



UNIVERSITA' DEGLI STUDI "G. d'Annunzio"
Chieti-Pescara



SCUOLA SUPERIORE "G. d'Annunzio"

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMOLECOLARI E FARMACEUTICHE

CICLO
XXXVII

**SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN PROCESSO DI PREPARAZIONE IN
ASEPSI DEL RADIOFARMACO (^{18}F)FLUODESOSSIGLUCOSIO 1 GBq/ml**

Dipartimento di Farmacia

Settore scientifico disciplinare: CHEM-07/A

Dottorando:

Dott. Giuseppe Tesse

Coordinatore:

Prof.ssa Assunta Pandolfi

Tutor Accademico:

Prof.ssa Letizia Giampietro

Tutor Aziendale:

Dott.ssa Anna Tolomeo

Anni Accademici 2021/2024

Indice

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Radiofarmaci diagnostici	5
1.2 Radiofarmaci terapeutici	10
2. SCOPO DEL LAVORO	15
2.1 Qualifica e Convalida	18
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Processo di Sintesi	24
3.1.1 Produzione del radionuclide ^{18}F	25
3.1.2 Sintesi del radiofarmaco [^{18}F]FDG	31
3.1.3 Formulazione e dispensazione	38
3.2 Qualifiche dei Metodi Analitici	42
3.2.1 Protocollo di convalida del Metodo Radio-TLC per la verifica della Purezza Radiochimica – Test B	42
3.2.2 Protocollo di convalida del Metodo TLC per la verifica della Purezza Chimica – Test B	45
3.2.3 Protocollo di convalida del Radio-HPLC per la verifica della Purezza Chimica e Radiochimica	48
3.2.4 Protocollo di convalida del metodo analitico GC per la determinazione dei solventi residui	53

3.2.5	<i>Protocollo di convalida del Bioburden in soluzioni bulk di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.....</i>	58
3.2.6	<i>Protocollo di convalida della Sterilità in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.....</i>	64
3.2.7	<i>Protocollo di convalida della determinazione delle Endotossine batteriche in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo Cinetico-Cromogenico</i>	71
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	76
4.1	Qualifica dei Metodi Analitici.....	76
4.1.1	<i>Protocollo di convalida del Metodo Radio-TLC per la verifica della Purezza Radiochimica – Test B</i>	76
4.1.2	<i>Protocollo di convalida del Metodo TLC per la verifica della Purezza Chimica – Test B</i>	86
4.1.3	<i>Protocollo di convalida del Radio-HPLC per la verifica della Purezza Chimica e Radiochimica</i>	89
4.1.4	<i>Protocollo di convalida del metodo analitico GC per la determinazione dei solventi residui.....</i>	112
4.1.5	<i>Protocollo di convalida del Bioburden in soluzioni bulk di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.....</i>	119

4.1.6	<i>Protocollo di convalida della Sterilità in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.....</i>	122
4.1.7	<i>Protocollo di convalida della determinazione delle Endotossine batteriche in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo Cinetico-Cromogenico</i>	123
4.2	Convalida di Processo e Studi di Stabilità	129
5.	CONCLUSIONI.....	147

1. INTRODUZIONE

La Medicina Nucleare rappresenta una branca della medicina che utilizza i **radiofarmaci** contenenti al loro interno vari radionuclidi; questi, in base alle loro proprietà fisiche, possono essere utilizzati a scopo sanitario, sia nel campo diagnostico che terapeutico.¹ I radiofarmaci possono essere costituiti da:

- il radionuclide in forma ionica o molecolare,
- il radionuclide in forma ionica opportunamente legato da un agente chelante,
- il radionuclide legato covalente all'interno di una struttura molecolare.

I radionuclidi decadono attraverso l'emissione di radiazioni (positroni, raggi gamma, elettroni, radiazioni alfa) e, in base alla natura fisica della radiazione, possono essere usati a scopo clinico per diagnosi o terapia. Il decadimento radioattivo si manifesta quando un nucleo si trova in una forma isotopica instabile e si trasforma spontaneamente in una forma isotopica più stabile, con l'emissione di particelle o energia.

La legge esponenziale del decadimento radioattivo è la legge che regola il decadimento del numero dei nuclei (N) nell'unità di tempo (t) (**Formula 1**):

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N$$

Formula 1: legge esponenziale del decadimento radioattivo.

In questa formula, λ rappresenta la “*costante di decadimento*” ed è singolare per ogni nucleo, l’*Attività*, invece, rappresenta il numero di nuclei che decadono nell’unità di tempo e si misura in Becquerel (Bq), dove $1 \text{ Bq} = 1$ disintegrazione/secondo, o in Curie (Ci) dove $1 \text{ Ci} = 3.7 \cdot 10^{10}$ disintegrazioni/secondo.

Ogni radionuclide, in base alla sua natura chimica nucleare, è caratterizzato da un “*tempo di dimezzamento*” che indica il tempo necessario affinché l’attività si dimezzi per effetto del decadimento ed è indicato con la seguente formula (**Formula 2**):²

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

Formula 2: tempo di dimezzamento relativo al decadimento radioattivo.

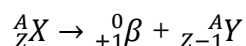
1.1 Radiofarmaci diagnostici

I radiofarmaci diagnostici sono fondamentali in quanto permettono di studiare vari processi biologici e permettono di individuare patologie ad uno stadio non ancora avanzato. Per essere efficaci, è necessario che abbiano una buona stabilità *in vivo*, una buona biodistribuzione ed interazione con il sistema biologico. Quest’ultima può avvenire attraverso un processo fisico-chimico correlato alla funzione anomala della patologia oppure attraverso il legame ad un target biologico, come un recettore, un enzima o una proteina di trasporto. È importante, inoltre, che questi radiofarmaci abbiano una rapida *clearance* sanguigna, in modo tale che il materiale

radioattivo venga subito eliminato dall'organismo, limitando la dose radioattiva al paziente sottoposto al test imaging.³

Le due tecniche di *molecular imaging* utilizzate in medicina nucleare sono la Tomografia ad Emissione di Protoni (*Positron Emission Tomography, PET*) e la Tomografia Computerizzata ad Emissione Singola di Fotoni (*Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT*).⁴

La PET è una tecnica che utilizza radiofarmaci contenenti radionuclidi β^+ emettitori. Il **decadimento positronico β^+** (**Schema 1**) si genera quando l'isotopo risulta instabile in seguito ad un eccesso di protoni rispetto ai neutroni all'interno del nucleo: il protone decade in una coppia neutrone e positrone (che costituisce l'antimateria):



Schema 1: reazione nucleare del decadimento positronico.

In questo decadimento il peso atomico del nucleo originale (X) e del nucleo nuovo (Y) non cambia, pertanto i due nuclei si definiscono *isobari* aventi, cioè, stesso numero di massa (A). Invece, il numero atomico (Z) diminuisce di una unità generando un nuovo elemento chimico.

Dopo essere stato somministrato per via endovenosa, il radiofarmaco raggiunge il proprio bersaglio all'interno dell'organismo, e qui il radionuclide decade con emissione di un positrone β^+ .⁵ Il positrone, dopo aver percorso un breve tratto dal

punto in cui è stato emesso, incontra un elettrone facente parte della materia biologica circostante dando origine al fenomeno dell'**annichilazione** (Figura 1)

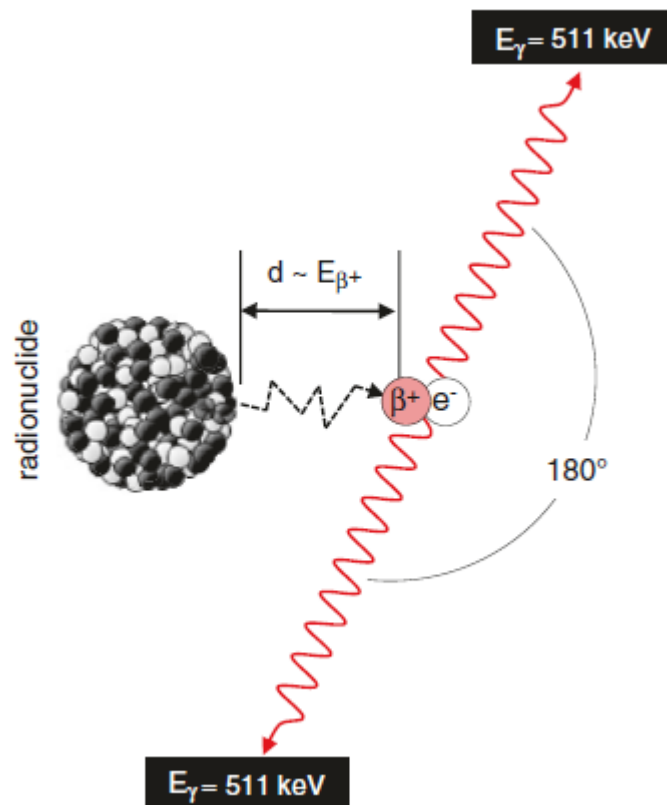


Figura 1: annichilazione di un positrone in materiale biologico.

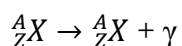
Questo evento causa l'emissione di una coppia di raggi γ ad energia di 511 keV che si allontana dal punto di annichilazione in versi opposti formando un angolo di 180° . Il tomografo è dotato di uno scanner che, attraverso un algoritmo, elabora il segnale quando viene colpito dai due raggi γ contemporaneamente a 180° , dando così informazioni sul punto dell'organismo dove è avvenuta l'annichilazione, e

quindi dove si è depositato il radiofarmaco. Di seguito in **Tabella 1** sono presenti i maggior radionuclidi utilizzati per la PET.

Tabella 1: radionuclidi β^+ emettitori utilizzati per la PET.

<i>Radionuclide</i>	<i>Simbolo</i>	<i>Tempo di dimezzamento</i>	<i>Energia massima (MeV)</i>
Fluoro-18	^{18}F	109.7 minuti	0.64
Carbonio-11	^{11}C	20.3 minuti	0.97
Azoto-13	^{13}N	10 minuti	1.20
Ossigeno-15	^{15}O	2 minuti	1.74
Bromo-76	^{76}Br	16.2 ore	4.0
Iodio-124	^{124}I	4.18 giorni	2.14
Gallio-68	^{68}Ga	68.1 minuti	1.90
Rame-64	^{64}Cu	12.7 ore	0.655

La SPECT è invece una tecnica diagnostica in cui vengono somministrati al paziente radiofarmaci γ emettitori. Il **decadimento γ** (**Schema 2**) avviene quando un nucleo si trova nel suo stato eccitato instabile e ritorna nel suo stato fondamentale stabile liberando un eccesso di energia emettendo radiazione γ . L'energia di questa radiazione corrisponde alla differenza di energia tra lo stato del nucleo eccitato e lo stato ad energia inferiore più stabile.



Schema 2: reazione nucleare del decadimento γ .

Il nucleo che si forma avrà lo stesso numero atomico e lo stesso numero di massa del nucleo di origine.

Queste radiazioni elettromagnetiche permettono di localizzare il radiofarmaco tramite l'elaborazione da parte del tomografo di varie proiezioni planari, con le quali riesce a ricostruire la posizione tridimensionale del punto di origine dell'emissione γ e quindi della localizzazione del radiofarmaco. In **Tabella 2** sono riportati i radionuclidi γ emittenti maggiormente usati per la SPECT.^{2,3}

Tabella 2: radionuclidi γ emittitori utilizzati per la SPECT.

<i>Radionuclide</i>	<i>Simbolo</i>	<i>Tempo di dimezzamento</i>	<i>Energia massima (keV)</i>
Tecnezio-99m	${}^{99m}\text{Tc}$	6.0 ore	140
Indio-111	${}^{111}\text{In}$	67.4 ore	171; 245
Tallio-201	${}^{201}\text{Tl}$	73 ore	70-80; 135; 167
Gallio-67	${}^{67}\text{Ga}$	78 ore	93; 184; 296
Iodio-123	${}^{123}\text{I}$	13.3 ore	159; 285

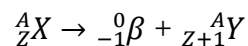
1.2 Radiofarmaci terapeutici

Negli ultimi anni, alcuni radiofarmaci sono stati impiegati ad uso terapeutico (*radioterapia metabolica*). In particolare, vari radionuclidi vengono veicolati, tramite specifiche molecole o proteine, verso molecole bersaglio come i siti tumorali o dove sono presenti altri tipi di proliferazione cellulare patologica. Questi radiofarmaci hanno il vantaggio, rispetto alla radioterapia tradizionale, di poter trattare aree patologiche, come il cervello e le ossa, ed in questo modo il sito tumorale bersaglio assorbe la dose di radiazione dal radiofarmaco che decresce esponenzialmente nel tempo. Un altro vantaggio della terapia mediante radiofarmaci è quello di poter raggiungere e distruggere anche siti metastatici. Pertanto, in base all'obiettivo terapeutico, vengono scelti i radionuclidi tenendo in considerazione le loro caratteristiche fisiche tra cui: il tempo di emivita, l'energia della radiazione, il tipo di decadimento, il metodo di produzione e la purezza radionuclidica.

L'emivita di un radionuclide usato nella radioterapia metabolica deve essere idealmente compresa tra le sei ore e i sette giorni. I radiofarmaci con una lunga emivita esporranno il tumore bersaglio e l'ambiente circostante ad una radiazione più prolungata. I radiofarmaci, invece, con un'emivita molto breve avranno limitazioni dovute al loro tempo di veicolazione verso le cellule bersaglio. Pertanto, il tempo di emivita deve essere sufficiente affinché la radiazione possa essere veicolata verso la zona d'interesse. A tal proposito vengono impiegati radionuclidi con un'alta energia di trasferimento lineare (*LET – linear energy transfer*).

I radionuclidi utilizzati nella radioterapia metabolica in medicina nucleare sono i β^- emettitori, con un LET di circa 0.2 keV/ μm e gli α^{2+} emettitori con un LET di 50-230 keV/ μm .^{6,7} Le particelle α percorrono un breve tratto nella materia biologica, in quanto hanno una massa relativamente grande pari a 4 Da.^{3,8} La distanza attraversata dalle particelle e la loro energia rilasciata nelle cellule deve essere considerata e valutata, così da garantire un'ottimale distruzione delle cellule bersaglio considerate patologiche, cercando di salvaguardare la distruzione e l'interazione con le radiazioni ionizzanti delle cellule non cancerogene presenti nei tessuti adiacenti.⁹⁻¹³

Il **decadimento β^-** (Schema 3) avviene negli isotopi che presentano un numero più alto di neutroni rispetto ai protoni. In questo modo un neutrone decade in un protone ed elettrone (β^-):



Schema 3: reazione nucleare del decadimento β^- .

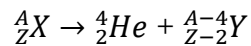
Come nel decadimento positronico (β^+), anche nel decadimento β^- il peso atomico del nucleo originale (X) e del nucleo nuovo (Y) non cambia, risultando i due nuclei *isobari* con stesso numero di massa (A). Invece il numero atomico (Z) aumenta di una unità generando un nuovo elemento chimico.²

Il radionuclide β^- emettitore più frequentemente utilizzato è lo *Iodio-131* (^{131}I). Questo è particolarmente usato nei casi gravi di ipertiroidismo e anche per trattare il cancro alla tiroide e presenta un'emivita di 8.05 giorni.¹⁴⁻¹⁷

Un altro radionuclide utilizzato è l'*Yttrium-90* (^{90}Y). Questo è utilizzato legato a determinati anticorpi monoclonali per la cura del cancro ovarico e alcuni tumori del sangue.^{18,19} Inoltre, molti tumori neuroendocrini sono trattati con peptidi radiomarcanti con ^{90}Y .^{20,21}

Il radionuclide *Lutetium-177* (^{177}Lu) ha un'emivita di 6.64 giorni ed è un emettitore di particelle β^- (utilizzabile per la radioterapia metabolica) oltre ad essere un emettitore di raggi γ e quindi sfruttabile per l'imaging molecolare. Per queste sue caratteristiche chimico fisiche il ^{177}Lu può essere utilizzato nel campo della teranostica.²² La teranostica è la nuova generazione di medicina personalizzata per affrontare nuove sfide nella pratica antitumorale. Con un grande potenziale, la teranostica combina la diagnosi non invasiva e la terapia mirata dei tumori con la capacità di monitorare, in tempo reale, il rilascio e la distribuzione dei farmaci. I progressi nell'applicazione dei radionuclidi terapeutici in campo medico hanno reso possibile l'integrazione di capacità terapeutiche e diagnostiche in un unico sistema.²³

Il **decadimento α^{2+}** (**Schema 4**) si genera spontaneamente in tutti gli elementi successivi al Bismuto, quindi con un numero atomico superiore a 83. Questa reazione nucleare risulta spontanea in quanto la massa del nucleo che decade è superiore alla somma delle masse dei nuclei prodotti durante il decadimento. Per raggiungere la propria stabilità questi nuclei hanno necessità di abbassare il proprio numero atomico. Pertanto, avviene l'emissione di un nucleo di He composto da 2 protoni e da 2 neutroni come indicato nella seguente reazione nucleare:²



Schema 4: reazione nucleare decadimento α^{2+} .

Le particelle α presentano, quando decadono, un'alta energia 4-9 MeV e percorrono solo 40-100 μ (1-3 cellule). Durante questo percorso, provocano varie rotture all'interno del DNA delle cellule bersaglio generando i *double-strand breaks* (DSBs), rendendo inefficace il processo di autoriparazione cellulare. Il primo radionuclide α -emettitore autorizzato all'uso clinico è stato il *Radium-223* (^{223}Ra , Xofigo). Questo è utilizzato come cura palliativa nei pazienti con cancro alla prostata resistenti alla castrazione chimica, che presentano metastasi ossee. Infatti, il dicloruro ^{223}Ra è un analogo del calcio (Ca) che si lega all'idrossiapatite, un minerale naturale dell'osso. Per questo motivo può essere utilizzato nei pazienti con metastasi riscontrati solo nell'osso.²⁴ Il ^{223}Ra ha un'emivita di 11.4 giorni ed ha un trasferimento di energia lineare elevato (alto LET) e le particelle α hanno una penetrazione di 70 μm nel tessuto. L'irradiazione ad alto LET induce rotture del doppio filamento del DNA (DSB) che sono complesse e difficili da riparare, e quindi producono aberrazioni cromosomiche e morte cellulare.²⁵

Un altro radionuclide α -emettitore che è attualmente oggetto di studio è *Actinium-225* (^{225}Ac) che può essere usato per la cura dei tumori neuroendocrini e, se legato all'antigene specifico di membrana della prostata (*Prostate Specific Membrane Antigen* - PSMA), può essere utilizzato anche per il cancro alla prostata.^{26,27}

Di seguito, in **Tabella 3**, sono riassunti tutti i radionuclidi maggiormente utilizzati nella radioterapia metabolica.³

Tabella 3: radionuclidi utilizzati in terapia.

<i>Radionuclide</i>	<i>Simbolo</i>	<i>Tempo di dimezzamento</i>	<i>Emissione</i>
Radio-223	²²³ Ra	11.4 giorni	α
Attinio-225	²²⁵ Ac	10 giorni	α
Iodio-131	¹³¹ I	8 giorni	β ⁻ ad alta energia
Ittrio-90	⁹⁰ Y	64 ore	β ⁻ ad alta energia
Lutezio-177	¹⁷⁷ Lu	6.64 giorni	β ⁻ ad alta energia
Samario-153	¹⁵³ Sm	1.9 ore	β ⁻ ad alta energia
Stronzio-89	⁸⁹ Sr	50.5 ore	β ⁻ ad alta energia

2. SCOPO DEL LAVORO

Il radiofarmaco oggetto di studio di questo lavoro è il 2-[^{18}F]fluoro-2-desossi-D-glucosio ([^{18}F]FDG). Questo rappresenta un analogo del glucosio, avente sul carbonio 2 (C2), al posto del gruppo ossidrilico OH, il radionuclide ^{18}F , uno dei β^+ emettitori più usati nella tecnica diagnostica della PET (**Figura 2**).

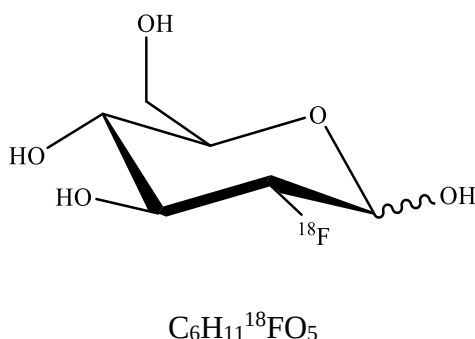


Figura 2: formula di struttura del [^{18}F]FDG.

[^{18}F]FDG, essendo un analogo del glucosio, ha un ruolo importante nel PET imaging, come *marker* del metabolismo cellulare. [^{18}F]FDG, infatti, è in grado di entrare nella cellula attraverso lo stesso meccanismo di trasporto del glucosio. Dopo la penetrazione all'interno della cellula mediante i trasportatori del glucosio (GLUT), sia il glucosio che [^{18}F]FDG sono fosforilati dall'enzima *esochinasi*, formando il glucosio-6-fosfato o il [^{18}F]FDG-6-fosfato (nel caso del radiofarmaco). Il glucosio-6-fosfato prosegue la glicolisi e viene convertito dall'enzima *fosfoglucoisomerasi* ad un anello a 5 atomi di carboni, diventando fruttosio-6-fosfato e proseguendo fino alla formazione di acido piruvico e successivo rilascio

di energia. Il $[^{18}\text{F}]\text{FDG-6-fosfato}$, invece, non prosegue il meccanismo biochimico di glicolisi a causa della sostituzione sul C2 del OH con il ^{18}F . In questo modo il $[^{18}\text{F}]\text{FDG-6-fosfato}$ rimane intrappolato all'interno della cellula (*"trapping metabolic"*), anche in seguito alla sua carica negativa dovuta al gruppo fosfato (PO_4^{3-}), che non gli permette di fuoriuscire attraverso la membrana cellulare (**Figura 3**).²⁸⁻³¹

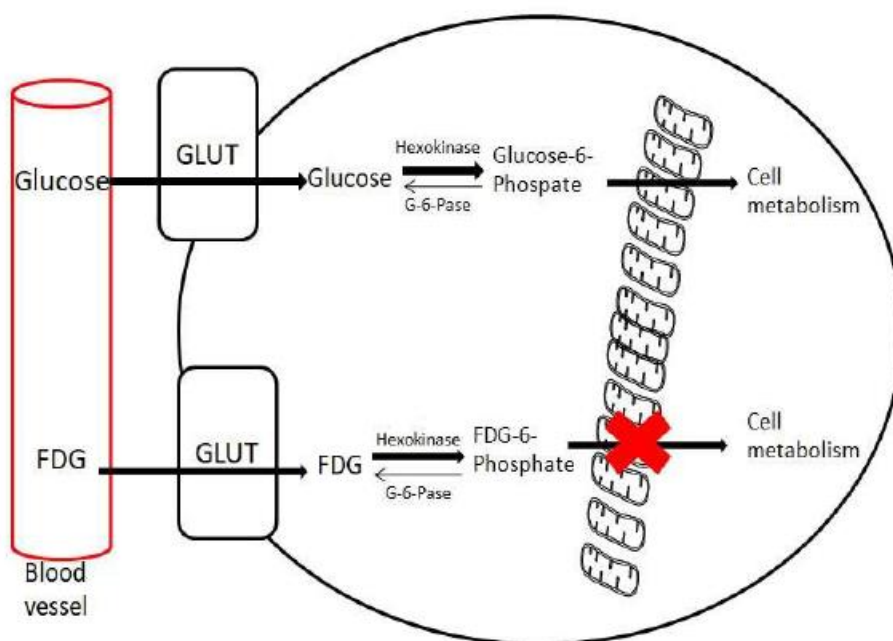


Figura 3: struttura e meccanismo di assorbimento cellulare del $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$.²⁸

Le cellule tumorali consumano una grande quantità di glucosio rispetto alle cellule sane, in quanto richiedono molta energia nel processo di proliferazione cellulare. Pertanto, l'assorbimento di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ è maggiore nelle cellule tumorali, rispetto alle cellule sane. Quindi $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ è un radiofarmaco utile per monitorare il

metabolismo del glucosio e anche per identificare la velocità della crescita delle cellule cancerogene. Inoltre, è utilizzato per monitorare la funzionalità di organi come cervello e cuore che sono caratterizzati da un alto metabolismo di glucosio.

L'officina radiofarmaceutica ITELPHARMA della Itel telecomunicazioni s.r.l. attualmente è titolare AIC del radiofarmaco ITEL FDG: soluzione sterile iniettabile a base di [^{18}F]FDG prodotta mediante tecnica di sterilizzazione terminale in autoclave. La sintesi e la dispensazione del radiofarmaco avvengono in un locale dell'officina (clean room), conforme ai requisiti di contaminazione particellare e microbiologica previsti per la classificazione ambientale di grado C descritta nell'Annex 1 delle Good Manufacturing Practice (GMP).³²

Questo lavoro di tesi di dottorato è incentrato sullo sviluppo e convalida di un processo in asepsi per la produzione di [^{18}F]FDG soluzione sterile iniettabile, con AIC proprietaria di Itel telecomunicazioni s.r.l. Rispetto al prodotto con sterilizzazione terminale avente un'attività di 250 MBq/ml, la nuova specialità equivalente di [^{18}F]FDG prodotta in asepsi presenterà un'attività di 1 GBq/ml consentendo di ottenere un prodotto finito sterile ed apirogeno con rendimenti maggiori rispetto all'attuale processo. Una volta ottenuta l'autorizzazione, sarà possibile fornire un numero maggiore di UOC di Medicina Nucleare, purché presenti in un raggio chilometrico compatibile con la durata del radiofarmaco (10 ore circa). La qualità del prodotto finito, da un punto di vista microbiologico, sarà quindi assicurata dalla qualità del processo stesso, inteso come qualità degli ambienti, attrezzature, materie prime, procedure operative e personale, piuttosto che da un processo di sterilizzazione terminale mediante autoclave.

Data l'impossibilità di conoscere l'esito del test di sterilità del prodotto finito prima del suo utilizzo (la durata del test di sterilità è di 14 giorni), è di assoluta importanza che il processo di produzione sia sviluppato con il massimo rigore e in accordo a linee guida di riferimento, che dovranno essere adattate alla realtà del sito produttivo di Itel telecomunicazioni s.r.l..

Una volta sviluppato il processo di produzione in asepsi, che prevede la produzione del radionuclide mediante ciclotrone, la sintesi della sostanza attiva, la formulazione e la dispensazione del radiofarmaco, è stato attuato un piano di convalide volto ad accertare la ripetibilità e la robustezza del processo posto in essere. In caso di risultati conformi alle specifiche prestabilite, sarà possibile avviare l'iter di registrazione del prodotto e relativo processo ai fini della sua utilizzabilità nell'uomo.

2.1 Qualifica e Convalida

La qualifica e la convalida in ambito farmaceutico rappresentano un requisito delle GMP che permettono di controllare che i prodotti farmaceutici soddisfino un sistema di qualità e di sicurezza.

La **Qualifica** rappresenta tutte quelle azioni necessarie per dimostrare e qualificare che un'apparecchiatura, un sistema o un determinato componente soddisfi le specifiche richieste. In generale la qualifica è suddivisa in diverse fasi:

- *Design Qualification* (Qualifica di progetto): consiste nel verificare che il design proposto soddisfi tutte le specifiche richieste.

- *Installation Qualification* (Qualifica dell'installazione): consiste in una serie di controlli con lo scopo di confermare che l'apparecchiatura o il sistema sia stato installato correttamente secondo le specifiche ed i disegni approvati.
- *Operational Qualification* (Qualifica operativa): vengono eseguiti una serie di test in cui viene dimostrato il corretto funzionamento dei parametri del sistema o dell'attrezzatura.
- *Performance Qualification* (Qualifica delle prestazioni): vengono eseguite verifiche per confermare che l'attrezzatura o il sistema preso in considerazione operi come previsto nelle condizioni di utilizzo reali, garantendo la qualità delle prestazioni necessarie in condizioni produttive.

La **Convalida** rappresenta la conferma che i metodi analitici e i processi utilizzati nella produzione e nel controllo qualità di un prodotto farmaceutico siano idonei per il loro uso previsto a garantire un farmaco conforme ad un sistema di qualità.³³

All'interno dell'officina radiofarmaceutica ITEL, i moduli di sintesi, la strumentazione di laboratorio, le celle di dispensazione (isolatore schermato) e la sua strumentazione installata all'interno (contaparticelle, pompa peristaltica, bilancia analitica, calibratore di dose, stazione di riempimento, tappatura e ghieratura), l'impianto di condizionamento dell'aria e i software utilizzati sono già stati sottoposti ad opportuna qualifica. Inoltre, anche le materie prime e i gas usati nel processo di produzione sono stati scelti da fornitori previa qualifica di questi ultimi.

Il prodotto con AIC proprietaria ITEL telecomunicazioni, una volta ricevuta l'autorizzazione dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), sarà sottoposto ad opportuni test di controllo qualità, prima del rilascio. La **Tabella 4** riassume tutti i controlli da eseguire con i rispettivi limiti di specifica proposti per il prodotto secondo Farmacopea Europea.³⁴

Tabella 4: test di controllo qualità relativi al radiofarmaco [¹⁸F]FDG.

PARAMETRO ANALITICO	METODOLOGIE	LIMITI DI SPECIFICA
Aspetto	Ispezione visiva	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, esente da particelle
Contenuto di radioattività	Calibratore di dose	90-110% della radioattività del ¹⁸ F dichiarata in etichetta all'ora e data di taratura
PUREZZA RADIONUCLIDICA (IDENTIFICAZIONE)		
Identificazione A	Spettrometria raggi Gamma (Mucha)	Energia di emissione gamma 0.511 MeV ±5% . A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV
Identificazione B	Calibratore di dose	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti
Identificazione C	HPLC	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio
PUREZZA CHIMICA		
pH	pH-metro	4.5 – 8.5
FDG - CIDG (Test A)	HPLC	FDG ≤ 0.050 g/l CIDG ≤ 0.050 g/l
Kryptofix (Test B)	Colour Spot test	≤ 220 µg/ml

PARAMETRO ANALITICO	METODOLOGIE	LIMITI DI SPECIFICA
Solventi residui (Test C)	GC	Acetonitrile ≤ 0.41 mg/ml Etanolo ≤ 5 mg/ml Isopropanolo ≤ 5 mg/ml
PUREZZA RADIOCHIMICA		
^{18}F , ^{18}FDG e ^{18}FDM (Test A)	HPLC	$\geq 95\%$ di $^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM}$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F $\leq 10\%$ di ^{18}FDM della radioattività globale per $^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM}$
^{18}FDG (Test B)	TLC	$^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM} \geq 95\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F [^{18}F] più derivati acetilati $\leq 5\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F
TEST INTEGRITA' DI FILTRI		
Pre-filtro Filtro finale	Test punto di bolla	> 3.45 bar (o 50 psi) secondo i dati del fornitore (Millex)
PUREZZA RADIONUCLIDICA		
Purezza radionuclidica -Test A	Spettrometria raggi Gamma (Mucha)	Il ^{18}F deve essere $\geq 99.9\%$ della radioattività totale
Impurezze radionuclidiche (Test Post-rilascio) Test B	Spettrometria raggi Gamma (Ortec)	La radioattività totale dovuta ad impurezze $\leq 0.1\%$ della radioattività totale
TEST BIOLOGICI		
Endotossine batteriche	- Metodo A – metodo Gel-Clot Metodo D – metodo Cineto cromogenico	≤ 17.5 IU/ml
Sterilità (Test post-rilascio)	Filtrazione su membrana	Conforme alla Ph. Eur. 0125

Sulla base di tali informazioni, è stato redatto un documento di *Risk Assessment*, all'interno del quale è stata valutata la necessità di eseguire nuovi protocolli di convalida relative a determinate metodiche analitiche per il rilascio del radiofarmaco. In particolare, sono stati redatti ed eseguiti i protocolli di convalida relativi alle metodiche analitiche dei controlli di qualità chimici, seguendo le linee guida ICH Q2R1.³⁵

La convalida di un metodo analitico è il processo attraverso il quale si stabilisce, per mezzo di studi di laboratorio, se un metodo di analisi presenta caratteristiche di efficienza tali da soddisfare i requisiti previsti per le applicazioni specifiche del metodo stesso.

I protocolli di convalida eseguiti sono stati i seguenti:

- Metodo Radio-TLC per la verifica della Purezza Radiochimica – Test B – di soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.
- Metodo TLC per la verifica della Purezza Chimica – Test B - di soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.
- Metodo Radio-HPLC per la verifica della purezza chimica e radiochimica della soluzione iniettabile di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.
- Metodo Gas-Cromatografico per la determinazione dei solventi residui in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.

Data la natura delle preparazioni a base di ¹⁸F (rischio connesso all'esposizione a radiazioni e breve emivita del radionuclide, con conseguente impossibilità ad

eseguire il test di sterilità ai fini del rilascio), il requisito della sterilità può essere confermato solo dopo il rilascio della preparazione e la sua somministrazione nel paziente.³⁶ Ne consegue che la sterilità di un prodotto non può essere garantita dai controlli di qualità eseguiti al termine del processo produttivo, ma deve essere il processo stesso ad offrire elevate garanzie.

Dopo aver eseguito la convalida dei metodi analitici dei controlli di qualità chimici, sono stati redatti ed eseguiti i protocolli di convalida relativi alle metodiche analitiche per i test microbiologici del prodotto (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.

In particolare, i protocolli eseguiti sono stati i seguenti:

- Determinazione del Bioburden in soluzioni bulk di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.
- Determinazione della sterilità in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana.
- Determinazione delle endotossine batteriche in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo cinetico-cromogenico.

Infine, dopo la convalida dei metodi analitici, sono stati prodotti dei lotti di convalida di processo per eseguire studi di stabilità del prodotto finale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Processo di Sintesi

La produzione del radiofarmaco [^{18}F]FDG prevede le seguenti fasi di processo:

- produzione del radionuclide ^{18}F , a partire da H_2^{18}O , per mezzo del ciclotrone;
- sintesi della molecola [^{18}F]FDG, mediante l'incorporazione del ^{18}F in una molecola organica;
- idrolisi e purificazione;
- trasferimento della soluzione contenente la sostanza attiva in un isolatore di classe A secondo le GMP;
- doppia filtrazione e dispensazione del prodotto nei contenitori primari, successivamente tappati e ghierati.

Una rappresentazione schematica del processo produttivo è riportata di seguito

(Figura 4):

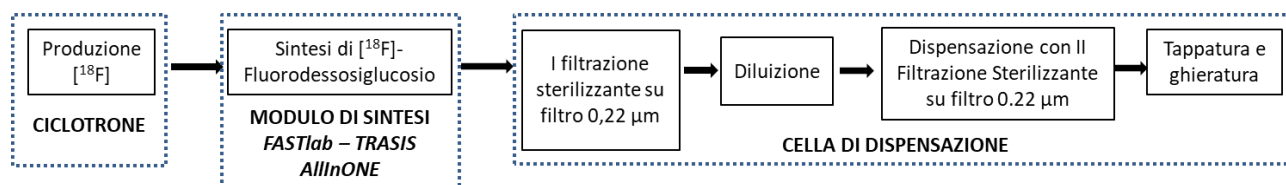
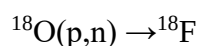


Figura 4: rappresentazione schematica del processo produttivo.

3.1.1 Produzione del radionuclide ^{18}F

Il primo step per la produzione del radiofarmaco $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ consiste nella produzione del suo radionuclide ^{18}F . Il radionuclide ^{18}F viene prodotto in forma ionica di fluoruro marcato, $[^{18}\text{F}^-]$, mediante bombardamento di acqua arricchita di Ossigeno-18 $[\text{H}_2^{18}\text{O}]$ con un fascio di protoni accelerati. La reazione nucleare che avviene è la seguente (**Schema 5**):



Schema 5: reazione nucleare per la produzione di fluoro-18.

La produzione del radionuclide ^{18}F viene eseguita tramite l'utilizzo di uno o entrambi i ciclotroni (PETtrace 860 GEHC), attualmente installati ed in uso presso l'officina (**Figura 5**).



Figura 5: PETtrace 860 GEHC ciclotroni installati nella divisione
ITELPHARMA.

Il ciclotrone è un acceleratore di particelle usato per la produzione della maggior parte di radionuclidi usati in medicina nucleare; in base al tipo di target iniziale bombardato, possono generarsi vari radionuclidi:

- ^{18}O (liquido) per la produzione di ^{18}F ;
- ^{14}N (gas) per la produzione di ^{11}C ;
- ^{16}O (liquido) per la produzione di ^{13}N ;
- ^{15}N (gas) per la produzione di ^{15}O ;
- ^{14}N (gas) per la produzione di ^{15}O ;
- ^{20}Ne (gas) per la produzione di $^{18}\text{F}_2$;
- ^{18}O (gas) per la produzione di $^{18}\text{F}_2$;
- ^{124}Xe (gas) per la produzione di ^{123}I .

Gli elementi principali di cui è costituito un ciclotrone sono i seguenti:

- un magnete,
- un sistema di radiofrequenza,
- una sorgente di ioni che genera le particelle che verranno immesse nella camera di accelerazione;
- i target, ovvero le strutture col compito di contenere il materiale che deve essere bombardato;
- un sistema di vuoto, per evitare che le particelle accelerate interagiscano con materiale non inerte.

Il ciclotrone accelera gli ioni idruro H^- che vengono prodotti mediante un dispositivo chiamato sorgente di ioni (*ion source*), presente al centro del ciclotrone.

Lo ione H^- viene accelerato grazie alla presenza di due elettrodi chiamati *dees*. Ai due elettrodi è collegato un sistema di radiofrequenza che applica un elevato voltaggio responsabile dell'accelerazione degli ioni idruro. Il campo magnetico, invece, la cui direzione è presente su un piano perpendicolare ai due elettrodi, ha la funzione di generare una traiettoria circolare delle particelle; in questo modo lo ione acquisisce un andamento a spirale allontanandosi sempre di più dal centro del ciclotrone.

L'accelerazione degli ioni nel ciclotrone avviene in un ambiente con un sistema vuoto, in modo tale da evitare collisioni che possono causare una diminuzione della quantità di ioni o cambiare la loro traiettoria. La particella, quando arriva alla fine del campo magnetico e quindi alla fine della sua traiettoria circolare, viene deviata ed estratta per essere indirizzata verso il target dove sarà responsabile del bombardamento del materiale bersaglio (in questo caso l'acqua arricchita $H_2^{18}O$).

L'estrazione degli ioni H^- avviene attraverso i cosiddetti *carbon foil o extraction foil*, ovvero lamine di carbonio molto sottili che hanno il compito di trattenere la coppia di elettroni dello ione idruro, trasformandolo così in uno ione positivo H^+ , che verrà usato per bombardare il target dando origine alla reazione nucleare (Figura 6).^{2,37}

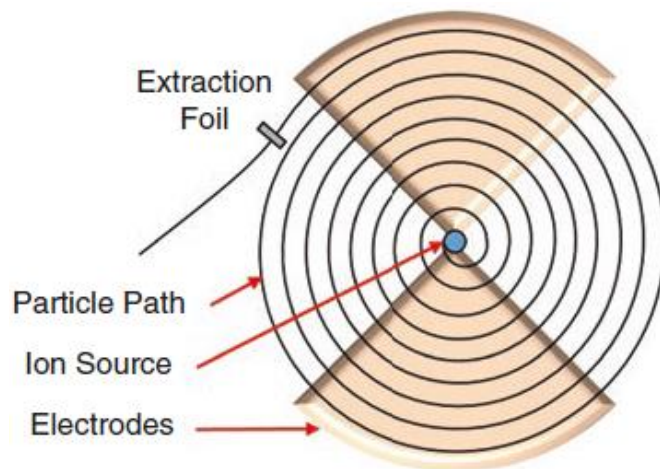


Figura 6: rappresentazione della struttura di un ciclotrone.

L'energia al punto di estrazione è di 16.5 MeV con un'intensità di corrente massima di 100 μ A. Il materiale bersaglio è contenuto in un contenitore in niobio di capacità di 2.5 ml, e la cavità interna è rivestita da una sottile lamina di Havar, una lega a base di cobalto che risulta essere resistente alle elevate pressioni, alle alte temperature ed inerte dal punto di vista chimico e fisico. Le caratteristiche fisiche dei due ciclotroni utilizzati in IteI telecomunicazioni sono riassunte nella **Tabella 5**.

Tabella 5: caratteristiche fisiche del ciclotrone PETtrace860.

Energia del protone al punto di estrazione	16.5 MeV
Intensità di corrente massima del fascio dei protoni	100 μ A
RF Frequenza per protoni	27.2 MHz
Campo magnetico medio (al punto di estrazione)	1.8 Tesla
<i>Typical Performance at End of Beam</i> (EOB): attività pronta per il trasferimento alle celle di sintesi dopo la fine del bombardamento per il modello PETtrace 860 e Nb 25 target.	Single beam (un solo target) 60 min tempo di irradiazione 60 μA corrente di fascio 3800 mCi / 141 GBq attività ottenuta Single beam (un solo target) 120 min tempo di irradiazione 60 μA corrente di fascio 6400 mCi / 236,8 GBq attività ottenuta

	Dual beam (due target contemporaneamente)
	60 min tempo di irradiazione
	100 μ A corrente di fascio
	6300 mCi/ 233,10 GBq attività ottenuta
	Dual beam (due target contemporaneamente)
	120 min tempo di irradiazione
	100 μ A corrente di fascio
	10630 mCi (393 GBq) attività ottenuta

Come descritto in **Tabella 5**, la resa di attività del radionuclide prodotto dipende da vari fattori come il tempo di bombardamento (60 o 120 minuti) e la tipologia. A tal proposito il bombardamento del materiale bersaglio può avvenire su un singolo target (*single beam*), oppure quando sono necessarie alte rese viene eseguito un doppio bombardamento su due target contemporaneamente (*dual beam*), ottenendo così una maggior attività.

Una volta ultimata la fase di bombardamento, la soluzione acquosa del radionuclide ^{18}F formatosi è veicolata, attraverso linee di trasferimento schermate, direttamente dal target del ciclotrone ai moduli di sintesi.

3.1.2 Sintesi del radiofarmaco [^{18}F]FDG

La soluzione acquosa di fluoruro-18 proveniente dal ciclotrone viene trasferita al modulo di sintesi tramite tubi capillari dedicati mediante un flusso di gas elio (He) ad alta purezza.

Il processo di fabbricazione del [^{18}F]FDG si basa su una reazione di sostituzione nucleofila bimolecolare $\text{S}_{\text{N}}2$ in cui lo ione fluoruro $^{18}\text{F}^-$ sostituisce, sul carbonio in posizione 2 il gruppo trifluorometano solfonato di una molecola di mannosio opportunamente protetto da gruppi acetili ($-\text{COCH}_3$).

Questo processo di sintesi è suddiviso in vari passaggi come descritti di seguito.

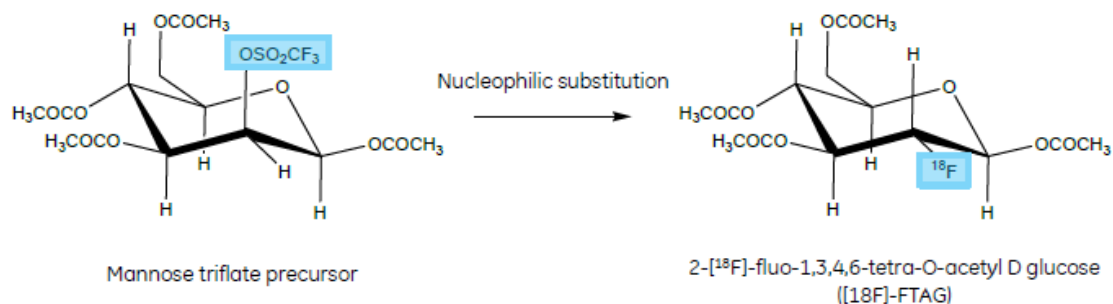
Sintesi del [^{18}F]FTAG

La soluzione trasferita dal ciclotrone passa attraverso una cartuccia di separazione a scambio anionico (QMA). Gli anioni di $^{18}\text{F}^-$ sono trattenuti da questa cartuccia, mentre l'acqua arricchita H_2^{18}O e altre impurezze passano attraverso e sono collegate ad un vial di scarto. Il $^{18}\text{F}^-$ viene poi eluito dalla cartuccia in un piccolo reattore mediante una soluzione eluente, contenente una miscela di carbonato di potassio e Kryptofix K222 in acqua e acetonitrile (20/80). Nel reattore la miscela viene evaporata mediante riscaldamento, aggiungendo una piccola quantità di

acetonitrile, sotto un flusso di gas inerte (azoto) a pressione ridotta. Successivamente, viene aggiunta una soluzione di mannosio triflato in acetonitrile; ad una temperatura di circa 125° C (per il modulo di sintesi *FASTlab*) o 85 °C (per il modulo *TRASISAllinone*) avviene una reazione di sostituzione nucleofila, in cui il gruppo trifluorometano solfonato del precursore viene spiazzato dal $^{18}\text{F}^-$, ottenendo 2- ^{18}F -Fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetile-D-glucosio (^{18}F FTAG), con conseguente inversione di conformazione sul C2 (**Schema 6**).

La reazione di marcatura è un passaggio fondamentale nella sintesi del ^{18}F FDG. Per rendere $^{18}\text{F}^-$ solubile nell'acetonitrile, è necessario che abbia un controione organico; questo ruolo è svolto dall'amminopolietere (KryptofixTM, K222) che contribuisce ad aumentare la nucleofilicità del fluoro, “ingabbiando” il catione potassio, separando così la coppia ionica forte formata da fluoro e potassio.

La miscela ottenuta viene diluita con acqua e tramite una siringa vengono effettuati numerosi lavaggi all'interno del reattore. In seguito, la soluzione finale viene trasferita su una cartuccia a fase inversa (tC18), che trattiene il ^{18}F FTAG, mentre i materiali non reagiti, solventi e amminopolietere, vengono lavati attraverso la cartuccia verso un contenitore esterno di rifiuti; in questo modo si effettua una prima purificazione del prodotto intermedio. La cartuccia contenente il ^{18}F FTAG intrappolato subisce ulteriori lavaggi con acqua.

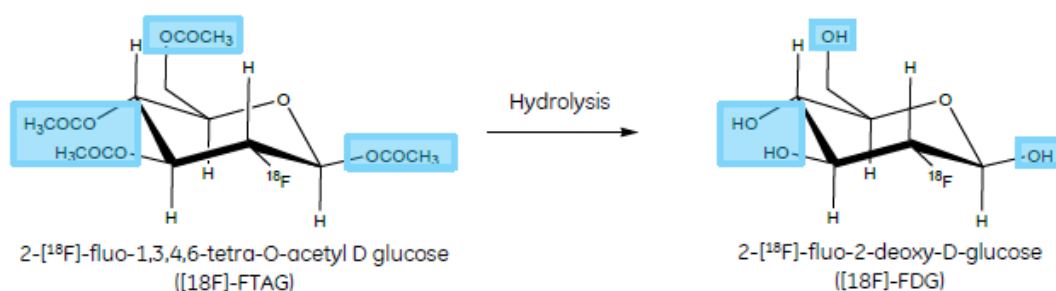


Schema 6: sintesi del [^{18}F]FTAG (SN2).

Rimozione dei gruppi protettivi acetili tramite idrolisi alcalina

L'ultima fase della sintesi del [^{18}F]FDG consiste nella rimozione dei quattro gruppi protettivi acetili dal [^{18}F]FTAG intermedio trattenuto sulla cartuccia. Questo avviene mediante idrolisi con idrossido di sodio (NaOH) a temperatura ambiente.

Dopo l'idrolisi, viene regolato il pH della soluzione alcalina [^{18}F]FDG, aggiungendo tampone citrato e acido cloridrico 2M (**Schema 7**).



Schema 7: reazione di idrolisi del [^{18}F]FTAG in [^{18}F]FDG tramite rimozione dei gruppi protettivi acetili.

Purificazione e diluizione

La soluzione finale di [^{18}F]FDG viene purificata facendo passare la soluzione neutralizzata attraverso una seconda cartuccia tC18, che trattiene i composti parzialmente idrolizzati e le impurità non polari. Infine, la soluzione passa attraverso una cartuccia di Alumina N che rimuove e trattiene le ultime tracce di ioni $^{18}\text{F}^-$ non reagiti. In **Tabella 6** vengono riportati i composti chimici coinvolti nella produzione del [^{18}F]FDG.

Tabella 6: composti molecolari coinvolti nella sintesi del [^{18}F]FDG.

Nome chimico	Nome abbreviato	Struttura molecolare
1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethanesulfonyl- β -D-mannopyranose	Mannosio trifluorometano	
1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-[^{18}F]fluoro-2-desossi-D-glucosio	FTAG	
Amminopolietere, Kryptofix TM	K-222	

Il processo di sintesi del [^{18}F]FDG avviene tramite dei moduli automatizzati, dotati di cassette monouso che includono al loro interno tutti i reagenti ed i materiali necessari nei vari step di sintesi (sopra descritti) dalla fase di ricezione dell'attività dal ciclotrone fino al trasferimento del prodotto finale. I due moduli di sintesi che possono essere utilizzati per la sintesi del radiofarmaco [^{18}F]FDG sono il modulo di sintesi *FASTlab* e il modulo *TRAVIS Allinone* (**Figura 7**).



Figura 7: modulo di sintesi *FASTlab* (a) e modulo di sintesi *TRAVISAllinone* (b).

Il modulo *FASTlab* utilizza le cassette monouso *FDG Citrate cassette* che comprendono un collettore con un rubinetto a 25 valvole, un recipiente di reazione, due siringhe da 6 ml, una siringa da 1 ml, connessioni in entrata ed uscita, connessioni per il collegamento con le fiale dei reagenti e varie cartucce di purificazione. Le posizioni dei vari componenti sono indicate nella **Figura 8** e nella **Figura 9**.

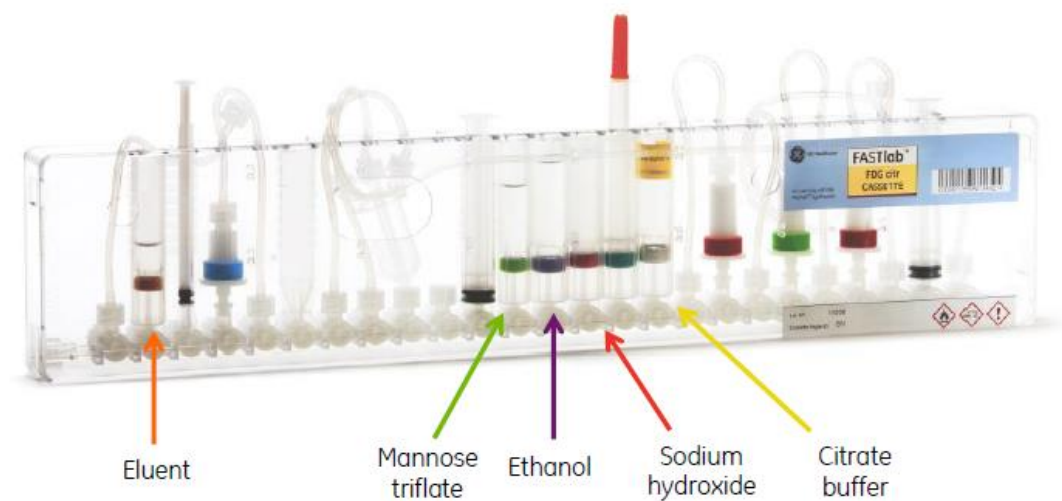


Figura 8: posizione dei reagenti sulla cassetta monouso *FDG citrate cassette*.

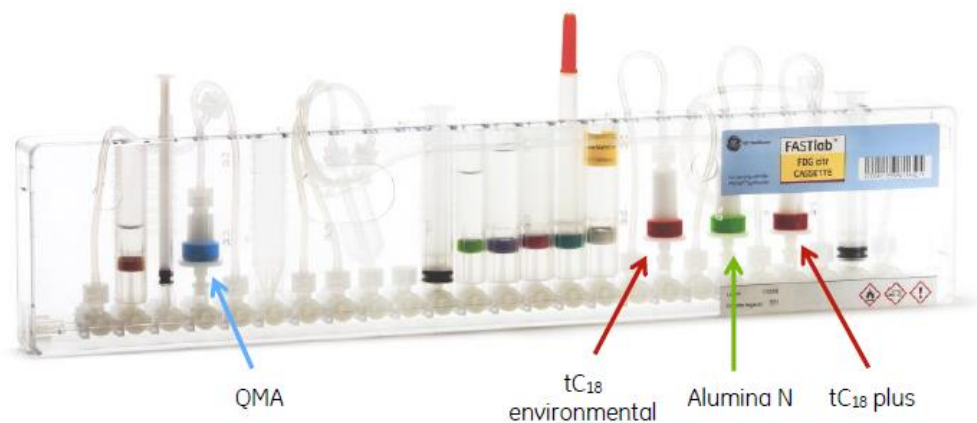


Figura 9: posizione delle varie cartucce sulla cassetta monouso *FDG citrate cassette*.

Il modulo *TRASISAllinone* utilizza le cassette *FDG Dual Cassette* che sono dotate di 3 collettori con 6 valvole a 3 vie, 1 reattore da 6 ml, due siringhe, e anche qui

connessioni per fluidi in entrata ed in uscita, connessioni per il collegamento con le fiale dei reagenti e varie cartucce di purificazione (**Figura 10**).

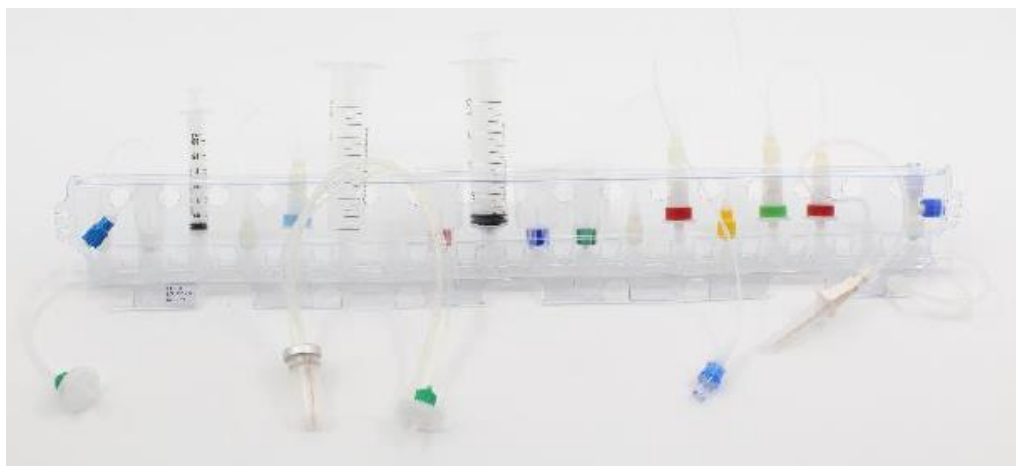


Figura 10: posizione delle varie cartucce sulla cassetta *FDG Dual cassette* usato nel modulo *TRASIS All in one*.

In **Tabella 7** sono riassunti i vari reagenti con le relative quantità, presenti nelle due diverse tipologie di cassette utilizzati per la sintesi del [^{18}F]FDG.

Tabella 7: reagenti presenti nelle cassette *FDG Citrate Cassette (modulo FASTlab)* e *FDG Dual Cassette (modulo TRASISAllinone)*.

<i>FDG Citrate Cassette (modulo FASTlab)</i>		<i>FDG Dual Cassette (modulo TRASISAllinone)</i>	
Reagente	Quantità	Reagente	Quantità
Mix di eluente contenente: Kryptofix®222, carbonato di potassio, acetonitrile, acqua	850 µl	QMA eluente	100 mg Kryptofix®222, 20 mg di carbonato di potassio in 80% di acetonitrile e 20% di acqua (2 ml di volume totale)
Mannosio Triflato in MeCN	2 ml	Mannosio Triflato	60 mg
Etanolo	4 ml	Acetonitrile	40 ml
Idrossido di sodio	4.2 ml	Idrossido di sodio	3.1 ml
Citrato buffer	4.3 ml	Citrato buffer	30 ml

3.1.3 Formulazione e dispensazione

Il radiofarmaco [^{18}F]FDG non viene isolato durante il processo di produzione. Viene sintetizzato da un modulo di sintesi automatizzato, purificato e formulato in un prodotto farmaceutico finito come soluzione sterile iniettabile, durante un processo continuo.

Le fasi di formulazione e dispensazione del prodotto finito sono state eseguite mediante l'utilizzo di un isolatore schermato, al cui interno sono già installati i seguenti equipment:

- bilancia analitica ad alta risoluzione;
- calibratore di dose utilizzato per la misurazione della radioattività del flacone bulk e dei singoli flaconi una volta dispensati;
- robot per apertura/chiusura e crimpatura vial costituito da componenti meccanici e pneumatici che permettono l'apertura, la chiusura e la crimpatura dei flaconi; il sistema di dispensazione è regolato da un software di controllo;
- sistema di monitoraggio particellare in continuo costituito da:
 - ✓ contaparticelle: strumento elettronico per la misura in tempo reale della contaminazione particellare,
 - ✓ sonda isocinetica: la sonda viene applicata per garantire perfetta linearità della colonna d'aria che si inserisce nella camera ottica del contaparticelle;
- pompa peristaltica che permette la movimentazione dei fluidi attraverso i capillari ed i tubi predisposti per la formulazione e dispensazione del prodotto. I fluidi entrano in contatto solo con l'interno del capillare, eliminando quindi la possibilità che il corpo della pompa contaminino il fluido o che il fluido contaminino la pompa.

Il funzionamento della pompa peristaltica è controllato mediante l'utilizzo di un software e si basa sul principio del trasporto meccanico positivo. Tutta la strumentazione menzionata è stata opportunamente convalidata in precedenza ed è attualmente in uso presso l'officina.

Ricezione della soluzione prodotta nell'isolatore di dispensazione

Una volta terminata la sintesi, il prodotto purificato ottenuto (Soluzione Madre $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) viene trasferito automaticamente nell'isolatore dispensatore di classe A,³² attraverso un capillare sterile e monouso mediante un flusso di azoto e successivamente la soluzione madre viene raccolta in una fiala intermedia sterile da 25 ml.

Durante questa fase viene eseguita una prima filtrazione, in cui viene usato un filtro sterile da 0.22 μm , posizionato tra il modulo di sintesi e la fiala intermedia della soluzione madre da 25 ml. Il flacone è un flaconcino sterile da 25 ml, sigillato e monouso che viene forato con un ago epidurale.

Trasferimento della soluzione di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in una vial da 125 ml per la diluizione

Per la diluizione della soluzione madre di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ viene utilizzata una soluzione fisiologia di NaCl 0.9%. Il trasferimento della soluzione madre viene effettuato utilizzando una pompa peristaltica e provette sterili.

Una volta calcolato il volume di diluizione in base alla concentrazione desiderata, la soluzione madre di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ viene trasferita dalla fiala da 25 ml in una fiala sterile da 125 ml. Quest'ultima una volta posizionata sulla bilancia, viene diluita automaticamente tramite il software convalidato, sino a raggiungere la concentrazione di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ desiderata. Al termine della diluizione, la soluzione finale di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ viene successivamente miscelata utilizzando la pompa peristaltica.

Filtrazione terminale e distribuzione nelle vials da 15 ml

Il prodotto farmaceutico viene dispensato nelle fiale del prodotto finale con l'uso di un sistema di dispensazione semiautomatico (stazione di riempimento, tappatura e sigillatura). Utilizzando questo sistema è possibile riempire le fiale del controllo qualità, i campioni conservati e le fiale da destinare al paziente in condizioni sterili. L'attività viene controllata con un calibratore di dose installato all'interno della cella calda. Per il riempimento della fiala, il tubo sterile della pompa è collegato con un filtro terminale (utilizzato per la filtrazione finale) sterile ed apirogeno, e un ago di Huber sterile, che viene fissato al sistema di dispensazione semiautomatico con l'ausilio di un supporto di fissaggio. Le fiale (fiala sterile da 15 ml) utilizzate per la dispensazione, etichettate precedentemente sotto una cappa a flusso laminare, vengono ispezionate per garantire che siano prive di particelle visibili, scheggiature e crepe e che l'etichettatura sia corretta.

Il sistema di dispensazione semiautomatico viene azionato per aprire la vial rimuovendo la capsula in alluminio e il tappo in gomma; il sistema di dispensazione semiautomatico successivamente posiziona l'ago di Huber sopra la fiala aperta. A questo punto, tramite software, si procede al trasferimento del volume richiesto di soluzione del farmaco nella fiala sterile (da 0.5 a 10 ml $\pm$ 0.05 ml). Questo trasferimento viene effettuato tramite la pompa peristaltica.

Durante la dispensazione, le condizioni di grado A sono controllate mediante monitoraggio particellare e microbiologico. Inoltre, l'integrità dei filtri di filtrazione sterilizzante utilizzati per trasferire la soluzione madre [^{18}F]FDG verso l'isolatore

di dispensazione e di quello utilizzato per la filtrazione finale durante la distribuzione, viene determinata alla fine del processo di produzione mediante il metodo del punto di bolla (*bubble point test*).³² Il test di integrità del filtro è un criterio di rilascio del lotto e il risultato del test deve soddisfare le specifiche del fornitore (> 3.45 bar).

L'integrità del filtro utilizzato per la filtrazione sterilizzante finale viene testata immediatamente dopo la produzione.

3.2 Qualifiche dei Metodi Analitici

3.2.1 Protocollo di convalida del Metodo Radio-TLC per la verifica della Purezza Radiochimica – Test B

Strumenti, materiali e reagenti

Per le attività di convalida sono stati utilizzati i seguenti strumenti, materiali e reagenti:

Strumenti:

- TLC Scanner MiniGita;
- Micropipetta P1000;
- Micropipetta P20;
- Camera di sviluppo.

Materiali:

- Matracci tarati da 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- Tappi di polietilene per matracci;
- Lastrine TLC silica gel 60F254 200 mm × 50 mm

Reagenti:

- Acqua ultrapura;
- Acetonitrile.

Le soluzioni per la convalida sono state:

- *Fase mobile*: soluzione di acetonitrile e acqua in rapporto 95÷5 v/v
- *Test solution*: soluzione di [¹⁸F]FDG
- *Reference solution*: 30 mg di 1,2,3,4-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosio e 20 mg di glucosio vengono disciolti in 1 ml di H₂O.

Descrizione del metodo analitico

Sulla lastra di gel di silice TLC vengono applicati:

- 2 µL di *reference solution*;
- 2 µL di *test solution*.

La piastra viene sviluppata su un percorso di 8 cm e, dopo essiccazione all'aria, viene analizzata con un rilevatore di radioattività, precedentemente tarato con una sorgente di radiazione standard ¹³⁷Cs. La piastra, in seguito, viene immersa in una

soluzione di acido solforico in metanolo da 75 g/L ed essiccata a 150°C fino alla comparsa di macchie scure ottenute con la soluzione di riferimento.

Limiti di specifica

Il [^{18}F] in forma di [^{18}F]FDG + [^{18}F]FDM deve rappresentare almeno il 95% della radioattività totale dovuta al [^{18}F].

Il [^{18}F] in forma fluoruro [^{18}F] $^{-}$ e derivati acetilati del [^{18}F]FDG e del [^{18}F]FDM devono rappresentare al massimo il 5% della radioattività totale dovuta al [^{18}F] (come indicato in **Tabella 4**).

Condizioni operative per la cromatografia

- Strumento: TLC scanner con un rilevatore di radioattività
- Fase stazionaria: Lastrine TLC silica gel
- Fase mobile: acetonitrile/acqua 95÷5 v/v

All'interno di questo protocollo è stata eseguita:

- la valutazione della specificità del metodo analitico,
- la valutazione del Limite di rilevabilità (LOD).

3.2.2 Protocollo di convalida del Metodo TLC per la verifica della

Purezza Chimica – Test B

Strumenti, materiali e reagenti

Per le attività di convalida sono stati utilizzati i seguenti strumenti, materiali e reagenti:

Strumenti:

- Micropipetta P1000
- Micropipetta P200
- Micropipetta P10
- Bilancia analitica Mettler XS105DU

Materiali:

- Matracci tarati da 1 ml, 10 ml;
- Tappi di polietilene per matracci;
- Lastrine TLC silica gel

Reagenti:

- Acqua bidistillata
- Soluzione NaCl 0.9 %
- Iodio platinato
- Kryptofix 2.2.2.

Le soluzioni di riferimento usate nella convalida per la verifica della specificità del metodo sono:

- *Soluzione A*: una soluzione di [^{18}F]FDG è stata preparata e lasciata decadere fino a completo decadimento del prodotto radioattivo.
- *Soluzione B*: 11 mg di Kryptofix 2.2.2. sono stati sciolti e diluiti fino a 25 ml con NaCl 0.9%. 1 ml di tale soluzione è stato prelevato e portato fino a 10 ml con NaCl 0.9 %, considerando 10 ml il volume massimo iniettabile.
(Concentrazione di Kryptofix 2.2.2. nella miscela B: 220 µg/ml).
- *Soluzione C*: soluzione salina NaCl 0.9%.
- *Soluzione D*: 11 mg di Kryptofix 2.2.2. sono stati sciolti e diluiti fino a 25 ml con la *Soluzione A*. 1 ml di tale soluzione è stato prelevato e portato fino a 10 ml con la soluzione A, sempre considerando 10 ml il volume massimo iniettabile.
(Concentrazione di Kryptofix 2.2.2. nella miscela D: 220 µg/ml).
- *Soluzione E (soluzione test)*: 100 µl di soluzione di [^{18}F]FDG sono stati diluiti con 400 µl di acqua.

Le soluzioni di riferimento invece usate nella convalida per i limiti di rilevabilità sono:

- *Miscela 22 µg/ml*: sono stati prelevati 100 µl di *Soluzione D* e portati a volume di 1 ml di soluzione fisiologica.

- *Miscela 44 µg/ml*: sono stati prelevati 200 µl di *Soluzione D* e portati a volume di 1 ml di soluzione fisiologica.
- *Miscela 88 µg/ml*: sono stati prelevati 400 µl di *Soluzione D* e portati a volume di 1 ml di soluzione fisiologica.
- *Miscela 132 µg/ml*: sono stati prelevati 600 µl di *Soluzione D* e portati a volume di 1 ml di soluzione fisiologica.
- *Miscela 176 µg/ml*: sono stati prelevati 800 µl di *Soluzione D* e portati a volume di 1 ml di soluzione fisiologica.
- *Miscela 220 µg/ml*: questa miscela coincide con la *Soluzione D*

Descrizione del metodo analitico

Su una lastrina TLC vengono caricati:

- 2.5 µl di *soluzione test*
- 2.5 µl di *soluzione B*
- 2.5 µl di acqua bidistillata
- 2.5 µl di *soluzione test* + 2.5 µl di *soluzione B*

Limite di specifica

La parte centrale della macchia dovuta alla soluzione test deve essere non più intensa della macchia dovuta alla soluzione di riferimento B (0.22mg/ml) (come indicato in **Tabella 4**).

All'interno di questo protocollo è stata eseguita:

- la valutazione della specificità del metodo analitico,
- la valutazione della linearità,
- la valutazione del Limite di rilevabilità (LOD).

3.2.3 Protocollo di convalida del Radio-HPLC per la verifica della Purezza Chimica e Radiochimica

Strumenti, materiali e reagenti

Per le attività di convalida sono stati utilizzati i seguenti strumenti, materiali e reagenti:

Strumenti:

- HPLC ICS-6000
- Rilevatore radiometrico GABI
- Pre-colonna cromatografica PA10
- Colonna cromatografica PA10
- Micropipetta P1000
- Micropipetta P100
- Bilancia analitica Mettler XS105DU

Materiali:

- Matracci tarati da 2 ml, 10 ml, 20ml;
- Tappi di polietilene per matracci;

Reagenti:

- Acqua bidistillata
- Standard di 2-Fluoro-2-desossi-D-glucosio (FDG)
- Standard di 2-Fluoro-2-desossi-D-mannosio (FDM)
- Standard di 2-Cloro-2-desossi-D-glucosio (ClDG)

Le soluzioni madre di riferimento usate nella convalida del metodo sono state:

- *Soluzione SM1*: 1 mg di FDG standard è stato disciolto in acqua bidistillata e diluito fino ad un volume di 2 ml utilizzando lo stesso solvente;
(concentrazione della soluzione SM1: FDG: 500 µg/ml).
- *Soluzione SM2*: 1 mg di ClDG standard è stato disciolto in acqua bidistillata e diluito fino ad un volume di 2 ml utilizzando lo stesso solvente
(concentrazione della soluzione SM1: ClDG: 500 µg/ml).
- *Soluzione SM3*: 1 mg di FDM standard è stato disciolto in acqua bidistillata e diluito fino ad un volume di 20 ml utilizzando lo stesso solvente
(concentrazione della soluzione SM3: FDM: 50 µg/ml).
- *Soluzione SM4*: 1 mg di FDM standard è stato disciolto in acqua bidistillata e diluito fino ad un volume di 2 ml utilizzando lo stesso solvente
(concentrazione della soluzione SM4: FDM: 500 µg/ml).

Le soluzioni di riferimento usate nella convalida sono state:

- *Reference solution A*: 1 ml di SM1 è stato prelevato e diluito fino a 10 ml.
(concentrazione della soluzione A FDG: 50 µg/ml).

- *Reference solution B*: 1 ml di SM2 è stato prelevato e diluito fino a 10 ml. (concentrazione della soluzione B ClDG: 50 µg/ml).
- *Reference solution C*: in un matraccio da 1 ml sono stati inseriti 0.5 ml di soluzione SM3 e 0.5 di *Reference solution A* (concentrazione della soluzione C: FDM: 25 µg/ml ; FDG: 25 µg/ml)
- *Soluzione D (Prodotto Finito)*: una soluzione di [¹⁸F]FDG è stata preparata e lasciata decadere completamente.
- *Soluzione E*: 1 ml di SM4 è stato prelevato e diluito fino a 10 ml. (concentrazione della soluzione E FDM: 50 µg/ml).
- *Soluzione F*: 1 mg di glucosio è stato disciolto e diluito con acqua bidistillata fino ad un volume di 2 ml. Successivamente 1 ml di questa soluzione è stato prelevato e diluito fino a 10 ml. (concentrazione della soluzione F Glucosio: 50 µg/ml).
- *Soluzione G*: Soluzione fisiologica 0.9 % NaCl.
- *Soluzione H*: 0.1 ml di SM1 (FDG), 0.1 ml di SM2 (ClDG) e 0.1 ml di SM4 (FDM) sono stati prelevati e posti in un matraccio da 5 ml. Dopo portare a volume con la Soluzione D (concentrazione della soluzione H: FDG: 50 µg/ml; ClDG: 50 µg/ml; FDM: 50 µg/ml).

Purezza Chimica (Test A)

Il metodo per la determinazione della purezza chimica (Test A) del radiofarmaco è un test limite descritto nella Monografia del [¹⁸F]FDG in

Farmacopea Europea.³⁴ Questo controllo è importante per la determinazione del FDG e CIDG (impurità A) nel prodotto radiofarmaceutico finale attraverso l'utilizzo di un rilevatore elettrochimico.

Limiti di specifica

Il campione è conforme alle specifiche se:

- l'area dell'FDG nel cromatogramma ottenuto con la soluzione da analizzare non risulta superiore all'area del picco corrispondente nel cromatogramma ottenuto con la *Reference solution A* (limite di specifica per il contenuto di FDG: $\leq 50 \mu\text{g/mL}$);
- la presenza di CIDG nel cromatogramma ottenuto con la soluzione da analizzare non risulta superiore all'area del picco corrispondente nel cromatogramma ottenuto con la *Reference solution B* (limite di specifica per il contenuto di CIDG: $\leq 50 \mu\text{g/mL}$).

Purezza Radiochimica (Test A)

La purezza radiochimica (Test A) è determinata tramite cromatografia liquida, secondo quanto descritto nella Monografia del [¹⁸F]FDG in Farmacopea Europea.³⁴ Questo test è eseguito attraverso l'utilizzo di un rilevatore radiometrico. La quantità delle sostanze contenenti ¹⁸F viene calcolato automaticamente dal sistema HPLC, dalle aree dei picchi presenti nei radio-cromatogrammi ottenuti dal prodotto analizzato.

Limiti di specifica

Il contenuto di ^{18}F sotto forma di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FDM}$ non deve essere inferiore al 95% della radioattività totale dovuta al fluoro-18.

Il contenuto di $[^{18}\text{F}]\text{FDM}$ non deve essere superiore al 10% della radioattività totale dovuta a $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ e $[^{18}\text{F}]\text{FDM}$.

Condizioni operative per la cromatografia

Pre-colonna:

- Carbowack PA10 Dionex
- Lunghezza: 50 mm
- Diametro interno: 4 mm
- Diametro particelle: 10 μm
- Fase stazionaria: resina a scambio anionico fortemente basica

Colonna:

- Carbowack PA10 Dionex
- Lunghezza: 250 mm
- Diametro interno: 4 mm
- Diametro particelle: 10 μm
- Fase stazionaria: resina a scambio anionico fortemente basica

Fase mobile: NaOH 0.1 M

Flusso: 1 ml/min

Pressione colonna: ≤ 3000 psi

Volume di iniezione: 20 μ l

Temperatura colonna: 25 °C

All'interno di questo protocollo è stata eseguita:

- la valutazione della specificità del metodo analitico,
- la valutazione del Limite di rilevabilità (LOD),
- la valutazione del Limite di quantificazione (LOQ)

3.2.4 Protocollo di convalida del metodo analitico GC per la determinazione dei solventi residui

Strumenti, materiali e reagenti

Per le attività di convalida sono stati utilizzati i seguenti strumenti, materiali e reagenti:

Strumenti:

- GC Modello Clarus 580 con spazio di testa TURBO MATRIX 40
- Colonna capillare Restek Rtx-200 (1 μ m, 30 m $\times$ 320 μ m)
- Micropipetta P1000
- Micropipetta P200

Materiali:

- Matracci tarati da 10 ml, 25 ml;

- Tappi di polietilene per matracci;

Reagenti:

- Acqua bidistillata
- Soluzione standard di Etanolo
- Soluzione standard di Acetonitrile
- Soluzione standard di Alcol Isopropilico.

Le soluzioni madre di riferimento usate nella convalida del metodo sono:

- *Soluzione madre di etanolo (SM1)*: 500 µl di etanolo standard è stato prelevato e posto in un matraccio da 25 ml e portato a volume con acqua bidistillata.
- *Soluzione madre di isopropanolo (SM2)*: 500 µl di isopropanolo standard è stato prelevato e posto in un matraccio da 25 ml e portato a volume con acqua bidistillata.
- *Soluzione madre di acetonitrile (SM3)*: 500 µl di acetonitrile standard è stato prelevato e posto in un matraccio da 25 ml e portato a volume con acqua bidistillata.
- *Soluzione M4*: 3150 µl di SM1 (etanolo), 3150 µl di SM2 (isopropanolo) e 260 µl di SM3 (acetonitrile) sono stati prelevati e posti in un matraccio da 10 ml e portati a volume con acqua bidistillata. Concentrazione della soluzione M4: acetonitrile (408.72 µg/ml), etanolo (4970.7 µg/ml), isopropanolo (4951.8 µg/ml).

Le soluzioni di riferimento usate nella convalida per la verifica della specificità del metodo sono:

- *Miscela A*: è stata preparata una soluzione di [^{18}F]FDG 1 GBq/ml ed è stata lasciar decadere.
- *Soluzione di etanolo SM1a*: 40 μl di etanolo standard sono state prelevate e poste in un matraccio da 2 ml e portati a volume con la Miscela A.
- *Soluzione di isopropanolo SM2a*: 40 μl di isopropanolo standard sono state prelevate e poste in un matraccio da 2 ml e portati a volume con la Miscela A.
- *Soluzione di acetonitrile SM3a*: 40 μl di acetonitrile standard sono state prelevate e poste in un matraccio da 2 ml e portati a volume con la Miscela A.
- *Soluzione S1*: 315 μl di SM1a (etanolo), 315 μl di SM2a (isopropanolo) e 26 μl di SM3a (acetonitrile) sono stati prelevati e posti in un matraccio da 1 ml e portati a volume con Miscela A. Concentrazione della soluzione S1: acetonitrile (408.72 $\mu\text{g/ml}$), etanolo (4970.7 $\mu\text{g/ml}$), isopropanolo (4951.8 $\mu\text{g/ml}$).

Descrizione del metodo analitico

I tre potenziali solventi residui (acetonitrile, etanolo e isopropanolo) vengono testati contemporaneamente, utilizzando il metodo della gascromatografia. La miscela M4

viene iniettata in modo da determinare la risoluzione tra i picchi di etanolo e isopropanolo, che non deve essere superiore a 1.5. Il campione del farmaco viene iniettato per determinare il contenuto di ciascun analita nel campione del prodotto, sulla base delle aree dei picchi.

Limiti di specifica

La concentrazione di etanolo e isopropanolo nel campione di prodotto di [^{18}F]FDG non deve superare 5.0 mg/mL; il contenuto di acetonitrile, invece, non deve superare 0.410 mg/mL.

Condizioni operative per la cromatografia

GC Perkin Elmer Clarus 580HS Turbomatrix 40

- Flusso gas carrier (Elio): 1.5 ml/min
- Flusso aria sintetica: 300 ml/min
- Flusso Idrogeno: 30 ml/min
- Temperatura iniziale (per 7 min, da 0 a 7 min): 60°C
- Rampa di temperatura (da 7 a 10.6 min): +50°C/min
- Temperatura finale (per 1 minuto da 10.6 a 11.6 min): 240°C
- Temperatura iniettore: 280°C
- Temperatura detector: 250°C
- Durata della corsa cromatografica: 12 minuti
- Colonna cromatografica: Col. capillare Restek RTX-200

Metodo HS

- Temperature:
 - Thermo: 80 °C
 - Needle: 100 °C
 - Transfer: 120 °C
- Timing:
 - Thermo: 10 min
 - Pressurize: 1.5 min
 - Injection: 0.03 min
 - Withdrawal: 0.2 min
 - GC cycle: 7.0 min
- Option:
 - Vial vent (on)
 - High press injection (on)
- Ppc:
 - Column: 17 psi
 - Injection: 24 psi
- Campione:
 - 3 µl della soluzione da analizzare in vial da
 - 22 ml tappato e ghierato per HS

All'interno di questo protocollo è stata eseguita:

- la valutazione della specificità del metodo analitico,
- la valutazione del Limite di rilevabilità (LOD),

3.2.5 Protocollo di convalida del Bioburden in soluzioni bulk di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana

Per i prodotti sterili ottenuti mediante lavorazione in asepsi, il controllo della carica microbiologica appena prima dello step di filtrazione sterilizzante è un elemento cruciale dell'intera strategia di assicurazione della sterilità del prodotto finito. Infatti, valori di bioburden elevati in arrivo sul filtro sterilizzante potrebbero compromettere l'affidabilità dello step di filtrazione ed in generale influenzare negativamente la qualità del prodotto finito. In accordo a quanto previsto dalle linee guida regolatorie EMA,³⁸ EU GMP-Annex 1,³² il limite di bioburden pre-filtrazione è stato stabilito pari a 10 CFU/ml.

Strumenti e materiali

- Incubatore KW 32.5 ± 2.5° C
- Incubatore KW 22.5 ± 2.5° C
- Cappa a flusso laminare Steril VBH
- Micropipetta 10 - 100 µl
- Micropipetta 100 - 1000 µl
- Frigorifero + 4°C
- Stazione di sperlatura
- Pompa per filtrazione su membrana Milliflex
- Imbuti filtranti Milliflex - 100 ml
- Provette sterili da 15mL

Terreni di coltura e reagenti

- Piastre da conta contenenti il terreno Tryptic Soy agar (TSA)
- Piastre da conta contenenti il terreno Sabouraud Dextrose agar (SDA)
- Piastre Milliflex contenenti TSA
- Piastre Milliflex contenenti SDA
- Flaconi contenenti acqua peptonata (Fluid A)
- Flaconi contenenti NaCl Peptone Buffer pH 7.0

Microrganismi test

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus epidermidis* (isolato endogeno)
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*

Descrizione del metodo analitico

La pompa Milliflex plus è predisposta sotto cappa a flusso laminare. La membrana dell'imbuto viene prebagnato con 50 ml di soluzione sterile fluid A.

Per il radiofarmaco [^{18}F]FDG l'analisi viene condotta su 2 ml di soluzione bulk diluita 1:10 con NaCl Peptone Buffer pH 7 (1 ml di soluzione bulk + 9 NaCl

Peptone Buffer pH 7 su TSA e 1 ml di soluzione bulk + 9 NaCl Peptone Buffer pH 7 su SDA). Successivamente, la soluzione diluita è filtrata.

Infine, la membrana filtrante viene trasferita all'interno della piastra TSA e della piastra SDA. Le piastre TSA vengono incubate a 32.5 ± 2.5 °C per 5 giorni, mentre le piastre SDA vengono incubate a 22.5 ± 2.5 °C per 5 giorni.

Limite di specifica

Dopo il periodo di incubazione, ciascuna piastra del campione bulk analizzato deve mostrare un numero di CFU ≤ 10 .

Metodo di verifica

Durante le prove di convalida è stato verificato (per tre differenti lotti di produzione) che la soluzione *bulk* (soluzione precedente al processo di filtrazione terminale) non abbia avuto nessuna azione batteriostatica e/o fungistatica sui microrganismi test, quando analizzata con il metodo analitico proposto.

Un'aliquota da 2 ml di soluzione bulk di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml è stata diluita 1:10 e, previo inoculo con i microrganismi ATCC prescritti dalla Farmacopea Europea (paragrafo 2.6.12)^{Errore. Il segnalibro non è definito.} e con lo *S. epidermidis* (ceppo isolato ambientale ITELPHARMA), è stata filtrata mediante dispositivi sterili monouso con membrane filtranti di porosità $\leq 0.45\mu\text{m}$ (imbuti milliflex); le membrane sono state poi lavate con acqua peptonata.

I dispositivi filtranti sono stati messi a contatto con due terreni di coltura (Tryptic Soy Agar o TSA, e Sabouraud Dextrose Agar o SDA, a seconda del microrganismo testato) ed incubati. Sono stati previsti, assieme ai test di batteriostasi e fungistasi della soluzione bulk del prodotto, anche controlli positivi (microrganismi ATCC filtrati in assenza di prodotto) e negativi (filtrazione del solo diluente; filtrazione del diluente con il prodotto bulk filtrato e filtrazione del diluente con il prodotto non filtrato).

All'interno di questo protocollo sono state eseguite le seguenti attività:

- Preparazione e verifica delle sospensioni microbiche “sospensione test”
- Preparazione dei campioni per le attività di convalida.

3.2.5.1 Preparazione e verifica delle sospensioni microbiche “sospensione test”

Per ogni microorganismo è stata preparata una sospensione microbica (*sospensione test*), da utilizzare per le attività di convalida, avente una concentrazione di 10-100 CFU/100 µl, partendo da una coltura cellulare o pellet pronto all'uso. Successivamente è stata eseguita, sotto cappa a flusso laminare, il controllo del titolo dell'inoculo (IT) nel seguente modo:

- è stato piastrato in duplicato su piastra da conta TSA (per batteri) o SDA (per funghi e lieviti) 50 µl della sospensione microbica da verificare;

- successivamente le piastre di TSA sono state incubate a 30-35°C per non più di 3 giorni (per i batteri), mentre le piastre di SDA sono state incubate a 20-25°C per non più di 5 giorni (funghi e lieviti).

Dopo il periodo di incubazione, è stata eseguita la conta numerica su ciascuna delle piastre inoculate e su ciascun valore è stato ottenuto un valore medio conforme al criterio d'accettazione <100 CFU/100 µl. Nella **Tabella 8** sono riportati i valori ottenuti per ciascuna sospensione microbica:

Tabella 8: risultati della verifica delle sospensioni microbiche.

Microrganismo	Valore medio (CFU/100 µl)
<i>Staphylococcus aureus</i>	42
<i>Bacillus subtilis</i>	59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
<i>Candida albicans</i>	62
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	68
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88

3.2.5.2 Preparazione dei campioni per le attività di convalida

Durante l'esecuzione del protocollo di convalida sono stati preparati i seguenti controlli:

- **Controllo Positivo del Prodotto:** ogni sospensione microbica è stata filtrata su membrana in presenza della soluzione bulk di ciascuno dei tre lotti di prodotto, per poi essere incubata sui terreni di coltura TSA o SDA a seconda del microrganismo.
- **Controllo Positivo senza prodotto:** ogni sospensione microbica è stata filtrata su membrana senza la soluzione bulk di prodotto, per poi essere incubata sui terreni di coltura TSA o SDA a seconda del microrganismo.
- **Controllo Negativo senza Prodotto:** consiste nella verifica della sterilità di terreni e materiali e della corretta manualità durante l'esecuzione delle prove. Il diluente utilizzato viene filtrato su membrana ed incubato su entrambi i terreni di coltura (SDA o TSA).
- **Controllo Negativo con Prodotto Filtrato:** consiste nella verifica della sterilità dell'efficacia della filtrazione del prodotto finale a 0.22 µm. Tale controllo prevede pertanto la filtrazione su membrana ed incubazione su entrambi i terreni di coltura (SDA o TSA).
- **Controllo Negativo con Prodotto Non Filtrato:** il prodotto bulk non filtrato a 0.22 µm è stato filtrato su membrana ed incubato sui due terreni di coltura.

I tempi e le temperature di incubazione dei campioni sopra elencati sono riassunti nella **Tabella 9**.

Tabella 9: tempi e temperature delle piastre da incubare con le membrane filtranti.

Terreno di coltura	Temperatura di incubazione	Tempi di incubazione	
		Controlli positivi	Controlli Negativi
Piastre SDA	20-25°C	≤ 5 giorni per funghi e lieviti	5 giorni
Piastre TSA	30-35°C	≤ 3 giorni per batteri ≤ 5 giorni per funghi e lieviti	5 giorni

3.2.6 Protocollo di convalida della Sterilità in soluzioni iniettabili di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana

Il prodotto da testare è una soluzione iniettabile e come tale deve risultare sterile. A tal proposito si è resa necessaria la convalida del metodo analitico responsabile del test di sterilità del prodotto finito.

Strumenti e materiali

- Incubatore KW $32.5 \pm 2.5^\circ \text{C}$
- Incubatore KW $22.5 \pm 2.5^\circ \text{C}$

- Cappa a flusso laminare Steril VBH
- Micropipetta 10 - 100 µl
- Micropipetta 100 - 1000 µl
- Frigorifero KW + 4°C
- Isolator ST-IS2
- Symbio pump
- Campionatore dinamico MAS-100NT
- Contaparticelle Climet CI-753
- Dispositivi filtranti Steritest EZ

Terreni di coltura e reagenti

- Flacons contenenti il terreno colturale Fluid Thioglycolate Medium (FTM)
- Flacons contenenti il terreno colturale Tryptic Soy Broth (TSB)
- Flacons contenenti acqua peptonata (Fluid A)
- Piastre da conta contenenti il terreno Tryptic Soy Agar (TSA)
- Piastre da conta contenenti il terreno Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- Piastre contenenti il terreno TSA con neutralizzanti per campionamento passivo
- Piastre contenenti il terreno TSA con neutralizzanti per campionamento superfici
- Acqua per preparazioni iniettabili (PPI)

Microrganismi test

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Clostridium sporogenes*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*

Descrizione del metodo analitico

Il test di sterilità sul prodotto finito viene eseguito mediante filtrazione su membrana di porosità 0.45 µm utilizzando i dispositivi Steritest; la filtrazione è eseguita utilizzando la pompa Steritest Symbio ISL Pump installata all'interno di un isolatore di classe A GMP, dopo aver sottoposto il materiale ad un ciclo di biodecontaminazione terminato con esito conforme; il ciclo di biodecontaminazione deve essere eseguito utilizzando i vaporizzatori in dotazione all'isolatore. Inizialmente il Fluid A viene utilizzato per procedere con la pre-bagnatura della membrana filtrante. Successivamente, il prodotto da analizzare viene trasferito tramite la pompa in due canister, con una velocità tale da garantire un'equipartizione del prodotto. Dopo aver fatto passare il prodotto tramite le membrane filtranti dei due canister, vengono trasferiti su un

canister il TSB e nell'altro FTM. Infine, i due canister sono incubati nel seguente modo:

- i canister riempiti con FTM vengono incubati per 14 giorni ad una temperatura di 32.5 ± 2.5 °C;
- i canister riempiti con TSB vengono incubati per 14 giorni ad una temperatura di 22.5 ± 2.5 °C.

Limite di specifica

Il prodotto soddisfa i requisiti del saggio (prodotto sterile) se non è rilevata presenza di crescita microbica dopo il periodo di incubazione.

Metodo di verifica

L'analisi di batteriostasi e fungistasi è stata condotta su tre differenti lotti di prodotto finito, prodotti presso l'officina radiofarmaceutica di ITEL Telecomunicazioni S.r.l.

Per l'esecuzione del test è stata utilizzata la pompa Steritest Symbio, posizionata all'interno di un sistema isolatore biodecontaminato con H₂O₂ tramite un vaporizzatore.

La soluzione di Fluodesossiglucosio (¹⁸F) 1 GBq/ml è stata filtrata mediante dispositivi chiusi, sterili, monouso, costituiti da due unità filtranti definite "canister", aventi membrane con pori di diametro $\leq 0.45\mu\text{m}$. Successivamente, le membrane filtranti sono state poi lavate con acqua peptonata, previamente

inoculata con una quantità nota (≤ 100 CFU) di sospensione microbica (“sospensione test”), preparata per ciascun microrganismo utilizzato nella convalida. Infine, le due unità filtranti sono state riempite con appropriato terreno di coltura (TSB o FTM, a seconda del microrganismo testato) ed incubate.

Assieme ai test di batteriostasi e fungistasi del prodotto, sono stati eseguiti anche controlli positivi (microrganismi ATCC filtrati in assenza di prodotto), negativi (solo acqua per preparazioni iniettabili al posto del prodotto) e controlli sul prodotto (test di sterilità sul prodotto).

All’interno di questo protocollo sono state eseguite le seguenti attività:

- Preparazione e verifica delle sospensioni microbiche “sospensione test”
- Preparazione dei campioni per le attività di convalida.

3.2.6.1 Preparazione e verifica delle sospensioni microbiche “sospensione test”

Per ogni microorganismo è stata preparata una sospensione microbica (sospensione test) ed è stato eseguito il controllo del titolo, seguendo le indicazioni e i tempi di incubazione precedentemente descritti nel protocollo di “*Determinazione del Bioburden in soluzioni bulk di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana*”. Dopo il periodo di incubazione, è stata eseguita la conta numerica su ciascuna delle piastre inoculate e su ciascun valore è

stato ottenuto un valore medio conforme al criterio d'accettazione <100 CFU/100 µl. Nella **Tabella 10** sono riportati i valori ottenuti per ciascuna sospensione microbica.

Tabella 10: risultati della verifica delle sospensioni microbiche.

Microrganismo	Valore medio (CFU/100 µl)
<i>Staphylococcus aureus</i>	49
<i>Bacillus subtilis</i>	59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
<i>Clostridium sporogenes</i>	45
<i>Candida albicans</i>	52
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	70
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	92

3.2.6.2 Preparazione dei campioni per le attività di convalida

Durante l'esecuzione del protocollo di convalida sono stati preparati i seguenti controlli:

- **Controllo Positivo del Prodotto:** rappresenta il test vero e proprio, per verificare la fungistasi e/o batteriostasi del prodotto finito. Ogni sospensione microbica, previamente inoculata in un flacone di acqua peptonata, è stata filtrata su membrana filtrante in presenza di ciascuno dei tre lotti di prodotto finito, per poi essere incubata sui terreni di coltura TSB o FTM a seconda del microrganismo.

- **Controllo Positivo senza Prodotto:** permette di verificare nelle condizioni analitiche oggetto di convalida, la crescita di ciascun microrganismo in assenza di prodotto. Successivamente, ogni sospensione microbica, inoculata in un flacone di acqua peptonata, è stata filtrata su membrana ed incubata in uno dei terreni di coltura TSB o FTM a seconda del microrganismo.
- **Controllo Negativo:** consiste nella verifica della sterilità dei terreni, materiali e della corretta manualità durante l'esecuzione delle prove. Al posto del prodotto è stata usata un'identica quantità di acqua per preparazioni iniettabili, precedentemente sterilizzata. Il tutto è stato testato mediante filtrazione su membrana ed incubato nei due terreni liquidi di coltura TSB o FTM.
- **Controllo su Prodotto:** ogni lotto di prodotto finito è stato testato mediante filtrazione su membrana ed incubato nei terreni di coltura TSB o FTM.

I tempi e le temperature di incubazione dei campioni sopra elencati sono riassunti nella **Tabella 11**.

Tabella 11: tempi e temperature di incubazione dei terreni di coltura presenti nei cannister.

Terreno di coltura	Temperatura di incubazione	Tempi di incubazione		
		Controlli positivi con/senza prodotto	Controlli su prodotto	Controlli Negativi
TSB	20-25°C	≤ 5 giorni	14 giorni	14 giorni
FTM	30-35°C	≤ 5 giorni	14 giorni	14 giorni

3.2.7 Protocollo di convalida della determinazione delle Endotossine batteriche in soluzioni iniettabili di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo Cinetico-Cromogenico

La valutazione del contenuto di endotossine batteriche nel prodotto farmaceutico viene effettuata in conformità ai requisiti indicati nella Farmacopea Europea paragrafo 2.6.14 “*Bacterial endotoxins*”.³⁹

Per l'esecuzione di questo test si utilizza il metodo cinetico-cromogenico, test D della Farmacopea Europea paragrafo 2.6.14, utilizzando il sistema portatile Endosafe Portable Test System (PTS) della Charles River (**Figura 11**).



Figura 11: sistema portatile Endosafe Portable Test System (PTS) della Charles River.

Questo strumento è uno spettrofotometro che utilizza cartucce precaricate con tutti i reagenti necessari, in modo tale da verificare la presenza di endotossine in una soluzione campione.

La cartuccia utilizzata per il test contiene quattro canali separati con pozzetti in cui vengono aggiunte appropriate aliquote di campione da 25 μL . Ciascun canale contiene il reagente LAL (lisato di amebociti di Limulus) e il substrato cromogenico. Due dei canali (canale 2 e 4) contengono anche una quantità nota di endotossina per il controllo positivo del prodotto (**Figura 12**).

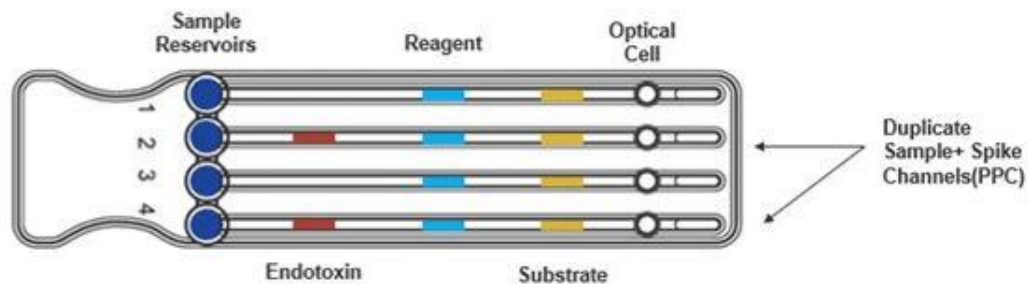


Figura 12: cartuccia per Endosafe Portable Test System (PTS) della Charles River.

L'interazione endotossina/reagente LAL cromogenico porta allo sviluppo di colore dopo circa 15 minuti d'incubazione a 37 ± 1 °C. Lo strumento misura il tempo di reazione (*Onset Time*) necessario per il raggiungimento di un determinato valore di assorbanza, direttamente correlata alla concentrazione endotossinica presente nel campione. La concentrazione endotossinica è quantificata mediante il confronto con una curva di calibrazione standard sviluppata dal fornitore Charles River.

Strumenti

- Lettore Endosafe Nexgen PTS;
- Vortex;
- Micropipette 100-1000 µl e 20-200 µl;
- pHmetro.

Materiali consumabili

- Cartucce Endosafe PTS precaricate con tutti i reagenti necessari al test (Charles River);
- Puntali per micropipette privi di endotossine;
- Provette per diluizioni 13 x 100 mm sterili e apirogene.

Reagenti

- *LAL Reagent Water (LRW)*: acqua a basso contenuto di endotossine batteriche; viene utilizzata per la ricostituzione del lisato, degli standard di endotossina e per la diluizione del prodotto finito.

La convalida è stata eseguita su tre lotti di prodotto finito di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.

Le due attività eseguite all'interno del protocollo sono state le seguenti:

- controllo negativo e convalida dell'operatore;
- determinazione dell'inibizione/attivazione del prodotto testato sul lisato.

3.2.7.1 Controllo negativo e convalida dell'operatore

Lo scopo del presente test è stato quello di verificare l'assenza di una concentrazione di endotossina (≤ 0.05 EU/ml) nel materiale utilizzato e nel LRW (LAL Reagent Water), soluzione utilizzata per la ricostituzione del lisato, degli standard di endotossina e per la diluizione del prodotto finito. A tal proposito, è

stato prelevato il LRW e sono stati caricati 25 µl in ciascuno dei 4 pozzetti della cartuccia del sistema Endosafe Nexgen PTS ed è stata avviata l'analisi.

3.2.7.2 Determinazione dell'inibizione/attivazione del prodotto testato sul lisato

La sensibilità del lisato presente nella cartuccia deve essere verificata in presenza e in assenza del prodotto in esame - come indicato in Farmacopea Europea - per verificare che il prodotto, nelle condizioni di test, non interferisca con il lisato generando risultati falsati.

Tale fase relativa alla convalida del metodo analitico prevede le seguenti attività che sono state eseguite:

- stabilire la “Massima diluizione valida” (MVD), alla quale può essere sottoposta la soluzione campione da testare;
- verificare che il pH delle soluzioni, da sottoporre ad analisi di endotossine, rientri nel range indicato in Farmacopea Europea (pH tra 6 e 8);
- verificare l'assenza di interferenza della soluzione “test” con il prodotto finale ad una determinata diluizione sulla reazione lisato /endotossina.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Qualifica dei Metodi Analitici

4.1.1 Protocollo di convalida del Metodo Radio-TLC per la verifica della Purezza Radiochimica – Test B

4.1.1.1 Valutazione della specificità del metodo analitico

Lo scopo di questo test è stato valutare la capacità del metodo analitico di misurare uno specifico analita in presenza di altri componenti.

Nell'analisi TLC la specificità si realizza quando la macchia dovuta alle sostanze di interesse è ben separata dalle macchie dovute ad altre sostanze presenti nella soluzione.

Come descritto nella Farmacopea Europea per il [^{18}F]FDG le sostanze potenzialmente interferenti sono il [$^{18}\text{F}^-$] e i derivati parzialmente acetilati. Non essendo disponibili soluzioni standard per queste sostanze, il test è stato eseguito sul farmaco finito ed è stata effettuata una valutazione dei picchi ottenuti. Inoltre, poiché i derivati parzialmente acetilati solitamente non sono stati trovati nel campione, è stata valutata la risoluzione tra gli spot generati da [$^{18}\text{F}^-$] e [^{18}F]FDG + [^{18}F]FDM.

La specificità del sistema è stata valutata mediante la determinazione della risoluzione dei picchi riscontrati nel corso dell'analisi.

È stato sottoposto ad analisi un campione di prodotto finito di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml. Utilizzando la **Formula 3** di seguito riportata, è stata calcolata la risoluzione tra le due macchie (¹⁸F⁻ vs [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM e [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM vs derivati parzialmente acetilati di [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM) riscontrate nel corso delle analisi:

$$R_s = \frac{1,18(R_b - R_a)}{W_a + W_b} \quad \text{Formula 3}$$

Dove:

Ra: distanza dello spot del ¹⁸F⁻ dal punto di deposito

Rb: distanza dello spot del [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM dal punto di deposito

Wa: larghezza del picco a metà altezza della sostanza a

Wb: larghezza del picco a metà altezza della sostanza b.

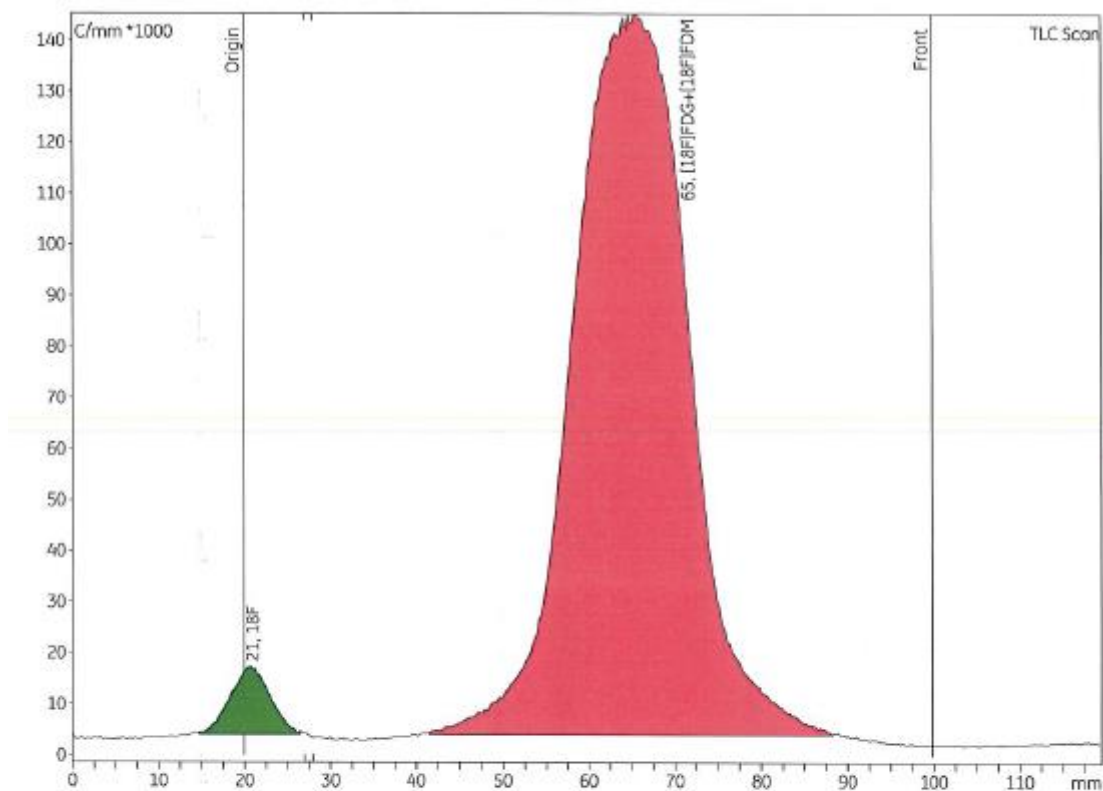
Il criterio di accettazione prevede che la risoluzione (Rs) tra le due macchie (¹⁸F⁻ vs [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM e [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM vs derivati parzialmente acetilati di [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM) sia > 1.5

In **Tabella 12** sono riassunti i risultati ottenuti che hanno dimostrato la specificità del test.

Tabella 12: risultati test specificità.

Peak	R	W
[¹⁸ F ⁻]	14.72	5.21
[¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM	41.41	14.66
Resolution (Rs)		
1.59		

In **Figura 13** è riportato il cromatogramma del campione di prodotto finito di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml in cui è stata dimostrata la presenza di due picchi ben visibili relativi al ¹⁸F⁻ e al [¹⁸F]FDG + [¹⁸F]FDM, senza mostrare alcuna sovrapposizione. I dati ottenuti hanno evidenziato la specificità del metodo analitico.



Sample description

Measurement: F092094A T0
 Method: FDG
 Instrument: miniGITA Single OFA
 Meas. time: 0:05:00 h:m:s
 Evaluated by: -
 Raw data: Integrity verified by GINA Star
 Evaluation: Not completed
 Approval: Not approved
 Ext. certificate: -
 Radio detector: MiniGita Serial Nr: 37153
 Software Version: 10.4, Build 6482

Integration TLC Scan

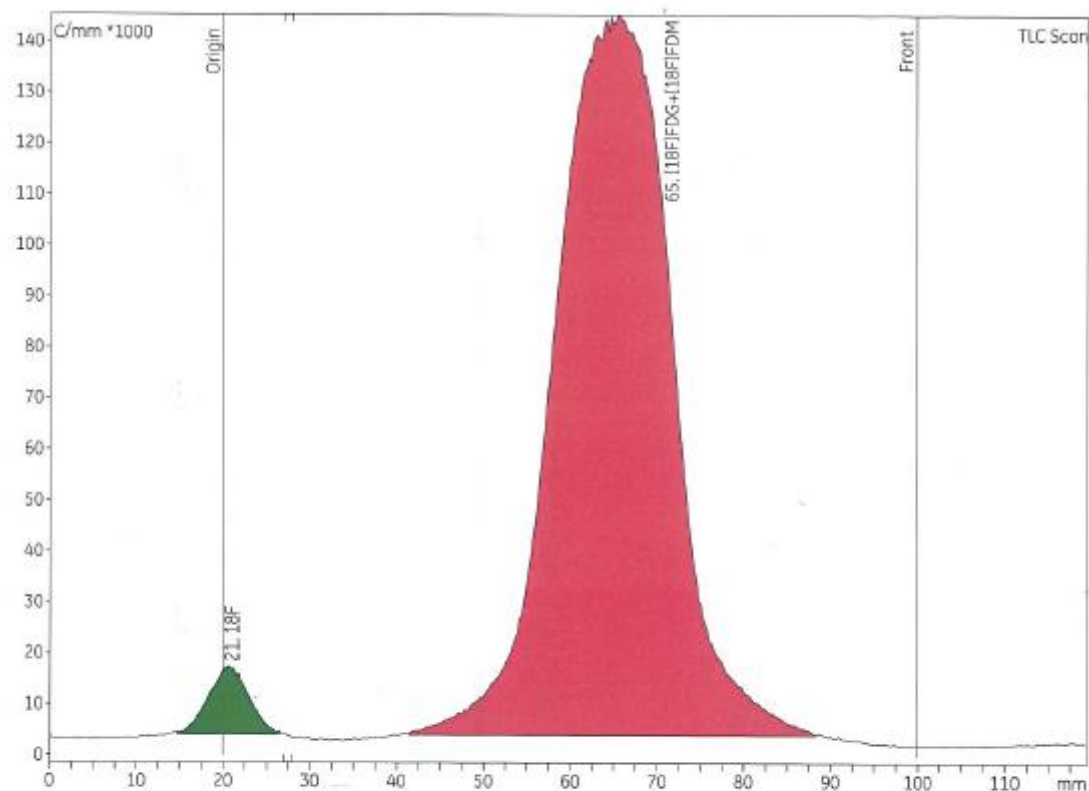
Substance	R/F	Area Counts	%Area %	R/T mm	Start test mm	Stop mm	Height C/m	S/N ratio	FWH mm
18F	0.009	71427	3.13	20.71	14.72	26.44	13134	15.4	5.21
[18F]FDG+[18F]FD	0.566	2207949	96.87	65.11	41.41	88.32	140193	107.2	14.66
Sum in ROI	-	2279376	100.00	-	-	-	-	-	-
Area (total) RF	-	2232131	-	-	-	-	-	-	-
BKG1 (CPS)	-	4015.0	-	-	-	-	-	-	-

Figura 13: report strumentale del cromatogramma del *test solution*.

4.1.1.2 Valutazione del Limite di Rilevabilità (Limit of Detection - LOD)

Il limite di rilevabilità (LOD) di una singola procedura analitica è la quantità minima di analita in un campione che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata come valore esatto.

Lo scopo del test è stato definire il LOD del metodo in esame, per soluzioni di [^{18}F]FDG, definito come la più bassa quantità di analita ([^{18}F]FDG e $^{18}\text{F}^-$) rilevabile in un campione di analisi. La miscela di [^{18}F]FDG è stata sottoposta ad analisi ripetute in un arco di tempo sufficientemente lungo, nello specifico al tempo di produzione (T_0) (**Figura 14**), ad un Tempo di calibrazione generico (T_c) (**Figura 15**), al tempo di scadenza (T_{exp}) (**Figura 16**) e ad 1 ora dopo il tempo di scadenza ($T_{\text{exp}+1}$) (**Figura 17**).



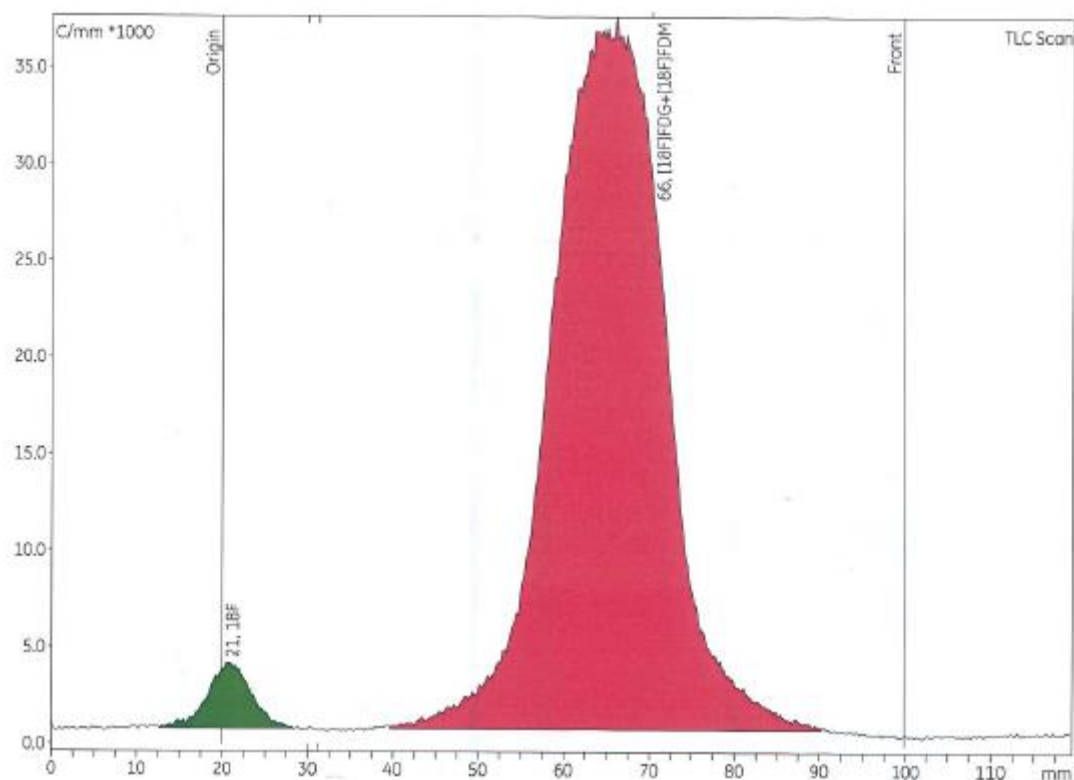
Sample description

Measurement: F092094A T0
 Method: FDG
 Instrument: miniGITA Single OFA
 Meas. time: 0:05:00 h:m:s
 Evaluated by: -
 Raw data: Integrity verified by GINA Star
 Evaluation: Not completed
 Approval: Not approved
 Ext. certificate: -
 Radio detector: MiniGita Serial Nr. 37153
 Software Version: 10.4, Build 6482

Integration TLC Scan

Substance	R/F	Area Counts	%Area %	R/T mm	Start test mm	Stop mm	Height C/m
18F	0.009	71427	3.13	20.71	14.72	26.44	13134
[18F]FDG+[18F]FD	0.586	2207949	96.87	65.11	41.41	88.32	140193
Sum in ROI	-	2279376	100.00	-	-	-	-
Area (total) RF	-	2232131	-	-	-	-	-
BKG1 (CPS)	-	4015.0	-	-	-	-	-

Figura 14: report strumentale soluzione di ^{18}F e $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$ (Analisi 1 a T₀).



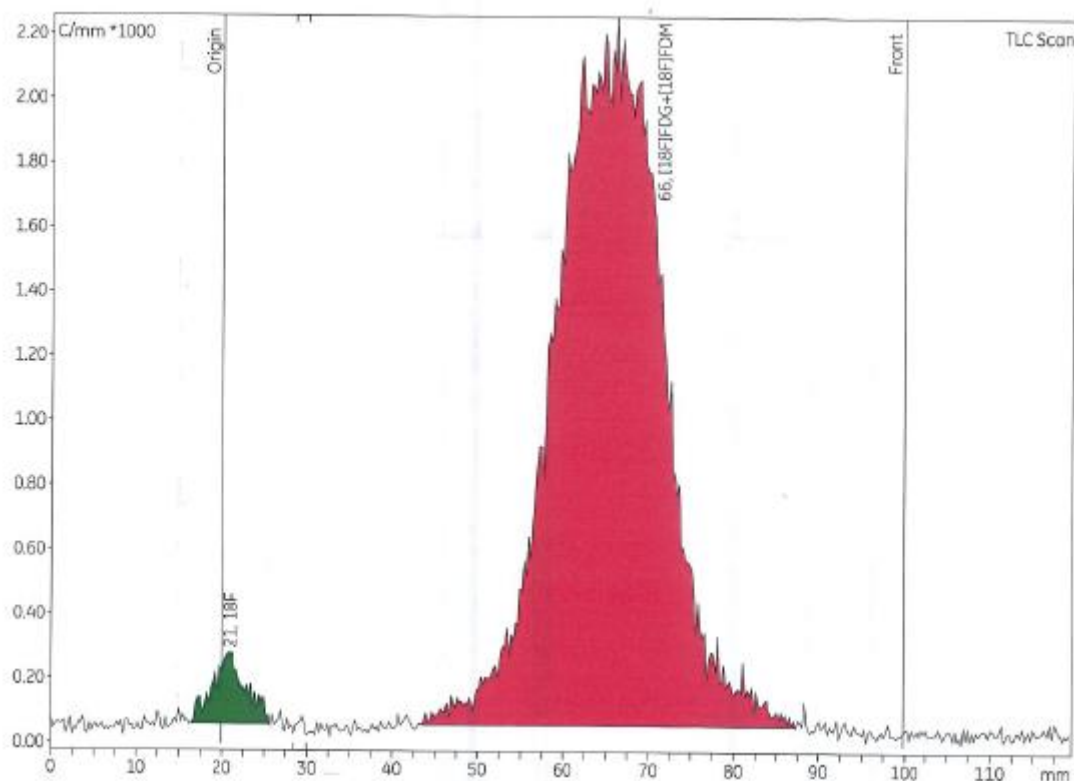
Sample description

Measurement: F092094A Tc
 Method: FDG
 Instrument: miniGITA Single OFA
 Meas. time: 0:05:00 h:m:s
 Evaluated by: -
 Raw data: Integrity verified by GINA Star
 Evaluation: Not completed
 Approval: Not approved
 Ext. certificate: -
 Radio detector: MiniGita Serial Nr: 37153
 Software Version: 10.4, Build 6482

Integration TLC Scan

Substance	R/F	Area Counts	%Area %	R/T mm	Start test mm	Stop mm	Height C/m	S/N ratio
18F	0.013	20159.2	3.41	20.96	12.72	28.19	3294.4	21.8
[18F]FDG+[18F]FD	0.572	571302.8	96.59	65.61	39.67	90.31	35995.9	98.1
Sum in ROI	-	591462.0	100.00	-	-	-	-	-
Area (total) RF	-	582925.0	-	-	-	-	-	-
BKG1 (CPS)	-	805.60	-	-	-	-	-	-

Figura 15: report strumentale soluzione di ^{18}F e $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$ (Analisi 2 a Tc).



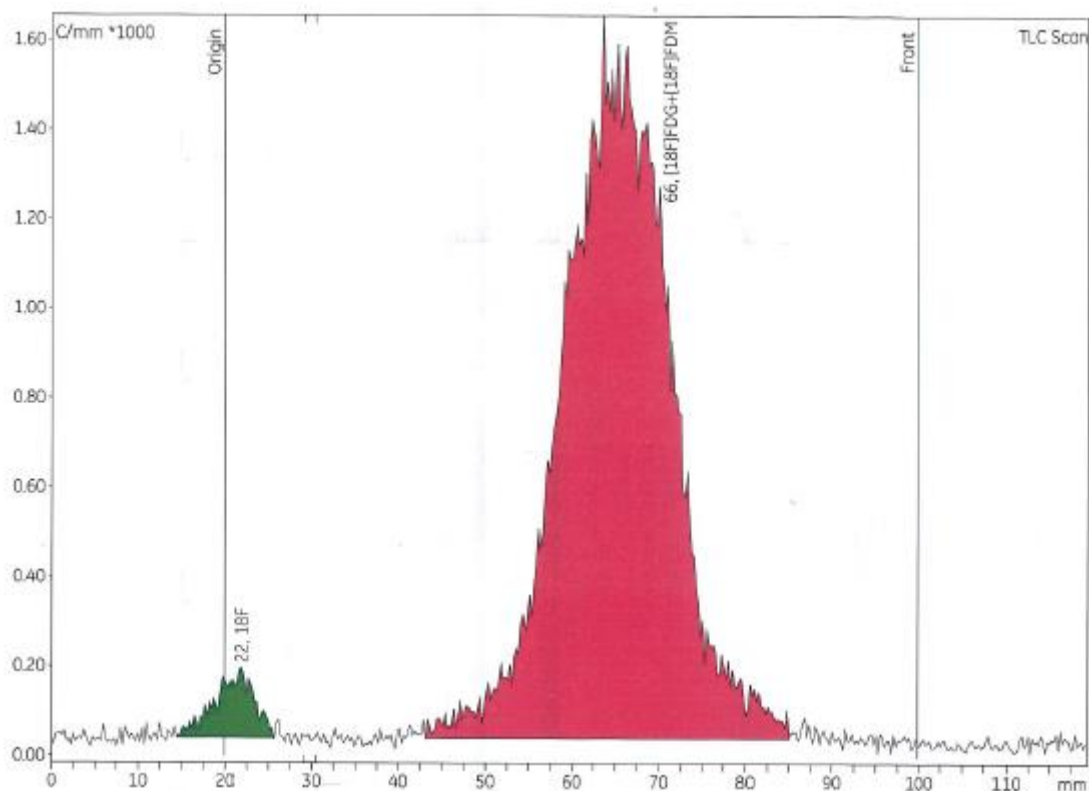
Sample description

Measurement: F092C94A Texp
 Method: FDG
 Instrument: miniGITA Single OFA
 Meas. time: 0:05:00 h:m:s
 Evaluated by: -
 Raw data: Integrity verified by GINA Star
 Evaluation: Not completed
 Approval: Not approved
 Ext. certificate: -
 Radio detector: MiniGita Serial Nr: 37153
 Software Version: 10.4, Build 6482

Integration TLC Scan

Substance	R/F	Area Counts	%Area %	R/T mm	Start test mm	Stop mm	Height C/m	S/N ratio
18F	0.009	997.17	3.01	20.71	16.47	25.70	216.67	6.1
[18F]FDG+[18F]FD	0.581	32123.33	96.99	66.36	43.41	87.32	2044.22	34.0
Sum in ROI	-	33120.50	100.00	-	-	-	-	-
Area (total) RF	-	32569.33	-	-	-	-	-	-
BKG1 (CPS)	-	59.333	-	-	-	-	-	-

Figura 16: report strumentale soluzione di ^{18}F e $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$ (Analisi 3 a T_{exp}).



Sample description

Measurement: F092094A Texp+1h
 Method: FDG
 Instrument: miniGITA Single OFA
 Meas. time: 0:05:00 h:m:s
 Evaluated by: -
 Raw data: Integrity verified by GINA Star
 Evaluation: Not completed
 Approval: Not approved
 Ext. certificate: -
 Radio detector: MiniGita Serial Nr: 37153
 Software Version: 10.4, Build 6482

Integration TLC Scan

Substance	R/F	Area Counts	%Area %	R/T mm	Start test mm	Stop mm	Height C/m	S/N ratio
18F	0.022	805.00	3.49	21.70	14.47	25.70	145.33	4.9
[18F]FDG+[18F]FD	0.575	22265.00	96.51	65.86	43.16	85.07	1454.67	36.3
Sum in ROI	-	23070.00	100.00	-	-	-	-	-
Area (total) RF	-	22847.00	-	-	-	-	-	-
BKG1 (CPS)	-	40.000	-	-	-	-	-	-

Figura 17: report strumentale soluzione di ^{18}F e $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$
 (Analisi 4 a $T_{\text{exp}+1}$).

Il criterio di accettazione prevede di ottenere un segnale il cui rapporto segnale/rumore (S/N) sia maggiore o uguale a 3. Il valore in “*counts area*” associato a tale segnale è stato corrisposto, per ciascun analita ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ e $^{18}\text{F}^-$) alla minima quantità rilevabile.

Il rapporto segnale rumore è stato calcolato mediante l’equazione seguente **(Formula 4)**:

$$S/N = 2 H/h \quad \textbf{Formula 4}$$

Dove:

- H è l’altezza del picco corrispondente all’analita, misurata dal massimo del picco alla linea di base estrapolata, dove la linea di base è osservata su una distanza uguale ad almeno 5 volte l’ampiezza a metà altezza del picco;
- h è il range del rumore di fondo nel cromatogramma del bianco, osservato su una distanza uguale ad almeno 5 volte l’ampiezza a metà altezza del picco nel cromatogramma.

In **Tabella 13** sono riassunti i valori dei LOD per il metodo analitico ottenuti ai diversi tempi di misura presi in considerazione.

Tabella 13: risultati test LOD.

LOD solution [^{18}F]FDG+[^{18}F]					
Sample activity: 2.514 MBq/mL					
Analysis Number	Measurement Time	Area Counts ^{18}F	S/N ^{18}F	Area counts [^{18}F]FDG + [^{18}F]FDM	S/N [^{18}F]FDG + [^{18}F]FDM
1	T ₀	71427	168.38	2207949	1797.35
2	T _c	20159.2	42.24	571302.8	461.49
3	T _{exp}	997.17	2.78	32123.33	26.21
4	T _{exp+1}	805.00	1.86	22265.00	18.65
LOD [^{18}F] (minimum area counts): 20159.2 cps					S/N: 42.24
LOD [^{18}F]FDG + [^{18}F]FDM (minimum area counts):22265.00 cps					S/N: 18.65

4.1.2 Protocollo di convalida del Metodo TLC per la verifica della Purezza Chimica – Test B

4.1.2.1 Valutazione della specificità del metodo analitico

È stata valutata la capacità del metodo analitico di misurare il Kryptofix 2.2.2. in presenza di altri componenti che possono essere presenti nella matrice del campione da analizzare e che possono eventualmente influenzare l'analisi stessa.

Sono state preparate le soluzioni di riferimento A-E, come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”, e sono state depositate 2.5 µl di ogni soluzione. In seguito, gli spot ottenuti sono stati confrontati visivamente.

In **Figura 18** è stata riportata la lastrina relativa al test eseguito. La lastrina non ha mostrato alcuna macchia scura in corrispondenza di miscele non contenenti Kryptofix 2.2.2. (*Soluzione A, C ed E*), mentre l'intensità della macchia scura, per le *soluzioni B e D* deve risultare confrontabile.

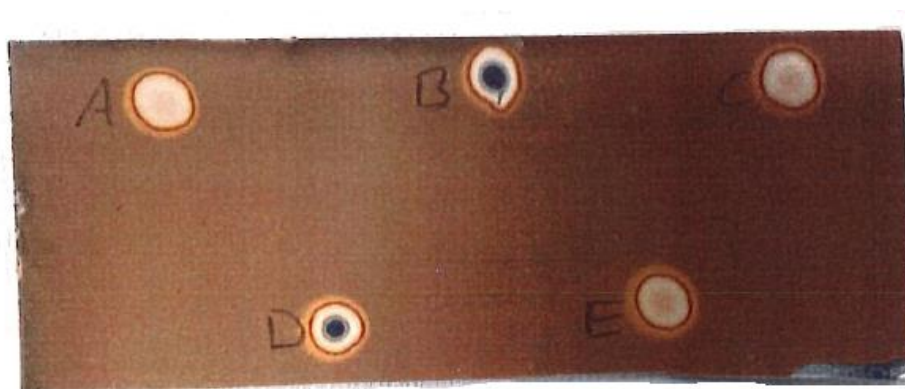


Figura 18: immagine lastrina TLC del test di specificità.

4.1.2.2 Valutazione della linearità del metodo analitico

In questo test è stata verificata la risposta visiva a differenti concentrazioni di Kryptofix 2.2.2. in soluzione fisiologica.

Sono state preparate le soluzioni diluite (*Miscela 22 $\mu\text{g/ml}$ -220 $\mu\text{g/ml}$*), precedentemente descritte nel paragrafo “Materiale e Metodi”, e di ognuna sono state depositate, sulla lastrina trattata con iodio platinato, 2.5 μl di ciascuna soluzione.

In **Figura 19** è rappresentata la lastrina relativa al test eseguito. Una diversa intensità di colorazione è stata osservata passando dalla soluzione più concentrata (220 $\mu\text{g/ml}$) a quella più diluita (22 $\mu\text{g/ml}$).

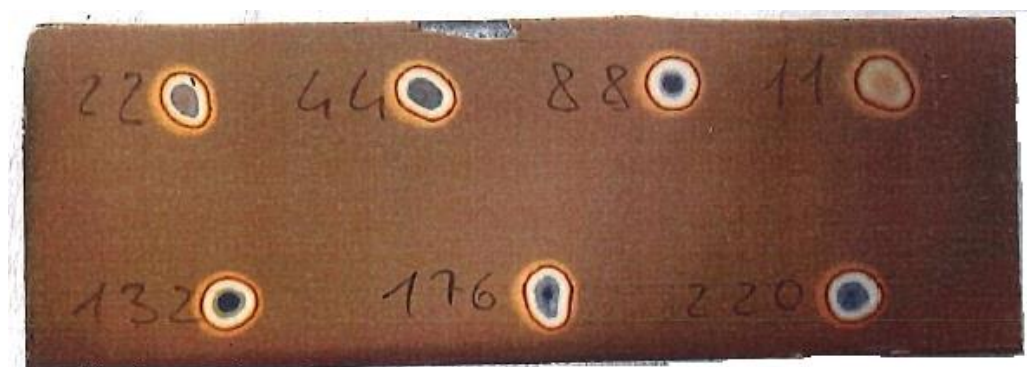


Figura 19: immagine lastrina TLC del test di linearità.

Con questo test abbiamo dimostrato che il metodo analitico è in grado di ottenere risultati visivi, direttamente proporzionali alla concentrazione di Kryptofix 2.2.2. presente nella soluzione campione, così da poter paragonare la quantità da testare con una soluzione standard di 220 $\mu\text{g/ml}$ da non superare, come indicato nei limiti di specifica del radiofarmaco.

4.1.2.3 Valutazione del Limite di Rilevabilità (Limit of Detection - LOD)

Lo scopo del seguente test è stato valutare la concentrazione di analita Kryptofix 2.2.2. che produce una macchia scura di intensità sufficientemente apprezzabile ovvero il LOD.

Il test è stato effettuato tramite ispezione visiva delle lastrine.

La concentrazione LOD individuata è di 22 µg/ml in **Figura 19**, in quanto a questa concentrazione di Kryptofix 2.2.2. l'anello nero-blu e la macchia centrale nera-blu sono risultati visibili ad occhio nudo. Pertanto, il metodo analitico è risultato capace di individuare concentrazioni più basse di 220 µg/ml che rappresenta il nostro valore limite di specifica da non superare durante il rilascio di un lotto.

4.1.3 Protocollo di convalida del Radio-HPLC per la verifica della Purezza Chimica e Radiochimica

4.1.3.1 Valutazione della specificità del metodo analitico

Nell'analisi HPLC la specificità si raggiunge quando si può dimostrare che il picco, corrispondente alla sostanza in esame è separato dai picchi delle sostanze eventualmente presenti in soluzione. Questo è stato dimostrato iniettando ogni singola sostanza e andando a verificare l'assenza di sovrapposizioni tra segnali appartenenti a sostanze diverse. Nel caso di picchi interferenti, i cromatogrammi sono stati analizzati e la loro risoluzione è stata calcolata.

1. Iniezione della *Reference Solution C* (FDM/FDG)

La risoluzione (R_s) fra i due picchi adiacenti è stata espressa dal rapporto fra la loro distanza e la semisomma delle rispettive larghezze alla base, usando la **Formula 3**. In **Tabella 14** sono riassunti i risultati ottenuti che hanno dimostrato la specificità del test e in **Figura 20** il cromatogramma relativo alla *Reference Solution C*.

Tabella 14: risultati della specificità del metodo analitico (Iniezione della Reference Solution C).

SOLUTION C (FDM 25 µg/mL + FDG 25 µg/mL)		
Peak	Retention time (min)	Width of the peak
FDM	10.996	0.36
FDG	12.475	0.50
Resolution (Rs)		
2.03		

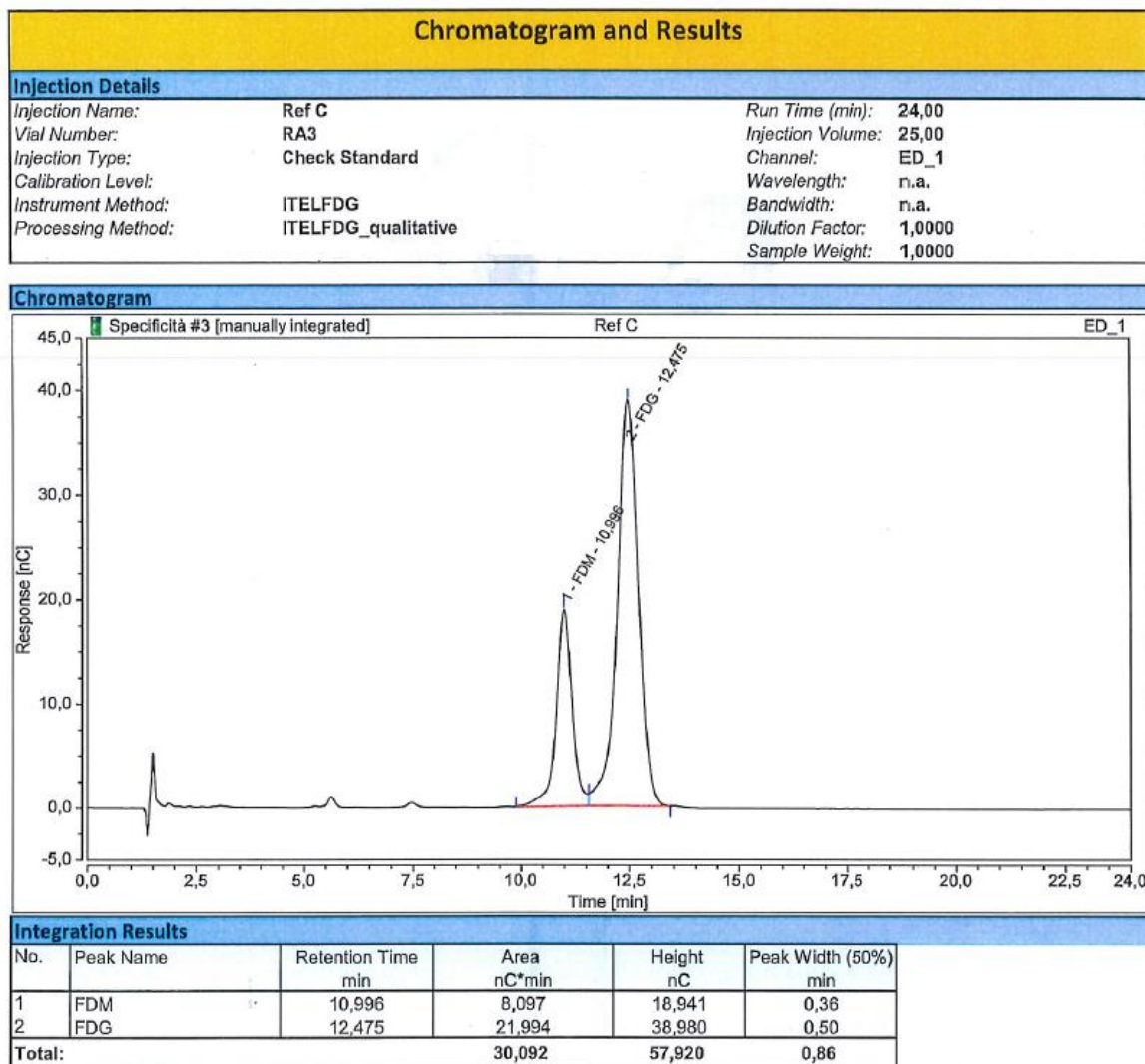


Figura 20: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Reference Solution C.

2. Iniezione delle soluzioni di riferimento

Sono state iniettate le seguenti soluzioni di riferimento:

- Reference solution A (FDG);
- Reference solution B (CIDG);

- Soluzione E (FDM);
- Soluzione F (Glucosio);
- Soluzione G (NaCl 0.9 %)
- Soluzione D ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$): prodotto finito decaduto.

Sono stati confrontati visivamente i cromatogrammi ottenuti (**Figure 21-26**) ed è stata verificata l'assenza di picchi significativi non identificabili o interferenti nel cromatogramma ottenuto dall'analisi della *Reference solution A, B* ed *E*. In caso di picchi interferenti, è stata calcolata la risoluzione utilizzando la **Formula 3**.

In **Tabella 15** sono riassunti i risultati ottenuti che hanno dimostrato la specificità del test.

Tabella 15: risultati della specificità del metodo analitico (iniezione delle soluzioni di riferimento)

Soluzione D: $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ decaduto	
Peak	Retention time (min)
Glucosio	5.102
Reference solution A: FDG standard	
FDG	12.150
Reference solution B: CIDG standard	
CIDG	12.914
Soluzione E: FDM standard	

FDM	10.359
Soluzione F: Glucosio standard	
Glucosio	5.213
Soluzione G: NaCl 0.9%	
-	-

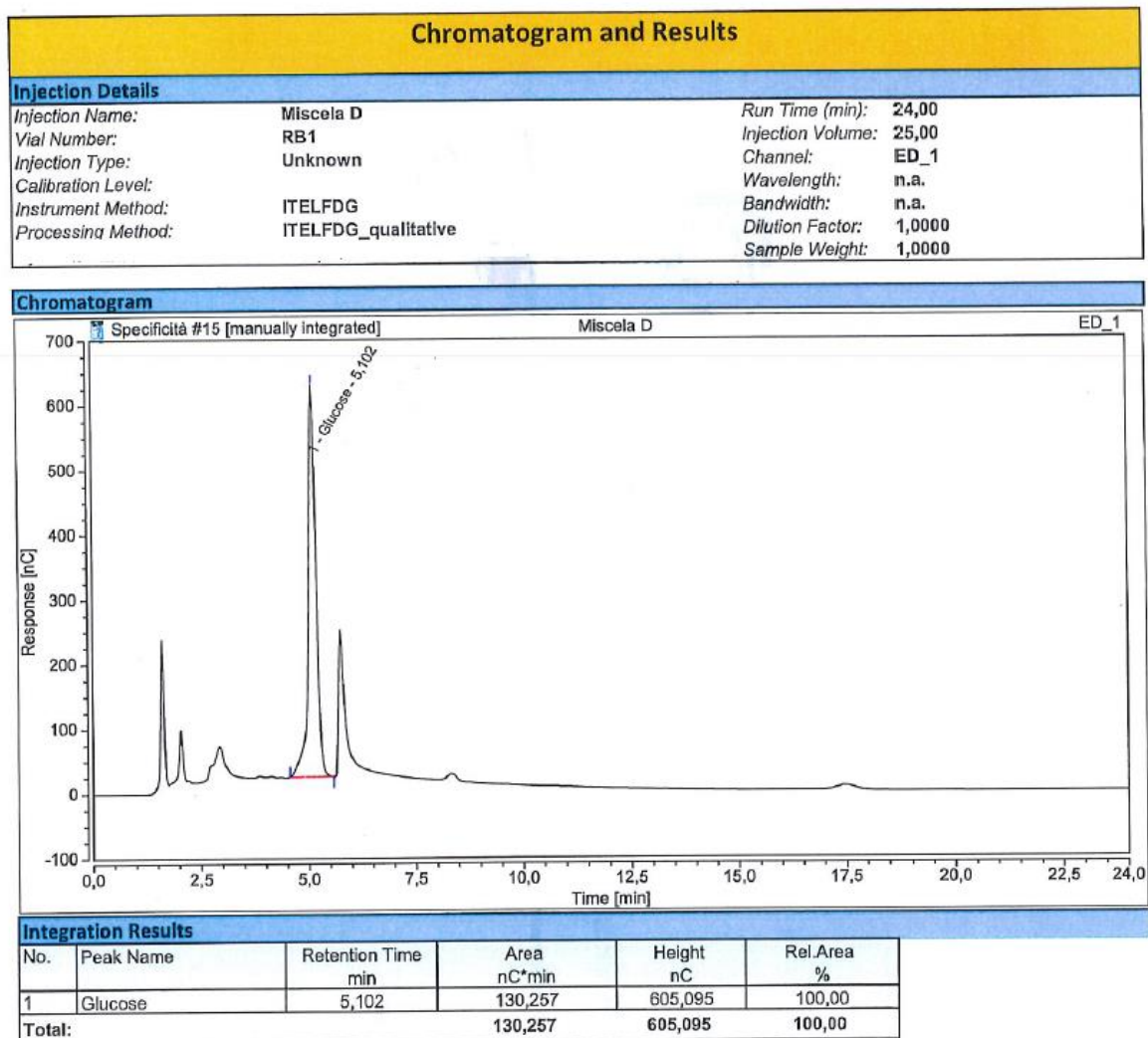


Figura 21: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione D ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$): prodotto finito decaduto.

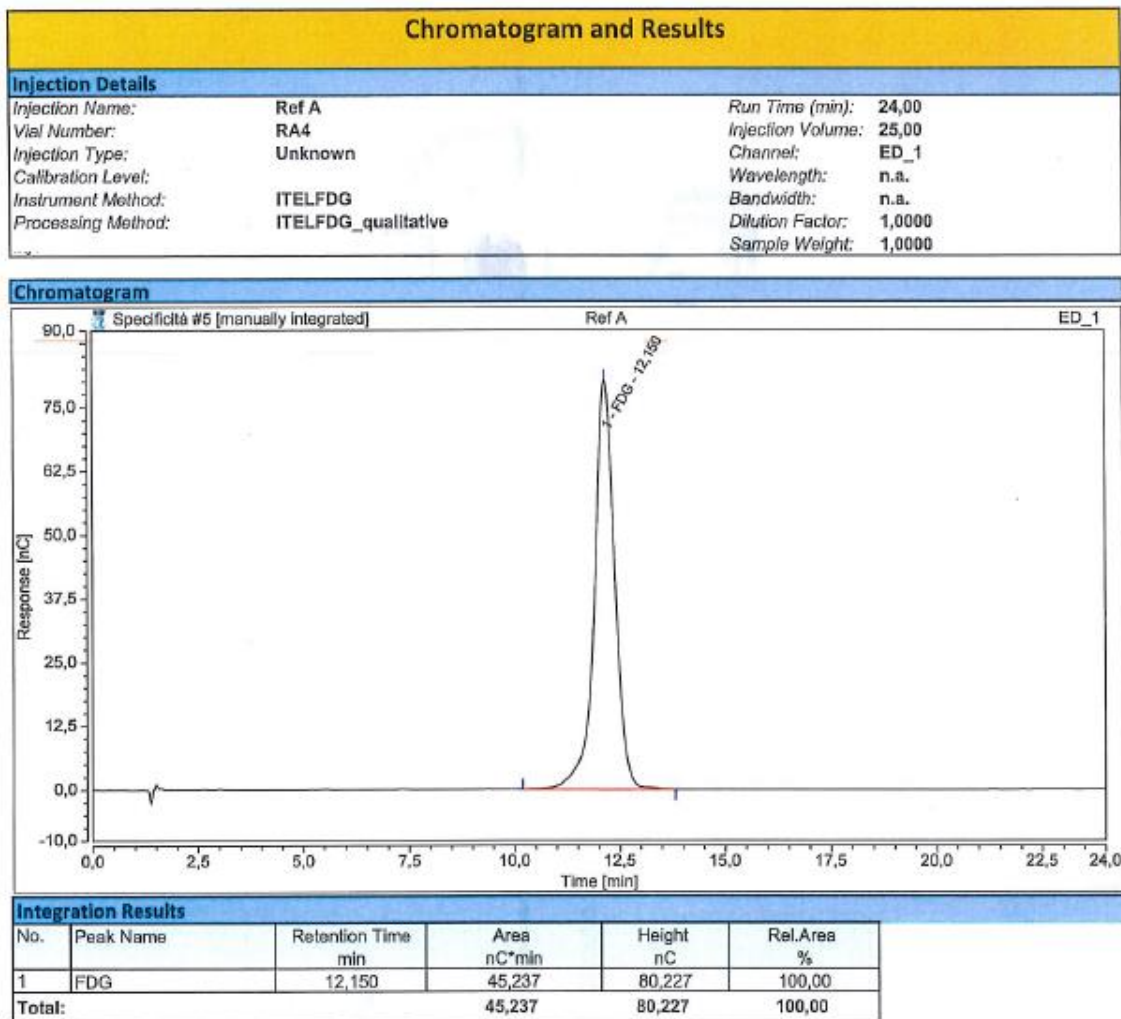


Figura 22: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione A (FDG standard).

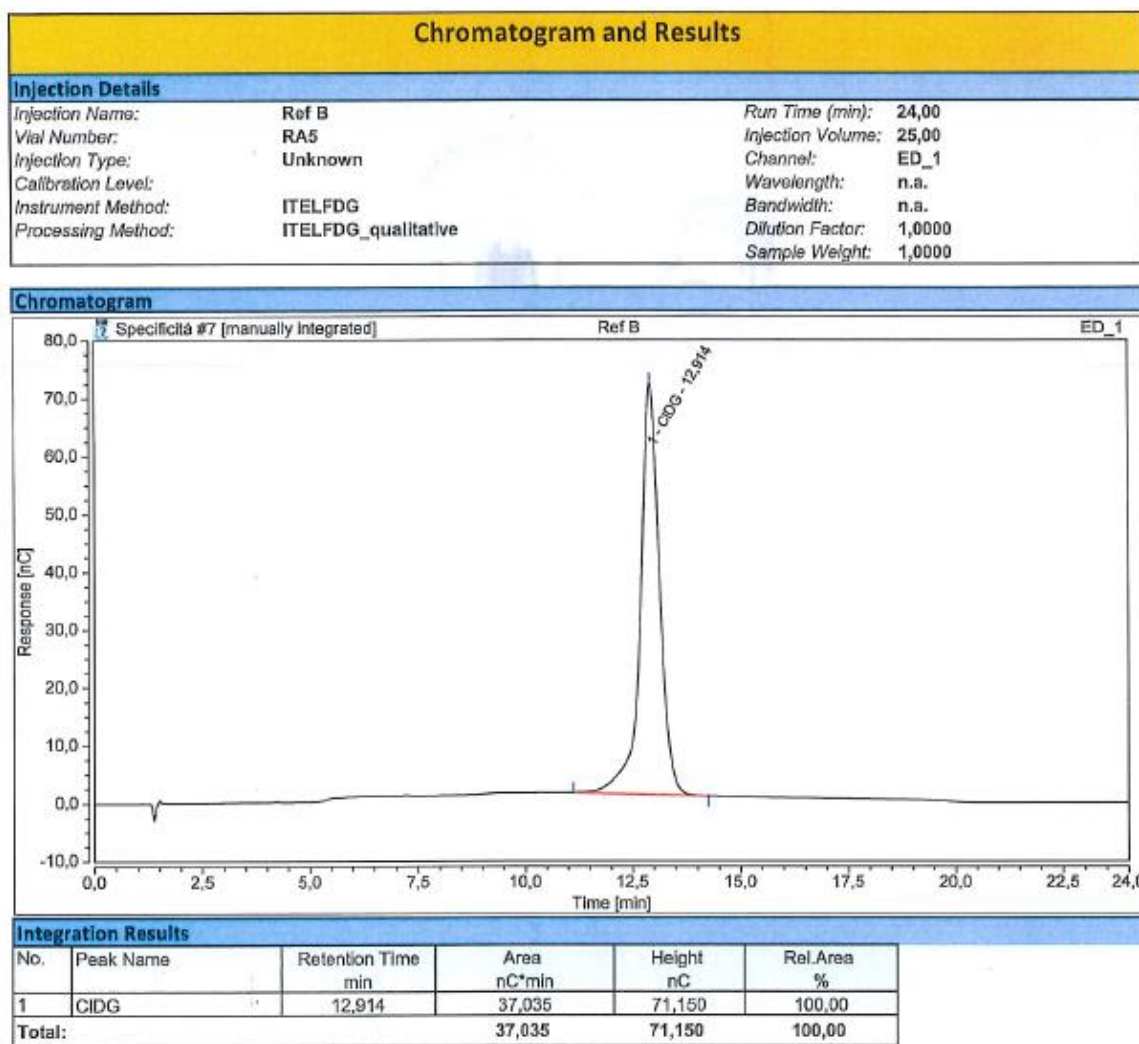


Figura 23: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione B (CIDG standard).

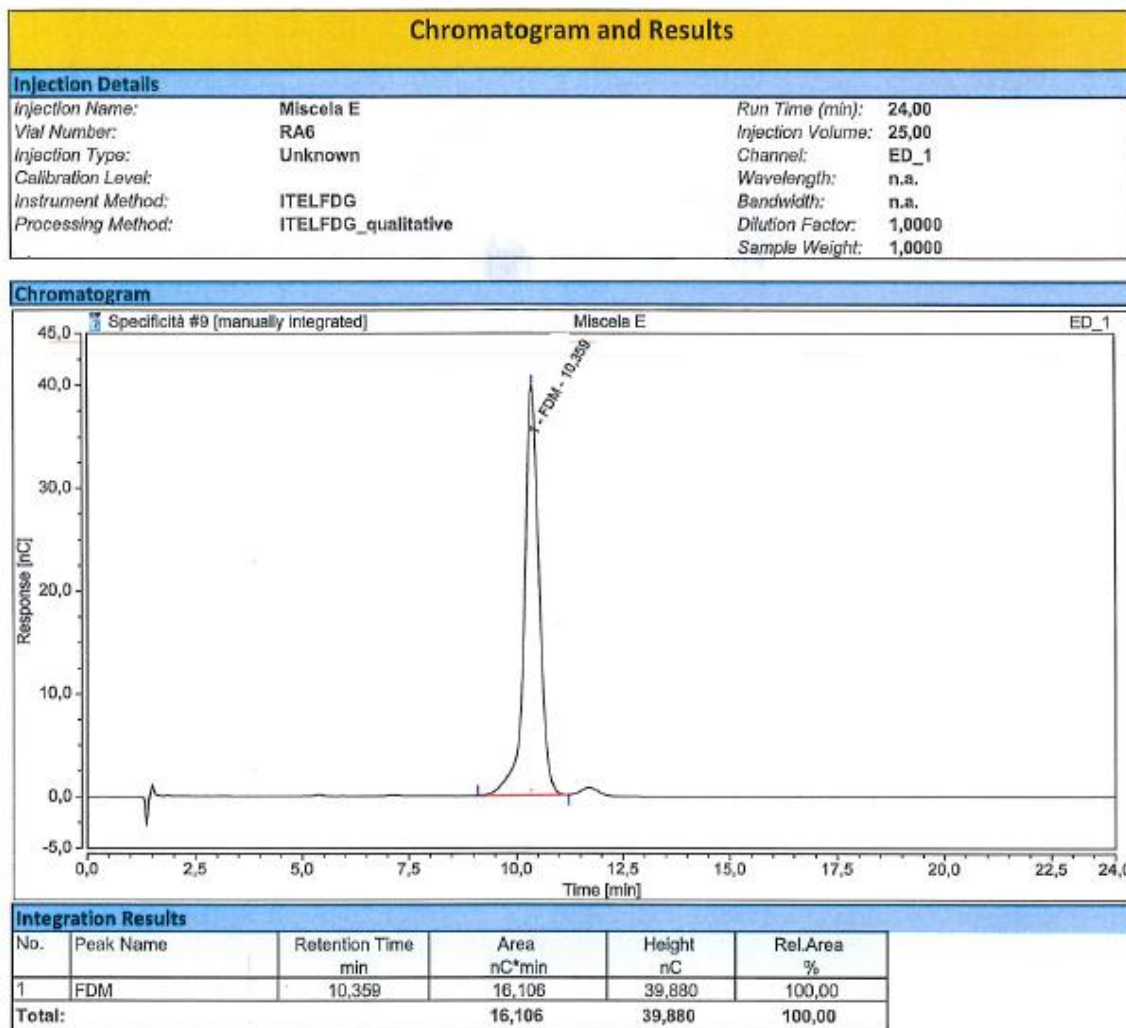


Figura 24: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione E (FDM standard).

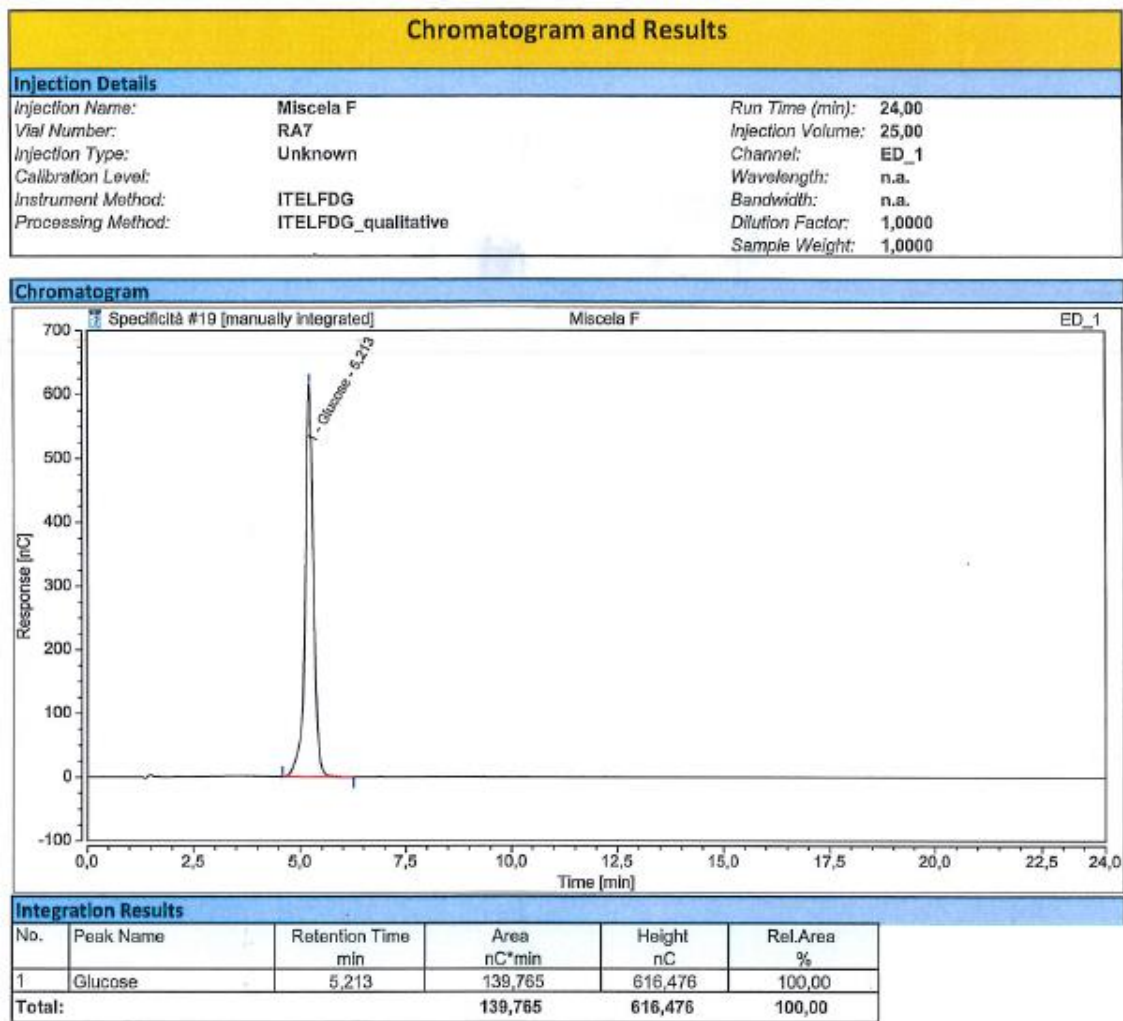


Figura 25: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione F (Glucosio standard).

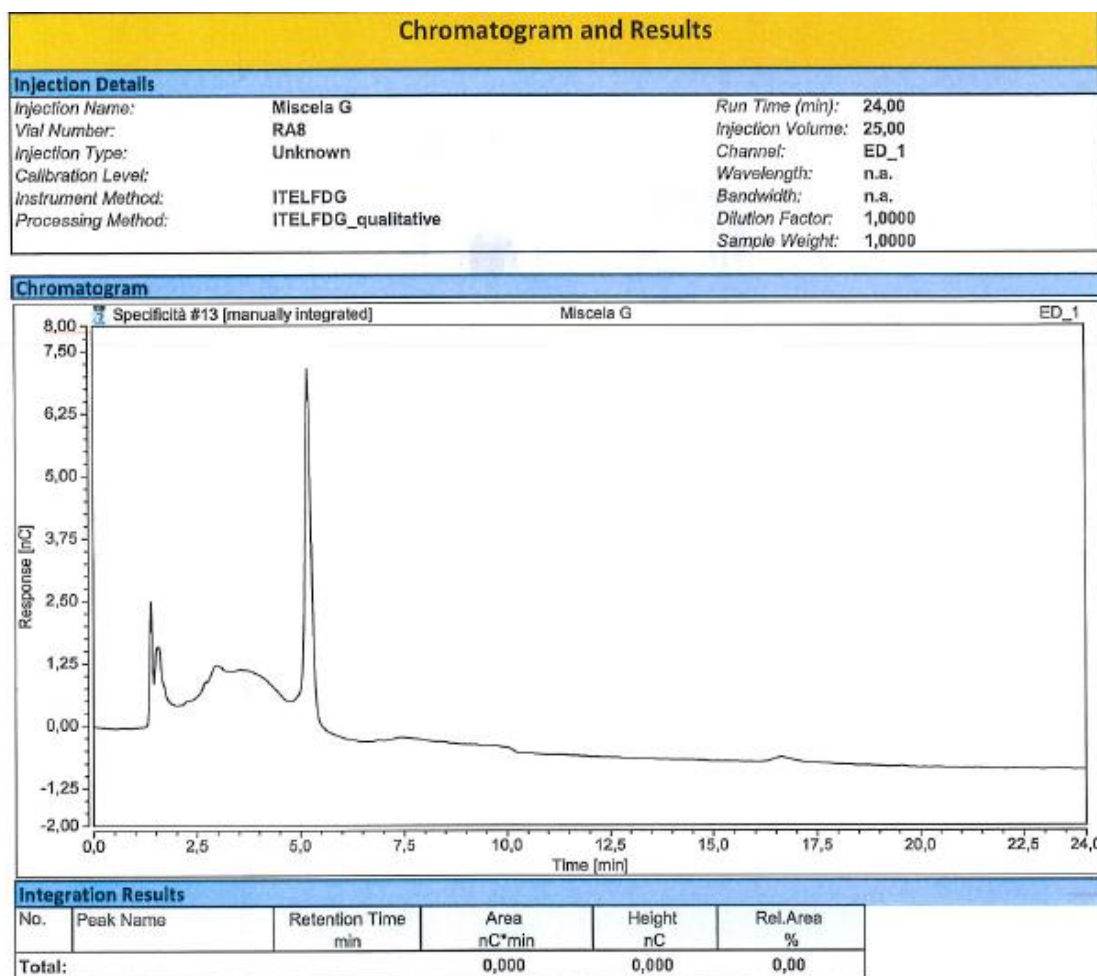


Figura 26: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione G (NaCl 0.9 %).

3. Iniezione del prodotto finito decaduto arricchito con FDM, FDG e CIDG (Soluzione H)

È stata verificata la risoluzione R_s tra un picco e quello successivo tramite la **Formula 3**.

I cromatogrammi della Soluzione H (**Figura 27**) sono stati visivamente confrontati e non hanno mostrato sovrapposizioni. In caso contrario, la loro risoluzione è risultata come da criterio di accettazione maggiore di 1.5 ad eccezione della risoluzione tra FDG e CIDG. La risoluzione tra i picchi FDG e CIDG risulta solitamente essere inferiore al criterio di accettazione di 1.5. Tuttavia, tale grado di risoluzione dipende dalla modalità analitica adottata.⁴⁰

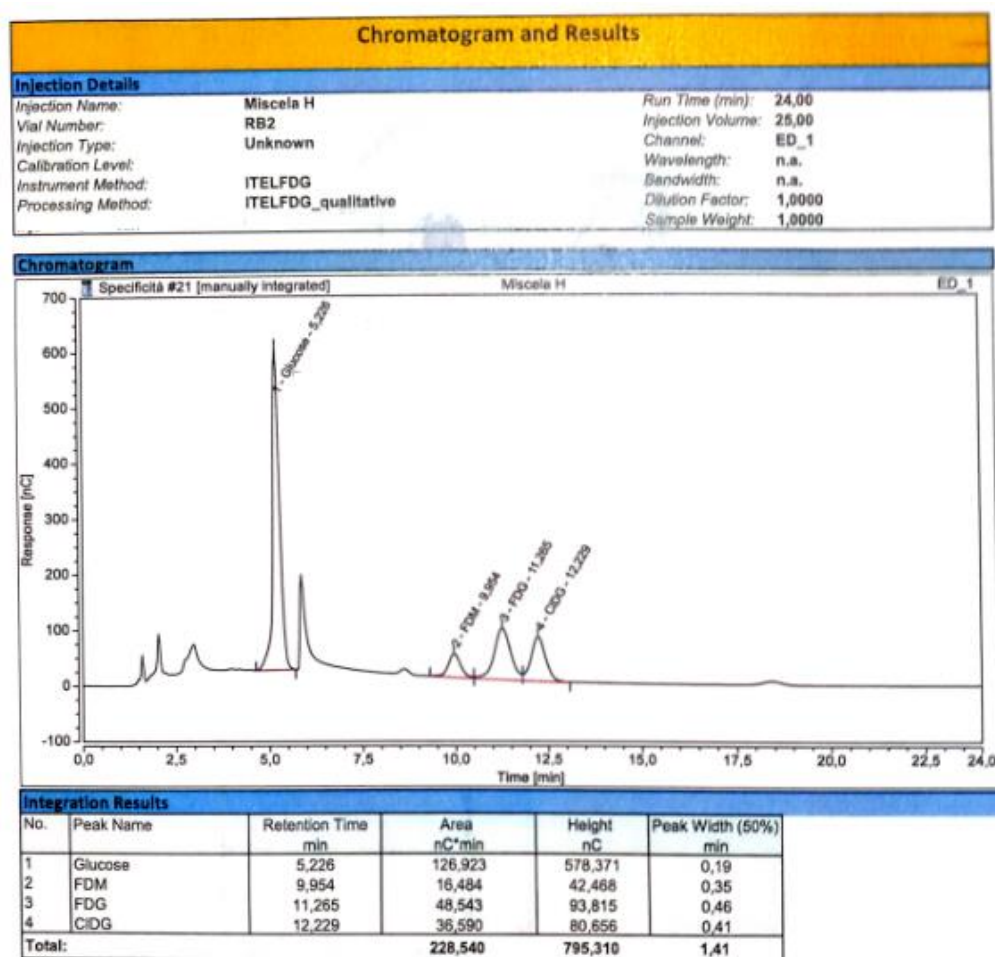


Figura 27: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione H ($[^{18}\text{F}]$ FDG decaduto, FDM, FDG e CIDG).

In **Tabella 16** sono riassunti i risultati ottenuti che dimostrano la specificità del test.

Tabella 16: risultati della specificità del metodo analitico (Iniezione della soluzione H).

Soluzione H: [^{18}F]FDG decaduto + FDG + CIDG + FDM		
Analyte	Retention time	Resolution (Rs)
[^{18}F]FDG decaduto	5.226	10.33
FDM	9.954	1.91
FDG	11.265	1.31
CIDG	12.229	N/A

4.1.3.2 Valutazione del Limite di Rilevabilità (LOD)

Lo scopo di questo test è stato valutare la concentrazione minima dell'analita che produce un'area di picco per la quale il rapporto segnale/rumore è uguale o superiore a 3.

Il LOD è stato calcolato mediante la misura del rumore di fondo, misurato sul bianco, e il calcolo teorico del LOD, seguito dalla verifica sperimentale.

La determinazione del range del segnale (height max bianco) è stata misurata sull'analisi del bianco. La regione di integrazione per questi è stata calcolata partendo dal tempo di ritenzione del FDG, più o meno 5 volte l'ampiezza a metà altezza del picco.

Il calcolo teorico è stato effettuato tramite la seguente **Formula 5**:

$$LOD(theoretical) = 3 * \frac{height\ max\ bianco}{2} \quad \textbf{Formula 5}$$

Successivamente, è stato valutato sperimentalmente il LOD tramite l'analisi di soluzioni di riferimento ottenute per diluizioni progressive della Reference solution A (FDG 50 µg/ml).

Il rapporto segnale/rumore è stato calcolato usando la **Formula 4** descritta in precedenza.

In **Tabella 17** sono riassunti i risultati ottenuti dalla verifica del LOD mentre in **Figura 28** e in **Figura 29** sono riportati rispettivamente il cromatogramma della soluzione A e il cromatogramma dell'analita alla concentrazione LOD.

Tabella 17: risultati del limite di rilevabilità (LOD).

Analyte	Maximum height (nC)	Width at mid-height	Retention time	Integration range limits
FDG	83.992	0.51	12.700 min	10.15 min ÷ 15.25 min
Integration range width	Background noise	Theoretical LOD	Experimental LOD	Signal to noise Experimental LOD ≥ 3
5.1 min	0.05 nC	0.075	9.4	Yes

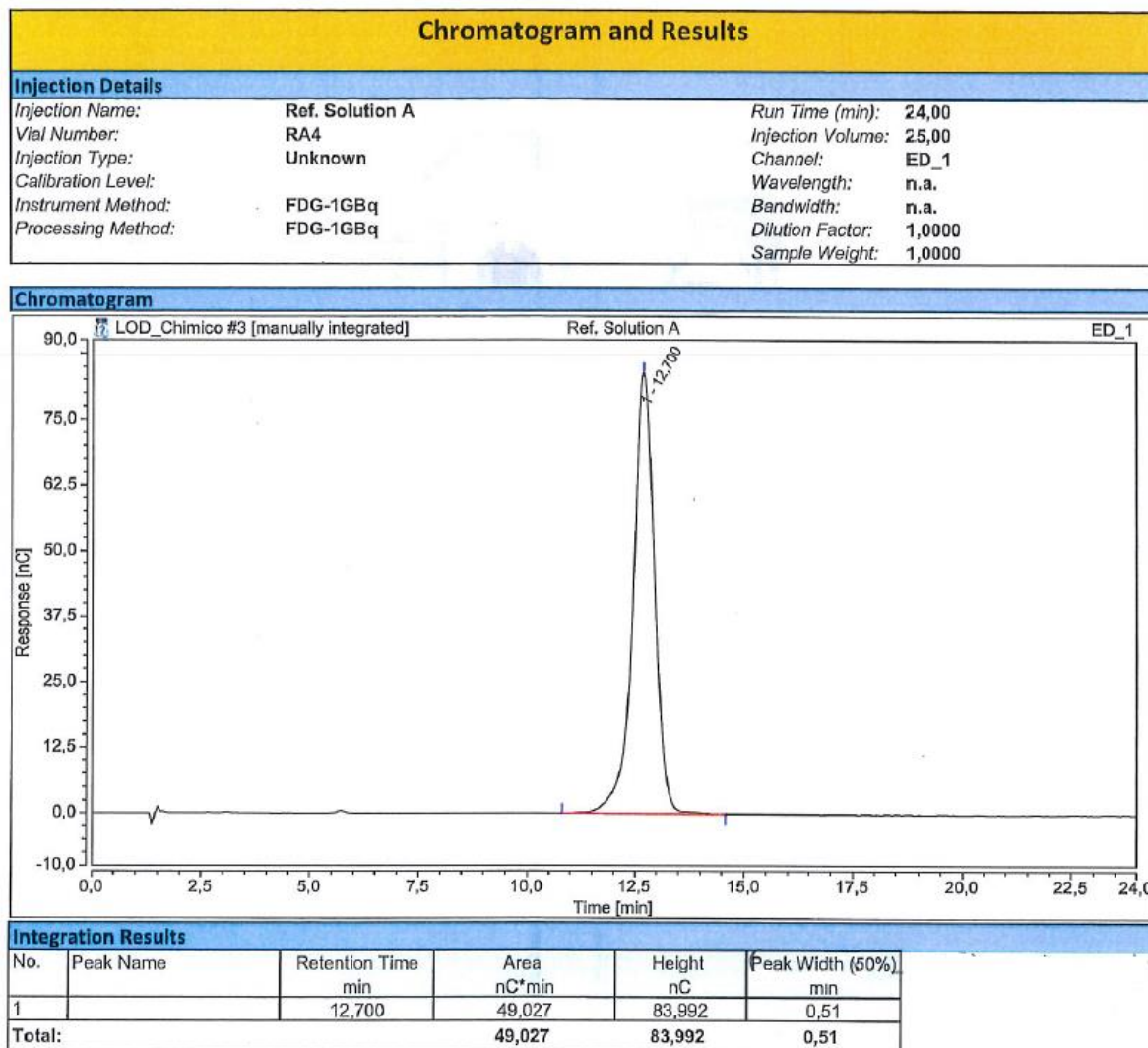


Figura 28: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione

A.

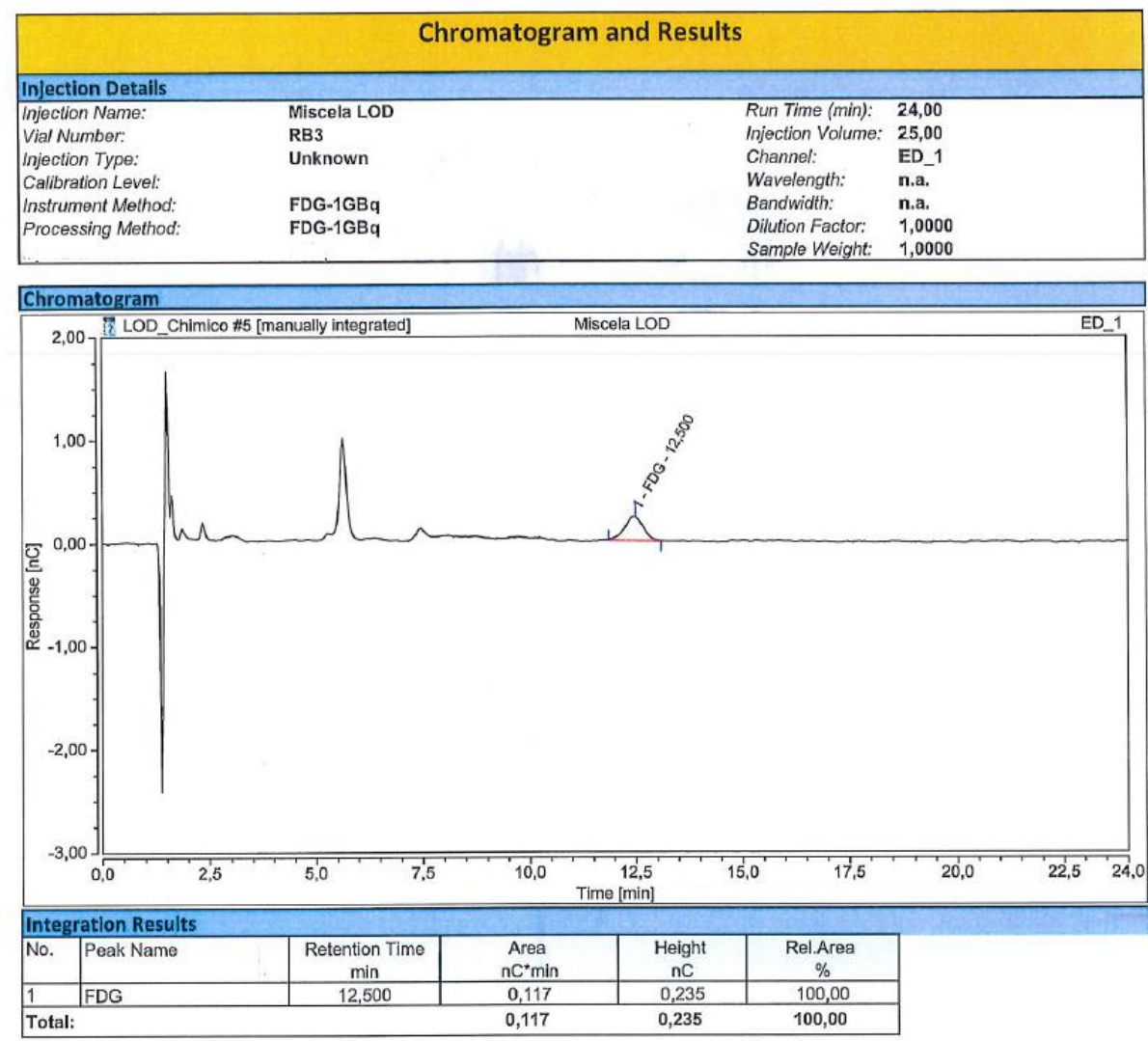


Figura 29: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della concentrazione LOD.

4.1.3.3 Valutazione del test di identificazione e del LOQ

Lo scopo di questo test è stato verificare il tempo di ritenzione del [^{19}F]FDG nella soluzione di riferimento e il tempo di ritenzione del [^{18}F]FDG nel campione radioattivo. Inoltre, è stato necessario verificare anche la concentrazione

dell'analita, la cui area produce un rapporto segnale/rumore che non deve essere inferiore a 10. Questa concentrazione è il limite di quantificazione (LOQ) ovvero la concentrazione più bassa che può essere rilevabile in un campione analitico con rilevatore radiometrico.

Per eseguire il test sono state eseguite le iniezioni delle seguenti soluzioni:

- bianco,
- soluzione di riferimento A (**Figura 30**),
- soluzione di [^{18}F]FDG (**Figura 31**),
- soluzione di [^{18}F]FDG T_C, (al tempo di calibrazione) (**Figura 32**)
- soluzione di [^{18}F]FDG T_{EXP} (al tempo di scadenza) (**Figura 33**),
- soluzione di [^{18}F]FDG T_{EXP+1h} (1 ora dopo il tempo di scadenza) (**Figura 34**).

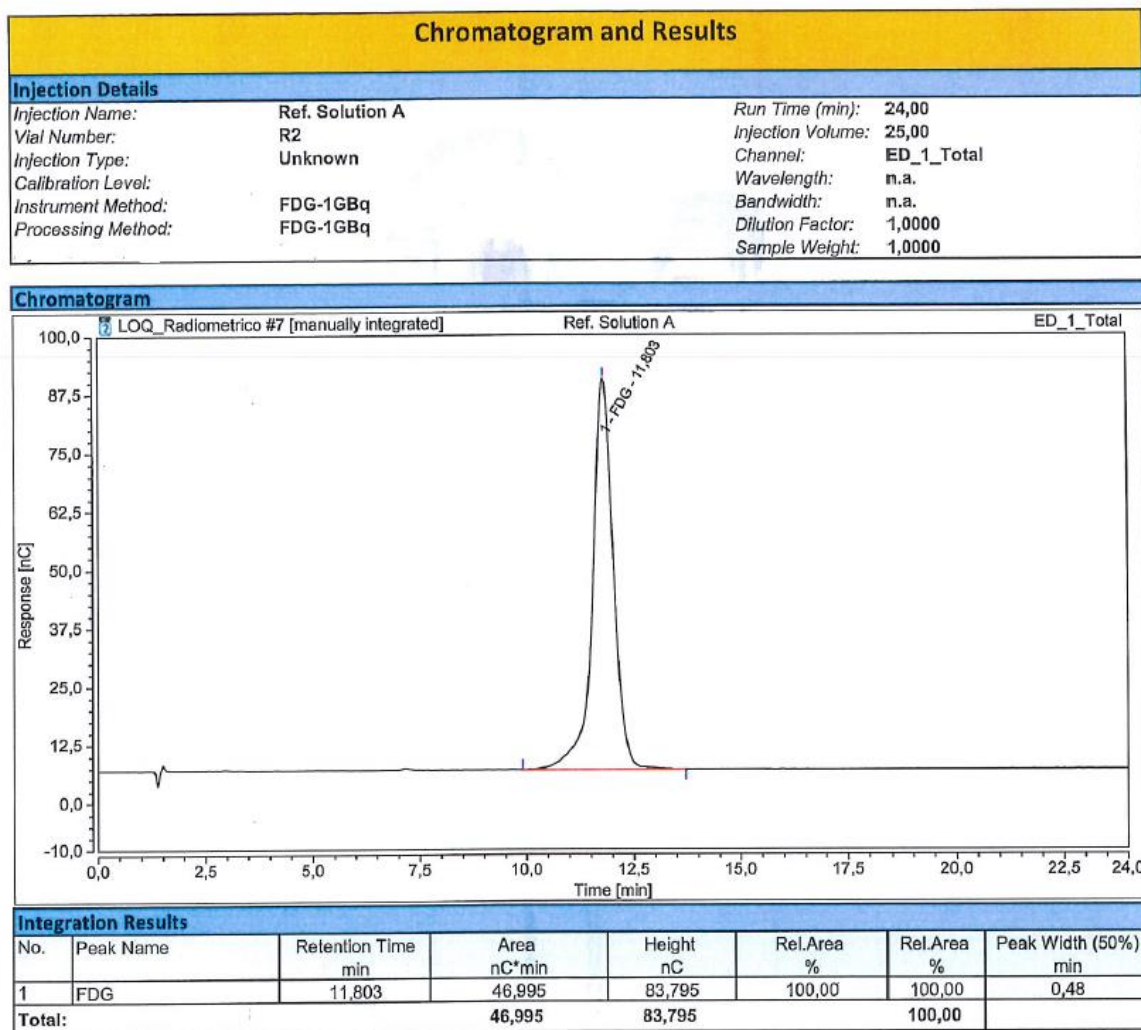


Figura 30: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della soluzione di riferimento A.

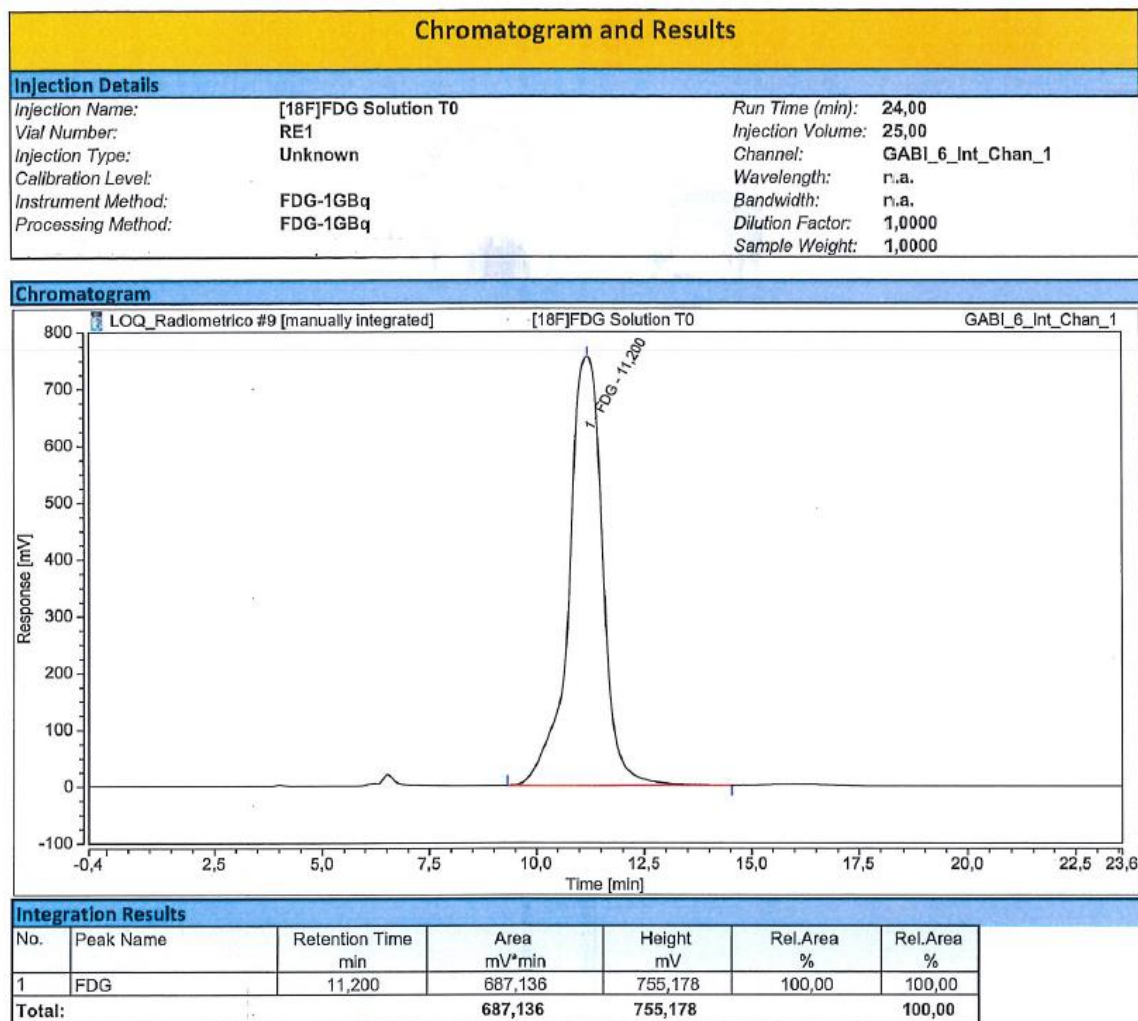


Figura 31: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della soluzione di $[^{18}\text{F}]$ FDG.

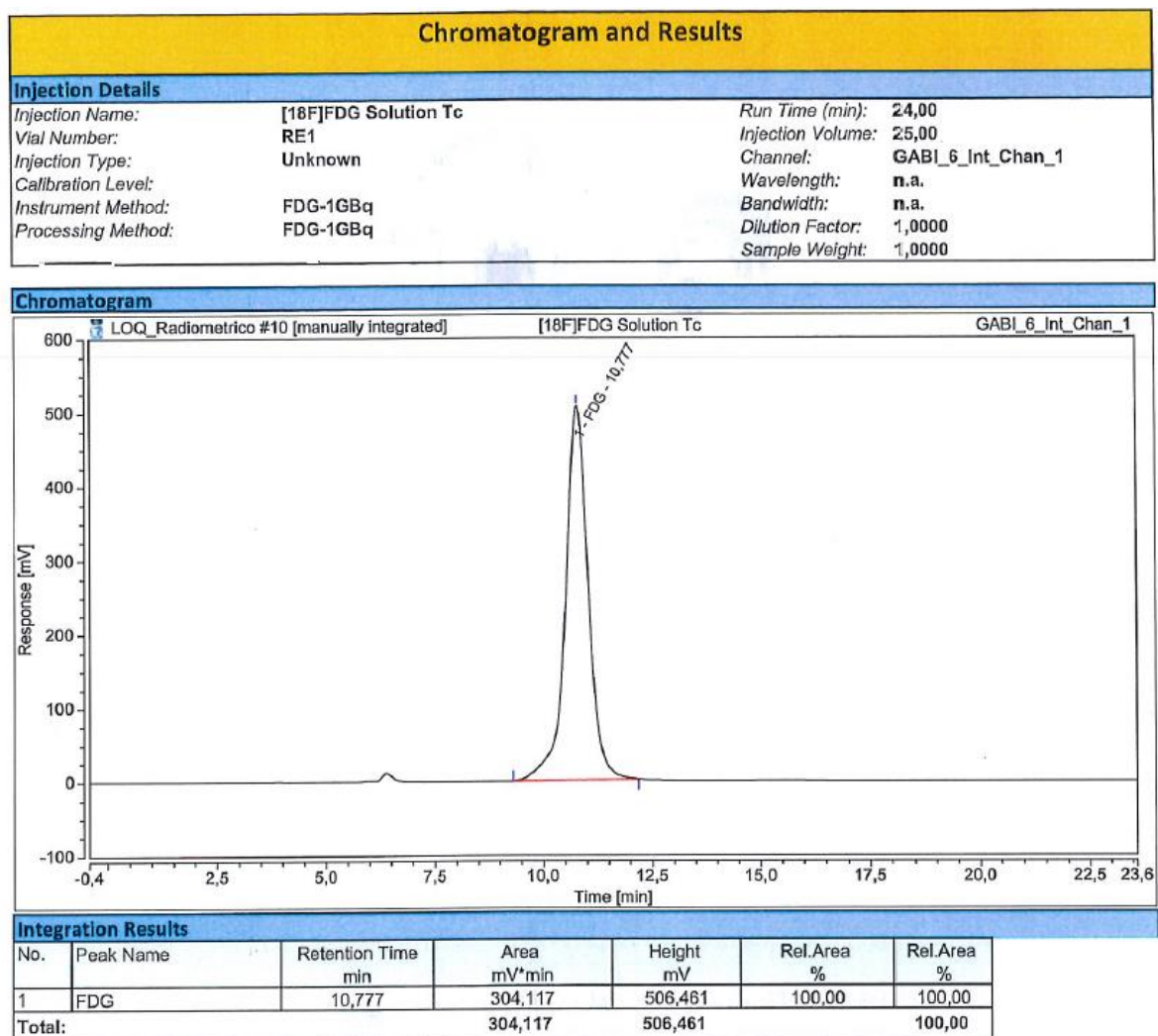


Figura 32: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della soluzione di soluzione di $[^{18}\text{F}]$ FDG Tc.

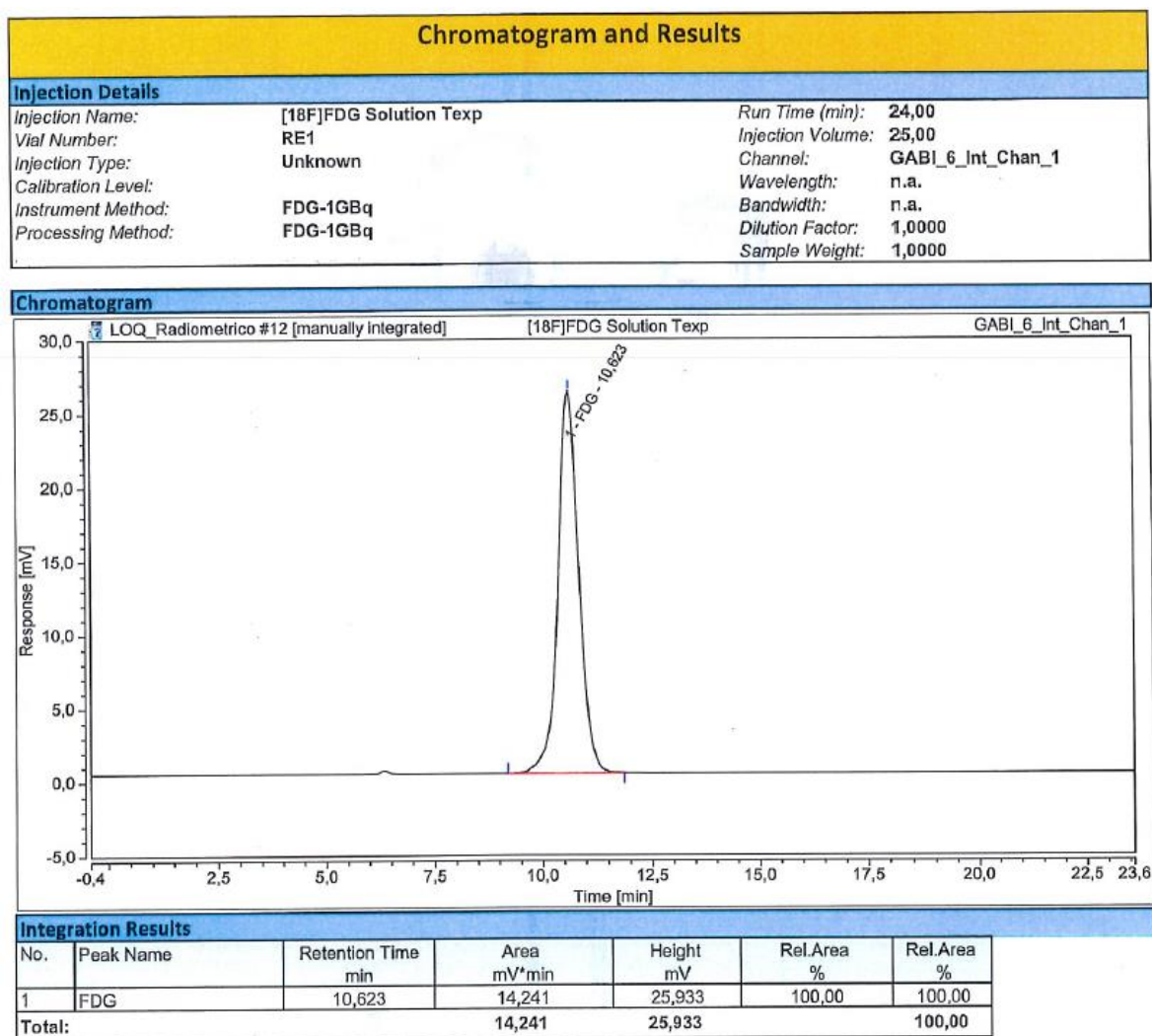


Figura 33: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della soluzione di soluzione di $[^{18}\text{F}]\text{FDG T}_{\text{EXP}}$.

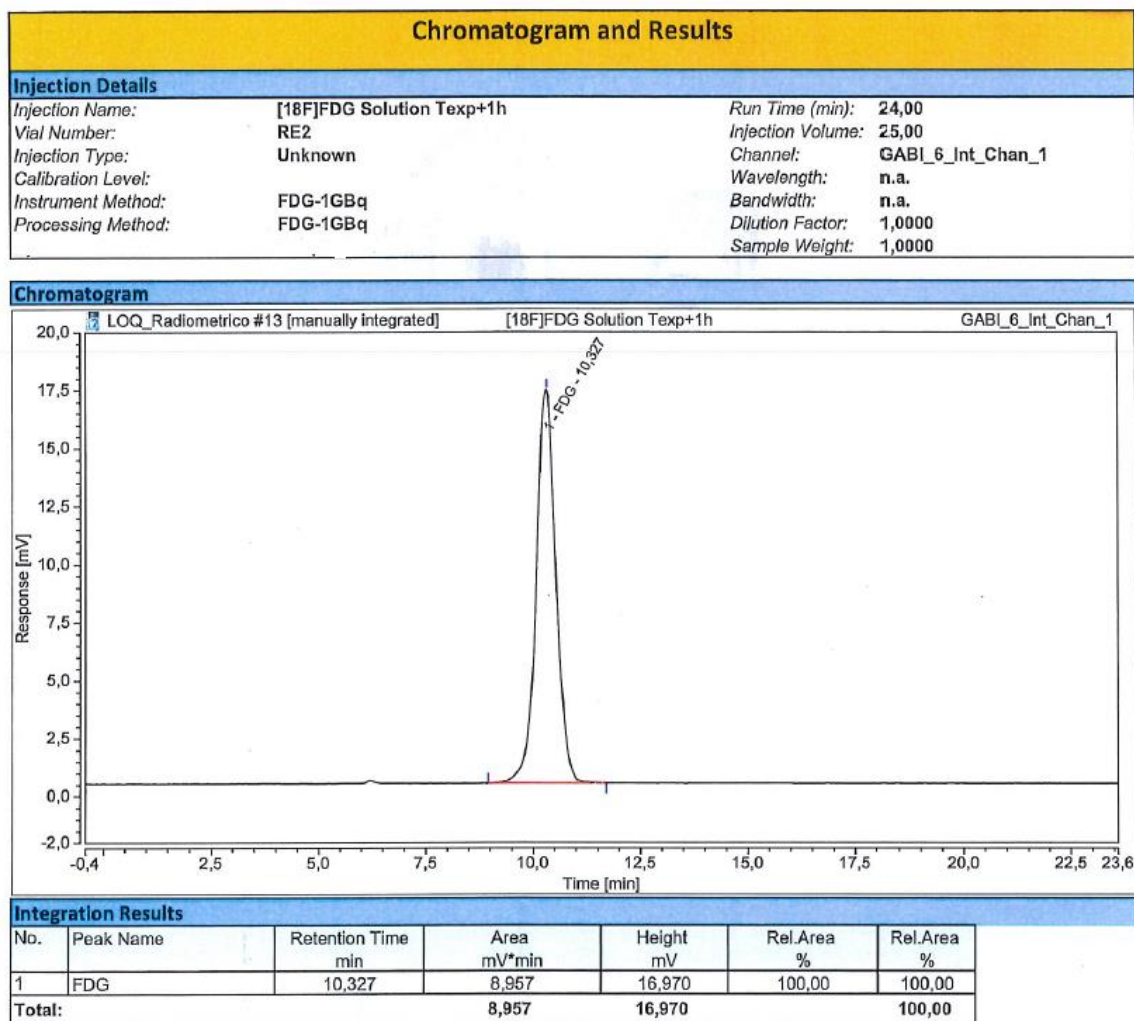


Figura 34: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della soluzione di $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ $T_{\text{EXP}+1}$.

I picchi sono stati identificati e integrati sul canale radiometrico e confrontati con il canale amperometrico.

Il picco del $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, rilevato sul canale radiometrico ha mostrato un tempo di ritenzione simile a quello dell'analita $[^{19}\text{F}]\text{FDG}$ rilevato sul canale amperometrico,

andando a soddisfare una delle specifiche previste dalla Farmacopea Europea (Identificazione C) precedentemente indicata in **Tabella 4**. Il rapporto segnale/rumore per il picco di [^{18}F]FDG è stato ≥ 10 .

In **Tabella 18** sono riassunti i valori per l'identificazione e per la valutazione del LOQ.

Tabella 18: risultati del LOQ.

Analyte	Retention time ^{19}F -FDG channel Amp.		Width at half height Ref. Sol. A	
Reference Solution A	11.803		0.48	
Sample	Retention time ^{18}F - FDG	Height signal H (mV)	Height Noise h (mV)	S/N
^{18}F -FDG solution T_0	11.200	755.178	0.0176	85815
^{18}F -FDG T_c solution	10.777	506.461	0.0176	57552
^{18}F -FDG T_{EXP} solution	10.623	25.933	0.0176	2946.9
^{18}F -FDG T_{EXP} solution+1h	10.327	16.970	0.0176	1928.4

4.1.4 Protocollo di convalida del metodo analitico GC per la determinazione dei solventi residui

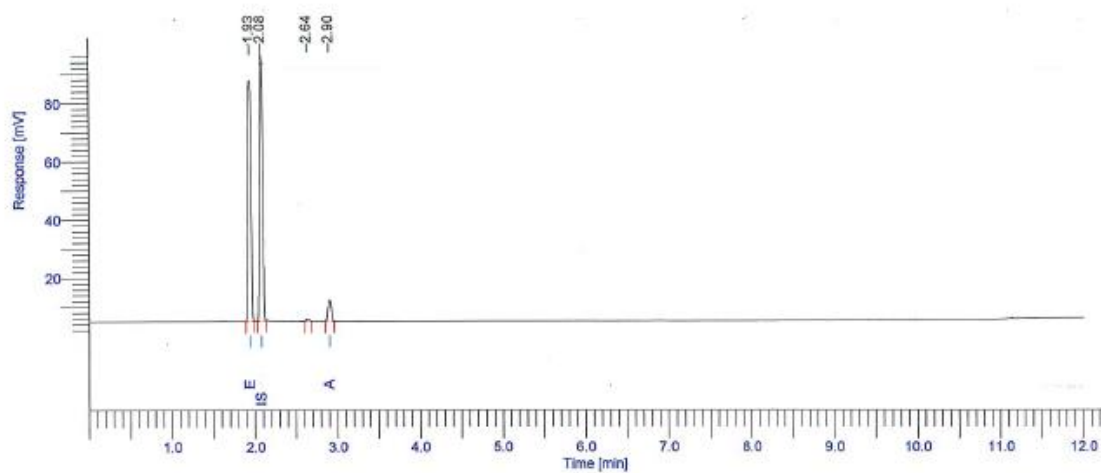
4.1.4.1 Valutazione della specificità del metodo analitico

Nell'analisi gascromatografica la specificità si ottiene quando il picco corrispondente alla sostanza specifica [^{18}F]FDG è ben separato dai picchi delle altre sostanze potenzialmente presenti nel campione. Sono stati quindi confrontati i cromatogrammi ottenuti dalla miscela di solventi da rilevare ovvero la Soluzione standard dei solventi in esame - Soluzione M4 (acetonitrile, isopropanolo e etanolo) e il prodotto addizionato con la stessa miscela di solventi – Soluzione S1. In caso di picchi interferenti, sono stati analizzati i cromatogrammi e la risoluzione tra ciascun picco del solvente è stata calcolata.

È stata verificata l'assenza di picchi non identificabili ed interferenti nel cromatogramma ottenuto dall'analisi della soluzione M4 come rappresentata in **Figura 35**. Per quanto riguarda la soluzione S1, invece, nessun picco relativo agli eccipienti, al principio attivo e alle impurezze ha interferito con i picchi dei solventi in esame come mostrato in **Figura 36**.

Software Version : 6.3.2.0646
Sample Name :
Instrument Name : Clarus 580
Rack/Vial : 0/0

Sample Amount : 1.000000
Cycle : 2
Channel : A
Dilution Factor : 1.000000



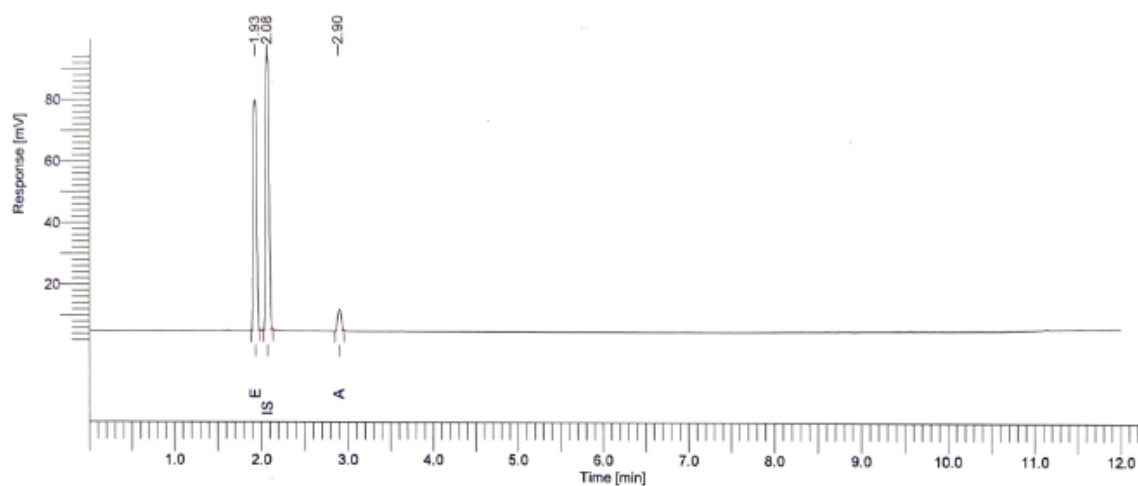
M4

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [μ V-s]	Height [μ V]	Area [%]
1	Etanolo	1.934	236848.26	82584.94	45.63
2	Isopropanolo	2.076	260817.48	91392.56	50.25
4	Acetonitrile	2.903	21419.10	7282.00	4.13

Figura 35: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione

M4.

Software Version	: 6.3.2.0646	Sample Amount	: 1.000000
Sample Name	:	Cycle	: 4
Instrument Name	: Clarus 580	Channel	: A
Rack/Vial	: 0/0	Dilution Factor	: 1.000000



S1

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [μ V-s]	Height [μ V]	Area [%]
1	Etanolo	1.934	213823.13	74573.43	43.68
2	Isopropanolo	2.075	254989.61	88749.87	52.09
3	Acetonitrile	2.902	20718.85	7068.12	4.23
			489531.58	170391.42	100.00

Figura 36: report strumentale del cromatogramma dell'iniezione della Soluzione

S1.

In caso di picchi interferenti, è stata calcolata la loro risoluzione R_s tramite la **Formula 3**.

Qualora siano presenti picchi attribuibili al principio attivo o agli eccipienti/impurezze, la loro risoluzione rispetto ai picchi dei solventi in esame

deve essere ≥ 1.5 . e anche la risoluzione tra i tre solventi residui deve essere ≥ 1.5 , in conformità ai criteri d'accettazione.

Nella **Tabella 19** sono stati riassunti i tempi di ritenzione per ciascun componente della soluzione M4.

Tabella 19: risultati della specificità del metodo analitico GC.

Solution M4 (mixture of acetonitrile, ethanol and acetic acid)		
Analyte	Retention time (min)	Resolution
Ethanol	1.834 min	N/A
Isopropanol	2.076 min	1.76
Acetonitrile	2.903 min	10.17

Dai dati ottenuti in questa soluzione non è risultato alcun picco interferente e relativamente alla soluzione S1, i risultati ottenuti hanno dimostrato che nessun picco relativo agli eccipienti, al principio attivo e alle impurezze interferisce con il picco dei solventi in esame. Pertanto, il metodo analitico preso in esame ha mostrato una buona specificità.

4.1.4.2 Valutazione del LOD

Questa concentrazione è definita come il limite inferiore di rilevabilità, ovvero la concentrazione minima alla quale l'analita produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco.

Il LOD è calcolato mediante la misura del rumore di fondo, misurato sul bianco, e il calcolo teorico del LOD, seguito dalla verifica sperimentale.

La determinazione del range del segnale (height max bianco) è misurata sull'analisi del bianco. La regione di integrazione per questi è stata calcolata partendo dal tempo di ritenzione dell'etanolo, isopropanolo e acetonitrile (soluzione M4) più o meno 5 volte l'ampiezza a metà altezza del picco.

Il calcolo teorico è stato effettuato tramite la **Formula 5**.

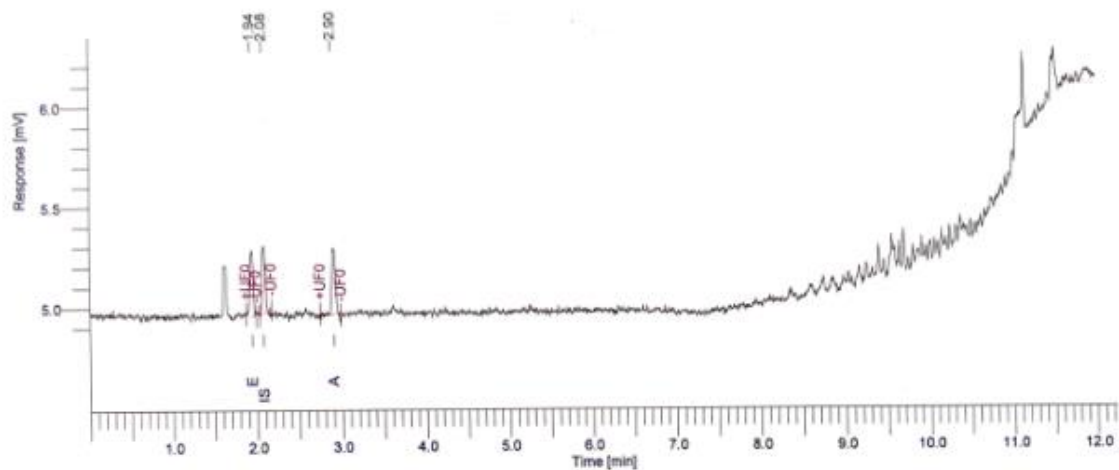
Successivamente è stata eseguita una valutazione sperimentale del LOD tramite analisi delle soluzioni di riferimento ottenute per diluizioni progressive della miscela di etanolo, isopropanolo e acetonitrile al limite di specifica (Soluzione M4).

Il rapporto segnale/rumore è stato calcolato usando l'equazione della **Formula 4**.

Il cromatogramma ottenuto relativo al test LOD è presente in **Figura 36**.

Software Version : 6.3.2.0646
Sample Name :
Instrument Name : Clarus 580
Rack/Vial : 0/0

Sample Amount : 1.000000
Cycle : 1
Channel : A
Dilution Factor : 1.000000



LOD

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [μV·s]	Height [μV]	Area [%]
1	Etanolo	1.940	913.93	321.52	31.98
2	Isopropanolo	2.077	942.56	331.08	32.98
3	Acetonitrile	2.901	1001.27	329.81	35.04
			2857.75	982.41	100.00

Figura 36: report strumentale del cromatogramma relativo al test LOD.

I risultati ottenuti sono raccolti in **Tabella 20**.

Tabella 20: risultati della valutazione del LOD del metodo analitico GC.

Analyte	Width at half- height in the solution M4	Retention time in the solution M4	Integration range width on black (min)	Time range	Maximum width (μ V)	Theoretical LOD3H/2 (μ V)	Experimental LOD (μ V)	Signal to noise	Signal to noise ≥ 3
Etanolo	0.048	1.934	0.48	1.694 min - 2.174 min	52	78	321.52	12.37	Sì
Isopropanolo	0.047	2.076	0.47	1.841 min - 2.311 min	46	69	331.08	14.39	Sì
Acetonitrile	0.049	2.903	0.49	2.658 min - 3.148 min	44	66	329.81	14.99	Sì

4.1.5 Protocollo di convalida del Bioburden in soluzioni bulk di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana

Lo scopo di questo protocollo è stato convalidare il metodo analitico di filtrazione su membrana utilizzato per la determinazione del bioburden in soluzioni bulk di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml, prima della filtrazione sterilizzante, prodotte presso l'officina radiofarmaceutica di ITEL Telecomunicazioni S.r.l.

L'esecuzione del presente protocollo di validazione ha permesso, quindi, di dimostrare l'assenza di un effetto batteriostatico e/o fungistatico della soluzione di prodotto testata, sulla crescita dei microrganismi ATCC (American Type Culture Collection) indicati in Farmacopea Europea (paragrafo 2.6.12) e sullo S. Epidermidis (ceppo isolato ambientale ITELPHARMA).

In riferimento ai campioni dei *controlli positivi* previsti dalle attività di convalida, la crescita di ciascun microrganismo ATCC testato sui differenti terreni di coltura è avvenuto entro i tempi di incubazione indicati nella **Tabella 9** e il numero di colonie (CFU) risultante è risultato compreso tra il 50 e 200 % rispetto al valore medio risultato dal relativo controllo del titolo (IT), come previsto dal criterio d'accettazione.

I campioni dei *controlli negativi senza prodotto e con prodotto filtrato* previsti dalle attività di convalida non hanno mostrato nessuna crescita dopo il periodo di incubazione previsto dalla **Tabella 9**.

Invece, i campioni dei *controlli negativi con prodotto non filtrato* (test bioburden) previsti dalle attività di convalida, dopo il periodo di incubazione previsto dalla **Tabella 9**, per piastra hanno presentato valori ≤ 10 CFU, come previsto dalle specifiche.

A conclusione del periodo d'incubazione, i microrganismi testati durante le prove di batteriostasi e fungistasi con il prodotto, hanno riportato una crescita comparabile (in termini di conta microbica) a quella osservata nei relativi controlli positivi (in assenza di prodotto), pertanto si può escludere la presenza di un'attività antimicrobica della soluzione bulk di prodotto sui microrganismi testati. In questo modo, il metodo analitico utilizzato è stato ritenuto idoneo per la determinazione del bioburden della soluzione bulk del prodotto (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml. Di seguito nella **Tabella 21** i risultati ottenuti.

Tabella 21: risultati microbiologici dei tre lotti usati per la convalida del metodo.

Microrganismo	<i>Lotto 1</i> (CFU/100 μl)	<i>Lotto 2</i> (CFU/100 μl)	<i>Lotto 3</i> (CFU/100 μl)	<i>Controllo positivo senza prodotto (CFU/100 μl)</i>	Valore medio (CFU/100 μl)
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	46	40	44	42
<i>Bacillus subtilis</i>	56	58	60	66	59

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70	74	72	68	62
<i>Candida albicans (TSA)</i>	62	66	68	64	62
<i>Candida albicans (SDA)</i>	72	76	76	80	62
<i>Aspergillus brasiliensis (TSA)</i>	72	68	60	56	68
<i>Aspergillus brasiliensis (SDA)</i>	68	72	58	68	68
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	80	82	80	76	88

4.1.6 Protocollo di convalida della Sterilità in soluzioni iniettabili di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo di filtrazione su membrana

Lo scopo di questo protocollo è stato convalidare il metodo analitico di filtrazione su membrana utilizzato per la determinazione della sterilità in soluzioni iniettabili di (^{18}F) Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml, prodotte presso l'officina radiofarmaceutica di ITEL Telecomunicazioni S.r.l.

L'esecuzione del presente protocollo di validazione ha permesso, quindi, di dimostrare l'assenza di un effetto batteriostatico e/o fungistatico della soluzione di prodotto testata, sulla crescita dei microrganismi ATCC (American Type Culture Collection) indicati in Farmacopea Europea (paragrafo 2.6.1) e sullo *S. Epidermidis* (ceppo isolato ambientale ITELPHARMA).

Secondo i criteri d'accettazione, in riferimento ai campioni dei *controlli positivi* previsti dalle attività di convalida, la crescita di ciascun microrganismo ATCC testato sui differenti terreni di coltura si è verificata entro i tempi di incubazione indicati nella **Tabella 11** e la crescita di ciascun microrganismo dei campioni del *controllo positivo del prodotto* è risultata visivamente confrontabile con quella osservata nel relativo campione del *controllo positivo senza prodotto*, e comunque entro 5 giorni.

Invece, i campioni del *controllo negativo* e del *controllo su prodotto* previsti dalle attività di convalida non hanno avuto nessuna crescita dopo il periodo di incubazione.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può escludere la presenza di un'attività antimicrobica del prodotto sui microrganismi testati, assumendo pertanto valido ed idoneo il metodo di convalida testato per la determinazione della sterilità del prodotto Fluodesossiglucosio (^{18}F) 1 GBq/ml.

4.1.7 Protocollo di convalida della determinazione delle Endotossine batteriche in soluzioni iniettabili di (^{18}F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml mediante metodo Cinetico-Cromogenico

4.1.7.1 Controllo negativo e convalida dell'operatore

Questo test è risultato convalidato in quanto i valori hanno rispettato i seguenti criteri di accettazione:

- il coefficiente di variazione (CV%) del campione, cioè la variazione tra i tempi di reazione delle 2 repliche nei canali 1 e 3, senza endotossine CSE, (*Control Standard Endotoxin*), ha presentato un valore < del 25%;
- il coefficiente di variazione (CV%) dello *spike* (campione a cui è stata aggiunta una quantità nota di endotossina standard), cioè la variazione tra i tempi di reazione delle 2 repliche nei canali 2 e 4, è risultato < del 25%;
- il recupero percentuale dello *spike* (*spike recovery*), cioè la percentuale di endotossina recuperata nei canali 2 e 4, ha registrato un valore compreso nel range del 50-200% del valore teorico riportato sul certificato di analisi del fornitore;

- il risultato relativo al “test suitability” è risultato conforme;
- il contenuto endotossinico (*sample value*) è stato $\leq 0,05$ EU/ml.

I risultati ottenuti da questo test sono stati raccolti nella seguente **Tabella 22**.

Tabella 22: risultati del controllo negativo della convalida del metodo analitico delle endotossine batteriche.

<i>Sample</i>	<i>Spike recovery %</i>	<i>CV % (sample channel)</i>	<i>CV % (spike channel)</i>	<i>Sample value</i>	<i>Test suitability* (PASS/FAIL)</i>	<i>Sample value ≤ 0.05 EU/mL</i>
LWR	153%	0.0%	3.7%	< 0.05 EU/mL	PASS	Sì

4.1.7.2 *Determinazione dell'inibizione/attivazione del prodotto testato sul lisato*

Calcolo della Massima Diluizione Valida

La Massima Diluizione Valida (MVD) rappresenta la massima diluizione alla quale può essere sottoposta la soluzione “campione” da testare per la ricerca di endotossine batteriche.

Questa dipende dalla sensibilità del lisato contenuto all'interno delle cartucce. Per determinare la MVD è stato necessario determinare il Limite Endotossinico (EL),

cioè la quantità massima di endotossine/ml di soluzione “campione” ammissibile nel prodotto.

La MVD è data dalla formula:

$$MVD = \frac{EL(\frac{EU}{ml})}{\lambda(\frac{EU}{ml})}$$

dove:

- EL = limite endotossinico, ovvero quantità massima di endotossine/ml di soluzione campione ammissibile nel prodotto
- λ = limite di sensibilità dichiarata della cartuccia che si utilizza (0.05 EU/ml)

Per il prodotto (^{18}F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml, il limite endotossinico è stato calcolato come segue:

$$EL = \frac{175EU}{V} = 17,5 \text{ EU/ml}$$

dove:

175 EU= massimo contenuto di endotossine per massimo volume iniettabile;

V = massimo volume iniettabile del prodotto (10 ml).

Pertanto, il valore massimo di diluizione MVD è risultato di 1:350.

Studio preliminare sul pH delle soluzioni test

E' stato verificato che il pH della soluzione del prodotto (^{18}F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml da testare, rientri nel range di pH tra 6-8 come indicato nella Farmacopea Europea. Il prodotto è stato diluito 1:175 con LRW (MVD/2=175) ovvero 4 μl (^{18}F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml sono stati aggiunti a 696 μl di LRW. Il pH della soluzione diluita è risultato conforme al criterio d'accettazione tra 6 e 8. Il test è stato ripetuto per tre lotti differenti di (^{18}F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml.

I risultati ottenuti sono raccolti nella seguente **Tabella 23**.

Tabella 23: risultati della verifica del valore pH della soluzione test per la validazione del metodo per la determinazione delle endotossine mediante Endosafe PTS.

	pH LRW	6.65
Lotto 1	pH [^{18}F]FDG	5.63
	pH [^{18}F]FDG diluito 1:175	7.40
Lotto 2	pH [^{18}F]FDG	5.69
	pH [^{18}F]FDG diluito 1:175	6.66
Lotto 3	pH [^{18}F]FDG	5.59
	pH [^{18}F]FDG diluito 1:175	7.28

Verifica dell'assenza di interferenza della soluzione test ad una determinata diluizione sulla reazione lisato/endotossina

Dopo aver formato la soluzione “test” di (¹⁸F)Fluodesossiglucosio 1 GBq/ml, con una diluizione 1:175 (inferiore alla MVD) con diluente LRW, sono stati dispensati 25 µl della diluizione da testare in ciascuno dei 4 pozzetti della cartuccia ed è stato avviato il test. La verifica è stata eseguita su tre lotti di produzione.

Il test è risultato convalidato in quanto i valori hanno rispettato i criteri d'accettazione descritti nel test del Controllo negativo e dell'operatore e il contenuto endotossinico del campione è risultato ≤ 17.5 EU/ml. I risultati ottenuti sono raccolti nella seguente **Tabella 24**.

Tabella 24: risultati per la verifica dell'assenza di interferenze della soluzione in esame sulla reazione lisato/endotossina.

Lotto 1 ([¹⁸ F]FDG diluted 1:175)	Spike recovery %	CV % (sample channel)	CV % (spike channel)	Sample value	Test suitability (PASS/FAIL)	Sample value ≤ 17.5 EU/mL
	137%	0.0%	4.2%	< 8.75 EU/mL	PASS	Yes
Lotto 2 ([¹⁸ F]FDG diluted 1:2175)	Spike recovery %	CV % (sample channel)	CV % (spike channel)	Sample value	Test suitability (PASS/FAIL)	Sample value ≤ 17.5 EU/mL
	109%	0.0%	14.9%	< 8.75 EU/mL	PASS	Yes
Lotto 3 ([¹⁸ F]FDG diluted 1:175)	Spike recovery %	CV % (sample channel)	CV % (spike channel)	Sample value	Test suitability (PASS/FAIL)	Sample value ≤ 17.5 EU/mL
	95%	0.0%	8.4%	< 8.75 EU/mL	PASS	Yes

4.2 Convalida di Processo e Studi di Stabilità

Il prodotto farmaceutico, Fluodesossiglucosio (^{18}F) ITELPHARMA 1 GBq/mL, è formulato come soluzione iniettabile sterile, da somministrare per via endovenosa ed è fornito in *vial* multidose. Ogni flaconcino contiene da 0.5 mL a 10 mL di Fluodesossiglucosio (^{18}F) ITELPHARMA 1 GBq/mL alla data e ora di calibrazione.

Lo step finale, di questo lavoro, è stato quello di effettuare la convalida dell'intero processo produttivo attraverso la redazione e l'esecuzione di un protocollo di *Process Validation* in cui sono stati eseguiti almeno 3 lotti di prodotto per ciascun modulo di sintesi utilizzato, precisamente 3 lotti per il modulo *FastLab* e 4 lotti per il modulo *Trasis All in One*.³³

Sugli stessi lotti usati per il protocollo della convalida di processo è stato eseguito uno studio di stabilità per confermare che la qualità del prodotto sia soddisfacente per tutta la durata di conservazione proposta. La durata di conservazione (*shelf life*) del prodotto farmaceutico è stata definita di 12 ore dopo la data e l'ora di produzione (t_0).

Lo studio è stato eseguito su campioni prodotti utilizzando il metodo descritto precedentemente nel paragrafo “Materiali e Metodi”, con la stessa formulazione e nello stesso contenitore e chiusura proposti per la commercializzazione. Lo scopo è stato quello di rilevare eventuali problemi di stabilità associati alla formulazione e/o al packaging proposto per l'immissione in commercio. Attraverso lo studio di stabilità è stata indirettamente dimostrata la compatibilità degli eccipienti utilizzati

per formulare la sostanza farmaceutica e del packaging primario con il prodotto farmaceutico e la radioattività. Non è stata effettuata alcuna valutazione della stabilità del farmaco in condizioni di luce e umidità anomale, in quanto il prodotto è confezionato in un flacone di vetro sigillato (che fornisce una barriera permanente al passaggio di umidità), a sua volta contenuto in un contenitore schermante (tungsteno o piombo), inserito all'interno di un confezionamento secondario predisposto al trasporto del radiofarmaco (**Figura 37**).



Figura 37: confezionamento per il trasporto del radiofarmaco.

Lo studio di stabilità è stato eseguito sugli stessi lotti prodotti per lo scopo di validazione del processo. I lotti del farmaco sono stati analizzati dopo un periodo di conservazione sia a temperatura ambiente $25 \pm 1^\circ\text{C}$ che a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, dopo 12 ore dalla fine della produzione. Poiché la chiusura del contenitore esclude l'umidità dal prodotto, le fiale sono state conservate nelle condizioni di umidità ambientale prevalenti nel luogo di conservazione.

Il prodotto farmaceutico è stato testato immediatamente dopo la produzione (t_0) e 12 ore dopo la produzione. Di seguito nelle **Tabelle 25 - 31** sono stati riportati i risultati relativi agli studi di stabilità dei vari lotti prodotti.

Tabella 25: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 1 (prodotto con modulo di sintesi *FastLab*)

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			$25 \pm 1^\circ\text{C}$	$40 \pm 1^\circ\text{C}$
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma $0.511 \text{ MeV} \pm 5\%$. A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.512 MeV	0.516 MeV	0.516 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	109.8 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di $[^{19}\text{F}]\text{-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio}$	Conforme	Non Verificato	Non verificato

pH	4.5 – 8.5	5.52	5.45	5.45
Purezza Chimica (Test A)	FDG $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ CIDG $\leq 50 \mu\text{g/mL}$	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) $\leq 0.22 \text{ mg/mL}$	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile $\leq 0.410 \text{ mg/mL}$ Etanolo $\leq 5.0 \text{ mg/mL}$ Isopropanolo $\leq 5.0 \text{ mg/mL}$	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ^{18}F deve essere $\geq 99,9 \%$ della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze $\leq 0.1\%$ della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM} \geq 95\%$ della totale radioattività dovuta a ^{18}F $[^{18}\text{F}]\text{FDM} \leq 10\%$ della radioattività dovuto a $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ + $[^{18}\text{F}]\text{FDM}$	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.5%	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.86%	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.80%
Purezza Radiochimica (Test B)	$^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM} \geq 95\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F $[^{18}\text{F}] + \text{derivati acetilati} \leq 5\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} +$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	$\leq 17.5 \text{ IU/ml}$	Conforme	Non verificato	Non verificato

Integrità pre-filtro	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.11 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.03 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 26: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 2 (prodotto con modulo di sintesi *FastLab*)

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			$25 \pm 1^\circ\text{C}$	$40 \pm 1^\circ\text{C}$
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma $0.511\text{ MeV} \pm 5\%$. A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.504 MeV	0.494 MeV	0.498 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	110.4 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione	Conforme	Non verificato	Non verificato

	di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio			
pH	4.5 – 8.5	5.16	5.14	5.09
Purezza Chimica (Test A)	FDG ≤ 50 µg/mL CIDG ≤ 50 µg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) ≤ 0.22 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile ≤ 0.410 mg/mL Etanolo ≤ 5.0 mg/mL Isopropanolo ≤ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ¹⁸ F deve essere ≥ 99,9 % della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze ≤ 0.1% della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	[¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM ≥ 95% della totale radioattività dovuta a ¹⁸ F [¹⁸ F]FDM ≤ 10% della radioattività dovuto a [¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.42%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.44%
Purezza Radiochimica (Test B)	¹⁸ FDG + ¹⁸ FDM ≥ 95% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F [¹⁸ F] + derivati acetilati ≤ 5% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato

Endotossine batteriche	≤ 17.5 IU/ml	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.07 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.01 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 27: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 3 (prodotto con modulo di sintesi *FastLab*).

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			25 ± 1 °C	40 ± 1 °C
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma 0.511 MeV $\pm 5\%$. A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.514 MeV	0.510 MeV	0.506 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	109.8 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco	Conforme	Non verificato	Non verificato

	ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro- 2-deossi-D-glucosio			
pH	4.5 – 8.5	5.66	5.81	5.77
Purezza Chimica (Test A)	FDG ≤ 50 µg/mL CIDG ≤ 50 µg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) ≤ 0.22 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile ≤ 0.410 mg/mL Etanolo ≤ 5.0 mg/mL Isopropanolo ≤ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ¹⁸ F deve essere ≥ 99,9 % della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze ≤ 0.1% della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	[¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM ≥ 95% della totale radioattività dovuta a ¹⁸ F [¹⁸ F]FDM ≤ 10% della radioattività dovuto a [¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.09%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.06%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.22%
Purezza Radiochimica (Test B)	¹⁸ FDG + ¹⁸ FDM ≥ 95% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F [¹⁸ F] + derivati acetilati ≤ 5% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%

Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	≤ 17.5 IU/ml	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.10 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.15 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 28: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 1 (prodotto con modulo di sintesi *Trasis All in One*).

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			25 ± 1 °C	40 ± 1 °C
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma $0.511 \text{ MeV} \pm 5\%$. A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.514 MeV	0.512 MeV	0.516 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	110.4 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha	Conforme	Non verificato	Non verificato

	approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio			
pH	4.5 – 8.5	6.9	6.94	6.91
Purezza Chimica (Test A)	FDG ≤ 50 µg/mL CIDG ≤ 50 µg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) ≤ 0.22 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile ≤ 0.410 mg/mL Etanolo ≤ 5.0 mg/mL Isopropanolo ≤ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ¹⁸ F deve essere ≥ 99,9 % della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze ≤ 0.1% della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	[¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM ≥ 95% della totale radioattività dovuta a ¹⁸ F [¹⁸ F]FDM ≤ 10% della radioattività dovuto a [¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.22 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100%
Purezza Radiochimica (Test B)	¹⁸ FDG + ¹⁸ FDM ≥ 95% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.65 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 100 %

	[¹⁸ F] + derivati acetilati ≤ 5% della radioattività totale dovuta al ¹⁸ F			
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	≤17.5 IU/ml	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.05 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.05 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 29: risultati della convalida di processo (T₀) e dello studio di stabilità del Lotto 2 (prodotto con modulo di sintesi *Trasis All in One*).

Test	Specifiche	T ₀	12 ore	
			25 ± 1 °C	40 ± 1 °C
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma 0.511 MeV ±5% . A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.510 MeV	0.502 MeV	0.504 MeV

Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	109.8 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio- cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro- 2-deossi-D-glucosio	Conforme	Non verificato	Non verificato
pH	4.5 – 8.5	6.28	6.16	6.26
Purezza Chimica (Test A)	FDG ≤ 50 µg/mL CIDG ≤ 50 µg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) ≤ 0.22 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile ≤ 0.410 mg/mL Etanolo ≤ 5.0 mg/mL Isopropanolo ≤ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ¹⁸ F deve essere ≥ 99,9 % della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze ≤ 0.1% della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	[¹⁸ F]FDG + [¹⁸ F]FDM ≥ 95% della totale radioattività dovuta a ¹⁸ F	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 98.83 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.32 %	[¹⁸ F]FDG+ [¹⁸ F]FDM: 99.51 %

	$[^{18}\text{F}]\text{FDM} \leq 10\%$ della radioattività dovuto a $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$			
Purezza Radiochimica (Test B)	$^{18}\text{F}\text{DG} + ^{18}\text{F}\text{FDM} \geq 95\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F $[^{18}\text{F}] + \text{derivati acetilati} \leq 5\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$: 99.63 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$: 100 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$: 100 %
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	$\leq 17.5 \text{ IU/ml}$	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	$> 3.45 \text{ bar}$ (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.06 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	$> 3.45 \text{ bar}$ (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.08 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 30: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 3 (prodotto con modulo di sintesi *Trasis All in One*).

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			$25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$	$40 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma 0.511 MeV $\pm$ 5% . A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.510 MeV	0.508 MeV	0.506 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	109.8 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di [¹⁹ F]-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio	Conforme	Non verificato	Non verificato
pH	4.5 – 8.5	5.44	5.44	5.43
Purezza Chimica (Test A)	FDG $\leq$ 50 μ g/mL CIDG $\leq$ 50 μ g/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) $\leq$ 0.22 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile $\leq$ 0.410 mg/mL Etanolo $\leq$ 5.0 mg/mL Isopropanolo $\leq$ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ¹⁸ F deve essere $\geq$ 99,9 % della radioattività totale	100%	100%	100%

Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze $\leq 0.1\%$ della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM} \geq 95\%$ della totale radioattività dovuta a ^{18}F $[^{18}\text{F}]\text{FDM} \leq 10\%$ della radioattività dovuto a $[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM}$	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100%	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100%	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100%
Purezza Radiochimica (Test B)	$^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM} \geq 95\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F $[^{18}\text{F}] + \text{derivati acetilati} \leq 5\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100%	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100%
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	≤ 17.5 IU/ml	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.05 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	> 3.45bar (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.03 bar	Non verificato	Non verificato

Tabella 31: risultati della convalida di processo (T_0) e dello studio di stabilità del Lotto 4 (prodotto con modulo di sintesi *Trasis All in One*).

Test	Specifiche	T_0	12 ore	
			$25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	$40 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
Aspetto	Soluzione chiara, incolore o leggermente giallina, essente da particelle	Conforme	Conforme	Conforme
Identificazione (Test A)	Energia di emissione gamma $0.511\text{ MeV} \pm 5\%$. A seconda della geometria della misura, si può osservare un picco somma di 1.022 MeV	0.508 MeV	0.506 MeV	0.510 MeV
Identificazione (Test B)	Tempo di emivita compreso tra 105 e 115 minuti	108 min	Non verificato	Non verificato
Identificazione (Test C)	Il picco principale del radio-cromatogramma ha approssimativamente lo stesso tempo di ritenzione del picco ottenuto dal detector amperometrico per la soluzione di riferimento di $[^{19}\text{F}]\text{-2-fluoro-2-deossi-D-glucosio}$	Conforme	Non verificato	Non verificato
pH	4.5 – 8.5	5.33	5.56	5.53
Purezza Chimica (Test A)	$\text{FDG} \leq 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ $\text{CIDG} \leq 50\text{ }\mu\text{g/mL}$	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Chimica (Test B)	Amminopolietere (Kryptofix) $\leq 0.22\text{ mg/mL}$	Conforme	Conforme	Conforme

Purezza Chimica (solventi residui – Test C)	Acetonitrile ≤ 0.410 mg/mL Etanolo ≤ 5.0 mg/mL Isopropanolo ≤ 5.0 mg/mL	Conforme	Conforme	Conforme
Purezza Radionuclidica (Test A)	Il ^{18}F deve essere $\geq 99,9$ % della radioattività totale	100%	100%	100%
Purezza Radionuclidica (Test B)	La radioattività totale dovuta ad impurezze $\leq 0.1\%$ della radioattività totale	Conforme	Non verificato	Non verificato
Purezza Radiochimica (Test A)	$[^{18}\text{F}]\text{FDG} + [^{18}\text{F}]\text{FDM} \geq 95\%$ della totale radioattività dovuta a ^{18}F $[^{18}\text{F}]\text{FDM} \leq 10\%$ della radioattività dovuto a $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ + $[^{18}\text{F}]\text{FDM}$	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.30 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.14 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.28 %
Purezza Radiochimica (Test B)	$^{18}\text{FDG} + ^{18}\text{FDM} \geq 95\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F $[^{18}\text{F}]$ + derivati acetilati $\leq 5\%$ della radioattività totale dovuta al ^{18}F	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 99.76 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %	$[^{18}\text{F}]\text{FDG}+$ $[^{18}\text{F}]\text{FDM}:$ 100 %
Sterilità	Sterile	Conforme	Non verificato	Non verificato
Endotossine batteriche	≤ 17.5 IU/ml	Conforme	Non verificato	Non verificato
Integrità pre-filtro	$> 3.45\text{bar}$ (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.12 bar	Non verificato	Non verificato
Integrità filtro finale	$> 3.45\text{bar}$ (or 50 psi) in accordo ai dati del fornitore	4.05 bar	Non verificato	Non verificato

I dati di stabilità indicano che il prodotto farmaceutico ha soddisfatto costantemente le specifiche nel momento in cui è stato eseguito il test. La temperatura di conservazione non ha avuto alcun effetto significativo sulle caratteristiche di qualità del prodotto farmaceutico, pur superando la propria *shelf life*. Inoltre, il radiofarmaco è risultato stabile nella formulazione proposta e nel sistema di contenimento primario, e quindi adatto all'uso previsto fino a 12 ore dopo la produzione. Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti, per il prodotto farmaceutico è stata proposta una durata di conservazione fino a 12 ore dopo la produzione se conservato a una temperatura non superiore a 40°C.

5. CONCLUSIONI

Il lavoro di dottorato si è focalizzato sullo sviluppo di un processo in asepsi di un radiofarmaco altamente utilizzato in ambito diagnostico tramite tecnica PET: il Fluodesossiglucosio con un'attività di 1 GBq/ml. L'intero processo di produzione e rilascio del radiofarmaco è stato sottoposto a convalida, sia relativamente alle metodiche analitiche (chimiche e microbiologiche) e sia relativamente agli studi di stabilità. Attraverso l'esecuzione del lavoro di convalida è stato possibile stabilire che:

- tutti i lotti di validazione prodotti nel sito sono risultati conformi analiticamente alle specifiche richieste;
- non sono emerse divergenze né nelle procedure operative e di fabbricazione né nella conformità alle specifiche indicate.

Si ritiene che la convalida del processo di produzione del Fluodesossiglucosio (^{18}F) ITELPHARMA 1 GBq/mL sia stata completata in modo soddisfacente.

I risultati del lavoro svolto hanno dimostrato che il processo di produzione in asepsi del radiofarmaco in oggetto, se gestito entro i parametri stabiliti, produce lotti costantemente conformi alle specifiche. Tutti i risultati dei test relativi all'identità, all'aspetto e alla purezza sono rientrati nei criteri d'accettazione. Anche i risultati microbiologici dei lotti relativi alla sterilità e alle endotossine sono risultati pienamente conformi. I dati hanno mostrato anche conformità alle specifiche al termine della loro *shelf life*, come dimostrato dagli studi di stabilità effettuati.

Pertanto, è possibile concludere che il processo di produzione di Fluodesossiglucosio (^{18}F) ITELPHARMA 1 GBq/mL in asepsi risulta essere robusto, riproducibile, affidabile e conforme ad alti standard di qualità.

Utilizzando questi dati di convalida, è stato allestito un dossier di registrazione per il prodotto di titolarità ITEL, ed è stato sottomesso presso l'Autorità Regolatoria Nazionale (AIFA-Agenzia Italiana del Farmaco), al fine di ottenere idonea titolarità AIC (Autorizzazione all'Immissione in Commercio).

Questa molecola andrebbe dunque ad ampliare il portfolio di prodotti radiofarmaceutici allestiti presso il sito produttivo di ITELPHARMA. Pur trattandosi di un radiofarmaco equivalente ad altre specialità già presenti sul mercato da molti anni, aiuta a far fronte alle crescenti richieste da parte delle medicine nucleari delle strutture ospedaliere limitrofe, garantendo in tal modo la continuità operativa degli esami diagnostici.

Inoltre, ciò che differenzia un farmaco coperto da AIC da un galenico, prodotto in accordo a monografie della Farmacopea Europea e alle norme di buona preparazione (NBP), è il maggior grado di qualità, efficacia e sicurezza, certificati dall'ente regolatorio AIFA, a seguito di ispezioni periodiche, atte a verificare la produzione secondo le norme GMP e, conseguentemente, a emettere le autorizzazioni alla produzione e/o i certificati GMP presso l'officina di produzione dei medicinali.

Ciò non accade, invece, per le preparazioni galeniche magistrali o officinali, prodotti secondo monografie presenti in Farmacopea Europea, e regolamentate dalle NBP.

In data 13/11/2024 l'azienda ha ricevuto da AIFA la determina per l'autorizzazione all'immissione in commercio del radiofarmaco FLUODESOSSIGLUCOSIO (^{18}F) ITELPHARMA, raggiungendo, in questo modo, lo scopo del lavoro di dottorato svolto.

Bibliografia

- ¹ Frey, K. A., Royal, H. D., Di Carli, M. F., Dillehay, G. L., Gordon, L., Mankoff, D. A., O'Malley, J., Ramanna, L., Rohren, E., Segall, G. M., Shulkin, B. L., Wallis, J. W., & Ziessman, H. A. (2011). ABNM position statement: Nuclear medicine professional competency and scope of practice. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 52(6), 994–997. <https://doi.org/10.2967/jnumed.111.089979>
- ² Compendio di radiochimica e radiofarmacia, Sergio Todde & Stefano Boschi, Edizione Minerva Medica, 2020.
- ³ Chimica farmaceutica, Gualtieri, Casa Editrice Ambrosiana-Zanichelli, 2020.
- ⁴ Vallabhajosula, S. (2009). *Molecular imaging: radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Springer Science & Business Media.
- ⁵ Wadsak, W., & Mitterhauser, M. (2010). Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *European journal of radiology*, 73(3), 461–469.
- ⁶ Tesse, G.; Tolomeo, A.; De Filippis, B.; Giampietro, L. Radiolabeled Probes from Derivatives of Natural Compounds Used in Nuclear Medicine. *Molecules* **2024**, 29, 4260. <https://doi.org/10.3390/molecules29174260>
- ⁷ Lacoeuille, F., Arlicot, N., & Faivre-Chauvet, A. (2018). Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopharmaceutical and clinical aspects. *Médecine Nucléaire*, 42(1), 32–44.
- ⁸ Salih, S., Alkatheeri, A., Alomaim, W., & Elliyanti, A. (2022). Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(16), 5231. <https://doi.org/10.3390/molecules27165231>
- ⁹ Yeong, C. H., Cheng, M. H., & Ng, K. H. (2014). Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15(10), 845–863. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400131>
- ¹⁰ Asadian, S., Mirzaei, H., Kalantari, B. A., Davarpanah, M. R., Mohamadi, M., Shpichka, A., Nasehi, L., Es, H. A., Timashev, P., Najimi, M., Gheibi, N., Hassan, M., & Vosough, M. (2020). β -radiating radionuclides in cancer treatment, novel insight into promising approach. *Pharmacological research*, 160, 105070. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105070>
- ¹¹ Sgouros, G., Bodei, L., McDevitt, M. R., & Nedrow, J. R. (2020). Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(9), 589–608. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
- ¹² Ferrier, M. G., & Radchenko, V. (2019). An Appendix of Radionuclides Used in Targeted Alpha Therapy. *Journal of medical imaging and radiation sciences*, 50(4 Suppl 1), S58–S65. <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2019.06.051>
- ¹³ James, S. S., Bednarz, B., Benedict, S., Buchsbaum, J. C., Dewaraja, Y., Frey, E., ... & Xiao, Y. (2021). Current status of radiopharmaceutical therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 109(4), 891–901.
- ¹⁴ Elliyanti, A. (2021). Radioiodine for Graves' Disease Therapy. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.96949
- ¹⁵ Slonimsky, E., & Tulchinsky, M. (2020). Radiotheragnostics Paradigm for Radioactive Iodine (Iodide) Management of Differentiated Thyroid Cancer. *Current pharmaceutical design*, 26(31), 3812–3827. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200605121054>
- ¹⁶ Luster, M.; Pfestroff, A.; Hänscheid, H.; Verburg, F.A. Radioiodine Therapy. *Semin. Nucl. Med.* 2017, 47, 126–134.
- ¹⁷ Fard-Esfahani, A., Emami-Ardekani, A., Fallahi, B., Fard-Esfahani, P., Beiki, D., Hassanzadeh-Rad, A., & Eftekhari, M. (2014). Adverse effects of radioactive iodine-131 treatment for differentiated thyroid carcinoma. *Nuclear medicine communications*, 35(8), 808–817.
- ¹⁸ Oei, A. L., Verheijen, R. H., Seiden, M. V., Benigno, B. B., Lopes, A., Soper, J. T., Epenetos, A. A., & Massuger, L. F. (2007). Decreased intraperitoneal disease recurrence in epithelial ovarian cancer patients receiving intraperitoneal consolidation treatment with yttrium-90-labeled murine HMFG1 without improvement in overall survival. *International journal of cancer*, 120(12), 2710–2714. <https://doi.org/10.1002/ijc.22663>

- ¹⁹ Waldmann, T. A., White, J. D., Carrasquillo, J. A., Reynolds, J. C., Paik, C. H., Gansow, O. A., Brechbiel, M. W., Jaffe, E. S., Fleisher, T. A., Goldman, C. K., Top, L. E., Bamford, R., Zaknoen, E., Roessler, E., Kasten-Sportes, C., England, R., Litou, H., Johnson, J. A., Jackson-White, T., Manns, A., ... Nelson, D. L. (1995). Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac. *Blood*, 86(11), 4063–4075.
- ²⁰ Nisa, L., Savelli, G., & Giubbini, R. (2011). Yttrium-90 DOTATOC therapy in GEP-NET and other SST2 expressing tumors: a selected review. *Annals of nuclear medicine*, 25(2), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s12149-010-0444-0>
- ²¹ Otte, A., Herrmann, R., Heppeler, A., Behe, M., Jermann, E., Powell, P., ... & Muller, J. (1999). Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. *European journal of nuclear medicine*, 26, 1439–1447.
- ²² Ferdinandus, J., Violet, J., Sandhu, S., & Hofman, M. S. (2018). Prostate-specific membrane antigen theranostics: therapy with lutetium-177. *Current opinion in urology*, 28(2), 197–204.
- ²³ Chen, X., Tan, F., Liang, R., Liao, J., Yang, J., Lan, T., Yang, Y., Liu, N., & Li, F. (2024). A Proof-of-Concept Study on the Theranostic Potential of ¹⁷⁷Lu-labeled Biocompatible Covalent Polymer Nanoparticles for Cancer Targeted Radionuclide Therapy. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 30(9), e202303298. <https://doi.org/10.1002/chem.202303298>
- ²⁴ Rubini, G., Nicoletti, A., Rubini, D., & Asabella, A. N. (2014). Radiometabolic treatment of bone-metastasizing cancer: from 186rhenium to 223radium. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 29(1), 1–11.
- ²⁵ Abramenkova, A., Hariri, M., Spiegelberg, D., Nilsson, S., & Stenerlöv, B. (2022). Ra-223 induces clustered DNA damage and inhibits cell survival in several prostate cancer cell lines. *Translational oncology*, 26, 101543. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101543>
- ²⁶ Navalkissoor, S., & Grossman, A. (2019). Targeted Alpha Particle Therapy for Neuroendocrine Tumours: The Next Generation of Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Neuroendocrinology*, 108(3), 256–264. <https://doi.org/10.1159/000494760>
- ²⁷ Rosar, F., Krause, J., Bartholomä, M., Maus, S., Stemler, T., Hierlmeier, I., Linxweiler, J., Ezziddin, S., & Khreish, F. (2021). Efficacy and Safety of [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 Augmented [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Patients with Highly Advanced mCRPC with Poor Prognosis. *Pharmaceutics*, 13(5), 722. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050722>
- ²⁸ Libro “Production and Quality Control of Fluorine-18 Labelled Radiopharmaceuticals”, IAEA.
- ²⁹ Campbell, E., Jordan, C., & Gilmour, R. (2023). Fluorinated carbohydrates for 18F-positron emission tomography (PET). *Chemical Society reviews*, 52(11), 3599–3626. <https://doi.org/10.1039/d3cs00037k>
- ³⁰ Pajak, B., Siwiak, E., Sołtyka, M., Priebe, A., Zieliński, R., Fokt, I., Ziemniak, M., Jaśkiewicz, A., Borowski, R., Domoradzki, T., & Priebe, W. (2019). 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 234. <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>
- ³¹ Caracó, C., Aloj, L., Chen, L. Y., Chou, J. Y., & Eckelman, W. C. (2000). Cellular release of [18F]2-fluoro-2-deoxyglucose as a function of the glucose-6-phosphatase enzyme system. *The Journal of biological chemistry*, 275(24), 18489–18494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908096199>
- ³² EudraLex—Volume 4—Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Annex 1 “Manufacture of Sterile Medicinal Products”
- ³³ EudraLex—Volume 4—Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Annex 15 “Qualification and Validation”
- ³⁴ Farmacopea Europea, Monografia “Fludeoxyglucose (¹⁸F) Injection”, edizione corrente.
- ³⁵ Linee guida: ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- ³⁶ EudraLex—Volume 4—Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines, Annex 3 “Manufacture of Radiopharmaceuticals”.
- ³⁷ Libro “Radiopharmaceutical Chemistry”
- ³⁸ EMA human and veterinary notes for guidance on manufacture of the finished dosage form – CPMP/QWP/486/95.
- ³⁹ Farmacopea Europea, paragrafo 2.6.14, edizione corrente.
- ⁴⁰ Comparison of various Requirements of the Quality Assurance Procedures for 18F-FDG injection, Joseph C. Hung, J Nucl Med, 2002; 43: 1495-1506.