



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0719314-9 A2



* B R P I 0 7 1 9 3 1 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 17/11/2007
(43) Data da Publicação: 04/02/2014
(RPI 2248)

(51) Int.Cl.:
C12Q 1/02

(54) Título: PROCESSO DE TRATAMENTO
TERAPÊUTICO PERSONALIZADO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 17/11/2006 US 60/859.739

(73) Titular(es): Accim Biosciences

(72) Inventor(es): Ali Arjomand, Glenn Kawasaki, Michael
Chansler

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007085033 de
17/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/064138de
29/05/2008

"PROCESSO DE TRATAMENTO TERAPÊUTICO PERSONALIZADO"

Campo Técnico

É divulgado um processo para a determinação simultânea da distribuição de dois ou mais agentes químicos (terapêuticos) para o tecido doente e patógenos. O procedimento 5 gera um relatório específico do paciente que é usado para selecionar o melhor agente químico e dosagem de uma forma personalizada.

Anterioridade

A quimioterapia é uma poderosa ferramenta disponível para clínicos para o tratamento do câncer. A seleção de fármacos, combinações, dosagens e horários é frequentemente com base em dados estatísticos de um grupo. A dosagem dos agentes quimioterápicos pode ser difícil. Por exemplo, se a dose for muito baixa, a terapia será ineficaz contra o tumor, enquanto a doses excessivas a toxicidade (os efeitos colaterais) será intolerável para o paciente. Isso tem levado à formação de esquemas de dosagem detalhados na maioria das configurações de tratamento, o que orienta em relação à dose correta e ajuste em caso 10 de toxicidade. Na imunoterapia, os fármacos são em princípio usados em dosagens menores do que no tratamento de doenças malignas. Na maioria dos casos, a dose é ajustada para a área de superfície corporal do paciente e uma medida composta de peso e altura que matematicamente se aproxima do volume corporal. Portanto, ela é desejável para a seleção 15 de fármacos com base em análise de fatores tumorais individuais do paciente. Isso deveria resultar em melhor eficácia sem toxicidade aumentada.

Embora a dosagem da quimioterapia seja normalmente com base na área de superfície corporal, poucos dados apoiam verdadeiramente o uso desse método (*Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6^a edição. 335-344, 2001). A principal desvantagem desse método é que área de superfície corporal se relaciona muito pouco com a função hepática. 25 Isso é um problema já que bem poucos fármacos quimioterápicos para tipos de câncer citostáticos são metabolizados através do fígado. Além disso, as estratégias de dosagem presentes resultam em variantes entre os pacientes na área sob a curva (AUC) e a eliminação do fármaco por um fator de diversos múltiplos (*J. Clin. Oncol.* 14:2590-2611, 1996). Devido a essas falhas, uma ferramenta mais previsível com base em características tumorais individualizadas é necessária para a seleção de fármaco e dosagem.

O tratamento de câncer de mama é desafiador para o paciente e o clínico porque muitas terapias falham em agir como planejado. Isso é frequentemente o resultado do fato do tumor ser não-responsivo para o fármaco escolhido. Não há atualmente nenhum modo para prever consistentemente a responsividade antes de iniciar o tratamento, então é usado 35 o método de tentativa e erro. A seleção de agentes quimioterápicos para o câncer de mama é atualmente com base em diversos parâmetros gerais tais como a histologia do tumor, estágio clínico, status do receptor e antigênico. Esses prognosticadores levam a alguns paci-

entes receberem fármacos tóxicos dos quais eles não conseguem se beneficiar. Além disso, o tempo gasto para identificar um regime individualizado que seja benéfico ainda retarda o tratamento responsável. Uma ampla variedade de tumores pode ser tratada eficazmente quando são detectados prematuramente e o paciente é colocado em um regime terapêutico 5 adequado. Assim, uma melhor informação em prognosticadores de resposta tumoral para especificar os compostos quimioterápicos em pacientes individuais é necessária.

A eficácia dos regimes de quimioterapia para câncer de mama é altamente variável de paciente para paciente. Como resultado, uma proporção substancial de pacientes recebe fármacos tóxicos dos quais eles não conseguem se beneficiar, e alguns pacientes recebem 10 tardivamente o regime do qual eles mais se beneficiariam. Os prognosticadores de resposta prematura precisos para os compostos quimioterápicos podem se mostrar valiosos na determinação de gerenciamento clínico ótimo de pacientes com câncer de mama.

Tem havido algumas idéias experimentadas para tentar abordar o problema anterior. Uma foi descrita em Silverman et al., *Mol. Imageamento Biol.* 8(1):36-42, 2006, com o 15 uso de 3'-[F-18]fluor-3'-deoxitimidina com tomografia de emissão de pósitrons (PET) para tentar prever a resposta do câncer de mama à terapia. Especificamente, os autores concluíram que um scan PET com o uso do marcador deoxitimidina fluorada adquirido duas semanas após o término do primeiro curso da quimioterapia foi "útil" para prever eficácia a um prazo maior de regimes de quimioterapia para mulheres com câncer de mama. Esta "utilidade" é dificilmente uma resposta direta para a escolha de dosagem terapêutica ou adequada 20 para o paciente. Ao invés disso, ela é simplesmente uma ferramenta de monitoramento da eficácia para se medir o encolhimento do tumor.

Em Delgrorio et al., um único composto foi administrado a animal e linhagens celulares com o uso de um dose a nível terapêutico e usado AMS usado para se medir total ¹⁴C. 25 Houve nenhuma quantificação de metabólito experimentada por HPLC.

A Patente US 4.037.100 descreve um aparelho que pode ser usado para a detecção de partículas eletronegativas e fornece dados como para sua composição elemental. O aparelho inclui um espectrômetro de massa com acelerador (AMS) que pode ser usado para fazer a análise de massa e elemental. A Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) foi 30 desenvolvida como um método sensível para a contagem de isótopos cosmogênicos de vida longa, mas raros, tipicamente aqueles que têm meias vidas entre 10^3 e 2×10^7 anos. Os isótopos com essa variedade de meias vidas têm vida muito longa para detectar por técnicas convencionais decadentes, mas têm vida muito curta em escalas de tempo geológicas para estarem presentes em concentrações apeciáveis na biosfera ou litosfera. Ensaio com isótopos 35 cosmogênicos (tal como, ¹⁰Be, ¹⁴C, ²⁶Al, ⁴¹Ca, ³⁶Cl, e ¹²⁹I) por AMS tem se tornado uma ferramenta fundamental em arqueologia, oceanografia, e o geociências, mas tem não sido amplamente aplicado a problemas de uma natureza biológica ou clínica.

White e Brown (*Trends Pharmacol. Sci.* 25:442-447, 2004) é uma revisão que fornece exemplos de AMS usados em farmacologia e toxicologia. ^{14}C -uréia foi dada para crianças na Suécia e usada para detectar *Helicobacter pylori* pela medida de ^{14}C na respiração ou urina por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS). A produção de ^{14}C -benzeno 5 foi seguida em camundongos para fígado e medula óssea por AMS. Além disso, a ausência de um fármaco que chegue ao DNA foi determinada por similar estudos de micro-dosagem. Um estudo citado demonstrou que um carcinógeno, MelQx, formado a partir de carnes cozidas foi capaz para alcançar normal e tecido tumoral em pacientes humanos com câncer de cólon (Mauthe et al., *Int. J. Câncer* 80:539-545, 1999). Dano similar ao DNA foi visto em tecido tumoral e normal humano. A uma alta dose, o ^{14}C -tamoxifeno tinha sido administrado a mulheres quem estavam para se submeter a histerectomias para detectar (por AMS) dano 10 ao DNA no útero. O estudo concluiu que alguns dano ao DNA foi visto por AMS, mas não o suficiente para causar neoplasia. Outros isótopos (especialmente cálcio e alumínio) foram 15 seguidos em seres humanos com AMS. Entretanto, apesar de tais usos de AMS, nenhuma menção de efeitos diferenciais de dois ou mais fármacos em células cancerosas ou normais 20 foi divulgada.

Brown et al. (*Espectrometria de massa Rev.* 25:127-145, 2006), obserca a AMS para a detecção de mudanças em proteínas e DNA em indivíduos teste administrados com ^{14}C -carcinogênios. Ainda, os isótopos ^3H , ^{10}Be , ^{26}Al , ^{36}Cl , ^{41}Ca , e ^{129}I têm sido usados para 25 pesquisa biológica com AMS.

Wu et al. (*Int. J. Gynecol. Cancer* 12:409-423, 2002) é um artigo de revisão em proteomics em pesquisa sobre o câncer com o uso de dois-dimensional géis, chips protéicos, e outros métodos. Espectrometria de massa (mas não AMS) foi usada para resolver e medir pequeno moléculas orgânicas a partir de amostras biológicas. Uma técnica chamada microdissecção de captura a laser (LCM) foi sugerida para separar células específicas sob um 25 microscópio para análise subsequente. LCM tem também sido combinada com espectrometria de massa para captura e remoção de células a partir de tecido circunvizinho.

Lee e Macgregor, *Modern Drug Discovery* (July):45-49, 2004 observou a resistência ao fármaco em células cancerosas devido a mudanças em aceitação, absorção, metabolismo, eliminação, e outros mecanismos do fármaco. Os dados de microdisposição de DNA 30 podem ser usados para detectar biomarcadores da resposta à quimioterapia. Por exemplo, o marcador CA125 eleva em 70% de pacientes com câncer de ovário com reincidência para o tratamento de quimioterapia.

A testagem *in vitro* de células cancerosas de paciente para resistência e sensibilidade a fármaco foi feita por um número de organizações comerciais, tal como Rational Therapeutics, Oncotech, e Genzyme. O valor desses testículos não é substanciado; e muitas seguradoras não cobrem a testagem *in vitro* de células tumorais. Oncotech, por exemplo, 35

reivindica que seu ensaio EDR, o qual expõe células cancerosas primárias para cinco dias de fármacos em ágar macio, pode prever a resistência ao fármaco para a quimioterapia em pacientes (“sobre 99% de precisão para a identificação de agentes inficazes,” a partir do website de Oncotech). Entretanto, Oncotech requer pelo menos dois gramas de tecido tumoral viável; e pacientes não devem estar em terapia de quimioterapia ou radiação dentro de três semanas da coleta de espécime. Similarmente, Genzyme reivindica 99% de precisão em prever resistência a tumor para a quimioterapia. Nenhuma dessas companhias reivindica a precisão para prever que o fármaco(s) será eficaz, particularmente em combinações de dois ou mais fármacos administrados ao mesmo tempo.

Por fim, Sharma et al. (*Cancer Cell International* 5:26-45, 2005) demonstrou que imageamento MRI de sódio foi usado para monitorar resposta ao tratamento com taxotere em câncer de mama de rato. Elevado índice de sódio intracelular foi encontrado em tumores de mama benigno e maligno. Os agentes anticancerígenos aumentaram o sódio intracelular. Entretanto, a apoptose causada por tal fármacos leva a interrupções na distribuição de sódio. Portanto, os autores concluem que MRI de sódio pode ser usado como um método de monitoramento de fármaco *in vivo* para avaliar resposta de tumores à quimiosensibilidade a taxotere. Entretanto, os autores ainda opinam que o método com tecidos *in vivo* “levanta dúvida de precisão em prever as características do tumor.”

Resumo

É divulgado um processo para a determinação simultânea das quantidades de distribuição de dois ou mais agentes para tecido doente, em um nível celular. O processo gera um relatório específico do paciente que é usado para selecionar o melhor agente e dosagem em um modo individualizado para a distribuição a um local de atividade. Especificamente, é divulgado um processo para a determinação de terapia personalizada, que compreende:

(a) administrar um coquetel teste a um indivíduo teste, onde o coquetel teste compreende dois ou mais agentes terapêuticos diferentes a uma dosagem pelo menos duas vezes menor do que uma dose terapêutica esperada;

(b) obter uma biópsia de amostra do tecido doente relevante para estudo; e

(c) analisar a biópsia de amostra para cada um dos agentes terapêuticos administrados e seus metabólitos.

Preferencialmente, a dosagem do coquetel teste é uma Dose traçadora, onde uma Dose traçadora é menos do que 10% de uma dose terapêutica. Preferencialmente, a etapa de análise é executada com um Instrumento de Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS). Preferencialmente, o processo ainda compreende uma pausa a partir de cerca de 10 minutos para cerca de duas horas após administrar um coquetel teste para permitir para distribuição tecidual do coquetel teste. Preferencialmente, a biópsia de amostra é um pedaço de tecido selecionado a partir do grupo que consiste em tecido tumoral excisado, sangue,

sangue fracionado, tecido infectado com patógeno isolado, e combinações dos mesmos. Preferencialmente, o processo ainda compreende o fracionamento da biópsia de amostra por sortimento da amostra em tipos de componentes celulares. Mais preferencialmente, quando a biópsia de amostra é sangue, a amostra de sangue é fracionada em cada tipo de célula sanguínea branca e vermelha.

Beve Descrição das Figuras

A figura 1 é um fluxograma que descreve um fluxo de trabalho geral para o tratamento personalizado de câncer.

A figura 2 demonstra a separação de ciclofosfamida e paclitaxel por cromatografia líquida de alto desempenho.

A figura 3 demonstra um modelo da abordagem terapêutica personalizada que demonstra a quantificação da quantidade de ciclofosfamida e paclitaxel em biópsia de tumor de mama após a administração de coquetel teste em três pacientes A, B e C.

A figura 4 demonstra um esquema que utiliza a cromatografia líquida de alto desempenho para gerar frações individuais a intervalos de um minuto seguida pela quantificação da radiomarcação em cada fração com o uso de Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) para produzir dados de distribuição de ciclofosfamida e paclitaxel em biópsia de tumor de mama após a administração de coquetel teste em três pacientes A, B e C.

A figura 5 demonstra a quantidade de CVT 337 distribuída em tecidos 5 minutos após a administração oral e iv em camundongos. As amostras de três (3) camundongos em cada grupo de tratamento foram combinadas e medidas para atividade total de ^{14}C por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS).

A figura 6 demonstra a quantidade de CVT 337 em tecidos por um período de 24 horas após a administração iv em camundongos. As amostras a partir de três (3) camundongos em cada grupo de tratamento foram combinadas e medidas para atividade total de ^{14}C por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS).

A figura 7 demonstra concentração de ^{14}C -folato em célula sanguínea vermelha para os primeiros 8 dias (acima) e 200 dias (abaixo) pós-dose em um indivíduo humano saudável. O atraso de três dias antes do surgimento de ^{14}C -folato reprezentou o tempo necessário para incorporação de ^{14}C -folato em células na medula durante a maturação. As barras de erro representam desvio padrão de ± 1 de determinações triplicadas de ^{14}C por AMS.

A figura 8 demonstra uma cromatografia HPLC-AMS da amostra de plasma coletada uma hora após a administração oral de ^{14}C -ácido fólico para um indivíduo humano saudável. A absorção foi monitorada a 292 nm (linha sólida) e a concentração de ^{14}C foi medida por AMS e expressa como moderno (linha tracejada). O pico grande a partir de 2-4 minutos é de ácido ascórbico adicionado à amostra para proteger contra oxidação. Padrões de referência para ácido fólico (FA) e 5-metiltetraidrofolato (5MTFA) foram adicionados ao plasma

antes da extração para conferir a recuperação e para marcar os tempos de retenção de FA e 5MTFA.

A figura 9 demonstra um modelo simples descrevendo a absorção e perda de rastreador.

5 A figura 10 demonstra um modelo de multi-compartimentos de distribuição de folato em seres humanos. Esse esquema descreve combinações principais envolvidas em metabolismo de folato. A quantidade de rastreador foi medida em todas as combinações demonstradas com uma linha sólida. A combinação de tecido, demonstrada com uma linha pontilhada, foi a única combinação cuja concentração de ^{14}C -folato não foi medida. A elaboração de
10 um modelo comportamental permitiu que a distribuição do rastreador na combinação de tecido fosse determinada por diferença.

A figura 11 demonstra um modelo comportamental de cinética do folato em um voluntário humano. Os compartimentos são numerados de 1 a 11 e os coeficientes de transferência demonstrados como k (receptor, doador).

15 A figura 12 demonstra uma recuperação de 5FU e PAC contaminado a partir de homogenados de tecido com o uso de diferentes solventes de extração. Este experimento é descrito no Exemplo 3 neste.

20 A figura 13 demonstra uma cromatografia que mostra a separação de 5FU e PAC em extratos homogenados de tecido de camundongos. Os picos de 5FU e PAC no traço UV representam padrões de referência não-marcados contaminados em amostras experimentais antes da separação para marcar o tempo de retenção de 5FU e PAC radiomarcados o que não produz um sinal UV a concentrações dosadas. As frações em um minuto foram coletadas e as frações correspondentes a 5FU e PAC foram ainda analisadas por AMS para quantificação de ^{14}C .

25 A figura 14 demonstra sinal de radiomarcação total no plasma, xenoenxertos tumorais de linhagens celulares de câncer de cólon humano HT-29 e tecido pulmonar normal em camundongos duas horas após receberem 5FU, PAC ou um coquetel de ambos 5FU e PAC.

30 A figura 15 demonstra a quantidade de 5FU e PAC em tumor, tecido pulmonar e plasma normal após os camundongos receberem tanto 5FU, PAC ou ambos como um coquetel duas horas após a administração iv.

A figura 16 demonstra separação cromatográfica e quantificação de 5FU e PAC em extratos de tecido tumoral e pulmonar após o tratamento tanto com 5FU como PAC. Os extratos de tecido foram cromatografados com e sem contaminação com menos do que 1,0 DPM de 5FU. O gráfico é normalizado para PAC.

35 Descrição Detalhada

Definições

Os seguintes termos definidos são usados neste:

Um Indivíduo teste é um paciente; voluntário para estudo; ou um modelo animal.

Um Coquetel teste é uma dose de dois ou mais agentes químicos administrados a um Indivíduo teste. Os agentes químicos podem ser misturados juntos e co-administrados por vias de administração oral, intravenosa ou outras. Alternativamente, cada agente químico é administrado por uma via de administração diferente. Alternativamente, cada agente químico é administrado em um tempo diferente.

Uma Dose traçadora é uma sub-dose terapêutica administrada ao Indivíduo teste a níveis de traço para reduzir o risco de exposição química.

Um tecido alvo é um órgão, tecido ou massa celular cuja absorção de fármacos deve ser estudada.

Tempo de distribuição é o tempo entre a administração de Coquetel teste e a coleta de tecido alvo.

O sistema de detecção é o método analítico e instrumentação para avaliar os níveis de cada Dose traçadora no tecido alvo.

Relatório Teste é um resumo de resultados do procedimento teste.

Comparação de Métodos

A presente divulgação fornece um coquetel teste que compreende dois ou mais agentes terapêuticos diferentes a uma dosagem pelo menos duas vezes menor do que uma dose terapêutica esperada. Essa dose baixa é chamada uma "Dose traçadora." Ainda, a quantidade de radioatividade geralmente não é maior do que cerca de 100 nCi. A presente divulgação também usa diversas técnicas de detecção diferentes, inclusive AMS, espectroscoopia de massa (EM) e uma cromatografia líquida combinada (LC) para separações combinadas com a detecção EM.

A seguinte tabela lista os processos anteriores em comparação com a presente di-

vulgação.

Status	Protocolo	Propósito	Regulador	Tamanho da dose química	Isótopo ¹⁴ C	Método de detecção
Anterioridade	Microdose	Pesquisa	Exploratory Investigational New Drug (E-IND)	<100 µg de dose química	100 nCi	AMS
Anteriori-	Dose te-	Pesquisa	Investiga-	40-200	100 nCi	AMS

dade	rapêutica		tional No- vos Drug (IND)	mg de dose química		
Reivindi- cações atuais	Dose tra- çadora de dois ou mais a- gentes	-Pesquisa - Di- agnóstico	- Explora- tory IND - aprova- ção antes da co- merciali- zação para uso diagnostic <i>in vitro</i>	Tipica- mente, <10 mg de dose química de cada agente	100 nCi total	AMS LC/EM- EM PET

O seguinte procedimento emprega Doses traçadoras de dois agentes terapêuticos misturados em um Coquetel teste e administrados a um Indivíduo teste para quantificar a distribuição de cada agente terapêutico em tecido tumoral ou normal. O procedimento min-

5 mamente invasivo, combinado com métodos analíticos e instrumentação altamente sensíveis, fornece informação individualizada para a seleção de um ótimo agente terapêutico e dose ótima para terapia personalizada. Especificamente, esse exemplo fornece um procedimento para tratamento personalizado de câncer de mama. A distribuição de dois agentes quimioterápicos, ciclofosfamida e paclitaxel, ao tecido de mama maligno é avaliada. A Ciclo-
10 fosfamida é em uma classe de fármacos conhecida como agentes alquilantes. Ela retarda ou interrompe o crescimento de células cancerosas no corpo. A extensão de tratamento depende de quão bem o corpo responde ao fármaco, e o tipo de câncer. O Paclitaxel é amplamente usado como um fármaco quimioterapêutico no tratamento de diversas malignidades, inclusive cânceres de mama, de ovário, e de pulmão.

15 Esse procedimento é conduzido quando um Indivíduo teste é escalado para um procedimento de biópsia com agulha. Procedimentos de biópsia com agulha são executados rotineiramente para se obter amostras de tecido para determinação patológica de condições benignas e malignas. Aproximadamente 80% de indivíduos que se submetem a um procedimento de biópsia com agulha são determinados como tendo uma condição benigna.

20 Esse procedimento estabelece uma alta margem de segurança, especialmente para 80% de Indivíduos teste que se descobre posteriormente terem uma condição benigna. Os

agentes quimioterápicos podem ser tóxicos para todos os Indivíduos teste a dose terapêuticas. Para minimizar esse risco para todos os Indivíduos teste, um Coquetel teste que consiste essencialmente em Doses traçadoras de ciclofosfamida e paclitaxel foi formulado. Neste exemplo, a quantidade de cada agente no Coquetel teste foi 1000 vezes menos do que a 5 dose terapêutica correspondente.

A detecção de Doses traçadoras de ciclofosfamida e paclitaxel em biópsias com agulha requer método analíticos e instrumentação altamente sensíveis. A Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) é um método extremamente sensível para a detecção de Doses traçadoras de compostos marcados com um rastreador tal como radiocarbono os isótopos (¹⁴C). Quantidades extremamente pequenas de rastreador de isótopo ¹⁴C foram usadas na marcação de ciclofosfamida e paclitaxel devido à extrema sensibilidade de AMS. Como resultado, o risco de radiação do Coquetel teste para Indivíduos teste é comparável ao risco de radiação já presente no ambiente a níveis naturais ao longo de um período cumulativo de 10 um ano. Além disso, a quantidade extremamente baixa de rastreador de isótopo ¹⁴C no Coquetel teste e tecido alvo impediu procedimentos de manuseio especiais ou precauções, 15 tornando esse procedimento compatível com padrão ético, ambiental, médico e de práticas laboratoriais. AMS é, portanto, um sistema de detecção ideal para esse exemplo.

A seguinte tabela resume o projeto do protocolo anterior.

Indivíduo teste	mulher com 60 kg, 167 cm
Dose traçadora*	2,4 mg de Ciclofosfamida 0,292 mg de Paclitaxel
Tecido alvo	Biópsia de tumor de mama
Coquetel teste	Administração intravenosa única; infusão de 10 minutos
Tempo de distribuição	3 horas
Sistema de detecção	Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS)
Rastreador de isótopo ¹⁴ C	50 nCi de ciclofosfamida e 50 nCi de paclitaxel ou 100 nCi total
Relatório teste	% de dose administrada ou metabólitos em tecido alvo Quantidade de dose ou metabólito/mg de proteína no tecido alvo

* a dose terapêutica é de 2,400 mg para ciclofosfamida e de 292,25 mg para paclitaxel.

Ciclofosfamida

A Ciclofosfamida está em uma classe de fármacos conhecido como alquilantes agentes; ela retarda ou interrompe o crescimento de células cancerosas no corpo. A extensão de tratamento depende de quão bem o corpo responde ao fármaco, e o tipo de câncer. O fármaco pode ser tomado pela boca na forma de comprimido ou ser dado por injeção em uma veia. A fim de agir, a ciclofosfamida é primeiro convertida pelo fígado em dois substâncias químicas, acroleína e fosforamida. A acroleína e fosforamida são os compostos ativos, e eles retardam o crescimento de células cancerosas pela interferência com as ações de ácido desoxirribonucleico (DNA) dentro das células cancerosas. Ela é, portanto, citada como um fármaco citotóxico. Infelizmente, as células normais também são afetadas, e isto resulta em sérios efeitos colaterais. A ciclofosfamida também suprime o sistema imunológico e também é citada como imunosupressora.

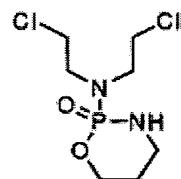
A dose inicial usual para tratamento de adultos e crianças é de 40-50 mg/kg administrados intravenosamente por 3-5 dias em doses divididas. O dose oral usual é 1-5 mg/kg por dia. As doses de manutenção subsequentes são ajustadas com base na resposta do tumor ao tratamento e os efeitos colaterais. Uma preparação de dose intravenosa para um Indivíduo teste com 60 kg contém $40 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} = 2,400 \text{ mg}$ de ciclofosfamida.

A Ciclofosfamida é biotransformada principalmente no fígado a metabólitos alquilantes ativos por um sistema de oxidase microsomal de função mista. Esses metabólitos interferem com o crescimento de células malignas suscetíveis de rápida proliferação. A Ciclofosfamida é bem absorvida após administração oral com um biodisponibilidade maior do que 75%. O fármaco não modificado tem uma meia vida de eliminação de 3 a 12 horas. Ela é eliminada primariamente na forma de metabólitos, mas a partir de 5% a 25% da dose é excretada na urina como fármaco não modificado. Diversos metabólitos citotóxicos e acitotóxicos têm sido identificado na urina e no plasma. As concentrações de metabólitos alcançam um máximo no plasma 2 a 3 horas após uma dose intravenosa. A ligação de proteína plasmática de fármaco não modificado é baixa, mas alguns metabólitos são ligados em uma extensão maior do que 60%. Não tem sido demonstrado que qualquer único metabólito é responsável tanto para os efeitos terapêuticos como tóxicos de ciclofosfamida. Embora níveis elevados de metabólitos de ciclofosfamida tenham sido observados em pacientes com insuficiência renal, uma maior toxicidade clínica em tais pacientes não tem sido demonstrada.

Cálculos de Dose traçadora de Ciclofosfamida

Fórmula $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{O}_2\text{P}$

Peso molecular 261,085 g/mol



Via uma única administração intravenosa

Indivíduo teste indivíduo com 60 kg

5 Dose 0,04 mg/kg

Dose traçadora 0,04 mg/kg x 60 kg = 2,4 mg

Isótopo ^{14}C 50 nCi

Atividade específica

Equivalente molar: $(2,4 \text{ mg ciclofosfamida}) \times (1 \text{ mmol} / 261,085 \text{ mg})$

10 $= 0,009192 \text{ mmol} = \underline{9,192 \mu\text{mol}}$

^{14}C Rastreador de isótopo: 50 nCi

50 nCi / $9,192 \mu\text{mol}$

$= \underline{5,43 \text{ nCi} / \mu\text{mol}}$

Fonte: Ciclofosfamida, (American Radiolabeled Quimicals, St. Louis, MO) 10 μCi

15 M.W. 261,085 Atividade específica 50-100 mCi/mmol é diluído a 0,1 mCi/mL

Paclitaxel

Paclitaxel é amplamente usado como um fármaco quimioterapêutico no tratamento de diversas malignidades, inclusive cânceres de mama, ovário, e pulmão. Paclitaxel é um fármaco lipofílico de ocorrência natural que foi originalmente extraído da teixo do pacífico *Taxus brevifolia*. O fármaco interfere com a função microtubular e resulta em apreensão primária e pós-mitótica de G1 em células do músculo liso, assim inibindo a proliferação dessas células sem induzir apoptose, ou morte celular.

Para o tratamento adjuvante de câncer de mama nódulo-positivo, o regime recomendado é paclitaxel, a uma dose de 175 mg/m^2 intravenosamente sobre 3 horas a cada 3 semanas para quatro cursos. Uma preparação de dose intravenosa para um Indivíduo teste de 60 kg contém $175 \text{ mg/m}^2 \times 1,67 \text{ m}^2 = 292,25 \text{ mg}$ de paclitaxel.

Paclitaxel deve ser diluído antes da infusão. A administração de Paclitaxel é recomendada para ser diluída a uma concentração de 0,3 a 1,2 mg/mL. As soluções são fisicamente e quimicamente estável para até 27 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e condições de iluminação ambiente.

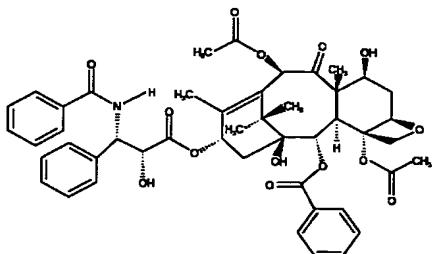
Paclitaxel Dose traçadora Cálculos

Dose traçadora nesse protocolo é pretendida para administração iv em um Indivíduo teste de 60 kg, 167 cm. A área calculada de superfície corporal para dose de medicação

com o uso da fórmula Mosteller é 1,67 m².

Fórmula C₄₇H₅₁NO₁₄

Peso molecular 853,906 g/mol



Via uma única administração intravenosa

5 Indivíduo teste com 60 kg, 1,67 m²

Dose 0,175 mg/m²

Dose traçadora 0,175 mg/m² x 1,67 m² = 0,292 mg

Isótopo ¹⁴C 50 nCi

Atividade específica

10 Equivalente molar: (0,292 mg paclitaxel) x (1 mmol / 853,906 mg)

= 0,000342 mmol = 0,342 μmol

Rastreador de isótopo ¹⁴C: 50 nCi

50 nCi /0,342 μmol

= 146,1 nCi / μmol

15 Fonte: Taxol (paclitaxel), [anel 2-benzoila-¹⁴C(U)] (American Radiolabels Chemicals, St. Louis, MO) 10 μCi M.W. 853,9 Atividade específica 50-100 mCi/mmol é diluído para 0,1 mCi/mL

O tecido alvo nesse exemplo foi tecido de mama coletado durante diagnóstico preliminar de malignidade. Uma vez que uma biópsia da mama é recomendada após uma des-
20 coberta anormal de mamografia, o Indivíduo teste se submete a uma alternativa minimamente invasiva para cirurgia, conhecida como uma biópsia com agulha. O procedimento de biópsia dura alguns minutos e não é necessária nenhuma sutura.

Uma biópsia da mama é executada para remover uma amostra de tecido de mama. O tecido é então estudado por um patologista sob um microscópio para determinar a pre-
25 sença ou ausência de malignidade. Diversos métodos de biópsia da mama existem agora. O método de biópsia mais adequado para um paciente depende de uma variedade de fatores, inclusive o tamanho, localização, surgimento e características do mama anormalidade. Es-
ses métodos fornece quantidade suficiente de tecido alvo para outra análise histológica por um patologista e quantificação de dose traçadora.

30 Em esse protocolo, um caroço biópsia com agulha foi executada para se obter tecido alvo. Uma biópsia de caroço com agulha é um procedimento percutâneo que envolve remover pequenas amostras de tecido de mama com o uso de um agulha de "núcleo" oco.

Três a seis inserções de agulha são necessárias para se obter uma adequada amostra de tecido. Tipicamente, cada inserção remove amostras de aproximadamente 0,75 polegadas (aproximadamente 2,0 centímetros) e 0,0625 polegadas (aproximadamente 0,16 centímetros) em diâmetro. O volume da amostra removida em cada inserção de agulha é de aproximadamente 0,04 cm³ com uma massa de aproximadamente 40 mg. Isso fornece material para mais do que 5 medidas analíticas separadas com o uso de 40 mg de tecido alvo. A amostra coletada a partir de uma inserção é rapidamente congelada em nitrogênio líquido e mantida congelado até outra análise. O resto das amostras coletadas são enviadas para o laboratório de patologia para determinar se um nódulo de mama é canceroso (maligno) ou não canceroso (benigno).

$\text{Inserção de agulha única} = 2,0 \text{ cm de extensão} \times 0,16 \text{ cm de diâmetro} = 0,04 \text{ cm}^3$
$\text{Inserção de agulha única} = \text{aprox. } 40 \text{ mg de tecido alvo}$
$40 \text{ mg de tecido alvo} = \text{Pelo menos 5 medidas analíticas separadas}$

O procedimento para a detecção de cada dose traçadora e seus metabólitos ativos em tecido alvo é um processo de duas etapas: (1) Dose traçadora e metabólitos são separados em frações diferentes por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), (2) a quantidade de ¹⁴C rastreador de isótopo em cada fração é determinada por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS). Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) é a plataforma de escolha quando é necessária extrema sensibilidade. Nesse exemplo, AMS quantifica a quantidade de radiocarbono-marcado Dose traçadora em tecido alvo com atomol (10^{-18} M) sensibilidade. Doses muito baixas de traços de AMS de compostos com o uso de radiação extremamente baixa (<100 nanoCurie) em Indivíduos teste. Absorção, metabolismo, distribuição, ligação, e eliminação são todos quantificáveis com alta precisão após adequada preparação da amostra.

(1) O fracionamento por HPLC

Os principais metabólitos de paclitaxel no plasma humano são 6-alfa-hidroxipaclitaxel; 3'-p-hidroxipaclitaxel; 6-alfa, 3'-p-diidroxipaclitaxel; 7-epipaclitaxel. Os principais metabólitos de ciclofosfamida no plasma humano são 4-hidroxifosfamida (OH-CP) e carboxietilfosfamida (CEPM). Há alguns metabólitos diferentes encontrados em urina humana: ciclofosfamida; N-declorofosfamida (DCL-CP); 4-ceto ciclofosfamida (4CetoCP); e carbonxi ciclofosfamida (CarboxiCP).

Os protocolos personalizados permitem a separação de compostos originais e/ou metabólitos de paclitaxel e ciclofosfamida. Vide exemplo abaixo para separação de compostos originais de paclitaxel e ciclofosfamida (*J. Pharm. Biomed. Anal.* 1;39(1-2):170-6, 2005).

Procedimento

a)O tecido alvo é removido do freezer e deixado para descongelamento sobre gelo.

Uma porção com o peso de 20-30 mg é isolada e o peso seco registrado. Um 20% peso/volume (p/v) homogenado é preparado em albumina sérica bovina (BSA, 40 g/L) em água.

b)Homogenados (0,1 mL) são extraídos por acetato de etila (1 mL).

c)Um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e de coluna de octadecil silicone (ODS) de 4,6 mm x 250 mm é usado para separar as frações com o uso de um protocolo de gradiente que consiste em acetonitrila-água deionizada (*J. Pharm. Biomed. Anal.* 1 de Set.; 39(1-2):170-6, 2005).

d)Frações individuais são coletadas e ainda analisadas por AMS.

(2) A detecção por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS)

Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) é um sensível instrumento essencial para a detecção de níveis extremamente baixos de radiocarbono (^{14}C) em amostras muito pequenas. O natural índice de ^{14}C em 20 μL de plasma humano ou 5 mg de tecido é aproximadamente 105×10^{-18} (atomol) ^{14}C , representando menos do que 1 decaídas de ^{14}C por hora. Este nível natural de ^{14}C é não detectável por outros instrumentos, ainda é facilmente quantificado para mais do que 1% deprecisão em menos do que um minuto por instrumentação AMS. AMS pode quantificar níveis ainda menores de ^{14}C com excepcionais sensibilidade e precisão. O limite de quantificação (LOQ) AMS para ^{14}C é <200 zeptomol (10^{-21} mol) em 20 μL de plasma humano ou 5 mg tecido (*BioTechniques* 38:S25-S29).

AMS é um tipo de espectrometria de massa de proporção de isótopo tandem no que um feixe de baixa energia (dezenas de keV) de íons negativos atômicos e moleculares pequenos é analisado em massa para resolução de 1 AMU (massa 14, por exemplo). Esses íons são então atraídos para uma célula de colisão papel alumínio em gás ou sólido que é mantido a potencial positivo muito alto (0,5-10 megaVolts). Passando através do papel alumínio ou gás, dois ou mais elétrons são chocados a partir do íon atômico ou molecular, tornando-os positivo em carga. Esses íons positivos então aceleram away a partir do positivo potencial para um segundo massa analisador onde um abundant carga estado (4^+ no caso de uma dissociação de 7MV) é selecionado. A perda de 4 ou mais elétrons (para o 3^+ carga estado) no colisão célula destroys todos moléculas, leaving apenas nuclear íons a relativamente alto energias (20-100 MeV) que pode ser individualmente e uniquely identified por diversos propriedades de seus interação com detectors. O caroço "truques" de AMS são dissociação molecular para remover isóbaros moleculares e identificação de íon para distinguir isóbaros nucleares. Além dessas duas propriedades fundamentais de AMS, truques especiais únicos para cada elemento têm sido desenvolvidos. Nesse caso, ^{14}N é separado de fonte de íon ^{14}C já que o nitrogênio não forma um íon negativo.

A sensibilidade e especificidade de AMS enables farmacocinética e distribuição estudos de Doses traçadoras de agente químicos ^{14}C -marcado para tecido alvo de Indivíduos teste. Qualquer excesso de isótopo ^{14}C acima de níveis de pré-dose bem-conhecidos e mensuráveis é atribuido para o Dose traçadora e seu metabólitos. AMS sensibilidade drasticamente reduz a dose química exposição para 100-1000x abaixo terapêutico níveis e o ^{14}C rastreador de exposição ao isótopo para menos do que níveis de 100 nanoCurie (nCi).

Procedimento:

a)O volume de cada uma fração HPLC é colocado em tubos de quartzo individuais. Carbono carreador (1 mg) a partir de um suprimento estoque de tributirina é adicionado para eficiente grafitização. Tubos de quartzo são colocado em um centrifuge e seus índices secos sob a vácuo. Um padrão cálculo é usado para correta sinal introduced pelo carbono carreador. Todos amostras são individualmente combustadas para CO_2 e o CO_2 é reduzida para grafite sobre um adequado catalisador tal como ferro (*Anal. Chem.* 75,2192-2196, 2003).

b)AMS medidas são executada no grafite (Davis, *Nucl. Instrum. Methods* B40/41. 15 705-708, 1989; e Proctor, *Nucl. Instrum. Methods* B40/41. 727-730, 1989).

c)Controles – Um amostra plasmática é coletado antes de administração do Coquetel teste para assegurar que o Indivíduo teste does não possua níveis de rastreador de isótopo ^{14}C acima de níveis naturais. sacarose ANU, com uma atividade 1,508 vezes o ^{14}C atividade de 1950 carbono é usada como o padrão analítico.

Relatório Teste

Os resultados analíticos a partir do AMS instrumento são analisados e um relatório é produzido classificando a distribuição de cada agente químico no Coquetel teste de acordo com a quantidade detectada no tecido alvo. O Relatório Teste pode ser apresentado em diversos diferente formatos.

Cálculos de Rastreador Isótopo ^{14}C

AMS fornece um direta medida do $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ proporção em HPLC frações. Isso $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ proporção é conhecido como o Fração Moderno (FM). O FM valor é usado para calcular o quantidade de ^{14}C rastreador de isótopo em cada fração HPLC. Um série de cálculos é demonstrado abaixo para quantificação de Doses traçadoras no protocolo.

Etapa 1 - Conversão de resultados de AMS para quantidade de isótopo ^{14}C (atomol)

$$\text{atomol } ^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} =$$

$$(FM) \times (97.9 \text{ atomol } ^{14}\text{C}) \times (\text{mg C}_{\text{carrier}} + \text{mg C}_{\text{fração HPLC}}) - (^{14}\text{C}_{\text{carrier}})$$

$$\text{mg C}_{\text{total}}$$

Etapa 2 – as frações HPLC são essencialmente livres de carbono já que o HPLC de fase móvel consiste em componentes voláteis que são todos removidos durante centrifugação a vácuo. Portanto, o mg C_{fração HPLC} é considerado sendo zero. A equação acima é reduzida para:

$$\text{atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} = \frac{(\text{FM}) \times (97,9 \text{ atomol } {}^{14}\text{C}) \times (\text{mg C}_{\text{carrier}}) - ({}^{14}\text{C}_{\text{carrier}})}{\text{mg C}_{\text{carrier}}}$$

5 Etapa 3 - Um comum carbono carreador é tributirina (80 μL , 20 mg/mL). O total carbono massa adicionado como carreador é 0,9536 mg C. A Fração de Moderno é 0,1014.

$$\text{atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{carrier}} = (0,1014 \text{ FM}) \times (97,9 \text{ atomol } {}^{14}\text{C}) \times (0,9536 \text{ mg C}_{\text{carrier}})$$

$$\text{mg C}_{\text{carreador}}$$

$$\text{atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{carrier}} = 9,466 \text{ atomol } {}^{14}\text{C em tributirina carreador}$$

10 Etapa 4 – nesse exemplo, uma fração HPLC com carbono carreador adicionado tem uma Fração de Moderno de 0,2345, então:

$$\text{atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} = \frac{(0,2345) \times (97,9 \text{ atomol } {}^{14}\text{C}) \times (0,9536 \text{ mg C}_{\text{carrier}}) - (9,466 \text{ atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{carrier}})}{\text{mg C}_{\text{carrier}}}$$

$$\text{atomol } {}^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} = 12,426 \text{ atomol } {}^{14}\text{C em fração HPLC}$$

15 Etapa 5 – O quantidade de ${}^{14}\text{C}$ em atomoles é convertida para fCi ${}^{14}\text{C}$.

$$\text{fCi } {}^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} = (12,426 \text{ atomol } {}^{14}\text{C}) \times (6,11 \text{ fCi})$$

$$= (97,9 \text{ atomol})$$

$$\text{fCi } {}^{14}\text{C}_{\text{fração HPLC}} = 0,7755 \text{ fCi } {}^{14}\text{C}$$

20 Etapa 6(a) - Se essa fração HPLC representa ciclofosfamida, então a quantidade de ${}^{14}\text{C}$ -ciclofosfamida na fração HPLC é calculada com o uso da atividade específica da Dose traçadora administrada de ${}^{14}\text{C}$ -ciclofosfamida.

$$\text{pmol } {}^{14}\text{C-ciclofosfamida} = \frac{(0,7755 \text{ fCi } {}^{14}\text{C}) \times (1 \text{ nCi}) \times (1 \mu\text{mol}) \times (10^6 \text{ pmol})}{(10^6 \text{ fCi}) (5,43 \text{ nCi}) (1 \mu\text{mol})}$$

25 $\text{pmol } {}^{14}\text{C-ciclofosfamida} = 0,1428 \text{ pmol } {}^{14}\text{C-ciclofosfamida}$

$$\% \text{ dose administrada em fração HPLC} =$$

$$0,1428 \text{ pmol } {}^{14}\text{C-ciclofosfamida em fração HPLC}$$

$$9,192 \mu\text{mol } {}^{14}\text{C-ciclofosfamida em dose administrada}$$

$$\% \text{ dose administrada em fração HPLC} = 0,00000155 \%$$

30 Etapa 6(b) - Se essa fração HPLC representa paclitaxel, então o quantidade de ${}^{14}\text{C}$ -paclitaxel na fração HPLC é quantificada com o uso da atividade específica da Dose traçadora administrada de ${}^{14}\text{C}$ -paclitaxel.

$$\text{pmol } {}^{14}\text{C-paclitaxel} = \frac{(0,7755 \text{ fCi } {}^{14}\text{C}) \times (1 \text{ nCi}) \times (1 \mu\text{mol}) \times (10^9 \text{ fmol})}{(10^6 \text{ fCi}) (146,1 \text{ nCi}) (1 \mu\text{mol})}$$

$$\text{pmol } {}^{14}\text{C-paclitaxel} = 5,308 \text{ fmol } {}^{14}\text{C-paclitaxel}$$

$$\% \text{ dose administrada em fração HPLC} =$$

5,308 fmol ^{14}C -paclitaxel em fração HPLC

0,342 μmol ^{14}C -paclitaxel em dose administrada

% dose administrada em HPLC = 0,00000155 %

O cálculos acima são aplicados para todas as frações coletadas por HPLC. A ativi-

5 dade específica da molécula dos compostos originais é usada para calcular a quantidade de metabólitos presentes em cada fração. Para simplicidade, o termo 'equivalente' é usado pa-
ra significar que a atividade específica da molécula dos compostos originais é usada para calcular a quantidade de metabólitos.

paclitaxel ciclofosfamida

10 equivalente 6-alfa-hidroxipaclitaxel equivalente 4-hidroxifosfamida

equivalente 3'-p-hidroxipaclitaxel equivalente carboxietilfosfamida

Substancial variabilidade inter-individual existe na farmacocinética e metabolismo de agentes quimioterápicos. Os indivíduos podem obter diferentes concentrações plasmáticas de paclitaxel após doses fixas de paclitaxel. Uma diferença de 4–5 vezes em área de 15 paclitaxel sob a curva concentração-tempo (AUC) foi relatada após uma administração de dose fixa (*J. Clin. Oncol.* 15:317–29, 1997). O tecido alvo guiou a seleção de agentes quimi-
oterápicos e otimização de dosagem em um modo individualizado pode auxiliar em se chegar ao tratamento desejado.

20 O processo descrito permite determinação individualizada da distribuição de tera-
pêutico compostos. Dados são apresentados, por exemplo, para dois a compostos quimioterápicos, ciclofosfamida e paclitaxel, para tecido alvo. Quantitative distribuição de Doses tra-
çadoras de ciclofosfamida e paclitaxel co-administrados em um Coquetel teste pode servir para forecast distribuição desses geralmente tóxicos agentes doses em tumor de mama. Tal 25 previsões são difíceis de se fazer devido à grande quantidade de variabilidade dentre os
indivíduos. Entretanto, medidas de distribuição aumentam a precisão com o que a eficácia de cada agente quimioterápico é prevista.

30 As alterações no metabolismo do fármaco são particularmente importantes em pa-
cientes com câncer, que são submetidos tipicamente à terapia de multi-fármacos e/ou pode sofrer de doença hepática devido à fármaco-toxicidade ou metastase hepática. Diversas enzimas metabólicas podem ser tanto supra ou infra-reguladas sob essas condições. Além disso, diversos fatores podem influenciar o metabolismo do fármaco outcomes, inclusive, por exemplo, fatores genéticos, estado de doença, idade, dieta, e estado fisiológico.

Exemplo 1

35 Esse exemplo ilustra a quantificação de ^{14}C -CPT 377 distribuição em diversos tecidos em camundongos por Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS). Diagnósticos de Tipo II diabetes e complicações associadas com diabetes surgiram para epidêmicas proporções na última década em uma escala global. Ela é atualmente estimado que mais do que

150 milhões de pessoas sofram de diabetes Tipo II, com a características de insulino resistência em tecidos periféricos, hiperglicemia, e disfunção pancreática de *B*-célula. Embora diversas terapias comercializadas estejam disponíveis, muitas têm efeitos colaterais significativos ou se tornaram ineficazes para pacientes que recebem esses tratamentos. Além
5 disso, na medida em que a doença progride, a necessidade para intervenção terapêutica adicional e tratamento suplementar com insulina é necessária. Como tal, esforço considerável no sentido do desenvolvimento de agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação continua, com a esperança de se reduzir a ocorrência, progressão e complicações desse
doença debilitante.

10 Uma tal abordagem é para se obter agentes sensibilizantes de insulina eficazes alvejando-se a via de sinalização de insulina diretamente, e mais especificamente através de Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B). PTP1B é uma enzima amplamente expressa, não-receptora que negativamente regula a sinalização de insulina e leptina *in vivo*. camundongos PTP1B knockout (PTP1B^{-/-}) são saudáveis e mostram sensibilidade à insulina aumentada,
15 aumentada glicose tolerância e resistência para ganho de peso quando recebe uma dieta com alto gordura. Além disso, estudos a partir de tecido específico atenuação de PTP1B sugere um papel para esse enzima em certos tecidos sensíveis à insulina. Portanto, uma pequena molécula reversível, inibiror competitivo desse bem-validado alvo iria fornecer um positivo terapêutico benefício em o tratamento de diabetes Tipo II.

20 Uma molécula de partida de estágio inicial altamente potente a partir de uma série química projetada para especificamente inibir PTP1B, foi encontrada por ser eficaz em um modelo camundongo de diabetes e obesidade (C57Bl/6J ob/ob). Reduções em níveis plasmáticos de glicose diários e efeitos positivos em um teste de tolerância à glicose padrão foram vistos após 3-5 dias de um uma vez que tratamento oral diário com esse composto
25 (CPT 377). Tradicional farmacocinética análise revelou a biodisponibilidade oral da molécula para ser baixa (<6%) com uma meia-vida sérica de 1,5 horas. Com base no reported papel de PTP1B em tecidos periféricos de sensibilidade à insulina, um estudo deAMS foi projetado para delinear se o positivo eficácia resultados desse composto foram devido a residence tempo do composto em específico tecidos. Essa informação iria ajudar a estabelecer o potencial correlação entre tecido exposição e efeito.
30

Um experimento foi set up com um Teste Artigo sendo um oral e iv fórmulação de um lightly-marcado ¹⁴C-CPT 377 (pequena molécula). A atividade específica foi 0,12 mCi/mmol, condições de armazenamento foram 2-8°C, a dose oral foi 20mg/kg, e dose iv foi 4mg/kg em 38 camundongos machos estirpe CD-1 (equivalente albino Swiss, Charles River Laboratories, Hollister, CA) com o peso de cerca de 20 g cada um. O animais foram abrigados individualmente a temperatura ambiente e 50 \pm 20% de umidade relativa, em ambientes com pelo menos dez mudanças de ar no ambiente por hora e alimentados com Laboratory

Rodent Diet com água forneceu *ad libitum*. O fotoperíodo foi diurno; 12 horas de luz, 12 horas de escuro e os animais foram primeiramente aclimados por quatro dias.

Aproximadamente 1 mL sangue integral foi coletado por cardiac puncture. Plasma e eritrócitos foram separados na hora da coleta por centrifugação a aproximadamente 2800

- 5 RPM para 15 minutos a 4 °C. Plasma foi removido e armazenados em Fisher brand glass threaded vials.

As amostras de tecido a partir de diversos órgãos foram obtidas por remoção cirúrgica e o peso seco registrado. Um homogenado de 20% peso/volume (p/v) foi preparado em 20 mM fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4), pH 7,4.

- 10 A concentração total de carbono em cada amostra (75-100 μL) foi medida pelo congelamento da amostra sobre nitrogênio líquido em individual Costech estanho cápsulas (Ventura, CA) seguida por liofilização durante a noite. Cada cápsula foi então colocado inside um segundo estanho cápsula, rolado em uma esfera e analisados para total carbono concentração com o uso de um analisador de carbono Carlo-Erba (Pella, Am. Lab. 22:116-
15 25, 1990). Cálculos foram com base em amostra pesos medido para quatro casas decimais.

Tecido	Amostra	Massa (μg)	% Carbono
Plasma 1	2,1	4656	3,75
Plasma 2	2,2	3679	4,10
Plasma 3	2,3	4121	3,31
Plasma 4	8,1	3313	4,80
Plasma 5	8,2	2724	5,72
Plasma 6	8,3	3169	6,60
Plasma 7	11,1	4667	4,23
Plasma 8	11,2	2610	5,21
Plasma 9	11,3	4196	4,79
Plasma 10	14,1	4664	4,42
Plasma 11	14,3	5617	3,87
Plasma 12	17,1	5013	3,32
Plasma 13	17,2	5403	4,02
Plasma 14	17,3	3886	4,27
Plasma médio (% Carbono)			4,46
Cérebro 1	42,1	2972	5,13
Cérebro 2	42,3	6975	3,11
Cérebro médio (% Carbono)			4,12
Fígado 1	48,1	5293	3,05
Fígado 2	48,2	7029	2,74

Fígado médio (% Carbono)			2,90
Gordura 1	80,1	4654	0,76
Gordura 2	80,2	3324	0,98
Gordura médio (% Carbono)			0,87
Músculo 1	89,1	5106	2,32
Músculo 2	89,2	4821	2,88
Músculo 3	89,3	6366	2,74
Músculo médio (% Carbono)			2,65

Aproximadamente 20 μL de tecido homogenizado foram colocados em tubos individuais de quartzo e grafitados (*Anal. Chem.* 75:2192-2196, 2003). nesse processo, todas as amostras foram combustadas a CO_2 e o CO_2 foi reduzido a grafite sobre um adequado catalisador, tal como ferro.

$$\frac{\text{Radiocarbono}_{\text{amostra}} = \text{fração moderna} \times 97,9 \text{ amol de radiocarbono} \times \text{carbono}}{\text{amostra}} \\ \text{mg de carbono}$$

5 As medidas de AMS foram executadas como descrito anteriormente (Davis, *Nucl. Instrum. Methods.* B40/41. 705-708, 1989 e; Proctor, *Nucl. Instrum. Methods.* B40/41. 727-730, 1989). A pré-dose plasma e urina foi coletada de um camundongo para assegurar que os animais não possuem concentrações de ^{14}C acima de níveis naturais. Seis amostras adicionais estão disponíveis para o uso para medidas de controle de ^{14}C . A sacarose ANU, com 10 uma atividade 1,508 vezes a atividade ^{14}C de carbono 1950 foi usada como o padrão analítico.

O tempo de administração da dose foi citado como T_0 . Todos os ponto de tempos subsequentes, dado em minutos, foram citados como ‘minutos desde a dose’. Os cálculos de ^{14}C foram “atuais” para quatro casas decimais a 3% de precisão. O moderno pode ser thought de como um medida de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ proporção. A concentração de ^{14}C foi calculada a partir do moderno valores por com o uso de um referência número para total carbono (^{12}C) em diversas amostra tipos. Uma vez que a concentração de ^{14}C foi determinada, a concentração da ^{14}C -dose foi calculada com o uso da atividade específica da dose administrada.

20 Plasma, urina, bile fmol ^{14}C -dose/ μL
Tecido fmol ^{14}C -dose/g tecido

$$\frac{1 \text{ moderno} = 13,56 \text{ dpm} = 6,11 \text{ fCi} = 97,9 \text{ amol de radiocarbono}}{\text{g de carbono mg de carbono mg de carbono}}$$

$$1 \text{ mol } ^{14}\text{C} = 14 \text{ g } ^{14}\text{C}$$

$$\text{fCi } ^{14}\text{C-composto} = 1 \text{ fmol } ^{14}\text{C-composto}$$

$$\text{g } ^{14}\text{C} = 1 \text{ g } ^{14}\text{C-composto}$$

O composto (administrado iv) foi rapidamente eliminado a partir de plasma dentro

de 25 minutos e sobre 95% eliminado dentro de 3 horas de dosagem. Com administração oral, Cmax foi alcançado a aproximadamente 1,5-2 horas. Houve um aproximadamente 100x diferença entre oral e iv concentração a Cmax. Houve muito pouca ou nenhuma distribuição de dose iv ou oral em cérebro. Com um iv dose em coração tecido, houve um rápida queda em concentração por 25 minutos após a dose e um retorno próximo para linha de base por aproximadamente 6 horas. O oral dose saw um muito rápida queda em concentração e retorno para linha de base dentro de 25 minutos. O diferença em máximo concentração entre vias iv e oral é menos observada em coração. no fígado/rins/Testículos/Osso, (iv dose) o sinal máximo foi observado a 5 minutos com rápida queda em composto concentração dentro de 25 minutos e retorno para linha de base por 6 horas após a dose. Com a dose oral, houve um rápida queda em concentração e retorno próximo para linha de base dentro de 6 horas.

A dose iv no músculo demonstrou o sinal máximo foi observado a 5 minutos com queda mais lenta em concentração de dose do que outros tecidos. Ele retornou à linha de base por 6 horas após a dose. A dose oral demonstrou uma queda mais lenta em concentração do que outros tecidos mais. Ela retornou à linha de base por 6 horas após a dose. Deve ser observado que houve pouco ou nenhuma diferença em concentração entre as vias de administração iv e oral.

Em tecido gorduroso, o sinal máximo de dose iv foi observado a 5 minutos com rápida queda na concentração do composto dentro de 25 minutos e retorno à linha de base por 6 horas após a dose. Similarmente, com a dose oral uma queda rápida em concentração foi observada e um retorno próximo à linha de base dentro de 6 horas.

O composto CPT 377 foi um composto líder inicial em uma série de inibidores potentes e bem-caracterizados de PTP1B. Ele demonstrou consistente eficácia oral em um modelo de camundongo ob/ob de diabetes e obesidade. Os resultados a partir de um estudo farmacocinético tradicional em rato com o uso de CPT 377, revelaram que o composto tem um perfil farmacocinético menos do que ótimo com uma baixa biodisponibilidade (<6%). A fim de compreender ainda a desconexão entre a eficácia e a biodisponibilidade de 377 e para determinar se o composto tinha o tempo de residência suficiente em tecidos sensíveis à insulina para fornecer um efeito, um método ultra-sensível para analisar o perfil de distribuição de baixos níveis de composto foi necessário. CPT 377 foi facilmente marcado com ¹⁴C no local a uma economia significativa de custo e de tempo e foi dosado para camundongos por gavagem oral ou intravenosa, e as amostras coletadas a diversos pontos de tempo através de 24 horas. O perfil de distribuição tecidual e a determinação da biodisponibilidade a partir do estudo de AMS forneceu a informação necessária para focar em modificações químicas alternadas a fim de se beneficiar da potência, evitar eliminação rápida, e foco em tecidos alvo específicos de interesse.

O estudo demonstrou a utilidade de AMS como uma ultra-sensível a detecção plataforma para quantificar a cinética do fármaco e distribuição em pequenos animais. Os métodos analíticos de AMS não necessitam de nenhum desenvolvimento de método adicional, inclusive otimização espectrométrica cromatográfica ou de massa para específico químico estruturas. Isso torna AMS ainda mais adequado para a fase inicial de desenvolvimento de fármaco onde as fontes analíticas ou métodos podem não estar prontamente disponíveis, ou onde a caracterização inicial pré-clínica pode ajudar a selecionar o candidato mais adequado dentro de uma série de compostos similares. Como tal, os protocolos baseados em AMS permitem a avaliação de farmacocinética e características de ADME de novos fármacos anteriormente em desenvolvimento, com contribuição bioanalítica mínima e com tremenda sensibilidade.

Exemplo 2

Esse exemplo demonstra uma quantificação da distribuição de ¹⁴C-ácido fólico nas células sanguíneas vermelhas e mais particularmente uma quantificação e a elaboração de um modelo comportamental de distribuição de ¹⁴C-ácido fólico nas células sanguíneas vermelhas após uma única administração oral em um indivíduo humano.

Recentes avanços em espectrometria de massa e a disponibilidade de compostos estáveis marcados com isótopos fizeram do rastreamento cinético de nutrientes uma poderosa ferramenta para a compreensão do metabolismo de nutrientes em seres humanos. A qualidade dos dados gerados por tais estudos foi ditada em uma grande proporção por limitações devido a preparação e análise da amostra. A Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) forneceu uma abordagem alternativa para o estudo da cinética de rastreador pela medida de ¹⁴C-marcado em amostras humanas a concentrações atomáticas.

O folato desempenha um papel importante na etiologia de muitas doenças. Essa relação engloba a patologia de diversos órgãos que ocorrem a diferentes estágios durante o desenvolvimento (Wadsworth, *Canadian Journal Of Public Health-Revue Canadienne Of Sante Publique* 88:304-304, 1997). Isso aumenta o desafio enfrentado por pesquisadores que desejam identificar os mecanismos subjacentes de muitas dessas patologias. Muitos processos biológicos são envolvidos na coordenação de homeostase de folato e metabolismo. O equilíbrio de folato é também influenciado em grande extensão por fatores ambientais tal como absorção dietética. A recíproca entre a regulação biológica determinada ao nível genético (genótipo), e fatores ambientais, produz o observado estado do organismo (fenótipo). A modelagem cinética pode identificar o fenótipo metabólico do organismo. Os fatores genéticas e/ou ambientais que contribuem para o fenótipo observado pode então ser determinado. Isso ajudará a identificar a etiologia de doenças relacionadas com o folato e para desenvolver as terapias racionais. Nenhum método confiável já foi desenvolvido para modelo cinético do folato em seres humanos sob condições fisiológicas. Nesse estudo, a extrema

sensibilidade de Espectrometria de Massa com Acelerador permitiu a modelagem de cinética do folato em um adulto saudável do sexo masculino para a primeira vez. O instrumento será útil para cientistas como uma ferramenta de pesquisa biomédica e clínica como uma ferramenta de diagnóstico.

- 5 Embora a Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) tenha sido usada no passado para pesquisa ambiental, geológica e arqueológica, apenas recentemente ela tem sido aplicada para as ciências biomédicas. A pesquisa toxicológica animal e humana tem rendido novos insights em interações entre macromoléculas e tóxicos (Creek, *Carcinogenesis* 18:2421-2427, 1997; Kautiainen, *Chemico-Biological Interactions* 106:109-121, 1997;
- 10 Turteltaub, *Mutation Research-Fundamental e Molecular Mechanisms Of Mutagenesis* 376:243-252, 1997; White, *Chemico-Biological Interactions* 106, 149-160, 1997)). Uma investigação recente revelou quantidades fentomólicas de $^{14}\text{CO}_2$ na expiração de seres humanos após a ingestão de 40 nCi ^{14}C -trioleína (Stenstrom, *Appl. Radiat. Isot.* Apr.; 47(4):417-22, 1996). Nós não sabemos de pesquisa biomédica sobre AMS que tem sido experimentada com a precisão necessária de densidade e quantitativa da amostragem por esse estudo. Esses protocolos experimentais foram baseados na compreensão atual da cinética do folato em seres humanos. Importantes parâmetros, tais como nível de dosagem e a programação da amostragem, foram planejados para auxiliar na moldagem matemática dos dados.
- 15 Os materiais usados nesse estudo incluiram L-Ácido glutâmico [^{14}C (U)] (250 mCi/mmol) (Moravek Biochemicals), ácido fólico, ácido 5-metiltetraidro fólico e ácido folínico padrões (Sigma), acetonitrila e água (grau OPTIMA a partir de Fisher). Pteroyl-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-ácido glutâmico (ácido fólico) foi sintetizada de acordo com os método de Plante (Plante, *Methods in Enzymology* 66, 533-5, 1980) com algumas modificações (Clifford, *Adv. Exp. Med. Biol.* 445:239-51, 1998). A concentração foi medida por espectrometria UV-VIS após separação por HPLC de fase reversa. A radioatividade foi medida por contagem de cintilação e atividade específica calculada a 1,24 mCi/mmol. A atividade específica do produto final foi menor do que a atividade específica do ^{14}C -ácido glutâmico por conta da diluição com ácido glutâmico não-marcado.
- 20 ^{14}C -Ácido fólico foi administrado a um voluntário masculino saudável informado com o peso de 85 kg consumiu 50 mL água oralmente contendo 35 μg ^{14}C -ácido fólico (80 nmol, atividade específica 1,24 mCi/mmol) na manhã seguida por um café da manhã leve. A dose residual no recipiente foi enxaguada com aproximadamente 100 mL de água e ingerida. Todos os procedimentos foram aprovados por Institutional Review Boards na Universidade da Califórnia, Davis e Lawrence Livermore National Laboratory. Um pequeno volume de amostra necessária para medida de AMS permitiu amostragem frequente de sangue nas primeiras 24 horas de estudo. O estágio prematuramente dinâmico de absorção de folato e a dis-

tribuição foi determinada por coleta de ~8 mL de sangue a intervalos de 10 minuto após a dose. A frequência de amostragem foi reduzida a intervalos de 20 minutos após uma hora e a intervalos de 30 minuto após 3 horas. Um total de 24 amostras foi coletado nas primeiras 24 horas. A amostragem de ~ 24 mL sangue continuou para os próximos 200 dias a intervalos semanais a mensais.

As células sanguíneas vermelhas foram isoladas por coleta de sangue integral antes da administração da dose oral e pós-dose através de um catéter para a primeira semana e por venopunção a partir de então. As células sanguíneas vermelhas foram separadas do sangue integral dentro de um hora após coleta por centrifugação a 3,500 RPM por 5 minutos. O plasma foi removido, o buffy coat descartado e as células sanguíneas vermelhas lavadas quatro vezes com um volume aproximadamente igual de tampão isotônico (cloreto de sódio a 150 mM, fosfato de potássio a 10 mM, pH 7,2, EDTA a 0,05 mM, ascorbato a 2 %). O plasma e as células sanguíneas vermelhas foram armazenados a -20°C para medidas de AMS, folato e carbono.

A concentração total de carbono em cada amostra (75-100 μ L) foi medida pelo congelamento da amostra sobre nitrogênio líquido em cápsulas de estanho individuais Costech (Ventura, CA) seguida por liofilização durante a noite. Cada cápsula foi então colocado inside de um segundo estanho cápsula, rolled em um ball e analisados para concentração total de carbono com o uso de um analisador de carbono Carlo-Erba (Pella, 1990). Os cálculos foram com base em pesos de amostra medidos para quatro casas decimais.

A evidência que o indivíduo esteve em estado constante foi fornecida pela concentração de carbono no sangue e perdas de carbono em urina e fezes. A concentração de carbono de cada amostra foi medida com o uso de um protocolo modificado que simplificou a pipetagem e acomodação de amostras antes da análise. Os resultados, demonstrados na Tabela 3 abaixo, forneceu evidência que a homeostase de carbono foi mantida sobre o período de estudo de 200 dias.

Tabela 3. Carbono em amostras coletadas sobre um período de 200-dias

Amostra	Média \pm Desvio padrão
Plasma (n=59)	4,42 \pm 0,14 g/dL
Células sanguínea vermelhas (n=59)	0,60 \pm 0,04 g/g hemoglobina
Urina (n=63)	9,68 \pm 1,9 g/dia
Fezes (n=39)	9,09 \pm 1,5 g/dia

As medidas AMS foram executadas como anteriormente descrito (Davis, *Nucl. Instrum. Methods* B40/41:705-708, 1989 e; Proctor, *Nucl. Instrum. Methods* B40/41:727-730, 1989). Em resumo, um feixe de íons C- foi produzido por bombardeamento da superfície fria e cesiada de um amostra de grafite com cerca de 5 keV de íons Cs+. O feixe de C- produzi-

do pela crepitação da amostra pelo feixe de Cs^+ foi acelerado, concentrado, e a massa analisada em feixes de massa com 14, e 13 amu.

Esses feixes foram então acelerados a alta energia em sequência por mudança sucessiva em sua energia na medida em que eles passam através do analisador de massa de modo que eles foram na trajetória correta para transmissão em um acelerador 1,5SDH-1 Pelletron. O sequenciador de mudança de energia foi ajustado a cerca de 10 vezes um segundo de modo que cerca de 1 parte em 10^3 do feixe de massa 13, e 99,9% do feixe de massa 14 passou no acelerador mantendo aceleração média e feixe correntes de carga muito baixas e raios X produzidos diretamente ou indiretamente por íons de alta energia também muito baixa. O feixe de íons negativos foi cerca de 500 keV em energia quando ele alcançou uma região de pressão relativamente alta de gás argônio, o canal separador, localizado no terminal de alta voltagem do 1,5SDH-1 Pelletron. Os íons negativos de movimentação rápida perdem elétrons e se tornam predominantemente íons C^+ quando passam através do canal separador. Também críticos para o processo AMS, os íons moleculares negativos, tal como CH^- e CH_2^- , são quebrados em íons C^{+n} e H^+ pelo gás argônio. Isso elimina as interferências que devem ser causadas por íons moleculares quando se conta posteriormente os íons $^{14}\text{C}^+$ no sistema.

Os íons positivos de carga 1 são acelerados a partir do terminal de alta voltagem para ganho de terreno de um adicional 0,5 MeV na energia para um total de cerca de 1 MeV. Os íons são magneticamente defletidos e concentrados a 90° pelo ímã de análise de modo que os pulsos de $^{13}\text{C}^+$ são separados de $^{14}\text{C}^+$ e medidos em uma gaiola de Faraday. Os íons $^{14}\text{C}^+$ e um pequeno número de íons $^{12}\text{C}^+$ ou $^{13}\text{C}^+$ a partir da distorção molecular no terminal que tenha mudado o estado de carga em exatamente os casos certos no tubo de aceleração de modo que sua energia é maior o suficiente do que o íons $^{14}\text{C}^+$ para ser transmitido em torno do ímã a 90° são então deixados passar em um analisador esférico eletrostático a 90° (ESA) o que deflete o mais rapidamente os íons $^{12}\text{C}^+$ e $^{14}\text{C}^+$ para fora da via de feixes de íon $^{14}\text{C}^+$. O ESA também fornece um foco final de modo que o $^{14}\text{C}^+$ íons são transmitidos para um detector de estado sólido onde eles são contados. Pelo registro da corrente de ^{13}C e contagens de ^{14}C na medida em que as amostras conhecidas e desconhecidas são crepitadas, a quantidade de ^{14}C presente em uma amostra é determinada para alta precisão.

A dose de ^{14}C -ácido fólico tinha uma atividade específica de 1,24 mCi/mmol. Exatamente 441,4 μL da preparação sintetizada foram usados para a dose com uma atividade de 222,000 DPM (5,028 DPM/ μL). Isso correspondeu a 100 nCi de atividade e 80,6 nmol de ácido fólico. Esta quantidade (35,6 μg) foi aproximadamente equivalente a 1/6 da corrente RDA para ácido fólico.

A dose foi misturada com ~ 150 mL de água e ingerida às 7:12. A primeira amostra de sangue foi colhida após 10 minutos do tempo de amostras subsequentes registrado em

5 minutos após a dose e expressado como dias (após a ingestão de dose). Um amostra de urina a 24 horas foi coletada antes da ingestão da dose seguida por coletas de 6 horas para o primeiro dia e coletas de 24 horas a partir de então. Todos os valores foram expressos ao ponto final de cada coleta. Uma amostra fecal pré-dose foi coletada 24 horas antes da ingestão da dose. O tempo de cada coleta foi registrado e os valores para aquelas amostras são expressos naquele ponto de tempo.

10 O valor moderno para cada amostra foi determinado três vezes por Espectrometria de Massa com Acelerador e o valor médio usado para calcular a concentração de ^{14}C -ácido fólico. O valor moderno, concentração de carbono de cada amostra e atividade específica da dose foram usados para calcular a concentração de ^{14}C -folato em cada amostra. Já que o identidade da molécula de folato não foi determinada, esse valor foi expresso como uma quantidade molar para eliminar ambiguidades entre diferentes moléculas de folato devido a diferenças em peso molecular. A mesma abordagem foi colhida na expressão de concentração de ^{14}C -folato em urina e fezes. Essas amostras continham catabólitos de folato, mas as concentrações foram expressas como moles de ^{14}C -folato já que um mol de catabólito foi derivado a partir de exatamente um mole de ^{14}C -ácido fólico. As equações para calcular as concentrações de ^{14}C -folato são demonstradas abaixo.

$$1 \text{ mol } ^{14}\text{C} = 14 \text{ g } ^{14}\text{C}$$

$1 \text{ modern} = 13,56 \text{ dpm} = 6,11 \text{ fCi} = 97,9 \text{ amol de radiocarbono}$ $\text{g de carbono mg de carbono mg de carbono}$
--

$$1,24 \text{ fCi } ^{14}\text{C}-\text{ácido fólico} = 1 \text{ fmol } ^{14}\text{C}-\text{ácido fólico}$$

$$20 \quad 6,2741 \times 10^{-4} \text{ g } ^{14}\text{C} = 1 \text{ g } ^{14}\text{C}-\text{ácido fólico}$$

Cálculo Exemplo: Plasma (P1)

$$(1,4180 \text{ moderno}) - (1,0986 \text{ moderno}) = 0,3194 \text{ moderno (ajustada)}$$

$$(0,3194 \text{ moderno}) \times (97,9 \text{ amol } ^{14}\text{C}/\text{mg C}) = 31,2692 \text{ amol } ^{14}\text{C}/\text{mg C}$$

$$(31,2692 \text{ amol } ^{14}\text{C}/\text{mg C}) \times (44,38 \text{ mg C/mL plasma}) = 1,387,7 \text{ amol } ^{14}\text{C/mL plasma}$$

$$25 \quad (387,7 \text{ amol } ^{14}\text{C/mL plasma}) \times (14 \text{ ag } ^{14}\text{C}/\text{amol } ^{14}\text{C}) = 19,428,2 \text{ ag } ^{14}\text{C/mL plasma}$$

$$(19,428,2 \text{ ag } ^{14}\text{C/mL}) \times (1 \text{ ag } ^{14}\text{C-ácido fólico}/6,2741 \times 10^{-4} \text{ ag } ^{14}\text{C})$$

$$= 3,0965 \times 10^7 \text{ ag } ^{14}\text{C-ácido fólico /mL}$$

$$(3,0965 \times 10^7 \text{ ag } ^{14}\text{C-ácido fólico /mL}) \times (1 \text{ amol } ^{14}\text{C-ácido fólico}/441,4 \text{ ag } ^{14}\text{C-ácido fólico})$$

$$30 \quad = 70,151 \text{ amol } ^{14}\text{C-ácido fólico/mL plasma}$$

$$= 70,1 \text{ fmol } ^{14}\text{C-ácido fólico/mL plasma}$$

35 Célula sanguínea vermelha concentração de ^{14}C -folato foi medida por AMS e os dados expressos como fmol ^{14}C -folato/grama hemoglobina. Essa abordagem eliminou diferenças em célula diluição após a lavagem em tampão por normalização dos valores de folato contra a concentração de hemoglobina. O dados para o primeiro oito dias e para o entire

estudo período são demonstrado no acima e abaixo da figura 7, respectivamente. As amostras coletadas no primeiro 24 horas possuiu uma pequena quantidade de ^{14}C acima o anterior. Entretanto, as mesma voltou para a anterior por 36 horas após a dose e permaneceu baixa até dia 3. As amostras coletadas após dia 4 demonstraram uma rápida elevação na concentração de ^{14}C -folato em célula sanguínea vermelha e alcançou um máximo de 1650 fmol ^{14}C -folato/grama hemoglobina por dia 19.

Com o uso da concentração de hemoglobina do indivíduo e valores referência para volume total de sangue, a quantidade total de hemoglobina em circulação foi estimada em 6,6 g (13,3 g de hemoglobina/dL, 5 L de sangue). A quantidade total de ^{14}C -folato nas células sanguíneas vermelhas por dia 19 foi aproximadamente 10,9 pmol ^{14}C -folato ou cerca de 0,014 % do administrados bólus. Esse valor correspondeu para 2,18 fmol ^{14}C -folato/mL sangue, bem acima o a detecção limite de AMS.

A figura 7 demonstra concentração de ^{14}C -folato em célula sanguínea vermelha para os primeiros 8 dias (acima) e 200 dias (abaixo) pós-dose. O atraso de três dias antes do surgimento de ^{14}C -folato reprezentado o tempo necessário para ^{14}C -folato incorporação em células no medula durante a maturação. As barras de erro representam ± 1 desvio padrão de triplicate determinações de ^{14}C por AMS.

Folato foi extraído a partir de plasma com o uso de cartuchos C18 de extração de fase sólida e ligação folato proteína-cromatografia por afinidade. As moléculas de folato extraídas foram separadas por HPLC de fase reversa com a detecção a 292 nm. Folato a partir de 100 μL plasma não produz um sinal detectável porque a concentração de folato endógeno foi abaixo do limite da detecção. Os padrões de folato foram adicionados para o plasma como padrões internos antes da extração para conferir a recuperação e para marcar o retenção de folato sob as condições de HPLC. Ácido fólico (FA) e 5-metiltetrahidrofolato (5MTFA) padrões foram adicionado já que plasma folato foi no forma de 5MTFA e a dose administrada foi no forma de FA. Folato padrões, tampões de extração e solventes HPLC foram screened por AMS para assegurar que não haveria nenhuma contaminação por ^{14}C . Frações foram coletadas a cada minuto, liofilizadas e carreador carbono adicionado antes de medida AMS.

A figura 8 demonstra uma cromatografia HPLC-AMS de amostra plasmática coletada um hora após a ingestão de ^{14}C -ácido fólico. Absorção foi monitorada a 292 nm (linha sólida) e ^{14}C concentração foi medido por AMS e expressos como moderno (linha tracejada). O grande prematuramente pico foi devido a ácido ascórbico adicionado para o amostra para proteger contra oxidação. Ácido fólico (FA) e 5-metiltetraidrofolato (5MTFA) padrões foram adicionado para o plasma antes extração para conferir para recuperação e para marcar folato tempos de retenção.

Um modelo comportamental determina as taxas de transferência entre os compar-

timentos corporais pela divisão do corpo em diferentes combinações. Essas combinações podem ou não representar órgãos reais com correlações biológicas. O modelo foi construído no esquema simples descrito na figura 9. O modelo mais simples consistiu em uma única combinação corporal com entrada para o rastreador e uma saída para todas as excreções.

- 5 Ele foi essencial para saber a quantidade de rastreador administrados. A biodisponibilidade do rastreador, entretanto, quantificação complicada da quantidade de rastreador que verdadeiramente entra o corpo combinação. A figura 9 demonstra um simples modelo descrevendo o absorção e perda de rastreador.

Esse problema tem sido tradicionalmente resolvido por administração intra-venosa de um segundo rastreador para determinar a biodisponibilidade e fazer o adequada ajustes. A biodisponibilidade do rastreador nesse estudo foi medido diretamente e nenhum de tais ajustes foi necessário. Uma vez que o rastreador foi absorvido ele foi distribuído para diversos tecidos e eventualmente excretado a partir do corpo no urina e fezes. Se o rastreador poderia ser perdido através do lungs, expired ar deveria também ser coletado e incluiram como um via de excreção. Skin poderia também representam um via de excreção para alguns compostos. nesse estudo, urina e fezes foram considerados como as principais vias de excreção de folato do corpo (Krumdieck, *American Journal of Clínico Nutrition* 31:88-93, 1978).

Sangue é uma combinação facilmente acessível no corpo. Sangue integral foi frequentemente amostrado e separado no plasma e as células sanguíneas vermelhas, cada representando um discrete combinação. As células sanguíneas vermelhas reprezentando uma combinação de tecido que poderia ser facilmente amostrada. Os componentes principais do modelo são demonstrados na figura 10 para distribuição de folato em seres humanos. Esse esquema descreve ascombinações principais envolvidas em metabolismo de folato. A quantidade de rastreador foi medida em todas ascombinações demonstradas com um linha sólida. A combinação de tecido, demonstrada com uma linha pontilhada, foi a única combinação cuja concentração de ¹⁴C-folato foi não medido. A elaboração de um modelo comportamental permitiu o distribuição do rastreador nesse combinação para ser determinado por simples diferença. Os compartimentos que foram medidos são demonstrado com linha sólidas, e os 30 compartimento de tecido inacessível são demonstrados com uma linha pontilhada.

Uma vez que os principais componentes do modelo foram identificados, componentes biologicamente relevantes foram adicionados. Esses componentes foram baseados no conhecimento atual de metabolismo de folato em seres humanos e animais. Por exemplo, ¹⁴C-ácido fólico no estômago tinha que passar através de células intestinais antes de chegar ao plasma. Uma combinação intestinal foi adicionada para considerar esse processo. Foi conhecido que a maturação das células sanguíneas vermelhas na medula incorporou folato antes de serem liberadas em circulação (Bills, *Blood* 79:2273-80, 1992). Um compartimento

representando a medula foi adicionado assim como um elemento de atraso para fornecer o necessário atraso observado experimentalmente (Strumia, *Medical Vezes* 96:1113-24, 1968). Já que a dinâmica de folato na célula sanguínea vermelha foi governada pelo célula's vida útil em circulação, um elemento de atraso foi adicionado para fornecer para esse biológica processo. O 24 horas transit tempo de material através do gastrointestinal tract também necessitated um elemento de atraso para ser incorporado nesse porção do modelo.

A elaboração de um modelo comportamental fez certas considerações em relação a fluxos do rastreador entre os compartimentos. Inicialmente, o modelo considerou que todos fluxos foram governados por processos de primeira ordem, matematicamente reapresentado como $\text{fluxo}(2,1)=k(2,1)*q_1$, onde 1 foi a combinação doadora, 2 foi o combinação receptora, $k(2,1)$ foi o coeficiente de transferência entre o combinações, e q_1 foi o concentração do rastreador. O fluxo, portanto, variou na medida em que a concentração em combinação 1 mudou. Na maioria dos casos, a consideração que um processo de primeira ordem governou fluxo foi válida, entretanto, a equação poderia ser alterada para ir de encontro às necessidades do sistema.

Outra consideração feita na modelagem foi que o rastreador paralleled o behavior do endógenos composto sendo estudado. Isotopicamente marcação folato permitted discriminação do rastreador a partir de endógenos sources. O consideração foi feita que biológica processos, tal como absorção, proteína ligação e enzymatic conversão para metabólitos, foram não afetadas por isótopo marcação. nesse estudo, ^{14}C -labelling de ácido fólico ensured minimal ou nenhum isótopo efeitos. Em previous models de nutrient cinética o proporção de marcado e nonlabeled nutrient foi usado para derive a atividade específica do rastreador. Isso valor foi então usado para modelo o nutrient dinâmica entre diversas os compartimentos já que a atividade específica foi um medida de rastreador enrichment em que os compartimento. nesse estudo, ^{14}C -folato concentração alone foi usado para build o modelo comportamental com base na consideração que dinâmica de ^{14}C -folato reapresentou a dinâmica de folato.

Já que a modelagem tratou os compartimentos corporais como combinações, os dados de concentração no plasma e as células sanguíneas vermelhas foram convertidos para quantidades total de ^{14}C -folato em cada combinação com o uso de referência valores para plasma volume e total gramas de hemoglobina em circulação. Esses quantidades, assim como cumulativo ^{14}C -folato excretado na urina e fezes, foram associados com suas respectivas combinações no modelo. Todos valores, em femtomoles ^{14}C -folato, foram assigned um desvio padrão fracional de 0,025 para representar a incerteza nas medidas AMS.

O tempo de coleta para cada amostra foi convertido para horas após a ingestão do bólus. O compartimento estômago recebeu um bólus de $8,0 \times 10^7$ fmol ^{14}C -ácido fólico a tempo zero. O compartimento cólon recebeu a porção experimentalmente medida do bólus

que foi não absorvida igual a $9,39 \times 10^6$ fmol ^{14}C -folato. O cólon para transferência de fezes teve um elemento de atraso de 24 horas. O medula para as células sanguíneas vermelhas transferência teve um elemento de atraso de 100 horas enquanto o degradação atraso foi um hora. Os compartimentos foram adicionado para representam tecido distribuição de folato que consiste em rápido e lento recuperação combinações. A rápida recuperação de tecido teve um elemento de atraso de 20 horas. O modelo foi gerado com o uso do software SAAM II (SAAM Institute, Universidade de Washington).

O modelo, demonstrado na figura 11, foi uma expansão do modelo básico demonstrado anteriormente. O entero total de 80 nmol de bólus de ^{14}C -folato entrou no compartimento estômago a tempo zero. Exatamente 9,39 nmol ^{14}C -folato desse foi perdido para o compartimento cólon e rerepresentado a porção do bólus que foi não absorvida, como determinado experimentalmente. O remanescente do bólus entrou no intestino os compartimento. Isso combinação reprezentado o intestinal células que absorvida ácido fólico e reduzida e metilado antes de passar para o plasma (Whitehead, *British Journal of Haematology* 13:679-86, 1972).

O compartimento plasma distribuiu folato para a urina e cólon, para excreção, e para tecidos para armazenamento. Dois compartimentos reprezentaram armazenamento em tecido, um rápido-recuperação combinação de tecido e uma combinação de recuperação lenta de tecido. A combinação de célula sanguínea vermelha recebeu o rastreador através de um compartimento medula o que foi adicionado para representar incorporação de folato em maturação de leucócitos antes seus liberação em circulação (Bills, *Blood* 79:2273-80, 1992).

Os coeficientes iniciais foram determinados para cada parâmetro com base em um melhor palpite. As equações diferenciais foram resolvidas simultaneamente com o uso de algoritmos no software. O algoritmo ajustada esses coeficientes com a cada iteração a fim de minimizar o soma ao quadrado de erros entre valores previstos e experimentais no quatro os compartimentos onde dados foram disponíveis. Os coeficientes de transferência foram finalmente derivados dos valores determinados experimentalmente previstos satisfatoriamente.

A consideração anterior que fluxos no modelo comportamental foram orientados por primeira ordem processos foi não aplicável para a transferência do rastreador para as combinações célula sanguínea vermelha e urina. Para simplificação, foi considerado que ^{14}C -folato foi incorporado no célula sanguínea vermelha combinação em um pulso discreto. Isso consideração foi incorporado no modelo por forçar o coeficiente de transferência a partir de plasma para medula, $k(9,3)$ para 0 após 24 horas. Isso permitiu ^{14}C -folato para entrar o medula combinação por um primeira ordem processo para o primeiro 24 horas. O $0,030 \text{ hr}^{-1}$ coeficiente de transferência dentro de que período permitted ^{14}C -folato absorção no medula

combinação que reflected o célula sanguínea vermelha combinação's influx de ^{14}C -folato determinado experimentalmente. O modelo foi incapaz e prever os dados de ^{14}C -folato em célula sanguínea vermelha quando essa provisão foi removido.

A combinação célula sanguínea vermelha apresentado um caso especial na elabo-

5 ração de um modelo comportamental já que o fluxo para fora do célula sanguínea vermelha combinação foi governado pelo vida útil desses células em circulação. Uma vez que folato entrou esse combinação, se tornou indisponível para remoção devido a poliglutamação, até o células themselves foram removido a partir de circulação (Rothenberg, *Blood* 43:437-43, 1974; Ward, *J. Nutr.* 120:476-84, 1990; Brown, *Present knowledge in nutrition*, 6th edição, 10 1990). Isso foi evidente em aproximadamente presença de 100 dias de ^{14}C -folato na combinação célula sanguínea vermelha, intimamente se ajustando à conhecida vida útil dessas células. Este processo foi incorporado no modelo por ajuste do coeficiente de transferência do fluxo para fora da combinação célula sanguínea vermelha. Esse coeficiente de transferência foi mudado de $4 \times 10^{-5} \text{ hr}^{-1}$ para $0,00072 \text{ hr}^{-1}$ a 2300 horas.

15 Envelhescidas as células sanguíneas vermelhas foram removidas a partir de circulação por um processo macrofago-mediado que engulfou as células e as retornou para o baço e fígado para degradação (Rosse, *Journal of Clínico Investigation* 45:749-57, 1966). A combinação de degradação, q10, reapresentado esse processo. Embora o ^{14}C -folato nessas células foi capaz de ser reciclado, sua remoção para uma combinação de degradação de 20 término não afetou o modelo já que a quantidade total de ^{14}C -folato na combinação célula sanguínea vermelha reapresentou apenas 0,014 % do bólus.

25 Urina saída de ^{14}C -folato foi não governou por primeira ordem processos. Experimental dados demonstrou que houve um constant saída do rastreador no urina sobre o 42-dia período. Já que plasma ^{14}C -folato foi altamente dinâmica nas primeiras 24 horas, fluxo para o urina combinação poderia não depender da concentração em plasma. Saída de ^{14}C -folato, como metabólitos ou catabólitos, foi movida por um seletivo processo a partir de glomerulos renais. Esses incluiram mecanismos de transporte ativos que concentraram ^{14}C -folato contra um gradiente (Das, *Br. J. Haematol.* 19:203-21, 1970; Henderson, *J. Membr. Biol.* 101:247-58, 1988; e Pristoupilova, *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch* 30 113:759-65, 1986). Foi portanto injustificável o uso de equações de fluxo de primeira ordem para descrever transferência de ^{14}C -folato a partir de plasma para urina. Ao invés disso, o linear regression modelo que descrito o cumulative excreção de ^{14}C -folato em urina, foi usado para matematicamente modelo o fluxo de ^{14}C -folato para a combinação urina.

35 Os coeficientes de transferência, demonstrados na Tabela 4, foram derivados o que com sucesso previu as quantidades de ^{14}C -folato nas diversas combinações.

A figura 11 demonstra um modelo comportamental da cinética do folato em um voluntário humano. Os compartimentos são numerados de 1 a 11 e os coeficientes de transfe-

rência demonstrados como k (receptor, doador).

Tabela 4. Coeficientes de transferência a partir de combinações de doador para receptor			
Parâmetro	De	Para	Coeficiente de transferência, hr ⁻¹
k(8,1)	Estômago	Côlon	0,000 ²
k(2,1)	Estômago	Intestino	3,800
k(3,2)	Intestino	Plasma	0,094
k(4,3)	Plasma	Tecido rápido	2,300
k(3,4) ¹	Tecido rápido	Plasma	0,059
k(5,3)	Plasma	Tecido lento	1,900
k(3,5)	Tecido lento	Plasma	0,0022
k(9,3)	Plasma	Medula	0,030 ³
k(10,9) ¹	Medula	RBC	0,210 ⁴
k(11,10) ¹	RBC	Degrade	0,00004 ⁵
k(6,3)	Plasma	Urina	0,026 ⁶
k(8,3)	Plasma	Côlon	0,020
k(7,8) ¹	Côlon	Fezes	1,300

¹ Transferência para combinação de receptor através de um elemento de atraso
² Transferência determinada pela biodisponibilidade do bólus
³ Forçada a 0 após 24 horas
⁴ Forçada de 0 a 0,21 após 58 horas
⁵ Forçada a 0,00072 após 2300 horas
⁶ Função de forçamento usada para descrever a transferência para a combinação de urina (vide texto)

Exemplo 3

Esse exemplo demonstra fluorouracil (5FU), um fármaco que é usado no tratamento de câncer. Pertence à família de fármacos chamada antimetabólicos. Ela é um análogo de pirimidina. 5FU, o que tem sido em uso contra câncer para cerca de 40 anos, age em diversos vias, mas principalmente como um inibidor de timidilato sintase, interrompendo a ação de uma enzima o que é um fator crítico na síntese de timina. Alguns dos principais usos de

5FU são no tratamento de câncer colo-rectal e câncer pancreático, onde tem servido como o estabelecido forma da quimioterapia para décadas. Como um análogo de pirimidina, 5FU é transformado dentro da célula em diferente citotóxicos metabólitos o que são então incorporados em DNA e RNA, finalmente induzir apreensão de célula ciclo e apoptose por inibição 5 da capacidade da célula para sintetizar DNA. Capecitabina é um pró-fármaco que é convertida em 5FU nos tecidos. pode ser administrados oralmente.

Paclitaxel (PAC) é um inibidor mitótico usado em quimioterapia. PAC é agora usado para tratar pacientes com câncer de pulmão, ovário, câncer de mama, cabeça e pescoço, e formas avançadas de sarcoma de Kaposi. PAC age pela interferência com normal crescimento microtubular durante divisão célula e destrói a célula capacidade para uso seu citoesqueleto em um modo flexível. Especificamente, PAC se liga a β subunitida de tubulina. As células não-cancerosas são também afetadas adversamente, mas já que células cancerosas dividem muito mais rapidamente do que não-células cancerosas, eles são muito mais suscetíveis a tratamento PAC.

15 Diversos *in vitro* estudos em humano sólido tumor linhagens celulares have demonstrou o positivo e interação programação-dependente de PAC e 5FU (Kano et al., *Br. J. Câncer* 1996, 74:704-710; Smorenburg et al., *Eur. J. Câncer* 2001, 37:2310-2323; Johnson et al., *Anticancer Pesquisa* 2002, 22:3197-3204). Um efeito sinérgico foi obtido apenas quando células tumorais foram expostas para PAC seguida por antimetabolites. Por outro 20 lado, simultânea exposição para o dois fármacos ou pré-tratamento com 5FU reduzida morte geral da célula comparada a PAC sozinho.

O grande peso molecular e estrutura químico volumosa de atraso de eliminação peritoneal PAC, aumenta a exposição na cavidade peritoneal, e pode assim ser explorada no tratamento de cânceres gástricos. Além disso, PAC exertsce seus efeitos citotóxicos através 25 de um mecanismo diferente a partir de daquele de 5FU, e assim demonstra nenhum resistência cruzada com 5FU. Em linhagens celulares tumorais, a combinação de PAC e 5FU tem demonstrado citotoxicidade aditiva, especialmente com exposição sequencial.

Um número de novos agentes têm sido introduced recentemente, tanto alone ou em 30 combinação, para o tratamento de sólido tumores. PAC é um novosly desenvolvido anticâncer fármaco o que tem parecido promissor para o tratamento de câncer gástrico, especialmente para pacientes com disseminação peritoneal avançada e refratária. Embora um número de clínico testículos examinaram o efeitos de PAC sozinho, as taxas de resposta foram aproximadamente 25% e nenhuma vantagem de sobrevivência foi demonstrada na maioria desses relatórios. Portanto, alguns grupos iniciaram testes clínicos para examinar diversas 35 novos regimes de combinação de PAC com outros agentes quimioterápicos. Cascinu et al. relatou um estudo de fase I de 5FU mais PAC semanal a cada 3 semanas em pacientes com câncer gástrico avançado que foi refratario para o regime existente (5FU, leucovorina,

cisplatina, epidoxorubicina). Bokemeyer et al. executaram um estudo de fase II de semanal 5FU/leucovorina mais PAC a cada 3 semanas e demonstrou um 32% resposta taxa para câncer gástrico avançado. Apesar da evidência promissora forneceu por anteriores estudos, permanece uma necessidade para mais estudos de fase I para investigar outras combinações de agentes quimioterápicos com PAC semanal.

Os dados farmacológicos demonstraram que doses semanais de PAC entre 60 e 90 mg/m² produzem níveis plasmáticos de PAC que permanecem acima de 0,01 mmol/l por pelo menos 24 horas após a administração sobre 1 hora, e um AUC de 90 mg/m² é similar para que observado com uma dose de 105 mg/m² distribuído sobre 3 horas. Prolongada exposição para uma baixa concentração de PAC, na ordem de 0,01 mmol/l, tem sido demonstrado para induzir apoptose em diversos diferentes linhagens celulares. O resultados demonstram que PAC doses pode ser seguramente escalada para 90 mg/m²/semana, com uma dose fixa de 5 dias continuous 5FU infusão, com hematológico e fígado toxicidade limiting ainda dose escalação. No geral, esse regime foi adequadamente tolerado para até 8 semanas e foi associado com tóxicos efeitos moderados. Embora o MTD de PAC combinadas com 5FU nesse programa fosse 90 mg/m² weekly para três out of a cada 4 semanas, a recomendada dose para um future fase II trial foi um nível menor.

Camundongos Fêmeas atípicos nus com 6-7 semanas de idade foram obtidas a partir de Taconic Laboratories (Germantown, NJ). Os camundongos foram abrigados em microisolator housing, com food e água fornecida *ad libitum*, e submetidos a quarentena para 4 dias antes do início do estudo. A linhagem de célula de câncer de cólon humano HT-29 foi usado nesse estudo (American Type Culture Collection). HT-29 células foram mantidas em DMEM e meio McCoy's5A suplementado com 10% de soro fetal bovino respectivamente. Todos os cérvulos foram cultured a 37 graus Centígrados em uma atmosfera de 95% ar/5% CO₂ e 100% umidade. Células foram alimentados com a cada terceiro dia e passadas semanalmente. Quando células alcançaram 80% de confluência, elas foram colhidas com o uso de 0,25% tripsina/EDTA solução. As colhidas células foram lavadas uma vez com salina fosfato tamponada (PBS) e re-suspensas em PBS a um densidade de 1×10^7 células/100 µl. Para cada camundongo, 100 µl da célula suspensão foi subcutaneamente injetado ao flanco direito.

Uma vez que animais foram implanted com células cancerosas, eles foram observado por dia para desenvolvimento do tumor. Quando tumores alcançaram aproximadamente 100 mm³, os camundongos foram divididos igualmente em três grupos e dosados intravenosamente com ¹⁴C-PAC, ¹⁴C-5-fluorouracil, ou ambos. PAC foi dissolvida em um 50% Cre-mophor© EL, 50% solução de etanol desidratado e diluído com 5% dextrose para preparar a dose intravenosa. Fluorouracil foi dissolvida em água e diluído com 5% dextrose para preparar a intravenosa dose. Animal receiving um única agente foram dosados com 5 nCi do ra-

diamarcação e o coquetel grupo recebeu um total de 10 nCi. A dose administrada foi até para 5 mg/kg corpo peso em um volume de 20 microlitros para o única grupo agente e 40 microlitros para o grupo coquetel.

Camundongos foram sacrificados a 0,5, 2, ou 4 horas após dosagem e plasma e 5 órgão amostras foram colhida imediatamente e armazenados congelado até transferência para laboratório analítico. Tecido foi colocado em individuais moedores de tecido descartáveis (Fisher), água foi adicionado (2:1 v/p) e homogenizado por dois minutos para forma uma pasta homogenea. Metanol foi adicionado para o homogenizado (3:1 metanol/homogenizado, v/v) e vortexado para 30 segundos. O tubos foram então centrifuged a 10 2,000 g para 10 minutos e o sobrenadante removido para ainda análise. O pélete foi retido para ainda análise de sinal não extraído de radiomarcação.

Os extratos de tecido (300 μ L) foram secos com o uso de centrifugação a vácuo por aproximadamente 2 horas e resuspensos em de fase móvel A (25 mM de fosfato de amônio, pH 6,08). Os padrões de referência não-marcados para PAC e 5FU foram contaminados 15 nessa solução para marcar o tempo de retenção de PAC e 5FU no traço UV. Entre 50-100 μ L se a mistura foi injetada em uma coluna Luna fenil-hexil C18 (Phenomenex), 5 μ m de tamanho de partícula, 4,60mm x 250mm. O sistema de cromatografia consistiu em um Shimadzu Prominence HPLC com auto sampler, UV detector e fração collector. Um sistema gradiente foi usado que consiste em de fase móvel Um (25 mM fosfato de amônio, pH 6,08) 20 e de fase móvel B (100% acetonitrila). O unidade foi programada para distribuir 0% de fase móvel B a partir de 0-3 minutos, subindo para 90% de fase móvel B por 19 minutos e mantendo a 90% de fase móvel B até o término do cromatografia com uma taxa de fluxo de 1,0 mL/minuto. Frações individuais foram coletadas a intervalos de um minuto throughout o cromatografia. Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS) foi usado para quantificar o 25 sinal de radiomarcação no frações.

A figura 12 demonstra um recuperação de contaminado 5FU e PAC a partir de homogenados de tecido com o uso de diferente solventes de extração. A recuperação Completa de 5FU livre (não incorporado) e PAC foi obtidasa com o uso de 100% metanol a um proporção de três volumes solvente para um volume tecido homogenado. A figura 13 demonstra um cromatografia do separação de 5FU e PAC em extratos homogenados de tecido de camundongos. O 5FU e PAC picos representam não-marcado padrões de referêcia contaminado em experimental amostras antes de separação para marcar o tempo de retenção de radiomarcado 5FU e PAC o que não produz um sinal UV a o concentrações dosadas. As frações em um minuto em torno de o 5FU e PAC foram coletado e ainda analisados por 30 AMS para quantificação de radiomarcação. O picos em torno de 5FU representam endógenos compostos do camundongo que não são radiomarcados e não interfere com quantificação a jusante AMS. de 5FU por AMS

A figura 14 demonstra sinal de radiomarcação total no plasma, xenoenxertos tumorais de linhagens celulares de câncer de cólon humano HT-29 e tecido pulmonar normal em camundongos duas horas após receberem 5FU, PAC ou um coquetel de ambos 5FU e PAC. O sinal plasmático total (DPM/mL de plasma) para camundongos que receberam 5FU é 5 comparável ao grupo que recebeu PAC. Isso é esperado já que cada grupo recebeu 5 nCi de dose e a meia-vida plasmática estabelecida de PAC é de 0,34 horas e 0,25-0,30 horas para 5FU. Quando 5FU e PAC foram co-administrados em um coquetel (10 nCi total), houve 10 um aumento de quase 20 vezes no sinal plasmático total fortemente que sugere um efeito sinérgico entre esses dois agentes. Outros pesquisadores viram também esse efeito aditivo 15 em certas linhagens celulares (Kano, *British Journal of Cancer* 74(5):704-10, 1996) e empregaram a terapia de combinação em testículos clínicos, demonstraram melhor perfil farmacológico de PAC (Kondo, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35(6):332-337, 2005). O tecido pulmonar tumoral e normal de camundongos (DPM/mL total de extrato) nesse exemplo 20 também demonstram esse efeito aditivo. Nesse caso, houve um aumento de aproximadamente 10 vezes no sinal total quando 5FU e PAC foram administrados como um coquetel. Notavelmente, o procedimento de extração em metanol é projetado para recuperar PAC e a combinação não incorporada de 5FU livre. 5FU incorporado em RNA e DNA é recuperado no pélete e medido separadamente. Os resultados nesses gráficos consistentemente mostram sinal baixo de 5FU demonstraram quase completa incorporação de 5FU na fração de 25 RNA e DNA.

Para ainda delinear a fonte de sinal em cada tipo de amostra, a cromatografia líquida de alto desempenho foi empregada para separar 5FU de PAC seguida por quantificação por Espectrometria de Massa com Acelerador. A figura 15 demonstra a quantidade de 5FU e 25 PAC em tumor, tecido pulmonar normal e plasma após os camundongos receberem tanto 5FU, PAC ou ambos como um coquetel duas horas após administração iv. Novamente, o extrato em metanol de homogenados de tecido foi usado nos dados capturados por cromatografia para a combinação não incorporada de 5FU livre. O limite de quantificação é demonstrado como uma linha pontilhada e foi calculado com base em sinal anterior do carbono carreador adicionado para cada amostra durante o processamento. O grupo tratado com 30 PAC demonstra sinal correspondente a PAC, mas não 5FU em tumor, pulmão e plasma. O grupo tratado com 5FU demonstra sinal correspondente a 5FU, mas não PAC no plasma. Não foi detectado nenhum 5FU livre nos extratos em metanol de homogenados de tecido 35 que demonstraram incorporação quase completa de 5FU livre em RNA e DNA os quais foram recuperados no pélete após a centrifugação do extrato em metanol. A quantificação de radiomarcação total na fração de pélete rendeu um sinal de aproximadamente 1,103 DPM e 0,914 DPM para tecido tumoral e pulmonar, respectivamente, em animais tratados com 5FU. Isso comparado a 0,468 DPM e 0,927 DPM de PAC para tecido tumoral e pulmonar, respec-

tivamente, na fração de extrato em metanol de animais tratados com PAC. Além disso, no plasma, onde se espera que 5FU exista apenas na forma livre, 5FU é claramente detectado no extrato em metanol de camundongos que recebeu 5FU ou o coquetel. O fracionamento de homogenados de tecido em um sobrenadante baseado em solvente e um pélete não a-
5 penas permitiu o rastreamento da distribuição de 5FU no tecido, mas também forneceu a capacidade de distinguir a combinação de % de FU livre a partir da combinação incorporada de DNA e RNA.

A figura 16 demonstra separação cromatográfica e quantificação de 5FU e PAC em extratos de tecido tumoral e pulmonar após tratamento tanto com 5FU como PAC. Os extra-
10 tos de tecido foram cromatografados como descrito anteriormente e novamente após contaminação com menos do que 1,0 DPM de 5FU. O gráfico é normalizado para PAC e demonstra o expected aumento no sinal de 5FU após contaminação com 5FU, reforçando ainda o método cromatográfico robusto desenvolvido nesse exemplo.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a determinação de terapia personalizada, **CARACTERIZADO** pelo fato de que comprehende:
 - (a) administrar um coquetel teste a um indivíduo teste, onde o coquetel teste comprehende dois ou mais agentes terapêuticos diferentes a uma dosagem pelo menos duas vezes menor do que uma dose terapêutica esperada;
 - (b) obter uma biópsia de amostra do tecido doente relevante para estudo; e
 - (c) analisar a biópsia de amostra para cada um dos agentes terapêuticos administrados e seus metabólitos.
 2. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dosagem do coquetel teste é uma Dose traçadora, onde uma Dose traçadora é menos do que 10% de uma dose terapêutica.
 3. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de análise é executada com um Instrumento de Espectrometria de Massa com Acelerador (AMS).
 4. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o processo ainda comprehende uma pausa a partir de cerca de 10 minutos a cerca de duas horas após administrar um coquetel teste para permitir a distribuição tecidual do coquetel teste.
 5. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a biópsia de amostra é um pedaço de tecido selecionado a partir do grupo que consiste em tecido tumoral excisado, sangue, sangue fracionado, tecido infectado com patógeno isolado, e combinações dos mesmos.
 6. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que quando a biópsia de amostra é sangue, a amostra de sangue é fracionada em cada tipo de célula sanguínea branca e vermelha.
 7. Processo para a determinação de terapia personalizada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o processo ainda comprehende o fracionamento da biópsia de amostra por sortir a amostra em tipos de células componentes.

Figura 1

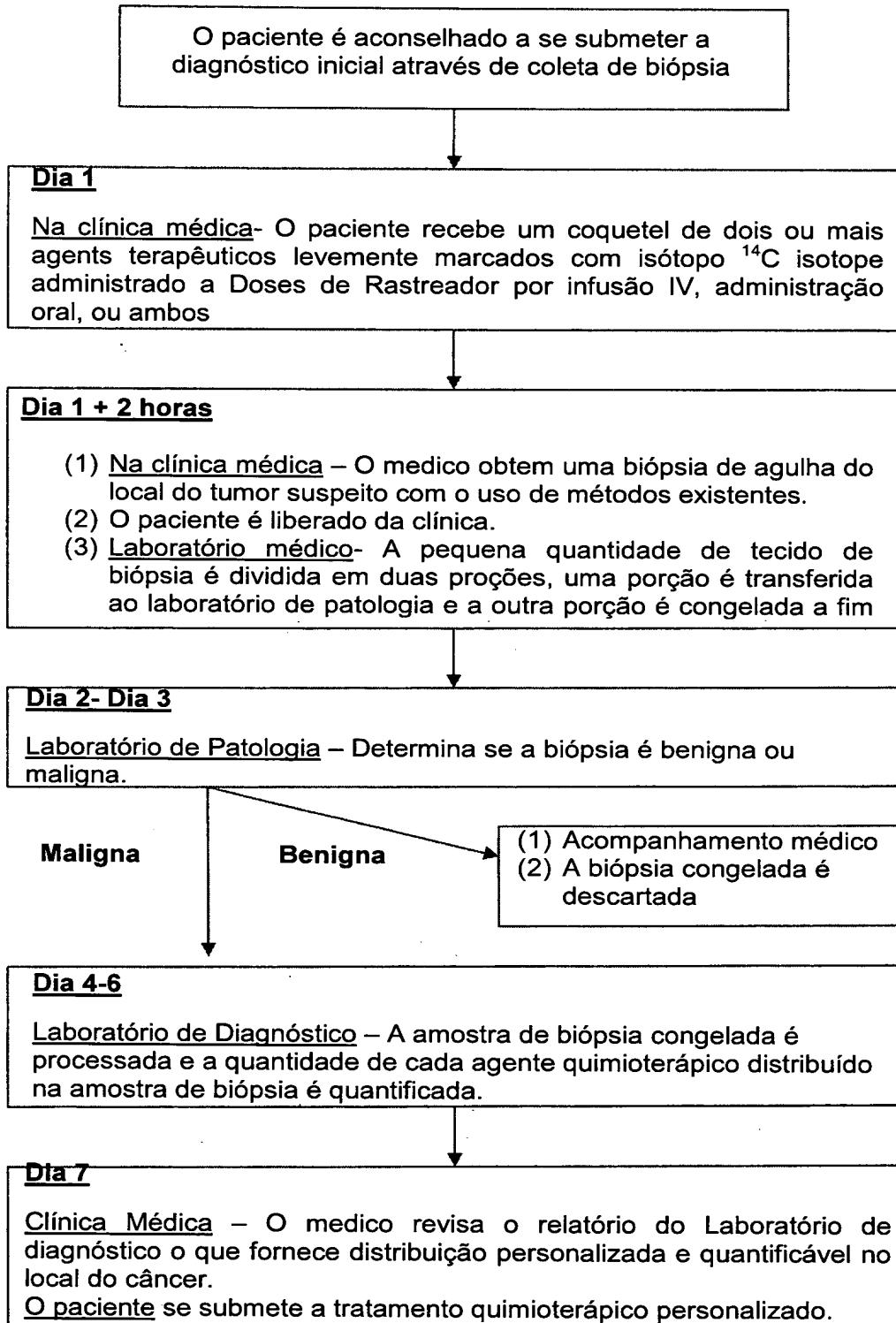


Figura 2

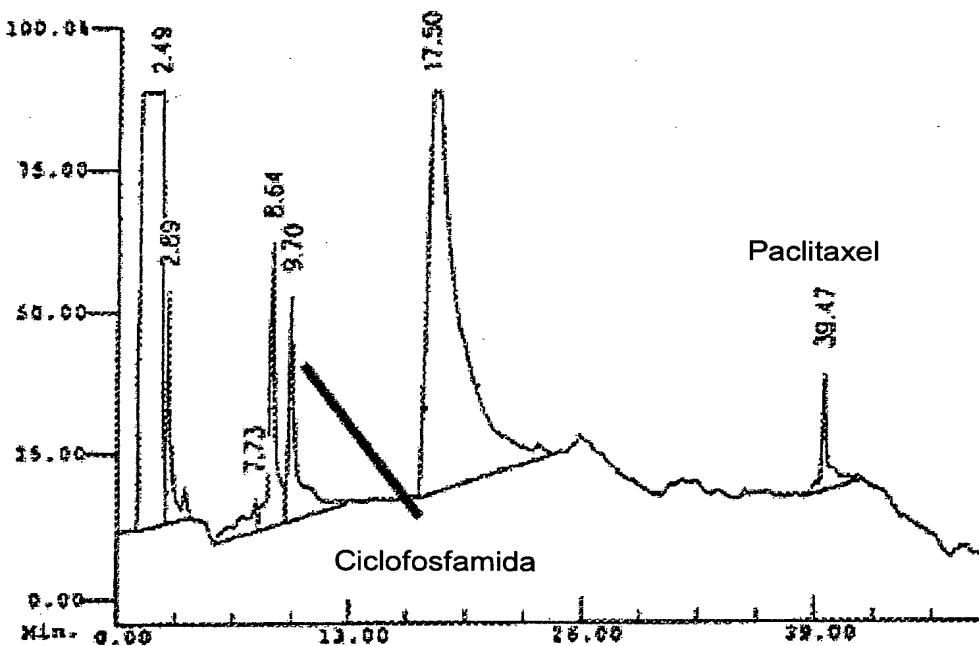


Figura 3

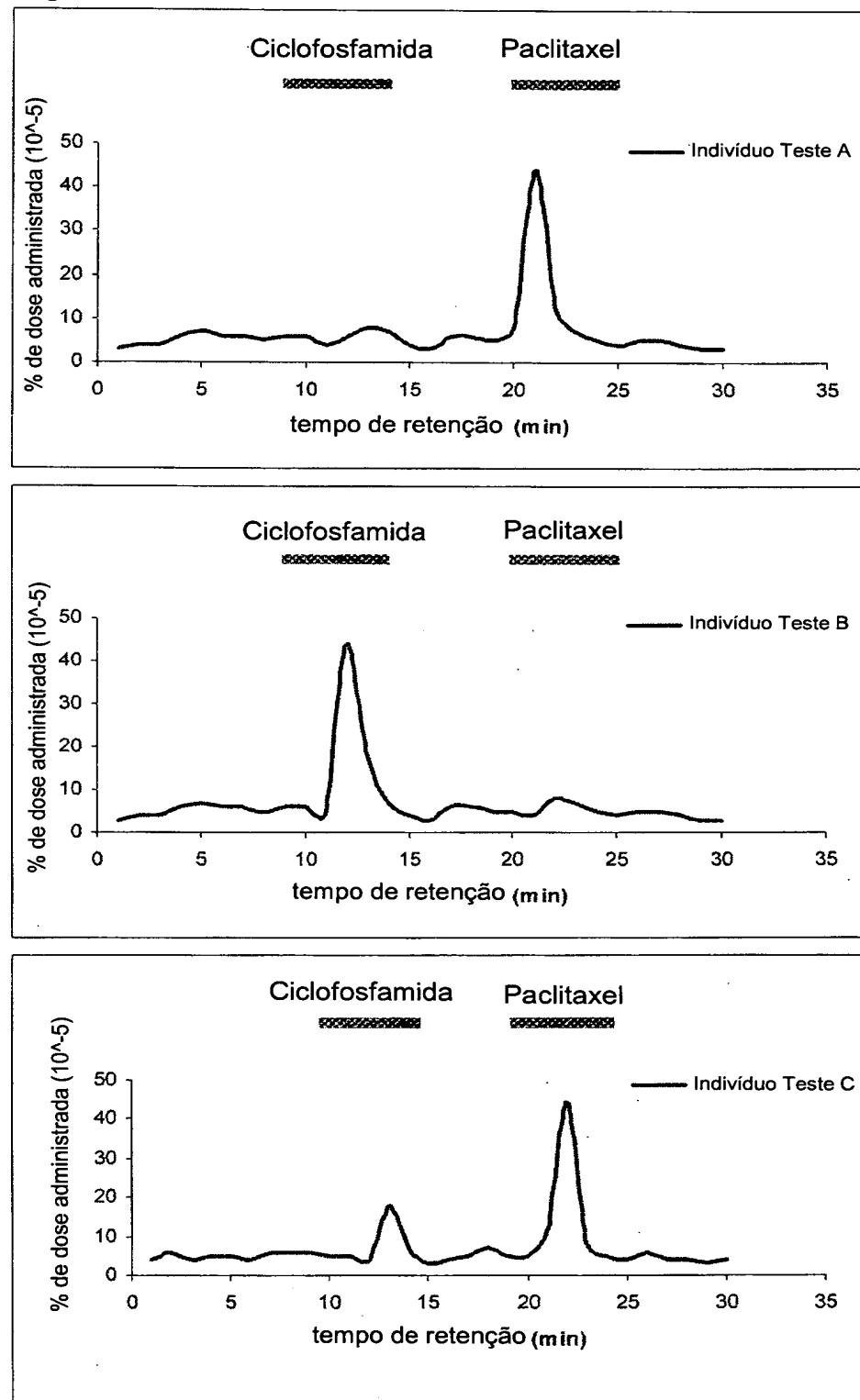


Figura 4

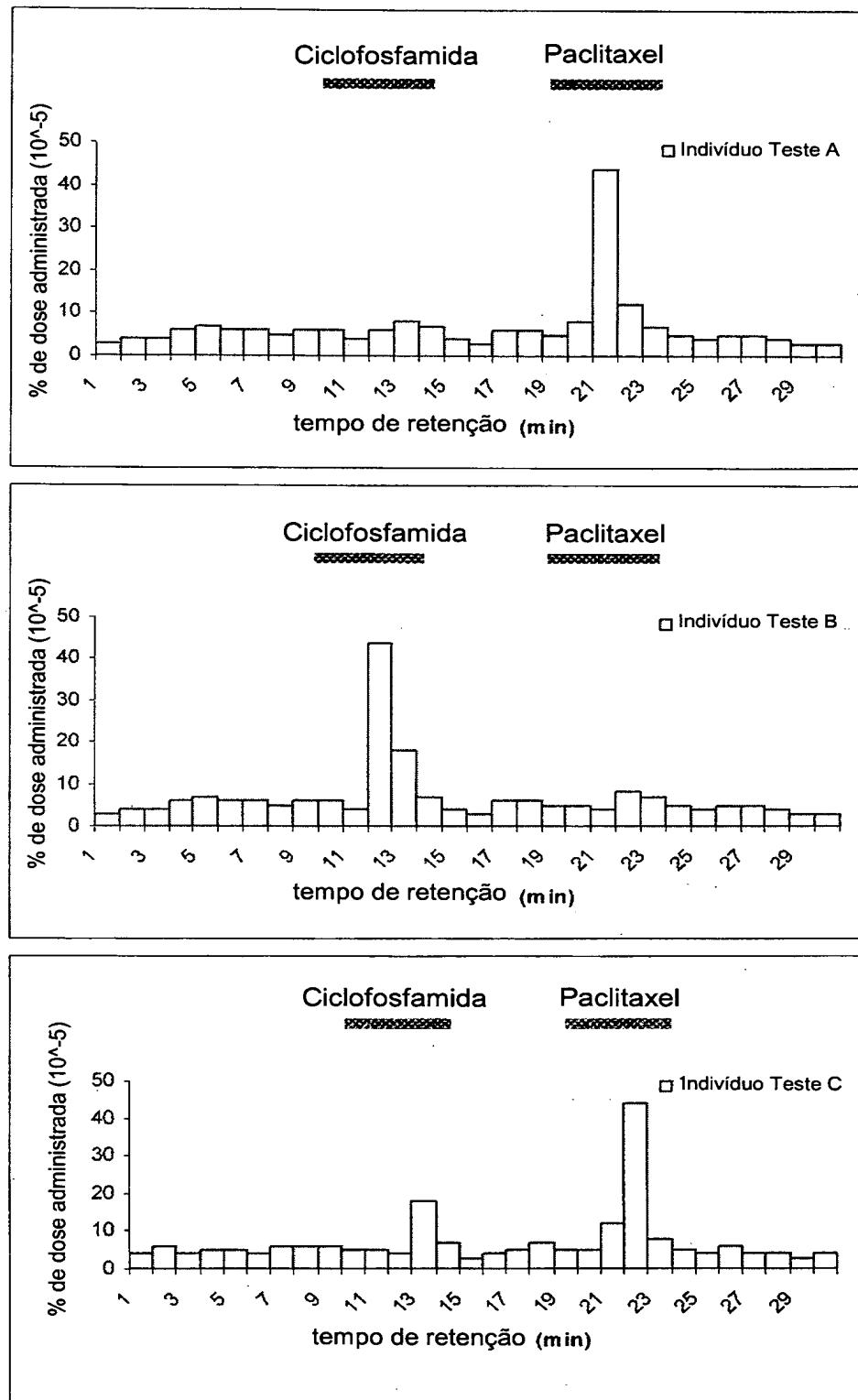


Figura 5

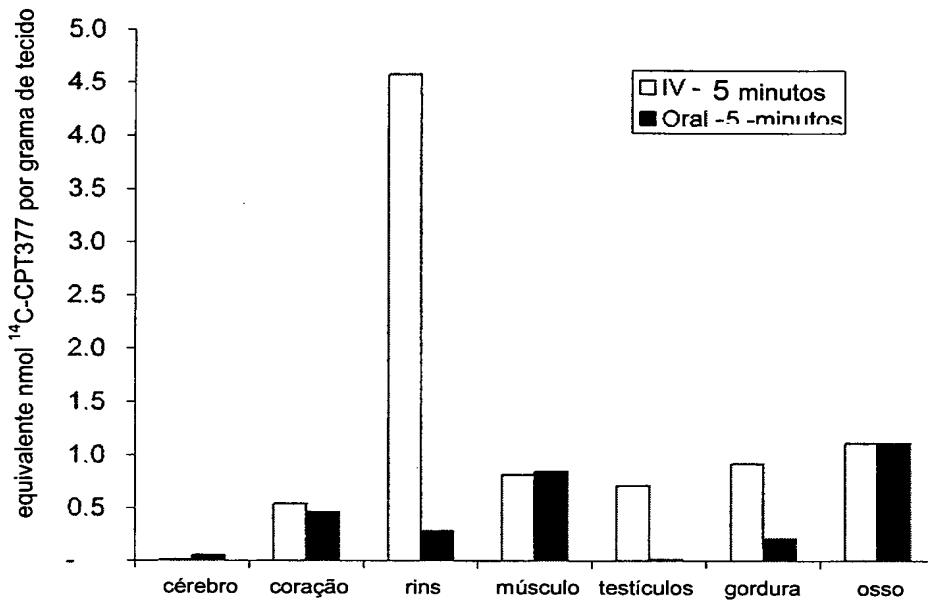


Figura 6

Distribuição no tecido de ^{14}C -CPT 377 (dose IV)

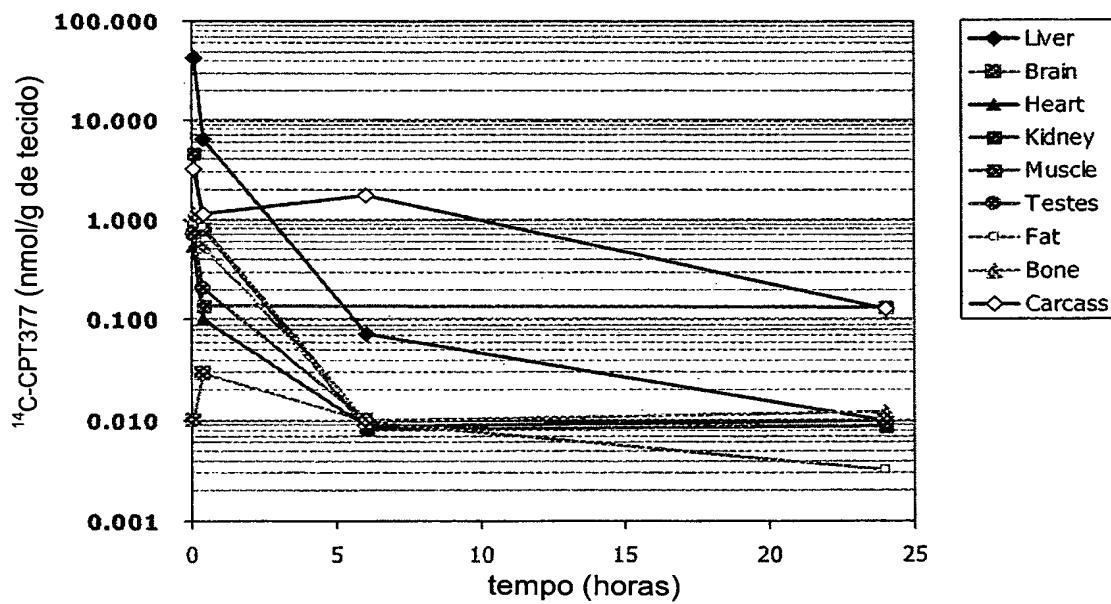


Figura 7

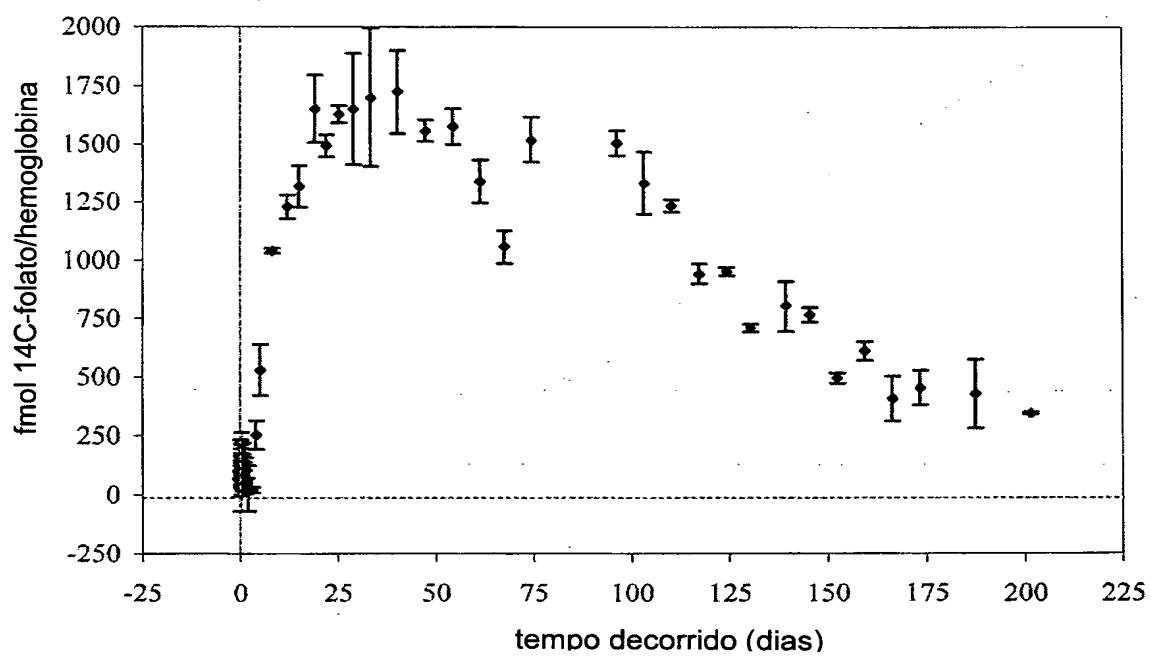
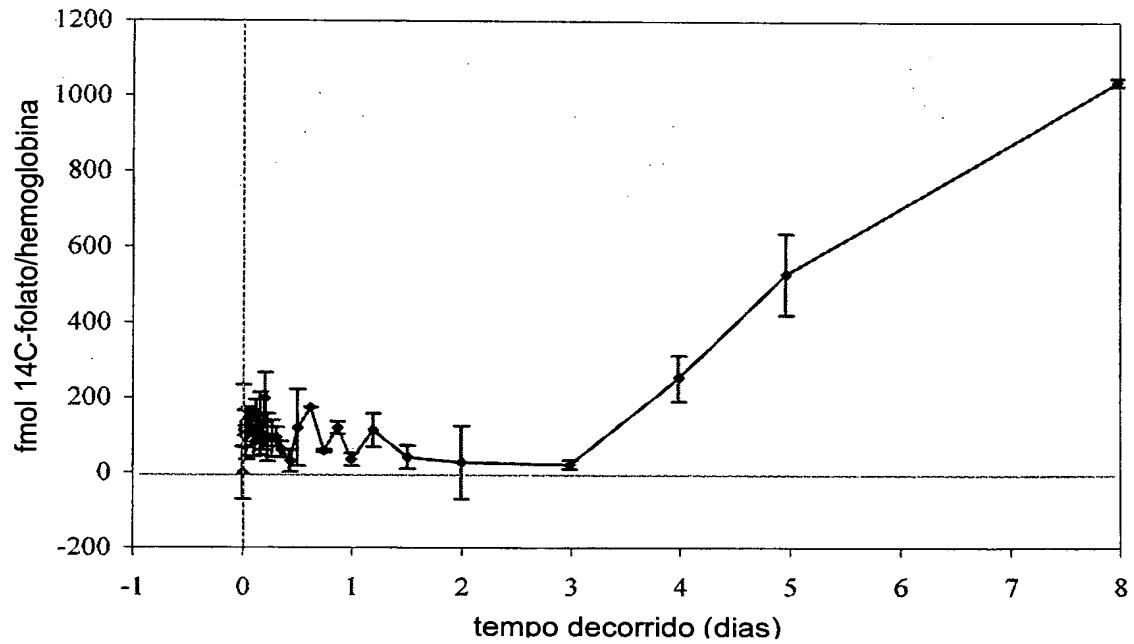


Figura 8

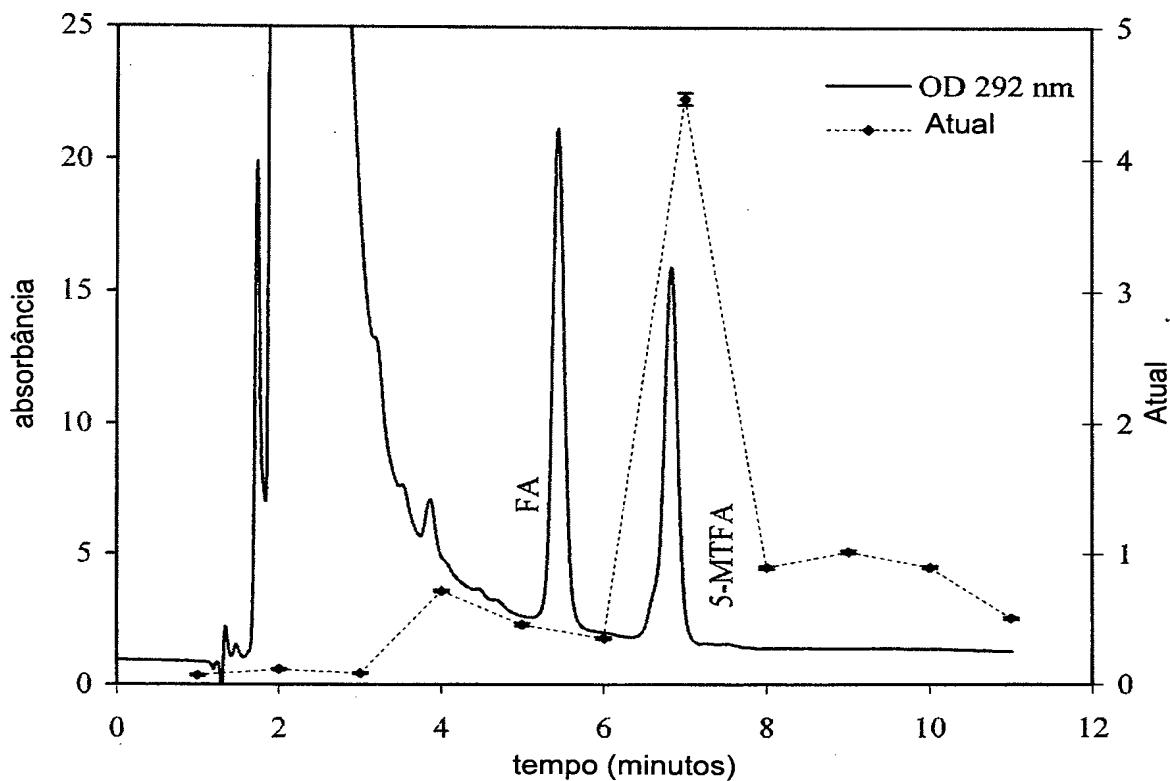


Figura 9

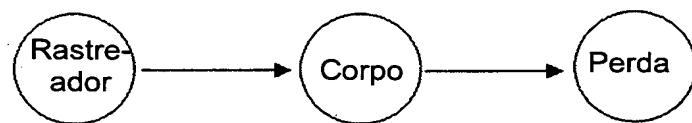


Figura 10

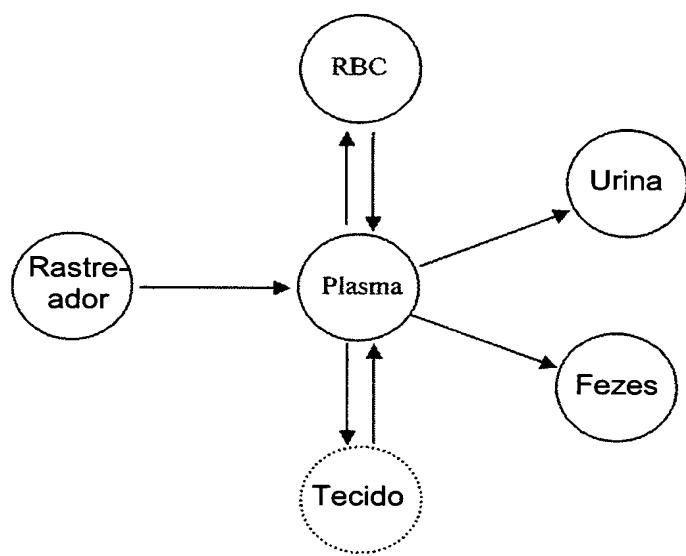


Figura 11

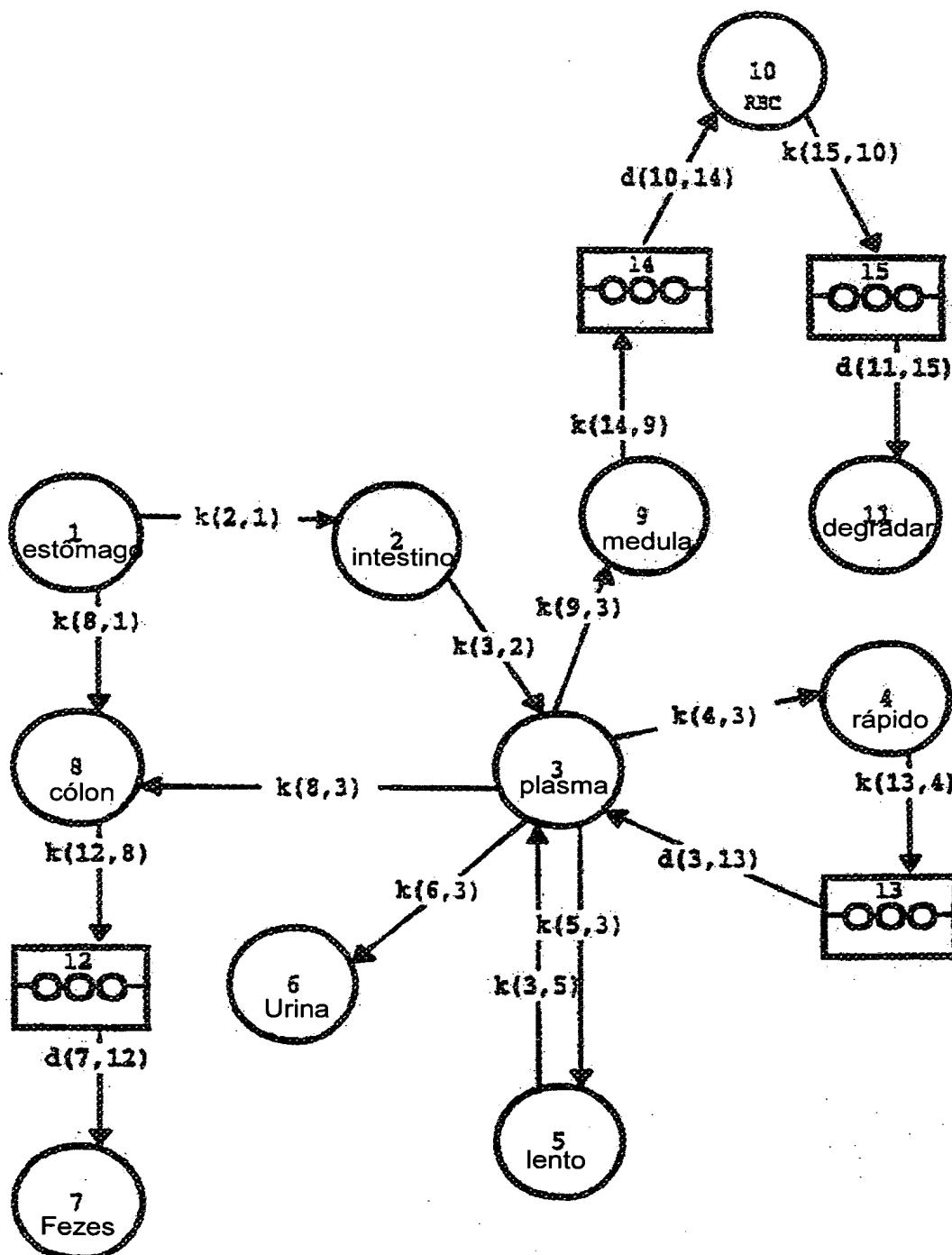


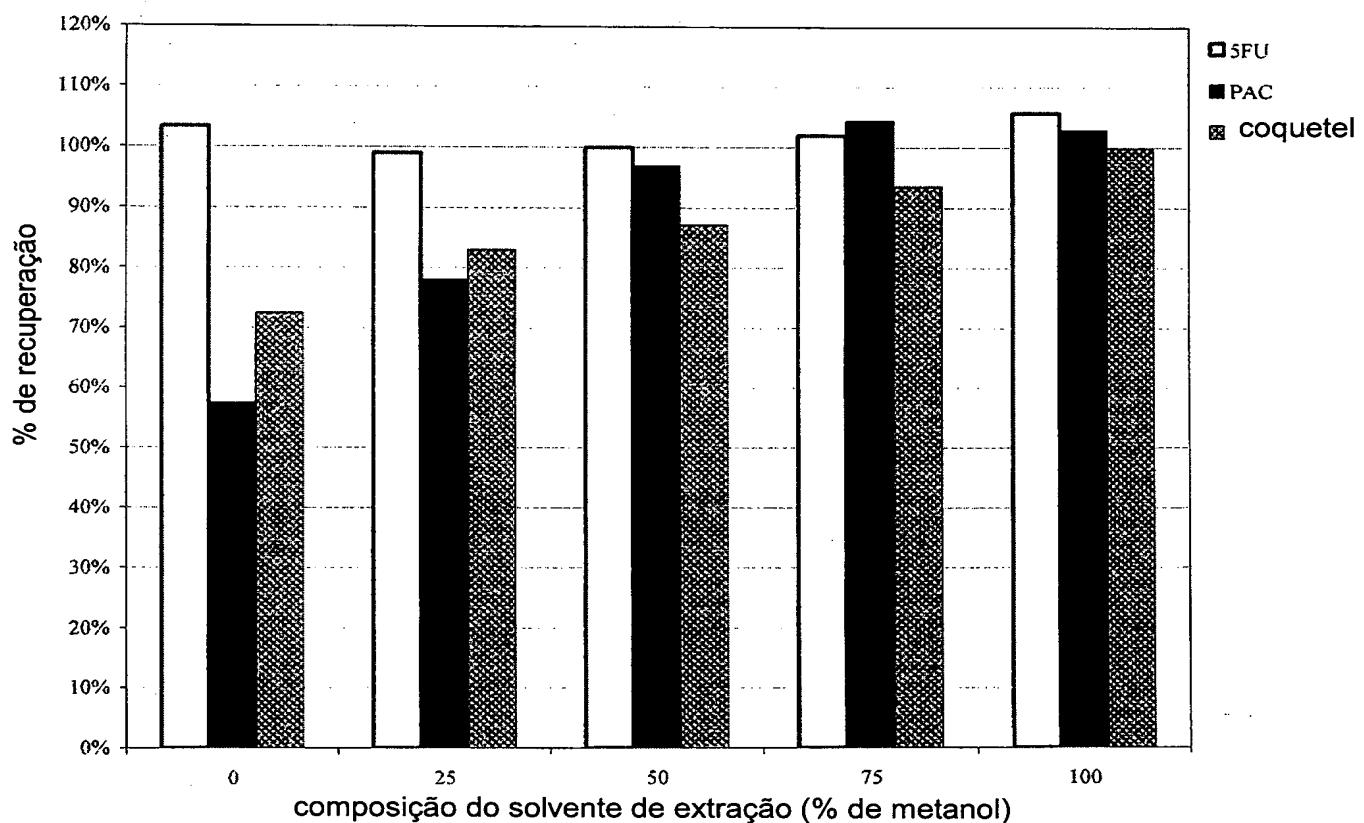
Figura 12

Figura 13

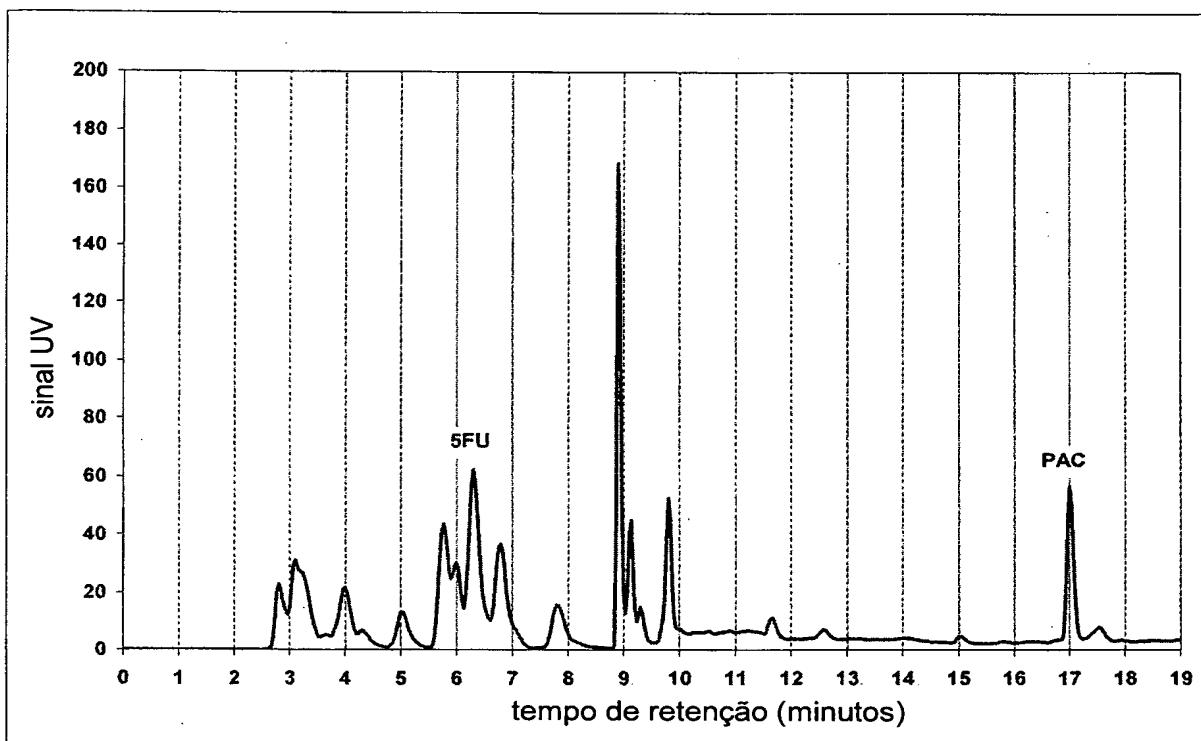


Figura 14

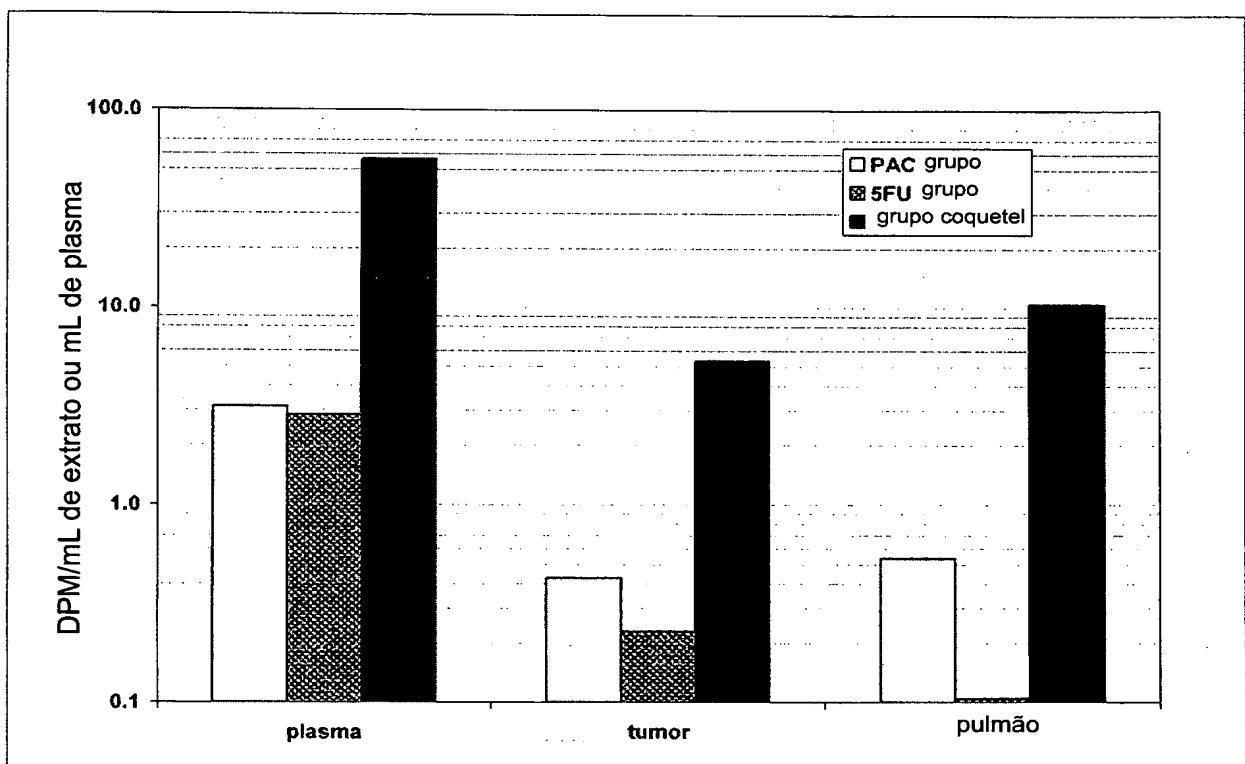


Figura 15

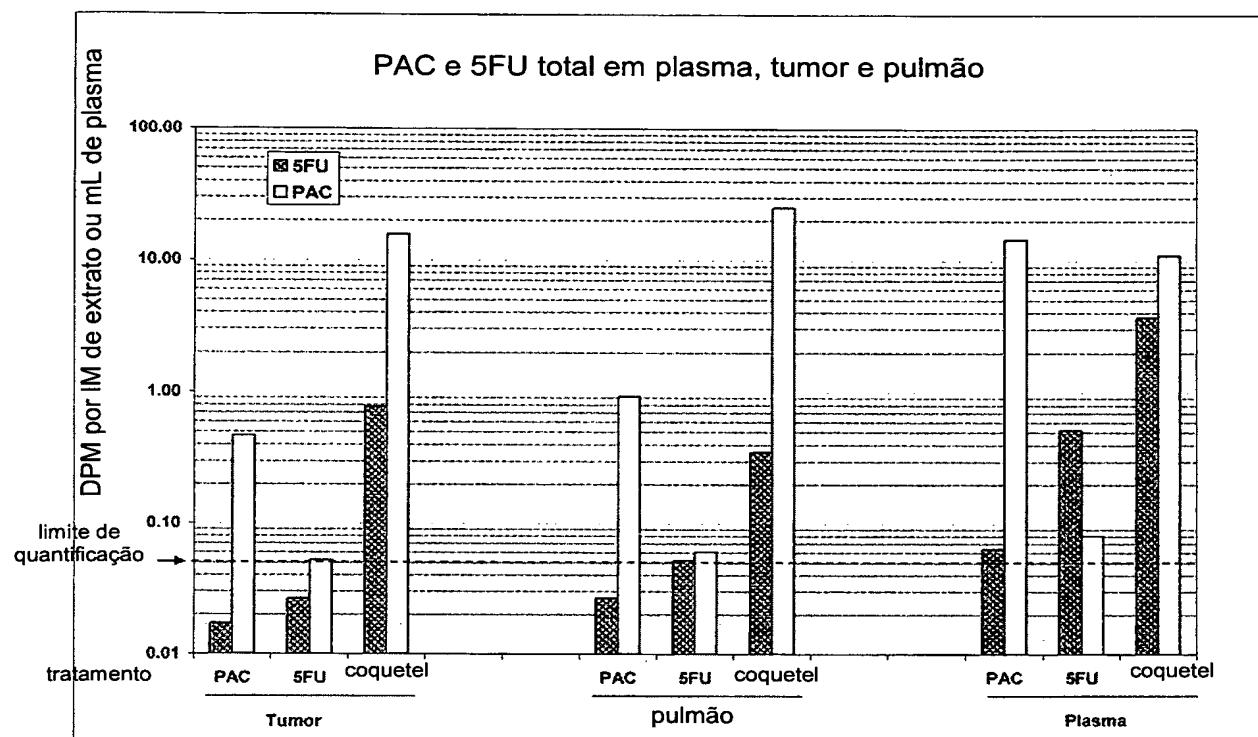
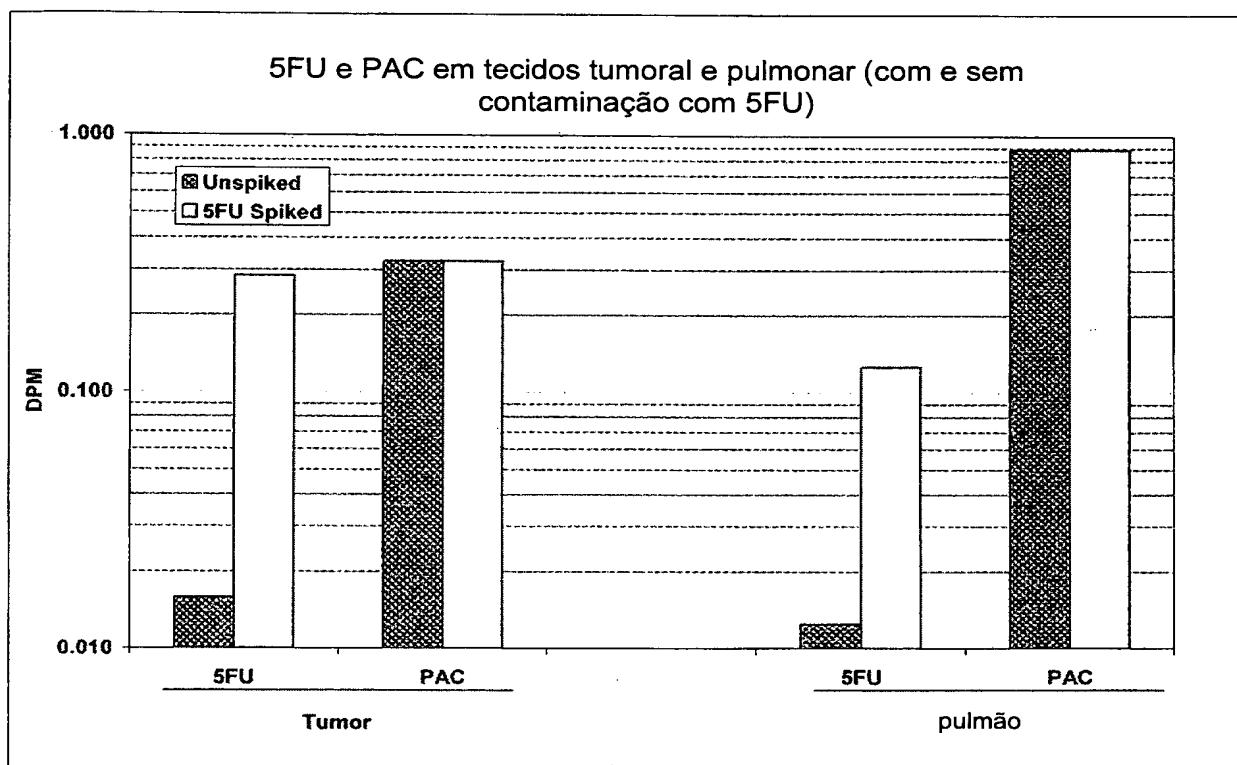


Figura 16



RESUMO

“PROCESSO DE TRATAMENTO TERAPÊUTICO PERSONALIZADO”

É divulgado um processo para determinação simultânea da distribuição de dois ou mais agentes químicos (terapêutico) ao tecido doente. O procedimento gera um relatório 5 específico do paciente que é usado para selecionar o melhor agente químico e dosagem de uma forma personalizada.