



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0800492-7 B1



(22) Data do Depósito: 31/01/2008

(45) Data de Concessão: 10/12/2019

(54) Título: RADIOFÁRMACO E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: C07F 13/00; A61K 51/04; A61K 103/10; A61P 35/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

(72) Inventor(es): VALBERT NASCIMENTO CARDOSO; ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS; MÔNICA CRISTINA DE OLIVEIRA; RICARDO JOSÉ ALVES.

(57) Resumo: RADIOFÁRMACO E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER. A presente invenção relata um radiofármaco e suas composições farmacêuticas, contendo uma combinação de um componente radioativo e um componente químico (ligante orgânico), podendo também conter excipientes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis. Essas composições farmacêuticas caracterizam-se por conter uma combinação de um radionuclídeo, o Tecnécio-99m, e um componente químico (ligante orgânico) que apresenta afinidade por células tumorais, principalmente em estágios iniciais, favorecendo o tratamento e aumentando as chances de cura da doença.

“RADIOFÁRMACO E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DE CÂNCER”

A presente invenção relata um radiofármaco e suas composições farmacêuticas, contendo uma combinação de um componente radioativo e um componente químico (ligante orgânico), podendo também conter excipientes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis.

Essas composições farmacêuticas caracterizam-se por conter uma combinação de um radionuclídeo, o Tecnécio-99m, e um componente químico (ligante orgânico) que apresenta afinidade por células tumorais, principalmente em estágios iniciais, favorecendo o tratamento e aumentando as chances de cura da doença.

Estado da técnica:

A proliferação celular desordenada é fundamental para o desenvolvimento do câncer. Para a determinação dessa proliferação são utilizadas técnicas de diagnóstico que necessitam de amostras de tecido para a sua realização, como: imuno histoquímica, citometria de fluxo e contagem do número de mitoses visíveis. No entanto, estas técnicas apresentam algumas limitações. A biópsia, por exemplo, pode não ser representativa de todo o tumor devido à heterogeneidade deste, elas podem ser difíceis de serem realizadas dependendo da profundidade do tumor e, além disso, pode haver diferenças entre o tumor primário e metástases (KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. Clinical Oncology, v. 16, p. 176-185, 2004).

Outros meios de avaliação da proliferação tumoral se baseiam em mudanças anatômicas observadas em exames clínicos, raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, que permitem avaliar alterações no tamanho do tumor. Essas mudanças, no entanto, podem tardar semanas ou meses para serem observadas e avaliadas, dificultando o tratamento (SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; DOHMEN, B. M.; MACHULLA, H.; STAYANOFF, J. C.; OBRADOVICH, J. E. Imaging proliferation *in vivo* with [F-18] FLT and positron emission tomography. Nature Medicine, v. 4, n. 11, p. 1334-1336, 1998.).

A medicina nuclear vem se tornando uma ferramenta poderosa para a detecção de diversas doenças, como o câncer. Enquanto as demais técnicas avaliam alterações anatômicas, a cintilografia é capaz de detectar alterações bioquímicas e fisiológicas no

12
 órgão estudado, e assim, identificar a doença em seu estágio inicial. A possibilidade do diagnóstico precoce de células neoplásicas irá favorecer a terapêutica, aumentando a sobrevida dos pacientes e, até, possibilitando sua cura. Nesta técnica, a imagem do corpo é obtida através da captação da radioatividade emitida pelo radiotraçador administrado. Os radiofármacos são administrados, em sua maioria, por via endovenosa e o diagnóstico é baseado em alterações bioquímicas e fisiológicas do órgão em exame, sem a necessidade de alterações anatômicas, fornecendo o diagnóstico da doença em um estágio inicial (CONTI, P. S.; LILIEN, D. L.; HAWLEY, K.; KEPPLER, J.; GRAFTON, S. T.; BADING, J. R. PET and [^{18}F]-FDG in oncology: A clinical uptake. Nuclear Medicine and Biology, v. 23, p. 717-735, 1996; THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408).

Radiofármacos são compostos radioativos usados no diagnóstico e no tratamento de doenças. Em medicina nuclear cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados para fins de diagnósticos. A maioria destes radiofármacos é uma combinação de um componente radioativo (radionuclídeo), que permite a detecção externa da fisiologia e/ou anatomia do órgão em exame, e um componente químico (ligante orgânico), que é responsável pelo direcionamento no organismo. Essas substâncias não apresentam ação farmacológica, pois são administradas em doses extremamente baixas. O radionuclídeo deve emitir uma radiação que será facilmente detectável por um instrumento nuclear e a dose dessa radiação para o paciente deverá ser mínima (SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p.; THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408).

Existe uma grande variedade de radionuclídeos usados em medicina nuclear como: iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), Tálcio-201 (^{201}Tl), Flúor-18 (^{18}F), Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Gálio-67 (^{67}Ga), entre outros (SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p.).

Em oncologia, o agente de imagem tumoral mais usado é o 2-[^{18}F]fluoro-2-desoxi-D-glicose ([^{18}F]FDG) (CELEN, S.; GROOT, T.; BALZARINI, J.; VUNCKY, K.; TERWINGHE, C. Synthesis and evaluation of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAMA-propyl-thymidine complex as a potential probe for *in vivo* visualization of tumor cell proliferation with SPECT. Nuclear Medicine and Biology, v. 34. p. 283-291, 2007).

O flúor-18 é produzido em ciclotron, tem meia-vida física de 109 minutos e decai por emissão de pósitron (radiação β^+) que ao interagir com um elétron do meio se aniquila gerando dois fótons gama de 511 keV num ângulo de 180°, que serão detectados por tomografia por emissão de pósitron (PET)-(THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408). O [18F]FDG é um análogo da D-glicose, como mostrado na figura 4, e sua aplicação baseia-se na maior atividade glicolítica das células tumorais malignas (CONTI, P. S.; LILIEN, D. L.; HAWLEY, K.; KEPPLER, J.; GRAFTON, S. T.; BADING, J. R. PET and [¹⁸F]-FDG in oncology: A clinical uptake. Nuclear Medicine and Biology, v. 23, p. 717-735, 1996). O [18F]FDG penetra na célula por difusão facilitada através dos transportadores para glicose (GLUT-1), que, conforme já explicitado, também apresentam maior expressão em células tumorais (SCHIBLI, R.; DUMAS, C.; PETRIG, J.; SPADOLA, L.; SCAPOZZA, L.; GARCIA-GARAYOA, E.; SCHUBIGER, P. A. Synthesis and *in vitro* characterization of organometallic rhenium and technetium glucose complexes against GLUT-1 e hexokinase. Bioconjugate Chemistry, v. 16, p. 105-112, 2005., (LOVE, C.; TOMAS, M. B.; TRONCO, G. G.; PALESTRO, C. J. FDG PET of infection and inflammation. Radiographics, v. 25, n. 5, p. 1357-1368, 2005.), é fosforilado pela enzima hexoquinase, como ocorre normalmente com a D-glicose, gerando o [18F]FDG-6-fosfato (GU *et al.*, 2006). O segundo passo na glicólise seria a isomerização da glicose-6-fosfato a frutose 6-fosfato pela enzima fosfohexose isomerase, porém para a formação da frutose-6 fosfato, é necessário a presença do oxigênio em C-2, que está ausente no 18FDG.

Portanto, a partir desse ponto, o [18F]FDG fosforilado não pode prosseguir no caminho metabólico normal da glicose, ficando retido no interior da célula de maneira proporcional a atividade glicolítica desta célula (PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, J. H.; MCCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIERE, B. FDG accumulation and tumor biology. Nuclear Medicine and Biology, v. 25, p. 317-322, 1998.; BOS, R.; HOEVEN, J. J. M.; WALL, E.; GROEP, P.; DIEST, P. J.; COMANS, E. F. J.; SEMENZA, G. L. Biological correlates of ¹⁸fluorodesoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. Journal of Clinical Oncology, v. 20, n. 2, p. 379-387, 2002).

O uso do [18F]FDG na rotina clínica é, ainda, limitado devido à sua baixa disponibilidade e o custo relativamente alto, tanto em sua produção (ciclotron) como na detecção das imagens (câmara PET), além da necessidade de uma síntese rápida devido ao baixo tempo de meia-vida física do flúor-18 (109 minutos). Assim, seria de grande valia o desenvolvimento de agentes de diagnóstico baseados em isótopos emissores de radiação gama, direcionados à produção de imagens em câmaras de cintilação convencionais (CHEN, X.; LI, L.; LIU, F.; LIU, B. Synthesis and biological of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 5503-5506, 2006.).

O Tecnécio-99m é o radionuclídeo mais usado em medicina nuclear, por apresentar propriedades físicas e químicas ideais para um radioisótopo destinado à produção de imagens cintilográficas, tais como: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.; JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. *Radiochimica Acta*, v. 70/71, p. 289-297, 1995; MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de Tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiologia Brasileira*, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001; YANG, D. J.; KIM, C.; SCHECHTER, N. R.; AZHDARINIA, A.; YU, D.; OH, C., BRYANT, J. L.; WON, J.; KIM, E. E.; PODOLOFF, D. A. Imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. *Radiology*, p. 465-473, 2003).

O tecnécio é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). A estabilidade desses estados de transição depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, M. K. The chemistry of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990; SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p).

- O íon pertecnetato, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, tem estado de oxidação +7 para o ^{99m}Tc , isso o torna uma espécie não reativa e incapaz de ligar a algum composto, sendo necessária a redução do tecnécio, do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc (NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. Textbook of radiopharmacy theory and practice. V.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 3, p. 53-72; 1990; SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p).
- O ^{99m}Tc reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes. O agente quelante geralmente é doador de elétrons e forma uma ligação covalente coordenada com o Tc-^{99m} reduzido. (SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p).
- Desse modo, a alternativa mais viável seria a produção de substâncias que pudessem ser marcadas com Tecnécio- 99m , contribuindo para a redução dos custos e, desta forma, tornando a técnica acessível a todos.
- Existem muitos compostos capazes de se ligar ao Tecnécio- 99m , sendo usados em medicina nuclear para avaliar a função e/ou a morfologia de um órgão, determinando o estado patológico do paciente. São exemplos desses compostos o $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ (marcador cerebral), $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ (marcador renal), $^{99m}\text{Tc-ECD}$ (marcador para imagem cerebral), $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ (marcador adequado para imagens do sistema hepatobiliar), $^{99m}\text{Tc-DMSA}$ (agente de marcação renal). (JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. Chemical Reviews, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993).
- O MAG_3 , mercaptoacetilglicilglicilglicina, é um ligante N_3S , que ao ser marcado com Tecnécio- 99m apresenta uma pureza radioquímica superior a 90% (ROBLES *et al*, 2003). É capaz de formar um complexo estável, e carregado negativamente com tecnécio (VANBILLOEN, H. P.; BORMANS, G. N.; ROO, M. J.; VERBRUGGEN, A. N. Complexes of technetium- 99m with tetrapeptides, a new class of ^{99m}Tc -labeled agents. Nuclear Medicine and Biology, v. 22, n. 3, p. 325-338, 1995; YAMAMURA, N.; MAGATA, Y.; ARANO, Y.; KAWAGUCHI, T.; OGAWA, K.;

KONISHI, J.; SAJI, H. Technetium-99m-labeled medium-chain fatty acid analogues metabolized by α -oxidation: radiopharmaceutical for assessing liver function. *Bioconjugate Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 489-495, 1999; OKARVI, S. M. Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent. *Journal Peptide Research*, v. 63, p. 460-468, 2004).

O primeiro passo para a formação do radiofármaco ^{99m}Tc -MAG₃, consiste na formação de um complexo do ^{99m}Tc com um ligante fraco em meio aquoso. Esse complexo reage, em seguida, com um segundo ligante (MAG₃), que forma um complexo mais estável. Ligantes fortes, como o MAG₃, são menos solúveis em meio aquoso e necessitam de aquecimento ou longo tempo para dissolverem.

Inicialmente é preparado o complexo ^{99m}Tc -tartarato ou ^{99m}Tc -gluconato por redução do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com íon estanoso em presença de tartarato de sódio ou gluconato de sódio, seguido de aquecimento com MAG₃, resultando no ^{99m}Tc -MAG₃, como esquematizado na figura 6 (BORMANS, G.; CLEYNHENS, B.; ADRIAENS, P.; VANBILLOEN, H.; ROO, M.; VERBRUGGEN, P. Investigation of the labeling characteristics of ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycine. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 22, n. 3, p. 339-349, 1995; SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p).

O ^{99m}Tc -MAG₃ é usado como marcador da função tubular renal. Apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas, cerca de 90%, que confere a ele uma pequena taxa de filtração glomerular (menor que 3%). Após administração por via intravenosa, seu *clearance* sanguíneo é rápido e bifásico, sendo rapidamente excretado por secreção tubular renal (FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG₃ as a Hippuran replacement. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 27, n. 1, p. 111-116, 1986; ESHIMA, D.; TAYLOR, A. Technetium-99m (^{99m}Tc) Mercaptoacetyltriglycine: Update on the new ^{99m}Tc renal tubular function agent. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 22, n. 2, p. 61-73, 1992; SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p; THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. *Medicina Nuclear*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408).

Com base no exposto e valendo-se do metabolismo acelerado das células tumorais, que as tornam mais ávidas por glicose, realizou-se a síntese em oito etapas de β -D-glicopiranosídeo de 4-N-[N³-(benzoilmercaptoacetil)glicilglicilglicil]aminofenila, um derivado da D-glicose que complexado ao Tecnécio-99m seria capaz de detectar tumores, em estágios iniciais favorecendo o tratamento e aumentando as chances de cura.

Foram relatados, em alguns estudos, a síntese de (S-EOE- MAG₃- β -alanine: S-(1-ethoxyethyl) mercaptoacetyltriglycyl - β -alanine and CCK4:Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) através de sucessivas condensações de aminoácidos ativados em resinas químicas de pureza elevada e o desenvolvimento de método de complexação do Tecnécio usando pH fisiológico e temperatura controlados. Além disso, estudos farmacológicos in vitro e in vivo demonstraram a afinidade específica do composto obtido por receptores CCKB que são expressos preferencialmente por algumas células tumorais do trato digestivo. (HAFID BELHADJ-TAHAR, JEAN-PAUL ESQUERRE AND YVON COULAIS. "An easy-to-use imaging tool and radiopharmaceutical agent derived from CCK4 for internal radiotherapy": Synthesis and assessment of an original biovector. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section.)

O desenvolvimento de um radiofármaco análogo do peptídeo aM2, o Mercaptoacetiltriglicina (MAG)₃-derivado do peptídeo aM2 com Tecnécio-99m, foi realizado para o diagnóstico do câncer de mama. Estudos farmacológicos de biodistribuição in vivo demonstram a afinidade do composto obtido por células tumorais da região da mama. (S.M. OKARVI. "Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent". Journal of Peptide Research).

Alguns estudos descrevem a síntese e as características biológicas do Tecnécio-99m triamida derivados do mercaptoacetiltriglicina (MAG₃). (S. M. OKARVI, P. ADRIAENS, A. M. VERBRUGGEN. "Synthesis and biological characteristics of the Technetium-99m triamide derivatives of mercaptoacetyltriglycine (MAG₃)". Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals).

Outros estudos descrevem a síntese de Benzoyl-mercaptoacetylglucylglycylglycine-mannosyldextran (Bz MAG₃-mannosyl-dextran) e o uso do composto obtido como radiofármaco para diagnóstico de células malignas no tecido reticuloendotelial.

(DAVID R. VERA, ANNE M. WALLACE AND CARL K. HOHA. "99mTc] MAG₃-mannosyl-dextran: a receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection". Nuclear Medicine and Biology).

5 O pedido de patente sob o número **US5245018**, "Process for preparing a radiopharmaceutical composition", descreve um processo de preparo de uma composição radiofarmacêutica, compreendendo tecnécio 99m, MAG₃, agente redutor e estabilizante solúveis em água, a qual remove qualquer incômodo oriundo do diagnóstico local e diminui a exposição do técnico à radiação durante a operação. Contudo, a composição farmacêutica descrita no presente relatório é distinta e não foi reivindicada no pedido de patente US5245018.

10 O pedido de patente de número **US5840273**, "Technetium-99m complexes for use as radiopharmaceuticals", descreve uma composição radiofarmacêutica compreendendo complexo de tecnécio 99-m para exame de função renal, bem como o método de exame usando a composição. Dessa forma, a composição da presente invenção (caracterizada por descrever um ligante orgânico que complexado ao Tecnécio-99m seria capaz de detectar tumores em estágios iniciais) é diferente da descrita na patente *supra* citada.

20 O pedido de patente sob o número **US5986074**, "Metal chelates as pharmaceutical imaging agents", processes of making such and uses thereof, descreve o processo de obtenção e composição farmacêutica de metais quelatos, como o Tecnécio-99m, para ligantes correspondentes destinado ao diagnóstico de diversas doenças. Entretanto, a composição farmacêutica descrita no presente relatório descritivo é bem diferente do pedido de patente citado e, portanto, não foi reivindicado.

25 Não foi encontrada no estado da técnica nenhuma patente contendo composição de radiofármaco derivado de MAG-3 capaz de detectar tumores ou que tenham grande avidez por células tumorais em estágios iniciais.

30 Para solucionar tal problema a presente invenção propõe a obtenção de composição contendo uma combinação de um radionuclídeo, o Tecnécio-99m, e um componente químico (ligante orgânico) que apresenta afinidade por células tumorais, capaz de detectar tumores principalmente em estágios iniciais, o que inclusive favorece o tratamento e aumenta enormemente as chances de cura da doença.

24

Realizou-se a marcação dos compostos Benzoilmercaptoacetilglicilglicilglicina (1) e β -D-glicopiranosídeo de 4-N-[N³-(benzoil-mercaptoacetil)glicilglicilglicil]aminofenila (2), formando complexos com Tecnécio-99m como o ^{99m}Tc-MAG₃ (3) e o ^{99m}Tc-MAG₃-G (4) respectivamente, que serão utilizados nos estudos de biodistribuição.

Foram realizados os estudos de biodistribuição de ^{99m}Tc-MAG₃-G (4), um derivado da D-glicose, inicialmente em camundongos SWISS, machos, 25-30g, sadios, utilizando o ^{99m}Tc-MAG₃ (3) como padrão. Os estudos demonstraram que (4) e (3) apresentam padrões de biodistribuição diferentes, observando-se o perfil de *clearance* bifásico para o (3) que é ausente em (4). Em seguida, realizaram-se os estudos de biodistribuição de (4) em camundongos com tumor de Erhlich implantados na pata posterior direita, novamente utilizando-se o (3) como padrão. O derivado (4) apresentou concentração cerca de duas vezes maior no tumor em relação à pata posterior esquerda (controle) para todos os tempos analisados (5, 30, 120 e 240 minutos), o que o credencia como um promissor marcador tumoral. Tal característica não foi observada para o (3).MAG₃

Nesse sentido, a presente invenção caracteriza-se pelo uso de ligantes orgânicos acoplados quimicamente a açúcares, que aumentam sua afinidade por células tumorais. Esses ligantes são complexados ao Tecnécio-99m, tornando-se capaz de detectar tumores principalmente em estágios iniciais, favorecendo o tratamento e aumentando as chances de cura.

A formulação da presente invenção caracteriza-se pelo uso da mistura de excipientes aceitáveis farmaceuticamente combinados ao produto obtido, derivado de MAG₃ acoplado ao Tecnécio-99m e/ou outros radionuclídeos. Podem ser preparadas formulações com um excipiente ou misturas desses. Exemplos de excipientes incluem água para injetáveis, solução salina estéril, soluções tamponadas com fosfato, a solução de Ringer, solução de dextrose, a solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietileno glicol. Veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sesame, etil-oleato, ou triglicerídeo também podem ser usados. Outras formulações úteis incluem agentes capazes de aumentar a viscosidade, como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextran.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, como substâncias que aumentam isotonicidade e estabilidade química de substância ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, *m* - ou *o*-cresol, formalina e álcool benzílico.. As formulações padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, uma formulação não-líquida, o excipiente pode incluir dextrose, albumina de soro humano, conservantes, etc, na qual água ou solução salina estéril possa ser acrescentada antes da administração.

A presente invenção, caracteriza-se ainda pela preparação de sistemas de liberação controlada contendo o produto obtido derivado de MAG_3 acoplado ao Tecnécio- $^{99\text{m}}$ e/ou outros radionuclídeos Os sistemas de liberação controlada satisfatórios incluem, mas não são limitados às ciclodextrinas, polímeros biocompatíveis, polímeros biodegradáveis, outras matrizes poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparações de bolus, bombas osmóticas, dispositivos de difusão, lipossomas, lipoesferas, e sistemas de administração transdérmicos.

Lista de figuras:

Figura 1: Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sistema urinário.

Figura 2: - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sangue.

Figura 3: Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no fígado.

Figure 4: Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no coração.

Figura 5: Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no pulmão.

Figura 6 - Imagens cintilográficas de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em todos os tempos estudados, onde se nota maior concentração do produto testado na pata posterior direita (PPD) em relação a esquerda.

A presente invenção pode ser melhor entendida através dos seguintes exemplos, porém não limitantes:

EXEMPLO 1- Rendimento de marcação e purificação de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$

Realizou-se a marcação de Bz-MAG₃ (9) e de Bz-MAG₃-G (10) utilizando-se frasco âmbar contendo 1 mg do composto a ser marcado, 40 mg de tartarato de sódio e 0,1 mL de HCl 0,25 mol/L contendo 0,2 g de cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ajustou-se o pH para uma faixa de 6 a 8 com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L. O frasco foi lacrado e realizou-se vácuo para evitar a oxidação do estanho. Ao frasco adicionou-se 0,1 mL de solução de pertecnetato de sódio com atividade de 37 MBq. O frasco com a solução foi mantido em banho-maria fervente por 10 a 40 minutos. Após este período a solução foi deixada à temperatura ambiente por 10 a 30 minutos para resfriamento.

O ^{99m}Tc se complexa com os derivados Benzoilmercaptoacetilglicilglicilglicina (1) e β -D-glicopiranosídeo de 4-N-[N³-(benzoilmercaptoacetil)glicilglicilglicil]aminofenila (2) através dos três átomos de nitrogênio e do átomo de enxofre, que é desprotegido após o aquecimento (WINNARD, P. Jr; CHANG, F.; RUSCKOWSKI, M.; MARDIROSSIAN, G.; HNATOWICH, D. J. Preparation and use of NHS-MAG₃ for Technetium-99m labeling of DNA. Nuclear Medicine & Biology, v. 24, n. 5, p. 425-432, 1997), fornecendo o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ que serão utilizados nos estudos de biodistribuição.

O rendimento de marcação para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foram determinados com base nos valores obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD). Pelos dados obtidos por CCD, utilizando acetona como eluente, foi possível determinar o percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($6,02 \pm 1,15$), ou seja, dos átomos de tecnécio que não foram reduzidos. Utilizando-se salina como eluente, encontrou-se o percentual de aproximadamente $40,28 \pm 4,62$ de $^{99m}\text{TcO}_2$, sendo este percentual relativo aos átomos de Tecnécio-99m hidrolizados. Portanto, os dois produtos testados, inicialmente, não apresentaram rendimento satisfatório de marcação como mostrado na tabela 1. De acordo com a literatura, o rendimento de marcação recomendado de um produto para estudos de biodistribuição deve ser superior a 90% (THEOBALD, A. E. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. Textbook of radiopharmacy theory and practice. V.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 7, p. 115-148). Impurezas radioquímicas

8X

resultam em imagens de baixa qualidade devido à alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e no sangue, além de expor o paciente a uma dose desnecessária de radiação (SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p; THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408).

Desta forma, para atender os objetivos propostos tornou-se necessário a purificação dos produtos marcados, ou seja, a retirada das impurezas radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$.

A pureza radioquímica foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60. Inicialmente, realizaram-se as CCD das impurezas comumente encontradas nos processos de marcação, $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, empregando-se solução salina a 0,9% e acetona como eluentes. O $^{99m}\text{TcO}_2$ foi obtido tratando-se o pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) com um agente redutor (cloreto estanoso) por 5 a 30 minutos. Aplicou-se uma gota da solução em uma tira de CCD para a realização da cromatografia com os eluentes já citados. A cromatografia com pertecnetato foi realizada diretamente com a solução eluída do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

Cada placa de CCD foi preparada nas dimensões de 10 cm de comprimento por 1 cm de largura. Após a eluição de cada solvente, as placas foram secadas, cortadas em fragmentos de 1 cm de comprimento cada e, em seguida, a radioatividade foi determinada em um contador gama.

Após definidos os valores de R_f das impurezas acima citadas, realizaram-se as cromatografias dos produtos sintetizados (1) e (2) marcados com ^{99m}Tc , também utilizando tiras de CCD (sílica gel 60) e, como eluentes, acetona e solução salina a 0,9%.

As soluções contendo os produtos marcados foram purificadas por coluna utilizando silicato de magnésio (Florisil 60-100 mesh) como fase estacionária e, inicialmente, acetona como fase móvel para a remoção do pertecnetato em excesso, seguida pela utilização de solução salina a 0,9% para a retirada do produto marcado, ficando o $^{99m}\text{TcO}_2$ retido na coluna. Retirou-se 30 alíquotas de, aproximadamente, 0,25 mL com cada eluente e contou-se a radioatividade destas alíquotas, determinando as frações com maior atividade, nas quais o produto eluído estaria em maior concentração. Os resultados mostraram que as impurezas radioquímicas foram removidas (tabela 2).

Tabela 1 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ antes da purificação por coluna

Composto testado	Rendimento de marcação
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$	$52,4 \pm 4,8$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$42,2 \pm 4,9$
Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=9$)	

5

Tabela 2 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após purificação por coluna de Florisil

Composto testado	Rendimento de marcação
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$	$94,4 \pm 3,8$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$93,9 \pm 3,0$
Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=9$)	

EXEMPLO 2- Estudos de biodistribuição de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios:

10

Aliquotas das frações eluídas da coluna contendo 370 KBq de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ ou $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foram injetadas por via endovenosa, em camundongos SWISS, machos, pesando de 25 a 30 gramas.

Utilizou-se 20 animais divididos em 4 grupos de 5 camundongos cada. Após a administração dos produtos marcados os camundongos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. Nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos os animais foram sacrificados.

5 Fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue e bexiga foram retirados, pesados e colocados em contador gama de poço para determinação da radioatividade. Para correção do decaimento radioativo do Tecnécio-99m utilizou-se um padrão de dose contendo a mesma atividade e o mesmo volume da dose injetada nos animais.

10 A radioatividade contida em cada órgão estudado foi dividida pela massa desse órgão, conseguindo-se, assim, a medida em contagem por minuto por grama tecidual (cpm/g). Este procedimento teve como finalidade a padronização dos experimentos, de maneira a evitar a interferência das diferentes massas dos órgãos. O valor em cpm obtido para o padrão de dose foi considerado como 100%, obtendo-se ao final a relação %dose/g.

15 Observa-se pela tabela 3 que no decorrer dos experimentos os órgãos que apresentaram maior captação de radioatividade foram os rins e a bexiga. Isso evidencia eliminação renal do produto $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$. Sabe-se, pela literatura, que o MAG_3 que se encontra disponível comercialmente apresenta alta afinidade pelo sistema urinário: rins e bexiga (FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG_3 as a Hippuran replacement. Journal of Nuclear Medicine, v. 27, n. 1, p. 111-116, 1986; ROBLES, B. R.; HERRERA, J.; CABALLERO, J.; OTERO, M. Purificación del benzoil-mercaptoacetil triglicina complementado con evaluaciones biológicas. Alasbimn Journal. v. 5, n. 21, 2003).
20 Portanto, os dados obtidos de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ sintetizado nesse trabalho encontram-se respaldados pela literatura.

25

Tabela 3 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ em animais sadios (%dose/g).

Tecido	5 min	15 min	30 min	60 min
Fígado	$5,78 \pm 0,99$	$5,28 \pm 0,54$	$14,29 \pm 1,68$	$10,54 \pm 1,09$
Baço	$1,63 \pm 0,25$	$1,85 \pm 0,05$	$3,85 \pm 0,50$	$3,18 \pm 0,17$
Rins	$6,99 \pm 1,64$	$6,06 \pm 0,45$	$13,74 \pm 1,96$	$9,03 \pm 1,66$
Estômago	$0,69 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,13$	$2,43 \pm 0,33$	$2,06 \pm 0,29$
Coração	$1,34 \pm 0,14$	$1,00 \pm 0,14$	$2,34 \pm 0,27$	$1,78 \pm 0,24$

Pulmão	2,96 ± 0,44	2,37 ± 0,34	7,91 ± 0,70	5,41 ± 0,34
Sangue	2,86 ± 0,15	1,60 ± 0,28	3,27 ± 0,21	1,98 ± 0,25
Bexiga	27,70 ± 2,27	33,99 ± 3,84	85,25 ± 3,75	90,63 ± 6,41

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=5).

21

A biodistribuição do derivado sacarídico ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$) caracteriza-se por uma eliminação renal mais rápida para este complexo. Observa-se pela tabela 4 e pela figura 1 que nos tempos de 5 e 15 min após a administração foi verificado uma excreção renal estatisticamente superior quando comparada com aquela observada para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato da glicose ter contribuído para aumentar a hidrossolubilidade da molécula favorecendo a eliminação renal. Dados da literatura mostram que moléculas hidrossolúveis são eliminadas mais rapidamente (RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Mecanismos celulares: proliferação celular e apoptose. In: Farmacologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 5, p. 77-89).

Tabela 4 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais saudáveis (%dose/g).

Tecido	5 min	15 min	30 min	60 min
Fígado	8,77 ± 1,22	5,29 ± 0,68	2,33 ± 0,17	1,82 ± 0,15
Baço	0,99 ± 0,14	0,97 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,33 ± 0,04
Rins	22,97 ± 3,91	8,06 ± 1,39	2,95 ± 0,41	1,24 ± 0,16
Estômago	1,74 ± 0,14	1,46 ± 0,20	0,77 ± 0,10	0,51 ± 0,06
Coração	1,66 ± 0,24	1,06 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,34 ± 0,04
Pulmão	2,11 ± 0,27	1,70 ± 0,20	0,75 ± 0,12	0,63 ± 0,08
Sangue	3,28 ± 0,21	1,80 ± 0,21	0,76 ± 0,10	0,57 ± 0,06
Bexiga	41,17 ± 5,40	71,30 ± 5,85	95,54 ± 3,05	94,24 ± 4,19

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=5).

De uma maneira geral, observa-se pelas Tabelas 3 e 4 que os níveis de radioatividade presentes no estômago e baço, durante todo o período, não ultrapassaram 7%. Este dado é de grande importância, pois indica que o teor de impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$) presentes nas preparações injetadas estão dentro dos limites preconizados. Sabe-se, pela literatura, que o TcO_4^- uma vez presente na

solução injetada é captado preferencialmente pelo estômago, enquanto que o TcO_2 é captado pelo baço (THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408).

No sangue os resultados de biodistribuição do $^{99m}Tc-MAG_3$ mostraram um perfil de clareamento bifásico (figura 2). Este mesmo perfil encontra-se descrito na literatura para o $^{99m}Tc-MAG_3$ encontrado comercialmente e disponível para os exames de medicina nuclear (SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p). Esse dado corrobora para o sucesso da síntese do mercaptoacetiltriglicina (MAG_3) obtida nessa invenção. Outro aspecto que merece destaque é que, quando a molécula de glicose encontra-se ligada à estrutura do MAG_3 , o composto $^{99m}Tc-MAG_3-G$ apresenta um perfil de biodistribuição monofásico no sangue. Esses comportamentos distintos foram reproduzidos nos órgãos que apresentam maior aporte sanguíneo, como fígado (figura 3), coração (figura 4) e pulmão (figura 5). Esses resultados mostraram, de forma inequívoca, que a presença da molécula de glicose ligada ao MAG_3 modifica a biodistribuição do mesmo. Portanto, trata-se de produtos distintos apresentando perfis de biodistribuição característicos (KIM, I.; KOBAYASHI, H.; YOO, T. M.; KIM, M.; LE, N.; HAN, E.; WANG, Q-C.; PASTAN, I.; CARRASQUILLO, J. A.; PAIK, C. H. Lowering of pI by acylation improves the renal uptake of ^{99m}Tc -labeled anti-Tac ds Fv: effect of different acylating reagents. Nuclear Medicine and Biology, v. 29, p. 795-801, 2002; CHEN, X.; LI, L.; LIU, F.; LIU, B. Synthesis and biological of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 16, p. 5503-5506, 2006).

Os padrões de biodistribuição apresentados nas tabelas acima foram avaliados pelo teste t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

EXEMPLO 3- Implantação do tumor Ehrlich e estudos de biodistribuição.

Inicialmente, células de tumor de Ehrlich foram implantadas, intraperitonealmente, em camundongos SWISS, machos, pesando 25 a 30 g, com o intuito de produzir um foco de tumor ascítico. Utilizaram-se para este experimento oito animais que após 8 dias do implante foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. Em

32

seguida, os animais foram sacrificados. Retirou-se o líquido ascítico contendo células tumorais viáveis, que foram transferidas para um tubo Falcon estéril de 50 mL. Centrifugou-se o líquido ascítico a 3000 vezes a força gravitacional por 5 minutos e o precipitado foi ressuspensionado com solução salina a 0,9%. Esse processo foi repetido e, em seguida, as células foram coradas com solução de Tripan 0,4% e contadas em microscópio com aumento de 400 vezes com o auxílio de uma câmara de Newbawer, determinando a concentração da solução contendo as células tumorais.

A solução contendo as células de tumor de Ehrlich foi novamente centrifugada e o sobrenadante (salina) foi retirado. O sedimento contendo as células tumorais foi ressuspensionado, utilizando o mesmo volume do sobrenadante retirado, com meio para congelamento contendo soro fetal bovino inativado a 57 °C por 1 hora e dimetilsulfóxido na proporção de 9:1. As células foram aliquotadas em criotubos de 1,5 mL com concentração de 10^8 células/mL sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio.

Para os estudos de biodistribuição em animais com tumor sólido, foram utilizados 20 camundongos SWISS, machos, pesando 25 a 30 g, para cada experimento (Bz-MAG₃ (1) e o Bz-MAG₃-G (2) marcados com ^{99m}Tc divididos em 4 grupos de 5 animais cada. Implantou-se, via subcutânea, na pata posterior direita, o volume de 0,1 mL de solução salina a 0,9% contendo, aproximadamente, 10^6 células tumorais. Os animais foram mantidos em um biotério por 15 a 20 dias sem restrição de alimento e água. Administraram-se, então, os derivados (1) e (2) radiomarcados. Os camundongos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg respectivamente, e sacrificados nos tempos de 5, 30, 120 e 240 minutos após a administração. Fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor (pata posterior direita) e músculo controle (pata posterior direita) foram retirados, pesados e colocados em um contador gama de poço para a determinação da radioatividade, bem como o padrão de dose relativo ao experimento.

Células de tumor de Ehrlich são células transplantáveis provenientes de adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas, que se desenvolvem rapidamente.

Tais células têm sido utilizadas como modelo no estudo de diversas substâncias, como agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico (SEGURA, J. A.; BARBERO, L; G.; MARQUEZ. J. Ehrlich ascites tumor imbalances splenic cell populations and reduces

- responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters*, v. 74, p. 111-115, 2000; OLORIS, S. C. S.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Effect of β -carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Science*, v. 71, p. 717-724, 2002; SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipertireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 48, n. 6, p. 867-874, 2004; FERREIRA, E.; SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; GOMES, M. G.; CASSALI, G. D. Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. *Pathology: Research and practice*, v. 203, p. 39-44, 2007).

- Os estudos de biodistribuição dos compostos marcados ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$) em animais portadores de tumores, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o sistema urinário, quando comparado com resultados obtidos em animais sadios (Tabelas 5 e 6). Portanto, a presença do tumor não alterou o tropismo dos compostos marcados pelo sistema renal, mantendo o alto nível de excreção renal verificado para os radiofármacos testados.

Tabela 5 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ em animais sadios e com tumor (%dose/g)

Animais	5 min	30 min
Sadios	34,69 $\pm$ 2,30	98,99 $\pm$ 2,75
Tumor	40,17 $\pm$ 6,94	96,68 $\pm$ 6,19

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Os valores apresentados não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

Tabela 6 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios e com tumor (%dose/g)

Animais	5 min	30 min
Sadios	$64,14 \pm 6,36$	$98,49 \pm 3,40$
Tumor	$58,87 \pm 6,61$	$99,66 \pm 12,97$

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Os valores apresentados não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

Avaliou-se, também, a radioatividade presente no tecido tumoral (pata posterior direita) e no tecido muscular (pata posterior esquerda). Desta maneira, foi possível expressar os resultados em forma da relação alvo/não alvo tomando-se como premissa que, o músculo da pata posterior esquerda foi considerado a região não alvo. Os dados da Tabela 7 mostraram relação superior a 2,0 para todos os tempos investigados. Isto sugere que o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foi 100% mais captado pelo tumor do que o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$. Substâncias que apresentarem relação alvo/não alvo maior que 1,5 (captação 50% maior no tecido alvo) podem ser consideradas como potenciais agentes de diagnóstico (PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. Advanced drug delivery reviews, v. 37, p. 13-32, 1999). Portanto, os dados obtidos sugerem que o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ pode ser empregado para a identificação de tumores.

Tabela 7 - Relação Alvo/Não-Alvo de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$

Derivado testado	5 min	30 min	120 min	240 min
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3$	$1,22^a \pm 0,14$	$1,22^a \pm 0,10$	$1,16^a \pm 0,08$	$1,10^a \pm 0,11$
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$2,05^b \pm 0,25$	$2,22^b \pm 0,24$	$2,13^b \pm 0,12$	$2,10^b \pm 0,24$

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Os valores foram

avaliados pelo teste Tukey-Kramer. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa.

EXEMPLO 6- Imagens cintilográficas

Para o estudo cintilográfico os produtos Bz-MAG₃ (1) e Bz-MAG₃-G (2) foram radiomarcados com uma alíquota da solução de pertecnetado de sódio com atividade de 185 MBq, afim de se obter atividade suficiente para aquisição das imagens. As imagens foram obtidas em uma gama câmara, com colimador low energy high resolution (LEHR), matriz 256x256x16 e tempo de aquisição de 600 segundos. Foram utilizados 3 animais, com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita, para cada experimento (^{99m}Tc-MAG₃ e o ^{99m}Tc-MAG₃-G) e as imagens foram adquiridas nos tempos de 5, 30, 120 e 240 minutos.

O estudo cintilográfico foi realizado em câmara de cintilação a raios gama, com 3 animais por experimento (^{99m}Tc-MAG₃ e ^{99m}Tc-MAG₃-G). As imagens foram obtidas nos tempos de 5, 30, 120 e 240 minutos após a administração do produto a ser testado (^{99m}Tc-MAG₃ ou ^{99m}Tc-MAG₃-G), como mostrado na figura 5.

Foi selecionada a região de interesse (ROI) nas patas posteriores direita (alvo) e esquerda (não-alvo) e com isso foi possível determinar a área e a atividade presente em cada ROI. Além disso, obtiveram-se as relações alvo/não alvo corrigidas pela área de cada região. Essa relação para o ^{99m}Tc-MAG₃-G manteve-se próxima a dois e para o ^{99m}Tc-MAG₃ próxima a 1, como mostrado na Tabela 8, sendo estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey-Kramer.

Tabela 8 - Relação Alvo/Não-Alvo de ^{99m}Tc-MAG₃ e ^{99m}Tc-MAG₃-G obtida por imagens em câmara de cintilação a raios gama (%dose/cm²).

Derivado testado	5 min	30 min	120 min	240 min
^{99m} Tc-MAG ₃	1,23 ^a ± 0,02	1,09 ^a ± 0,07	1,18 ^a ± 0,12	1,13 ^a ± 0,13
^{99m} Tc-MAG ₃ -G	1,80 ^b ± 0,10	2,02 ^b ± 0,09	1,95 ^b ± 0,12	1,93 ^b ± 0,06

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3). Os valores foram avaliados pelo teste Tukey-Kramer.

As análises das imagens apresentaram dados que foram congruentes com os estudos de biodistribuição (não apresentando diferenças estatísticas pelo teste t ($p>0,05$)), como observado nas Tabelas 9 e 10. A coerência dos dados foi mantida também para os demais órgãos não sendo observado sinais de impurezas radioquímicas.

5

Tabela 9 - Relação Alvo/ Não Alvo apresentada pelo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/cm²)

Tipo de análise	5 min	30 min	120 min	240 min
Biodistribuição (n=5)	1,22 ± 0,14	1,22 ± 0,10	1,16 ± 0,08	1,10 ± 0,11
Imagens (n=3)	1,23 ± 0,02	1,09 ± 0,07	1,18 ± 0,12	1,13 ± 0,13

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os valores foram avaliados pelo teste t ($p>0,05$).

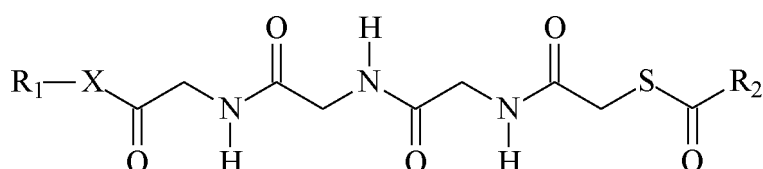
Tabela 10 - Relação Alvo/ Não Alvo apresentada pelo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/cm²)

Tipo de análise	5 min	30 min	120 min	240 min
Biodistribuição (n=5)	2,05 ± 0,25	2,22 ± 0,24	2,13 ± 0,12	2,10 ± 0,24
Imagens (n=3)	1,80 ± 0,10	2,02 ± 0,09	1,95 ± 0,12	1,93 ± 0,06

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os valores foram avaliados pelo teste t ($p>0,05$).

REIVINDICAÇÕES

1. RADIOFÁRMACOS DERIVADOS DE MAG_3 , caracterizadas por compreenderem a seguinte fórmula estrutural acoplada ao Tecnécio-99m:



com as possíveis substituições:

- a) Os radicais R_1 por α - ou β -D-glicopiranosil, α - ou β -D-galactopiranosil, α - ou β -D-manopiranosil, α - ou β -L-fucopiranosil, 2-amino-2-desoxi- α - ou β -D-glicopiranosil, 2-acetilamino-2-desoxi α - ou β -D-glicopiranosil;
- b) Os radicais R_2 por metil, fenil, Triclorometil, Trifluorometil, 4-nitrofenil;
- c) A porção X por $-OC_6H_4NH$ (*orto*, *meta*, *para*), ou $-SC_6H_4NH$ (*orto*, *meta*, *para*), Ou $-O(CH_2)_nNH$, $-S(CH_2)_nNH$ ($n = 1, 2, 3, 4, 5, 6$), ou por $-NH$.

2. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE RADIOFÁRMACO DERIVADO DE MAG_3 caracterizadas por compreenderem o radiofármaco descrito na reivindicação 1.

3. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE RADIOFÁRMACO DERIVADO DE MAG_3 de acordo com as reivindicação 2 caracterizadas por compreenderem um veículo farmacêutica e fisiologicamente aceitável para uso humano como água para injetáveis, solução salina estéril, solução tampão, mas não limitantes.

4. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE RADIOFÁRMACO DERIVADO DE MAG_3 de acordo com as reivindicações de 2-3 caracterizadas por compreenderem excipientes inertes farmaceuticamente aceitáveis tais como: amido, lactose, celulose microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose, talco, estearato de magnésio, mas não limitantes.

5. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE RADIOFÁRMACO DERIVADO DE MAG_3 , caracterizadas por ser para preparação de medicamentos para diagnóstico de processos oncológicos conforme descrito nas reivindicações de 2-4.

Figura 1

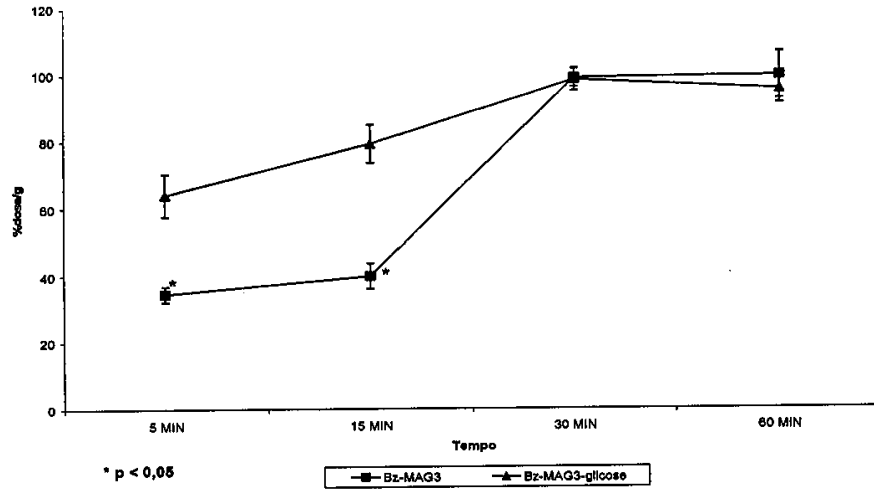


Figura 2

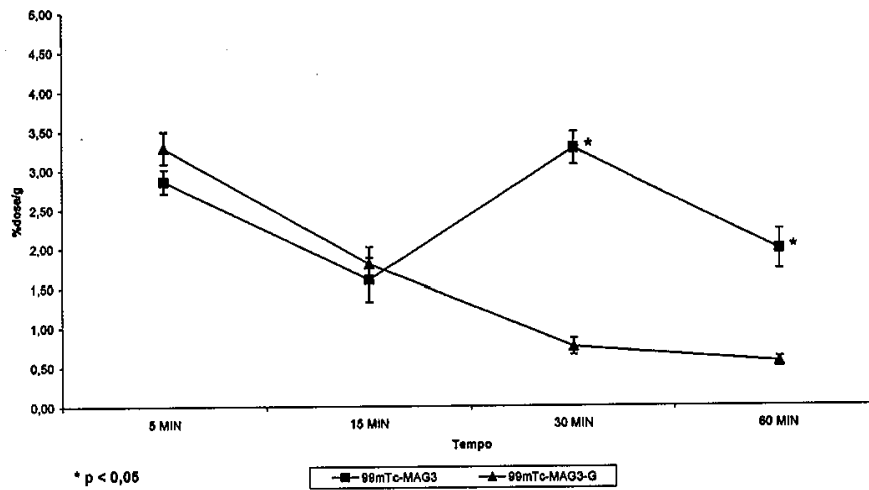


Figura 3

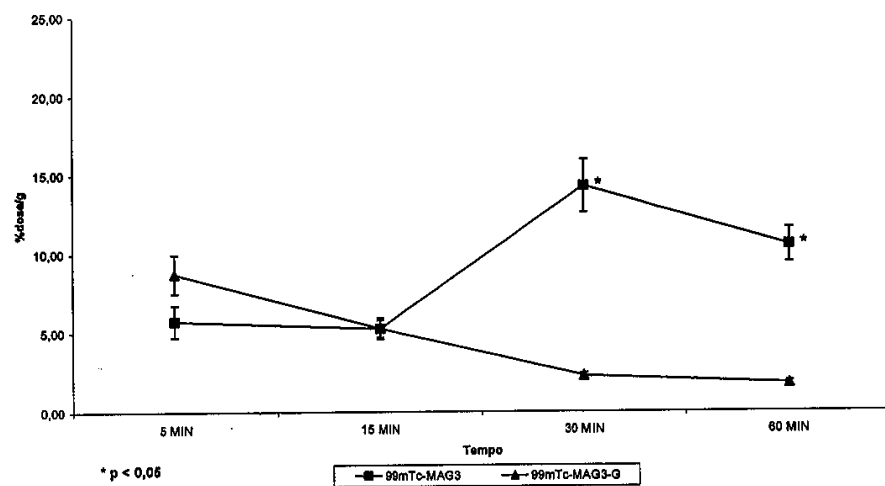


Figura 4

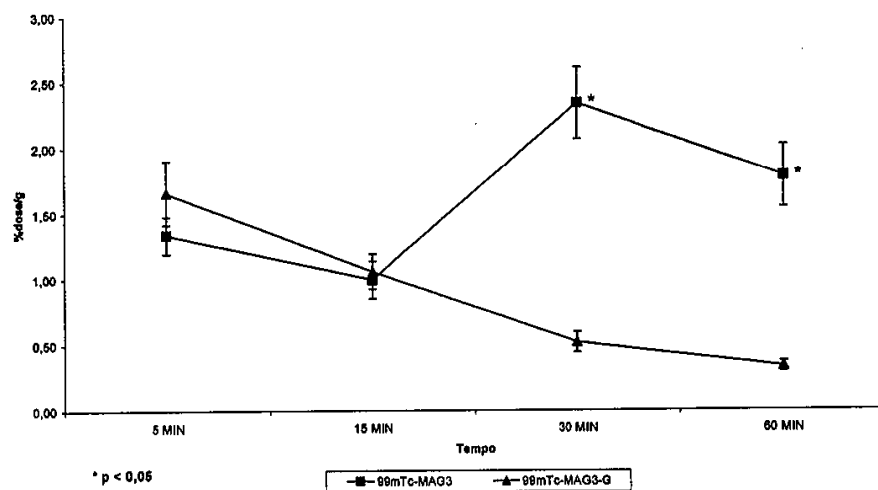


Figura 5

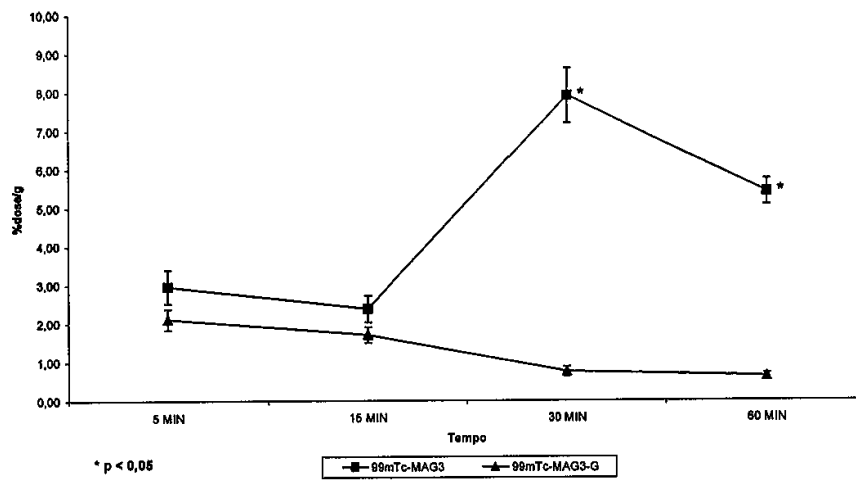


Figura 6

