

**Produção e Desenvolvimento de novos
radiofármacos marcados com Flúor 18 para o
diagnóstico de câncer**

Índice

1. Resumo	3
2. Introdução	4
2.1. Câncer	4
2.2. Imagem molecular.....	4
2.3. Imagem por PET/CT.....	5
2.4. Flúor-18.....	5
2.6. Radiofármacos consagrados marcados com Flúor-18	6
2.6.1. [¹⁸ F]-colina.....	6
2.6.2. [¹⁸ F]-FLT	7
2.6.3. Radiofármaco para hipóxia - [¹⁸ F]-FAZA.....	8
2.7. Radiofármacos inéditos marcados com Flúor-18	8
2.7.1. [¹⁸ F]-Losartan.....	8
3. Objetivos	10
3.1. Objetivos específicos	10
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1. Síntese da [¹⁸ F]-colina	11
4.2. Síntese do [¹⁸ F]-FLT.....	12
4.3. Síntese do [¹⁸ F]-FAZA.....	12
4.4. Síntese do ¹⁸ F-AMBF3-losartan	13
4.5. Controle de qualidade	13
4.5.1. Identidade radioquímica.....	13
4.5.2. Pureza radioquímica.....	13
4.5.3. Atividade específica	14
4.5.4. pH	14
4.6. Controle biológico	15
4.6.1. Endotoxinas bacterianas.....	15
4.6.2. Esterilidade	15
4.7. Estudo de Toxicidade de Dose Única (Aguda)	15
4.8. Estudos de Genotoxicidade	15
4.9. Estudo de Tolerância Local	16
4.10. Estudos de Interesse para a Avaliação da Segurança Farmacológica	16
4.11. Cultura de células.....	16
4.12. Estudo de captação celular específica	16
4.13. Experimentos de retenção celular e internalização	17
4.14. Estabelecimento de modelo tumoral <i>in vivo</i>	17
4.15. Estudos de biodistribuição	17
4.16. Estudos de biodistribuição por método não invasivo (μPET/SPECT/CT).....	17
5. Cronograma.....	19
6. Referências.....	20

1. Resumo

Radiofármacos são substâncias (fármacos, drogas ou produtos biológicos) marcadas com radionuclídeos, utilizados em Medicina Nuclear com finalidades terapêuticas e diagnósticas em diversas áreas, incluindo a oncologia. Nos últimos 50 anos, centros de pesquisa em Medicina Nuclear têm investido esforços no desenvolvimento e aplicações de novos radiofármacos no campo da medicina. Entretanto, atualmente no cenário nacional, o único radiofármaco para PET produzido no Brasil é um análogo da glicose (2-desoxi-2-¹⁸Fúor-**D**-glicose) marcado com Flúor 18 radioativo (¹⁸F-FDG). Embora o ¹⁸F-FDG seja utilizado com sucesso no diagnóstico por imagem molecular de vários tipos de câncer, alguns tumores apresentam localização e/ou características metabólicas que desfavorecem a sensibilidade e especificidade do ¹⁸F-FDG. No cenário mundial, os radiotraçadores [¹⁸F]-colina e [¹⁸F]-FLT têm se destacado com uma alternativa no diagnóstico de tumores para os quais o ¹⁸F-FDG apresenta limitações. Por outro lado, traçadores como o [¹⁸F]-FAZA, que permitem a detecção de áreas de hipoxia, tem se mostrado importantes para a determinação de regime terapêutico, seja por quimio ou radioterapia. Diante do exposto, o principal objetivo deste projeto é a produção e obtenção de registro de comercialização dos novos radiofármacos ([¹⁸F]-colina, [¹⁸F]-FLT e [¹⁸F]-FAZA) marcados com ¹⁸F para aplicação no diagnóstico molecular por imagem em oncologia. Além disso, propomos a síntese de radiofármacos inéditos que exploram a presença de novos receptores envolvidos na progressão tumoral. Cumpre ressaltar que todos os resultados obtidos durante a realização deste projeto farão parte de documentação a ser submetida à ANVISA como parte dos requisitos para obtenção do registro comercial.

2. Introdução

2.1. Câncer

Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. A estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A elevada taxa de mortalidade do câncer se deve, principalmente, ao diagnóstico tardio da doença. Portanto, existe uma grande necessidade de desenvolver novas ferramentas de diagnóstico moleculares que possam ajudar a detectar células cancerosas o mais precocemente possível.

2.2. Imagem molecular

Atualmente, a identificação, diagnóstico e tratamento da grande maioria dos cânceres dependem de técnicas que geram imagens anatômicas dos tumores, como ultrassom, tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Essas técnicas clássicas de imagem detectam as patologias baseando-se na identificação de distorções anatômicas de estruturas e comparando-as com as estruturas normais. Tais mudanças morfológicas, entretanto, são consideradas como produtos finais de uma série de complexas modificações moleculares, que derivam da oncogênese. Consequentemente, uma vez que alterações bioquímicas precedem as alterações anatômicas, o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de detectar os tumores em estágios iniciais da doença tem sido alvo de grande interesse pela comunidade científica. Essa mudança de paradigma tem sido estimulada pelos avanços das áreas de Genômica e Proteômica, que por sua vez abriram caminho para o surgimento de uma nova disciplina chamada “Imagem Molecular”.

A imagem molecular consiste na detecção não invasiva e na medição de processos celulares e moleculares em pacientes utilizando uma variedade de modalidades, incluindo a tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia por emissão de fóton único (SPECT), ressonância magnética (RM), tomografia

computadorizada (CT), ultra-som, fluorescência ou bioluminescência. A imagem molecular tem-se tornado uma ferramenta cada vez mais indispensável na pesquisa do câncer, ensaios pré-clínicos e na prática médica pois a maioria das técnicas de imagem são não invasivas, fornecem dados em tempo real e permitem medidas repetidas. Além do mais, o diagnóstico por imagem permite uma detecção mais precoce, estadiamento, seleção de terapia, planejamento e monitoramento da resposta ao tratamento, levando a uma melhora considerável na terapia contra o câncer.

2.3. Imagem por PET/CT

O diagnóstico não invasivo e a medição de processos celulares e moleculares em pacientes com câncer por imagem PET associado ao CT tem permitido uma melhora considerável na terapia contra o câncer. A técnica PET utiliza radionuclídeos emissores de pósitrons (β^+) e permite avaliar qualitativa e quantitativamente a biodistribuição *in vivo* de um radiofármaco (Wahl *et al*, 2011). A base da imagem é a detecção simultânea de dois fótons de 511 keV emitidos em sentido oposto, resultantes da aniquilação do pósitron com o elétron do tecido nas proximidades (Chatziioannou, 2005). Uma das maiores vantagens da imageologia pela tecnologia PET é que os radionuclídeos para PET (^{11}C , ^{13}N , ^{18}F , ^{64}Cu) podem ser rapidamente produzidos por ciclotrons ou por geradores como por ex $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ e incorporados em moléculas de interesse biológico (Pysz *et al*, 2010). A facilidade na instalação de ciclotrons e o gerenciamento de rejeitos radioativos quando comparado às instalações de reatores nucleares permite que essa tecnologia possa ser utilizada em qualquer país. Quando essa tecnologia foi descoberta no final da década de 1960 ficou confinada aos laboratórios de pesquisas, mas já na década de 1990 a tecnologia PET começou a ser utilizada para estudos em neurologia, cardiologia e oncologia em hospitais e clínicas de vários países devido a uma facilidade de marcação de moléculas com radioisótopos, alta resolução e acurácia e, sua habilidade em monitorar o comportamento e circulação de radiofármacos no organismo. (Welch *et al*, 1991).

2.4. Flúor-18

O flúor-18 (^{18}F) é um radionuclídeo emissor β^+ que apresenta as propriedades físicas e nucleares mais favoráveis para a imagem PET: 97 % de decaimento β^+ , baixa energia máxima do pósitron emitido (635 keV) e meia-vida relativamente curta de 109,7 min (Jacobson *et al*, 2014). A baixa energia dos pósitrons resulta em uma

penetração reduzida dos pósitrons no tecido (aproximadamente 1 mm), o que favorece a resolução da imagem PET com menor dose de radiação para o paciente (Wahl *et al*, 2011). Sua meia-vida permite um maior tempo de análise *in vivo* em comparação com outros radionuclídeos β^+ como o carbono-11.

Na década de 1990 muitos países já produziam radiofármacos marcados com flúor-18 como $^{18}\text{F-NaF}$, $^{18}\text{F-FDG}$, $^{18}\text{F-DOPA}$ e com o passar dos anos mais moléculas marcadas com flúor-18 foram sendo produzidas, muitas delas para a área de diagnóstico em oncologia (Welch *et al*, 1991). Hoje em dia, mais de 90% das pesquisas clínicas na detecção de neoplasias malignas utilizam o [^{18}F]-fluorodeoxiglicose ([^{18}F]FDG). O [^{18}F]FDG é um análogo de glicose marcado com flúor-18 que permite a detecção de células neoplásicas devido a seu metabolismo de glicose frequentemente aumentado, e conseqüentemente, a captação aumentada do radiotraçador (Treglia *et al*. 2014). No entanto, este radiofármaco tem-se demonstrado pouco específico no diagnóstico de alguns tumores, possuindo alta captação em locais inflamatórios e órgãos saudáveis levando por vezes ao aparecimento de resultados falsos-positivos (Jacobson *et al*, 2012). Dessa forma, o interesse por agentes de imagem alternativos com capacidade de ligação específica, a receptores, antígenos e enzimas têm ganhado cada vez mais interesse na comunidade científica.

2.6. Radiofármacos consagrados marcados com Flúor-18

O Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN começou a produzir $^{18}\text{F-FDG}$ e $^{18}\text{F-NaF}$ em 1997 e 2009 respectivamente e, desde então, esses radiotraçadores são produzidos e comercializados rotineiramente pelo CR. Entre a descoberta da importância da utilização do $^{18}\text{F-FDG}$ e os dias atuais, muitas moléculas marcadas com flúor-18 foram desenvolvidas e validadas para o diagnóstico de câncer em centros de pesquisa no exterior. Dentre essas moléculas já consagradas encontram-se por exemplo, as moléculas [^{18}F]-colina, [^{18}F]-FLT e [^{18}F]-FAZA. Atualmente, o CR vem investindo esforços na padronização do processo de produção dessas moléculas e na obtenção de registro para comercialização das mesmas.

2.6.1. [^{18}F]-colina

A [^{18}F]-colina é um agente promissor de diagnóstico para uso em Tomografia de Emissão de Pósitrons (PET), superando a atualmente utilizada ^{11}C -colina, que possui uma meia vida curta, em torno de 20 minutos, o que limita seu uso a locais que não tenham o próprio ciclotron para produzi-la (Ceci *et al*, 2016).

A [^{18}F]-colina é principalmente conhecida por sua importância no diagnóstico de câncer de próstata, devido à avidéz apresentada a esse órgão, o que permite sua captação e alta concentração, resultando em imagens com qualidade elevada para serem utilizadas no diagnóstico em oncologia. O uso diagnóstico da [^{18}F]-colina para avaliação de tumores em outros locais do corpo também tem sido bem estudado. Por sua distribuição ser dependente da corrente sanguínea, a [^{18}F]-colina consegue atingir rapidamente diferentes órgãos, como o cérebro (sendo útil na identificação de gliomas), fígado, ossos, mamas, linfonodos pélvicos, permanecendo nestes órgãos somente em condições de malignidade, definindo uma especificidade de diagnóstico. Estudos com o uso da [^{18}F]-colina mostram que ela pode ser importante na detecção de gliomas, formações benignas, metástases mesmo que distantes e até mesmo no monitoramento da terapia (Gulyás and Halldin, 2012).

2.6.2. [^{18}F]-FLT

O [^{18}F]-FLT ([^{18}F]-Fluortimidina ou Fludesoxitimidina) é um análogo nucleosídico da timidina e, um dos blocos construtores dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA). A etapa inicial do metabolismo da timidina é a fosforilação da desoxitimidina, que é catalisada pela enzima timidina quinase 1 (TK1) (Been *et al*, 2004). Em células que não estão no estado de divisão celular, a enzima TK1 tem sua atividade praticamente nula, mas em células em divisão atinge a sua atividade máxima no final da fase G1 e durante a fase S do ciclo celular. Em alguns estudos foi possível verificar que a atividade da enzima TK1 é de três a quatro vezes maior em células malignas que em células benignas (Boothman *et al*, 1994). Este fator se mostra atrativo não só para a imagem de tumores, mas também para a avaliação precoce da resposta tumoral frente à quimio e radioterapia (Been *et al*, 2004).

O [^{18}F]-FLT é um radiofármaco já consagrado que tem sido apresentado como uma outra alternativa ao [^{18}F]-FDG. Muitos dos estudos com o [^{18}F]-FLT têm sido feitos a fim de detectar a resposta tumoral frente à quimioterapia e/ou radioterapia. Por exemplo, em um estudo com 20 pacientes, Contractor e colaboradores (Contractor *et al*, 2011) observaram mudanças na proliferação de tumor de mama utilizando o [^{18}F]-FLT após o início da quimioterapia com docetaxel, apresentando uma alta sensibilidade. No acompanhamento radioquimioterápico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, as imagens PET com [^{18}F]-FLT também apresentaram um grande potencial para prever as respostas terapêuticas e identificar pacientes que precisavam de um rigoroso acompanhamento a fim de detectar doença persistente ou recorrente (Kishino *et al*, 2012). De fato, alguns

estudos revelam que o [¹⁸F]-FLT tem se mostrado um marcador mais câncer-específico que o [¹⁸F]-FDG (Chareonthaitawee *et al*, 2002; van Waarde *et al*, 2004).

2.6.3. Radiofármaco para hipóxia - [¹⁸F]-FAZA

A hipóxia é uma condição patológica do tecido vivo que ocorre quando o suprimento de oxigênio não cobre adequadamente a demanda metabólica celular. Atualmente, sabe-se que até 60% dos tumores sólidos em estágios avançados apresentam áreas com oxigenação reduzida (hipóxia) ou suprimento de oxigênio quase ausente (anóxia) (Eales *et al*, 2016). A detecção deste fenômeno em tumores é de máxima relevância clínica, pois o aumento da agressividade do tumor, da probabilidade de propagação metastática, da taxa de recorrência e, o pior prognóstico estão todos associados à presença de hipóxia no microambiente tumoral (Dhani *et al*, 2015).

Sabe-se atualmente que tumores hipóxicos são mais difíceis de tratar, tendo maior resistência à terapia por radiação (Li *et al*, 2014). Assim sendo, é fundamental quantificar a extensão da hipóxia devido às suas implicações na resposta às terapias e também para determinar o modo e tipo de terapia mais adequado para cada paciente.

Ensaio pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que o [¹⁸F]-FAZA apresenta uma captação seletiva em áreas de hipóxia no microambiente tumoral (Tran *et al*, 2012). De fato, recentemente, foi verificado que o [¹⁸F]-FAZA é um indicador de prognóstico importante em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço submetidos a quimiorradioterapia (Saga *et al*, 2017).

2.7. Radiofármacos inéditos marcados com Flúor-18

Um objetivo central na pesquisa do câncer é identificar novos alvos moleculares para diagnóstico e possíveis intervenções terapêuticas. Dessa forma, o interesse por agentes alternativos para imagem com capacidade de ligação específica, por exemplo, a receptores, antígenos, enzimas têm ganhado cada vez mais interesse na comunidade científica. Neste contexto, o losartan tem surgido como uma possível molécula a ser investigada como radiofármaco para o diagnóstico de câncer.

2.7.1. [¹⁸F]-Losartan

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é um sistema circulante hormonal centrado no peptídeo ativo Angiotensina II (Ang II) que produz a maioria das respostas fisiológicas através do receptor tipo 1 (do inglês, AT1R). Nos últimos dez anos tem havido um aumento gradual do número de publicações no PubMed e Scopus referentes à expressão do AT1R em diversos modelos tumorais. A expressão do receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1R) tem sido descrita em diversos tipos de tumores, demonstrando correlação com um maior índice de proliferação, angiogênese, migração e invasão da célula tumoral. A expressão do AT1R foi reportada em linhagens tumorais humanas e tecidos tumorais de pacientes com câncer de mama, próstata, pâncreas, bexiga, gástrico, glioblastoma, carcinoma do ovário, carcinoma cervical e carcinoma endometrial (Chaudhary and Chaudhary 2017). Portanto, o losartan (antagonista específico do receptor AT1) pode constituir um alvo de interesse no diagnóstico de tumores com expressão aumentada desse receptor.

3. Objetivos

Este projeto visa padronizar o método de produção e a obtenção do registro para comercialização no Brasil de novos radiofármacos para diagnóstico de câncer. Os radiofármacos ($[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT e $[^{18}\text{F}]$ -FAZA), já são consagrados na medicina nuclear, ainda não são comercializados no Brasil. Além disso, pretende-se desenvolver a síntese inédita de novos radiotraçadores com Flúor-18 para o diagnóstico de câncer.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Padronização da síntese e caracterização de $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan

3.1.1.1. Síntese de $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan

3.1.1.2. Controle de qualidade do processo de obtenção dos radiofármacos (identidade e pureza radioquímica, atividade específica, pH)

3.1.1.3. Controle biológico (esterilidade)

3.1.1.4. Estudo de Toxicidade de Dose Única (Aguda)

3.1.1.5. Estudos de Genotoxicidade

3.1.1.6. Estudo de Tolerância Local

3.1.1.7. Estudos de Interesse para a Avaliação da Segurança Farmacológica

3.1.2. Avaliação *in vitro* da ligação de $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan com células tumorais

3.1.2.1. Estudo de captação celular específica

3.1.2.2. Estudo de retenção celular e internalização

3.1.3. Avaliação *ex-vivo* da ligação de $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan a tumores

3.1.3.1. Estabelecimento de tumores em camundongos Balb/c nude

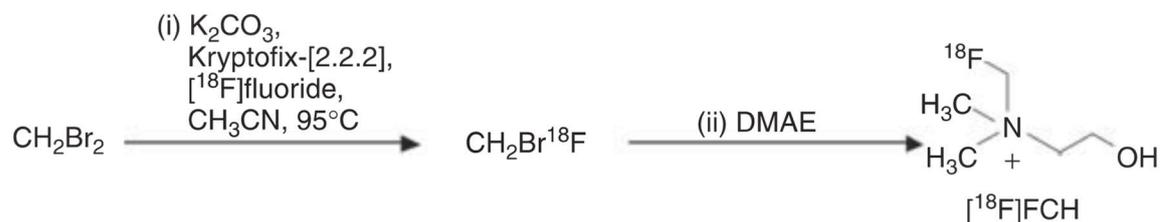
3.1.3.2. Estudos da biodistribuição e farmacocinética

3.1.4. Estudos *in vivo* com $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan

4.1. Estudos por imagem PET/CT da ligação $[^{18}\text{F}]$ -colina, $[^{18}\text{F}]$ -FLT, $[^{18}\text{F}]$ -FAZA e $[^{18}\text{F}]$ -losartan em modelos tumorais

4. Materiais e Métodos

4.1. Síntese da [¹⁸F]-colina



Síntese da [¹⁸F]Fluorcolina.

O fluoreto ¹⁸F é produzido pela reação nuclear do ¹⁸O(p,n)¹⁸F no ciclotrón (Cyclone 18), utilizando um feixe de prótons de 30 MeV. A água ¹⁸O enriquecida (átomo 97%+) foi adquirida da Marshall Isotope (Tel Aviv, Israel). A produção do radionuclídeo é totalmente automatizada e as condições típicas de irradiação geralmente dependem da necessidade real e são definidas caso a caso. Para produção de [¹⁸F]-colina o alvo é geralmente bombardeado com 75µA por 120 min para gerar aproximadamente 8.1Ci (300GBq) de fluoreto 18F. O fluoreto ¹⁸F é transportado para o módulo de síntese da TRACERlab MXFDG onde é preso a um cartucho QMA-Light Sep-Pak®. O fluoreto ¹⁸F é então eluído para a um frasco de reação com uma mistura de K_2CO_3 (22 mg em 0.3 mL H_2O) e Kryptofix-[2.2.2] (7 mg in 0.3 mL acetonitrila). O fluoreto ¹⁸F é seco por destilação azeotrópica a 85°C utilizando três adições sucessivas de acetonitrila (0.7 mL). A solução de dibromometano (CH_2Br_2) (300 µL) diluída em acetonitrila (3 ml) é adicionado ao fluoreto ¹⁸F seco. O frasco da reação é então aquecido a 95°C por 300s de forma a produzir o [¹⁸F]fluorbromometano ($\text{CH}_2\text{Br}^{18}\text{F}$). O [¹⁸F]fluorbromometano é isolado do dibromometano e do fluoreto 18F por destilação utilizando 3 cartuchos de sílica Sep-Pak Plus sob nitrogênio (35 mL/min) vacuum (100 mbar). O [¹⁸F]fluorbromometano reage então com dimetilamino etanol (DMAE) (400 µL) previamente adicionado em um cartucho C18 Sep-Pak® Plus. A [¹⁸F]Fluorcolina sintetizada é então removida do cartucho C18 Sep-Pak® Plus para um cartucho de troca iônica CM Sep-Pak® Plus com 10 mL de etanol. O cartucho é lavado com 15 mL de água e o produto final eluído por via de um filtro estéril com 3mL de salina isotônica para um frasco e encaminhado para o controle de qualidade.

4.2. Síntese do [¹⁸F]-FLT

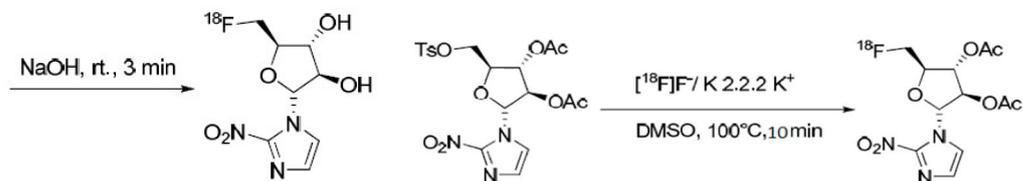
A síntese do [¹⁸F]-FLT será realizada utilizando-se o módulo automatizado modelo TRACERlab MX (GE), ao qual será instalado com um cassete contendo um sistema de purificação por cartuchos compactados de resina.

O fluoreto ¹⁸F, produzido como descrito acima, será capturado em cartucho de troca iônica (QMA) e eluído com bicarbonato de tetrabutilamônio (TBA HCO₃) para o reator. Após evaporação para eliminação da água residual, 25 mg do precursor N-BOC protegido em 2 mL de acetonitrila serão adicionados à mistura reacional e a temperatura será elevada a 100°C por 5 minutos para o processo de radiomarcção. Após a marcação, será realizada uma hidrólise ácida dos grupos de proteção do precursor com HCl 2 M. A mistura reacional será purificada em cartucho de troca catiônica forte (CHROMAFIX Clean-up PS-H+) e cartucho de fase reversa (HLB) e, finalmente, o produto será eluído e esterilizado com filtro esterilizante de 0,2 µm. Ao final de cada processo de produção, o produto será fracionado dentro de uma cela de processamento específica. Após o fracionamento, os frascos do tipo 1 contendo uma quantidade determinada de produto são acondicionados em blindagens específicas e, então, encaminhados para análises de controle de qualidade e demais ensaios pertinentes.

4.3. Síntese do [¹⁸F]-FAZA

A síntese do ¹⁸F-FAZA será realizada conforme demonstrado no Esquema abaixo. Inicialmente, uma amostra de 1,5 mL do íon ¹⁸F-Fluoreto (¹⁸F⁻) (proveniente do Cíclotron), será passada através de uma coluna de troca iônica (SEP-PAK light, Waters Accell Plus QMA, USA). Em seguida, o íon ¹⁸F⁻ será eluído do cartucho QMA lentamente com uma mistura de Kryptofix 2.2.2 em acetonitrila e K₂CO₃. Para garantir a eliminação de água residual, a solução será submetida a três ciclos de destilação azeotrópica com acetonitrila (1mL) a 100 °C. Em seguida será adicionado ao frasco uma solução do precursor 1-(2,3-Diacetil-5-tosil-(α-D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol (5 mg, 10,2mmol) em 400 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a mistura será aquecida por 10 minutos a 100 °C. Após resfriamento do frasco da reação, a mistura será então diluída com água Milli Q e passada através de um cartucho de fase reversa Plus C-18. O cartucho C18 será eluído com 1,5 mL de metanol e o ¹⁸F-FAZA acetilado será transferido para outro frasco. A etapa de desproteção será realizada através da adição de solução de NaOH 0.1 M (1 mL) por 3 minutos à temperatura ambiente, obtendo-se finalmente o ¹⁸F-FAZA. A pureza radioquímica será determinada por HPLC: Fase estacionária: Agilent C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 µ , 100

Á. Fase móvel: Solvente (A) Água Milli Q + 0,1%TFA, Solvente (B) 100% Acetonitrila. Gradiente: de 10% a 100% de Acetonitrila em 30 min. Fluxo: 1mL/min. Comprimento de onda: 300 nm.



Obtenção do ^{18}F -FAZA □

4.4. Síntese do ^{18}F -AMBF3-losartan

O análogo do losartan [19F]-Ammoniumethyl-trifluoroborate-losartan (19F-AMBF3-losartan) e seu composto marcado serão preparados com base em metodologias descritas na literatura (Liu *et al*, 2014). O composto padrão será sintetizado por uma reação de cicloadição azido-alcino catalisada por cobre I a 45°C por duas horas e, purificado por HPLC semi-preparativa. A seguir, o mesmo composto padrão será marcado com ^{18}F em meio aquoso por um mecanismo de troca isotópica ^{19}F - ^{18}F para obter o composto marcado [^{18}F]-AMBF3-losartan. O radiotraçador será purificado utilizando apenas uma coluna Sep-pak Light C18.

4.5. Controle de qualidade

4.5.1. Identidade radioquímica

A medição da meia-vida é um método mais confiável para a confirmação da presença de ^{18}F . A medição da meia-vida pode ser realizada através da medição em calibrador de dose em dois ou mais intervalos de tempo. A meia-vida é então calculada aplicando-se os dados à equação de decaimento da radioatividade. O intervalo de tempo entre cada medição deve ser suficientemente longo para permitir um decaimento significativo da radioatividade. Tem sido relatado que o período mínimo de decaimento pode ser 10, 20 ou 30 min. Ao mesmo tempo, os resultados deste método também podem sugerir a identidade radionuclídica.

4.5.2. Pureza radioquímica

A pureza radioquímica pode ser confirmada por HPLC ou TLC. É um dos parâmetros mais importantes a ser em conta para realizadas controle de qualidade de radiofármacos. Este parâmetro determina o nível de radioatividade (%) incorporada

pelo traçador. Para isso, é necessário efetuar separação precisa das espécies radioquímicas presentes, o que permitirá sua posterior quantificação. Um radiofármaco pode ser injetado no corpo humano apenas se a sua pureza radioquímica for superior a 95 % (S Yu , 2006). Baixa pureza radioquímica acarretará alterações no padrão de biodistribuição do radiofármaco, afetando a eficiência diagnóstica do mesmo. Para calcular a pureza radioquímica (%), a radioatividade obtida para o produto purificado (¹⁸F-Fluoretil melatonina) será dividida pela radioatividade total injetada em HPLC, e multiplicada por 100.

A cromatografia em camada delgada (TLC) é um método mais fácil e tão confiável como o HPLC para o monitoramento de reações químicas. No entanto, a TLC pode demorar mais tempo. A fase estacionária é TLC TLC - SG e a fase móvel é acetonitrila: água (95 % : 5 % v / v) . O R_f da livre ¹⁸F é 0 (S Yu , 2006) e do ¹⁸F-Fluoretil melatonina será lido com a fase móvel . Por conseguinte, é importante usar o mesmo tipo de placa de TLC - SG e fase móvel recentemente preparada, se possível. O tamanho do ponto deverá ser de cerca de 2 a 5 mL (S Yu , 2006) . Deve ser seco e colocado acima do nível da fase móvel.

4.5.3. Atividade específica

A atividade específica será determinada por injeção de uma alíquota do produto em comparação a área do pico de absorbância de UV para uma quantidade conhecida do produto padrão. Em primeiro lugar, um volume específico de padrão de concentração conhecida (em g /ml) será injetado em HPLC analítica e a área sob a curva de UV avaliada. Em segundo lugar, uma alíquota da formulação do produto que contenha uma quantidade conhecida de atividade (uCi) será injetado e a absorbância de UV avaliada. A quantidade de massa fria no produto será determinada pela comparação das duas absorbâncias em UV, tendo em conta a quantidade de padrão injetado. Como a atividade específica é tipicamente apresentada em unidades de atividade por mole, a quantidade de padrão deve ser convertida em moles, calculados dividindo-se a massa (em g) pelo peso molecular (MW, em g / mol).

4.5.4. pH

O valor de pH de um injetável deve ser o mais próximo do pH fisiológico possível e ajustado com solução de bicarbonato de sódio, se necessário. Alguns laboratórios usam fitas de papel para medir o pH, enquanto outros usam medidores de pH eletrônicos.

4.6. Controle biológico

4.6.1. Endotoxinas bacterianas

O teste de formação de gel do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) será utilizado para a realização deste teste. O critério de aceitação é $< 175V$ IU/mL (sendo V o volume máximo a ser utilizado na preparação de uma única dose para paciente).

4.6.2. Esterilidade

O teste de esterilidade será realizado em condições assépticas em meio de tioglicolato fluído (utilizado para cultura de bactérias anaeróbicas e aeróbicas) e meio de caseína soja (TSB), adequado para cultura de fungos e bactérias aeróbicas.

4.7. Estudo de Toxicidade de Dose Única (Aguda)

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. **Modelo animal a ser estudado:** Devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos por via endovenosa. **Dosagem:** A dose limite a ser testada será de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. **Período de Observação:** No mínimo 14 dias após a administração da substância teste. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes. Posteriormente, no mínimo uma vez ao dia.

4.8. Estudos de Genotoxicidade

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas. Neste caso serão realizados:

- 1- Um teste para mutação gênica em bactéria,
- 2- Um teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (teste de aberrações cromossômicas *in vitro* ou teste de micronúcleo *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação gênica em células tk de linfoma de camundongo,
- 3- Um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores, podendo ser micronúcleos ou aberrações cromossômicas.

4.9. Estudo de Tolerância Local

O objetivo destes estudos é saber se as substâncias (princípios ativos e excipientes) são toleradas em locais do corpo que poderão entrar em contato com o produto em consequência da sua administração na prática clínica. Neste caso serão realizados:

1. Testes de Tolerância no Local de Administração
2. Teste de Toxicidade Sistêmica
3. Testes de Tolerância para Vias Específicas de Administração D. Potencial de Sensibilidade

4.10. Estudos de Interesse para a Avaliação da Segurança Farmacológica

Estes estudos são aqueles que pesquisam os potenciais efeitos farmacodinâmicos indesejáveis da substância teste nas funções fisiológicas dos diversos sistemas orgânicos em relação ao nível de exposição. A partir desses estudos são avaliadas funções vitais desenvolvidas pelos sistemas: nervoso central, cardiovascular e respiratório. Quando necessário, deve-se também avaliar o sistema urinário, nervoso autônomo, digestório, endócrino, imune e muscular esquelético.

4.11. Cultura de células

As células de câncer próstata humana (PC-3, ATCC: CRL1435), mama (MDA-MB-231, ATCC: HTB-26,), pâncreas (PANC-1, ATCC: CRL-1469 e MiaPACA2, ATCC: CRL-1420), gástrico (MKN45, JCRB0254) ou melanoma (SKmel-37, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, N. Y., USA), serão mantidas em meio DMEM ou RPMI (Invitrogen). Todas as linhagens serão suplementadas com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e gentamicina (50 µg/mL) (GIBCO). As células serão mantidas a 37°C com 5% CO₂.

4.12. Estudo de captação celular específica

Brevemente, 2×10^5 células serão plaqueadas em placas de 6 poços um dia antes do ensaio. Para determinar a captação específica celular, um grupo de células será bloqueada 30 min antes do ensaio com o radiofármaco não radioativos (um excesso de 200 vezes) e posteriormente incubadas com 3,7 KBq de cada um dos radiofármacos a 37°C durante 1 hora. Em seguida, as células serão lavadas com PBS a fim de remover a radiofármaco não ligada e lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH. As células recolhidas serão medidas num contador-γ.

4.13. Experimentos de retenção celular e internalização

Para avaliar a internalização celular, 2×10^5 células serão plaqueadas em placas de 6 poços um dia antes do ensaio. De seguida, as células serão incubadas com o radiofármaco a 4°C. Ao final de 1 hora, o meio será removido e as células serão lavadas com meio de cultura sem soro gelado. 1mL de meio de cultura completo será adicionado a cada poço e as células serão posteriormente incubadas a 37°C em estufa com 5% CO₂. Ao fim de 0, 30 min, 1, 2 e 24 horas, um grupo de células será removido da estufa, o meio será colectado e as células serão lavadas com meio de cultura sem soro gelado. Para remover a radioatividade ligada à membrana celular, as células serão incubadas com 1 mL de tampão ureia-citrato (8M urea, 0.1M sodium citrate, 3mM EDTA, pH 8.0), por 5 min no gelo e esta solução será colectada. As células serão novamente lavadas com 1mL de PBS gelado e lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH. As frações ligadas à membrana e internalizadas serão medidas num contador-γ.

4.14. Estabelecimento de modelo tumoral *in vivo*

Camundongos Balb/c nude serão criados no biotério do IPEN e todos os experimentos serão realizados de acordo com as diretrizes relevantes e com o comitê de ética animal local aprovado. Quando os animais atingirem entre 6 a 8 semanas, as células tumorais serão inoculadas subcutâneamente na presença de 20% de Matrigel. Cada grupo consistirá de 5 animais. Quando os tumores atingirem aproximadamente 0,8 cm³, os ensaios de biodistribuição ou imageamento serão realizados.

4.15 Estudos de biodistribuição

Para os ensaios de biodistribuição, 1-2 MBq de ¹⁸F-Colina, ¹⁸F-FLT, ¹⁸F-FAZA ou ¹⁸F-losrtan, serão injetados na veia caudal de camundongos Balb/c nude saudáveis ou previamente inoculado com as células tumorais. Ao final de 1, 4 e 6 horas os animais serão sacrificados e os órgãos de interesse incluindo o tumor serão excisados. A radioatividade de cada órgão de interesse será medida em um contador-γ e a %ID/g será calculada.

4.16. Estudos de biodistribuição por método não invasivo (μPET/SPECT/CT)

Para o ensaio no microPET, 10-25 MBq de ¹⁸F-Colina, ¹⁸F-FLT, ¹⁸F-FAZA ou ¹⁸F-losrtan serão injetados na veia caudal de animais Balb/c nude saudáveis ou

previamente inoculado com células tumorais e analisados ao final de 1 hora. Os animais serão anestesiados com isoflurano por inalação (concentração inicial 0.5%-anestesia geral 1 a 1.87%), colocados na câmara de escaneamento e analisados no microPET/SPECT/CT (microPET focus 220 siemens) no centro de radiofarmácia do IPEN. Os ROI's e as atividades nos órgãos (%DR) serão obtidos utilizando-se o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich).

6. Referências

1. Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH. [18F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Dec;31(12):1659-72.
2. Boothman DA, Davis TW, Sahijdak WM. Enhanced expression of thymidine kinase in human cells following ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 Sep 30;30(2):391-8.
3. Ceci F, Castellucci P, Mapelli P, Incerti E, Picchio M, Fanti S. Evaluation of Prostate Cancer with 11C-Choline PET/CT for Treatment Planning, Response Assessment, and Prognosis. *J Nucl Med*. 2016 Oct;57(Suppl 3):49S-54S.
4. Chareonthaitawee P, Schaefer K, Baker CS, Turkheimer F, Stegger L, Banner NR, Yacoub M, Bonser RS, Iozzo P, Camici PG, Rimoldi O. Assessment of infarct size by positron emission tomography and [18F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: a new absolute threshold technique. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002 Feb;29(2):203-15.
5. Chatziioannou AF. Instrumentation for molecular imaging in preclinical research: Micro-PET and Micro-SPECT. *Proceedings of the American Thoracic Society, Los Angeles, California, v.2, n.6, p. 533-536, 2005.*
6. Chaudhary M, Chaudhary S. Unravelling the Lesser Known Facets of Angiotensin II Type 1 Receptor. *Curr Hypertens Rep*. 2017 Jan;19(1):1.
7. Contractor KB, Kenny LM, Stebbing J, Rosso L, Ahmad R, Jacob J, Challapalli A, Turkheimer F, Al-Nahhas A, Sharma R, Coombes RC, Aboagye EO. [18F]-3'-deoxy-3'-fluorothymidine positron emission tomography and breast cancer response to docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7664-72.
8. Dhani N, Fyles A, Hedley D, Milosevic M. The clinical significance of hypoxia in human cancers. *Semin Nucl Med*. 2015. 45:110–121.
9. Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*. 2016 Jan 25;5:e190.
10. Gulyás B, Halldin C. New PET radiopharmaceuticals beyond FDG for brain tumor imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2012 Apr;56(2):173-90.
11. Kishino T, Hoshikawa H, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Mori N. Usefulness of 3'-deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET for predicting early response to chemoradiotherapy in head and neck cancer. *J Nucl Med*. 2012 Oct;53(10):1521-7.
12. Liu, Zhibo, et al. "An Organotrifluoroborate for Broadly Applicable One-Step 18F-Labeling." *Angewandte Chemie International Edition* 53.44 (2014): 11876-11880.
13. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. 2015.
14. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular Imaging: Current Status and Emerging Strategies. *Clin Radiol*. 2010; 65: 500–516.
15. Saga T, Inubushi M, Koizumi M, Yoshikawa K, Zhang MR, Obata T, Tanimoto K, Harada R, Uno T, Fujibayashi Y. Prognostic value of PET/CT with (18)F-fluoroazomycin arabinoside for patients with head and neck squamous cell carcinomas receiving chemoradiotherapy. *Ann Nucl Med*. 2016 Apr;30(3):217-24.
16. Tran LB, Bol A, Labar D, Jordan B, Magat J, Mignon L, Grégoire V, Gallez B. Hypoxia imaging with the nitroimidazole 18F-FAZA PET tracer: a comparison with OxyLite, EPR oximetry and 19F-MRI relaxometry. *Radiother Oncol*. 2012 Oct;105(1):29-35.

17. Treglia, G.; sadeghi, R.; del sole, S.; giovanella, L. Diagnostic performance of PET/CT with tracers other than F-18-FDG in oncology: an evidence-based review. *Clinical and Translational Oncology*, v.16, n.9, p.770-775, 2014.
18. van Waarde A, Cobben DC, Suurmeijer AJ, Maas B, Vaalburg W, de Vries EF, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH. Selectivity of 18F-FLT and 18F-FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med*. 2004 Apr;45(4):695-700.
19. Wahl, RL, Herman JM, Ford E. The Promise and Pitfalls of Positron Emission Tomography and Single-Photon Emission Computed Tomography Molecular Imaging–Guided Radiation Therapy. *Seminars in Radiation Oncology*, v. 21, n. 2, p. 88-100, 2011.
20. Welch MJ, Mathias CJ, McGuire A. Positron emission tomography. Present status and future prospectives. *Acta Radiol Suppl*. 1991;376:24-30.