sódio de 1,5M	4,5	4,0

Fonte: autora da tese.

O próximo parâmetro avaliado foi a influência da temperatura na eficiência de radiomarcagem. Dessa forma, a marcação foi testada à temperatura ambiente, utilizando 20 µg de PSMA-11 (21,1 nmols) em tampão acetato de sódio 1,5 M em pH 5,0 com adição do eluato de $^{68}\text{Ga}^{3+}$ (388,13 MBq- 10,49mCi em 4 mL), 10 minutos de incubação. O resultado na **Figura 34** mostra que a reação realizada à temperatura ambiente por 10 minutos, garantiu uma complexação de 100% de ^{68}Ga , quando analisado por CLAE, com identificação de um único pico, correspondente ao produto de interesse.

Figura 34 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11- ^{68}Ga representativo da marcação em pH 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/min. Dentro da figura são descritos: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11- ^{68}Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

O pH da mistura reacional foi de 4,5 na fita de pH. No entanto, os resultados por CCD em citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 demonstraram pureza radioquímica de 97,8 % e em acetato de amônio/metanol 1;1, demonstraram pureza radioquímica de 97,3 %, identificando a presença de galio-68 livre em pequena porcentagem.

Quando analisado por CCD, a radiomarcção com aquecimento a 90 °C foi discretamente maior na eficiência de complexação do ⁶⁸Ga em relação à marcação realizada à temperatura ambiente, como pode ser observado nos dados organizados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) de PSMA-11-⁶⁸Ga: radiomarcção realizada com aquecimento a 90°C e em temperatura ambiente. (N = 3).

Temperatura de marcação	CLAE (%)	CCD (%) citrato de sódio 0,1M pH 5,0	CCD (%) acetato de amônio/metanol 1:1	Critério de aceitação CLAE e CCD (%)
90°C por 10 minutos	100,0	99,2±0,0	98,8±0,0	≥ 95,0
T.A por 10 minutos	100,0	97,8±0,0	97,3±0,0	≥ 95,0

*Nota: Os valores estão expressos como “média ± DP”: (N = 3) e (p > 0,05).

Fonte: autora da tese.

Tanto a condição de radiomarcção com aquecimento a 90 °C ou temperatura ambiente por 10 minutos garantem complexação de ⁶⁸Ga acima de 95 % e atendem ao critério de aceitação descrito na farmacopeia europeia para produção de PSMA-11-⁶⁸Ga (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2021a). Apesar da condição de aquecimento, demonstrar pureza radioquímica aparentemente maior, a diferença calculada a partir da média das radiomarcções para as duas condições utilizando teste t student não pareado não é significativa (P >0,05) (N=3).

Um estudo de Satpati e colaboradores (2016) para formulação de um kit de PSMA-11 reportou que a reação com aquecimento a 85 °C por 10 min para o seu kit aumentou o rendimento de pureza radioquímica de 94,0 % para 98,5 %. Nesta publicação também foi descrita a obtenção de picos “dobrados” nos perfis de CLAE quando as radiomarcções foram realizadas à temperatura ambiente, o que foi atribuído à presença de diastereoisômeros na mistura reacional. O

pesquisador descreveu que com o aquecimento a 85°C os dois diastereoisômeros são convertidos em um produto termodinamicamente mais estável levando a um pico único e acentuado no perfil de CLAE (SATPATI et al., 2016).

Diferente dos resultados obtidos por Satpati e colaboradores (2016), o rendimento de pureza radioquímica obtido para radiomacação realizada à temperatura ambiente foi superior a 95 % e foi observado pico único no perfil por CLAE, quando a análise ocorreu imediatamente após a reação. Todavia, os picos “dobrados” observado por Satpati e colaboradores (2016) no perfil por CLAE apareceram no estudo de estabilidade das formulações congeladas e liofilizada com o armazenamento das mesmas a -20 °C (desde o primeiro mês de armazenamento) e será discutido na seção a seguir, 7.3.3. Outros pesquisadores relataram obter pureza radioquímica superior a 95 % empregando temperatura ambiente. (BEHESHTI et al., 2018a) (KURASH et al., 2020).

Para o desenvolvimento da formulação do kit de PSMA-11 para pronta marcação, também foi estudada a influência da adição de manitol na obtenção do PSMA-11-⁶⁸Ga com a adição de 5 mg ou 20 mg de manitol ao frasco de reação.

O objetivo da adição de manitol seria fornecer massa para composição da pastilha liofilizada, sendo importante em casos em que concentrações muito baixas do ingrediente ativo são utilizadas, diminuindo o risco de perda de massa durante o processo de liofilização. A adição de um açúcar à formulação proteica também exerce efeito protetor da proteína diante do processo de liofilização.

Dessa forma, a marcação foi avaliada, utilizando 20 µg de PSMA-11 (21,1 nmols) em tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 com adição de 5 mg de manitol, acrescentando-se o eluato de ⁶⁸Ga³⁺ (111 MBq - 3 mCi em 4 mL), seguido de 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. Da mesma forma, a marcação também foi testada à temperatura ambiente, utilizando 20 µg de PSMA-11 (21,1 nmols) em tampão acetato de sódio 1,5 M em pH 5,0, porém com a adição de 20 mg de manitol e por fim do eluato de ⁶⁸Ga³⁺ (111 MBq- 3 mCi em 4 mL), 10 minutos de incubação.

Os resultados das análises por CCD apresentados na **Tabela 13**, mostram que não há interferência do manitol (5 mg ou 20 mg) na reação de complexação com ^{68}Ga . O pH das misturas reacionais foi de 4,5, determinado em fitas de pH para ambas as condições avaliadas. Quando analisado por CCD, a radiomarcção com adição de 5 mg demonstrou pureza radioquímica discretamente maior em comparação com a radiomarcção realizada com a adição de 20 mg de manitol, no entanto a diferença não foi significativa ($P > 0,05$).

Tabela 13 - Porcentagem de pureza radioquímica (CCD) do PSMA-11- ^{68}Ga acrescido de 5 mg ou 20 mg de manitol à formulação. Marcado com tampão acetato de sódio 1,5 M e pH 5,0 e com pH final da reação de 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (N = 3).

Condição de Marcação pH do tampão acetato de sódio 1,5M pH 5,0	CCD (%) citrato de sódio 0,1M pH 5,0	CCD (%) acetato de amônio/metanol 1:1	Critério de aceitação CCD (%)
Adição 5 mg manitol	98,5 ± 0,0	98,2 ± 0,0	≥ 95,0
Adição 20 mg manitol	98,2 ± 0,0	97,2 ± 0,0	≥ 95,0

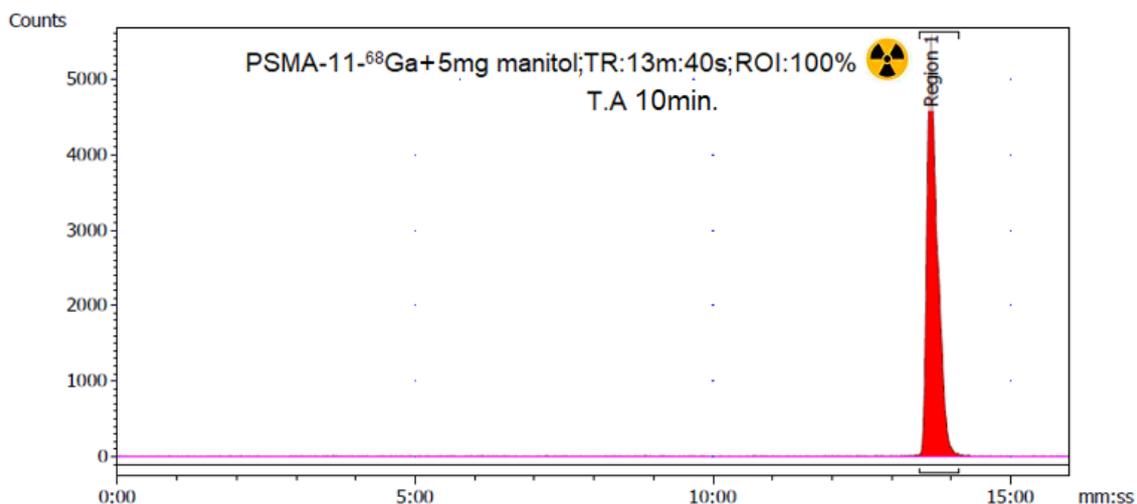
*Nota: Os valores estão expressos como “média ± DP”: (N = 3).

Fonte: autora da tese.

O resultado da avaliação por CLAE, **Figura 35**, corrobora que não há interferência do manitol (5 mg) na reação com ^{68}Ga . A radiomarcção realizada em temperatura ambiente por 10 minutos garantiu uma complexação de 100 % de ^{68}Ga , quando analisado por CLAE, com identificação de um único pico, correspondente ao produto de interesse.

O pH da mistura reacional foi de 4,5, determinado em fita de pH para a condição avaliada. Não houve alteração do tempo de retenção do PSMA-11- ^{68}Ga quando injetado concomitantemente com manitol neste perfil de CLAE e não foi observado pico “dobrado” para esta reação realizada a temperatura ambiente.

Figura 35 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga acrescido de 5 mg de manitol à formulação marcado em pH 4,5, Temperatura Ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters 250mm X 4,6. fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água ultrapura (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V) sob fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como uma porcentagem do total de área (ROI: %).

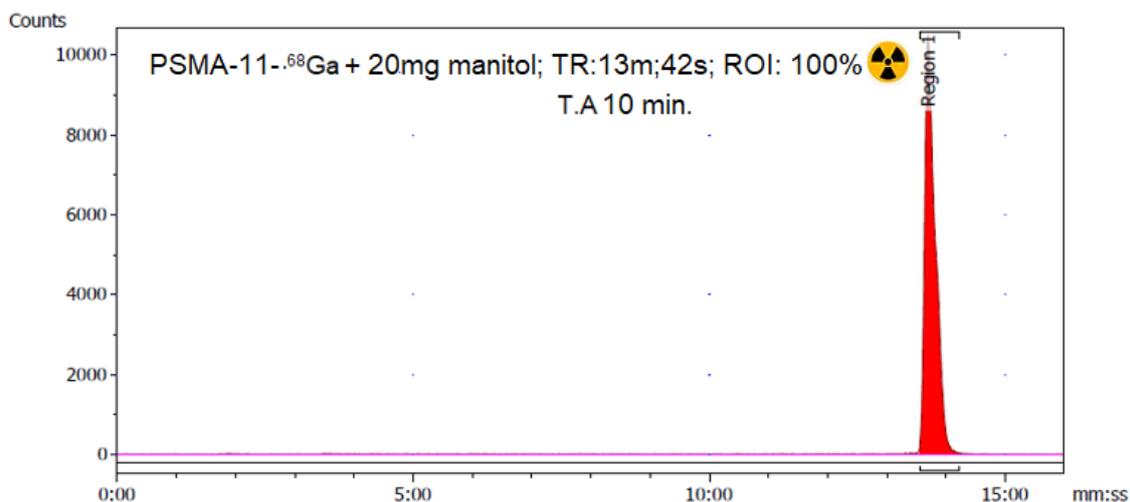


Fonte: autora da tese.

Do mesmo modo, o resultado na **Figura 36** mostra que não há interferência do manitol (20 mg) na reação com ⁶⁸Ga, quando avaliado por CLAE. A radiomarcagem a temperatura ambiente garantiu uma complexação de 100 % de ⁶⁸Ga, quando analisado por CLAE, com identificação de um único pico, correspondente ao produto de interesse. Não houve alteração do tempo de retenção do PSMA-11-⁶⁸Ga quando injetado concomitantemente com manitol neste perfil de CLAE e não foi observado pico “dobrado” para esta reação realizada a temperatura ambiente.

Figura 36 - Cromatograma de CLAE representativo do PSMA-11-⁶⁸Ga acrescido de 20 mg de manitol à formulação marcado em pH 4,5, Temperatura Ambiente (T.A) por 10 minutos (detector radioativo). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters 250mm X 4,6. fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água ultrapura (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V) sob fluxo

de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11-⁶⁸Ga como porcentagem do total de área (ROI: %).



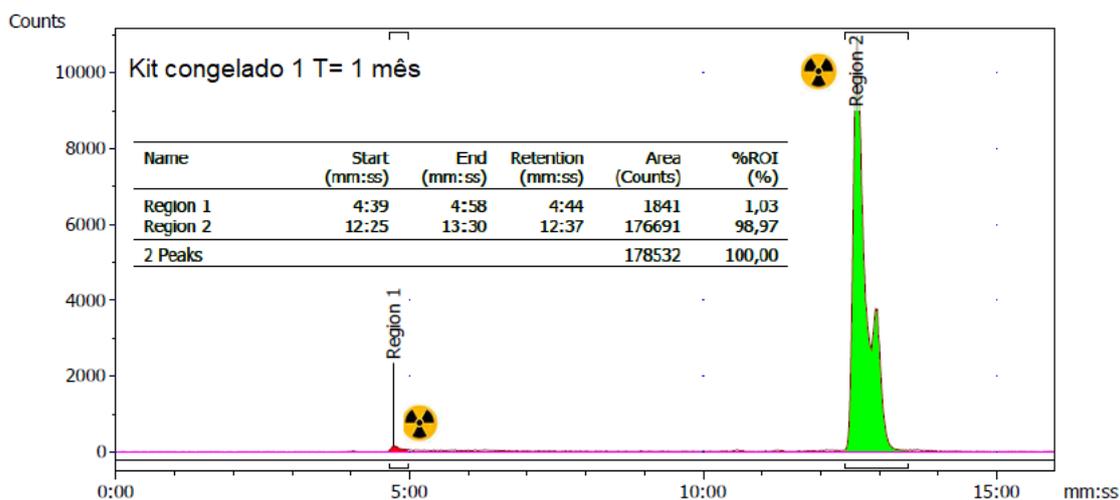
Fonte: autora da tese.

7.3.3 Estabilidade das formulações congeladas

A estabilidade das formulações congeladas propostas contendo 20 µg do peptídeo e tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 em frasco único (formulação 1 sem manitol e formulação 2 com 5 mg de manitol) foi avaliada mensalmente por um período total de 6 meses, a partir da radiomarcagem com atividade que variou entre 196,84 MBq e 58,09 MBq (5,32 mCi e 1,57 mCi) do primeiro ao sexto mês de avaliação. As reações ocorreram à temperatura ambiente por dez minutos e logo após foram avaliadas as purezas radioquímicas das formulações por CLAE.

Todas as análises por CLAE do estudo de estabilidade com os kits congelados (formulação 1 e 2) aparecem com o pico principal “dobrado” (do primeiro ao sexto mês de armazenamento) como pode ser observado em um perfil representativo na **Figura 37** (formulação 1) e **Figura 38** (formulação 2), ambas realizadas após 1 mês de armazenamento sob congelamento a – 20 °C.

Figura 37 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 congelado (formulação 1) após 1 mês de armazenamento sob congelamento a – 20 °C (T = 1 mês). Coluna Symmetry® C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11-⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).

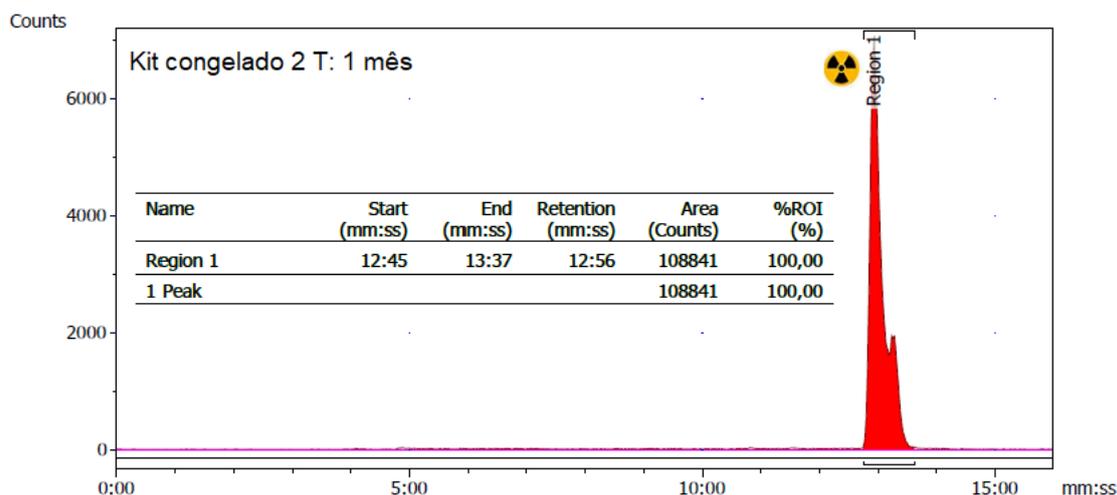


Fonte: autora da tese.

O pico principal “dobrado” pode ser observado uma vez que os dois principais diastereoisômeros não são separados quimicamente por CLAE. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade do presente trabalho corroboram dados da literatura sobre formação de frações de diferentes diastereoisômeros na mistura reacional de PSMA-11-⁶⁸Ga. Ou seja, ao final de cada reação obtêm-se uma mistura de diastereoisômeros cuja proporção de frações termodinamicamente mais e menos estáveis dependem de condições de temperatura e pH (HENNRICH; EDER, 2021).

Uma pequena fração do diastereoisômero termodinamicamente menos estável também está presente na mistura reacional mesmo nas marcações realizadas com aquecimento, por exemplo 95 °C (SATPATI et al., 2016) (HENNRICH; EDER, 2021).

Figura 38 - Pureza radioquímica do kit PSMA-11 congelado 2 (detector radioativo) durante estudos de estabilidade após 1 mês de congelamento sob congelamento a -20°C ($T = 1$ mês). Coluna Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 ^{68}Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).

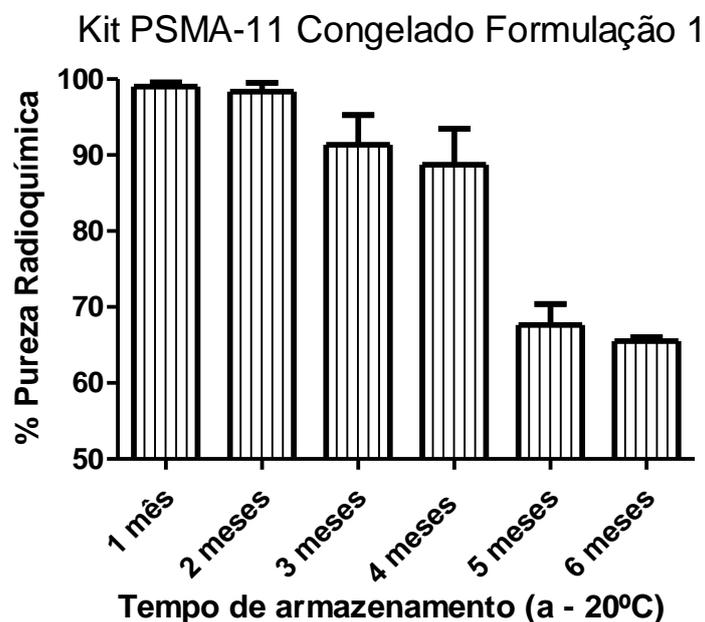


Fonte: autora da tese.

As **Figura 39 e 40** demonstram as porcentagens de pureza radioquímica de marcações de kit de PSMA-11 congelado, respectivamente para formulação 1 e formulação 2, determinadas durante um período de 6 meses.

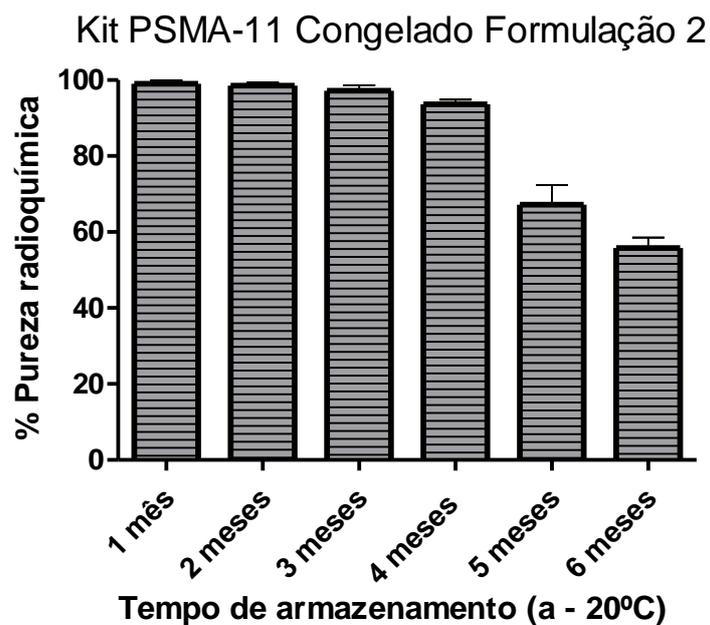
O estudo de estabilidade conduzido por CLAE demonstrou que é possível obter a radiomarcagem das duas formulações congeladas a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (em frasco único com tampão acetato de sódio de marcação, com e sem manitol) com $\text{PR} > 95\%$ e pH de 4,5 do produto final por um período de 4 meses. O impacto sobre a formação de diastereoisômeros na mistura reacional na ligação ao receptor de membrana (principalmente na condição de marcação em temperatura ambiente) será discutido adiante na seção 7.3.4.

Figura 39 - Porcentagem de pureza radioquímica da marcação do kit de PSMA-11 congelado (formulação 1) determinada durante um período de 6 meses.



Fonte: autora da tese.

Figura 40 - Porcentagem de pureza radioquímica da marcação do kit de PSMA-11 congelado (formulação 2) determinada durante um período de 6 meses.



Fonte: autora da tese.

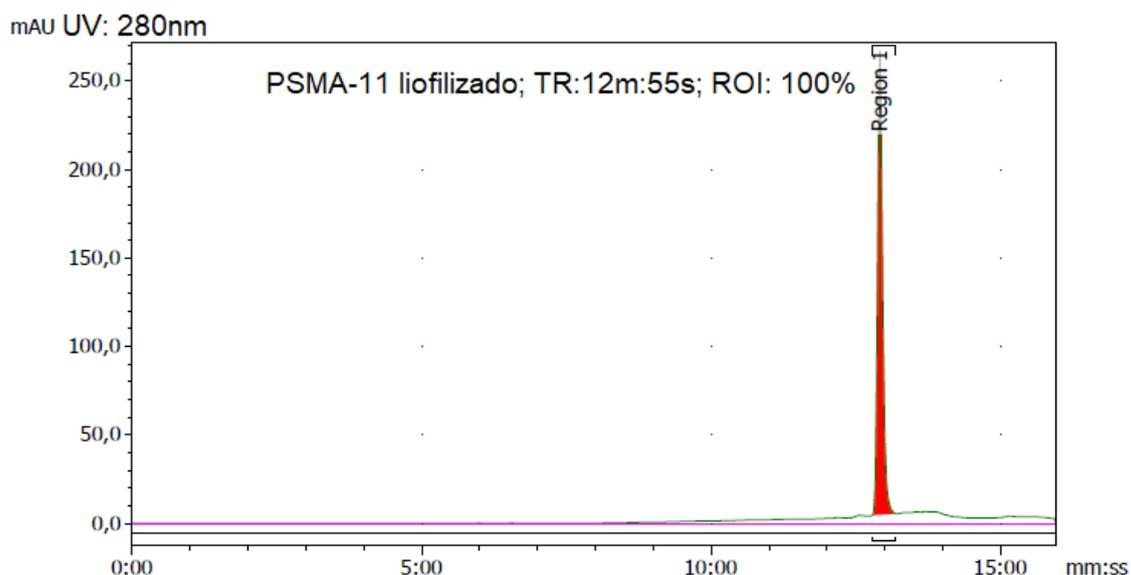
Nesta etapa do estudo de estabilidade dos kits congelados observou-se também alterações nos tempos de retenção do PSMA-11-⁶⁸Ga nas análises por CLAE. É reportado na literatura que esse tipo de alteração está relacionado à problema típico de obstrução na entrada da coluna (JOSÉ; NETO, [s.d.]).

Pode ter ocorrido uma sobrecarga de amostra uma vez que a formulação 2 continha manitol. Com os resultados obtidos conclui-se que é possível preparar um kit de PSMA-11 contendo em frasco único 20 µg do peptídeo e o tampão de radiomarcagem e manter o kit sob congelamento – 20 ± 5 °C. Entretanto, o kit congelado requer maiores cuidados em garantir as condições de temperatura adequada (– 20 ± 5 °C) durante o transporte e no local onde o kit será utilizado, justificando os estudos para liofilização do kit de PSMA-11 e avaliação da estabilidade do produto liofilizado.

7.3.4 Radiomarcção do kit de PSMA-11 liofilizado

A integridade da estrutura química do peptídeo PSMA-11 liofilizado (sem a presença de manitol e nas mesmas condições de liofilização descritas na tabela 4 da seção 6.2.3, foi confirmada por CLAE e pode ser observado um pico único e acentuado na **Figura 41**.

Figura 41 - Perfil de CLAE (UV:280nm) análise da integridade do peptídeo PSMA-11 após ciclo de liofilização (descrito na seção 6.2.3). Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-11 liofilizado como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

A radiomarcção direta do kit de PSMA-11 liofilizado com o eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador ITG foi avaliada imediatamente após a liofilização, com 40 dias e 75 dias de armazenamento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados de PR foram $> 95\%$ por CLAE e CCD nas análises imediatamente realizadas após liofilização e após 40 dias de armazenamento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Nas análises realizadas por CLAE e CCD após 75 dias de armazenamento a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a pureza radioquímica foi $< 95\%$ (N=1).

Os resultados destas avaliações de radiomarcção estão apresentados na **Tabela 14**. Para a marcação, o kit liofilizado PSMA-11 formulado com manitol

(20 mg) foi tamponado com 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0, seguido da adição de 4,0 mL do eluato de gerador ITG eluído com solução de HCl 0,05 M (cerca de 223,8 MBq/ 6,0 mCi). Todas as reações ocorreram em temperatura ambiente durante 10 minutos e o pH final da mistura reacional foi sempre de 4,5 (N=1).

Tabela 14 – Porcentagem de pureza radioquímica (CLAE e CCD) do kit PSMA-11 marcado com gálio-68 imediatamente, após 40 dias e 75 dias decorridos da liofilização (armazenamento a – 20 °C). pH final da reação de 4,5, temperatura ambiente (T.A) por 10 minutos (N = 1; média triplicata das fitas).

Tempo decorrido após liofilização	CLAE (%)	CCD (%) acetato de amônio/metanol 1:1	Critério de aceitação CCD (%)
Imediatamente	99,8	98,7 ± 0,0	≥ 95,0
40 dias	99,8	98,7 ± 0,0	≥ 95,0
75 dias	95,5	90,5 ± 0,0	≥ 95,0

Fonte: autora da tese.

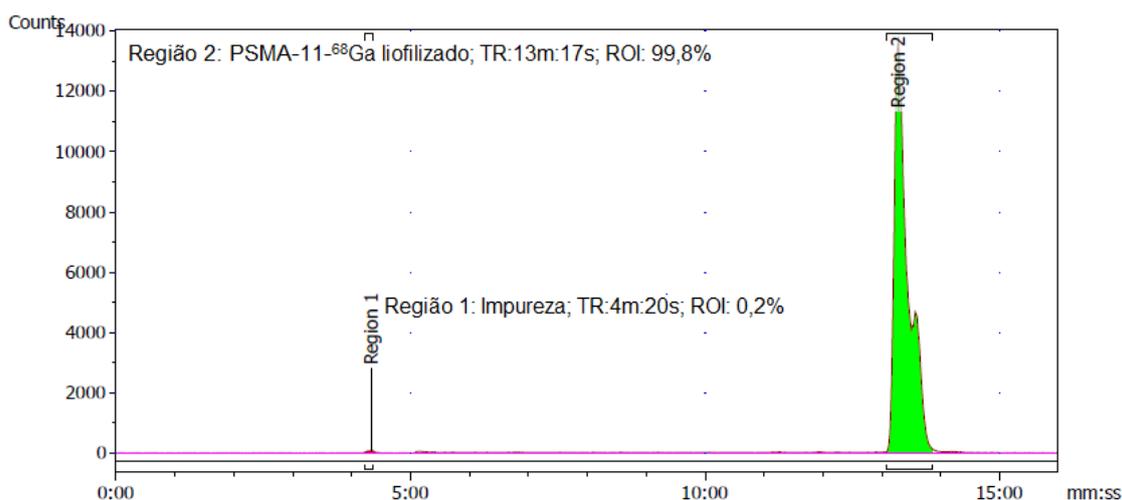
O resultado do estudo de estabilidade com a formulação liofilizada com manitol e armazenamento a – 20 °C mostrou estabilidade no período avaliado de 40 dias. O estudo de estabilidade descrito por Satpati e colaboradores (2016) para um kit PSMA-11 formulado em frasco único com tampão acetato de sódio 1,5 M e armazenado a 0 °C, apresentou estabilidade por seis meses (SATPATI et al., 2016). Chamou atenção neste trabalho que o autor não discutiu a questão da alteração do pH do tampão durante o processo de liofilização. Por outro lado, empregou condições de liofilização na etapa de congelamento bastante extremas, de -70 °C, condição esta impraticável na operação dos liofilizadores do IPEN.

Vale ressaltar que o estudo de estabilidade da formulação liofilizada de PSMA-11 com manitol foi realizado em apenas 1 lote e utilizando 1 frasco para marcação em cada tempo avaliado. O estudo de estabilidade deverá ser repetido para, pelo menos, 3 lotes do kit de PSMA-11 liofilizado com manitol e com intervalos de tempo menores de avaliação, para determinar o prazo de validade

do kit liofilizado. Outro ponto importante que o novo estudo de estabilidade deverá contemplar, é a marcação com atividades elevadas do eluído do gerador, de modo a determinar a estabilidade para a atividade máxima de marcação.

Foram obtidos picos “dobrados” nos perfis de CLAE das radiomarcações realizadas à temperatura ambiente com o kit liofilizado, de forma semelhante às radiomarcações realizadas à temperatura ambiente com os kits congelados. A **Figura 42** corresponde ao perfil por CLAE da marcação realizada com o kit liofilizado imediatamente após liofilização.

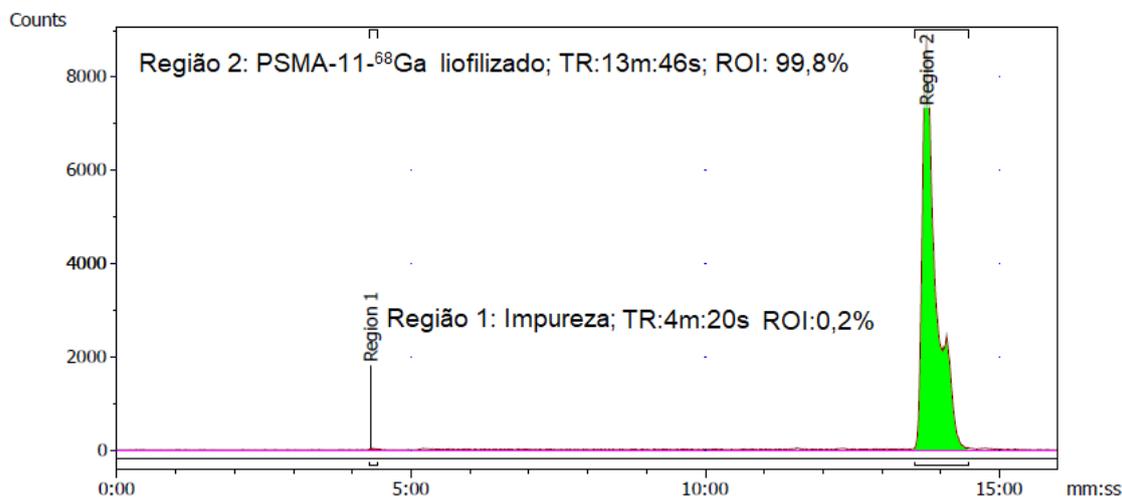
Figura 42 – Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 imediatamente após liofilização. Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 -⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

A **Figura 43** corresponde ao perfil por CLAE da marcação realizada com o kit liofilizado após 40 dias da liofilização.

Figura 43 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 40 dias após liofilização. Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 -⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).



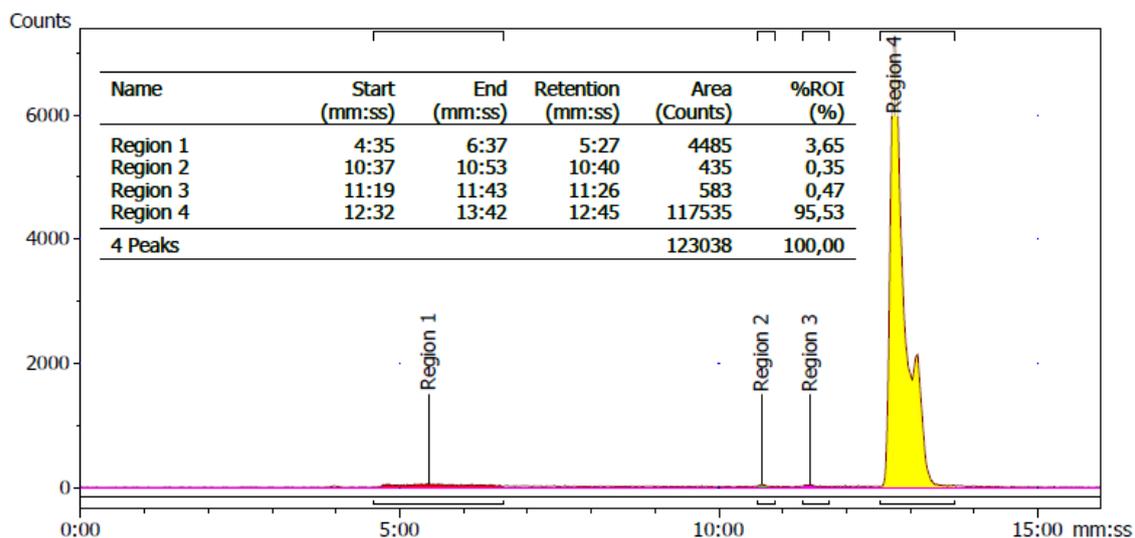
Fonte: autora da tese.

A presença de manitol no meio de marcação não interferiu na ligação do galio-68 ao PSMA-11, conforme demonstram os resultados dos estudos de CLAE da formulação congelada ou liofilizada.

Está documentado na literatura que o quelante radiometal acíclico HBED-CC representa um agente complexante altamente eficaz, principalmente para marcação com ⁶⁸Ga à temperatura ambiente, de anticorpos e proteínas. Os resultados obtidos do presente trabalho com relação a % de pureza radioquímica da formulação liofilizada estão de acordo aos descritos na literatura de que o PSMA-11 pode ser marcado em menos de 2 minutos com rendimento radioquímico de 99 % à temperatura ambiente e com pH em torno de 4,0 (EDER et al., 2014). Os resultados das radiomarcações obtidas com rendimento > 99 % à temperatura ambiente estão em conformidade com o conceito de kit para pronta marcação.

A **Figura 44** corresponde ao perfil por CLAE da marcação realizada com o kit liofilizado após 75 dias da liofilização.

Figura 44 - Cromatograma de CLAE do PSMA-11-⁶⁸Ga obtido a partir da marcação do kit PSMA-11 75 dias após liofilização. Coluna Symmetry[®] C18, 5µm, Waters, fase móvel (A): água ultrapura (0,1 % TFA), fase móvel (B): acetonitrila (0,1 % TFA) e fluxo de 0,6 mL/ min (detector radioativo). Na tabela dentro da figura são relatadas áreas relativas ao PSMA-11 -⁶⁸Ga e impurezas como porcentagens do total de áreas (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Os resultados obtidos do presente trabalho com relação aos perfis de CLAE com picos “dobrados” dos kits radiomarcados à temperatura ambiente também estão de acordo com as referências encontradas na literatura (HENNRICH; EDER, 2021) (SATPATI et al., 2016).

Eder e colaboradores (2021) descreve que a síntese realizada com aquecimento aproximadamente de 95 °C, resulta na formação predominante da molécula termodinamicamente mais estável e as avaliações comprovaram estabilidade de pelo menos 3 h no tampão de radiomarcção. O diastereoisômero menos estável se converte no termodinamicamente mais estável rapidamente em poucas horas em pH 4 (aproximadamente 3 horas de acordo com a literatura). No entanto, a neutralização da mistura reacional (pH 7,0) resultou em uma interconversão muito mais lenta (muitos dias) (HENNRICH; EDER, 2021).

De acordo com o mesmo autor, uma fração de aproximadamente 50 % do diastereoisômero termodinamicamente menos estável na mistura reacional não reduz a captação celular específica ao PSMA (ligação) e dessa forma, não tem

qualquer influência negativa na qualidade das imagens PET (HENNRICH; EDER, 2021).

Para a radiomarcagem do kit de PSMA-11 liofilizado com o gálio-68 obtido do gerador GalliaPharm Eckert & Ziegler os parâmetros avaliados foram o processo de pré-purificação do eluato do gerador e o pH do tampão acetato de sódio 1,5 M (pH 5,0 e 4,5). Todas as marcações foram realizadas à temperatura ambiente pelo tempo de 10 minutos. A pureza radioquímica da marcação foi avaliada por CCD utilizando o eluato purificado ou eluato não purificado e foi > 95 % para as duas condições (N=1). Dessa forma, não foram observadas diferenças na pureza radioquímica ao comparar as duas condições (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Pureza radioquímica da marcação de kit liofilizado de PSMA-11 com 3,5 mL (43,03 GBq) de solução de $^{68}\text{GaCl}_3$ eluída de Gerador Eckert & Ziegler com solução de HCl 0,1M. Marcação à temperatura ambiente por 10 minutos Análise por radio-CCD scanner. CCD (%): acetato de amônio/metanol 1:1. (N=1).

Precursor PSMA-11	Parâmetro avaliado	pH final	CCD (%)	Critério de aceitação CCD (%)
Kit liof. ^[1]	Tampão pH 5,0 ^[2]	4,0	100,0 ± 0,0	≥ 95,0
Kit liof. ^[1]	Tampão pH 4,5 ^[3]	4,0	100,0 ± 0,0	≥ 95,0
Kit liof. ^[1]	Eluato purificado	4,0	100,0 ± 0,0	≥ 95,0
Kit liof. ^[1]	Eluato não purificado	4,0	100,0 ± 0,0	≥ 95,0

^[1] Kit liofilizado - 20µg PSMA-11/20mg manitol

^[2] Tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 5,0

^[3] Tampão acetato de sódio 1,5 M, pH 4,5

Fonte: autora da tese.

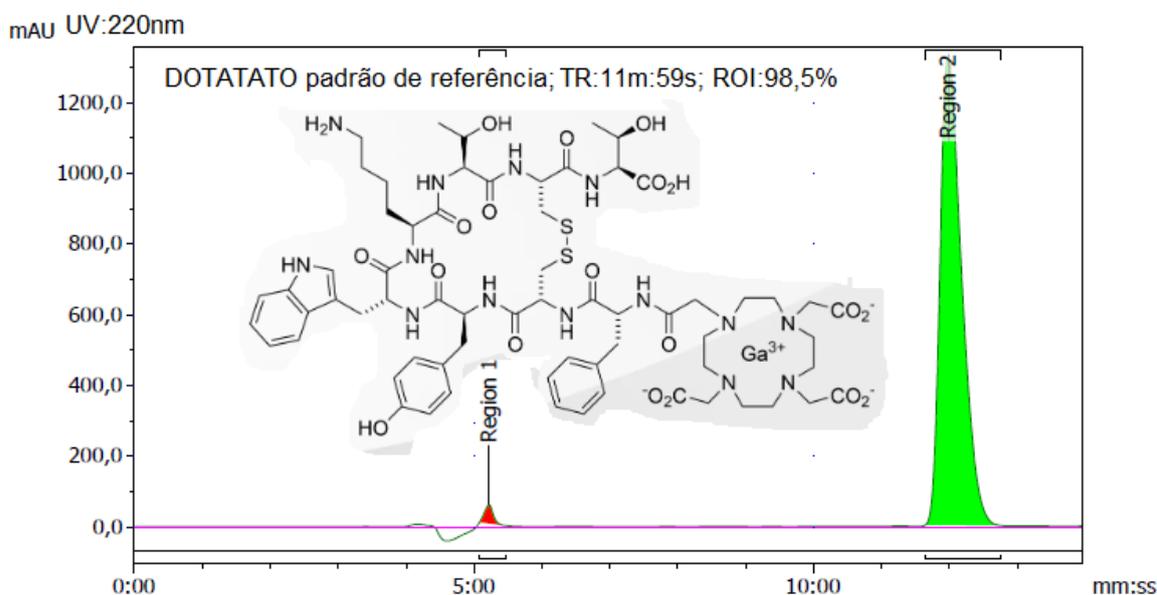
A marcação do kit com gálio-68 também foi avaliada pela adição de 1 mL de tampão acetato de sódio 1,5 M pH 5,0 ou 4,5. Em seguida, foi adicionado a metade do volume de eluição de $^{68}\text{GaCl}_3$ em HCl 0,1 M para testar cada condição (cerca de 43,03 GBq/ 11,63 mCi em 3,5 mL). O resultado da PR foi > 95% para as duas condições (N=1). Dessa forma também não foram observadas diferenças na pureza radioquímica ao comparar as duas condições. O valor de pH da solução de marcação radioativa de PSMA-11 foi sempre de 4,0 no frasco final.

A marcação do kit liofilizado desenvolvido no presente trabalho foi eficaz utilizando eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ de gerador Eckert & Ziegler pré-purificado ou sem purificação, sem qualquer diferença na porcentagem de pureza radioquímica. Da mesma forma, a marcação do kit liofilizado foi eficaz utilizando tampão acetato de sódio na concentração 1,5 M pH 4,5 ou 5,0. Os resultados obtidos estão de acordo com o reportado na literatura para a avaliação dos mesmos parâmetros (SATPATI et al., 2016).

7.3.5 Radiomarcagem do DOTATATO com ^{68}Ga

A padronização das análises iniciou-se pela determinação do tempo de retenção do padrão de referência do DOTATATO (1502,32 g/mol), cujo resultado foi de 11m:59s, **Figura 45**.

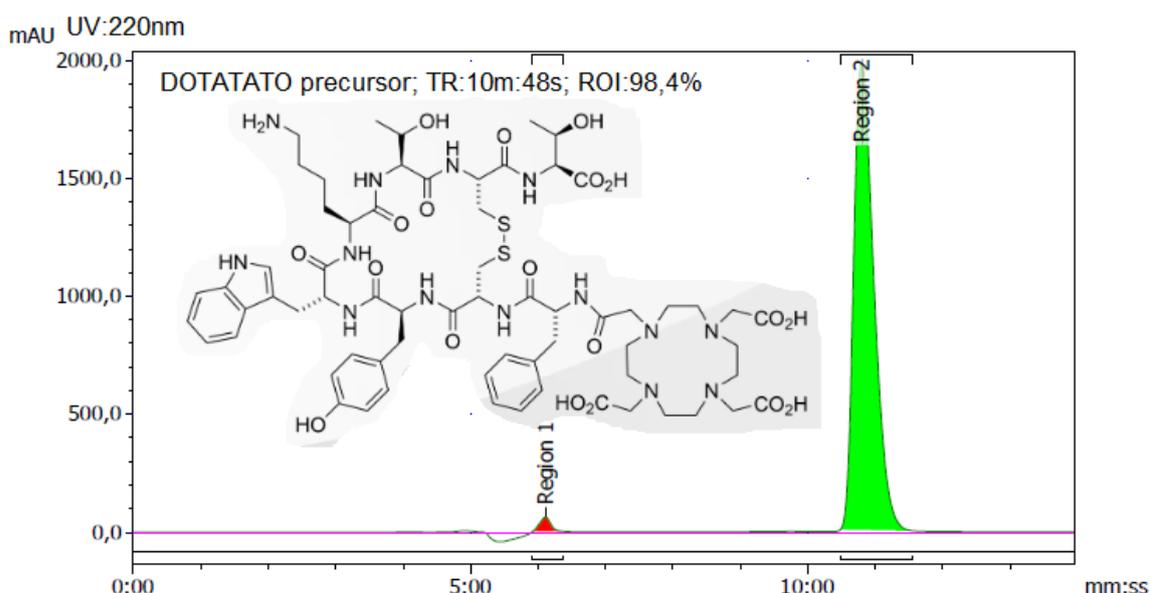
Figura 45 - Cromatograma do padrão de referência do DOTATATO (detector UV:220nm). As condições de CLAE utilizadas foram: fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO padrão de referência como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Na **Figura 46**, observa-se a integridade do peptídeo precursor DOTATATO (1435,63 g/mol), cujo tempo de retenção nas condições descritas foi de 10m:48s. As análises foram realizadas de acordo com a monografia para a solução de “Gallium (^{68}Ga) Edotreotide” injetável descrita na Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0, 2021b).

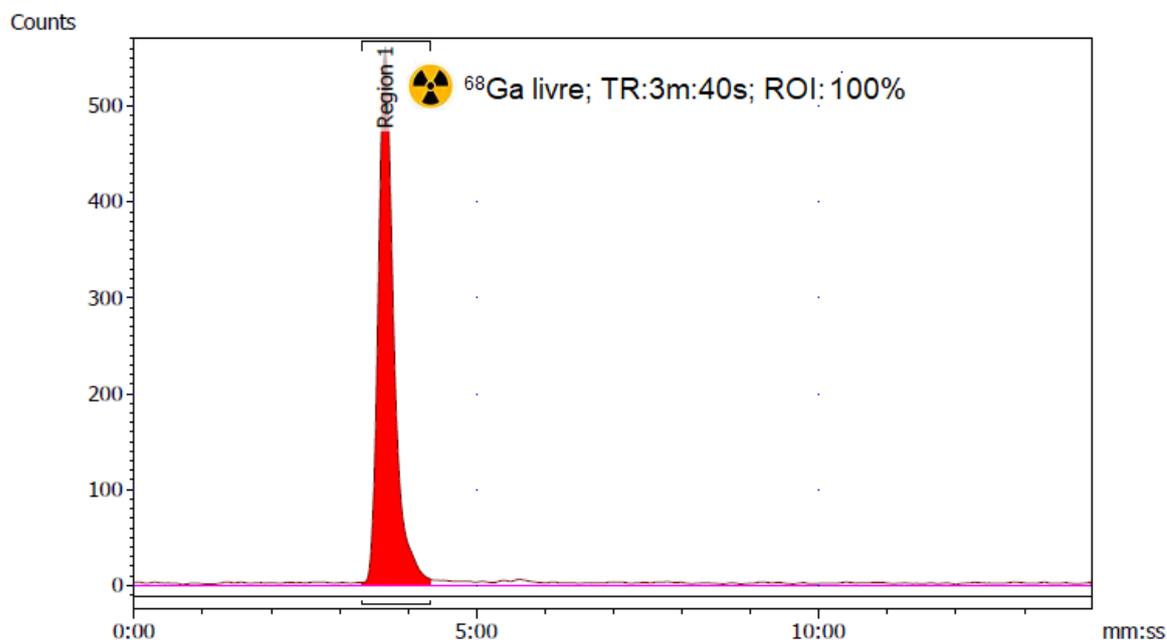
Figura 46 – Cromatograma do precursor DOTATATO (detector UV:220nm). As condições de CLAE utilizadas foram fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO precursor como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Também foi determinado o tempo de retenção do radionuclídeo ^{68}Ga livre (TR: 3m:40s), obtido a partir do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ITG (Alemanha), no mesmo sistema cromatográfico (**Figura 47**).

Figura 47 – Cromatograma do ^{68}Ga livre (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram fase móvel (A): ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ^{68}Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %).



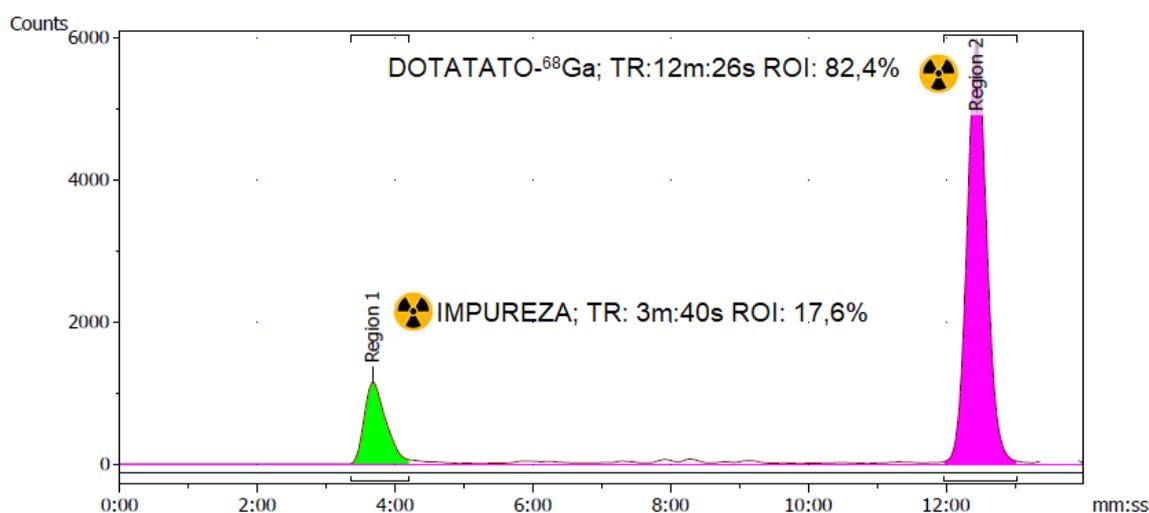
Fonte: autora da tese.

Várias tentativas de radiomarcção do DOTATATO foram realizadas utilizando eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ obtido a partir de um gerador da ITG (Alemanha) e tampão acetato de sódio 1,5 M, em diferentes pH, para obter DOTATATO- ^{68}Ga .

A primeira vez em que se obteve o DOTATATO- ^{68}Ga ocorreu quando reduziu-se o pH do tampão acetato de sódio 1,5 M de 5,0 para 3,0, mesmo assim uma porcentagem pequena do radiofármaco (25%) foi obtida. Ao utilizar tampão acetato de sódio 1,5 M pH entre 4,0 e 5,5, a reação de complexação não ocorreu. Após revisão da literatura e redução da concentração do tampão acetato de sódio para 0,25 M pH 3,0 e 4,0, o produto de interesse foi obtido em maior porcentagem, 44 e 66% respectivamente (CHAKRAVARTY; CHAKRABORTY; RADHAKRISHNAN; KAMALESHWARAN *et al.*, 2017). Porém, o melhor resultado obtido foi de 82,43 % de pureza radioquímica do DOTATATO- ^{68}Ga , avaliado por CLAE (**Figura 48**), quando se utilizou tampão acetato de sódio 0,25 M pH 4,0, 40% V/V de etanol absoluto, aquecimento a 95 °C por 30 minutos.

Após a reação de radiomarcagem, obteve-se uma solução límpida com atividade de aproximadamente 100 MBq e pH entre 1,0 e 2,0.

Figura 48 – Cromatograma DOTATATO-⁶⁸Ga marcado em tampão acetato de sódio 0,25 M pH 4,0, 40% V/V de etanol absoluto, aquecimento a 95 °C por 30 minutos (pH final entre 1,0 e 2,0) (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram: fase móvel (A) ácido trifluoroacético, água purificada (0,1: 99,9 V/V), fase móvel (B): ácido trifluoroacético, acetonitrila (0,1: 99,9 V/V), coluna cromatográfica Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm e fluxo de 0,6 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao DOTATATO-⁶⁸Ga e ⁶⁸Ga livre como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Este resultado foi confirmado por CCD, em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, com pureza radioquímica de 84 %. Este resultado pode ser atribuído à redução na concentração do tampão, redução do pH de marcação, utilização do etanol como *scavenger* e aumento no tempo de reação como fatores que contribuíram para aumentar a pureza radioquímica da reação. Chegou-se à conclusão de que para se obter o DOTATATO-⁶⁸Ga com elevada pureza radioquímica, há necessidade de realização de uma etapa de purificação após a reação, utilizando um cartucho de purificação do tipo C18, em detrimento do rendimento da reação. Neste caso, a proposta do kit para pronta marcação foi descartada para o DOTATATO.

Ao longo dos estudos de radiomarcção foi demonstrado que o PSMA-11-⁶⁸Ga pode ser obtido com pureza radioquímica > 95 % utilizando diretamente o eluato de ⁶⁸GaCl₃ do gerador ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga grau BPF e com pH da formulação final de 4,5. Foi demonstrado também que o PSMA-11-⁶⁸Ga pode ser obtido com pureza radioquímica satisfatória utilizando aquecimento ou em condições de temperatura ambiente e sem necessidade de purificação do produto de interesse final. Isso torna mais simples e prático a radiomarcção no ambiente da radiofarmácia hospitalar, com 100 % de rendimento, sem perdas por processo de purificação.

Os mesmos resultados de pureza radioquímica não foram observados para o DOTATATO-⁶⁸Ga, tendo sido obtido com PR de 82,43% (CLAE) quando se utilizou etanol absoluto na formulação com a finalidade de melhorar a solubilidade do peptídeo e prevenir radiólise durante a marcação.

Concluiu-se que para obtenção do DOTATATO-⁶⁸Ga com PR > 95% é necessária uma etapa de purificação utilizando cartucho C18 após reação de marcação. Para que a reação ocorra entre o peptídeo DOTATATO e o gálio-68 é necessário aquecimento, concentração do tampão acetato de sódio e pH menores do que o tampão utilizado para reação com o PSMA-11. Essas conclusões são reforçadas pelos dados encontrados na literatura e mencionadas a seguir.

A necessidade de purificação pós marcação do DOTATATO-⁶⁸Ga desencorajou o desenvolvimento de uma formulação liofilizada para pronta marcação de análogo de somatostatina com gálio-68, sendo mais conveniente a marcação em módulo de síntese, na qual a pré-purificação do eluato do gerador, bem como a purificação do produto radiomarcado podem ser realizadas de forma automatizada, minimizando a exposição dos operadores à radiação.

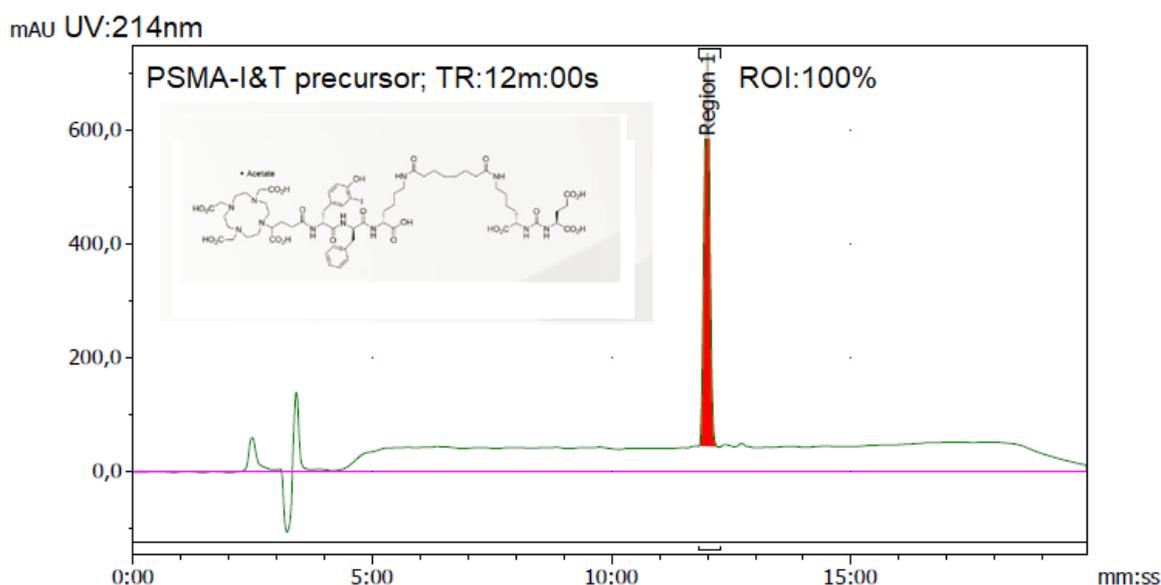
O kit comercial NETSPOT® (mencionado na seção 3.10.2.2) para marcação de DOTATATO com gálio Ga-68 é composto por dois frascos e um cartucho de purificação (acessório). Um frasco contém 40 µg do DOTATATO liofilizado e em frasco separado o tampão. O fabricante recomenda purificação do eluato do gerador Eckert & Ziegler através do cartucho acessório antes da radiomarcção. A reação ocorre com aquecimento 95 °C por 7 minutos e na faixa de pH entre 3,2 e 3,8 (MUKHERJEE et al., 2014a).

O kit com uma mistura de análogos de somatostatina proposto por Das Tapas e colaboradores (2014) requer pré-purificação do eluato de $^{68}\text{GaCl}_3$ do gerador Eckert & Ziegler com uma coluna de troca catiônica Strata™ X-C e pós-purificação após reação com uma coluna de fase reversa Sep-Pak® C-18. O preparo requer aquecimento em banho-maria (100 °C) por 15 minutos. O kit foi formulado em frasco único contendo a mistura de peptídeos e tampão acetato de sódio 1 M pH 4,0 (DAS et al., 2014).

7.3.6 Radiomarcagem do PSMA-I&T com ^{177}Lu

Foi realizada a padronização das condições de análise da radiomarcagem do peptídeo PSMA-I&T para a verificação da integridade do peptídeo e determinação da porcentagem da pureza radioquímica. Na **Figura 49** observa-se o cromatograma de CLAE do peptídeo precursor PSMA-I&T, cujo tempo de retenção foi de 12 minutos.

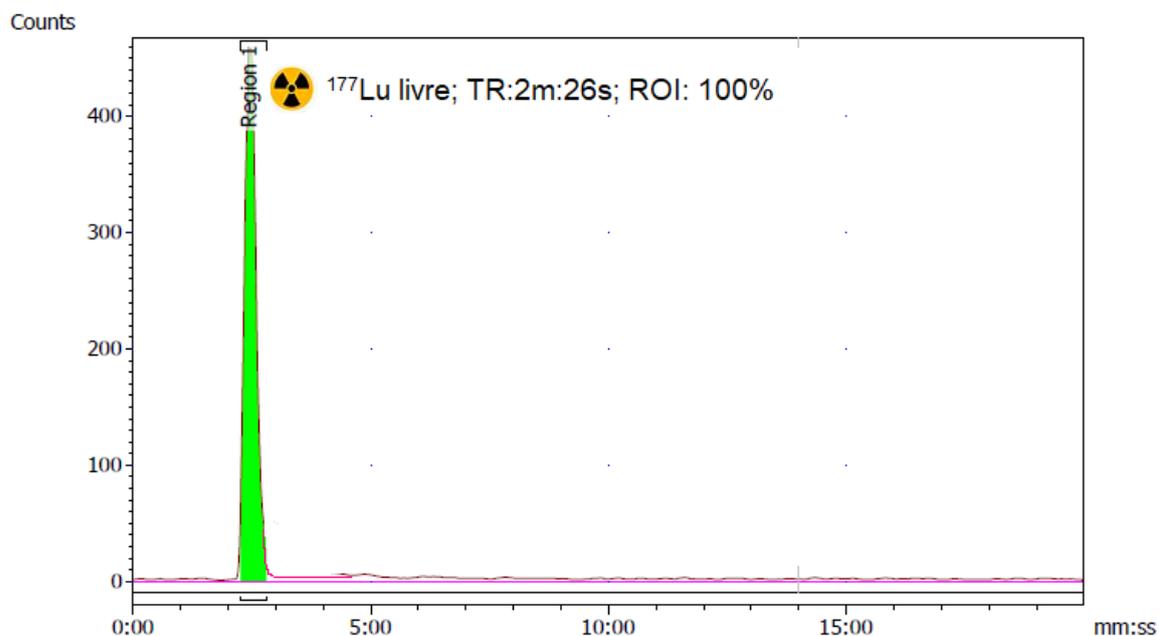
Figura 49 - Cromatograma do precursor PSMA-I&T (detector UV:214nm). As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry® C18, 5 μm , Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao PSMA-I&T precursor como porcentagem do total de área (ROI: %).



Fonte: autora da tese.

Na **Figura 50** observa-se o tempo de retenção (2m:26s) do radionuclídeo ^{177}Lu obtido da empresa Isotopia (Israel), para o mesmo sistema cromatográfico.

Figura 50 – Cromatograma ^{177}Lu livre (detector radioativo). As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry[®] C18, 5 μm , Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila/0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Dentro da figura são relatados: tempo de retenção (TR: m:s) e a área relativa ao ^{177}Lu livre como uma porcentagem do total de área (ROI: %).

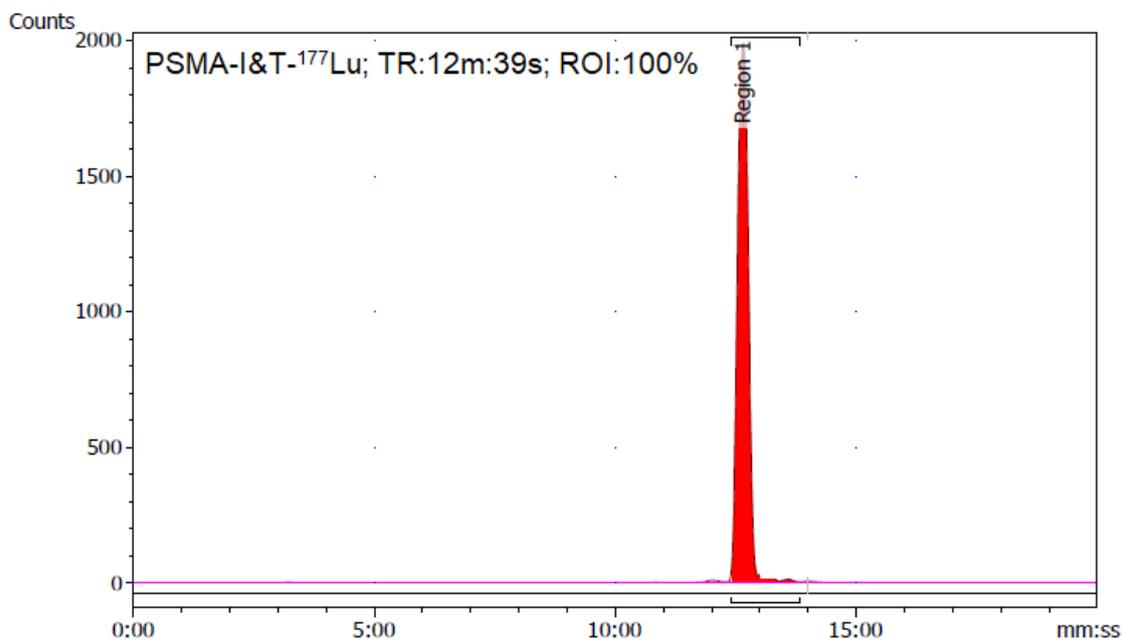


Fonte: autora da tese.

A radiomarcagem para obtenção do radiofármaco PSMA-I&T- ^{177}Lu foi baseada em diversas referências bibliográficas com algumas modificações (WEINEISEN et al., 2014b), (WEINEISEN et al., 2015), (RUIGROK et al., 2019), (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022).

Para completa complexação do ^{177}Lu ao peptídeo, 429,2 MBq de ^{177}Lu (AE= 718,9 GBq/mg) reagiu com um excesso molar de PSMA I&T, em tampão ascorbato de sódio 0,52 M, produzindo PSMA I&T- ^{177}Lu com pH 4,7 e pureza radioquímica de 100 % determinada por CLAE com identificação de um único pico, correspondente ao produto de interesse, **Figura 51** e confirmada por CCD (99,9 %).

Figura 51 - Perfil de análise por CLAE do radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu. As condições de CLAE utilizadas foram: coluna Symmetry® C18, 5 µm, Waters 250 X 4,6 mm, fase móvel: (A) água purificada (0,1% TFA) e (B) Acetonitrila 0,1%TFA e fluxo de 1 mL/minuto. Tempo de retenção (TR) de 12m:39s e pureza radioquímica de 100 % (ROI).



Fonte: autora da tese.

O próximo passo consistiu em utilizar este radiofármaco para avaliar a integridade biológica do PSMA-11 liofilizado, em estudos de competição em modelos tumorais *in vivo* e em ensaios *in vitro*.

7.4 Ensaios de ligação *in vitro*

Os ensaios de ligação *in vitro* fornecem informações sensíveis e quantitativas sobre a afinidade de ligação de radioligantes à receptores de membrana acoplados à proteína G e são estudos essenciais para a pesquisa básica e desenvolvimento de novas drogas (FLANAGAN, 2016).

Nos experimentos de ligação, um parâmetro importante a ser calculado é o K_d que é a constante de equilíbrio de dissociação e uma medida da força de interação de um ligante com seu receptor. Por definição, o K_d é a concentração de ligante que vai ocupar 50 % dos receptores. O segundo parâmetro que pode ser calculado é a densidade máxima de receptores ou B_{max} . A maioria dos peptídeos normalmente se liga com constantes de afinidade na faixa de picomol (pmol) com densidades de receptor na faixa de femtomol-picomol (fmol – pmol) (MAGUIRE; KUC; DAVENPORT, 2012).

O protocolo básico para um ensaio de ligação é preparar a cultura de tecido ou células contendo o receptor alvo, e incubar com o ligante radiomarcado por tempo e temperatura definidos para atingir o equilíbrio (FLANAGAN, 2016). Na literatura são descritos três tipos de ensaios: cinética de ligação, saturação e competição. Experimentos de cinética de ligação tem por finalidade medir as taxas de associação do radioligante aos receptores ou dissociação do radioligante dos receptores e com isso pode-se determinar as condições ideais (tempo de incubação) para os experimentos. Nos experimentos de saturação, tecidos ou cultura de células são incubados com concentrações crescentes do radioligante. Análises utilizando softwares, como o Graphpad Prism, e regressão não linear medem a afinidade do ligante radiomarcado por um receptor (constante de dissociação de equilíbrio, K_d) e densidade do receptor (B_{max}). A afinidade e seletividade são determinadas por meio de um ensaio de competição, onde um ligante não radiomarcado compete pela ligação ao receptor com uma concentração fixa de um ligante radiomarcado (MAGUIRE; KUC; DAVENPORT, 2012).

O objetivo principal da etapa de avaliação biológica deste trabalho consistiu em avaliar a integridade do peptídeo PSMA-11 após ciclo de liofilização, quanto à propriedade de ligação aos receptores tumor-específicos por meio do ensaio de competição.

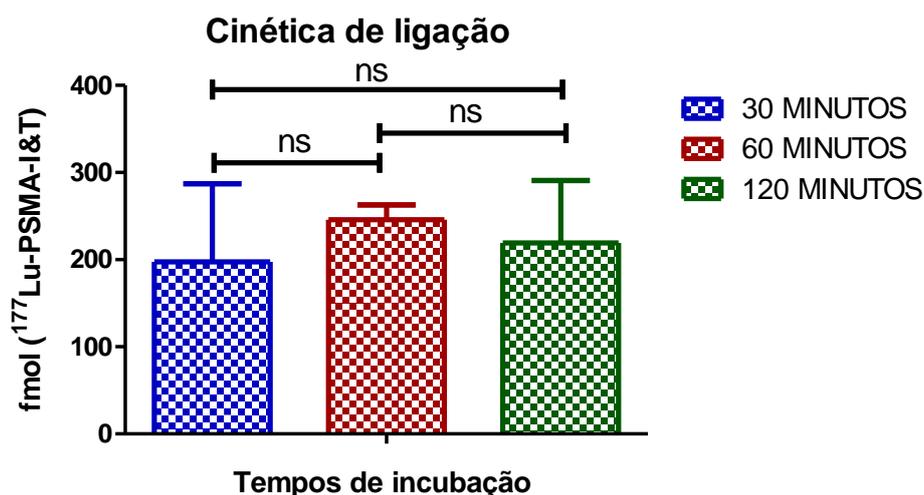
7.4.1 Preparo das células LNCaP

Um dia antes dos experimentos, 2×10^5 células LNCaP cultivadas foram semeadas em placas de 6 poços. No dia dos experimentos as células encontravam-se aderentes à placa e em condições de confluência adequadas (em torno de 80% de confluência), quando observadas ao microscópio.

7.4.2 Cinética de ligação

Ensaio de cinética de ligação *in vitro* foram realizados com a linhagem celular LNCaP, PSMA⁺ e o radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu, para determinar as condições ideais (tempo de incubação) para os experimentos de saturação e competição. O experimento demonstrou ligação do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu às células, após 30 minutos ($197,55 \pm 89,73$ fmol), 60 minutos ($245,67 \pm 17,29$ fmol) e 120 minutos de incubação ($219,00 \pm 71,89$ fmol) (**Figura 52**).

Figura 52 - Ligação do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (18,94 MBq/poço; 0,67nmol/poço) após 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos de incubação (n=3). A captação é expressa em fmol como média \pm desvio padrão das triplicatas. As barras de erro indicam desvio padrão.



ns (diferença não significativa)

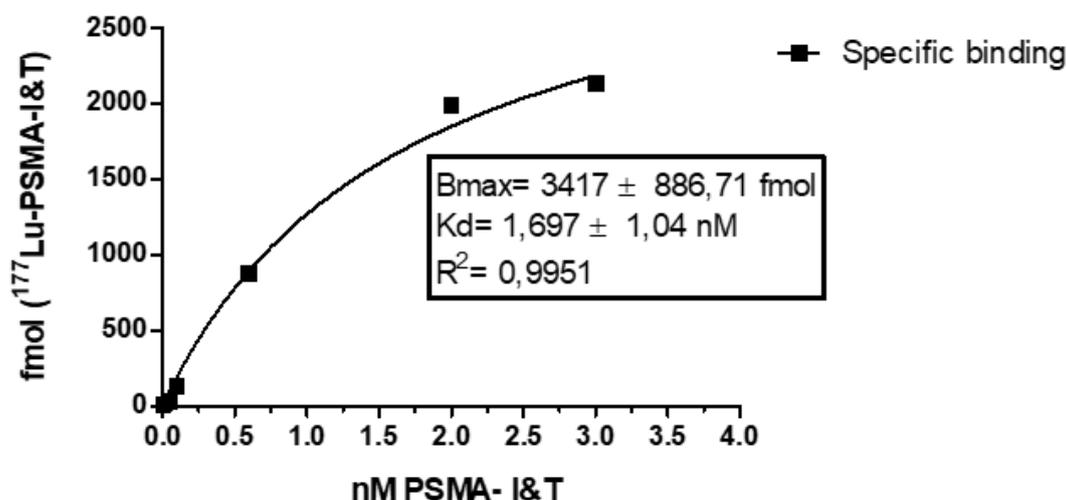
Fonte: autora da tese.

Não foi observada diferença significativa entre os tempos 30 minutos e 60 minutos, entre os tempos de 60 minutos e 120 minutos ou entre os tempos de 30 minutos e 120 minutos ($P > 0,05$). Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tempos de incubação avaliados, definiu-se o tempo de 60 minutos para a condução dos ensaios de saturação e competição, devido ao resultado de maior captação e menor desvio padrão e baseado em procedimentos de outros autores encontrados na literatura (WANG et al., 2018; WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022).

7.4.3 Curva de saturação

A afinidade (K_d) e densidade do receptor (B_{max}) foram determinadas pelo experimento de saturação. Sob condições de equilíbrio, a ligação específica de PSMA-I&T- ^{177}Lu aos receptores transmembrana PSMA⁺ foi dependente da concentração tendendo à saturação, conforme demonstrado pela incubação na presença de concentrações crescentes (0,01 a 3 nM) de PSMA-I&T- ^{177}Lu . O valor de K_d de $1,70 \pm 1,04$ nM e da densidade de receptores (B_{max}) de $3417 \pm 886,71$ fmol de proteína foram calculados a partir da análise de regressão não linear das curvas de saturação ($R^2 = 0,9951$), **Figura 53**.

Figura 53 - Ensaio de saturação. O PSMA-I&T- ^{177}Lu foi incubado com 2×10^5 células/poço a 4°C por 60 minutos em concentrações crescentes (variando de 0,01 a 3 nM). Cada ponto representa média \pm desvio padrão ($n=3$).



Fonte: autora da tese.

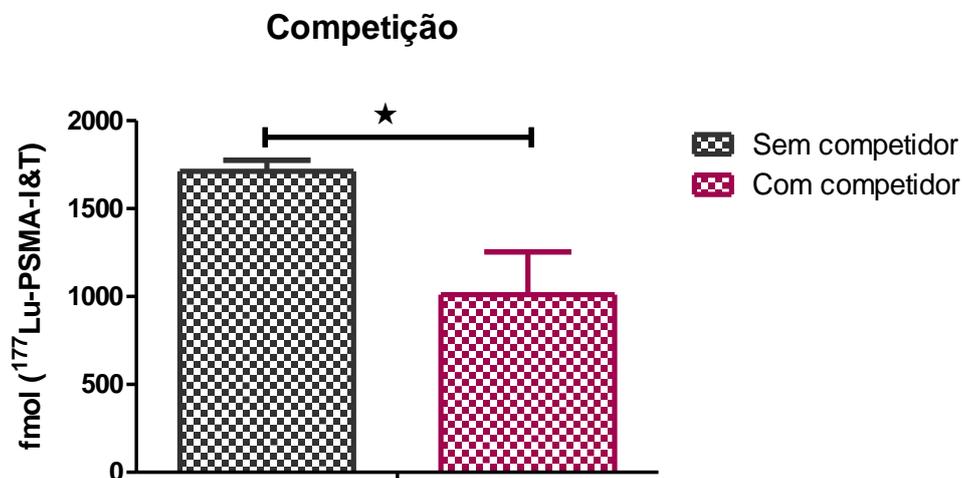
Um estudo de Wieczorek e colaboradores (2022) demonstrou a influência da atividade específica do PSMA-617 marcado com lutécio-177 obtido por duas rotas de produção diferentes (sem carreador e com carreador), no valor da constante de dissociação (K_d), que representa a afinidade do radiofármaco pelo receptor (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022). O resultado deste estudo *in vitro* apontou menor constante de dissociação para o PSMA-617 marcado com lutécio-177 sem carreador (o obtido com maior atividade específica), como esperado. Um menor valor de constante de dissociação representa uma maior afinidade entre a molécula e o receptor (DONG; LIU; WANG, 2015). O resultado de Wieczorek e colaboradores (2022) mostrou que o PSMA-617 marcado com lutécio-177 com carreador apresentou no estudo de ligação às células LNCaP, K_d de $1,65 \pm 0,41$ nM e B_{max} de $1123,0 \pm 128,70$ pmol ($R^2 = 0,9281$). Para efeito de comparação, o valor de K_d demonstrado para o PSMA-I&T- ^{177}Lu no presente trabalho ($1,70 \pm 1,04$ nM) foi bastante semelhante ao descrito por Wieczorek e colaboradores (2022) para o PSMA-617, ambos marcados com lutécio-177 com carreador, demonstrando afinidades semelhantes dos dois radiofármacos pelo receptor no estudo *in vitro*.

7.4.4 Competição

A integridade e a preservação da afinidade do PSMA-11 após liofilização foram avaliadas em um ensaio de ligação competitivo com a linhagem celular de carcinoma de próstata humano LNCaP-PSMA⁺ (2×10^5 células/poço), 1 hora de incubação a 4°C com PSMA-I&T- ^{177}Lu (5 nM) como radioligante e PSMA-11 liofilizado não marcado (75 nM) como competidor. O experimento demonstrou a ligação de PSMA-I&T- ^{177}Lu , sendo de $1712,08 \pm 63,03$ fmol sem competidor e de $1010,54 \pm 243,49$ fmol com competidor (**Figura 54**).

Foi observado diferença significativa entre a captação de PSMA-I&T- ^{177}Lu sem o competidor e com o competidor $P = 0,0320$ ($P < 0,05$). O resultado obtido confirma a preservação da afinidade do PSMA-11 pelo receptor após um mês de liofilização.

Figura 54 - Ensaio de competição em células LNCaP-PSMA+, empregando PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu (5 nM) como ligante e PSMA-11 (75 nM) como competidor, meio RPMI 1640 + 10% de soro fetal bovino, 1 hora de incubação a 4°C. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3 para cada condição).



Fonte: autora da tese.

7.5 Ensaios de ligação *in vivo*

Atualmente, o PSMA-11-⁶⁸Ga é o principal agente utilizado no imageamento e estadiamento do câncer de próstata. O PSMA-617-¹⁷⁷Lu e PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu estão sendo amplamente investigados em ensaios clínicos para atender à necessidade de um agente terapêutico tumor-específico para o tratamento do câncer de próstata metastático (DI IORIO et al., 2022). No entanto, as propriedades farmacológicas, de ligação ao receptor PSMA, biodistribuições e capacidades de danos ao DNA destes radiofármacos ainda não foram comparadas em detalhes, havendo a necessidade de investigações pré-clínicas adicionais (RUIGROK et al., 2021).

Uma grande preocupação com as moléculas direcionadas ao PSMA diz respeito à captação em órgãos saudáveis que expressam receptores PSMA como o intestino delgado, sistema nervoso central, túbulos renais proximais, próstata e, especialmente, as glândulas salivares e lacrimais. A alta captação principalmente nos rins e glândulas salivares pode levar à radiotoxicidade desses órgãos e isso pode afetar fortemente a qualidade de vida dos pacientes tratados (BOUCHELOUCHE; CHOYKE; CAPALA, 2010).

Camundongos expressam altos níveis de PSMA nos rins e glândulas salivares, de forma semelhante ao observado em seres humanos. Porém, ao contrário dos seres humanos, os camundongos têm expressão baixa ou nenhuma expressão de PSMA na próstata e no intestino delgado (jejuno). Além disso, apesar da elevada expressão de PSMA em glândulas salivares murinas, ensaios de biodistribuição com vários radiofármacos direcionados ao receptor PSMA não mostraram captação ou demonstraram baixíssima captação nas glândulas salivares, enquanto a captação renal é semelhante ou até maior em camundongos em comparação com seres humanos (RUIGROK et al., 2019).

Esta diferença na captação dos radiofármacos PSMA-específicos pode ser explicada pela diferença na sequência de aminoácidos do receptor PSMA entre humanos e camundongos (91% de similaridade). A falta de um modelo pré-clínico adequado de pesquisa para reproduzir a captação dos radiofármacos nas glândulas salivares em seres humanos é um grande desafio. Evidências crescentes sugerem que além da ligação específica do PSMA, também a ligação não específica pode desempenhar um papel na captação de radiofármacos direcionados ao receptor PSMA nas glândulas salivares. Mais investigações são necessárias para identificar um traçador capaz de bloquear seletivamente a ligação específica e/ou não específica de traçadores PSMA nas glândulas salivares e rins para melhorar a segurança sem afetar a captação no tumor (RUIGROK et al., 2019).

Um artigo publicado na revista *Nuclear Medicine and Biology* (2021) revisa a coadministração de aminoácidos (l-lisina e l-arginina) e radiofármacos empregados em terapia radionuclídica direcionada a receptores para reduzir significativamente a toxicidade renal, considerada a estratégia padrão ouro em nefroproteção até o momento (GEENEN et al., 2021). Um artigo de Hennrich e colaboradores (2019) aborda sobre o Lutathera[®], o primeiro radiofármaco para terapia com radionuclídeo direcionada a receptores aprovado pela FDA em 2018, e o ensaio clínico NETTER-1 onde reporta que a dose média de radiação para os rins pode ser reduzida em 47% (34% a 59%) com a coadministração de aminoácidos (HENNRICH; KOPKA, 2019).

O objetivo principal do estudo *in vivo* neste trabalho foi investigar a integridade e estabilidade do peptídeo PSMA-11, após processo de liofilização, através da

ligação ao receptor de membrana PSMA por meio de um ensaio de competição utilizando o PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu como ligante e PSMA-11 como competidor.

7.5.1 Desenvolvimento tumoral

Após 20 dias da inoculação das células tumorais em camundongos *SCID-BALB/c*, os tumores atingiram um volume médio de $1210 \pm 786 \text{ mm}^3$, e os animais foram utilizados nos experimentos.

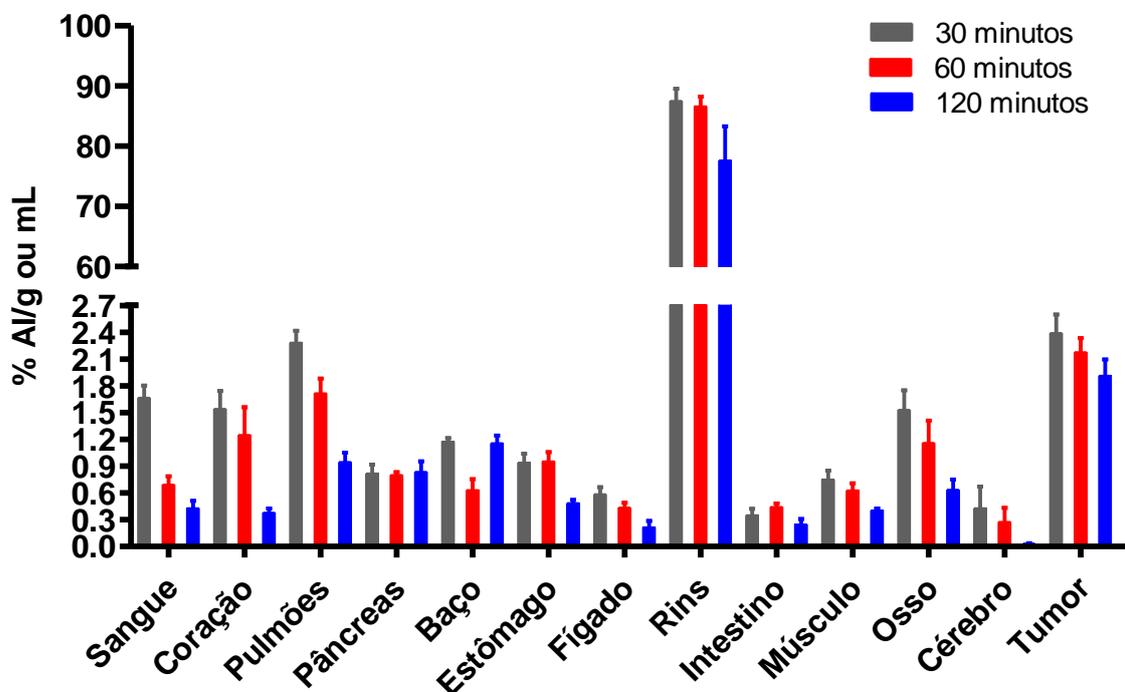
7.5.2 Estudo de biodistribuição do PSMA I&T-¹⁷⁷Lu em camundongos *SCID-BALB/c* portadores de tumor de células LNCaP

Estudo *in vivo* utilizando camundongos *SCID-BALB/c* machos, portadores de tumor de células LNCaP foi realizado com o radiofármaco PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu, obtido no dia do experimento com pureza radioquímica $\geq 95 \%$ avaliada por CLAE e CCD e a impureza, lutécio-177 livre determinada foi de 3,30 %.

Os resultados dos estudos de biodistribuição, realizado em três tempos (30 minutos, 60 minutos e 120 minutos) estão apresentados na **Figura 55 e Tabela 16**. O PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu mostrou rápido clareamento sanguíneo aos 30 minutos ($1,67 \pm 0,30 \%$ AI/g), 60 minutos ($0,69 \pm 0,21 \%$ AI/g) e 120 minutos ($0,34 \pm 0,24 \%$ AI/g) após-injeção, respectivamente. O PSMA I&T-¹⁷⁷Lu mostrou alta captação tumoral aos 30 minutos ($2,39 \pm 0,46 \%$ AI/g) com pequena diminuição nos tempos subsequentes de 60 minutos ($2,18 \pm 0,27 \%$ AI/g) e 120 minutos ($1,91 \pm 0,26 \%$ AI/g) após-injeção, respectivamente. A captação renal de PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu foi alta aos 30 minutos ($87,49 \pm 4,57 \%$ AI/g), e 60 minutos ($86,60 \pm 2,75 \%$ AI/g) e teve uma redução aos 120 minutos após-injeção ($77,62 \pm 9,75 \%$ AI/g).

Nos resultados da biodistribuição deste experimento foi observada captação no osso de $1,53 \pm 0,49 \%$ AI/g aos 30 minutos após-injeção e que reduziu para $0,51 \pm 0,35 \%$ AI/g aos 120 minutos após injeção, que pode ser atribuída, ainda que parcialmente, ao lutécio-177 livre. Entretanto, o fato da captação no osso não aumentar com o tempo, corrobora para a estabilidade *in vivo* do radiofármaco.

Figura 55 - Biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu em camundongos machos SCID-BALB/c com modelo de tumor de células LNCap PSMA+, expressa em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão ou tecido (%AI/g) ou por mL de sangue (%AI/mL). Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5).



Fonte: autora da tese.

Em órgãos positivos para PSMA excisados neste experimento, como pulmão e intestino delgado, foi observada captação levemente aumentada em comparação à órgãos que não expressam PSMA (**Tabela 16**).

Os dados de biodistribuição dos demais órgãos e tecidos excisados encontram-se disponibilizados na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Biodistribuição do ^{177}Lu -PSMA I&T (% AI/g ou % AI/mL) em camundongos *SCID-BALB/c* machos portadores de tumores de próstata subcutâneos após administração intravenosa e eutanásia aos 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5).

Material Biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue		
	30 minutos	60 minutos	120 minutos
Sangue	1,67 ± 0,30	0,69 ± 0,21	0,34 ± 0,24
Coração	1,54 ± 0,40	1,25 ± 0,54	0,30 ± 0,19
Pulmão	2,28 ± 0,23	1,72 ± 0,37	0,95 ± 0,18
Pâncreas	0,82 ± 0,22	0,80 ± 0,06	0,84 ± 0,17
Baço	1,17 ± 0,07	0,63 ± 0,21	1,16 ± 0,15
Estômago*	0,94 ± 0,23	0,95 ± 0,18	0,37 ± 0,25
Fígado	0,59 ± 0,17	0,44 ± 0,09	0,22 ± 0,10
Rins	87,49 ± 4,57	86,60 ± 2,75	77,62 ± 9,75
Intestinos*	0,35 ± 0,16	0,45 ± 0,06	0,20 ± 0,15
Músculo	0,75 ± 0,22	0,63 ± 0,14	0,41 ± 0,0
Osso	1,53 ± 0,49	1,16 ± 0,43	0,51 ± 0,3
Cérebro	0,43 ± 0,54	0,28 ± 0,35	0,04 ± 0,0
Tumor	2,39 ± 0,46	2,18 ± 0,27	1,91 ± 0,2

% AI/g = porcentagem de atividade injetada por grama ou por mL de sangue.

*Com conteúdo

Fonte: autora da tese.

As razões tumor/sangue e tumor/órgãos obtidas na biodistribuição do PSMA-I&T radiomarcado com lutécio-177 em camundongos *SCID-BALB/c* com tumor (células LNCaP) estão apresentadas na **Tabela 17**. Quanto maiores as razões tumor/sangue e tumor/órgãos para o radiofármaco, melhor a relação tumor-

background e maior a possibilidade de detecção de lesões em imagens (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022).

Adicionalmente, observa-se que a razão tumor/sangue aumenta em função do tempo, indicando que o radiofármaco permanece ligado aos receptores, em detrimento do clareamento sanguíneo, fato que corrobora para a especificidade de ligação do radiofármaco. Para órgãos que não apresentam expressão de receptores PSMA, espera-se que a razão tumor/órgão aumente com o tempo ou mantenha-se praticamente constante.

Tabela 17 - Razão tumor-sangue (%Al/g/%Al/mL), tumor-órgãos (%Al/g/%Al/g) em função do tempo (30 minutos, 60 minutos e 120 minutos) na biodistribuição do PSMA-I&T-177Lu em camundongos SCID portadores de tumor (células LNCaP). Calculado a partir das médias de %Al/ g ou mL (n=5).

Material Biológico	Razão da captação do tumor / tecido, órgãos ou sangue		
	30 minutos	60 minutos	120 minutos
Tumor/Sangue	1,43	3,16	5,62
Tumor/Pulmões	1,05	1,27	2,01
Tumor/Fígado	4,05	4,95	8,68
Tumor/Rins	0,027	0,025	0,016
Tumor/Músculo	3,19	3,46	4,66

% Al/g = porcentagem de atividade injetada por grama ou por mL de sangue.
 Fonte: autora da tese.

O PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu produzido no Centro de Radiofarmácia do IPEN mostrou um padrão de biodistribuição que condiz ao reportado na literatura. As investigações pré-clínicas seguem testando estratégias para proteger rins e glândulas salivares da radiotoxicidade, apesar da falta de modelos pré-clínicos que se assemelhem adequadamente à captação nas glândulas salivares de seres humanos (RUIGROK et al., 2019).

O estudo de Weiczorek e colaboradores (2022) avaliou a biodistribuição da molécula PSMA-617 radiomarcada com lutécio-177 de baixa atividade específica

(com carreador) na captação no tumor e em órgãos PSMA positivos não alvos e foi realizado em camundongos imunodeficientes (SCID) portadores de tumor LNCaP (fornecidos pelo biotério do IPEN) (WIECZOREK VILLAS BOAS et al., 2022).

A biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu quando comparado à biodistribuição do PSMA-617-¹⁷⁷Lu marcado com lutécio-177 com carreador, produzido na razão molar peptídeo/lutécio de 2,1:1 (ambos produzidos no Centro de Radiofarmácia do IPEN) mostrou maior captação tumoral (em torno de 1,5 vez) e maior captação renal (em torno de 2,6 vezes) aos 60 minutos após injeção. As diferenças de captação tumoral e renal entre o PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu e PSMA-617-¹⁷⁷Lu podem estar relacionadas com as diferenças estruturais entre os dois análogos, dentre as quais a utilização de quelantes diferentes (DOTAGA e DOTA, respectivamente) e o espaçador existente entre o grupamento quelante e a porção de interação com o receptor.

Considerando que a formulação do kit de PSMA-11 proposta neste trabalho contém manitol, encontrou-se na literatura uma investigação interessante a respeito do uso de manitol. Matteucci e colaboradores (2017) investigaram o potencial do manitol em reduzir a captação renal do PSMA-11-⁶⁸Ga pois atua como um diurético osmótico no PSMA expresso nos túbulos proximais dos rins. Seus resultados preliminares indicaram que o manitol pode desempenhar um papel na redução da captação renal do PSMA-11-⁶⁸Ga. Os resultados mostraram que a administração de uma infusão intravenosa de 500 ml de manitol a 10 % não influenciou a captação do PSMA-11-⁶⁸Ga nas glândulas salivares, devido ao fato de seu mecanismo de ação não interferir na captação do PSMA e dessa forma sugere que o manitol não pode comprometer a captação do traçador direcionado ao PSMA no tumor. No entanto o autor cita que a limitação do estudo foi o pequeno número de pacientes envolvidos. (MATTEUCCI et al., 2017).

Entretanto, Sarnelli e colaboradores (2019) publicaram estudos clínicos realizados com PSMA-617-¹⁷⁷Lu e revelaram que a administração de manitol não mostrou resultado significativo na redução da captação renal pelo radiofármaco (SARNELLI et al., 2019).

Diante de tais resultados, uma investigação futura deverá comparar a biodistribuição da formulação de kits de PSMA-11 com e sem a presença de

manitol, radiomarcados com galio-68, de modo a avaliar de forma comparativa a captação em órgãos que expressam receptores PSMA, particularmente, os rins.

7.5.3 Estudo de competição: PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu X PSMA-11 liofilizado

No experimento de competição utilizando PSMA-I&T radiomarcado com lutécio-177 e PSMA-11 liofilizado como bloqueador, foi observada redução na captação tumoral de $2,18 \pm 0,27$ %AI/g para $0,62 \pm 0,17$ %AI/g, o que representa uma redução na taxa de captação tumoral de 71,56 % (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu sem e com administração de 100 µg/camundongo do PSMA-11 liofilizado reconstituído (competidor), 30 minutos antes do radiofármaco. Os dois grupos de animais foram eutanasiados 60 minutos pós-injeção. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5).

Material Biológico	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue 60' sem competidor	60' com competidor
Sangue	0,69 ± 0,21	1,19 ± 0,38
Pulmões	1,72 ± 0,37	2,12 ± 0,70
Baço	0,89 ± 1,10	0,39 ± 0,09
Fígado	0,87 ± 0,64	0,72 ± 0,20
Rins	86,60 ± 2,75	7,37 ± 0,91
Intestinos*	0,91 ± 0,79	0,90 ± 0,59
Músculo	0,96 ± 0,47	0,65 ± 0,42
Tumor	2,18 ± 0,27	0,62 ± 0,17

% AI/g = porcentagem de atividade injetada por grama ou por mL de sangue.

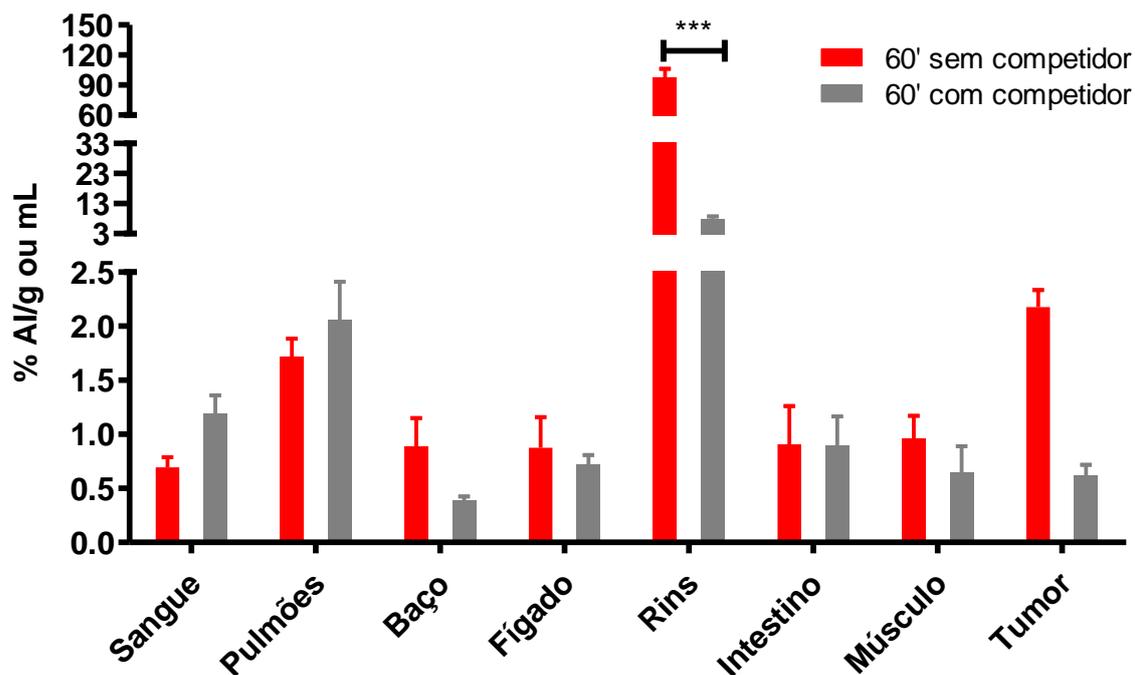
*Com conteúdo

Fonte: autora da tese.

Além disso, a captação renal também foi fortemente reduzida pela presença do competidor PSMA-11 liofilizado (redução na captação renal de $97,68 \pm 19,24$ %AI/g para $7,99 \pm 1,59$ %AI/g (***) $P \leq 0,001$) **Figura 56**. Em contrapartida, a porcentagem do radiofármaco em circulação aumentou no grupo com bloqueio, fato que também reflete a competição estabelecida entre o radiofármaco de

lutécio-177 e o competidor (PSMA-11) pelos receptores PSMA nas células tumorais.

Figura 56 - Biodistribuição do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu sem e com administração de 100µg/camundongo do PSMA-11 liofilizado reconstituído (competidor) 30 minutos antes do radiofármaco. Dados expressos pela média e desvio padrão (n = 5). Os asteriscos indicam significância (**P ≤ 0,001).



Fonte: autora da tese

Os resultados obtidos confirmam a especificidade de ligação do PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu aos receptores PSMA e que o peptídeo PSMA-11 (liofilizado, sem a presença de manitol e utilizado como competidor) manteve a integridade e estabilidade de sua estrutura após ser submetido ao ciclo de liofilização, uma vez que conservou a capacidade de ligação ao receptor PSMA.

8 CONCLUSÃO

O PSMA-11-⁶⁸Ga é considerado atualmente o padrão ouro para detecção de oligometástases por imagem PET em pacientes com recorrência bioquímica após prostatectomia radical, sendo útil para seleção e acompanhamento de pacientes submetidos à terapia radionuclídica com PSMA-617-¹⁷⁷Lu ou PSMA-I&T-¹⁷⁷Lu.

Obteve-se com sucesso uma formulação liofilizada (kit) de PSMA-11 que preservou a integridade do peptídeo e garantiu alta eficiência de radiomarcagem quando avaliada por CLAE e CCD. O kit formulado de PSMA-11, composto por dois frascos (um frasco liofilizado contendo o peptídeo em manitol e outro frasco contendo o tampão de marcação) pode ser radiomarcado diretamente com o eluato de ⁶⁸Ga proveniente de dois geradores BPF de diferentes fabricantes (ITG e Eckert & Ziegler) representando um método rápido e de fácil preparação do radiofármaco para uso em ambiente clínico.

A formulação liofilizada proposta apresenta ineditismo, uma vez que não foi encontrada na literatura consultada, outra formulação de PSMA-11 associada de manitol. O uso de manitol possibilitou obter uma pastilha liofilizada elegante, contribuindo para a preservação da massa e da integridade do peptídeo, frente às condições de liofilização.

Os estudos preliminares de estabilidade do kit liofilizado, atestaram estabilidade por pelo menos 40 dias, armazenados a – 20 °C. Entretanto, tais estudos deverão ser repetidos em um número maior de lotes, para intervalos de tempo mais curtos, e com atividades maiores de eluato, de modo a determinar o prazo de validade do kit liofilizado. Também se torna interessante avaliar a estabilidade em outras condições de armazenamento, como temperatura de refrigeração ou mesmo temperatura ambiente.

Ensaio pré-clínicos de competição *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a formulação proposta para o kit de PSMA-11 e as condições de liofilização empregadas, a partir da determinação de parâmetros importantes do processo de liofilização, preservaram a integridade e a afinidade do peptídeo pelo receptor PSMA, representando um importante passo para o escalonamento deste projeto para escala industrial, com a definição do número de frascos por lote produzido.

Novos estudos pré-clínicos *in vivo* com PSMA-11-⁶⁸Ga deverão avaliar a captação do PSMA-11-⁶⁸Ga no tumor e em órgãos PSMA-positivos não alvos por biodistribuição e imagem PET em equipamento Albira micro PET, Bruker Inc seguido de Tomografia Computadorizada (CT). A avaliação da influência do manitol na captação em órgãos PSMA-positivos, particularmente nos rins, deverá ser avaliada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Z.; REHMAN, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. Em: **Neoplasms**. [s.l.] InTech, 2018.
- ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 3–9, maio 2003.
- AGHANEJAD AYUOB et al. Optimized production and quality control of ^{68}Ga -DOTATATE. **Iran J Nucl Med** 2016;**24(1):29-36**, v. 24, n. 1, p. 29–36, 2016.
- AHMADZADEHFAR, H. et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with ^{177}Lu -DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. **EJNMMI Research**, v. 5, n. 1, p. 36, 20 dez. 2015.
- AL-NAHHAS, A. et al. Gallium-68 PET: a new frontier in receptor cancer imaging. **Anticancer research**, v. 27, n. 6B, p. 4087–94, 2007.
- ALSAAB, H. O. et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 23 ago. 2017a.
- ALSAAB, H. O. et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 23 ago. 2017b.
- AMBROSINI, V. et al. Radiolabeled Somatostatin Analogues for Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumors. **Cancers**, v. 14, n. 4, p. 1055, 19 fev. 2022.
- AMOR-COARASA, A. et al. Comprehensive Quality Control of the ITG $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generator and Synthesis of ^{68}Ga -DOTATOC and ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC for Clinical Imaging. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 9, p. 1402–1405, set. 2016.
- ANDERSON, C. J.; LEWIS, J. S. Current status and future challenges for molecular imaging. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 375, n. 2107, p. 20170023, 28 nov. 2017.
- ASLANI, A. et al. Gallium-68 DOTATATE Production with Automated PET Radiopharmaceutical Synthesis System: A Three Year Experience. **Asia Oceania journal of nuclear medicine & biology**, v. 2, n. 2, p. 75–86, 2014.

ASTI, M. et al. Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga -DOTATOC. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, n. 6, p. 721–724, ago. 2008.

AWOTWE-OTOO, D. et al. Impact of controlled ice nucleation on process performance and quality attributes of a lyophilized monoclonal antibody. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450, n. 1–2, p. 70–78, 25 jun. 2013.

BADAL TEJEDOR, M.; FRANSSON, J.; MILLQVIST-FUREBY, A. Freeze-dried cake structural and physical heterogeneity in relation to freeze-drying cycle parameters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 590, p. 119891, nov. 2020.

BALLINGER, J. R. ^{68}Ga -DOTATATE. Em: **PET Radiopharmaceuticals: Chemical, Biological, and Clinical Data**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 48–49.

BAUDHUIN, H. et al. ^{68}Ga -Labeling: Laying the Foundation for an Anti-Radiolytic Formulation for NOTA-sdAb PET Tracers. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 448, 10 maio 2021.

BAUWENS, M. et al. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of ^{68}Ga -Dotatoc for clinical application. **Nuclear Medicine Communications**, v. 31, n. 8, p. 753–758, ago. 2010.

BEHESHTI, M. et al. Optimal time-point for ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT imaging in assessment of prostate cancer: feasibility of sterile cold-kit tracer preparation? **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 45, n. 7, p. 1188–1196, 23 jul. 2018a.

BEHESHTI, M. et al. Optimal time-point for ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT imaging in assessment of prostate cancer: feasibility of sterile cold-kit tracer preparation? **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 45, n. 7, p. 1188–1196, 23 jul. 2018b.

BJØRNSTAD, T. et al. **Radiotracer generators for industrial applications, IAEA Radiation Technology Series No. 5**. [s.l.: s.n.].

BLOM ELISABETH; KOZIOROWSKI JACEK. **RADIOLABELLED SOMATOSTATIN ANALOGUES FOR USE IN MOLECULAR IMAGING**. [s.l.: s.n.].

BRANDT, M. et al. An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 10, p. 1500–1506, out. 2018.

BREEMAN, W. A. P. et al. Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga . **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 32, n. 4, p. 478–485, 18 abr. 2005.

BRYANT, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 913–917, 14 abr. 2005.

BUCHMANN, I. et al. Comparison of ^{68}Ga -DOTATOC PET and ^{111}In -DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 34, n. 10, p. 1617–1626, 20 set. 2007.

CAKIR, M.; DWORAKOWSKA, D.; GROSSMAN, A. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 1 – molecular pathways. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 11, p. 2570–2584, 29 nov. 2010.

CALAIS, J. et al. Impact of ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT on the Management of Prostate Cancer Patients with Biochemical Recurrence. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 3, p. 434–441, mar. 2018.

CALDERONI, L. et al. Evaluation of an Automated Module Synthesis and a Sterile Cold Kit-Based Preparation of ^{68}Ga -PSMA-11 in Patients with Prostate Cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 61, n. 5, p. 716–722, maio 2020.

CARPENTER, J. F. et al. Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice. Em: [s.l: s.n.]. p. 109–133.

CHAKRAVARTY, R. et al. Development of a nano-zirconia based $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator for biomedical applications. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 38, n. 4, p. 575–583, maio 2011.

CHAKRAVARTY, R. et al. Detailed evaluation of different $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators: an attempt toward achieving efficient ^{68}Ga radiopharmacy. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 59, n. 3, p. 87–94, 2 mar. 2016.

CHAKRAVARTY, R. et al. Clinical ^{68}Ga -PET: Is radiosynthesis module an absolute necessity? **Nuclear Medicine and Biology**, v. 46, p. 1–11, mar. 2017.

CHAKRAVARTY, R.; CHAKRABORTY, S. A review of advances in the last decade on targeted cancer therapy using ^{177}Lu : focusing on ^{177}Lu produced by

the direct neutron activation route. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 11, n. 6, p. 443–475, 2021.

CHAMPION, C. et al. Comparison between Three Promising β -emitting Radionuclides, ^{67}Cu , ^{47}Sc and ^{161}Tb , with Emphasis on Doses Delivered to Minimal Residual Disease. **Theranostics**, v. 6, n. 10, p. 1611–1618, 2016.

CHATALIC, K. L. S. et al. Towards Personalized Treatment of Prostate Cancer: PSMA I&T, a Promising Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Theranostic Agent. **Theranostics**, v. 6, n. 6, p. 849–861, 2016.

CHERRY, S. R.; SORENSON, J. A.; PHELPS, M. E. **Physics in Nuclear Medicine**. 2004. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:28999631>>

CLANTON, J.; SANDLER, M. P. Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 660–661, abr. 2010.

COENEN, H. H.; ERMERT, J. Expanding PET-applications in life sciences with positron-emitters beyond fluorine-18. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 92, p. 241–269, jan. 2021.

DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784–1793, nov. 2005.

DASH, A.; PILLAI, M. R. A.; KNAPP, F. F. Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. **Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 49, n. 2, p. 85–107, 17 jun. 2015.

DE BONO, J. S. et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 21, p. 1995–2005, 26 maio 2011.

DE KEIZER, B. et al. Hormonal crises following receptor radionuclide therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [^{177}Lu -DOTA $_0$,Tyr $_3$]octreotate. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 35, n. 4, p. 749–755, 16 abr. 2008.

DEL OLMO-GARCIA, M. I. et al. Somatostatin and Somatostatin Receptors: From Signaling to Clinical Applications in Neuroendocrine Neoplasms. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1810, 1 dez. 2021.

DI IORIO, V. et al. Production and Quality Control of [177Lu]Lu-PSMA-I&T: Development of an Investigational Medicinal Product Dossier for Clinical Trials. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4143, 28 jun. 2022.

DIAO, W. et al. Recent Advances in Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Radiopharmaceuticals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 33–56, 26 mar. 2019.

DO CARMO, S. J. C.; SCOTT, P. J. H.; ALVES, F. Production of radiometals in liquid targets. **EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 2, 10 dez. 2020.

EBENHAN, T. et al. Development of a Single Vial Kit Solution for Radiolabeling of 68Ga-DKFZ-PSMA-11 and Its Performance in Prostate Cancer Patients. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14860–14878, 14 ago. 2015.

EDER, M. et al. ⁶⁸ Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 688–697, 18 abr. 2012.

EDER, M. et al. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 7, p. 779–796, 30 jun. 2014.

EIBER, M. et al. Evaluation of Hybrid ⁶⁸ Ga-PSMA Ligand PET/CT in 248 Patients with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 5, p. 668–674, maio 2015.

EINSELE, H. et al. The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. **Cancer**, v. 126, n. 14, p. 3192–3201, 15 jul. 2020.

ELL, P. J.; KAYANI, I.; GROVES, A. M. 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT in cancer imaging. **Clinical Medicine**, v. 6, n. 3, p. 240–244, 1 maio 2006.

EMMETT, L. et al. Prospective, Multisite, International Comparison of ¹⁸ F-Fluoromethylcholine PET/CT, Multiparametric MRI, and ⁶⁸ Ga-HBED-CC PSMA-11 PET/CT in Men with High-Risk Features and Biochemical Failure After Radical Prostatectomy: Clinical Performance and Patient Outcomes. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 6, p. 794–800, jun. 2019.

EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0. GALLIUM (68Ga) PSMA-11 INJECTION. Em: 11.0^a ed. [s.l.] Eur Pharm., 2024a. p. 1276–1277.

EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0. GALLIUM (68Ga) EDOTREOTIDE INJECTION. Em: 11.0^a ed. [s.l.] Eur Pharm., 2024b. p. 1274–1275.

EUROPEAN PHARMACOPEIA 11.0. GALLIUM (68 Ga) CHLORIDE SOLUTION FOR RADIOLABELLING. Em: 11.0^a ed. [s.l.] Eur Pharm., 2024. p. 1273–1274.

EVANS, J. D. et al. Prostate cancer–specific PET radiotracers: A review on the clinical utility in recurrent disease. **Practical Radiation Oncology**, v. 8, n. 1, p. 28–39, jan. 2018.

EYCHENNE, R. et al. Overview of Radiolabeled Somatostatin Analogs for Cancer Imaging and Therapy. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 4012, 2 set. 2020.

FANG, Q.; COLE, R. N.; WANG, Z. Mechanisms and targeting of proteasome-dependent androgen receptor degradation in prostate cancer. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 10, n. 6, p. 366–376, 2022.

FANI, M.; ANDRÉ, J. P.; MAECKE, H. R. ⁶⁸ Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 3, n. 2, p. 53–63, 31 mar. 2008.

FASS, L. Imaging and cancer: A review. **Molecular Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115–152, 10 ago. 2008.

FRILLING, A. et al. The Impact of ⁶⁸Ga-DOTATOC Positron Emission Tomography/Computed Tomography on the Multimodal Management of Patients With Neuroendocrine Tumors. **Annals of Surgery**, v. 252, n. 5, p. 850–856, nov. 2010.

GARCIA-CARBONERO, R. et al. Advances in the Treatment of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinomas: Are we Moving Forward? **Endocrine Reviews**, v. 44, n. 4, p. 724–736, 11 jul. 2023.

GRIFFETH, L. K. Use of Pet/Ct Scanning in Cancer Patients: Technical and Practical Considerations. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 18, n. 4, p. 321–330, 11 out. 2005.

HA, S.; LUO, G.; XIANG, H. **A Comprehensive Overview of Small-Molecule Androgen Receptor Degradors: Recent Progress and Future Perspectives. Journal of Medicinal Chemistry**, 2022.

HE, L. et al. Metastatic castration-resistant prostate cancer: Academic insights and perspectives through bibliometric analysis. **Medicine**, v. 99, n. 15, p. e19760, abr. 2020.

HECK, M. M. et al. Treatment Outcome, Toxicity, and Predictive Factors for Radioligand Therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. **European Urology**, v. 75, n. 6, p. 920–926, jun. 2019.

HEIDEGGER, I. et al. Biomarkers to personalize treatment with ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 in men with metastatic castration-resistant prostate cancer - a state of the art review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 14, p. 175883592210819, 5 jan. 2022.

HENNRICH, U.; BENEŠOVÁ, M. [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 38, 3 mar. 2020.

HENNRICH, U.; EDER, M. [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, p. 713, 23 jul. 2021.

HENNRICH, U.; KOPKA, K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 114, 29 jul. 2019.

HOFMAN, M. S.; HICKS, R. J. How We Read Oncologic FDG PET/CT. **Cancer Imaging**, v. 16, n. 1, p. 35, 18 dez. 2016.

HUMMEL, H.-D. et al. Pasotuxizumab, a BiTE[®] immune therapy for castration-resistant prostate cancer: Phase I, dose-escalation study findings. **Immunotherapy**, v. 13, n. 2, p. 125–141, fev. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2023. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/>>. Acesso em: 29 out. 2023.

INZANI, F.; PETRONE, G.; RINDI, G. The New World Health Organization Classification for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasia. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 47, n. 3, p. 463–470, set. 2018.

JONES, W. et al. PSMA Theranostics: Review of the Current Status of PSMA-Targeted Imaging and Radioligand Therapy. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1367, 26 maio 2020.

JUZENIENE, A. et al. Preclinical and Clinical Status of PSMA-Targeted Alpha Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 779, 13 fev. 2021.

KABASAKAL, L. et al. Comparison of ⁶⁸Ga-DOTATATE and ⁶⁸Ga-DOTANOC PET/CT imaging in the same patient group with neuroendocrine tumours. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 39, n. 8, p. 1271–1277, 20 ago. 2012.

KAGIHARA, J. A. et al. Moving Towards Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. **Current Breast Cancer Reports**, v. 13, n. 3, p. 216–226, 4 set. 2021.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. S16–S21, mar. 2015.

KARTALIS, N.; MUCELLI, R. M. P.; SUNDIN, A. Recent developments in imaging of pancreatic neuroendocrine tumors. **Annals of gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 193–202, 2015.

KHORAMJOUY, M. et al. Optimization binding studies of opioid receptors, saturation and competition, using [3H]-DAMGO. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 5, p. 1390–1395, 1 out. 2021.

KILIAN, K. ⁶⁸Ga-DOTA and analogs: Current status and future perspectives. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 19, p. S13–S21, maio 2014.

KLEYNHANS, J. et al. Production of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA: Comparing a manual kit-based method with a module-based automated synthesis approach. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 63, n. 13, p. 553–563, 10 nov. 2020.

KOLHE, P.; AMEND, E.; SINGH, S. K. Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 3, p. 727–33, 2010.

KONSTANTINIDIS, A. K. et al. Controlled nucleation in freeze-drying: Effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3453–3470, ago. 2011.

KOOPMANS, K. P. et al. Molecular imaging in neuroendocrine tumors: Molecular uptake mechanisms and clinical results. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 71, n. 3, p. 199–213, set. 2009.

KOPKA, K. et al. Glu-Ureido–Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-

Molecular-Weight Theranostic Radiotracers. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. Supplement 2, p. 17S-26S, 1 set. 2017.

KUCHENBAECKER, K. B. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. **JAMA**, v. 317, n. 23, p. 2402, 20 jun. 2017.

KULKE, M. H. et al. Activity of Sunitinib in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 20, p. 3403–3410, 10 jul. 2008.

KULPRATHIPANJA, S.; HNATOWICH, D. J. A Method for Determining the pH Stability Range of Gallium Radiopharmaceuticals. Em: **Radiopharmaceuticals and Other Compounds Labelled with Short-Lived Radionuclides**. [s.l.] Elsevier, 1977. p. 229–233.

KURASH, M. M. et al. ⁶⁸Ga-labeled PSMA-11 (⁶⁸Ga-isoPROtrace-11) synthesized with ready to use kit: normal biodistribution and uptake characteristics of tumour lesions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3109, 20 fev. 2020.

LA SALVIA, A. et al. Targeted Cancer Therapy: What's New in the Field of Neuroendocrine Neoplasms? **Cancers**, v. 13, n. 7, p. 1701, 3 abr. 2021.

LABRIOLA, M. K. et al. Management of men with metastatic castration-resistant prostate cancer following potent androgen receptor inhibition: a review of novel investigational therapies. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 24, n. 2, p. 301–309, 9 jun. 2021.

LEPAREUR, N. Cold Kit Labeling: The Future of ⁶⁸Ga Radiopharmaceuticals? **Frontiers in Medicine**, v. 9, 10 fev. 2022.

LI, Y.; LIU, C.-F.; RAO, G.-W. A Review on Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors and Synthetic Methodologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 1565–1584, mar. 2021.

LIU, S.; ELLARS, C. E.; EDWARDS, D. S. Ascorbic Acid: Useful as a Buffer Agent and Radiolytic Stabilizer for Metalloradiopharmaceuticals. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1052–1056, 1 set. 2003.

LUNDMARK, F. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Optimised PSMA-Targeting Radioligands. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1098, 20 maio 2022.

MA, M. T. et al. Rapid kit-based ⁶⁸Ga-labelling and PET imaging with THP-Tyr³-octreotate: a preliminary comparison with DOTA-Tyr³-octreotate. **EJNMMI Research**, v. 5, n. 1, p. 52, 9 dez. 2015.

MACEDO, F. et al. Bone metastases: an overview. **Oncology Reviews**, 9 maio 2017.

MACHULKIN, A. E. et al. Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 8, p. 679–693, 13 set. 2016.

MANKOFF, D. A. A definition of molecular imaging. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 48, n. 6, p. 18N, 21N, jun. 2007.

MANOHARAN, P. et al. Safety, tolerability and clinical implementation of ‘ready-to-use’ ⁶⁸Ga-DOTA⁰-Tyr³-octreotide (⁶⁸Ga-DOTATOC) (SomaKIT TOC) for injection in patients diagnosed with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NETs). **ESMO Open**, v. 5, n. 2, p. e000650, 2020.

MATTEUCCI, F. et al. Reduction of ⁶⁸Ga-PSMA renal uptake with mannitol infusion: preliminary results. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 44, n. 13, p. 2189–2194, 11 dez. 2017.

MEISENHEIMER, M. et al. Manual vs automated ⁶⁸ Ga-radiolabelling—A comparison of optimized processes. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 63, n. 4, p. 162–173, 26 abr. 2020.

MODLIN, I. M.; LYE, K. D.; KIDD, M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. **Cancer**, v. 97, n. 4, p. 934–959, 15 fev. 2003.

MOKALENG, B. B. et al. Synthesis, ⁶⁸ Ga-Radiolabeling, and Preliminary *In Vivo* Assessment of a Depsipeptide-Derived Compound as a Potential PET/CT Infection Imaging Agent. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

MOLAVIPORDANJANI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J. Fundamental concepts of radiopharmaceuticals quality controls. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, 13 mar. 2019.

MOREAU, K. et al. **Proteolysis-targeting chimeras in drug development: A safety perspective. British Journal of Pharmacology**, 2020.

MUKHERJEE, A. et al. Development of Single Vial Kits for Preparation of ⁶⁸Ga-Labelled Peptides for PET Imaging of Neuroendocrine Tumours. **Molecular Imaging and Biology**, v. 16, n. 4, p. 550–557, 30 ago. 2014.

MULHOLLAND, D. J. et al. Cell Autonomous Role of PTEN in Regulating Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. **Cancer Cell**, v. 19, n. 6, p. 792–804, jun. 2011.

MÜLLER, C. et al. Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 46, n. 9, p. 1919–1930, 27 ago. 2019.

NARAYANAN, R.; PONNUSAMY, S.; MILLER, D. D. Destroying the androgen receptor (AR)-potential strategy to treat advanced prostate cancer. **Oncoscience**, v. 4, n. 11–12, p. 175–177, 28 dez. 2017.

NIKFARJAM, Z. et al. Metamorphosis of prostate specific membrane antigen (PSMA) inhibitors. **Biophysical Reviews**, v. 14, n. 1, p. 303–315, 13 fev. 2022.

NONNEKENS, J. et al. ²¹³Bi-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeting Agents Induce DNA Double-Strand Breaks in Prostate Cancer Xenografts. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 32, n. 2, p. 67–73, mar. 2017.

OCAK, M. et al. Full automation of ⁶⁸Ga labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, n. 2, p. 297–302, fev. 2010.

ORII, Y.; MORITA, M. Measurement of the pH of Frozen Buffer Solutions by Using pH Indicators. **The Journal of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 163–168, jan. 1977.

ORONSKY, B. et al. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 19, n. 12, p. 991–1002, dez. 2017.

PAVEL, M. et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 7, p. 844–860, jul. 2020.

PILLAI, M. R. A. et al. Production logistics of ¹⁷⁷Lu for radionuclide therapy. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 59, n. 2–3, p. 109–118, ago. 2003.

PIMLOTT, S. L.; SUTHERLAND, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 1, p. 149–62, jan. 2011.

POEPEL, T. D. et al. ⁶⁸Ga-DOTATOC Versus ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT in Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 12, p. 1864–1870, dez. 2011a.

POEPPEL, T. D. et al. ^{68}Ga -DOTATOC Versus ^{68}Ga -DOTATATE PET/CT in Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 12, p. 1864–1870, dez. 2011b.

PRINCE, D. et al. Development and Evaluation of User-Friendly Single Vial DOTA-Peptide Kit Formulations, Specifically Designed for Radiolabelling with ^{68}Ga from a Tin Dioxide $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generator. **Molecular Imaging and Biology**, v. 19, n. 6, p. 817–824, 24 dez. 2017.

PRIVÉ, B. M. et al. Lutetium-177-PSMA-I&T as metastases directed therapy in oligometastatic hormone sensitive prostate cancer, a randomized controlled trial. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 884, 14 dez. 2020.

PUTZER, D. et al. Bone Metastases in Patients with Neuroendocrine Tumor: ^{68}Ga -DOTA-Tyr³-Octreotide PET in Comparison to CT and Bone Scintigraphy. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 50, n. 8, p. 1214–1221, ago. 2009.

RODNICK, M. E. et al. Synthesis of ^{68}Ga -radiopharmaceuticals using both generator-derived and cyclotron-produced ^{68}Ga as exemplified by [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 for prostate cancer PET imaging. **Nature Protocols**, v. 17, n. 4, p. 980–1003, 4 abr. 2022.

ROMERO, E. et al. Development and long-term evaluation of a new $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator based on nano-SnO₂ for PET imaging. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12756, 29 dez. 2020.

RÖSCH, F. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generators: Past, Present, and Future. Em: [s.l: s.n.]. p. 3–16.

ROSSI, R. E.; MASSIRONI, S. The Increasing Incidence of Neuroendocrine Neoplasms Worldwide: Current Knowledge and Open Issues. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 13, p. 3794, 30 jun. 2022.

RUIGROK, E. A. M. et al. The Future of PSMA-Targeted Radionuclide Therapy: An Overview of Recent Preclinical Research. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 560, 29 out. 2019.

RUIGROK, E. A. M. et al. Extensive preclinical evaluation of lutetium-177-labeled PSMA-specific tracers for prostate cancer radionuclide therapy. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, n. 5, p. 1339–1350, 23 maio 2021.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. New York, NY: Springer New York, 2010.

SARTOR, O. et al. Lutetium-177–PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 12, p. 1091–1103, 16 set. 2021.

SATPATI, D. et al. Convenient Preparation of [68Ga]DKFZ-PSMA-11 Using a Robust Single-Vial Kit and Demonstration of Its Clinical Efficacy. **Molecular Imaging and Biology**, v. 18, n. 3, p. 420–427, 16 jun. 2016.

SCHER, H. I. et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 13, p. 1187–1197, 27 set. 2012.

SCHURKO, B.; OH, W. K. Docetaxel chemotherapy remains the standard of care in castration-resistant prostate cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 5, n. 9, p. 506–507, 22 set. 2008.

SELVARAJU, R. K. **Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 202 [68 Ga]Exendin-4: Bench-to-Bedside PET molecular imaging of the GLP-1 receptor for diabetes and cancer.** [s.l: s.n.].

SHUKLA, S. FREEZE DRYING PROCESS: A REVIEW. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH**, v. 2, n. 12, p. 3061–3068, 2011.

SMITH, R. A. et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 3, p. 184–210, 15 maio 2019.

STEPHENSON, A. J. et al. Perspectives on the natural history of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy, based on the response to salvage radiotherapy. **BJU International**, v. 94, n. 9, p. 1210–1212, dez. 2004.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

SVEDJEHED, J.; PÄRNASTE, M.; GAGNON, K. Demystifying solid targets: Simple and rapid distribution-scale production of [68Ga]GaCl₃ and [68Ga]Ga-PSMA-11. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 104–105, p. 1–10, jan. 2022.

TANAKA, T. et al. Current Imaging Techniques for and Imaging Spectrum of Prostate Cancer Recurrence and Metastasis: A Pictorial Review. **RadioGraphics**, v. 40, n. 3, p. 709–726, maio 2020.

TANG, X. (CHARLIE); PIKAL, M. J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 191–200, fev. 2004.

TOUSSI, A. et al. Standardizing the Definition of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy—What Prostate Specific Antigen Cut Point Best Predicts a Durable Increase and Subsequent Systemic Progression? **Journal of Urology**, v. 195, n. 6, p. 1754–1759, jun. 2016.

TWOROWSKA, I. et al. Radiosynthesis of clinical doses of ⁶⁸Ga-DOTATATE (GalioMedix™) and validation of organic-matrix-based ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 43, n. 1, p. 19–26, jan. 2016.

USPENSKAYA, A. A. et al. The Importance of Linkers in the Structure of PSMA Ligands. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 268–298, jan. 2022.

VELIKYAN, I. et al. Robust labeling and comparative preclinical characterization of DOTA-TOC and DOTA-TATE. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 39, n. 5, p. 628–639, jul. 2012.

VELIKYAN, I. ⁶⁸Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12913–12943, 16 jul. 2015.

VIS, R.; LAVALAYE, J.; VAN DE GARDE, E. M. GMP-compliant ⁶⁸Ga radiolabelling in a conventional small-scale radiopharmacy: a feasible approach for routine clinical use. **EJNMMI Research**, v. 5, n. 1, p. 27, 24 dez. 2015.

VIVALDINI, B. F.; DE ARAÚJO, E. B. The influence of generator eluate in radiolabeling PSMA-11 kit with ⁶⁸Ga. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, v. 9, n. 1A, 30 abr. 2021.

WANG, L. et al. Somatostatin Receptor-Based Molecular Imaging and Therapy for Neuroendocrine Tumors. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1–2, p. 1–60, ago. 2000.

WASEEM, N.; APARICI, C. M.; KUNZ, P. L. Evaluating the Role of Theranostics in Grade 3 Neuroendocrine Neoplasms. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 7, p. 882–891, jul. 2019.

WEINEISEN, M. et al. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. **EJNMMI Research**, v. 4, n. 1, 2014.

WEINEISEN, M. et al. ^{68}Ga - and ^{177}Lu -Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, n. 8, p. 1169–1176, ago. 2015.

WERNER, R. A. et al. ^{68}Ga - and ^{90}Y -/ ^{177}Lu : “theranostic twins” for diagnosis and treatment of NETs. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 20 jan. 2015.

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. et al. Stability in the production and transport of ^{177}Lu labelled PSMA. **Brazilian Journal of Radiation Sciences**, v. 9, n. 1, 27 mar. 2021.

WIECZOREK VILLAS BOAS, C. A. et al. **In vitro and in vivo response of PSMA-617 radiolabeled with CA and NCA lutetium-177. Applied Radiation and Isotopes** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2022.

XU, C.; ZHANG, H. Somatostatin Receptor Based Imaging and Radionuclide Therapy. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

XU, Z. et al. Epidemiologic Trends of and Factors Associated With Overall Survival for Patients With Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors in the United States. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 9, p. e2124750, 23 set. 2021.

YU, H. et al. Development of single vial kits for preparation of ^{68}Ga -labelled hexavalent lactoside for PET imaging of asialoglycoprotein receptor. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 61, n. 12, p. 885–894, 3 out. 2018.

ZHAO, J.; GUERCIO, B. J.; SAHASRABUDHE, D. Current Trends in Chemotherapy in the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. **Cancers**, v. 15, n. 15, p. 3969, 4 ago. 2023.

ZHERNOSEKOV, K. P. et al. Processing of Generator-Produced ^{68}Ga for Medical Application. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 48, n. 10, p. 1741–1748, 1 out. 2007.

ANEXO A- Comitê de Ética a seguir



CERTIFICADO – SOLICITAÇÃO DE TROCA DE LINHAGEM

Certificamos que foi devidamente justificada a alteração de linhagem de camundongo referente ao projeto “Desenvolvimento farmacotécnico de kit liofilizado para pronta marcação com ⁶⁸Ga e avaliação pré-clínica”, registrado com o nº 225/18, sob a responsabilidade de Elaine Bortoleti de Araújo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em 11/08/2023.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Janeiro/2019 a Janeiro/2024
Espécie/linhagem/raça:	<i>Mus musculus</i> (camundongos Balb/c e Scid)
Nº de animais:	20 Balb/c 64 Scid
Peso/Idade:	5 semanas
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério do IPEN/CNEN-SP

São Paulo, 11 de agosto de 2023

Cibele Nunes Peroni
Coordenadora da CEUA/IPEN

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

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