



AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA ESTABILIDADE RADIOQUÍMICA *IN-VITRO* DO NOVO RADIOFÁRMACO PSMA-1007 (18F)

Irene P. F. Côrtes¹, Caio B. Andrade², Marina B. Silveira¹

¹Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-90; irenedepaulacortes@gmail.com; mbs@cdtn.br;

²Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-90; caiobarbosaandrade@gmail.com

Palavras-Chave: Estabilidade radioquímica; PSMA-1007 (18F); Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

RESUMO

O radiofármaco PSMA-1007 (18F) representa um avanço significativo na detecção e estadiamento do câncer de próstata devido à sua alta afinidade pelo antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), o que possibilita imagens precisas dos tumores por meio da tomografia por emissão de pósitrons (PET). A administração intravenosa do PSMA-1007 (18F) requer que o radiofármaco mantenha sua estabilidade no sangue para garantir sua eficácia diagnóstica. O presente estudo realizou a avaliação da estabilidade radioquímica do PSMA-1007 (18F) em soro fetal bovino (SFB), simulando condições que replicam o ambiente sanguíneo. Durante o estudo, a estabilidade do radiofármaco foi monitorada ao longo de 120 minutos em duas temperaturas distintas de incubação (37°C e 4°C) a partir de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após o período de incubação, as proteínas na solução foram precipitadas, resultando em um pellet (proteínas do SFB e a porção radiofármaco ligado) e um sobrenadante turvo (radiofármaco livre e fase aquosa do SFB). O sobrenadante foi então filtrado e analisado quanto à estabilidade radioquímica por CLAE, utilizando detectores ultravioleta e de radioatividade. A análise dos cromatogramas revelou que a estabilidade radioquímica do PSMA-1007 (18F) foi mantida em 100% em ambas as temperaturas testadas, sugerindo uma alta estabilidade segundo às condições simuladas ao longo dos intervalos de tempo avaliados. A identificação do PSMA-1007 (18F) foi comprovada por comparação do tempo de retenção do padrão de referência. As impurezas detectadas no ultravioleta foram consideradas desprezíveis conforme especificação farmacopeica. Os resultados evidenciados neste estudo pré-clínico são um indicativo congruente à estabilidade observada *in-vivo*, contribuindo com a eficácia e segurança do PSMA-1007 (18F) em aplicações clínicas. Estes achados são consonantes para o desenvolvimento contínuo do radiofármaco como uma ferramenta importante na oncologia, especificamente no diagnóstico e monitoramento de câncer de próstata.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo mais comum entre os homens, os exames padrão ouro para investigação da suspeita são: dosagem sérica do antígeno prostático (do inglês Prostate Specific Antigen, PSA) e o toque retal, seguidos de uma biópsia para a confirmação do diagnóstico [1]. No entanto, a biópsia é um procedimento invasivo que pode resultar em complicações, como retenção de urina e hematúria [2]. Portanto, o desenvolvimento da Tomografia por Emissão de Pósitrons (do inglês Positron Emission Tomography, PET) com o novo radiofármaco antígeno de membrana específico da próstata, o PSMA-1007 (18F) ou ¹⁸F-PSMA-1007 representa significativo avanço, por se tratar de um método diagnóstico não invasivo e com elevada acurácia [3].

O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) é uma glicoproteína de superfície celular fortemente expressa na maioria dos cânceres de próstata, ao marcar esta proteína com flúor-18, isótopo radioativo do átomo de flúor, obtêm-se a molécula do ¹⁸F-PSMA-1007, Fig. 1, que possui uma alta afinidade aos receptores expressos nas células cancerosas [4]. Essa elevada afinidade resulta no acúmulo do radiofármaco na área tumoral, permitindo a obtenção de imagens PET, que revelam a presença do tumor, assim como sua agressividade e extensão [5].

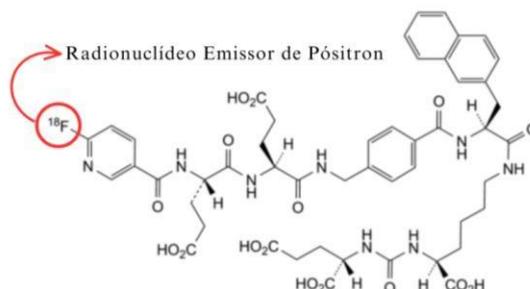


Fig. 1: Molécula ^{18}F -PSMA-1007. Fórmula molecular modificada pelo autor [6]

Em relação à produção do radiofármaco, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determina inúmeros testes pré-clínicos e clínicos que devem ser realizados para garantir a qualidade, segurança e eficácia do fármaco, e dentre os testes pré-clínicos, está o teste de estabilidade radioquímica [7].

A estabilidade radioquímica refere-se à capacidade de um radiofármaco manter sua forma química e propriedades radioativas ao longo do tempo, ou seja, desde sua produção até a realização da imagem [8]. Qualquer alteração na estrutura química do radiofármaco pode afetar sua distribuição, metabolização e excreção, assim comprometendo a precisão e a qualidade das imagens PET [9]. Ademais, uma vez que o radiofármaco ^{18}F -PSMA-1007 é administrado por via intravenosa, o sangue é o primeiro local do corpo em que a molécula se distribui, assim dando início aos processos farmacocinéticos essenciais para obtenção de imagens bem-sucedidas [10].

Portanto, a estabilidade radioquímica do radiofármaco no sangue é fundamental para sua eficácia, e um resultado positivo na análise de estabilidade radioquímica *in-vitro* sugere uma boa estabilidade *in-vivo* [11]. O presente estudo avaliou especificamente a estabilidade radioquímica do ^{18}F -PSMA-1007 em soro fetal bovino (SFB), com o objetivo de prever sua estabilidade no ambiente sanguíneo.

2. METODOLOGIA

O radiofármaco ^{18}F -PSMA-1007 foi produzido a partir do método validado na Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do Centro de desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). A estabilidade radioquímica foi avaliada pelo período total de 120 minutos, em quatro tempos: (T0) tempo inicial; 30 minutos (T1); 60 minutos (T2); 120 minutos (T3). O tempo de incubação foi determinado a partir do tempo máximo recomendado entre a injeção intravenosa do ^{18}F -PSMA-1007 e o início da aquisição da imagem PET, abrangendo todo o intervalo de biodistribuição *in-vivo* do radiofármaco.

O tempo T0 foi correspondente ao controle de qualidade do radiofármaco, não passando pela etapa de incubação. Para os tempos T1, T2 e T3, os eppendorfs foram incubados em duas temperaturas a 37°C (em câmara climática com 60% de umidade relativa) e 4°C (em geladeira). Os mesmos foram preenchidos com partes iguais de radiofármaco e SFB (inativado e isento de mycoplasma).

Após cada respectivo período de incubação, houve a precipitação das proteínas da solução por meio da adição de acetonitrila fria, seguido de um processo de centrifugação (13.500 rpm por 10 minutos). Em decorrência destes processos é observada a formação de duas fases no eppendorf, a primeira correspondente a um pellet no fundo do eppendorf (proteínas presentes na solução, oriundas do soro fetal bovino) e a segunda uma fase turva (o sobrenadante, correspondente ao radiofármaco livre e a fase aquosa do SFB). Com o auxílio de uma seringa, o sobrenadante de cada eppendorf foi retirado e filtrado em um filtro hidrofílico poro de 0,22 μm . Posteriormente a este procedimento cada filtro foi rinsado com 1 mL de solução de rinsagem (água e acetonitrila 1:1).

Para a análise da estabilidade radioquímica, o sobrenadante filtrado foi analisado por meio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) modelo Agilent HP 1200 (CRLPD-01) equipado com um detector de radioatividade (Raytest – Gabi Star) e UV-VIS com comprimento de onda de 225 nm. Utilizou-se coluna Zorbax C18 (150 x 4,6) mm, 2,7 μm , como fase móvel utilizou-se uma solução fosfato pH 2,5 (Fase móvel A) e acetonitrila (Fase móvel B), modo gradiente com fluxo de 1 mL/min. A análise foi realizada por meio do método já desenvolvido e validado para controle de qualidade do ^{18}F -PSMA-1007 na UPPR. Para comprovação da identificação do PSMA-1007 (^{18}F) foi realizada a comparação com o tempo de retenção do padrão de referência do PSMA-1007 (10 ppm).

Para a realização das análises no cromatógrafo é necessário que, previamente, seja assegurado a adequabilidade do seu sistema. A adequabilidade é determinada por meio de dois parâmetros. O primeiro parâmetro corresponde à variabilidade das injeções em triplicata do padrão PSMA-1007 (10 ppm). Nesse caso, o desvio padrão relativo aceito para a área da triplicata é de até 5% e a média do tempo de retenção (T_R) deve ser de oito minutos, aproximadamente. O segundo parâmetro corresponde à resolução mínima entre os picos cromatográficos determinados para a impureza C e a impureza D. A impureza C (Fig. 2 a) corresponde ao produto da reação do precursor com o grupo hidroxila ao invés do fluoreto e a impureza D (Fig. 2 b) corresponde ao precursor da síntese, N,N,N-trimetil-5-((2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)-carbonil)piridina-2-amino trifluorometanos-sulfonato. É preciso que haja uma resolução superior a 1 entre os picos destas impurezas para que caso as mesmas apareçam durante a análise das amostras, seja possível sua identificação de maneira efetiva.

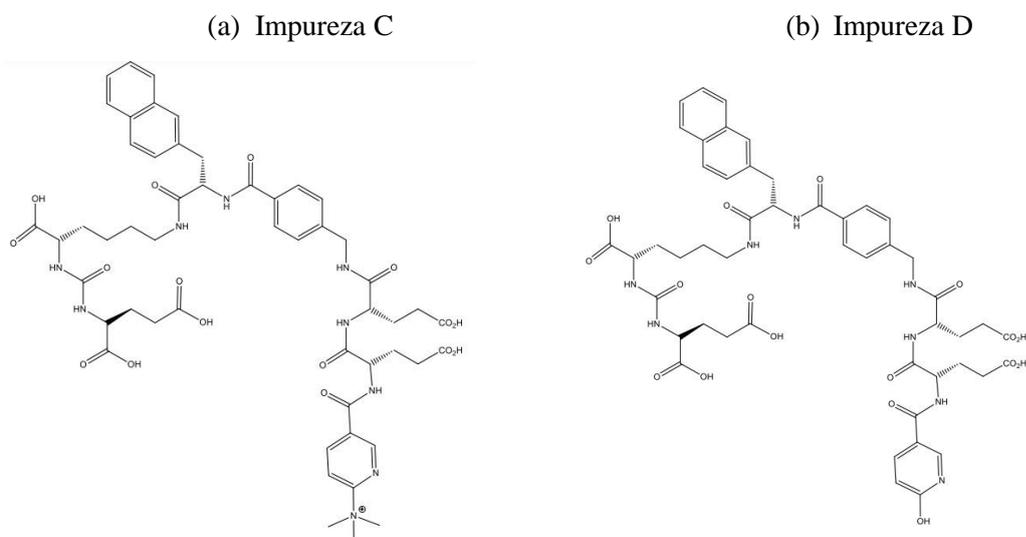


Fig. 2: Impurezas conhecidas do ^{18}F -PSMA-1007 descritas na monografia europeia do radiofármaco [12]



Em relação aos critérios de aceitação utilizados para determinar a estabilidade radioquímica, os mesmos são fundamentados na monografia do ^{18}F -PSMA-1007 na farmacopeia europeia, uma vez que a farmacopeia brasileira não possui monografia para o fármaco em questão. Deste modo, os critérios para a determinação da estabilidade são: o T_R da amostra deve ser semelhante ao T_R do padrão ($\sim 8,0$ minutos) podendo diferir deste em até $\pm 0,5$ minutos; a área correspondente ao ^{18}F -PSMA-1007 deve ser no mínimo 91,00% da radioatividade total (não podendo ser superior a área do pico obtido para o padrão); a área de qualquer impureza não conhecida não pode ser superior à área do pico obtido para o padrão e a soma das áreas de quaisquer picos significativos não deve ser superior a 5 vezes a área do pico obtido para o padrão. Vale ressaltar que, segundo a monografia, impurezas que possuem a área menor do que 0,3 vezes a área do padrão PSMA 10 ppm podem ser consideradas desprezíveis.

3. RESULTADOS

Os resultados da análise de adequabilidade do sistema atenderam os critérios de aceitação estabelecidos. Em relação à injeção em triplicata do padrão, Tab. 1, observou-se um DPR de 3,60% para as áreas do padrão, dentro do limite aceito de até 5%, e um T_R médio entre as triplicatas de 8,13 minutos. Além disso, a resolução obtida entre os picos das impurezas C e D foi de 1,1 (Fig. 3), também atendendo critério de aceitação (≥ 1).

Tab. 1: Valores de tempo de retenção (T_R) e área (mAu) obtidos por meio dos cromatogramas do CLAE na região do UV ($\lambda = 225$ nm) das injeções em triplicata do padrão do PSMA 10ppm para a verificação da adequabilidade do sistema.

	T_R (min)	Área (mAu)
Injeção Padrão PSMA 10ppm	8,10	1030,2750
	8,18	971,1230
	8,11	966,1779
Média	8,13	989,1917
DP	-	35,6651
DPR	-	3,6055

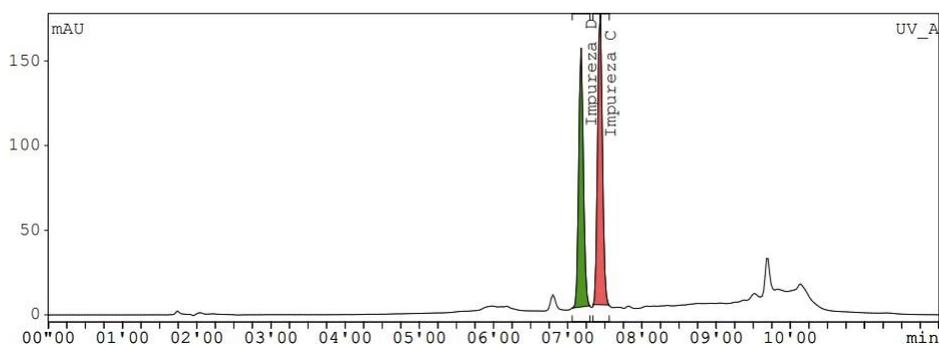


Fig. 3: Cromatograma obtido por meio da CLAE na região do UV ($\lambda = 225$ nm). Injeção da solução de impurezas conhecidas, impurezas C e D. Impureza C: T_R de 7,26 minutos. Impureza D: T_R de 7,11 minutos. Resolução entre os picos de 1,1.



Em relação ao tempo correspondente ao controle de qualidade do fármaco (T_R), os critérios de aceitação foram atendidos. O T_R da amostra foi semelhante ao padrão (diferindo em 0,03 minutos), Fig. 4; a radioatividade foi de 98,70% (Fig. 5); as áreas das impurezas foram menores do que a média das áreas da triplicata do padrão 10 ppm (989,20 mAU); as impurezas encontradas estavam dentro da classificação de desprezíveis e a soma de áreas das mesmas estava dentro do limite, ou seja, menor que cinco vezes a área do padrão de PSMA (Tab. 2).

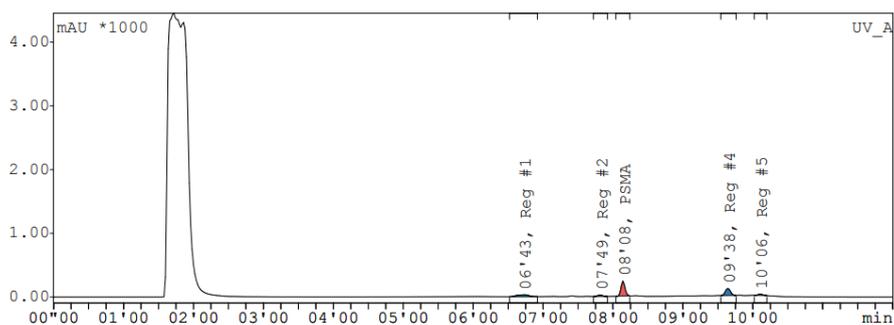


Fig. 4: Cromatograma obtido por meio da CLAE na região do UV ($\lambda = 225$ nm). Injeção da amostra de ¹⁸F-PSMA-1007 no T₀. T_R da amostra = 8,08 minutos.

Vale ressaltar que, o pico proeminente (T_R ~ 2 min) observado no cromatograma da injeção da amostra, Fig.4, corresponde ao ascorbato de sódio excipiente da formulação, utilizado como estabilizador uma vez que evita a radiólise [13].

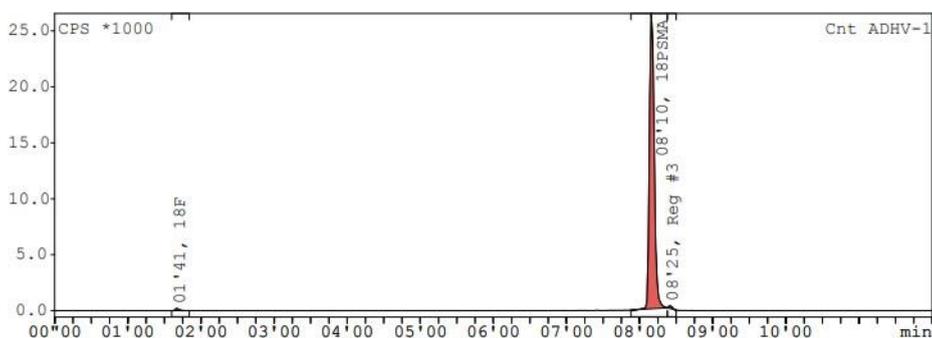


Fig. 5: Cromatograma obtido por meio da CLAE acoplado ao detector de radioatividade Raytest – Gabi Star. Injeção da amostra de ¹⁸F-PSMA-1007 em T₀. T_R da amostra = 8,10 minutos. Área do pico (%): 98,70.

Tab. 2: Valores das áreas dos picos das impurezas encontrados no cromatograma da Fig. 5. As áreas foram menores que a do padrão 10 ppm (989,20 mAu), assim estando dentro da especificação. As impurezas encontradas foram classificadas como desprezíveis, pois todas são menores que 0,3 x a área do padrão de PSMA 10ppm (296,76 mAu) e a soma de áreas das mesmas estava dentro do limite, ou seja, menor que cinco vezes a área do padrão de PSMA (4945,96 mAu)

	Área (mAu)
Impureza 1	338,27
Impureza 2	107,45
Impureza 3	553,18
Impureza 4	98,75
Total	1097,64



Após a adequação do sistema e a realização do controle de qualidade do fármaco (T0), foi realizada a avaliação da estabilidade radioquímica da amostra durante os tempos T1, T2 e T3. Considerando os dados obtidos, em todos os tempos e em ambas as temperaturas a amostra atendeu os critérios para a determinação da estabilidade.

Nos tempos T1, T2 e T3 o T_R da amostra foi semelhante ao T_R do padrão (~8,0 minutos) diferindo em até $\pm 0,5$ minutos, em ambas as temperaturas (Tab. 3).

Tab. 3: Diferença entre o T_R da amostra e da média do T_R padrão (8,13 minutos) nos tempos T1, T2 e T3 em ambas as temperaturas de análise, 37 e 4°C

	T_R 37°C (min.)	ΔT_R padrão e o T_R da amostra (min)	T_R 4°C (min.)	ΔT_R padrão e o T_R da amostra (min)
T1	8,08	-0,05	8,07	-0,06
T2	8,08	-0,05	8,07	-0,06
T3	8,08	-0,05	8,10	-0,03

O critério de aceitação de porcentagem mínima da radioatividade de PSMA-1007 (18F) em relação à radioatividade total foi observado em todos os tempos ($\geq 91\%$), indicando pureza radioquímica satisfatória. Em T0 a radioatividade do fármaco em relação ao todo foi de 98,70% e nos demais tempos de 100%. Salienta-se, que não houve um aumento da pureza radioquímica da amostra entre o T0 e os demais tempos. Conforme evidenciado na Fig. 5, em T0 há a quantificação de um pico com T_R de 1,41 e área percentual de 1,30%, sendo este identificado como correspondente a flúor-18 livre. O flúor-18 livre corresponde a uma impureza radioquímica que, ao passar do tempo, devido ao decaimento radioativo, acaba se tornando insignificante nos tempos T1, T2 e T3 (Fig.6 a 8), em que se observa PSMA-1007 (18F) com pureza radioquímica de 100%. Deste modo, não há um aumento da pureza radioquímica da amostra entre o T0 e os demais tempos e sim uma influência do decaimento radioativo na detecção da amostra no qual, a radioatividade associada ao radiofármaco diminui, assim como a radioatividade da impureza, que passa a ser não detectável.

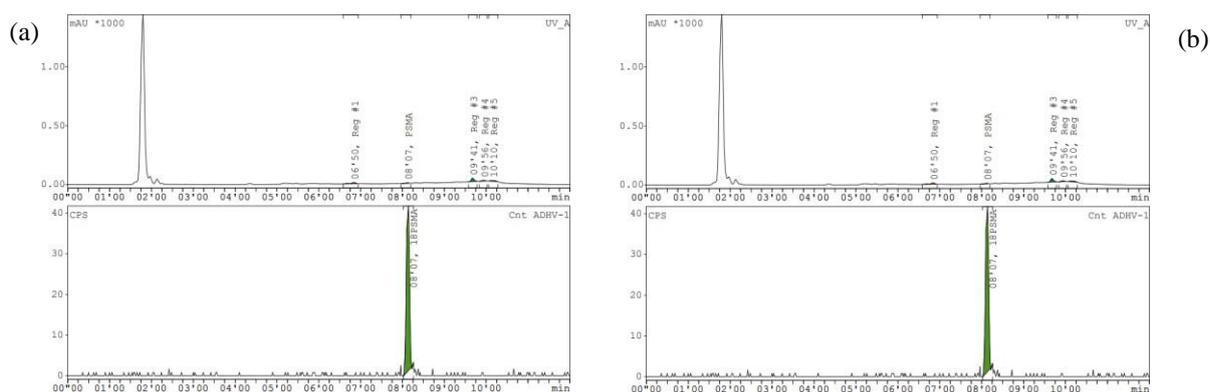


Fig. 6: Cromatograma obtido por meio da CLAE acoplado ao detector ultravioleta ($\lambda = 225$ nm) e de radioatividade Raytest – Gabi Star. Injeção da amostra de ^{18}F -PSMA-1007 em T1. (a) 37°C. (b) 4°C.

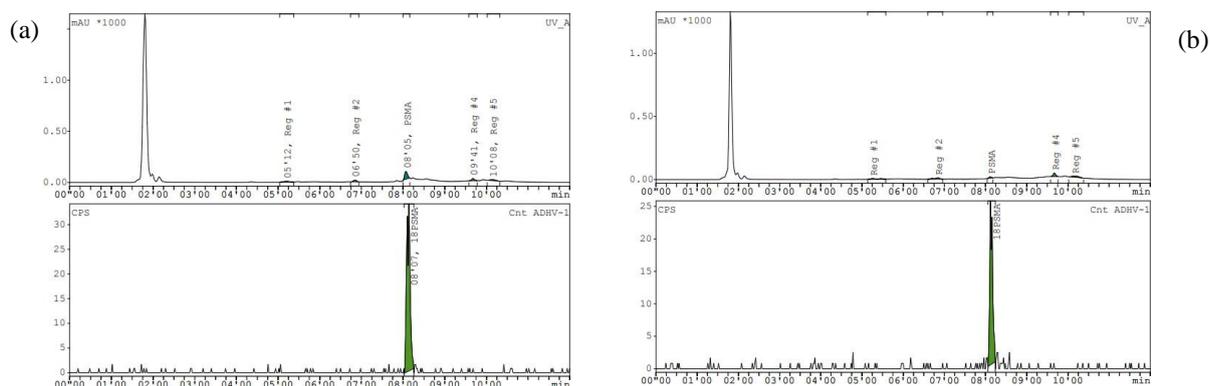


Fig. 7: Cromatograma obtido por meio da CLAE acoplado ao detector ultravioleta ($\lambda = 225$ nm) e de radioatividade Raytest – Gabi Star. Injeção da amostra de ^{18}F -PSMA-1007 em T2. (a) 37°C. (b) 4°C.

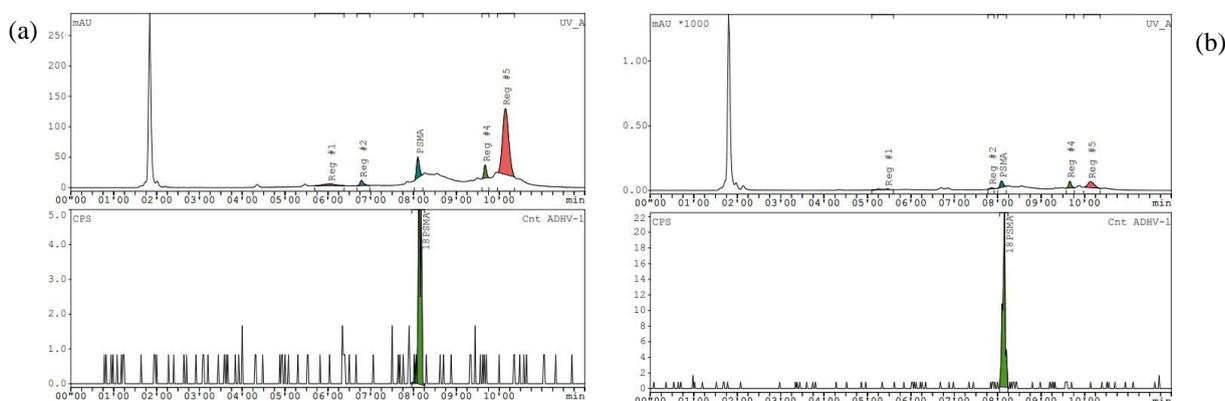


Fig. 8: Cromatograma obtido por meio da CLAE acoplado ao detector ultravioleta ($\lambda = 225$ nm) e de radioatividade Raytest – Gabi Star. Injeção da amostra de ^{18}F -PSMA-1007 em T3. (a) 37°C. (b) 4°C.

Todas as impurezas marcadas nos cromatogramas foram consideradas desprezíveis, pois não houve impureza que apresentou área superior a do padrão 10 ppm e a soma das mesmas não ultrapassou o limite de cinco vezes a área do padrão 10 ppm.

Deste modo, foi possível observar que a amostra permaneceu estável tanto a 4°C como a 37°C, em todos os tempos analisados.

4. CONCLUSÃO

Dado o exposto, conclui-se que o radiofármaco PSMA-1007 (^{18}F) apresentou estabilidade radioquímica satisfatória ao ser incubado em SFB por até 120 minutos. Como discutido previamente, a estabilidade radioquímica *in-vitro* evidenciada no teste pré-clínico em questão é sugestiva que o fármaco possui uma equivalente estabilidade *in-vivo*, fato este que comprova a garantia da segurança e eficácia para o uso *in-vivo*, seja para estudos pré-clínicos em animais ou clínicos em humanos.

AGRADECIMENTOS



Agradeço ao programa PIBIC da FAPEMIG pela bolsa de incentivo. Aos profissionais da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos, meu sincero reconhecimento por todo o suporte concedido ao longo do desenvolvimento do meu projeto e, principalmente, por todo o aprendizado adquirido durante este processo. Enfatizo a importância da Dra. Marina Bicalho, minha orientadora, pela oportunidade, confiança e suporte, durante todo este período. Ressalto minha gratidão por todas as experiências que o programa de iniciação científica me permitiu vivenciar, sendo essas de grande valia no desenvolvimento da minha jornada acadêmica e profissional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata> acessado em 09/07/2024.
- [2] J. Xiang *et al.*, Transperineal versus transrectal prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis, *World Journal Of Surgical Oncology*, pp. 327-345, Hangzhou, 13 feb. (2019).
- [3] X. B. NIU *et al.*, Diagnostic value of 18 F-PSMA-1007 PET/CT for predicting the pathological grade of prostate cancer, *Cancer Biology & Therapy*, pp. 327-345, Zhengzhou, 20 dec. (2023).
- [4] Oh *et al.*, Oh *et al.*, Prostate-Specific Membrane Antigen PET Imaging in Prostate Cancer: Opportunities and Challenges, *Korean Journal of Radiology*, pp. 819-831, Seoul, 6 aug. (2018).
- [5] M. S. Hofman *et al.*, Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study, *Lancet*, pp. 1208-1231, Melbourne, 16 april (2020).
- [6] F. L. GIESEL *et al.*, F-18 labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients, *European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging*. Heidelberg, pp. 678-688, Heidelberg, 26 nov. (2016).
- [7] https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/RDC_318_2019_.pdf/72014894-122d-433e-97b0-2c48bfb4ab54 acessado em 15/07/2024.
- [8] C. Y. Furukawa, Avaliação De Alguns Fatores Interferentes Na Estabilidade Radioquímica De Alguns Radiofármacos Marcados Com 99m Tc, Dissertação, Instituto De Pesquisas Energéticas e Nucleares, Brasil (2016).
- [9] V. Y. A. S. Madhusudan *et al.*, Stability Matters: radiochemical stability of therapeutic radiopharmaceutical¹⁷⁷lu-psma, *Journal Of Nuclear Medicine Technology*, pp. 244-247, Auckland, 14 jun. (2020).
- [10] H. Chen *et al.*, In vitro and in vivo comparative study of a novel ⁶⁸Ga labeled PSMA-targeted inhibitor and ⁶⁸GaPSMA-11, *Scientific Reports*, pp. 111-122, Sichuan Province, 27 set. (2021).
- [11] C. Maisto *et al.*, On Site Production Of [¹⁸f]Psm-1007 Using Different [¹⁸f]Fluoride Activities: Practical, Technical And Economical Impact, *Ejnmri Radiopharmacy And Chemistry*, pp. 6-36, Naples, 13 out. (2021).
- [12] EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare) European Pharmacopoeia - PSMA-1007 (18F) injection, 10th ed, Council of Europe, (2021).
- [13] J. Cardinale *et al.*, Preclinical Evaluation of 18F-PSMA-1007, a New Prostate Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging, *Journal Of Nuclear Medicine*, p.p. 425-431, Heidelberg, 27 out. (2016).