



TESI DOCTORAL

**VALIDACIÓ  
DE RADIOFÀRMACS PET  
PER AL SEU ÚS EN HUMANS**

ÈLIA TORRENT LLONGARRIU

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, DE TERAPÈUTICA I DE TOXICOLOGIA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2014

## VALIDACIÓ DE RADIOFÀRMACS PET PER AL SEU ÚS EN HUMANS

Èlia Torrent Llongarriu

**Doctorant**

Deborah Pareto Onghena

**Directora**

Dra. en Ciències Físiques

Unitat de Ressonància Magnètica (IDI)

Hospital Vall d'Hebron

Encarna García Montoya

**Codirectora**

Dra. en Farmàcia

Professora titular del departament de  
Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la  
Universitat de Barcelona

Magí Farré Albaladejo

**Tutor**

Catedràtic del departament de Farmacologia,

de Terapèutica i de Toxicologia de la

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia

Programa de Doctorat de Farmacologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2014



La **Dra. Deborah Pareto Onghena** Dra. en Ciències Físiques de la Unitat de Resonància Magnètica (IDI) de l'Hospital Vall d'Hebron i **Dra. Encarna García Montoya** Dra. en Farmàcia Professora titular del departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Universitat de Barcelona.

### FAN CONSTAR

Que el treball titulat “**Validació de radiofàrmacs PET per al seu ús en humans**”, l'autora del qual és **Èlia Torrent Llongarriu**, ha estat realitzat sota la seva direcció i que compleix amb les condicions exigides per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.



Dra. Deborah Pareto Onghena



Dra. Encarna García Montoya



Vist i plau del Tutor,

Dr. Magí Farré Albaladejo

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia

Barcelona, 15 d'octubre del 2014



## ***Agraiments***



Bé, ha arribat el moment que tant esperava, escriure els agraïments, senyal que estic finalitzant la tesi, fet que encara no m'acabo de creure.

Primer de tot començaré pels que l'han fet possible, els meus excompanys de CRC-CIM, un equip multidisciplinari, molt diferents els uns dels altres. Vàrem viure etapes difícils i les vàrem saber superar, perquè crèiem amb el que fèiem i en la seva utilitat, segurament això defineix el "no sé què" que ens feia aficionar a la feina i en intentar les coses, una vegada rere l'altre, encara que no sortissin. Miro enrere i veig una etapa dura que em va fer créixer personalment i tot seguit em venen els bons records i els grans moments com els èxits en els estudis, els partits de vòlei platja, els sopars... Gràcies a tots vosaltres per la feina ben feta, per animar-me a acabar la tesi i per tot el vostre suport. El que presento, tot, ho he après de vosaltres. En especial i afectuosament gràcies PETS!.

A la meva companya i directora de tesi, Dra. Deborah Pareto, perquè m'ho has fet tot molt fàcil. De seguida ens vàrem entendre i aconseguirem la suficiència investigadora. Perquè vàrem superar el fet de no poder tirar endavant el primer projecte de tesi presentat, un projecte ben definit, de gran interès i que amb tu hagués estat un èxit assegurat. Tot seguit em vares saber aconsellar en el canvi de rumb, i has estat al costat en tot moment, donant-me les indicacions oportunes i els ànims quan més ho necessitava. Sense tu, aquest treball, tampoc hagués estat possible. Gràcies!

També gràcies a l'altra peça clau de la direcció, la Dra. Encarna Garcia, perquè vas ser l'enllaç que necessitava per a poder elaborar aquesta tesi. Des del primer text que et vaig presentar, et vares interessar i vas creure en el projecte. Gràcies pel teu encoratjament, el temps dedicat, el teu seguiment i pels teus "pas a pas", "de mica en mica".

Al Dr. Magí Farré, per haver accedit a ser el tutor del meu doctorat sense pensar-ho dues vegades, gràcies per estar disponible sempre que t'he necessitat amb els teus consells, la teva opinió i la teva direcció. T'estic molt agraïda.

Al Consorci Marc Parc de Salut de Barcelona i en especial al Dr. Manuel Algara i la Dra. Núria Rodríguez de Dios, a l'Institut de Recerca Hospital Sant Pau i en especial al Dr. Rafael Blesa i a CRC-Centre Centre d'Imatge Molecular. Gràcies per la vostra implicació a la tesi i per haver-me deixat fer-la realitat.

Gràcies Adriana Llongarriu per les teves correccions ortogràfiques. Perquè no et deu haver estat fàcil corregir tot aquest text, jo sabia que podia comptar amb tu, portes els gens de l'avi Ramon i n'ets una gran deixeblla!. Perquè has fet la teva tasca meticulosament i amb responsabilitat.



A tota la meva família, inclosa la política, i als meus amics. Perquè m'heu animat i heu estat fent-me costat al llarg de tot aquest projecte.

Vull dedicar un petit record a aquells que tant trobo a faltar i que m'hagués agradat que visquéssiu aquest moment amb mi. D'una manera o una altra sé que hi sou i que esteu il·lusionats.

A l'Àlex, perquè m'has animat en tot moment, no deixant que tirés la tovallola quan més cansada estava. Per entendre el temps que he hagut d'aplicar-hi. Perquè m'has ensenyat que un ha de creure en el que vol i ha de tirar-ho endavant. Tanco una etapa que em permetrà estar al teu costat, en el teu projecte i en el nostre que iniciem. Ara són petits, però estic convençuda que es faran grans i ens portaran moltes satisfaccions, èxits i alegries. T'estimo.

Mil gràcies a tots!

*“Lluita pels teus somnis, t'estan esperant,*

*fes que siguin certs, abraça'ls”*

*Els teus somnis, Sopa de cabra*

***VALIDACIÓ DE RADIOFÀRMACS PET***

***PER AL SEU ÚS EN HUMANS***



**Índex**

<b>1</b>	<b>Abreviatures</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Contextualització</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Objectiu i Hipòtesi</b>	<b>19</b>
3.1	Hipòtesi .....	19
3.2	Objectiu .....	19
<b>4</b>	<b>Introducció</b>	<b>21</b>
4.1	La tomografia per emissió de positrons.....	21
4.2	Radiofàrmacs d'estudi.....	23
4.2.1	<sup>11</sup> C-PIB.....	23
4.2.2	<sup>18</sup> F-FMISO .....	24
4.3	Marc legal dels radiofàrmacs .....	26
4.4	Documentació de qualitat.....	30
4.4.1	Normes de Correcta Fabricació.....	30
4.4.2	Farmacopees .....	31
4.4.3	Guies ICH .....	31
4.5	Control de qualitat dels radiofàrmacs.....	32
4.6	Procés de fabricació .....	34
4.6.1	Síntesi de <sup>11</sup> C-PIB .....	35
4.6.2	Síntesi de <sup>18</sup> F-FMISO .....	37
<b>5</b>	<b>Part experimental: metodologia i resultats</b>	<b>41</b>
5.1	Validació dels mètodes analítics i definició de les especificacions .....	41
5.1.1	Puresa química .....	43
5.1.2	Puresa radioquímica.....	80
5.1.3	Concentració radioactiva i activitat específica .....	96
5.1.4	Dissolvents residuals .....	104
5.1.5	Esterilitat .....	125
5.1.6	Endotoxines.....	139
5.1.7	Mètodes analítics validats.....	150
5.2	Validació de procés .....	173
5.2.1	Introducció .....	173

---

5.2.2	Hipòtesi .....	175
5.2.3	Objectius.....	175
5.2.4	Metodologia .....	175
5.2.5	Resultats .....	180
5.2.6	Discussió .....	185
5.2.7	Conclusions.....	188
5.3	Estudi d'estabilitat.....	189
5.3.1	Introducció .....	189
5.3.2	Hipòtesi .....	190
5.3.3	Objectius.....	190
5.3.4	Metodologia .....	191
5.3.5	Resultats .....	192
5.3.6	Discussió .....	200
5.3.7	Conclusions.....	206
<b>6</b>	<b>Discussió</b>	<b>209</b>
<b>7</b>	<b>Conclusions</b>	<b>217</b>
<b>8</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>221</b>

## 1 Abreviatures

$^{11}\text{C-CH}_3\text{OTf}$	Triflat de metil
$^{11}\text{C-CH}_3\text{I}$	Iodur de metil
$^{11}\text{C-PIB}$	<i>Pittsburgh Compound B</i> marcat amb Carboni-11
$^{18}\text{F}^-$	Ió fluorur marcat amb Flúor-18 o $^{18}\text{F}$ -Fluorur
$^{18}\text{F-FMISO}$	Fluoromisonidazol marcat amb Flúor-18
AEMPS	<i>Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios</i>
Asp	Activitat específica
BET	Test d'Endotoxines Bacterianes ( <i>Bacterial Endotoxins Test</i> )
CG	Cromatografia de gasos
CMC	Dossier sobre les propietats químiques, procés de producció i control ( <i>Chemistry, Manufacturing and Control</i> )
Conc	Concentració
CR	Concentració radioactiva
CV	Coefficient de variació
Detector RAD	Detector isotòpic gamma
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EOS	Final de la síntesi ( <i>end of synthesis</i> )
FDG	Fludeoxiglucosa
FM	Fase mòbil
FMISO	Fluoromisonidazol
FR	Factor de resposta
FRs	Factors de resposta
FTG	Fluid de tioglicolat
GPs	Grups protectors
GS	Grup sortint
h.c.	Hora del control
h.i.	Hora injecció
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
I+D	Investigació i desenvolupament

---

ICH	Guies del <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICH E	Guies ICH d'Eficàcia ( <i>ICH Efficacy guidelines</i> )
ICH M	Guies ICH Multidisciplinàries ( <i>ICH Multidisciplinary guidelines</i> )
ICH Q	Guies ICH de Qualitat ( <i>ICH Quality guidelines</i> )
ICH S	Guies ICH de Seguretat ( <i>ICH Safety guidelines</i> )
LAL	Lisat d'amebòcit ( <i>Limulus Amoebocyte Lysate</i> )
LD	Límit de detecció
LQ	Límit de quantificació
MVD	Dilució màxima vàlida ( <i>Maximum Valid Dilution</i> )
NA	No aplica
NCF	Normes de Correcta Fabricació
ND	No detectable
OTs	Grup Tosilat
PDE	Exposició Diària Permesa ( <i>Permitted Daily Exposure</i> )
PEI	Producte en fase d'investigació clínica
PET	Tomografia per emissió de positrons ( <i>Positron Emission Tomography</i> )
pH	Potencial d'hidrogenions
Ph. Eur.	Farmacopea Europea ( <i>European Pharmacopoeia</i> )
PI	Patró intern
PIB	Pittsburgh Compound B
PQ	Puresa química
PR	Precursor
PRad	Precursor radioactiu
PRN	Puresa radionucleídica
PRNA	Puresa radionucleídica A
PRNB	Puresa radionucleídica B
PR-PIB	Precursor de <sup>11</sup> C-PIB
PRQ	Puresa radioquímica
PRs	Precursors
QMA	Sep-Pack de metil amoni quaternari ( <i>Quaternary Methyl Ammonium Sep-Pack</i> )
RD	Real Decret

RF	Radiofàrmac
RFE	<i>Real Farmacopea Española</i>
RFs	Radiofàrmacs
RM	Ressonància Magnètica
TC	Tomografia Computada
THP	Grup protector amb estructura de Tetrahidropirà
TLC	Cromatografia de capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
TR	Temps de retenció
TSB	Caldo de triptona i soja
USP	Farmacopea Nord-Americana ( <i>United States Pharmacopeia</i> )
UV	Radiació Ultravioleta





## 2 Contextualització

La tomografia per emissió de positrons (*Positron Emission Tomography*, PET) és una tècnica d'imatge no invasiva que permet obtenir imatges quantitatives i tridimensionals dels processos biològics i farmacològics en l'organisme. Portar a terme un estudi PET implica l'administració intravenosa d'un Radiofàrmac (RF) i l'obtenció de les imatges mitjançant un tomògraf PET. La PET està essent utilitzada en la pràctica clínica per al diagnòstic de diverses malalties com el càncer, la malaltia d'Alzheimer, el Parkinson i l'esquizofrènia, entre d'altres, i també en la investigació pre-clínica i clínica, tant per agilitzar els assaigs clínics amb noves molècules, com per a la recerca translacional.

Segons dades del *National Institutes of Health*<sup>1</sup> només un 8,7 % d'estudis PET realitzats en animals passen a realitzar-se en humans. Això es deu 1) a la pròpia limitació en el trasllat dels estudis d'animals a humans i 2) al cost i a les dificultats associades per aconseguir l'autorització d'ús dels RFs PET<sup>1</sup>.

Els Radiofàrmacs (RFs) són considerats medicaments i com a tals han de ser fabricats conforme a les Normes de Correcta Fabricació (NCF) i el seu ús ha de ser aprovat per les autoritats sanitàries competents. Això fa que la seva fabricació sigui costosa i tingui la dificultat associada de ser fabricats segons una normativa i guies poc adaptades a les característiques intrínseques dels RFs PET com és la seva curta semivida, de l'ordre de minuts. De fet, les guies específiques que apliquen als RFs són poc detallades per orientar els investigadors i les publicacions són poques.

L'objectiu d'aquesta tesi és establir unes pautes en el marc de la validació dels mètodes analítics dels RFs PET per tal de poder complir amb la normativa vigent i/o en el cas de manca de normativa orientar i contribuir a agilitzar els tràmits d'autorització.

Per portar a terme aquesta tesi, es desenvolupa l'exemple de dos RFs marcats amb isòtops diferents: <sup>11</sup>C-PIB, marcador de dipòsit de plaques amiloides en el diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer, i <sup>18</sup>F-FMISO, marcador d'hipòxia tissular en el tractament del càncer. La fase experimental va ser desenvolupada en laboratori farmacèutic CRC-Centre d'Imatge Molecular durant el període 2009-2012. Els dos RFs varen ser presentats com a medicament en investigació i obtingueren l'autorització de Producte en fase d'investigació clínica (PEI) per l'*Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* (AEMPS): <sup>11</sup>C-PIB PEI número 09-006 i <sup>18</sup>F-FMISO PEI nº 10-105.



## 3 Objectiu i Hipòtesi

Per tal que els RFs d'estudi satisfacin les garanties de qualitat i el seu ús, tant en el camp de la investigació com en la pràctica clínica, pugui ser autoritzat en humans, un dels punts claus és definir i validar els mètodes analítics i aplicar-los als estudis d'estabilitat i a la validació de procés seguint la normativa i/o directrius vigents.

### 3.1 Hipòtesi

És possible definir les especificacions i validar els mètodes analítics pels dos RF d'estudi:  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB.

Els mètodes analítics definits són aplicables a l'estudi d'estabilitat, a la validació de procés i a les produccions rutinàries dels RFs d'estudi.

### 3.2 Objectiu

Per als dos RFs d'estudi  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB:

- Definir les especificacions
- Validar els mètodes analítics, essent:
  - Puresa radioquímica
  - Puresa química
  - Dissolvents residuals
  - Esterilitat
  - Endotoxines
- Realitzar la validació de procés aplicant els mètodes analítics i les especificacions definides
- Determinar l'estabilitat de cadascun d'ells.

Com a objectiu secundari s'espera que el treball serveixi com a model de procediment de treball per dur a terme la validació dels mètodes analítics dels RFs PET per al seu ús en humans.



## 4 Introducció

### 4.1 La tomografia per emissió de positrons

La PET és una tècnica d'imatge no invasiva que permet obtenir imatges tomogràfiques i volumètriques de la distribució d'un RF un cop administrat a un pacient<sup>2,3</sup>.

La base de la tècnica PET la trobem en la injecció intravenosa d'una dosi traça<sup>1</sup> d'un RF, adquisició seqüencial d'imatges mitjançant un tomògraf específic i posterior reconstrucció volumètrica per a poder determinar la distribució tridimensional del RF. A partir d'aquestes imatges es pot<sup>4</sup>:

- Estudiar, visualitzar i quantificar múltiples processos bioquímics i fisiològics: metabolisme de la glucosa, síntesi proteica, proliferació cel·lular, perfusió miocardiaca, metabolisme  $\beta$ -oxidatiu, entre d'altres.
- Determinar la densitat de receptors d'una regió concreta, la cinètica d'unió receptor-ligand, l'afinitat d'un compost per un receptor determinat, la biodistribució del RF al llarg del temps i l'efecte d'un fàrmac en un procés fisiològic determinat.

Els avenços en els darrers anys en la instrumentació i la radioquímica han permès que mitjançant la tècnica PET, es pugui progressar en el coneixement, diagnòstic, estadiatge i tractament de diverses malalties com el càncer, la malaltia d'Alzheimer, el Parkinson i l'esquizofrènia, entre d'altres. A més, al ser una tècnica que permet obtenir dades quantificables sobre variables fisiològiques o patològiques<sup>2</sup> per pacient, suposa un pas endavant en la teràpia individualitzada.

La PET i la seva aplicació en la recerca biomèdica ha representat un gran impacte en el sector empresarial farmacèutic i en les seves estratègies d'investigació i desenvolupament (I+D). Els RFs PET tenen gran aplicació en assajos clínics en humans perquè permeten<sup>4,5,6</sup>:

- En fases preliminars visualitzar el comportament de noves molècules en l'organisme: biodistribució, ocupació de receptors, acumulació al teixit diana i en àrees de toxicitat potencial. Agafant importància en els assajos de primera vegada en humans (*First-in-Human Clinical Trials*).
- En fases més avançades per demostrar, seguir i comparar l'eficàcia d'un nou tractament.

---

<sup>1</sup> Dosi traça: <1/100 vegades la dosi que té efectes farmacològics, considerant un màxim 100  $\mu\text{g}$ <sup>7</sup>.

Paral·lelament la PET també té gran aplicació en la recerca pre-clínica translacional, ja que amb l'existència dels tomògrafs per animals petits de laboratori (microPET), es disposa de la mateixa eina per a humans i animals<sup>5,7</sup>.

Tot això fa que la PET sigui una eina molt útil en el camp de la investigació, permetent descartar en fases preliminars molècules amb perfils no adients i demostrar l'eficàcia de nous tractaments, agilitzant així els assajos clínics, disminuint el cost i assegurant les inversions econòmiques cap a noves molècules o tractaments.

La base i el que caracteritza la tècnica PET és el RF, que es defineix com una molècula marcada amb un isòtop radioactiu que s'administra a un organisme amb una dosi sense efectes farmacològics, és a dir, una dosi traça. Els RFs també s'anomenen radiotraçadors, al ser injectats a dosi traça. Un RF consta de dues parts ben diferenciades: la molècula suport (-fàrmac) que condiciona la distribució i comportament del RF dins l'organisme, i el radioisòtop (radio-) que és la part que emet la radiació permetent la detecció externa i per tant la valoració qualitativa o quantitativa del procés d'estudi.

Els RFs PET, a diferència dels RFs utilitzats en la medicina nuclear convencional, estan formats per isòtops emissors de positrons que es troben freqüentment a les molècules biològiques i als fàrmacs (<sup>18</sup>F, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O). Mitjançant processos de síntesi química es pot obtenir la mateixa molècula, però amb l'isòtop no radioactiu canviat pel radioactiu sense afectar les característiques del compost. Aquests radioisòtops tenen una energia d'emissió alta (511 keV) fet que permet l'obtenció d'imatges amb alta resolució (4-6 mm tomògrafs per humans), important en l'estudi d'estructures petites tal com els receptors cerebrals. Alhora, tenen un període de semidesintegració molt curt, com per exemple el C-11 que és de 20,4 min, que per aspectes clínics és un avantatge al permetre la realització de múltiples estudis en un mateix pacient. Com a contrapartida, aquest període de semidesintegració tan curt, de l'ordre de minuts, requereix que les instal·lacions per a la producció del radioisòtop, síntesi del RF i realització dels estudis, siguin complexes, hagin d'estar molt pròximes i que per lot produït es puguin estudiar pocs pacients (es pot arribar a necessitar un lot per cada pacient). Tot això converteix la PET en una tècnica d'imatge menys disponible i més costosa.

## 4.2 Radiofàrmacs d'estudi.

Aquesta tesi es basa en la validació dels mètodes analítics i la definició de les especificacions agafant com exemple dos RFs marcats amb isòtops diferents: el  $^{11}\text{C}$ -PIB, d'aplicació clínica neurològica, i el  $^{18}\text{F}$ -FMISO, d'aplicació clínica en el camp de l'oncologia.

### 4.2.1 $^{11}\text{C}$ -PIB

La malaltia d'Alzheimer és la forma de demència més comuna i es caracteritza per un deteriorament progressiu de la funció cognitiva i del comportament. Les característiques patològiques de la malaltia d'Alzheimer són les plaques neurítiques compostes de fibril·les peptídiques  $\beta$ -amiloides ( $\text{A}\beta$ ), cabdells neurofibril·lars de proteïna tau hiperfosforilada i el dèficit de neurotransmissors. Al llarg de la malaltia es produeix un increment en la concentració de fibril·les ( $\text{A}\beta$ ) que afecta l'eficàcia sinàptica i gradualment es produeix un increment en la massa de plaques amiloides i una progressió en el deteriorament cognitiu<sup>8</sup>. El diagnòstic de l'Alzheimer és diferencial i es basa en un test neurològic i proves complementàries com l'anàlisi de sang, la punció lumbar per estudiar el líquid cefaloraquídi i l'avaluació de l'atrofia cerebral mitjançant Tomografia Computada (TC) o Resonància Magnètica (RM). Però el diagnòstic definitiu no s'aconsegueix fins post-mortem amb l'estudi histopatològic del teixit cerebral<sup>8</sup>.

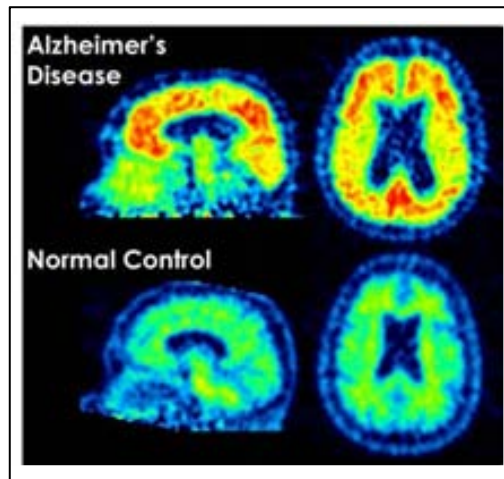
Aconseguir un biomarcador seria de gran valor per al desenvolupament d'un diagnòstic precoç, per valorar la progressió de la malaltia, l'eficàcia d'un tractament o per a l'estudi de noves teràpies. Els darreres esforços en la investigació clínica s'han basat en aconseguir marcadors de plaques  $\beta$ -amiloides i/o cabdells neurofibril·lars. És en aquest marc on la PET té el major potencial al ser una tècnica no invasiva que disposa de RFs que permeten l'obtenció d'imatges que mostren el dipòsit de les plaques d'amiloides. Actualment, un dels RFs més destacats és el  $^{11}\text{C}$ -PIB<sup>8</sup>.

El Pittsburgh Compound B (PIB) és un derivat de la Tioflavina T marcat radioactivament amb C-11 ( $^{11}\text{C}$ -PIB) desenvolupat per un grup de la Universitat de Pittsburgh associats amb investigadors de la Universitat de Uppsala. El  $^{11}\text{C}$ -PIB presenta una alta afinitat i unió competitiva per les fibril·les peptídiques  $\beta$ -amiloides ( $\text{A}\beta$ )<sup>ii</sup>, bona penetració a través la barrera hematoencefàlica, elevada retenció en zona cortical i bon aclariment cerebral. Totes aquestes característiques han fet que actualment sigui un RF molt usat en la investigació clínica per a l'estudi de la malaltia d'Alzheimer<sup>8-11</sup>. A continuació s'adjunten unes imatges resultants de dos estudis PET amb  $^{11}\text{C}$ -PIB, un pacient diagnosticat d'Alzheimer i un pacient control (Figura 1).

<sup>ii</sup> El PIB desplaça els lligands BS1 i BS3, ambdós receptors de les fibril·les peptídiques  $\beta$ -amiloides ( $\text{A}\beta$ )<sup>9</sup>.



**Figura 1.** Imatge de dos estudis PET amb  $^{11}\text{C}$ -PIB. A la part superior: imatge d'un patró positiu amb captació al precuni, lòbul frontal, parietal i temporal lateral, indicador de presència de placa amiloide en un pacient d'Alzheimer (*Alzheimer's disease*) i, a la part inferior: imatge d'un patró negatiu, control sa (*normal control*), amb captació inespecífica fonamentalment localitzada en substància blanca.



*Imatge d'un assaig clínic realitzat a CRC-CIM amb  $^{11}\text{C}$ -PIB*

#### 4.2.2 $^{18}\text{F}$ -FMISO

El càncer és una de les principals causes de mort a escala mundial. Existeixen més d'un centenar de tipus de càncer i cadascun respon diferent al tractament. Generalment les principals teràpies que es fan servir en el tractament del càncer són la quimioteràpia, la cirurgia, la radioteràpia, els transplants, la hormonoteràpia, la immunoteràpia i altres medicaments amb indicació anticancerígena (inhibidors de l'angiogènesi, vacunes, teràpia biològica...) <sup>12,13</sup>.

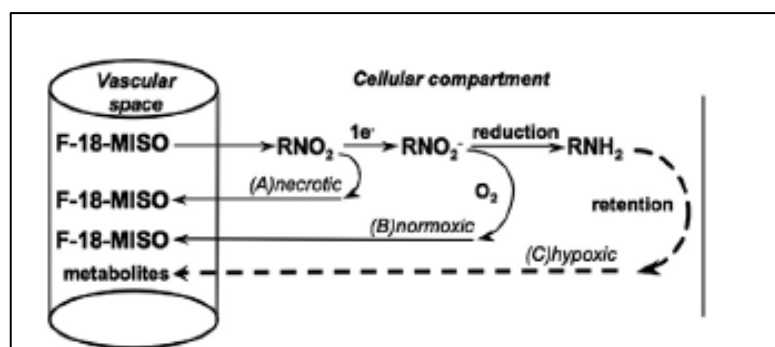
La tècnica PET ha estat molt utilitzada en el càncer amb l'administració del RF  $^{18}\text{F}$ -FDG (fludeoxiglucosa marcada amb Flúor-18). La FDG és un anàleg de la glucosa que s'incorpora principalment a les cèl·lules amb elevat consum de glucosa com són les cèl·lules cancerígenes. La PET amb  $^{18}\text{F}$ -FDG està indicada en el diagnòstic, l'estadiatge, la monitorització del tractament i en cas de sospita de recidiva <sup>14</sup>.

Dins el context de la investigació del càncer, també s'utilitzen altres RFs que permeten visualitzar certs marcadors que poden ajudar en el diagnòstic i tractament del càncer de forma individualitzada i més específica.

Un marcador d'hipòxia tissular és de gran interès en el tractament del càncer, ja que és una característica dels càncers amb tumors sòlids, com és el de pulmó i el de cap i coll. La hipòxia tissular ve originada per l'augment de la vascularització (angiogènesi) i per l'elevada demanda d'oxigen a causa de la proliferació cel·lular tumoral que sobrepassa la concentració d'oxigen local. La presència d'hipòxia cel·lular en teixit tumoral s'associa a una elevada agressivitat perquè les cèl·lules hipòxiques presenten radio i químic-resistència augmentant la taxa de recurrència, metàstasi i disminuint la supervivència<sup>14</sup>.

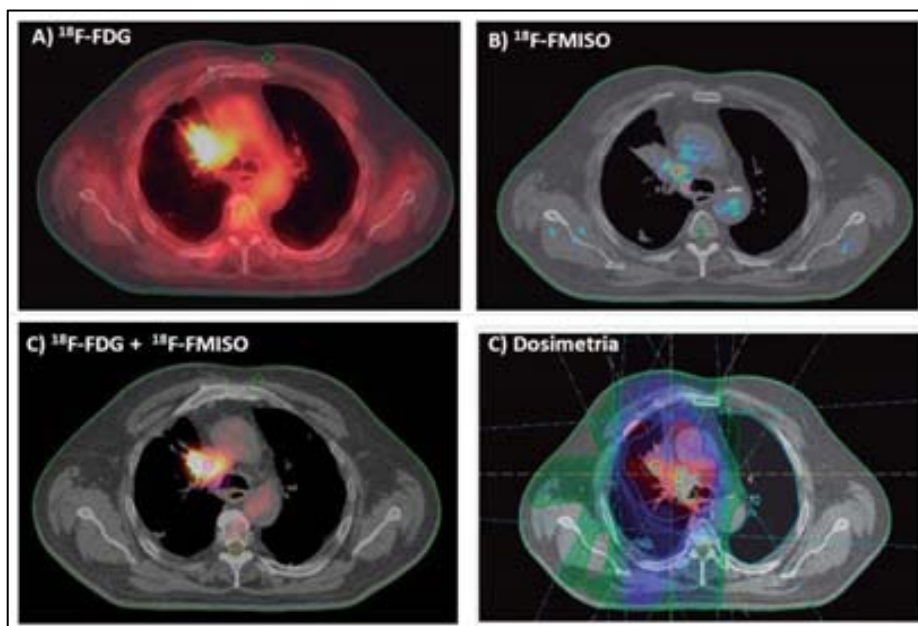
Existeixen diferents tècniques per detectar hipòxia, entre elles les tècniques d'immunohistoquímica que permeten l'obtenció d'imatges d'elevada resolució espacial però amb el desavantatge que són tècniques invasives. Per això s'estan dedicant molts esforços a validar un RF que permeti la detecció d'hipòxia de forma no invasiva. Un d'aquests RFs és <sup>18</sup>F-FMISO (fluoromisonidazol marcat amb Flúor-18) desenvolupat per investigadors de la Universitat de Washington. El mecanisme d'acció de <sup>18</sup>F-FMISO es basa en l'estructura nitromidazol, que és la responsable que el <sup>18</sup>F-FMISO quedi atrapat a l'interior de les cèl·lules tumorals. Concretament, la molècula de nitromidazol un cop a l'interior de la cèl·lula hipòxica és reduïda i posteriorment s'uneix covalentment a les macromolècules tissulars. En canvi si el teixit no és hipòxic la reducció és revertida gràcies a la presència d'oxigen i per tant no queda atrapat a l'interior (veure figura 2)<sup>15</sup>. D'aquesta manera es pot obtenir una imatge selectiva de les cèl·lules tumorals hipòxiques.

**Figura 2.** Mecanisme d'acció <sup>18</sup>F-FMISO<sup>15</sup>. <sup>18</sup>F-FMISO en penetrar a les cèl·lules és reduïda per enzims nitroreductasa en funció dels nivells d'oxigen del compartiment cel·lular. A) en teixit necròtic no es produeix la reducció, B) en teixit normòxic es produeix la reducció però seguidament és re-oxidada en presència d'oxigen i difon fora del compartiment cel·lular, C) en teixit hipòxic <sup>18</sup>F-FMISO és reduïda però no és re-oxidada quedant retinguda a dins la cèl·lula<sup>16</sup>.



Per tant, l'ús de  $^{18}\text{F}$ -FMISO en càncers on la hipòxia és present, permet valorar diferents estratègies terapèutiques com seria augmentar la dosi de radioteràpia en el teixit hipòxic, o la utilització de tractaments hipòxics en el teixit detectat<sup>16,17</sup>. Altres camps d'utilització d'aquest RF on també es presenta hipòxia tissular és l'infart cerebral o de miocardi isquèmic<sup>14</sup>. Actualment existeixen diversos estudis en la Unió Europea que utilitzen aquest RF en assajos clínics per tal d'optimitzar la tècnica i el seu ús en la pràctica clínica. A la figura 3 es mostren un conjunt d'imatges resultants d'un estudi PET amb  $^{18}\text{F}$ -FMISO on s'estudia el teixit hipòxic per tal de programar la radioteràpia més adient per al pacient.

**Figura 3.** Conjunt d'imatges d'un mateix pacient que demostra l'interès clínic del RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO. A) Imatge PET-TC amb  $^{18}\text{F}$ -FDG indica el metabolisme de glucosa, B) Imatge PET-TC amb  $^{18}\text{F}$ -FMISO indica el teixit hipòxic, C) Fusió dels dos estudis PET-TC amb  $^{18}\text{F}$ -FDG i  $^{18}\text{F}$ -FMISO que permet localitzar el teixit hipòxic dins el teixit tumoral i que per tant ha de rebre més radiació en el tractament radioteràpic, D) Planificació de la dosimetria del tractament radioteràpic on s'observa que el teixit hipòxic és el que rep més radiació.



*Imatge assaig clínic Consorci Marc Parc de Salut de Barcelona realitzat a CRC-CIM.*

### 4.3 Marc legal dels RF

El  $^{11}\text{C}$ -PIB i el  $^{18}\text{F}$ -FMISO són RFs i com a tals són considerats medicaments. Per tant, per a poder-los utilitzar en la pràctica clínica cal estudiar i entendre el complex marc legal que envolta els RFs PET i com ha anat canviant amb el temps.

L'any 1990 amb l'entrada en vigor de la Llei del medicament (*Ley del Medicamento 25/1990*)<sup>18</sup> i posterior Real Decret (RD) pel qual es regulaven els medicaments RFs d'ús humà (RD 479/1993)<sup>19</sup>, els RFs varen estar considerats medicaments: un RF és qualsevol producte que un cop preparat per al seu ús amb una finalitat terapèutica o diagnòstica contingui un o més radionúclids (isòtops radioactius).

Per tant segons la Llei 25/1990 els RFs al ser medicaments tenien les següents vies d'ús<sup>3</sup>:

- Els RFs destinats a ser comercialitzats requerien l'autorització prèvia de l'AEMPS.
- Alternativament l'AEMPS va estudiar la via de considerar els RFs com a Preparat o Fórmula Oficinal acollint-se a l'article 8.10 i 36 de la Llei del medicament<sup>18</sup>.
- Els RFs que no es podien acollir a la definició de preparat o fórmula magistral o el seu ús era diferent a l'autoritzat o bé eren destinats a ser administrats en un entorn d'investigació mèdica que requeria actuar segons el previst en el RD pel qual s'establien els requisits per a la realització d'assajos clínics (RD 561/1993)<sup>20</sup>, eren considerats medicaments en investigació i havien de complir amb la normativa vigent d'assajos clínics.

Però l'any 2003 amb la publicació del Formulari Nacional (Ordre SCO/3262/2003)<sup>21</sup> on no es va incloure cap monografia de RF, es va excloure la via d'ús dels RFs com a preparat o fórmula magistral, i amb la modificació de la normativa europea aplicable als medicaments d'ús humà, l'AEMPS va haver de revisar la normativa vigent. Com a conseqüència va sorgir la Llei de garanties i ús racional de medicaments i productes sanitaris (Llei 29/2006)<sup>22</sup> complementada pel RD pel qual es regula el procediment d'autorització, registre i condicions de dispensació dels medicaments d'ús humà fabricats industrialment (RD 1345/2007)<sup>23</sup> i el RD pel qual es regulen els assajos clínics amb medicaments (RD 223/2004)<sup>24</sup>, que varen derogar la Llei del medicament (Llei 25/1990)<sup>18</sup> i els corresponents RDs: RD 479/1993<sup>19</sup> de RFs i RD 561/1993<sup>20</sup> d'assajos clínics<sup>3</sup>.

Amb aquesta nova normativa els RFs continuen essent considerats medicaments al ajustar-se a la nova definició<sup>22</sup>: un medicament és tota substància o combinació de substàncies que presenti propietats per al tractament i prevenció de malalties en éssers humans o que pugui utilitzar-se o administrar-se en éssers humans amb la finalitat de restaurar, corregir o modificar les funcions fisiològiques exercint una acció farmacològica, immunològica o metabòlica, o d'establir un

diagnòstic mèdic. Concretament els RFs PET es consideren com a medicaments d'ús humà elaborats industrialment o que en la seva fabricació intervingui un procés industrial, ja que independentment del volum final que s'obtingui de la seva producció, el procés o processos de producció es realitzen en condicions constants i el producte obtingut és homogeni<sup>3</sup>.

Per tant, actualment els RFs PET com a medicaments d'ús humà o que en la seva fabricació intervingui un procés industrial, han de complir les condicions següents<sup>22</sup>:

- Els RFs destinats a ser comercialitzats requereixen de l'autorització prèvia de AEMPS.
- Els RFs no es poden acollir a la definició de preparat o fórmula oficial.
- Els RFs quan s'investiguin o s'utilitzin com a referència en un assaig clínic tenen consideració de medicament en investigació. Per tant necessiten la corresponent autorització per part de l'AEMPS per garantir aquesta investigació segons el reglament establert.
- Els RFs tenen consideració de medicaments especials<sup>iii</sup>, per tant l'AEMPS permet que es considerin com a ús compassiu en certs casos per tal de cobrir necessitats especials de tractament de situacions clíniques de pacients concrets i la prescripció de medicaments autoritzats quan s'utilitzen en condicions diferents a les autoritzades, com és la prescripció i l'aplicació de medicaments no autoritzats a pacients no inclosos en un assaig clínic, però sempre sota l'autorització de les autoritats sanitàries.

Un altre àmbit de controvèrsia que ha envoltat els RFs és l'àmbit d'elaboració, ja que els RFs s'elaboren en centres molt diferents: en laboratoris farmacèutics que requereixen l'autorització per part de l'AEMPS o en Unitats de Radiofarmàcia vinculades a centres que pertanyen al Sistema Nacional de Salut.

Respecte a aquesta qüestió, el RD pel qual es regula el procediment d'autorització, registre i condicions de dispensació dels medicaments d'ús humà fabricats industrialment (RD 1345/2007)<sup>23</sup> deixa clar en l'article 46 que: Els RFs tenen consideració de medicament i com a tals estan sotmesos a autorització i registre per part de l'AEMPS. Però cita a l'article 47 una excepció al requeriment d'autorització pels RFs PET preparats en una Unitat de Radiofarmàcia autoritzada sota supervisió i control d'un facultatiu especialista en radiofarmàcia sempre que: 1) Siguin elaborats íntegrament i utilitzats sense ànim de lucre en centres vinculats al Sistema Nacional de Salut, i 2) Siguin substàncies en fase d'investigació clínica o siguin medicaments que l'AEMPS

---

<sup>iii</sup> Medicament especial: són aquells medicaments que requereixen un tractament especial a efectes de demostrar la seva qualitat, seguretat i eficàcia<sup>23</sup>. Es regulen pel RD 1015/2009<sup>25</sup>. Altres exemples de medicaments especials a part dels RFs són: medicaments biològics, homeopàtics, a base de plantes i els orfes.

consideri que satisfan les garanties de qualitat, eficàcia, identificació i informació, i s'elaborin en instal·lacions adequades.

Per tant segons aquest RD en funció d'on es fabriquin i la intenció d'ús, pot ser que no requereixin l'autorització específica de l'autoritat competent. Però el que remarca és que, per tal que satisfacin les garanties de qualitat, eficàcia, identificació i informació, tots els RFs PET s'han de fabricar seguint les NCF de medicaments tant sigui per ser comercialitzats, utilitzar-los com a medicament en condicions especials, en el marc d'un assaig clínic o en un centre sense ànim de lucre.

Concretament en el cas dels RFs d'estudi  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO actualment s'estan utilitzant en l'àmbit de la investigació clínica formant part de molts assajos clínics a nivell europeu. Paral·lelament el  $^{11}\text{C}$ -PIB també s'està utilitzant per la via de l'ús compassiu o en condicions especials i en el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO aquest any 2014 acaba de publicar-se la primera monografia per aquest RF (*Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ ) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup>, fet que recolza la rellevància en la seva aplicació clínica i facilita noves vies per poder utilitzar-lo en humans.

Per tant, entenent tot el marc legal que envolta els RFs PET, es remarca que independentment del Centre/Unitat de Radiofarmàcia que els fabriqui i la via d'utilització a què vagin destinats, la seva fabricació haurà de satisfer les NCF<sup>27</sup>.

### 4.4 Documentació de qualitat

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, els RFs han d'estar fabricats, com tot medicament, de manera que l'AEMPS consideri que satisfan els requisits relatius a seguretat, qualitat i eficàcia<sup>28</sup>.

#### 4.4.1 Normes de Correcta Fabricació

Una de les bases per assegurar els requisits anteriors i que les autoritats demanen als fabricants de RFs, és que es fabriquin conforme amb els principis i directrius de les NCF<sup>27</sup>.

Les NCF es defineixen com: la part de la garantia de la qualitat que assegura que els medicaments són elaborats i controlats d'acord amb les normes de qualitat apropiades per a l'ús al que estan destinats, i s'apliquen tant a la producció com al control de qualitat. Les NCF s'estructuren en dues parts:

- Requisits bàsics: conté la part I dedicada als principis per a la fabricació de medicaments i la part II a les substàncies actives utilitzades com a materials de partida. Ambdós tracten capítols comuns com el sistema/garantia de qualitat, el control de qualitat, la producció, el personal, la documentació i els locals i equips.
- Annexes específics: que detallen de forma específica determinades activitats. Entre els quals cal destacar l'existència d'un annex específic de fabricació de RFs (Annex 3)<sup>29</sup>, l'annex de fabricació de medicaments estèrils (annex 1)<sup>30</sup> ja que la major part dels RFs PET són medicaments injectables i per tant han de ser estèrils, l'annex de fabricació de medicaments en investigació (annex 13)<sup>31</sup> i l'annex de validació i qualificació (Annex 15)<sup>32</sup>.

Un requisit inclòs en l'annex 15<sup>32</sup> de les NCF i que les autoritats sanitàries demanen als fabricants de RFs per donar la seva autorització, és que s'ha de tenir completada la validació del procés de fabricació del RF i que els mètodes analítics utilitzats han d'estar validats.

Centrant la validació en el camp del control de qualitat, un mètode analític es considera validat quan s'obtenen proves de què el procés analític utilitzat produeix en realitat el resultat previst. És important considerar que tant per a l'anàlisi com per a la fabricació, s'han d'utilitzar instal·lacions i equips qualificats, és a dir, que prèviament s'hagi comprovat que l'equip funciona correctament i produeix realment el resultat previst.

Per procedir a la validació dels mètodes analítics cal tenir definit prèviament el procés de fabricació, els mètodes analítics a utilitzar i els paràmetres de validació. Existeixen diferents normatives, guies i monografies, que ajuden en aquest pas previ. L'existència d'aquestes normatives facilita la validació dels mètodes analítics, però en el cas dels RFs hi ha la dificultat

afegida, atès que són guies enfocades als medicaments convencionals, que la major part de normativa és complexa i difícil d'aplicar als RFs.

### 4.4.2 Farmacopees

Una Farmacopea és el compendi legal de qualitat de medicaments, codi de referència per tots els àmbits relacionats amb els medicaments. Existeixen diferents Farmacopees en funció del país, concretament la legislació espanyola en la Llei de garanties i ús racional de medicaments i productes sanitaris (Llei 29/2006)<sup>22</sup>, cita que els medicaments han de complir amb els requisits exigits per la Real Farmacopea Espanyola (*Real Farmacopea Española*, RFE)<sup>33</sup> o, en el seu defecte, amb una Farmacopea de reconegut prestigi, com és la Farmacopea Europea (*European Pharmacopoeia*, Ph. Eur.)<sup>34</sup>. Cal mencionar que la RFE conté de forma íntegra la Ph.Eur. a excepció de certes monografies nacionals i últimes actualitzacions de la Ph. Eur. En cas de ser necessari al llarg del treball es consultarà la Farmacopea Nord-Americana (*United States Pharmacopeia*, USP)<sup>35</sup>.

Les farmacopees estan formades per monografies de principis actius i excipients, monografies generals sobre grups de medicaments, monografies sobre formes farmacèutiques i monografies generals necessàries per portar a terme les comprovacions analítiques preceptives descrites a les monografies específiques. Entre les monografies relacionades vigents de la RFE i Ph.Eur. cal destacar d'interès per aquest treball:

- Monografia general de preparacions Radiofarmacèutiques
- Monografies de RFs
- Monografies sobre mètodes analítics.

### 4.4.3 Guies ICH

Les guies ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) estan desenvolupades per un organisme internacional amb la finalitat d'harmonitzar els requisits tècnics per al registre de productes farmacèutics per a ús humà que reuneix les autoritats reguladores i la Indústria Farmacèutica d'Europa, Japó i els Estat Units per tal d'assegurar la seguretat, eficàcia i qualitat dels medicaments desenvolupats i registrats.

La seva aplicació permet l'optimització del procés de producció (reducció de costos), la flexibilització dels controls administratius demostrant que es manté i es garanteix la qualitat en tot el cicle de vida del medicament.



Les ICH estan formades per 4 grups de normatives: ICH de Qualitat (ICH Q, *Quality Guidelines*), ICH de seguretat (ICH S, *Safety Guidelines*), ICH d'Eficàcia (ICH E, *Efficacy Guidelines*) i ICH Multidisciplinàries (ICH M, *Multidisciplinary Guidelines*).

En el desenvolupament de RFs, són de gran utilitat les ICH Q per tal d'aplicar-les durant els processos de validació del procés de fabricació i dels mètodes analítics, i així com per assegurar l'obtenció de medicaments segurs, eficaços i de qualitat, tal com és requerit per l'autoritat sanitària. De les ICH Q a aplicar en el treball caldria destacar: les ICH Q d'estabilitat i les de validació de mètodes analítics.

Les ICH son normatives completes amb directrius específiques per tal de procedir a la validació del procés de fabricació i dels mètodes analítics. Però tal com passa amb les NCF i amb les farmacopees, moltes d'elles apliquen a medicaments convencionals i es fa difícil poder-les traslladar als RFs.

### 4.5 Control de qualitat dels radiofàrmacs

Als RFs se'ls aplica la monografia de la Ph. Eur. de preparacions radiofarmacèutiques (radiopharmaceutical preparations) 01/2014:0125<sup>36</sup> tant si són generadors de radionúclids, kits per preparar RFs, precursor de radionúclids, com RFs PET. La monografia descriu de forma general les característiques principals, la producció i els tests analítics que cal realitzar als RFs i quines monografies específiques de cada test cal aplicar. A la Ph. Eur. també trobem monografies de RFs determinats com la de la <sup>18</sup>F-FDG, on es descriuen els processos de fabricació a seguir, les possibles impureses, els controls de qualitat a realitzar i les especificacions per a cada test.

La majoria de RFs PET tenen pendent de validar la seva utilitat clínica, motiu pel qual no tenen cap monografia específica. Caldrà llavors agafar com a guia la Ph. Eur. de preparacions radiofarmacèutiques i adaptar-la per a cada RF, definint els tests analítics a validar i les seves especificacions.

Segons la monografia de preparacions radiofarmacèutiques<sup>36</sup> els tests que s'han de portar a terme pels RFs d'estudi són:

- Aspecte i partícules: Determinació de les característiques de color, limpidesa i partícules visibles de la solució final produïda.
- Potencial d'hidrogenions (pH): Determinació de la concentració d'hidrogenions en el producte final.

- Identificació: confirmació de la identificació del producte final, que consisteix en demostrar que el radionúclid que marca la molècula d'interès i la pròpia molècula d'interès o principi actiu, concideixen amb la descripció del producte.
- Puresa radionucleídica: identificar l'energia del pic radioactiu i la semivida.
- Puresa radioquímica: identificar i/o determinar el principi actiu marcat radioactivament i les possibles impureses radioactives generades del procés de fabricació.
- Puresa Química: determinar la quantitat de principi actiu i impureses generades durant el procés. El test inclou la determinació de dissolvents residuals i de residus metàl·lics.
- Concentració radioactiva: Determinació de la radioactivitat del radionúclid per unitat de volum.
- Activitat específica: Relació entre la radioactivitat per unitat de massa del producte final.
- Esterilitat: Test que permet demostrar que el producte final és lliure de microorganismes viables.
- Endotoxines: Test utilitzat per a determinar la presència de pirògens i/o endotoxines provinents de les bacteries gram negatives.

Definides les especificacions i validats els mètodes analítics, aquest s'apliquen en:

- La validació de procés, que inclou la producció de lots consecutius del RF d'estudi per tal de demostrar que el procés és eficaç i reproducible.
- Els estudis d'estabilitat, que s'utilitzen per establir la caducitat del producte analitzant el medicament al llarg del temps i observant els paràmetres analítics susceptibles de variació. També ens dona informació del seu perfil d'impureses.

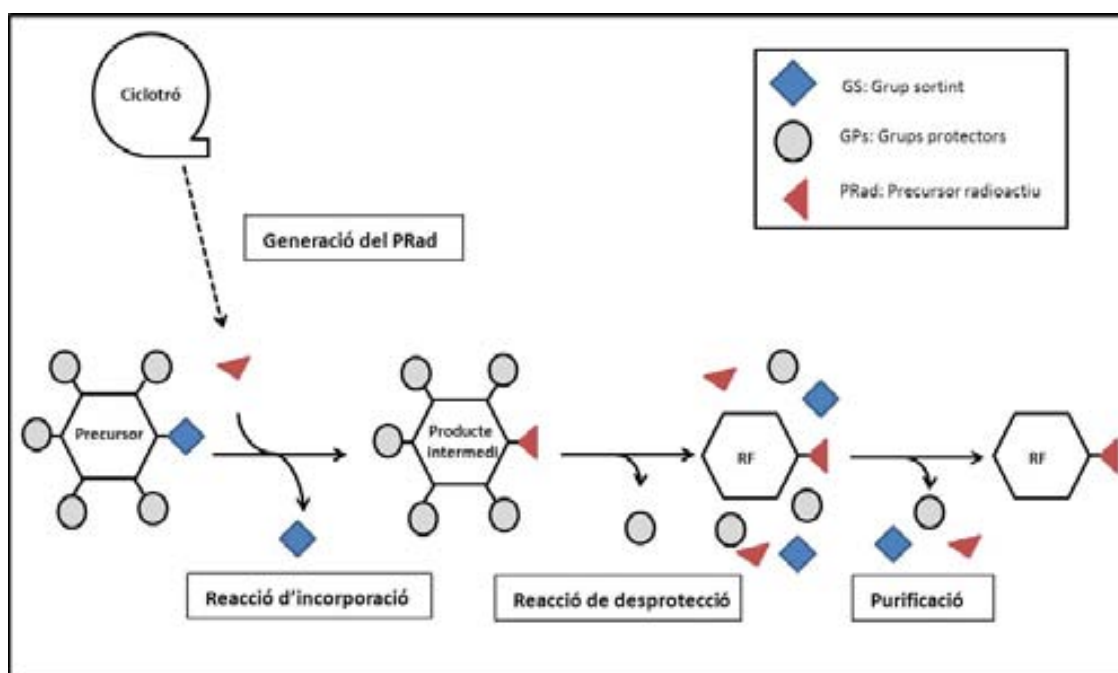
Dins el marc exposat, els RFs d'estudi es desenvoluparen en el laboratori farmacèutic CRC-Centre d'Imatge Molecular considerant les NCF, les monografies pertinents de la Ph. Eur. i les directrius de les ICH. Cal considerar que en el moment de validar el RF  $^{18}\text{F}$ -MISO, no existia la monografia específica per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO (*Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ ) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup>, publicada a inicis de l'any 2014, per tant, no serà aplicable al treball exposat en aquesta tesi.

#### 4.6 Procés de fabricació

Per tal de definir les especificacions, validar els mètodes analítics i portar-los a terme cal conèixer profundament el procés de producció. A continuació es descriu i s'adjunta un esquema general del procés de fabricació d'un RF (figura 4) i s'expliquen per a cada RF d'estudi de forma més detallada les seves etapes de producció.

La síntesi d'un RF PET parteix d'un precursor (PR) o centre reactiu, generalment format per grups protectors (GPs) i un grup sortint (GS), i un precursor radioactiu (PRad) que s'obté del bombardeig del ciclotró. L'etapa inicial és la reacció d'incorporació on el PRad reacciona amb el PR unint-s'hi covalentment i produint l'eliminació del GS. D'aquesta reacció s'obté el producte intermedi que posteriorment se sotmet a una reacció de desprotecció on s'eliminen els GPs per tal d'obtenir el producte final o RF. Seguidament és necessària una etapa de purificació del producte final per tal de separar-lo de les restes de PR i PRad que no han reaccionat, dels suproduites i els residus de reacció (GPs, GS, productes intermedis) i d'altres reactius o residus de reacció<sup>2</sup>. Un cop s'obté el RF purificat aquest s'ha de formular en la dissolució corresponent, com sèrum fisiològic (clorur sòdic 0,9 %) o aigua per a injectables, esterilitzar-lo utilitzant el mètode idoni per les característiques del RF (filtració esterilitzant, esterilització terminal per autoclau). Un cop s'obté la solució final del RF estèril es dispensa en diferents vials i es procedeix al control de qualitat per tal de poder donar l'apte i ser administrat als pacients.

**Figura 4.** Esquema general de les etapes del procés de fabricació d'un RF PET.



#### 4.6.1 Síntesi de $^{11}\text{C}$ -PIB

El procés de fabricació del RF  $^{11}\text{C}$ -PIB seguit en el present treball consta de la reacció de generació del PRad des del bombardeig fins a l'obtenció de la forma requerida de PRad (de  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> a  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>3</sub>OTf). Posteriorment s'incorpora el PRad al PR de síntesi. No és necessària la reacció de desprotecció, passant així a la reacció de purificació, formulació esterilització i dispensació.

Etapas de la síntesi  $^{11}\text{C}$ -PIB<sup>37</sup>:

- Generació de  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>
- Generació de  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub>
- Generació de  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>3</sub>OTf a partir de  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub>
- Síntesi de  $^{11}\text{C}$ -PIB
- Purificació de  $^{11}\text{C}$ -PIB
- Formulació
- Esterilització i dispensació

##### 4.6.1.1 Generació de $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>

El Carboni-11 es genera mitjançant la reacció nuclear [ $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ ] en un ciclotró model Cyclone 18/9 (IBA), bombardejant una mescla gasosa de N<sub>2</sub> / 0,5 % O<sub>2</sub> durant 45 - 120 minuts amb una intensitat en el blanc de 28 µA/h obtenint-se finalment l'espècie  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>.

##### 4.6.1.2 Generació de $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub>

Generat el gas  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> aquest és desplaçat cap a una columna d'acer inoxidable plena de tamís molecular<sup>iv</sup> i Níquel situada al mòdul de síntesi (mòdul TracerLab FX C Pro de GEHC), on es concentra el gas  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> a temperatura ambient. Seguidament, mitjançant una etapa de calefacció sota un flux constant d'hidrogen, el  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub> és reduït a  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub>.

Finalitzat el procés de reducció el  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub> s'allibera cap a la trampa de metà empaquetada amb Carbosphere 60/80, absorbent, que es troba refrigerada a temperatura de -100 °C. D'aquesta manera es concentra el  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub> per a l'etapa posterior.

##### 4.6.1.3 Generació de $^{11}\text{C}$ -CH<sub>3</sub>OTf a partir de $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub>

Un cop concentrada tota la radioactivitat en forma de  $^{11}\text{C}$ -CH<sub>4</sub> a la trampa de metà, s'escalfa la trampa a 100°C per tal d'alliberar el gas.

<sup>iv</sup> El tamís molecular és un material format per micropors que s'utilitza per adsorbir les molècules que passen a través del seu interior, en aquest cas el gas  $^{11}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>.

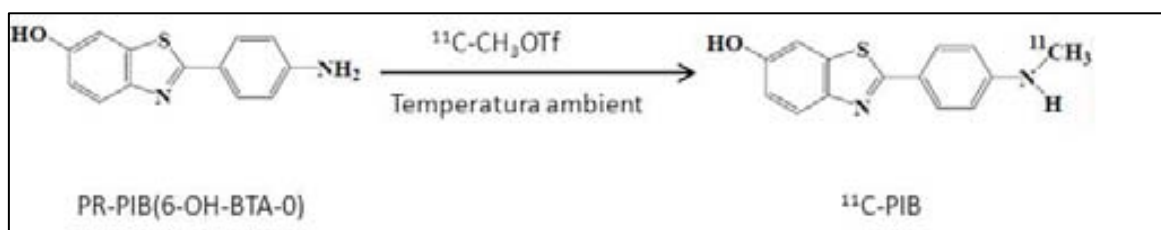
El  $^{11}\text{C}\text{-CH}_4$  alliberat passa a través d'un forn de iode que es troba escalfat a  $100^\circ\text{C}$ , el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_4$  arrossega certa quantitat de iode sublimat (iode gas) cap al forn de reacció que es troba a  $725^\circ\text{C}$ . Aquí és on té lloc la reacció en fase gasosa entre el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_4$  i el iode, formant-se el iodur de metil ( $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$ ). Posteriorment el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$  es concentra i purifica en una columna empaquetada de Poropack a temperatura ambient.

A continuació, es procedeix a escalfar la columna de iodur de metil fins  $220^\circ\text{C}$  amb la finalitat d'alliberar el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$ , que mitjançant un flux d'Heli es concentra a una columna empaquetada amb triflat de plata (TfOAg) prèviament escalfada a  $200^\circ\text{C}$ . D'aquesta manera el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{I}$  es va transformant en triflat de metil ( $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{OTf}$ ) i és conduït al reactor per a la síntesi de  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ .

#### 4.6.1.4 Síntesi de $^{11}\text{C}\text{-PIB}$

En el reactor de síntesi hi ha pre-carregada una dissolució de 1 mg de precursor de  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$  (PR-PIB o 6-OH-BTA-0) en 500  $\mu\text{L}$  d'acetona seca. A mesura que va arribant el  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{OTf}$  es fa bombollear amb flux d'Heli. Un cop atrapada tota l'activitat de  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{OTf}$  es deixa reaccionar 1 minut a temperatura ambient per formar  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ . Finalitzat el procés es transfereix al sistema de purificació.

**Figura 5.** Síntesi de  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ : reacció d'incorporació entre el triflat de metil,  $^{11}\text{C}\text{-CH}_3\text{OTf}$ , i el precursor de síntesi, PR-PIB o 6-OH-BTA-0, formant-se el producte final  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$ .



#### 4.6.1.5 Purificació de $^{11}\text{C}\text{-PIB}$

La purificació es porta a terme mitjançant Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) semi-preparativa. Condicions: fase estacionària columna C-18, fase mòbil mescla: 55 % formiat amònic (pH 5) / 45 % acetonitril, flux de 8 mL/min, detector Ultravioleta (UV, a 254 nm). Essent el temps de retenció (TR) de  $^{11}\text{C}\text{-PIB}$  aproximadament entre 4-6 min i el TR del PR aproximadament entre 2 - 4 min.

#### 4.6.1.6 Formulació

La fracció d'interès col·lectada s'addiciona sobre 20 mL de sèrum fisiològic. Aquesta mescla es fa passar per un sep-pack de C-18 que reté, concentra el compost i elimina la fase mòbil. Posteriorment es renta amb 7 mL d'aigua per a injectables, i mitjançant una contra elució amb 1,5

mL d'etanol absolut s'extreu el compost cap al vial final que conté 5 mL de sèrum fisiològic. Finalment s'addicionen 8,5 mL de sèrum fisiològic a la dissolució final per obtenir una solució salina al 10 % d'etanol (*bulk* no estèril) de volum final 15 mL.

#### 4.6.1.7 Esterilització i dispensació

El *bulk* no estèril de  $^{11}\text{C}$ -PIB es condueix a una cel·la de flux laminar de classe A on es procedeix a la filtració esterilitzant utilitzant dos filtres de 0,22  $\mu\text{m}$  situats en sèrie (doble filtració esterilitzant) i conseqüent fraccionament, dispensant els vials necessaris per control de qualitat, mostra i dosis.

#### 4.6.2 Síntesi de $^{18}\text{F}$ -FMISO

El procés de fabricació del RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO utilitzat en la tesi consta de la reacció de generació i concentració del PRad (d'ió Fluorur) a partir del bombardeig del ciclotró. Posteriorment s'incorpora el PRad al PR de síntesi i seguidament es realitza la reacció de desprotecció, que al tractar-se d'una reacció àcida, requereix d'una etapa de neutralització. Tot seguit la dissolució final es purifica, es formula, s'esterilitza i es dispensa.

Etaques de la síntesi  $^{18}\text{F}$ -FMISO<sup>38</sup>:

- Generació i concentració d'ió Fluorur ( $^{18}\text{F}^-$ )
- Síntesi de  $^{18}\text{F}$ -FMISO
- Purificació
- Formulació
- Esterilització i dispensació

##### 4.6.2.1 Generació i concentració d'ió Fluorur ( $^{18}\text{F}^-$ )

El Flúor-18 es genera mitjançant la reacció nuclear [ $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ ] en un ciclotró model Cyclone 18/9 (IBA), bombardejant aigua enriquida amb Oxigen-18, amb una intensitat depenent de la mida del blanc que s'utilitzi, blanc LV: 35  $\mu\text{A}/\text{h}$  20-60 min o blanc XXL: 80  $\mu\text{A}/\text{h}$  10-30 min.

Posteriorment l'ió fluorur generat és desplaçat al mòdul de síntesi cap a un cartutx d'intercanvi aniònic (sep-Pack de metil amoni quaternari, *quaternary methyl ammonium*, QMA). Aquest cartutx, a causa de la seva càrrega catiònica, reté l'ió fluorur i elimina l'aigua enriquida residual del bombardeig. Posteriorment s'hi afegeix una mescla de carbonat potàssic i criptand 222<sup>v</sup> dissolts en aigua / acetonitril, el carbonat desplaça l'ió fluorur i aquest elueix cap al reactor de síntesi. A continuació cal eliminar tota traça d'aigua ja que interfereix en la següent etapa, la

<sup>v</sup> El criptand 222 és un agent de transferència de fases, ajuda a solvatar l'anió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur al passar de fase aquosa a fase orgànica d'acetonitril.

reacció de fluoració, per tant es procedeix a diverses etapes d'assecat on s'aplica temperatura (100 - 120°C) i es va alternant flux d'Heli, buit i addició d'acetonitril anhidre que substitueix l'aigua (destil·lació azeotròpica).

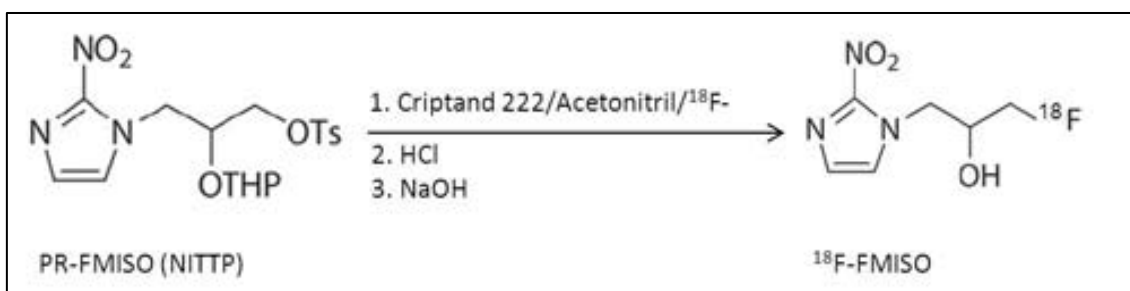
#### 4.6.2.2 Síntesi de $^{18}\text{F}$ -FMISO

En el reactor de síntesi tipus Peltier que conté la mescla de  $^{18}\text{F}^-$  i criptand 222 en acetonitril, s'addiciona la solució de PR per al seu marcatge formada per 5 mg de PR-FMISO o NITTP dissolt en acetonitril anhidre. A continuació es porta a terme la reacció de fluoració, reacció de tipus nucleofílica<sup>vi</sup>, on l'ió fluorur desplaça el grup Tosilat<sup>vii</sup> (OTs, Grup sortint) del PR-FMISO en presència de l'agent de transferència de fases (criptand 222) a les condicions de 10 min a 95°C.

Un cop marcat el producte es procedeix a la desprotecció eliminant els grups protectors amb estructura de Tetrahidropirà (THP<sup>viii</sup>) mitjançant una reacció d'hidròlisi àcida a 100°C durant 5 min, addicionant àcid clorhídric 1N.

Posteriorment la mescla final es refreda a 50°C i es neutralitza amb hidròxid sòdic 2M.

**Figura 6.** Síntesi de  $^{18}\text{F}$ -FMISO: etapa de reacció de fluoració o d'incorporació, el nucleòfil  $^{18}\text{F}$ -Fluorur desplaça el grup tosilat (OTs), la posterior hidròlisi àcida o reacció de desprotecció elimina els grups protectors THP i es neutralitza amb hidròxid sòdic.



#### 4.6.2.3 Purificació

La purificació es porta a terme mitjançant HPLC semi-preparativa. Condicions: Fase estacionària columna C-18; fase mòbil mescla: 97,5 % aigua per injectables / 2,5 % etanol absolut, flux de 5 mL/min, detector UV (327 nm). Essent el TR de  $^{18}\text{F}$ -FMISO aproximadament entre 18 - 22 min.

<sup>vi</sup> Una reacció nucleofílica és una reacció d'addició on un grup sortint (OTs) és desplaçat per un grup nucleòfil ( $^{18}\text{F}$ -Fluorur) formant-se un enllaç covalent.

<sup>vii</sup> El grup tosilat és un excel·lent grup sortint per reaccions nucleofíliques i la seva estructura és p-toluensulfonat (p- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-$ ). El  $^{18}\text{F}$ -Fluorur desplaça el grup durant la fluoració i queda marcada la molècula.

<sup>viii</sup> El grup THP és un grup protector amb estructura de tetrahidropirà que s'elimina en medi àcid. S'utilitza per protegir certes parts de la molècula de PR-FMISO que no interessa que es marquin amb fluor-18 evitant la formació de subproductes no desitjats.

#### 4.6.2.4 Formulació

La fracció d'interès es col·lecta sobre una dissolució d'igual composició que la fase mòbil fins a un volum final de 15 mL (*bulk* no estèril).

#### 4.6.2.5 Esterilització i dispensació

El *bulk* no estèril de  $^{18}\text{F}$ -FMISO es condueix a una cel·la de flux laminar de classe A on es procedeix a la filtració esterilitzant utilitzant dos filtres de 0,22  $\mu\text{m}$  situats en sèrie (doble filtració esterilitzant) i conseqüent fraccionament, dispensant els vials necessaris per control de qualitat, mostra i dosis.





## 5 Part experimental: metodologia i resultats

En el desenvolupament de la part experimental d'aquesta tesi es realitza una revisió de la normativa i guies vigents que envolten els RFs per tal de definir la metodologia a seguir i establir les especificacions, validar els mètodes analítics dels RFs d'estudi, i posteriorment realitzar els pertinents estudis d'estabilitat i validació de procés. En cada apartat s'estableix el mètode i els resultats obtinguts a l'estudi.

### 5.1 Validació dels mètodes analítics i definició de les especificacions

En el moment del desenvolupament dels RFs PET d'estudi,  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO, no existia cap registre comercial ni cap monografia a la Ph. Eur. específica perquè eren RFs poc utilitzats ja que encara estava per validar la seva utilitat a la pràctica clínica, per tant en el treball s'han portat a terme considerant-los com a nous productes.

Revisant les guies i la normativa referents a la definició d'especificacions per a nous productes, ICH Q6 A "*Specifications: test procedures and acceptance Criteria for new drug products: Chemical substances*"<sup>39</sup> i ICH Q3 A (R2) "*Impurities in new drug products*"<sup>40</sup>, s'observa que són molt generals o bé no apliquen als RFs PET. Així que, tal com s'ha comentat en l'apartat 4.5 *Control de qualitat dels RFs*, es fa necessari recórrer a la normativa particular de RFs: monografia Ph. Eur. específica de RFs: monografia de preparacions radiofarmacèutiques (*radiopharmaceutical preparations* 01/2014:0125<sup>36</sup>), monografies de la Ph. Eur. específiques de RFs com la monografia de la  $^{18}\text{F}$ -FDG<sup>41</sup>, on es descriuen els processos de fabricació a seguir, les possibles impureses, els controls de qualitat a realitzar i les especificacions per a cada test<sup>ix</sup>, aquestes es poden usar com a models a seguir, i una altra guia útil a l'hora de definir les especificacions i els test analítics per a cada RF és la guia de bones pràctiques radiofarmacèutiques<sup>42</sup>.

Per tant, agafant les citades normatives i guies que apliquen els RFs<sup>36,42</sup>, es defineix que els tests que s'han de portar a terme pels RFs d'estudi i que pels quals s'han de definir especificacions són:

- Aspecte i partícules
- pH
- Identificació

---

<sup>ix</sup> Aquest darrer any 2014 s'ha publicat per primera vegada la monografia del RF d'estudi  $^{18}\text{F}$ -FMISO<sup>26</sup>, aquest fet explica el motiu pel qual es procedeix a la validació del RF FMISO amb uns mètodes analítics i especificacions diferents que els que descriu la Ph.Eur. La metodologia que s'utilitzarà i els seus resultats serveixen igualment de guia pel desenvolupament de qualsevol RF PET i tenen validesa en l'actualitat.

- Puresa radionucleídica
- Puresa radioquímica
- Puresa química
- Concentració radioactiva
- Activitat específica
- Esterilitat
- Endotoxines

Els mètodes analítics utilitzats per a la seva determinació, tal com cita el capítol 6 de les NCF<sup>43</sup>, han de ser validats, és a dir, demostrar que donen el resultat previst<sup>44</sup> segons la normativa ICH.

A continuació s'adjunta la validació de cada mètode analític i la definició de les especificacions pertinents. Cal mencionar que aquells mètodes que per les seves característiques (senzillesa metodològica, tests que la seva metodologia es considera validada al seguir una monografia oficial) s'agrupen i es descriuen conjuntament en l'apartat *5.1.7 Mètodes analítics validats*.

### 5.1.1 Puresa química

#### 5.1.1.1 Introducció

La puresa química (PQ) és el test que permet identificar i quantificar les substàncies no radioactives i relacionades presents a la mostra (com restes de materials de partida, de reactius utilitzats, de productes intermedis,...)<sup>2</sup>. Per a la seva determinació habitualment s'utilitzen sistemes cromatogràfics com:

- HPLC
- Cromatografia de capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*)

Agafant com a referència les monografies de RFs PET marcats amb C-11 i F-18 publicades a la Ph.Eur.<sup>45-50</sup> fins el 2013, es pot estandarditzar que les especificacions a tenir en compte pels RFs PET pel que fa a PQ són la quantificació del principi actiu i la determinació de les impureses en el producte final. A continuació és detallen una sèrie d'aspectes a tenir en compte per a cada determinació.

- Determinació de la quantitat de principi actiu que hi ha al producte final: els RFs PET d'estudi són medicaments d'ús diagnòstic que s'utilitzen en dosi traça<sup>7</sup>, per tant no tenen efecte farmacològic. L'objectiu de la quantificació del principi actiu és assegurar l'administració d'aquesta dosi traça. El valor de quantitat de principi actiu també s'utilitza per a la determinació de l'activitat específica (veure *apartat 5.1.3*).

També cal tenir en compte que al treballar amb quantitats de l'ordre de micrograms calen equips d'alta sensibilitat (HPLC, TLC) i a causa de la curta semivida del C-11 i del F-18, 20,4 min i 110 min respectivament, calen mètodes analítics que en poc temps permetin determinar la PQ del producte final. Això fa que sigui de gran importància obtenir una bona validació d'aquests mètodes analítics, per tal de demostrar que els mètodes analítics en el poc temps definit d'anàlisi permeten obtenir un resultat precís i exacte.

- Determinació de la quantitat d'impureses o substàncies relacionades derivades de la síntesi del RF: a diferència dels medicaments convencionals, en el cas dels RFs PET el principi actiu (<sup>11</sup>C-PIB, <sup>18</sup>F-FMISO) se sintetitza in situ durant la fabricació. El procés de fabricació introdueix una sèrie d'etapes de purificació que eliminen les possibles impureses que puguin generar-se en el procés (HPLC, cartutxos de purificació), però no es tracta d'una purificació totalment excoent. Per tant cal conèixer el procés i definir el perfil d'impureses que pot tenir cada RF. Generalment com a impureses es determinen:

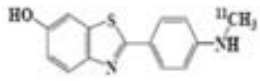
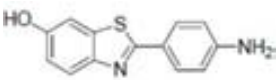
- El PR de la síntesi
- Les impureses derivades de la reacció (subproductes, impureses residuals...)
- Les impureses radioactives, aquestes es determinen a la puresa radioquímica (PRQ) (veure *apartat 5.1.2*).

Durant la fase inicial d'investigació i desenvolupament del procés de síntesi de cada RF d'estudi s'ha definit per a cadascun d'ells: els components, les possibles impureses a determinar, les especificacions, i els mètodes analítics a validar.

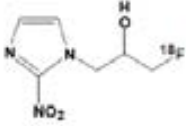
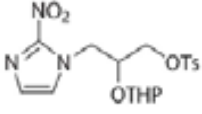
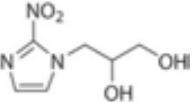
### **Components, impureses i especificacions**

A les taules annexades a continuació (Taula 1-3) es detallen per a cada RF d'estudi: els principis actius, les possibles impureses a determinar i les especificacions definides per a cada RF d'estudi.


**Taula 1.** Puresa química del  $^{11}\text{C}$ -PIB: principi actiu, possibles impureses i especificacions, per a cada component s'adjunten les figures corresponents (figura 7-8).

	<b>Principi actiu</b>	<b>Impureses</b>	<b>Especificació</b>
$^{11}\text{C}$ -PIB	$^{11}\text{C}$ -PIB o 6-OH-BTA-1 <sup>51</sup>  Figura 7.CA index name: 6-Benzothiazolol, 2-[4-([C-11]Methylamino)phenyl]-	Precursor de PIB: PR-PIB o 6-OH-BTA-0 <sup>52</sup>  Figura 8.CA index name: 6-Benzothiazolol, 2-4-(aminophenyl)-	Puresa química, HPLC: – PIB $\leq 1,3 \mu\text{g/mL}$ <sup>37*</sup> *Si $> 1,3 \mu\text{g/mL}$ , limitar el volum de la dosi a $\leq 13 \mu\text{g}$ PIB – La suma de totes les àrees que no corresponen a PIB ha de ser inferior al 10 % de l'àrea corresponent a $1,3 \mu\text{g/mL}$ de PIB <sup>37**</sup> **Si $> 10 \%$ , limitar el volum de la dosi a $\leq 1,3 \mu\text{g}$ suma impureses

**Taula 2.** Puresa química  $^{18}\text{F}$ -FMISO per HPLC: principi actiu, possibles impureses i especificacions, per a cada component s'adjunten les figures corresponents (figura 9-11).

	Principi actiu	Impureses	Especificació
$^{18}\text{F}$ -FMISO	<p><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO<sup>53</sup></p>  <p><b>Figura 9.</b> CA index name: 1H-Imidazole-1-ethanol, <math>\alpha</math>-(fluoromethyl)-2-nitro-</p>	<p>Precursor de FMISO: PR-FMISO o NITTP<sup>54</sup></p>  <p><b>Figura 10.</b> CA index name: 1H-imidazole-1-propanol, 2-nitro-<math>\beta</math>-[tetrahydro-2H-piran-2-yl]oxy-, 4-metilbenzenosulfonato(ester)-</p>	<p>Puresa química, HPLC:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FMISO <math>\leq 1,5 \mu\text{g/mL}</math><sup>38*</sup></li> <li>*Si <math>&gt; 1,5 \mu\text{g/mL}</math>, limitar el volum de la dosi a <math>\leq 15 \mu\text{g}</math> FMISO</li> <li>- La suma de totes les àrees que no corresponen a FMISO ha de ser <math>\leq 3,5 \mu\text{g/mL}</math><sup>38</sup> (concentració calculada a partir del patró IMP-FMISO)**</li> <li>**Si <math>&gt; 3,5 \mu\text{g/mL}</math>, limitar el volum de la dosi a <math>\leq 35 \mu\text{g}</math> suma d'impureses.</li> </ul>
	<p>Subproducte FMISO: IMP-FMISO<sup>55</sup> o Desmetilmisonidazol</p>  <p><b>Figura 11</b> CA index name: 1,2-Propanediol, 3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-</p>		

**Taula 3.** Puresa química  $^{18}\text{F}$ -FMISO per TLC: possibles impureses i especificació, per a cada component s'adjunten les figures corresponents (figura 12).

	Principi actiu	Impureses	Especificació
$^{18}\text{F}$ -FMISO	No es determina	<p>Agent de transferència de fases: Criptand 222<sup>56</sup></p>  <p><b>Figura 12.</b> CA index name: 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane</p>	<p>Puresa química, TLC:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Criptand <math>\leq 50 \mu\text{g/mL}</math><sup>38</sup></li> </ul>

### Mètode analític a validar

#### HPLC

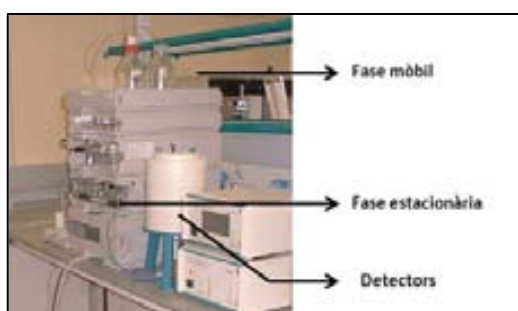
La cromatografia per HPLC és una tècnica analítica que separa els components d'una mescla basant-se en diferents tipus d'interaccions químiques entre les substàncies a analitzar i la columna cromatogràfica permetent identificar i quantificar els analits de la mostra.

Mitjançant el bombeig de fase mòbil (fase líquida) a alta pressió es fa passar la mostra en petites quantitats per una columna cromatogràfica que conté la fase estacionària (fase sòlida). Com a resultat els seus components a mesura que avancen per la columna es retarden diferencialment depenent de les interaccions químiques o físiques amb la fase estacionària. El grau de retenció dels components de la mostra depèn de la seva naturalesa, composició de la fase estacionària i de la fase mòbil. Al final de la columna se situa un detector que permet obtenir un cromatograma de la mostra (veure figura 13).

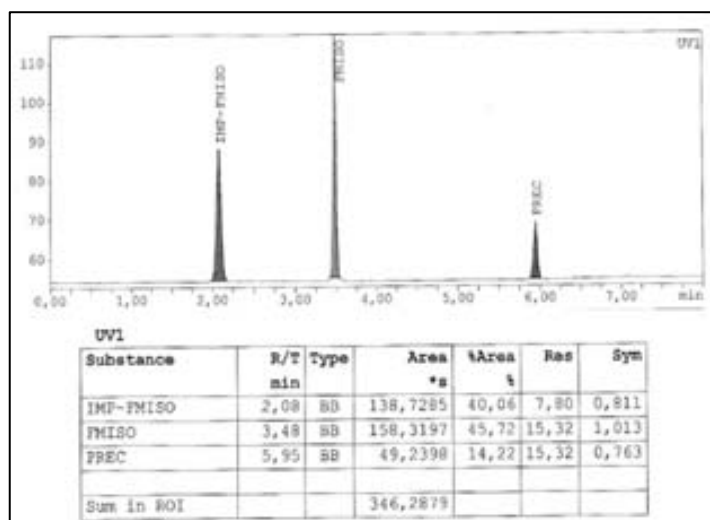
Del cromatograma s'obtenen diferents paràmetres, entre els quals els que s'utilitzen per obtenir els resultats de la mostra són (veure figura 14):

- El temps de retenció: és el temps que tarda un analit a ser eluït de la columna i és característic de l'analit en una determinada fase mòbil i fase estacionària. Per tant és un paràmetre qualitatiu que permet identificar l'analit en comparació amb un patró estàndard analitzat a les mateixes condicions cromatogràfiques.
- L'àrea de la mostra: és un paràmetre quantitatiu, que amb la validació del mètode analític permet demostrar que existeix una relació lineal entre l'àrea del pic i la concentració del corresponent analit. Prèviament havent analitzat un estàndard de l'analit de concentració coneguda es pot determinar la quantitat d'aquest analit a la mostra.

**Figura 13.** Components d'un equip de HPLC: Fase mòbil, fase estacionària a l'interior d'una columna cromatogràfica i detectors.



**Figura 14.** Cromatograma obtingut d'un dels patrons usats per a la validació de la puresa química del RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO (patró SF5 que conté 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de: patró FMISO, precursor FMISO i subproducte FMISO o desmetilmisonidazol), on *R/T* és el temps de retenció (paràmetre qualitatiu), *Area* és l'àrea de la mostra (paràmetre quantitatiu), *PREC* és el patró de precursor de FMISO, FMISO és el patró de FMISO i IMP-FMISO és el patró de suproducte de FMISO o desmetilmisonidazol.



Els paràmetres i les condicions analítiques per a cada RF s'expressen a la taula corresponent dins l'apartat de metodologia PQ per HPLC.

### TLC

La TLC és una tècnica cromatogràfica de separació on la fase estacionària es troba fixada formant una làmina o capa fina sobre un suport inert (placa de vidre, metall o plàstic). La solució d'analit es diposita a la placa. La separació es basa en la diferent difusió dels analits en un dissolvent o barreja de dissolvents (fase mòbil) per la capa fina a causa dels mecanismes d'adsorció, partició, intercanvi-iònic o combinacions d'ells.

Concretament el test d'estudi es basa en la reacció colorimètrica entre el iodeplatínat i el criptand objecte d'estudi. Es tracta d'un test on es compara visualment la intensitat de la taca resultant de l'inòcul d'una solució patró de criptand preparada a la concentració límit (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) amb la intensitat de la taca resultant de l'inòcul de la mostra en la capa fina. Prèviament a cada inòcul es diposita el reactiu iodeplatínat potàssic. Per tal que se superi el test la intensitat del color de la taca de la solució de mostra ha de ser d'intensitat menor que la del patró.

El mètode analític per TLC per a la determinació de criptand es detalla a la taula corresponent dins l'apartat de metodologia PQ per TLC.



**Validació dels mètodes analítics**

En l'etapa de desenvolupament de cada RF s'han definit les impureses, les especificacions i els mètodes analítics amb els seus paràmetres. Per tal de poder-los utilitzar en la rutina, cal procedir a la validació dels mètodes analítics i així demostrar que són adequats per al seu ús. Per a la validació tal com cita el capítol 6 de les NCF<sup>43</sup> se segueix la guia sobre Validació de mètodes analítics (CPMP/ICH/381/95)<sup>57</sup> adoptada per l'European Medicines Agency (EMA). Aquesta guia defineix diferents paràmetres a validar en funció del tipus de mètode analític (Figura 15).

**Figura 15.** Figura adjuntada a la guia sobre Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>, on segons el tipus de mètode analític (*type of analytical procedure*): identificació (*identification*), estudi d'impureses (*testing for impurities*), assaig de dissolució i/o contingut/potència (*assay of dissolution or/and content/potency*); la taula indica els paràmetres a validar: exactitud (*accuracy*), precisió fent la repetibilitat i la precisió intermitja (*precision as repeatability and intermediate precision*), selectivitat o especificitat (*specificity*), límit de detecció (*detection limit*), límit de quantificació (*quantitation limit*), linealitat/rang (*linearity, range*). Indicacions a la figura: (-) paràmetre que normalment no s'avalua, (+) paràmetre que normalment s'avalua, (1) en cas que es determini la reproductibilitat la precisió intermitja no és necessària, (2) si un mètode analític no demostra selectivitat aquest paràmetre es pot complementar mitjançant un altre mètode analític, (3) necessari en determinats casos.

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
characteristics		quantitat limit		
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Intern. Precision	-	+(1)	-	+(1)
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	-(3)	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

Seguint la guia, en el cas del test de PQ, tenim dos tipus de control:

- **Determinació de PQ per HPLC:** que es tracta d'un test utilitzat per identificar el producte final (veure *apartat 5.1.7.6*) i per quantificar el PR, el principi actiu i les impureses definides. Per tant es considera un test d'identificació (*identification test*) i un test quantitatiu per a la determinació del contingut d'impureses (*quantitative test for*

*impurities' content*). Així que segons indicacions de la guia per aquest tipus de test cal validar els següents paràmetres: selectivitat, linealitat/rang, límit de detecció (LD), límit de quantificació (LQ), precisió i exactitud.

- **Determinació de PQ per TLC:** test que només aplica al RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO. És un test utilitzat per determinar que la mostra final té una quantitat no superior a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de criptand, per tant es tracta d'un test límit pel control d'impureses (*Limit test for the control of impurities*) pel qual segons la guia només aplicarà la validació dels següents paràmetres: selectivitat i LD.

### Paràmetres de validació

- **Selectivitat**

És la capacitat que té el mètode analític de determinar l'analit en presència d'altres compostos que poden estar presents de forma habitual a la matriu de la mostra a analitzar i per tant interferir en l'anàlisi. Aquests compostos són derivats de la síntesi com: PRs (PR-PIB, PR-FMISO), estabilitzants (etanol), diluent (sèrum fisiològic)... o del propi mètode analític: fase mòbil.

Aquest paràmetre cal validar-lo tant per a la determinació de PQ per HPLC com per TLC.

- **Linealitat/rang**

La linealitat és la capacitat que té el mètode analític, dins un rang, d'obtenir un resultat directament proporcional a la concentració de l'analit a la mostra.

El rang és l'interval entre el màxim i el mínim de concentració on el mètode analític és proporcional a la concentració.

Aquest paràmetre només cal validar-lo per a la determinació de PQ per HPLC, ja que permet la quantificació d'analits. Cal estudiar el rang i la linealitat per als compostos a quantificar, que en el cas d'estudi són: els principis actius (PIB, FMISO), els PRs (PR-PIB, PR-FMISO) i impureses (IMP-FMISO).

- **Límit de detecció**

El LD és la mínima quantitat d'un analit que es pot detectar utilitzant un mètode analític.

Aquest paràmetre és necessari validar-lo tant per a la determinació de PQ per HPLC com per TLC i es realitza per a cada analit d'estudi (principis actius, PRs i impureses).

- **Límit de quantificació**

El LQ és la mínima quantitat d'un analit que es pot quantificar amb exactitud i precisió utilitzant un mètode analític. A diferència del LD, només es valida per a la determinació de

PQ per HPLC al ser un paràmetre quantitatiu, i es realitza per a cada analit d'estudi (principis actius, PRs i impureses).

– **Exactitud**

L'exactitud és el grau de concordança entre el valor que s'obté del mètode analític i el valor verdader de cada analit.

Paràmetre a validar només per a la determinació de PQ per HPLC.

– **Precisió**

La precisió és el grau de concordança entre una sèrie de resultats obtinguts considerant la variació lligada a la pròpia mostra i la relacionada amb les condicions d'anàlisi.

És a dir, la precisió engloba tant la repetibilitat, que estudia el grau de concordança entre repetits anàlisis d'una mateixa mostra en les mateixes condicions d'operació, com la precisió intermitja que estudia la variabilitat de resultats variant les condicions d'operació per a cada analit.

Aquest paràmetre només es valida per a la determinació de PQ per HPLC.

Cal mencionar que una vegada validats els paràmetres, qualsevol canvi en el procés de fabricació (síntesi, composició del producte final) i en els mètodes analítics, s'haurà de valorar l'impacte i revalidar els paràmetres pertinents.

**Taula 4.** Taula dels paràmetres a validar per a cada mètode analític de puresa química segons la guia Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>. Amb NA s'indiquen els paràmetres que no cal determinar o que no apliquen i amb una X s'indica el paràmetre necessari a validar, en cas que el paràmetre s'hagi de determinar per a diferents compostos s'indica amb les abreviatures de cada compost.

	<sup>11</sup> C-PIB: PQ HPLC	<sup>18</sup> F-FMISO: PQ HPLC	<sup>18</sup> F-FMISO: PQ TLC
<b>Selectivitat</b>	X	X	X
<b>Linealitat/rang</b>	PIB, PR-PIB	FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO	NA
<b>Límit de detecció</b>	PIB, PR-PIB	FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO	Criptand
<b>Límit de quantificació</b>	PIB, PR-PIB	FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO	NA
<b>Exactitud i precisió</b>	PIB, PR-PIB	FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO	NA

### 5.1.1.2 Hipòtesi

Els mètodes analítics desenvolupats per determinar la PQ per als RFs d'estudi són validables per a la determinació de la PQ seguint la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>.

### 5.1.1.3 Objectius

Validar els mètodes analítics per determinar la PQ pels dos RF d'estudi, definint:

- <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO: PQ per HPLC
  - Selectivitat
    - Demostrar que cada mètode analític és capaç de separar el principi actiu de les seves impureses habituals de síntesi i que el dissolvent utilitzat (fase mòbil) no constitueix una interferència.
  - Linealitat
    - Determinar l'interval en el qual cada mètode analític és proporcional a la concentració d'analit.
  - Límit de detecció
    - Determinar la mínima quantitat d'analit que es pot detectar per a cada mètode analític.
  - Límit de quantificació
    - Determinar la mínima quantitat d'analit que es pot quantificar per a cada mètode analític.
  - Exactitud
    - Estudiar el grau de concordança entre el valor que s'obté del mètode analític i el valor verdader.
  - Precisió
    - Estudiar la variabilitat associada a repetides injeccions d'una mateixa mostra (repetibilitat) i a les condicions d'anàlisi (precisió intermitja) de cada mètode analític.
- <sup>18</sup>F-FMISO: PQ per TLC
  - Selectivitat
    - Demostrar que el mètode és capaç de separar el catalitzador criptand dels altres components de la mostra.
  - Límit de detecció
    - Estudiar la mínima quantitat detectable de criptand usant el mètode analític.

## 5.1.1.4 Metodologia

**Puresa Química per HPLC**

- Mètode analític

**Taula 5.** Puresa química per HPLC: taula on s'indiquen les condicions i paràmetres dels mètodes analítics a validar per procedir a la determinació de la puresa química per HPLC dels RFs d'estudi.

**Puresa química per HPLC**

	<sup>11</sup> C-PIB	<sup>18</sup> F-FMISO															
<b>HPLC</b>	Agilent Serie 1100	Agilent Serie 1100															
<b>Columna cromatogràfica</b>	Mediterranean Sea 18, Tecnokroma (15 x 0,46 cm, 5 µm)	Mediterranean Sea 18, Tecnokroma (15 x 0,46 cm, 5 µm)															
<b>Fase mòbil (FM)</b>	Gradient fix: 55 % FMA / 45 % FMB FMA: 0,315 % format amònic qualitat HPLC en aigua purificada ajustat a pH 5 amb àcid fòrmic qualitat HPLC . FMB: Acetonitril qualitat HPLC.	Amb gradient: FMA: Aigua purificada FMB: Acetonitril qualitat HPLC. <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Temps</th> <th>FMA</th> <th>FMB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0- 4 min</td> <td>80 %</td> <td>20 %</td> </tr> <tr> <td>4-6,5 min</td> <td>5 %</td> <td>95 %</td> </tr> <tr> <td>6,5-7 min</td> <td>5 %</td> <td>95 %</td> </tr> <tr> <td>7-8 min</td> <td>80 %</td> <td>20 %</td> </tr> </tbody> </table>	Temps	FMA	FMB	0- 4 min	80 %	20 %	4-6,5 min	5 %	95 %	6,5-7 min	5 %	95 %	7-8 min	80 %	20 %
Temps	FMA	FMB															
0- 4 min	80 %	20 %															
4-6,5 min	5 %	95 %															
6,5-7 min	5 %	95 %															
7-8 min	80 %	20 %															
<b>Flux fase mòbil</b>	3 mL/min	1 mL/min															
<b>Detector Ultravioleta (UV)</b>	UV Agilent Model 1100 Longitud d'ona 350 nm	UV Agilent Model 1100 Longitud d'ona 327 nm															
<b>Patrons:</b>																	
Principi actiu	PIB <sup>51</sup>	FMISO <sup>53</sup>															
Precursor	PR-PIB o 6-OH-BTA-0 <sup>52</sup>	PR-FMISO o NITTP <sup>54</sup>															
Impureses	No aplica	IMP-FMISO <sup>55</sup>															

- Patrons:

Es preparen les dilucions segons taules adjuntes (taula 6 i taula 7).

**Taula 6.** Puresa química per HPLC: dissolucions patró per a la validació del mètode analític del RF  $^{11}\text{C}$ -PIB.**Patrons puresa química per HPLC**

$^{11}\text{C}$ -PIB	Blanc de PIB (BP)	100 % fase mòbil.
	Patró PIB (P1)	1,5 mg patró PIB enrasar a 10 mL amb fase mòbil. Concentració: 150 µg PIB/mL.
	Patró PR-PIB (P2)	1,0 mg patró PR-PIB enrasar a 10 mL de BP. Concentració: 100 µg PR-PIB/mL.
	Patró PIB + PR-PIB (P3)	86 µL P1, 13 µL P2 enrasar a 10 mL de BP. Concentració: 1,3 µg PIB/mL i 0,13 µg PR-PIB/mL.
	Patró Etanol (PE)	100 µL d'etanol enrasar fins 10 mL amb BP.
	Dissolució Sèrum fisiològic (SF)	Sèrum fisiològic o clorur sòdic 0,9 %.
	PIB Mostra problema (PMP)	Dissolució injectable de $^{11}\text{C}$ -PIB.

**Taula 7.** Puresa química per HPLC: dissolucions patró per a la validació del mètode analític del RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO.**Patrons puresa química per HPLC**

$^{18}\text{F}$ -FMISO	Blanc de FMISO (BF)	Dissolució al 20 % d'acetonitril en aigua (fase mòbil gradient temps 0).
	Patró de PR-FMISO (F1)	5 mg patró PR-FMISO en 10 mL d'acetonitril. Concentració: 500 µg PR-FMISO/mL.
	Patró mare de FMISO + PR-FMISO + IMP-FMISO (F2)	1 mg FMISO, 1 mg IMP-FMISO en 2 mL F1 enrasar fins 10 mL amb BF. Concentració: 100 µg FMISO/mL, 100 µg PR-FMISO/mL, 100 µg IMP-FMISO/mL.
	Patró de FMISO + PR-FMISO + IMP-FMISO (F3)	1 mL F2 enrasar fins 10 mL amb BF. D'aquesta dissolució pipetejar 1 mL i enrasar a 10 mL amb BF. Concentració: 1 µg FMISO/mL, 1 µg PR-FMISO/mL, 1 µg IMP-FMISO/mL.
	Patró etanol (FE)	100 µL d'etanol enrasar fins 10 mL amb BF.
	Patró criptand (FC)	15 mg criptand enrasar fins 10 mL amb BF. Concentració: 1,5 mg criptand/mL.
	FMISO mostra problema (FMP)	Dissolució injectable de $^{18}\text{F}$ -FMISO.

- Selectivitat
  - Per a cada mètode analític es realitza una sola injecció de les següents dissolucions:
    - Mètode  $^{11}\text{C}$ -PIB: dissolució BP, dissolució P3, dissolució SF, dissolució PE.
    - Mètode  $^{18}\text{F}$ -FMISO: dissolució BF, dissolució F3, dissolució FE, dissolució FC.
  - Criteri d'acceptació:
    - Es comprova que no existeixen analits que elueixen amb el mateix TR ni que la fase mòbil (BP, BF) ni la matriu (etanol, sèrum fisiològic) corresponent a cada RF, interfereixen en la determinació dels compostos estudiats.
- Linealitat
  - Per tal d'estudiar la linealitat del mètode en la quantificació de:
    - PIB i PR-PIB, es preparen les següents solucions (taula 8) que inclouen un rang superior i inferior del nivell d'acceptació establert (PIB  $1,3 \mu\text{g}/\text{mL}^{\text{x}}$  i de PR-PIB  $0,13 \mu\text{g}/\text{mL}^{\text{xi}}$ ).

**Taula 8.** Dissolucions patró per a la validació del paràmetre de linealitat del mètode analític per a la determinació de la puresa química per HPLC del RF  $^{11}\text{C}$ -PIB.

Patró	Volum P1 ( $\mu\text{L}$ )	Volum P2 ( $\mu\text{L}$ )	Volum d'enràs amb BP (mL)	Concentració PIB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentració PR-PIB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
SP1	4,4	4,4		0,07	0,04
SP2	8,6	8,6		0,13	0,09
SP3	11	11		0,17	0,11
SP4	22	22		0,33	0,22
SP5	44	44	10	0,66	0,44
SP6	65	65		0,98	0,65
SP7	86	86		1,30	0,86
SP8	109	109		1,63	1,09
SP9	130	130		1,95	1,30

<sup>x</sup> Límit per una dosi de 10 mL considerant que la quantitat màxima a injectar és de  $13 \mu\text{g}$  de PIB.

<sup>xi</sup> El límit d'acceptació de PR-PIB correspon al 10 % del límit d'acceptació de PIB.

- FMISO, PR-FMISO i IMP-FMISO, es preparen la següents solucions (taula 9) que inclouen un rang superior i inferior del nivell d'acceptació establert (FMISO 1,5 µg/mL<sup>xii</sup>, PR-FMISO+IMP-FMISO 3,5 µg/mL<sup>xiii</sup>).

**Taula 9.** Dissolucions patró per a la validació del paràmetre de linealitat del mètode analític per a la determinació de la puresa química per HPLC del RF <sup>18</sup>F-FMISO.

Patró	Solució a pipetejar	Volum (µL) a pipetejar	Volum d'enràs amb BF (mL)	Concentració (µg/mL) FMISO, IMP-FMISO PR-FMISO
SF1	F2	1.000		50
SF2	F2	600		30
SF3	F2	400		20
SF4	F2	300		15
SF5	F2	100		5
SF6	SF3	250	2	2,5
SF7	SF3	100		1
SF8	SF3	50		0,5
SF9	SF6	160		0,2
SF10	SF6	80		0,1
SF11	SF10	1.000		0,05
SF12	SF11	1.000		0,025

- S'injecta cada solució preparada per ordre de concentració creixent.
- Es calcula el factor de resposta (FR) de cada patró que és l'àrea obtinguda dividida per la concentració del patró.
- Es representa l'equació de la recta per a cada analit (PIB i PR-PIB; FMISO, IMP-FMISO i PR-FMISO) amb els patrons que compleixin el criteri d'acceptació del FR.
  - Abscisses: concentració d'analit (µg/mL).
  - Ordenades: àrea obtinguda per a cada concentració.

<sup>xii</sup> Límit per una dosi de 10 mL considerant que la quantitat màxima a injectar és de 15 µg de FMISO.

<sup>xiii</sup> Considerant el límit d'acceptació pitjor cas de cada impuresa individual (PR-FMISO, IMP-FMISO) que correspon a una dosi de 10 mL, la quantitat màxima a injectar de cada impuresa seria de 35 µg.



- Criteri d'acceptació:
  - Els factors de resposta (FRs) per a cadascuna de les concentracions de la mostra no presenten dispersió.
    - Coeficient de variació (CV) < 5%
  - S'estima l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats:
    - Coeficient de correlació de la recta de calibració:  $R^2 > 0,990$ .
    - Interval de confiança de l'ordenada a l'origen inclou el zero:  
**Equació 1.**  $IC = (a - t_{tab} \times s_a, a + t_{tab} \times s_a) \subset 0$   
Essent  $t_{tab}$  la t Student per  $\alpha=0,05$  i  $n=2$  graus de llibertat i la  $S_a$  la desviació estandard de l'ordenada a l'origen, llavors  $a=0$  amb una probabilitat superior al 95 % i el mètode no presenta biaix.
- Límit de detecció i límit de quantificació
  - Es realitza la inspecció visual de tots els cromatogrames de l'estudi de linealitat.
  - Criteri d'acceptació:
    - LD és la concentració mínima de cada analit que el seu senyal es diferencia del soroll de fons.
    - LQ:
      - 3 vegades el LD (3xLD), ha d'estar inclòs en l'interval de linealitat.
      - En cas que no estigui inclòs, es comprova que els següents múltiples de 3 del LD (6xLD, 9xLD...) estiguin inclosos en l'interval de linealitat.
- Precisió i exactitud
  - Es preparen les següents solucions a les quals s'afegeix una quantitat coneguda de solució patró de cada analit a quantificar considerant el nivell d'acceptació establert:
    - PIB 1,3 µg/mL i de PR-PIB 0,13 µg/mL
    - FMISO 1,5 µg/mL, PR-FMISO+IMP-FMISO 3,5 µg/mL.
  - S'injecten les solucions segons indica la taula 10 i 11: número d'injeccions per solució i operari.

**Taula 10.** Dissolucions patró per a la validació dels paràmetres de precisió i exactitud del mètode analític per a determinar la puresa química per HPLC de  $^{11}\text{C}$ -PIB.

	Solució	Composició	Nº injeccions	Operari
$^{11}\text{C}$ -PIB	Patró PIB + PR-PIB (P4)	173 $\mu\text{L}$ P1, 26 $\mu\text{L}$ P2 enrasar a 10 mL BP. Concentració: 2,6 $\mu\text{g}$ PIB/mL i 0,26 $\mu\text{g}$ PR-PIB/mL.	NA	NA
	Patró PIB + PR-PIB (P5)	100 $\mu\text{L}$ P4 + 100 $\mu\text{L}$ BP. Concentració: 1,3 $\mu\text{g}$ PIB/mL i 0,13 $\mu\text{g}$ PR-PIB/mL.	3	OP1
	Placebo	100 $\mu\text{L}$ PMP + 100 $\mu\text{L}$ BP.	3	OP1
	Mostra dopada	100 $\mu\text{L}$ PMP + 100 $\mu\text{L}$ P4.	6 3	OP1 OP2

NA: No aplica

**Taula 11.** Dissolucions patró per a la validació dels paràmetres de precisió i exactitud del mètode analític per a determinar la puresa química per HPLC de  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

	Solució	Composició	Nº injeccions	Operari
$^{18}\text{F}$ -FMISO	Patró de FMISO + PR-FMISO + IMP-FMISO (F4)	2 mL solució F2 enrasar a 10 mL BF. 1 mL solució anterior enrasar a 10 mL BF. Concentració: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FMISO, PR-FMISO i de IMP-FMISO .	NA	NA
	Patró FMISO + PR-FMISO + IMP-FMISO (F5)	400 $\mu\text{L}$ F4 + 400 $\mu\text{L}$ BF. Concentració: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FMISO, de PR-FMISO i de IMP-FMISO.	3	OP1
	Placebo	400 $\mu\text{L}$ FMP + 400 $\mu\text{L}$ BF.	3	OP1
	Mostra dopada	400 $\mu\text{L}$ FMP + 400 $\mu\text{L}$ F4.	6 3	OP1 OP2

NA: No aplica

- Es calcula:
  - Mitjana i CV de l'àrea per a cada analit de les 3 injeccions de patró (P5, F5) i placebo.
  - De les 9 injeccions de mostra dopada, es determina:
    - La recuperació de cada injecció, que és l'àrea d'analit corregida respecte l'àrea d'analit esperada. Per a cada analit es calcula de la següent manera:
      - Àrea corregida: àrea d'analit en la mostra dopada menys la mitjana de l'àrea de l'analit en les 3 injeccions de placebo.
      - Àrea esperada: mitjana de l'àrea de l'analit en les 3 injeccions del patró.
- Criteri d'acceptació:
  - Repetibilitat: es determinen la mitjana i el CV (%) dels percentatges de recuperació obtinguts per a cada operari.
    - $CV \leq 5 \%$
  - Precisió intermitja: es calculen la mitjana i el CV (%) dels percentatges globals de recuperació obtinguts (de les 9 injeccions).
    - $CV \leq 5 \%$
  - Exactitud: es realitza una prova t-Student per al percentatge de recuperació global (R).

**Equació 2.**  $t_{exp} = \frac{|100-R| \times \sqrt{n}}{s}$

Essent: R: percentatge de recuperació global

n: número de determinacions

s: desviació estàndard global de la mostra

- L'exactitud es considera satisfactòria si el percentatge global no difereix estadísticament de 100 %, pel que s'ha de complir que  $t_{exp} < t_{tab}$  amb un grau de probabilitat del 95 % ( $\alpha=0,05$ ) i n-1 graus de llibertat. No podrà existir cap valor individual fora del rang entre 90 – 110 %.
- En cas que no es compleixi s'avalua si l'exactitud és acceptable en funció de la desviació i el nivell de concentració.

**<sup>18</sup>F-FMISO: puresa química per TLC**

- Mètode analític

**Taula 12.** Mètode analític de puresa química per a la determinació de criptand pel RF <sup>18</sup>F-FMISO.

**Puresa química per TLC: Determinació de criptand**

<b>Fase estacionària</b>	Tires de TLC: Polygram SIL G/UV, Mackerey-Nagel.
<b>Reactiu</b>	Iodeplatinat potàssic TS.
<b>Patró</b>	Patró de criptand <sup>56</sup> .

- Patrons:

Es preparen les dissolucions necessàries per a realitzar la validació segons taula 13.

**Taula 13.** Dissolucions patró per a la validació del mètode analític per TLC del RF <sup>18</sup>F-FMISO.

**Patrons PQ per TLC**

<b><sup>18</sup>F-FMISO</b>	Blanc (FB)	Aigua purificada.
	Mostra problema (FMP)	Dissolució injectable de <sup>18</sup> F-FMISO.
	Dissolució mare de criptand (FC1)	50 mg de patró criptand enrasar fins 10 mL amb etanol. Concentració: criptand 5 mg/mL.
	Dissolució patró de criptand (FC2)	100 µL FC1 enrasar fins 10 mL amb aigua. Concentració: criptand 50 µg/mL.
	Mostra dopada (FMC)	Dissolució al 50 % FMP 50 % FC2.

- Selectivitat

- En una tira de TLC es realitzen 4 injeccions de 3 µL del reactiu iodeplatinat potàssic per separat.
- A continuació s'injecten les següents dissolucions cadascuna a sobre d'una injecció prèvia diferent de iodeplatinat:
  - Dissolució FB, dissolució FC2, dissolució FMP, dissolució FMC.
- Criteri d'acceptació:
  - Es comprova que no existeixen analits diferents al criptand que reaccionin amb el iodeplatinat potàssic (taca de color gris) i que ni el blanc ni la matriu del RF interfereixen en la detecció del criptand.

- Límit de detecció
  - Es preparen les solucions segons la taula 14 que inclouen un rang superior i inferior del nivell d'acceptació establert pel criptand 50 µg/mL.

**Taula 14.** Dissolucions patró per a la validació del paràmetre de límit de detecció del mètode analític per TLC del RF <sup>18</sup>F-FMISO.

	Volum FC1 (µL)	Volum d'enràs amb FB (mL)	Concentració (µg/mL) criptand
C1	50		25
C2	70		35
C3 (FC2)	100	10	50
C4	160		80
C5	300		150

- En una tira de TLC es realitzen 5 injeccions de 3 µL del reactiu iodeplatinat potàssic.
- A continuació s'injecten 2 µL de les solucions anteriors preparades cadascuna a una injecció prèvia diferent de iodeplatinat.
- Criteri d'acceptació:
  - s'observa visualment que la coloració final de la reacció (color gris) és més intensa a major concentració de criptand en les solucions patró testades.
  - LD: es determina per inspecció visual i correspon a la concentració mínima detectable.

## 5.1.1.5 Resultats

**PQ per HPLC**

- Selectivitat

A les taules següents es detallen els TR de cada compost que es va analitzar. S'indica amb ND els resultats no detectables o de senyal inexistent.

**Taula 15.**  $^{11}\text{C}$ -PIB pureza química per HPLC, selectivitat: resultats.

	Mostra	Temps de retenció	
$^{11}\text{C}$ -PIB	Dissolució BP	Fase mòbil	ND
	Dissolució PE	Etanol	ND
	Dissolució SF	Sèrum Fisiològic	ND
	Dissolució P3	PIB	2,88
		PR-PIB	1,47

ND: No detectable

**Taula 16.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO pureza química per HPLC, selectivitat: resultats.

	Mostra	Temps de retenció	
$^{18}\text{F}$ -FMISO	Dissolució BF	Fase mòbil	ND
	Dissolució FE	Etanol	ND
	Dissolució FC	Criptand	2,4
	Dissolució F3	IMP-FMISO	2,0
		FMISO	3,5
		PR-FMISO	5,9

ND: No detectable

- Linealitat

RF  $^{11}\text{C}$ -PIB: resultats de l'estudi de linealitat pel mètode analític de PQ per HPLC

- Es realitzaren les injeccions de cada patró, resultats adjuntats a la taula 17.
- S'estudià l'interval de concentracions que donaven un CV dels FRs que complien amb l'especificació (CV < 5 %) (taula 18):
  - L'interval que va complir l'especificació tant per a l'analit PIB com per PR-PIB va ser el de SP2 a la SP9, descartant-se la SP1 (per FR interval SP1 a SP9, CV > 5 %).

- Es va calcular la recta de calibració (Figura 16) i el coeficient de correlació (Figura 16 i taula 19) per a cada analit considerant els resultats dels patrons que pertanyien a l'interval que complia amb el criteri d'acceptació del FR.
  - El coeficient de correlació de la recta de calibració de cada analit va presentar un valor de  $R^2 > 0,990$ .
- Es va calcular l'interval de confiança de l'ordenada a l'origen de cada recta (taula 19).

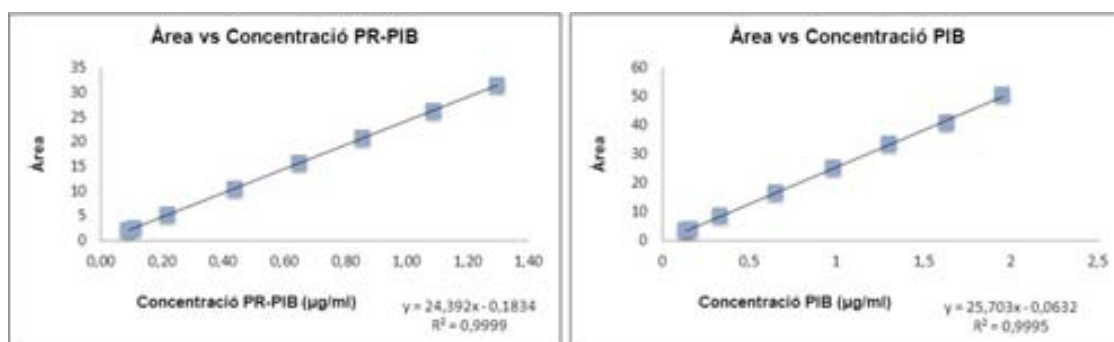
**Taula 17.**  $^{11}\text{C}$ -PIB pureza química per HPLC, linealitat. Taula de resultats obtinguts en l'estudi de linealitat on per a cada patró injectat s'indica: la concentració de l'analit en el patró (Conc), l'àrea obtinguda i el factor de resposta (FR) calculat (Àrea/concentració). S'han marcat els resultats que compleixen amb les especificacions establertes, els no marcats són els que es menyspreen per no complir-les.

	PR-PIB			PIB		
	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Àrea	FR	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Àrea	FR
SP1	0,04	1,23	30,75	0,07	1,44	20,57
SP2	0,09	2,17	24,11	0,13	3,46	26,62
SP3	0,11	2,42	22,00	0,16	3,90	24,38
SP4	0,22	5,15	23,41	0,33	8,52	25,82
SP5	0,44	10,38	23,59	0,65	16,55	25,46
SP6	0,65	15,79	24,29	0,98	25,15	25,66
SP7	0,86	20,88	24,28	1,3	33,56	25,82
SP8	1,09	26,26	24,09	1,63	41,01	25,16
SP9	1,3	31,59	24,30	1,95	50,61	25,95

**Taula 18.**  $^{11}\text{C}$ -PIB pureza química per HPLC, linealitat. Taula del càlcul dels coeficients de variació (CV) dels factors de resposta (FRs) per intervals de solucions patrons. S'han marcat els resultats que compleixen amb les especificacions establertes, els no marcats són els que es menyspreen per no complir-les.

	FRs CV (%)	
	Interval de SP1 a SP9	Interval de SP2 a SP9
PR-PIB	9,96 %	3,31 %
PIB	6,97 %	2,54 %

**Figura 16.**  $^{11}\text{C}$ -PIB pura química per HPLC, linealitat: recta de calibració obtinguda per a l'estudi de linealitat dels analits: PR-PIB (esquerra) i PIB (dreta).



**Taula 19.**  $^{11}\text{C}$ -PIB pura química per HPLC, linealitat: taula de resultats obtinguts a partir de les rectes de calibració calculades en l'estudi de linealitat per al  $^{11}\text{C}$ -PIB. A la taula s'indica per a cada analit d'estudi (PR-PIB, PIB): el rang lineal, el valor de la recta de calibració, l'interval de confiança de l'ordenada a l'origen (IC 95 %) i el coeficient de correlació de la recta de calibració ( $R^2$ ).

Analit	Rang lineal ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recta de calibració	IC 95 %	$R^2$
PR-PIB	0,09-1,30	$Y=24,392C-0,1834$	(-0,38, 0,01)	0,999
PIB	0,13-1,95	$Y=25,703C-0,0632$	(-0,69, 0,57)	0,999

RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO : resultats estudi de linealitat pel mètode analític de PQ per HPLC.

- Es varen realitzar les injeccions de cada patró, resultats adjuntats a taula 20.
- Es va estudiar l'interval de concentracions que donaven un CV dels FRs que complia amb l'especificació ( $\text{CV} < 5\%$ ) (taula 21) :
  - L'interval que va complir amb l'especificació per a l'analit FMISO va ser el de SF1 al SF11, descartant-se SF12 ( $\text{CV} > 5\%$ ).
  - L'interval que va complir amb l'especificació per a l'analit PR-FMISO va ser el de SF1 a la SF10, descartant-se SF11 i SF12 ( $\text{CV} > 5\%$ ).
  - L'interval que va complir amb l'especificació per a l'analit IMP-FMISO va ser el de SF1 a la SF10, descartant-se la SF11 i SF12 ( $\text{CV} > 5\%$ ).



**Taula 20.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, linealitat: taula dels resultats obtinguts en l'estudi de linealitat per al RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO. A la taula s'indica per a cada patró injectat i per analit: la concentració (Conc), l'àrea obtinguda i el factor de resposta (FR, Àrea/concentració) calculat. S'han marcat els resultats que compleixen amb les especificacions establertes, els no marcats són els que es menyspreen per no complir-les.

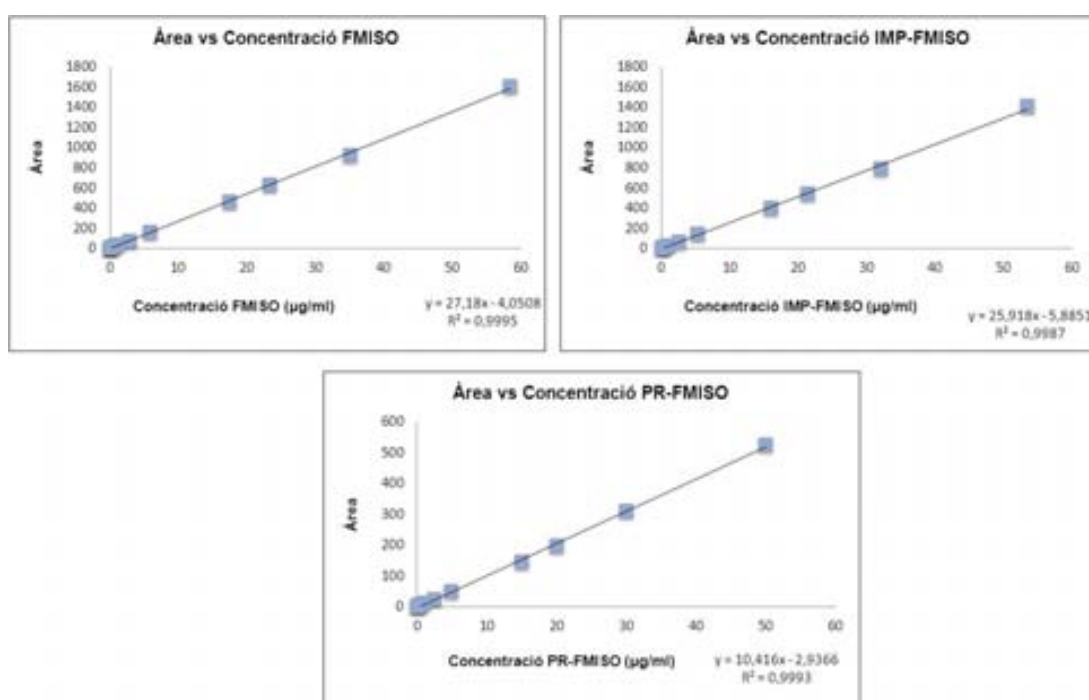
	FMISO			IMP-FMISO			PR-FMISO		
	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Àrea	FR	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Àrea	FR	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Àrea	FR
<b>SF1</b>	58,5	1.606,14	27,46	53,5	1.407,7	26,31	50	523,7	10,47
<b>SF2</b>	35,1	924,4	26,34	32,1	788,96	24,58	30	309,3	10,31
<b>SF3</b>	23,4	625,91	26,75	21,4	544,45	25,44	20	196,5	9,83
<b>SF4</b>	17,55	463,93	26,43	16,05	398,04	24,80	15	146	9,73
<b>SF5</b>	5,85	158,32	27,06	5,35	138,73	25,93	5	49,24	9,85
<b>SF6</b>	2,925	72,37	24,74	2,675	61,35	22,93	2,5	22,87	9,15
<b>SF7</b>	1,17	31,9	27,26	1,07	27,57	25,77	1	10,03	10,03
<b>SF8</b>	0,585	16,43	28,09	0,535	13,86	25,91	0,5	4,97	9,94
<b>SF9</b>	0,234	5,72	24,44	0,214	4,97	23,22	0,2	1,82	9,10
<b>SF10</b>	0,117	3,11	26,58	0,107	2,71	25,33	0,1	0,97	9,70
<b>SF11</b>	0,0585	1,66	28,38	0,0585	1,66	28,38	0,05	0,27	5,40
<b>SF12</b>	0,0268	0,53	19,81	0,0293	0,9	30,77	0,03	0,22	8,80

**Taula 21.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, linealitat: taula del càlcul dels coeficient de variació (CV) dels factors de resposta (FRs) per intervals de solucions patrons. S'han marcat els resultats que compleixen amb les especificacions establertes, els no marcats són els que es menyspreen per no complir-les.

	FRs CV (%)		
	Interval SF1-SF12	Interval SF1-SF11	Interval SF1-SF10
<b>FMISO</b>	8,84 %	4,57 %	NA
<b>IMP-FMISO</b>	8,17 %	5,88 %	4,60 %
<b>PR-FMISO</b>	15,78 %	14,80 %	4,45 %

- Es va calcular la recta de calibració (Figura 17) i el coeficient de correlació (Figura 17 i taula 22) per a cada analit considerant els resultats dels patrons que pertanyien a l'interval que complia amb el criteri d'acceptació del FR.
  - El coeficient de correlació de la recta de calibració de cada analit va presentar un valor de  $R^2 > 0,999$ .
  - Es va calcular l'interval de confiança de l'ordenada a l'origen de cada recta (taula 22).

**Figura 17.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, linealitat: recta de calibració obtinguda per a l'estudi de linealitat dels analits: FMISO (esquerra), PR-FMISO (baix) i IMP-FMISO (dreta).



**Taula 22.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, linealitat: taula dels resultats obtinguts a partir de les rectes de calibració calculades en l'estudi de linealitat per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO. A la taula s'indica per a cada analit d'estudi (FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO) el rang lineal, el valor de la recta de calibració, l'interval de confiança de l'ordenada a l'origen (IC 95 %) i el coeficient de correlació de la recta de calibració ( $R^2$ ).

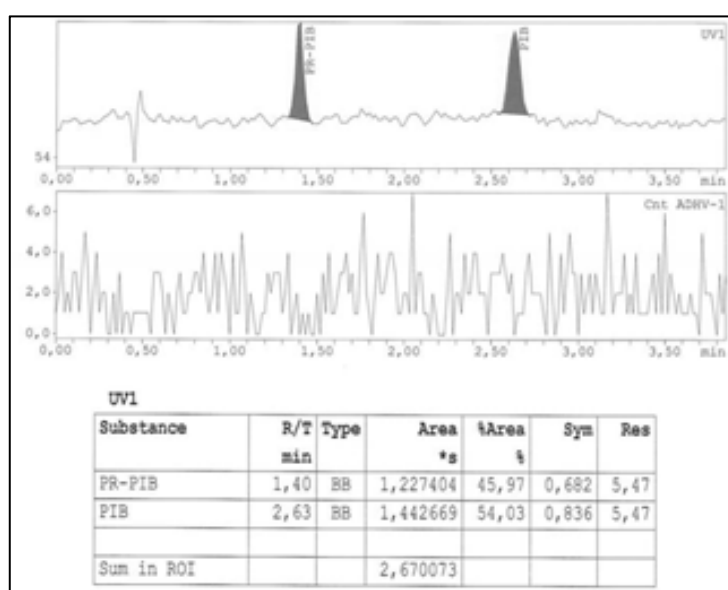
	Rang lineal (µg/mL)	Recta de calibració	IC 95 %	$R^2$
<b>FMISO</b>	0,06-58,50	$Y=27,18C-4,05$	(-14,12, 6,02)	0,999
<b>IMP-FMISO</b>	0,11-53,50	$Y=25,92C-5,89$	(-22,06, 10,29)	0,999
<b>PR-FMISO</b>	0,10-50,00	$Y=10,42C-2,94$	(-7,52, 1,65)	0,999

- Límit de detecció i límit de quantificació

Resultats per al <sup>11</sup>C-PIB

- Es va realitzar la inspecció visual de tots els cromatogrames de l'estudi de linealitat. La concentració mínima observada de cada analit que el seu senyal va diferenciar-se del soroll de fons (LD observat) va ser de: 0,04 µg/mL per PR-PIB i 0,07 µg/mL per PIB (figura 18).

**Figura 18.** <sup>11</sup>C-PIB puresa química per HPLC, límit de detecció i límit de quantificació: imatge dels cromatogrames corresponents al límit de detecció (cromatograma patró SP1).



- Respecte al LQ es va calcular el valor resultant de l'operació 3xLD i s'observà que estava inclòs en la recta de calibració (el valor calculat 3xLD va ser major que el valor menor de concentració inclòs a la recta de calibració). El LQ va ser el 1er valor de la recta de calibració (taula 23).

**Taula 23.** <sup>11</sup>C-PIB puresa química per HPLC, límit de detecció i límit de quantificació: taula resum dels resultats obtinguts.

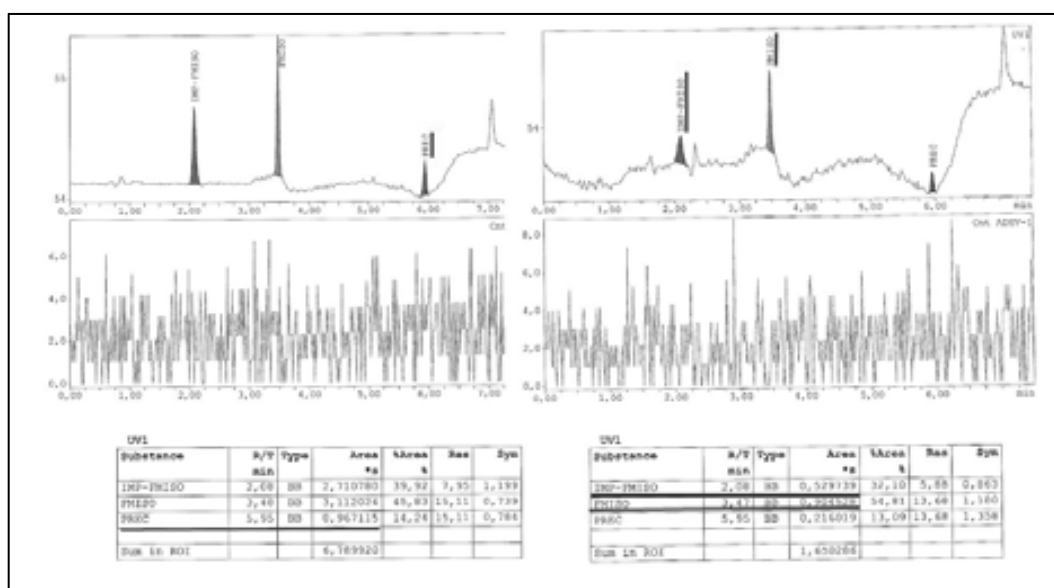
	LD	3xLD	Valor menor recta calibració	LQ
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
PR-PIB	0,04	0,12	0,09	0,09
PIB	0,07	0,21	0,13	0,13

LD: límit de detecció; LQ: límit de quantificació

### Resultats per al $^{18}\text{F}$ -FMISO

- Es va realitzar la inspecció visual de tots els cromatogrames de l'estudi de linealitat, observant-se la següent concentració mínima de cada analit que el seu senyal es va diferenciar del soroll de fons (LD observat): 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per PR-FMISO, 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per IMP-FMISO i per FMISO (figura 19).

**Figura 19.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, límit de detecció i límit de quantificació: imatge dels cromatogrames corresponents al límit de detecció: PR-FMISO o PREC (cromatograma patró SF10), IMP-FMISO i FMISO (cromatograma patró SF12).



- Pel que fa al LQ es va agafar el valor més baix per a cada analit comparant el primer valor inclòs a la recta de calibració i el valor resultant de l'operació  $3 \times \text{LD}$ . (taula 24)

**Taula 24.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química HPLC, límit de detecció i límit de quantificació: Taula resum dels resultats obtinguts.

	LD	3xLD	Valor menor recta calibració	LQ
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$
FMISO	0,03	0,09	0,06	0,06
IMP-FMISO	0,03	0,09	0,11	0,11
PR-FMISO	0,03	0,09	0,10	0,10

LD: límit de detecció; LQ: límit de quantificació

– Precisió i exactitud

- La mitjana de l'àrea i el CV de les tres injeccions per a cada analit en les solucions patró (P5 i F5) i placebo, es representen a la taula 25 pel RF  $^{11}\text{C}$ -PIB i a la taula 28 pel RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO.
- La mostra de  $^{11}\text{C}$ -PIB no va presentar àrea de PR-PIB i la mostra de  $^{18}\text{F}$ -FMISO no va presentar àrea de PR-FMISO.
- Els resultats de la mostra dopada i els càlculs necessaris per a la determinació de l'exactitud i precisió es representen a la taula 26 a la 27 pel RF  $^{11}\text{C}$ -PIB i a la taula 29 a la 31 pel RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

**Taula 25.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula amb els resultats de les 3 injeccions de patró (P5) i placebo, per a l'estudi de l'exactitud i precisió de  $^{11}\text{C}$ -PIB. S'adjunta el càlcul de la mitjana i el coeficient de variació (CV) de l'àrea de cada analit en cada solució patró.

Injecció	Placebo: Àrees analits		Patró: Àrees analits	
	PIB	PR PIB	PIB	PR PIB
1	16,70	ND	30,25	2,93
2	16,40	ND	29,57	2,99
3	16,85	ND	29,49	2,97
Mitjana	16,65	NA	29,77	2,96
CV(%)	1,38	NA	1,40	1,03

ND: no detectable, NA: no aplica

**Taula 26.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula per a l'analit PIB on s'indiquen els resultats de les 9 injeccions (INJ) de mostra dopada de  $^{11}\text{C}$ -PIB realitzats per 2 operaris diferents (OP1 i OP2), on es representa l'àrea de cada analit (A), l'àrea corregida (Ac), recuperació (R), la mitjana i el coeficient de variació (CV) per operari, el CV de totes les injeccions i el temps experimental (t exp).

	OPERARI	INJ	A PIB	Ac PIB	R	Mitjana	CV%	Mitjana	CV%	texp
Analit: PIB	OP1	1	46,26	29,61	99,46	100,35	0,49	100,47	0,61	2,289
		2	46,58	29,93	100,54					
		3	46,67	30,02	100,84					
		4	46,62	29,97	100,67					
		5	46,48	29,83	100,20					
		6	46,54	29,89	100,40					
	OP2	1	46,35	29,70	99,76	100,71	0,89			
		2	46,66	30,01	100,81					
		3	46,88	30,23	101,55					

**Taula 27.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula per a l'analit PR-PIB on s'indiquen els resultats de les 9 injeccions (INJ) de mostra dopada de  $^{11}\text{C}$ -PIB realitzats per 2 operaris diferents (OP1 i OP2), on es representa l'àrea de cada analit (A), l'àrea corregida (Ac), recuperació (R), la mitjana i el coeficient de variació (CV) per operari, el CV de totes les injeccions i el temps experimental (t exp).

	OPERARI	INJ	A PR-PIB	Ac PR-PIB	R	Mitjana	CV%	Mitjana	CV%	texp
Analit: PR-PIB	OP1	1	3,07	3,07	103,60	99,79	3,03	99,93	2,58	0,078
		2	3,00	3,00	101,24					
		3	2,96	2,96	99,89					
		4	2,84	2,84	95,84					
		5	3,01	3,01	101,57					
		6	2,83	2,83	96,59					
	OP2	1	2,96	2,96	99,89	100,22	1,87			
		2	2,92	2,92	98,54					
		3	3,03	3,03	102,25					

**Taula 28.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula amb els resultats de les 3 injeccions de patró (P5) i placebo, per a l'estudi de l'exactitud i precisió de  $^{18}\text{F}$ -FMISO. S'adjunten el càlcul de la mitjana i el coeficient de variació (CV) de l'àrea de cada analit en cada solució patró.

Injecció	Placebo: Àrees analits			Patró: Àrees analits		
	IMP-FMISO	FMISO	PR-FMISO	IMP-FMISO	FMISO	PR-FMISO
1	3,31	26,28	ND	25,17	31,59	4,30
2	3,40	25,81	ND	25,38	32,19	4,48
3	3,35	26,14	ND	26,21	32,28	4,71
Mitjana	3,35	26,08	NA	25,59	32,02	4,50
CV(%)	1,34	0,93	NA	2,15	1,17	4,57

**Taula 29.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula per a l'analit FMISO on s'indiquen els resultats de les 9 injeccions de mostra dopada realitzats per 2 operaris diferents, on es representa l'àrea de cada analit (A), l'àrea corregida (Ac), recuperació (R), la mitjana, el coeficient de variació (CV) per operari i en conjunt i temps experimental (texp).

	OPERARI	INJ	A	Ac	R	Mitjana	CV	Mitjana	CV	texp
			FMISO	FMISO			%	%		
Analit: FMISO	OP1	1	58,19	32,11	100,29	100,71	3,09	102,08	3,42	1,787
		2	56,55	30,47	95,17					
		3	58,35	32,27	100,79					
		4	59,27	33,19	103,66					
		5	59,28	33,20	103,70					
		6	58,30	32,22	100,64					
	OP2	1	58,78	32,70	102,13	104,82	2,62			
		2	59,60	33,52	104,69					
		3	60,54	34,46	107,63					

**Taula 30.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula per a l'analit PR-FMISO on s'indiquen els resultats de les 9 injeccions de mostra dopada realitzats per 2 operaris diferents, on es representa l'àrea de cada analit (A), l'àrea corregida (Ac), recuperació (R), la mitjana, el coeficient de variació (CV) per operari i en conjunt i temps experimental (texp).

	OPERARI	INJ	A	Ac	R	Mitjana	CV	Mitjana	CV	texp
			PR-FMISO	PR-FMISO						
Analit: PR-FMISO	OP1	1	4,14	4,14	92,07	96,74	4,16	98,00	4,46	1,374
		2	4,13	4,13	91,85					
		3	4,42	4,42	98,30					
		4	4,50	4,50	100,07					
		5	4,56	4,56	101,41					
		6	4,35	4,35	96,74					
	OP2	1	4,28	4,28	95,18	100,52	4,62			
		2	4,62	4,62	102,74					
		3	4,66	4,66	103,63					

**Taula 31.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per HPLC, precisió i exactitud: taula per a l'analit IMP-FMISO on s'indiquen els resultats de les 9 injeccions de mostra dopada realitzats per 2 operaris diferents, on es representa l'àrea de cada analit (A), l'àrea corregida (Ac), recuperació (R), la mitjana, el coeficient de variació (CV) per operari i en conjunt i temps experimental (texp).

	OPERARI	INJ	A	Ac	R	Mitjana	CV	Mitjana	CV	texp
			IMP-FMISO	IMP-FMISO						
Analit: IMP-FMISO	OP1	1	28,95	25,60	100,04	96,15	5,23	97,23	4,43	1,928
		2	27,20	23,85	93,20					
		3	25,80	22,45	87,73					
		4	28,47	25,12	98,16					
		5	29,30	25,95	101,41					
		6	28,01	24,66	96,37					
	OP2	1	29,01	25,66	100,27	99,39	0,79			
		2	28,63	25,28	98,79					
		3	28,71	25,36	99,10					



- Resultats:
  - Repetibilitat:
    - El CV de cada operari per a cada analit fou  $\leq 5\%$
  - Precisió intermitja:
    - El CV global de cada mètode analític i per a cada analit fou  $\leq 5\%$
  - Exactitud:
    - PIB:  $t_{exp} = 2,289 < t_{tab} 2,306$
    - PR-PIB:  $t_{exp} = 0,078 < t_{tab} 2,306$
    - FMISO:  $t_{exp} = 1,787 < t_{tab} 2,306$
    - PR-FMISO:  $t_{exp} = 1,374 < t_{tab} 2,306$
    - IMP-FMISO:  $t_{exp} = 1,928 < t_{tab} 2,306$

 **$^{18}\text{F}$ -FMISO: PQ per TLC**

- Selectivitat
  - Es prepararen les dissolucions pertinents i es realitzà el test per a cadascuna d'elles (taula 32).

**Taula 32.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per TLC, selectivitat: taula amb els resultats del paràmetre de selectivitat del mètode analític de determinació de criptand mitjançant la tècnica de TLC per al RF  $^{18}\text{F}$ - FMISO.

Mostra	Observació	
Dissolució FB	Aigua	No s'observà senyal (figura 20)
Dissolució FMP	Mostra $^{18}\text{F}$ -FMISO	No s'observà senyal (figura 20)
Dissolució FC2	Criptand 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Coloració gris d'alta intensitat (figura 20)
Dissolució FMC	Mostra $^{18}\text{F}$ -FMISO dopada amb criptand	Coloració gris de baixa intensitat (figura 20)

**Figura 20.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per TLC, selectivitat: imatges dels resultats obtinguts de la validació de selectivitat del mètode analític de determinació de criptand mitjançant la tècnica de TLC pel RF  $^{18}\text{F}$ - FMISO.



- Límit de detecció
  - Es prepararen les dilucions pertinents i es realitzà el test per a cadascuna d'elles obtenint els resultats adjuntats a la taula 33.

**Taula 33.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa química per TLC, límit de detecció: taula amb els resultats del paràmetre de límit de detecció del mètode analític de determinació de criptand mitjançant la tècnica de TLC pel RF  $^{18}\text{F}$ - FMISO.

	Concentració criptand ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Senyal
C1	25	No detectable
C2	35	Detectable
C3 (FC2)	50	Detectable
C4	80	Detectable
C5	150	Detectable

#### 5.1.1.6 Discussió

##### PQ per HPLC

- Especificacions:
 

Establir les especificacions de PQ és un dels punts més crítics sobretot en el cas de RFs per als quals no existeix cap monografia específica. En el cas dels RFs d'estudi es va realitzar segons s'indica a continuació.

  - Principi actiu
 

El límit per a cadascun dels principis actius es va establir segons bibliografia basada en estudis toxicològics (Dosi letal 50 %, assajos de primera vegada en humans o *First-in-human Clinical trials*), PEI nº 09-006<sup>37</sup> i PEI nº 10-105<sup>38</sup>. Concretament, en el cas de  $^{11}\text{C}$ -PIB es varen establir segons *First in humans studies* realitzats a Uppsala<sup>37</sup> i en el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO en base a un Dossier públic de producte en investigació de  $^{18}\text{F}$ -FMISO del *National Cancer Institute (Investigator's Brochure: [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO)*<sup>58</sup>.
  - Impureses
 

En el cas de les impureses es realitzà de la mateixa manera que el principi actiu. Generalment, quan no es disposa de molts estudis toxicològics de les impureses, s'estableix un límit d'impureses igual o inferior al 10 % de la quantitat permesa de

principi actiu considerant no superar el valor del llindar de potencial toxicològic (*threshold of toxicological concern*, TTC:  $> 1,5 \mu\text{g}/\text{dia}^{\text{xiv}}$ ) establert a la guia sobre límits d'impureses genotòxiques EMEA/CHMP/QWP/251344/2006 de l'EMA (*guideline on the limits of genotoxic impurities*)<sup>59</sup>. Aquest és el criteri que es va seguir en el cas de les especificacions per a les impureses de  $^{11}\text{C}$ -PIB.

En el cas de FMISO al disposar del Dossier de  $^{18}\text{F}$ -FMISO del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>, es varen agafar els límits establerts en el Dossier.

- Criptand

Els límits s'estableixen segons Dossier de  $^{18}\text{F}$ -FMISO del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>. Cal mencionar que el límit de  $50 \mu\text{g}$  criptand/mL, és més restrictiu que el límit establert per la monografia de FDG<sup>41</sup> i per la monografia 2014 de FMISO<sup>26</sup> que és de  $220 \mu\text{g}$  criptand/mL<sup>xv</sup>.

- Limitació per volum

Les especificacions de PQ s'expressen per concentració ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) considerant que el volum màxim d'injecció és de 10 mL. Per exemple, en el cas del  $^{11}\text{C}$ -PIB segons estudis toxicològics es limita a  $13 \mu\text{g}$  de PIB, per tant el producte final no pot contenir més de  $1,3 \mu\text{g}$  PIB/mL. Però com que en els RFs, a diferència dels medicaments convencionals, el volum d'injecció varia amb el temps a causa de la semivida, a l'especificació s'afegeix la limitació per volum en cas que se superi l'especificació de concentració. Seguint l'exemple, si un lot supera els  $1,3 \mu\text{g}$  PIB/mL es limita el volum de la dosi a injectar per tal que no s'injecti més de  $13 \mu\text{g}$  de PIB (en un lot de  $2 \mu\text{g}$  PIB/mL, el volum màxim per dosi a injectar seria de 6,5 mL). El fet d'incloure la limitació per volum en l'especificació fa que certs lots siguin aptes encara que no compleixin el límit de concentració per lot, ja que limitant per volum la dosi d'injecció permet complir el criteri de massa a injectar. Al mateix temps, la limitació per volum permet el control del compliment de les especificacions de forma individualitzada, és a dir, per a cada injecció. Cal mencionar que es permet la limitació per volum atès al marc d'ús d'aquests RFs al ser no comercials i destinat el seu ús a la unitat clínica del mateix servei de Radiofarmàcia, fet que permet la comunicació i el control en cas de limitació per volum de la dosi a injectar.

<sup>xiv</sup> No hi ha impureses que presentin risc toxicològic, és a dir, que excedeixin el llindar de potencial toxicològic (*threshold of toxicological concern*, TTC:  $> 1,5 \mu\text{g}/\text{dia}$ ).

<sup>xv</sup> Les monografies de la  $^{18}\text{F}$ -FDG<sup>41</sup> i de  $^{18}\text{F}$ -FMISO<sup>26</sup> citen concretament  $2,2 \text{ mg}$  criptand/Volum de la dosi màxima recomanada, que en el cas dels RFs d'estudi és de 10 mL, per tant el límit s'establiria a  $220 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

- Selectivitat
  - Per al  $^{11}\text{C}$ -PIB:
    - Els dos analits (PIB, PR-PIB) que conté la mostra elueixen a TR diferents i ni la fase mòbil ni la matriu del RF (sèrum fisiològic, etanol) donen senyal en el mètode analític usat, com es pot comprovar a la taula 15.
  - Per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO:
    - Els tres analits (IMP-FMISO, FMISO, PR-FMISO) que conté la mostra elueixen a TR diferents i la fase mòbil no dóna senyal en el mètode analític usat, com es pot comprovar a la taula 16.
    - Respecte a la possible impuresa (criptand) dona senyal a un TR pròxim al TR de IMP-FMISO però sense interferir en la seva determinació (taula 16). Cal mencionar que el patró criptand FC presenta una concentració (1,5 mg/mL) superior a l'especificació (< 50 µg/mL) ja que a concentracions menors no és detectable, essent necessària la seva determinació per TLC. En la mostra de producte final de  $^{18}\text{F}$ -FMISO el criptand pel mètode HPLC no és detectable.

Per tant es pot considerar que els mètodes analítics utilitzats presenten una òptima separació i que superen el test de selectivitat.

- Linealitat
  - Per al  $^{11}\text{C}$ -PIB:
    - Es preparen unes solucions que inclouen l'interval de concentració entre el 5 % i el 150 % respecte els valors límits a injectar de PIB. En el cas de PR-PIB inclou del 30 % al 120 % ja que el valor menor d'especificació és de l'ordre de 0,13 µg.
    - En l'anàlisi estadístic de les dades el CV dels FRs que considera totes les solucions patró (de la SP1 a la SP9) no compleix el criteri d'acceptació. Per tant observant el valor de FR de la solució SP1 i comparant-lo amb el de la resta, no es considera aquest valor i es calcula a partir de SP2, donant un CV que compleix especificació i uns paràmetres de recta de calibració que compleixen amb el criteri d'acceptació (taules 17 i 18).
    - Per tant es pot considerar que el mètode analític per  $^{11}\text{C}$ -PIB és lineal dins del rang (taules 19):

- PIB de 0,13 a 1,95 µg/mL
- PR-PRIB de 0,09 a 1,30 µg/mL

Essent els valors límits per a cada analit (1,3 µg PIB/mL i 0,13 µg PR-PIB/mL) es pot considerar que el mètode analític és adequat per a les condicions d'assaig. Fora de l'interval de cada analit no es pot assegurar la linealitat, per tant no seran valors quantificables. En el cas d'obtenir valors superiors als validats per quantificar s'hauria de diluir la mostra o bé procedir a validar valors superiors. En cas d'obtenir valors inferiors no és possible validar ja que s'ha demostrat la no linealitat excloent la solució SP1. No és d'esperar obtenir valors inferiors o majors als validats dins el rang que sigui d'interès quantificar-los.

- Per al <sup>18</sup>F-FMISO:
  - Es preparen unes solucions a partir de la solució de F1 per tal de cobrir un rang superior i inferior de cada analit considerant el nivell d'acceptació establert i que en el cas de de PR-FMISO i IMP-FMISO el límit està establert com a sumatori d'impureses. El 5 % i 150 % del límit de cada analit està inclòs en les solucions d'estudi.
  - L'anàlisi estadístic de les dades el CV dels FRs que considera totes les solucions patró (de la SF1 a la SF12) no compleix el criteri d'acceptació per cap analit. Per tant es procedeix a recalculer el CV del FR excloent paulatinament diversos valors fins al compliment del criteri d'acceptació i posteriorment es calculen els paràmetres de recta de calibració que compleixen amb el criteri d'acceptació: SF12 s'exclou pels 3 analits, SF12 i SF11 s'exclouen per PR-FMISO i IMP-FMISO (taules 20 i 21).
  - Per tant es pot considerar que el mètode analític per <sup>18</sup>F-FMISO és lineal dins del rang (taula 22):
    - FMISO de 0,06 a 58,50 µg/mL
    - IMP-FMISO de 0,11 a 53,50 µg/mL
    - PR-FMISO de 0,10 a 50,00 µg/mL
  - Tenint en compte els valors límits per a cada analit (1,50 µg FMISO/mL i 3,50 µg/mL sumatori de PR-FMISO i IMP-FMISO) es pot considerar que el mètode analític és adequat per a les condicions d'assaig. Fora de l'interval de cada analit no es pot assegurar la linealitat, per tant no seran valors

quantificables. En el cas d'obtenir valors superiors als validats per quantificar s'hauria de diluir la mostra o bé procedir a validar valors superiors. En cas d'obtenir valors inferiors no és possible validar ja que s'ha demostrat la no linealitat excloent les solucions SF12 o SF11. No és d'esperar obtenir valors inferiors o majors als validats dins el rang que sigui d'interès quantificar-los.

### – Límit de detecció i límit de quantificació

Existeixen diferents mètodes descrits a la guia ICH Q2 (R1): *Validation of Analytical procedures*<sup>57</sup> per determinar els límits de detecció i de quantificació depenent de si el mètode és instrumental o no (inspecció visual, basat en la relació senyal-soroll, basat en la desviació estàndard de la recta de l'analit, basat en la desviació estàndard del blanc, basat en la corba de calibració). La guia també cita que es poden usar altres mètodes sempre que es justifiquin i es demostrin.

Encara que en principi estigui indicat per a mètodes no instrumentals, en el cas dels mètodes d'estudi escollim el mètode d'inspecció visual per tal de determinar el LD: el fet que els RFs s'administrin en microdosi fa que els patrons de menor concentració usats per a l'estudi de linealitat siguin molt pròxims a la línia base (senyal/soroll) i a les condicions d'ús, per la qual cosa es pot treure profit d'aquests cromatogrames i establir visualment la mínima quantitat de cada analit que es pot determinar en cada mètode analític.

Respecte al LQ, s'utilitza l'equació on LQ és el valor igual a 3 vegades el LD sempre que estigui dins el rang de linealitat estudiat. Així un cop determinat el LD i l'interval de linealitat, el LQ és fàcilment calculable.

En el cas del mètode analític per al <sup>11</sup>C-PIB, el valor de 3xLD en els dos analits és superior al valor menor de la corresponent recta de calibració, per tant s'agafa com a valor de LQ el de la recta de calibració al ser el menor valor quantificable (taula 23).

En el cas dels 3 analits del mètode analític per al <sup>18</sup>F-FMISO, el valor de 3xLD en l'analit FMISO és superior al valor menor de la corresponent recta de calibració, per tant s'agafa com a valor de LQ el de la recta de calibració per ser el valor menor quantificable. En el cas de PR-FMISO i IMP-FMISO, s'agafa com a LQ el primer valor de la recta de calibració ja que el valor 3xLD no està inclòs dins la recta (taula 24).

### – Precisió i exactitud

Es prepararen patrons a concentracions límit de cada analit, però en el cas dels analits PR-FMISO i IMP-FMISO, al ser l'especificació sumatòria, es preparen a 1 µg/mL.

En el test de precisió es considera:

- Repetibilitat diverses injeccions d'una mateixa mostra per a un mateix operari, així només s'estudia la variabilitat associada al propi mètode analític.

En el cas dels dos RFs d'estudi, es pot observar que les injeccions de placebo no presenten àrea de PRs (ni PR-PIB taula 25, ni PR-FMISO taula 28). Això es deu a què aquesta impuresa de la reacció no sempre està present, ja que depèn del procés de purificació. El fet de no disposar d'aquest valor no es creu significatiu per a l'assaig ja que, com es pot observar a les taula 25 per  $^{11}\text{C}$ -PIB i a les taula 28 per  $^{18}\text{F}$ -FMISO, es tenen diverses injeccions d'una mateixa mostra on l'analit és PR-PIB o PR-FMISO i el CV de l'operari en els dos casos compleix el criteri d'acceptació ( $\text{CV} \leq 5\%$ ).

- Precisió intermitja, considerant com a variabilitat l'associada a diferents operaris, s'estudia el CV global de diverses injeccions d'una mateixa mostra realitzada per diferents operaris. Es descarta realitzar la variabilitat associada a diferents dies d'estudi ja que es té establert que sempre que es realitza un test s'injecten els patrons i es fa un test d'idoneïtat intern en el mateix dia.

A la taula 31, es pot observar que per a l'analit IMP-FMISO s'obté un valor de CV de 5,23 %, s'accepta el valor ja que s'agafa el CV sense decimals arrodonint-se al valor 5 i a més tots els altres valors obtinguts pel mateix operari i del mateix analit (taula 28) compleix el criteri d'acceptació (1,34 %).

- Exactitud, s'utilitza l'anàlisi estadístic de t-Student en una mostra dopada.

### $^{18}\text{F}$ -FMISO: PQ per TLC

- Selectivitat:
  - No existeix cap compost de la mostra que interfereixi en la determinació del catalitzador, a més la coloració de la taca del patró criptand concentrat és de més intensitat que la mostra dopada amb criptand que conté menys quantitat de criptand (taula 32, figura 20).
- Límit de detecció
  - S'observa que en augmentar la concentració d'analit (criptand) augmenta la coloració grisa (taula 33).
  - La mínima quantitat detectable de criptand és de 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (taula 33).

### 5.1.1.7 Conclusions

#### PQ per HPLC

- Selectivitat
  - Els mètodes analítics per HPLC validats pels RFs d'estudi tenen la capacitat de separar el principi actiu de les seves impureses habituals de síntesi i els dissolvents usats (fase mòbil i matriu) no constitueixen una interferència.
- Linealitat: el mètode analític és lineal dins els rangs indicats
  - Per als analits de  $^{11}\text{C}$ -PIB:
    - PIB de 0,13 a 1,95  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - PR-PRIB de 0,09 a 1,30  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - Per als analits de  $^{18}\text{F}$ -FMISO:
    - FMISO de 0,06 a 58,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - IMP-FMISO de 0,11 a 53,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - PR-FMISO de 0,10 a 50,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Límit de detecció i límit de quantificació, s'han determinat i s'indiquen a continuació.
  - Per als analits de  $^{11}\text{C}$ -PIB:
    - PIB el LD és de 0,07  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i el LQ és de 0,13  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - PR-PRIB el LD és de 0,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i el LQ és de 0,09  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - Per als analits de  $^{18}\text{F}$ -FMISO:
    - FMISO el LD és de 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i el LQ és de 0,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - IMP-FMISO el LD és de 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i el LQ és de 0,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$
    - PR-FMISO el LD és de 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i el LQ és de 0,10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Precisió i exactitud
  - Els mètodes analítics testats presenten per a cada analit una precisió conforme: repetibilitat ( $\text{CV} \leq 5\%$ ) i precisió intermitja ( $\text{CV} \leq 5\%$ ); i una exactitud ( $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ ) que supera la prova t-Student.

#### $^{18}\text{F}$ -FMISO: PQ per TLC

- Selectivitat:
  - El mètode analític validat és capaç de separar el catalitzador criptand dels altres components d'una mostra de  $^{18}\text{F}$ -FMISO.
- Límit de detecció
  - El mètode és capaç de diferenciar diferents concentracions de criptand.
  - El LD és de 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



### 5.1.2 Puresa radioquímica

#### 5.1.2.1 Introducció

La monografia de la Ph. Eur. sobre preparacions radiofarmacèutiques<sup>36</sup> indica el requeriment de portar a terme el test de PRQ en els RFs. La PRQ és un control específic per als RFs que s'engloba dins dels tests que determinen les impureses químiques<sup>60</sup>, concretament es determinen les impureses radioquímiques, i s'utilitza com a test d'identificació del producte final. En el cas dels RFs d'estudi, com que es tracten com a medicaments en investigació sense monografia específica, caldrà conèixer prèviament el seu perfil d'impureses radioquímiques i desenvolupar un mètode adequat per determinar-les.

S'entén com a PRQ d'una preparació radiofarmacèutica, la relació, expressada en percentatge, entre la radioactivitat provinent del radionúclid en la forma química d'interès i el total de la radioactivitat lligada al radionúclid de la preparació radiofarmacèutica<sup>36</sup>, essent la forma química d'interès el principi actiu que se sintetitza durant les etapes de producció del RF. La causa de la determinació de la PRQ, és que el procés pot generar altres compostos radioactius que no són el d'interès. Per això, concretament, en el cas dels RFs d'estudi la PRQ és en cada cas:

- La radioactivitat provinent del C-11 en la forma química de <sup>11</sup>C-PIB (principi actiu) respecte el total de la radioactivitat lligada al C-11 de la preparació radiofarmacèutica d'estudi (sumatori principi actiu més impureses marcades amb C-11).
- La radioactivitat provinent del F-18 en la forma química de <sup>18</sup>F-FMISO (principi actiu) respecte el total de la radioactivitat lligada al F-18 en la preparació radiofarmacèutica (sumatori principi actiu més impureses marcades amb F-18).

Les impureses que es determinen en el test de PRQ poden provenir de<sup>36</sup>:

- l'etapa de producció del radionúclid
- les etapes de síntesi del principi actiu
- l'etapa de purificació, per exemple a causa d'una purificació incompleta
- l'estabilitat del producte final durant l'emmagatzematge del producte.

Per tant, el mètode analític per determinar la PRQ ha de ser capaç de separar les diferents impureses radioquímiques que contenen el radionúclid d'interès i permetre el càlcul del percentatge d'activitat lligada al radionúclid en la forma química d'interès<sup>36</sup>.

Els principals mètodes analítics descrits a la monografia de preparacions radiofarmacèutiques per a la determinació de la PRQ són: la HPLC, la cromatografia en paper, la cromatografia de capa fina, la cromatografia de gasos, la cromatografia d'exclusió i l'electroforesi<sup>36</sup>.

Tal com es realitza en l'apartat de PQ, durant la fase inicial d'investigació i desenvolupament del procés de síntesi de cada RF d'estudi s'ha definit per a cadascun d'ells:

- les possibles impureses radioquímiques a determinar
- l'especificació pel test
- els mètodes analítics a validar.

### **Impureses radioquímiques i especificació**

Tal com s'ha comentat, aquestes impureses provenen de diferents etapes del procés de producció, per tant cal estudiar i conèixer per a cada RF el seu procés de producció per tal de determinar les impureses que el procés pot generar. Al mateix temps és important revisar les principals monografies de RFs PET<sup>45-50</sup> per veure per a cadascun d'ells quines impureses es determinen i establir l'especificació de PRQ.

#### **<sup>11</sup>C-PIB**

Les possibles impureses que es poden generar de la síntesi de <sup>11</sup>C-PIB són: <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub>, <sup>11</sup>C-CH<sub>4</sub>, <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>I, <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>OTf i les provinents del procés de metilació. Totes aquestes impureses són eliminades durant les diferents etapes del procés i en la fase de purificació final per HPLC<sup>61-63</sup>. Per tant, considerant la baixa probabilitat de trobar impureses en el producte final i tenint en compte l'especificació establerta pels RFs marcats amb C-11 de la Ph. Eur.<sup>48-50</sup>, s'estableix com a especificació de PRQ pel RF <sup>11</sup>C-PIB com: PRQ <sup>11</sup>C-PIB ≥ 95 %.

#### **<sup>18</sup>F-FMISO**

Igual que en el cas anterior, no s'espera trobar impureses radioquímiques en el producte final ja que són eliminades durant les diferents etapes del procés i en la fase de purificació final per HPLC. Consultant el Dossier de <sup>18</sup>F-FMISO del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>, una de les possibles impureses radioquímiques a trobar és l'ió <sup>18</sup>F-Fluorur (<sup>18</sup>F) lliure no lligat a cap molècula. Així que considerant tot el que s'ha esmentat i revisant les monografies pels RFs marcats amb F-18 de la Ph. Eur.<sup>45-47</sup>, s'estableix com a especificació de PRQ pel RF <sup>18</sup>F-FMISO com: PRQ <sup>18</sup>F-FMISO ≥ 95 %.

### Mètode analític a validar

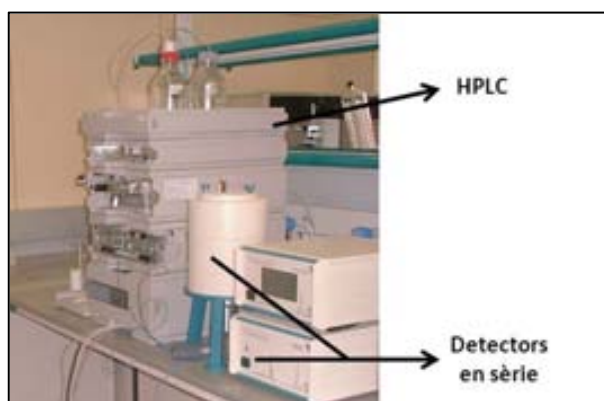
Generalment en els RFs PET, a causa de la curta semivida del radioisòtop, s'utilitza el mateix mètode analític de HPLC per determinar tant la PQ com la PRQ, d'aquesta manera amb una sola anàlisi s'obtenen els resultats de diferents especificacions. En cas de requerir-se es pot complementar la determinació de la PRQ per HPLC amb una altra anàlisi.

El mètode analític desenvolupat per determinar la PRQ dels RFs d'estudi és el mateix mètode analític usat per a la determinació de la PQ. Per tant els dos tests es realitzen en paral·lel, és a dir, en la mateixa anàlisi utilitzant les mateixes condicions en el mateix equip de HPLC al qual s'enllaça un detector de radioactivitat o isotòpic en sèrie al detector UV usat per determinar la PQ (figura 21 i figura 22).

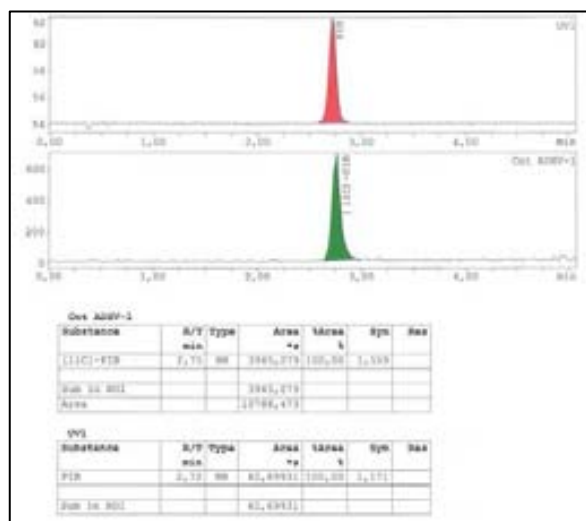
Cal mencionar que el Dossier de  $^{18}\text{F}$ -FMISO del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>, afegeix un control complementari al mètode de HPLC per determinar el  $^{18}\text{F}^-$ , es tracta d'un control mitjançant TLC. Però en el cas del mètode de HPLC desenvolupat per  $^{18}\text{F}$ -FMISO en aquest treball, es creu que pot determinar la presència de l'ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur i per tant s'inclourà en la validació per tal de no haver de fer un control complementari al de HPLC amb tot el que suposa.

Els paràmetres i les condicions analítiques del mètode a validar per a cada RF s'expressen a les taules pertinents dins l'apartat de metodologia.

**Figura 21.** Imatge on es mostra un HPLC amb diferents detectors connectats en sèrie, per tal de determinar en la mateixa anàlisi la puresa química i la puresa radioquímica.



**Figura 22.** Cromatograma obtingut de l'anàlisi d'una mostra de  $^{11}\text{C}$ -PIB, on es pot observar el cromatograma del detector UV (UV1) per a la determinació de la puresa química i el cromatograma obtingut del detector isotòpic (ADHV-1) per a la determinació de la puresa radioquímica.



### Validació dels mètodes analítics

Pel que fa a la validació del mètode analític per a la determinació de la PRQ se segueix la guia sobre validació dels mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>. Tal com s'ha comentat a l'apartat de PQ, aquesta guia defineix diferents paràmetres a validar en funció del tipus de mètode analític a validar. En el cas dels dos RFs d'estudi, en la PRQ:

- Es determina que la mostra conté una quantitat superior o igual al paràmetre d'especificació expressat en percentatge, per tant el mètode és considerat com un test límit per al control d'impureses (*Limit test for the control of impurities*). De tal manera que segons la guia ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> aplicarà la validació dels paràmetres de selectivitat i LD.
- S'identifica el producte final, per tant és també un test d'identificació (*identification test*), que té com a requeriment validar la selectivitat.

Per tant, els paràmetres a validar seran: selectivitat i LD. Això no obstant, es decideix profunditzar en la validació i també s'estudiarà el paràmetre de linealitat.

### Paràmetres de validació

#### - **Selectivitat**

Seguint la definició de l'apartat de PQ, la selectivitat pel mètode analític de PRQ és la capacitat que té el mètode analític de separar el principi actiu de les impureses

radioactives derivades de la síntesi com: PRad, formes radioquímiques del principi actiu (formes parcialment metilades o hidrolitzades, isòmers...) també s'estudiarà la influència del propi mètode analític: la fase mòbil.

### – **Linealitat i límit de detecció**

El LD és la mínima quantitat de radioactivitat que es pot detectar utilitzant el mètode analític a validar i la mostra.

Quant a la linealitat, s'estudiarà la relació entre l'àrea mesurada pel mètode analític a validar respecte a l'activitat de la mostra en els diferents temps d'anàlisi.

S'haurà de valorar l'impacte en la validació de qualsevol canvi en el procés de fabricació (síntesi, composició del producte final...) i en els mètodes analítics, i revalidar els paràmetres pertinents.

### **5.1.2.2 Hipòtesi**

Els mètodes analítics definits per determinar la PRQ pels dos RFs d'estudi  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO són validables per a la determinació de la PRQ seguint la ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>.

En el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO, el mètode analític desenvolupat no requereix d'una anàlisi complementària per TLC per determinar la impuresa  $^{18}\text{F}$ .

### **5.1.2.3 Objectius**

Validar els mètodes analítics per determinar la PRQ pels dos RFs d'estudi, definint:

- $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO: PRQ per HPLC
  - Selectivitat
    - Demostrar que cada mètode analític és capaç de separar el principi actiu marcat radioactivament de les seves impureses radioactives habituals de síntesi i que el dissolvent usat (fase mòbil) no constitueix una interferència.
  - Linealitat
    - Determinar l'interval en el qual l'àrea mesurada de cada mètode analític és proporcional a la concentració d'activitat en el temps.
  - Límit de detecció
    - Determinar per a cada mètode analític la mínima quantitat detectable de radioactivitat lligada a l'analit.
- Demostrar amb la validació que el mètode analític desenvolupat per  $^{18}\text{F}$ -FMISO no necessita una anàlisi complementària per TLC per determinar la impuresa  $^{18}\text{F}$ .

## 5.1.2.4 Metodologia

- Mètode analític
  - S'utilitza el mateix mètode analític adjunt a la taula 5 per a la determinació de PQ, però posant en sèrie el detector UV indicat a la taula 5 i el detector isotòpic:
    - Detector isotòpic gamma GABI de Raytest (Detector RAD).
  - Es preparen els següents patrons per a cada RF segons indicacions de la taula 34 per  $^{11}\text{C}$ -PIB i de la taula 35 per  $^{18}\text{F}$ -FMISO. Existeixen patrons comuns amb la validació de PQ, a les taules només s'indica la composició i/o concentració; per a la seva preparació, cal consultar les taules 6 i 7 respectivament.

**Taula 34.** Puresa radioquímica per HPLC. A la taula s'indiquen les dissolucions patró per a la validació del mètode analític de puresa radioquímica del RF  $^{11}\text{C}$ -PIB. Per a la preparació dels patrons BP i P3 cal consultar la taula 6.

Patrons puresa radioquímica per HPLC

$^{11}\text{C}$ -PIB	Blanc de PIB (BP)	100 % fase mòbil.
	Patró PIB + PR-PIB (P3)	Concentració: 1,3 µg PIB/mL i 0,13 µg PR-PIB/mL.
	PIB Mostra problema (PMP)	Dissolució injectable de $^{11}\text{C}$ -PIB.
	PIB Mostra activímetre (PMA)	200 µL de PMP en un vial de 1 mL.

**Taula 35.** Dissolucions patró per a la validació del mètode analític de puresa radioquímica del RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO. Per a la preparació de BF i F3 cal consultar la taula 7.

Patrons PQ per HPLC

$^{18}\text{F}$ -FMISO	Blanc de FMISO (BF)	20 % d'acetonitril en aigua (FM gradient temps 0).
	Patró de FMISO + PR-FMISO + IMP-FMISO (F3)	Concentració: 1 µg FMISO/mL, 1 µg PR-FMISO/mL, 1 µg IMP-FMISO/mL.
	FMISO mostra problema (FMP)	Dissolució injectable de $^{18}\text{F}$ -FMISO.
	$^{18}\text{F}^-$ mostra problema (FLMP)	Mostra de $^{18}\text{F}^-$ (obtinguda directament del bombardeig del ciclotró segons apartat 4.6.2.1 <i>Generació i concentració d'ió Fluorur (<math>^{18}\text{F}</math>)</i> ).
	$^{18}\text{F}$ -FMISO mostra activímetre (FMA)	1.000 µL de FM en un vial.

- Per a cada mètode analític es realitzen les següents injeccions considerant les condicions d'estudi descrites:
  - Mètode  $^{11}\text{C}$ -PIB
    - Una injecció de: dissolució BP, dissolució P3.
    - Mostra PMP: es realitzen un mínim de 6 injeccions diferents durant un període aproximat de 2 hores.
  - Mètode  $^{18}\text{F}$ -FMISO
    - Una injecció de: dissolució BF, dissolució F3, mostra FLMP.
    - Mostra FMP: es realitzen un mínim de 6 injeccions diferents durant un període aproximat de 3 hores.
  - En els dos mètodes analítics, al mateix temps que es realitza cada injecció de mostra (PMP, FMP) es mesura l'activitat de PMA i FMA mitjançant un activímetre (model: CRC®-15PET de Capintec).
- Selectivitat
  - Es determinen els TR de tots els analits presents en els patrons d'estudi. En el cas del principi actiu o altres compostos radioactius que es determinen en la mostra final (PMP, FMP) es calcula la mitjana del TR de les diferents injeccions per a cada compost.
  - Es considera validada la selectivitat si no existeixen analits que elueixin en el mateix TR que el principi actiu i que la fase mòbil (BP, BF) no interfereixi en la determinació dels compostos estudiats.
- Linealitat
  - S'utilitzen les dades de les diferents injeccions al llarg el temps de les mostres PMP i FMP i les dades d'activitat obtingudes mitjançant l'activímetre.
  - Es representa l'equació de la recta:
    - Abscisses: activitat de l'analit mesurada per l'activímetre (MBq).
    - Ordenades: àrea obtinguda de principi actiu ( $^{11}\text{C}$ -PIB o  $^{18}\text{F}$ -FMISO) en el detector RAD per a cada injecció segons correspongui.
  - S'estima l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats:
    - Coeficient de correlació de la recta de calibració:  $R^2 > 0,990$ .
    - L'interval de confiança de l'ordenada a l'origen que inclou el zero (veure equació 1 dins metodologia linealitat del apartat 5.1.1. PQ).
  - Es calculen els FRs (Àrea/Activitat) per a cadascuna de les injeccions i el CV (%).

- Límit de detecció
  - Es calcula el LD<sup>57</sup>:

**Equació 3.**

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S}$$

On  $\sigma$  és la desviació estàndard (error típic) i S el pendent de la recta

**5.1.2.5 Resultats**

- Selectivitat i límit de detecció

**RF <sup>11</sup>C-PIB**

A les taules adjuntes es detallen els resultats obtinguts.

**Taula 36.** <sup>11</sup>C-PIB puresa radioquímica per HPLC. Resultats de la injecció del blanc (BP) i de la dissolució patrons de PIB (P3). TR és el temps de retenció.

Mostra		Detector UV	Detector RAD
		TR (min)	TR (min)
Dissolució BP	Fase mòbil	ND	ND
Dissolució P3	PIB	2,88	ND
	PR-PIB	1,47	ND

ND: No detectable

**Taula 37.** <sup>11</sup>C-PIB puresa radioquímica per HPLC. Resultats de les injeccions de la mostra de dissolució injectable de <sup>11</sup>C-PIB (PMP). Es calcula la mitjana i el coeficient de variació (CV) del temps de retenció (TR) de cada injecció per a cada compost. A la taula s'indica també el % d'àrea que representa cada compost en el detector RAD.

**Puresa radioquímica: resultats injecció PMP**

Hora	Detector RAD				Detector UV
	Impuresa radioquímica		<sup>11</sup> C-PIB		PIB
	TR (min)	%	TR (min)	%	TR (min)
12:06	2,35	1,51	2,83	98,49	2,87
12:20	2,33	1,57	2,82	98,43	2,85
12:32	2,33	1,80	2,82	98,20	2,85
12:41	2,33	1,55	2,82	98,45	2,85
12:51	2,33	1,63	2,82	98,37	2,85
13:23	2,35	1,94	2,83	98,06	2,87
14:10	ND	ND	2,85	100,00	2,88
<b>Mitjana</b>	2,34	NA	2,83	NA	2,86
<b>CV (%)</b>	0,44	NA	0,39	NA	0,45

ND: No detectable, NA: No aplica



**RF <sup>18</sup>F-FMISO**

A les taules adjuntes es detallen els resultats obtinguts.

**Taula 38.** <sup>18</sup>F-FMISO puresa radioquímica per HPLC. Resultats injecció del blanc (BF), dissolució de patrons de FMISO (F3) i de mostra de Fluorur-18 (FLMP). TR és el temps de retenció.

Mostra		Detector UV TR (min)	Detector RAD TR (min)
Dissolució BF	Fase mòbil	ND	ND
Dissolució F3	IMP-FMISO	2,05	ND
	FMISO	3,43	ND
	PR-FMISO	5,92	ND
Dissolució FLMP	<sup>18</sup> F <sup>-</sup>	ND	1,55

ND: No detectable

**Taula 39.** <sup>18</sup>F-FMISO puresa radioquímica per HPLC. Resultats de les injeccions de la mostra de dissolució injectable de <sup>18</sup>F-FMISO (FMP). TR és el temps de retenció. Es calcula la mitjana i el coeficient de variació (CV) del TR de cada injecció per a cada compost. A la taula s'indica també el % d'àrea que representa cada compost en el detector RAD.

**Puresa radioquímica: resultats injecció FMP**

Hora	Detector RAD				Detector UV
	<sup>18</sup> F <sup>-</sup>		<sup>18</sup> F-FMISO		FMISO
	TR (min)	%	TR (min)	%	TR (min)
13:27	1,57	2,64	3,50	97,36	3,45
14:14	1,52	4,55	3,50	95,45	3,45
15:18	1,53	4,18	3,52	95,82	3,47
15:44	1,53	3,88	3,50	96,12	3,45
16:14	1,52	3,62	3,52	96,38	3,47
16:45	1,53	4,37	3,50	95,63	3,47
<b>Mitjana</b>	1,53	NA	3,51	NA	3,46
<b>CV (%)</b>	1,21	NA	0,29	NA	0,32

NA: No aplica

- Linealitat

**RF <sup>11</sup>C-PIB**

- Es realitzaren les injeccions de la dissolució de <sup>11</sup>C-PIB i es mesurà l'activitat a cada temps d'injecció (taula 40).
- Es calculà el FR per a cada injecció i el seu CV.
- Es va realitzar la recta de calibració (Figura 23).

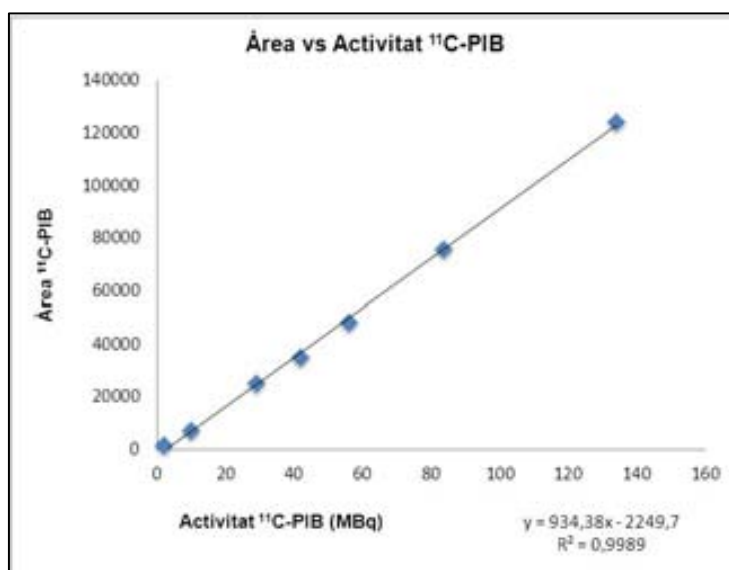
- Es calculà l'interval de confiança de cada recta (taula 41).

**Taula 40.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa radioquímica per HPLC, linealitat. Resultats de les injeccions de la mostra de dissolució injectable de  $^{11}\text{C}$ -PIB (PMP) al llarg de dues hores d'estudi pel principi actiu ( $^{11}\text{C}$ -PIB). FR és el factor de resposta i CV el coeficient de variació.

$^{11}\text{C}$ -PIB PRQ: Estudi linealitat

Patró	Hora	Àrea $^{11}\text{C}$ -PIB	Activitat (MBq)	FR (Àrea/Activitat)
1	12:06	124.225,10	133,99	927,12
2	12:20	75.881,00	83,78	905,68
3	12:32	48.500,75	56,07	865,05
4	12:41	35.049,50	42,00	834,46
5	12:51	25.299,29	29,17	867,19
6	13:23	7.336,63	9,91	739,98
7	14:10	1.461,11	1,99	733,33
Mitjana				838,97
CV (%)				9,06

**Figura 23.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa radioquímica per HPLC, linealitat. Recta de calibració.



**Taula 41.**  $^{11}\text{C}$ -PIB puresa radioquímica per HPLC, linealitat. Taula dels resultats obtinguts a partir de la recta de calibració (figura 23). A la taula s'indica el valor de la recta de calibració, l'interval de confiança (IC 95 %) i el coeficient de correlació de la recta de calibració ( $R^2$ ).

	Recta de calibració	IC 95 %	$R^2$
$^{11}\text{C}$ -PIB	$Y=934,38x-2.249,7$	(- 4.574,81 , 75,49)	0,999

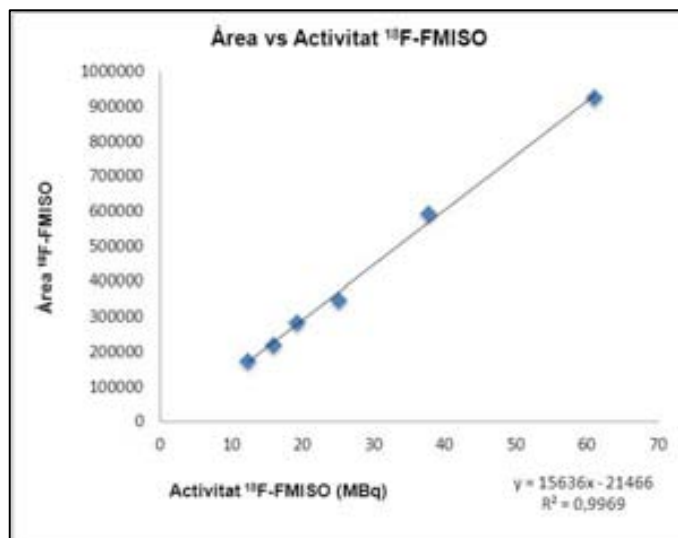
#### RF $^{18}\text{F}$ -FMISO

- Es realitzaren les injeccions de la dissolució de  $^{18}\text{F}$ -FMISO i es mesurà l'activitat a cada temps d'injecció (taula 42).
- Es calculà el FR per a cada injecció i el seu CV.
- Es realitzà la recta de calibració (Figura 24).
- Es calculà l'interval de confiança de cada recta (taula 43).

**Taula 42.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO puresa radioquímica per HPLC, linealitat. Resultats de les injeccions de la mostra de dissolució injectable de  $^{18}\text{F}$ -FMISO (FMP) al llarg de tres hores d'estudi pel principi actiu ( $^{18}\text{F}$ -FMISO). FR és el factor de resposta i CV el coeficient de variació.

#### $^{18}\text{F}$ -FMISO PRQ: Estudi linealitat

Patró	Hora	Àrea $^{18}\text{F}$ -FMISO	Activitat (MBq)	FR (Àrea/Activitat)
1	13:27	925.634,8	61,05	15.161,91
2	14:14	593.509,6	37,74	15.726,27
3	15:18	348.607,3	25,09	13.896,49
4	15:44	284.597,4	19,24	14.791,96
5	16:14	221.067,6	15,91	13.894,88
6	16:44	175.157,3	12,21	14.345,40
			Mitjana	14.636,15
			CV (%)	4,99

**Figura 24.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO pura radioquímica per HPLC, linealitat. Recta de calibració.

**Taula 43.**  $^{18}\text{F}$ -FMISO pura radioquímica per HPLC, linealitat. Taula dels resultats obtinguts a partir de la recta de calibració (figura 24). A la taula s'indica el valor de la recta de calibració, l'interval de confiança (IC 95 %) i el coeficient de correlació de la recta de calibració ( $R^2$ ).

	Recta de calibració	IC 95 %	$R^2$
$^{18}\text{F}$ -FMISO	$Y=15.636x-214,66$	$(-61.440,45, 18.508,18)$	0,997

- Límit de detecció

#### **RF $^{11}\text{C}$ -PIB**

- El LD calculat per  $^{11}\text{C}$ -PIB té un valor de 3,19 MBq (considerant desviació estàndard = 904,52, pendent = 934,38)

#### **RF $^{18}\text{F}$ -FMISO**

- El LD calculat per  $^{18}\text{F}$ -FMISO té un valor de 3,04 MBq (considerant desviació estàndard = 14.397,66, pendent = 15.636)

### 5.1.2.6 Discussió

El mètode analític escollit per a determinar la PRQ presenta l'avantatge de poder muntar en sèrie el detector isotòpic, necessari per a la determinació de la PRQ, amb el detector UV necessari per a la determinació de la PQ. D'aquesta manera es pot analitzar al mateix temps i en la mateixa anàlisi tant la PQ com la radioquímica. Aquesta característica dóna un valor addicional al mètode validat.

L'especificació definida per a cada RF, PRQ > 95 %, es basa en les monografies existents de RFs PET<sup>45-50</sup> marcats amb els mateixos radionúclids (C-11 i F-18), en publicacions científiques<sup>61-63</sup> i addicionalment en el cas de <sup>18</sup>F-FMISO consultant el seu Dossier del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>. Una altra observació és que les mostres analitzades, PMP i FMP, compleixen l'especificació definida PRQ > 95 % (taula 37 i 39).

#### - Selectivitat

##### ▪ Pel <sup>11</sup>C-PIB:

- El pic que s'observa tant en el detector RAD de TR 2,83 min com en el detector UV de TR 2,86 min (taula 37), s'identifica com a pic provinent del principi actiu, <sup>11</sup>C-PIB, ja que coincideix amb el pic observat del patró no radioactiu de PIB que té un valor de 2,88 min (taula 36). Cal considerar que existeix un cert retard en el TR del mateix compost entre els dos detectors atès que els detectors UV i RAD estan muntats en sèrie de manera que la mostra passa primer per un detector i després per l'altre segons disposició en l'equip.
- Quant a la mostra de <sup>11</sup>C-PIB (PMP) s'observa també un pic que es tractaria d'una impuresa no coneguda a TR 2,34 min (taula 37). Cal considerar que les possibles impureses que es poden generar de la síntesi de <sup>11</sup>C-PIB i les provinents del procés de metilació, no existeixen com a patrons. Davant d'aquesta problemàtica, no és possible identificar aquesta impuresa amb la metodologia d'estudi. De totes maneres tenint en compte l'estudi portat a terme per Philippe et al<sup>61</sup>, on demostra que no es formen impureses derivades de la metilació (no es forma 6-(<sup>11</sup>C)-MeO-BTA-0), el pic d'impuresa no coneguda es limita a les següents possibles impureses: <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub>, <sup>11</sup>C-CH<sub>4</sub>, <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>I, <sup>11</sup>C-CH<sub>3</sub>OTf.
- Quant a la separació, entre les possibles impureses i el principi actiu, es demostra que existeix bona separació ja que tant la impuresa radioactiva,

com el principi actiu,  $^{11}\text{C}$ -PIB, elueixen a TR diferents: 2,34 min versus 2,83 min respectivament (taula 37). Com és d'esperar, la fase mòbil no dona senyal radioactiu en el mètode analític usat (taula 36).

- Per tant amb tot el que s'ha exposat es pot considerar que el mètode analític de PRQ per  $^{11}\text{C}$ -PIB presenta una òptima separació entre els possibles analits radioactius i per tant supera el test de selectivitat.
- Pel  $^{18}\text{F}$ -FMISO:
  - La possible impuresa radioactiva d'una dissolució injectable de  $^{18}\text{F}$ -FMISO és l'ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur lliure segons el Dossier del *National Cancer Institute*<sup>58</sup>. El Dossier afegeix un control complementari de TLC per a la determinació de  $^{18}\text{F}$ -Fluorur. Però en aquest treball de validació a causa que l'ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur presenta l'avantatge que es pot sintetitzar a la mateixa planta i, per tant, és possible obtenir-lo, es decideix sintetitzar-lo com a patró (FLMP) i estudiar-lo en la validació del mètode analític de HPLC.
  - En els cromatogrames de mostra de  $^{18}\text{F}$ -FMISO (FMP) s'observa que presenten la impuresa d'ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur, ja que es detecta un pic radioactiu a TR 1,53 min (taula 39) que coincideix amb el TR del pic radioactiu observat en el patró injectat de dissolució d'ió  $^{18}\text{F}$ , TR de 1,55 min (taula 38).
  - També s'observa un segon pic tant en el detector RAD de TR 3,51 min com en el detector UV de TR 3,46 min (taula 39), aquest pic s'identifica com el principi actiu, ja que coincideix amb el pic observat en el patró no radioactiu de FMISO que té un valor de 3,43 min (taula 38).
  - Al mateix temps s'observa que tant la impuresa radioactiva, ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur, com el principi actiu,  $^{18}\text{F}$ -FMISO, elueixen a TR diferents: 1,53 min versus 3,51 min respectivament (taula 39). Com és d'esperar la fase mòbil no dona senyal radioactiu en el mètode analític usat (taula 38).
  - Per tant, es pot considerar que el mètode analític de PRQ per  $^{18}\text{F}$ -FMISO presenta una òptima separació entre els possibles analits radioactius i no es fa necessari un test complementari de TLC al poder-se determinar amb el mètode analític d'estudi.

- Linealitat
  - El paràmetre de linealitat, no és necessari determinar-lo, ja que es tracta d'un test límit per al control d'impureses (*Limit test for the control of impurities*) per la ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>. De tal manera que, segons la guia, només aplicaria la validació de selectivitat i LD. De totes maneres s'afegeix estudiar la linealitat com a paràmetre informatiu per veure la resposta del detector RAD respecte a l'activímetre.
  - S'observa que cada mètode analític per a cada RF presenta linealitat en obtenir un coeficient de correlació major de 0,990 dins el rang estudiat (taula 41 <sup>11</sup>C-PIB, taula 43 <sup>18</sup>F-FMISO).
  - Cal considerar que l'estudi de linealitat és d'utilitat sempre que la mostra compleixi l'especificació de PRQ ja que en el paràmetre d'àrea de la mostra només s'inclou l'àrea del principi actiu.
  - Una altra observació derivada de l'estudi de linealitat és sobre el FR. En el cas de <sup>11</sup>C-PIB presenta un coeficient de variació superior al 5 %, però inferior al 10 % (taula 40) i en el cas de <sup>18</sup>F-FMISO presenta un valor inferior però pròxim al 5 % (taula 42). Aquest fet s'atribueix a haver utilitzat un equip per a determinar l'activitat amb una sensibilitat inferior al detector isotòpic gamma emprat per l'HPLC. Per això en el cas del <sup>11</sup>C-PIB, com el radioisòtop presenta una semivida més curta que el F-18 del RF <sup>18</sup>F-FMISO, augmenta el CV. Una possible millora d'aquesta metodologia seria utilitzar un equip per mesurar l'activitat de major sensibilitat, com un comptador de pou, en lloc d'un activímetre.
- Límit de detecció
  - Existeixen diferents mètodes descrits a la guia ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> per a determinar el límit de detecció.
  - En el cas dels mètodes d'estudi, aprofitant que s'estudia la linealitat, s'escull el mètode de la desviació estàndard de la resposta i del pendent (*Standard deviation of the Response and the Slope*). Els altres mètodes disponibles com la inspecció visual o el basat en la relació de senyal/soroll, es descarten considerant la pròpia inestabilitat del radionúclid, sobretot en el cas del C-11.
  - S'observa que els dos mètodes analítics presenten un LD semblant d'activitat aproximadament d'un valor de 3 MBq. Això és deu a què s'utilitza el mateix detector i a què el radionúclid dels dos RFs d'estudi tenen el mateix tipus d'energia de desintegració.

### 5.1.2.7 Conclusions

- Selectivitat
  - El mètode analític validat per  $^{11}\text{C}$ -PIB i per  $^{18}\text{F}$ -FMISO és capaç de separar el principi actiu marcat radioactivament de les seves impureses radioactives habituals de síntesi i el dissolvent usat (fase mòbil) no constitueix una interferència.
- Linealitat
  - Els mètodes analítics validats pels dos RFs són lineals presentant un coeficient de correlació major de 0,990.
- Límit de detecció

S'ha determinat el LD de cada RF presentant els valors que s'indiquen a continuació.

  - $^{11}\text{C}$ -PIB: 3,19 MBq
  - $^{18}\text{F}$ -FMISO: 3,04 MBq
- El mètode analític desenvolupat per a  $^{18}\text{F}$ -FMISO no requereix d'una anàlisi complementària per TLC per a determinar la impuresa d'ió  $^{18}\text{F}$ -Fluorur.



### 5.1.3 Concentració radioactiva i activitat específica

#### 5.1.3.1 Introducció

La característica més important i intrínseca dels RFs que els diferencia dels fàrmacs convencionals és la radioactivitat o en termes generals activitat.

L'activitat depèn del temps i sempre cal expressar-la fent referència temporal.

S'entén com activitat d'una mostra d'una substància radioactiva el número d'àtoms que es desintegren per unitat de temps. Essent  $dN$  el número d'àtoms radioactius que s'han desintegrat en l'interval comprès entre  $t$  i  $t + dt$ , l'activitat en un instant  $t$  vindrà determinada per l'equació 4<sup>64</sup>:

**Equació 4.** Equació d'activitat d'una mostra

$$A = \left| \frac{dN}{dt} \right|$$

La unitat d'activitat en el Sistema Internacional és el *becquerel*<sup>64</sup>:

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ desintegració per segon (1 d.p.s.)}$$

Cal mencionar que a la pràctica s'utilitza més freqüentment la denominada unitat especial d'activitat, el *curie* (Ci)<sup>64</sup>:

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ d.p.s.} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

Però l'activitat d'una mostra d'una substància radioactiva no fa referència al volum o a la massa del material radioactiu en el qual es produeixen les transformacions radioactives<sup>64</sup>. D'aquí deriven el concepte de concentració radioactiva (CR) i d'activitat específica (Asp), que consideren el volum i la massa respectivament.

#### **Concentració radioactiva**

La CR es defineix com la radioactivitat d'un radionúclid per unitat de volum de la preparació radiofarmacèutica<sup>64</sup>. La seva unitat és GBq/mL. És un paràmetre que permet calcular l'Asp i el volum de la dosi a injectar.

#### **Activitat específica**

L'Asp es defineix com la relació entre la radioactivitat per unitat de massa del producte final (GBq/ $\mu$ mol) i es determina en el control de qualitat a partir de la CR (GBq/mL) i l'invers de la

concentració en massa (mL/ $\mu$ mol). És un concepte més complex al reflectir la massa total en la que es produeixen les desintegracions.

Per entendre el concepte s'ha de consultar la definició d'Asp de la IUPAC que defineix l'Asp com l'activitat d'un radionúclid dividida per la massa resultant de la suma de tots els isòtops radioactius i estables de l'element isotòpic implicat<sup>xvi</sup>.

Per tant, la massa que considera l'Asp incorpora la massa tant dels isòtops radioactius com dels isòtops estables de l'element isotòpic de la mostra, que en el cas dels RFs d'estudi, es refereix al Carboni i al Flúor.

La causa de l'existència dels diferents isòtops del mateix element es deu al procés de síntesi i al propi element.

En el cas del Carboni, a la natura es troben 3 isòtops naturals el C-12, C-13 i el C-14 amb una abundància del 98,89 %, 1,11 % i traça respectivament. El C-12 i C-13 són isòtops estables, el C-14 és un isòtop radioactiu que es pot considerar estable atès que la seva semivida és d'uns 5.730 anys<sup>64,65</sup>. Aquests isòtops naturals es poden incorporar durant la síntesi per diferents vies:

- Durant la producció del PRad: en el procés d'irradiació, en cas d'existència d'impureses en el blanc, impureses derivades de diferents components del ciclotró: vàlvules, reguladors de pressió, finestres del ciclotró i també restes de dissolvents hidrocarbonats utilitzats per a netejar les peces de metall<sup>66,67</sup>.
- Durant la síntesi del RF, <sup>11</sup>C-PIB: incorporació de contaminants provinents de l'atmosfera (<sup>12</sup>C-CO<sub>2</sub>), alliberació de compostos químics i no desitjats provinents de les connexions o dels reactors, a causa de la presència d'isòtops estables en els reactius de síntesi<sup>66</sup>.

En el cas del Flúor, només es troba un únic isòtop natural i estable que és el F-19<sup>65</sup>. Aquest es pot incorporar durant la síntesi per diferents vies<sup>68</sup>:

- A causa de materials com tubs de tefló
- A causa de certs contaminants provinents dels reactius usats en la síntesi com el criptand o el carbonat de potassi
- Provinents de certs materials usats per a la purificació, com les resines d'intercanvi iònic (QMA).

---

<sup>xvi</sup> La definició assumeix que els isòtops (estable i radioactiu) estan presents en la mateixa forma química i física de manera que es comporten idènticament en un procés radioquímic i en l'ús del radionúclid<sup>66,67</sup>.

Per tant, el fet d'incorporar isòtops naturals a la molècula final del RF influirà en els elements de l'Asp de la següent manera: la radioactivitat vindrà donada per l'isòtop radioactiu artificial generat (C-11 o F-18) i la massa vindrà generada majoritàriament pels isòtops naturals essent pràcticament negligible la massa aportada per l'isòtop radioactiu artificial generat (figura 25).

**Figura 25.** Influència dels isòtops en els components de l'activitat específica.

$$A_{sp} = \frac{\text{Radioactivitat (GBq)}}{\text{massa (\mu mol)}}$$

<sup>18</sup>F-FMISO

← Molècules F-18

← Molècules F-19 >>> F-18

<sup>11</sup>C-PIB

Molècules C-11

Molècules C-12 +C-13+C-14 >>> C-11

El valor d'Asp influeix quan es realitzen estudis amb RFs. Tot estudi té una dosi estàndard a administrar en unitats de radioactivitat (MBq o mCi), en el cas dels RFs d'estudi la dosi estàndard d'un adult generalment és de: 740 MBq (20 mCi) de <sup>11</sup>C-PIB i 370 MBq (10 mCi) de <sup>18</sup>F-FMISO. Aquesta dosi ha de tenir suficient activitat/radioactivitat per permetre obtenir una bona qualitat d'imatge però al mateix temps ha de ser suficientment baixa per evitar la saturació dels detectors del tomògraf PET i al mateix temps assegurar una baixa dosi d'exposició a la radiació pel pacient i evitar efectes no desitjats a causa de la radiació<sup>66</sup>. Per tant, al ser l'activitat/radioactivitat fixa, la massa a injectar dependrà de l'Asp obtinguda al final de la síntesi.

El que interessa en els RFs d'ús diagnòstic és injectar poca massa per tal d'assegurar la dosi traça, és a dir, una dosi sense activitat farmacològica. Per tant, la síntesi dels RFs d'estudi s'han d'optimitzar per tal d'obtenir una Asp alta: una elevada radioactivitat al final de la síntesi i baixa massa. D'aquesta manera la dosi a injectar contindrà poca massa i s'assegurarà l'administració de la dosi traça (figura 26 i 27).

**Figura 26.** Activitat específica. A la figura s'observa l'objectiu final d'una síntesi que és obtenir una activitat específica alta.

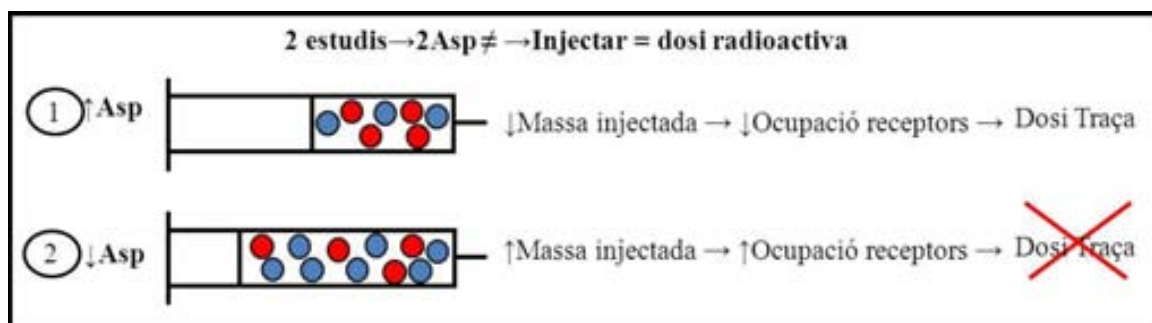
$$A_{sp} = \frac{\text{Radioactivitat (GBq)}}{\text{massa (\mu mol)}}$$

↑

↑ Radioactivitat (GBq)

↓ massa (μmol)

**Figura 27.** Influència de l'activitat específica. Exemple visual de dos estudis del mateix RF on s'injecta la mateixa dosi radioactiva però s'han obtingut activitats específiques diferents en la síntesi. L'estudi amb activitat específica major assegura la dosi traça, per contra l'estudi amb activitat específica inferior al injectar més massa del producte produeix més ocupació de receptors i no assegura la dosi traça.



Aquest fet és conegut com l'efecte de la massa<sup>69</sup> i és especialment important per RFs que s'uneixen a receptors, sobretot si els receptors són de baixa densitat o bé la unió és irreversible, i també en la recerca translacional quan es fan estudis PET cerebrals en animals petits de laboratori, a causa de les diferències de pes entre els humans i els animals petits de laboratori<sup>4</sup>.

En el cas dels RFs d'estudi la determinació de l'Asp té certa rellevància considerant els seus mecanismes d'acció:

- <sup>11</sup>C-PIB s'uneix de forma reversible als receptors específics de les fibril·les peptídiques  $\beta$ -amiloides (A $\beta$ ) característica patològica de la malaltia d'Alzheimer<sup>9</sup>.
- <sup>18</sup>F-FMISO és un marcador de teixit hipòxic que s'uneix covalentment a molècules cel·lulars de forma inversament proporcional a la concentració d'oxigen<sup>15</sup>.

Per tant, considerant per a cada RF la dosi estàndard per un adult i els límits de PQ establerts per a cada principi actiu (apartat 5.1.1 PQ), es defineixen els següents valors:

- <sup>11</sup>C-PIB:
  - L'Asp mínima a l'hora d'injecció (h.i.) ha de ser  $Asp \geq 14,56 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  (393,5 Ci/mmol)<sup>37</sup>. D'aquesta manera s'assegura el límit de PQ pel principi actiu PIB, definit a 13  $\mu\text{g}$ . És a dir una solució <sup>11</sup>C-PIB amb una Asp de 14,56 GBq/ $\mu\text{mol}$  (393,5 Ci/mmol) i una dosi estàndard de 740MBq (20 mCi) suposarà una dosi màxima de PIB o 6-OH-BTA-1 de 13  $\mu\text{g}$ <sup>xvii</sup>.

<sup>xvii</sup> Considerant que el pes molecular de PIB és de 256,32 g/mol<sup>51</sup>.

- La CR mínima a h.i. per tal d'assegurar una dosi de 740MBq (20 mCi) considerant que el volum màxim d'injecció és de 10 mL ha de ser  $CR \geq 74 \text{ MBq/mL}$  (2 mCi/mL).
- $^{18}\text{F}$ -FMISO
  - L'Asp mínima a h.i. ha de ser  $Asp \geq 4,662 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  (126 Ci/mmol)<sup>38,58</sup>. D'aquesta manera s'assegura el límit de PQ pel principi actiu FMISO, definit a 15  $\mu\text{g}$ . És a dir una solució  $^{18}\text{F}$ -FMISO amb una Asp de 4,662 GBq/ $\mu\text{mol}$  (126 Ci/mmol) una dosi de 370MBq (10 mCi) suposarà una dosi màxima de FMISO de 15  $\mu\text{g}$ <sup>xviii,xix</sup>.
  - La CR mínima a h.i. per tal d'assegurar una dosi de 370MBq (10 mCi) considerant que el volum màxim d'injecció és de 10 mL ha de ser  $CR \geq 37 \text{ MBq/mL}$  (1 mCi/mL).

### 5.1.3.2 Hipòtesi

El procés i els materials de síntesi definits i utilitzats per a la producció dels dos RFs d'estudi permeten obtenir una CR i una Asp adequades per realitzar els estudis PET en les condicions definides.

### 5.1.3.3 Objectius

Obtenir concentracions radioactives i activitats específiques dins els paràmetres definits pels dos RFs d'estudi,  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

### 5.1.3.4 Metodologia

Per a cada RF es calcula la CR i l'Asp en 3 lots de la següent manera:

- Es realitzen 3 síntesis de cada RF.
- Determinació de l'activitat:
  - Es determina l'activitat d'una mostra de 200  $\mu\text{L}$  de cada lot produït mitjançant un activímetre (model: CRC®-15PET de Capintec).
- Determinació de la PQ del principi actiu en la mostra:
  - Utilitzant el mètode de HPLC corresponent per a cada RF descrit a l'apartat 5.1.1 PQ, es determina la concentració en la mostra de principi actiu de cada lot per a cada RF.

---

<sup>xviii</sup> Considerant que el pes molecular de FMISO és de 189,14 g/mol<sup>53</sup>.

<sup>xix</sup> En el límit establert per a l'Asp de  $^{18}\text{F}$ -FMISO ( $Asp \geq 126 \text{ Ci/mmol}$ ) s'observen diferències respecte a l'especificat per l'IND publicat pel National Cancer Institute ( $Asp \geq 125 \text{ Ci/mmol}$ ). Aquest fet es deu a que l'IND considera l'equivalència del límit de dosi de FMISO 15  $\mu\text{g}$  a 80 nmol. En canvi en aquest article es considera que 15  $\mu\text{g}$  són 79,3 nmols al ser el pes molecular de FMISO 189,14 g/mol<sup>58</sup>.

- Determinació de la concentració:
  - Es calcula la CR de cada lot per a cada RF segons l'equació adjunta (Equació 5).

**Equació 5.** Equació per al càlcul de la concentració radioactiva (CR) d'una mostra. S'utilitzen les dades obtingudes de la mesura de la radioactivitat en l'activímetre.

$$CR = \frac{\text{Activitat (MBq)}}{\text{Volum (mL)}}$$

- Determinació de l'Asp
  - Es determina a partir de l'equació 6, considerant la concentració de principi actiu calculada per a cada mostra de cada RF en el test de PQ i la CR.

**Equació 6.** Equació per al càlcul de l'activitat específica (Asp) d'una mostra.

$$Asp = \frac{\text{Activitat (GBq)}}{\text{massa } (\mu\text{mol})} = \frac{\text{CR de la mostra (GBq/mL)}}{\text{Concentració del principi actiu } (\mu\text{mol/mL})}$$

### 5.1.3.5 Resultats

Es va realitzar la determinació de la CR i l'Asp usant els 3 lots de validació de cada RF.

Els càlculs realitzats i els valors que es van obtenir per a cada lot d'estudi es resumeixen a les taules que s'adjunten a continuació, Taula 44 resultats de <sup>11</sup>C-PIB i Taula 45 resultats de <sup>18</sup>F-FMISO.

**Taula 44.** Càlculs i valors obtinguts de concentració radioactiva i d'activitat específica en els 3 lots de validació pel RF <sup>11</sup>C-PIB, considerant que el pes molecular de PIB és de 256,32 g/mol<sup>51</sup> i h.c. és l'hora del control, CR és la concentració radioactiva i Asp és l'activitat específica.

	Activímetre		Puresa química PIB			CR (h.c.)		Asp (h.c.)	
	MBq	h.c.	μL	μg/mL	μmol/mL	MBq/mL	mCi/mL	GBq/μmol	Ci/mmol
<b>Lot 1</b>	78,21	16:23	200	2,41	9,4E-03	391,07	10,57	41,54	1.122,72
<b>Lot 2</b>	43,07	16:13	200	1,27	5,0E-03	215,34	5,82	43,41	1.173,17
<b>Lot 3</b>	45,55	12:13	200	1,26	4,9E-03	227,77	6,16	46,28	1.250,74

**Taula 45.** Càlculs i valors obtinguts de concentració radioactiva i d'activitat específica en els 3 lots de validació pel RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO, considerant que el pes molecular de FMISO és de 189,14 g/mol<sup>53</sup> i h.c. és l'hora del control, CR és la concentració radioactiva i Asp és l'activitat específica.

	Activímetre		Puresa química FMISO			CR (h.c.)		Asp (h.c.)	
	MBq	h.c.	$\mu\text{L}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{mol}/\text{mL}$	MBq/mL	mCi/mL	GBq/ $\mu\text{mol}$	Ci/mmol
<b>Lot 1</b>	102,9	12:28	200	0,50	2,6E-03	514,30	13,90	194,55	5.258,09
<b>Lot 2</b>	93,6	13:19	200	0,55	2,9E-03	468,05	12,65	160,96	4.350,22
<b>Lot 3</b>	384,1	13:26	200	1,29	6,8E-03	1.920,30	51,90	281,55	7.609,59

### 5.1.3.6 Discussió

Un fet a tenir en compte per a validar un RF i elaborar la documentació de qualitat, és que tant l'especificació de CR com l'Asp depenen de la dosi a administrar de cada RF. Per això s'ha definit un valor límit de cada paràmetre de tal manera que:

- La CR sigui la mínima concentració per tal d'assegurar la dosi d'estudi de cada RF considerant que el volum màxim d'injecció establert per a cada RF és de 10 mL.
- Respecte a l'Asp, s'ha definit un valor mínim considerant la dosi d'estudi per tal que no suposés una dosi superior a l'especificació en massa del principi actiu.

Ex: en el cas del  $^{11}\text{C}$ -PIB amb una Asp  $\geq 14,56$  GBq/ $\mu\text{mol}$  (393,5 Ci/mmol)<sup>37</sup> considerant la dosi d'estudi de 740MBq (20mCi) no se sobrepassa la dosi màxima de PIB (13  $\mu\text{g}$ ). En el cas  $^{18}\text{F}$ -FMISO Asp  $\geq 4,662$  GBq/ $\mu\text{mol}$  (126 Ci/mmol)<sup>38</sup>, considerant la dosi d'estudi de 370MBq (10mCi) no se sobrepassa la dosi màxima de FMISO (15  $\mu\text{g}$ ).

Pot succeir que estudis d'un mateix RF requereixin dosis (MBq, mCi) a administrar diferents a les definides, per exemple: quan s'estudien zones on la captació del RF és menor i es requereix més dosi de RF, o estudis que necessitin una especificació menor d'Asp, per exemple per raons d'interferència en la quantificació. Per això és recomanable posar els valors de CR i Asp com a valors merament informatius a calcular en el control de qualitat d'un RF i que així consti en la documentació de qualitat. De fet, les monografies específiques de RF no donen cap valor de CR i d'Asp. Aquests valors en cas de medicaments en investigació es poden definir en el protocol d'estudi i així el Dossier del RF es pot utilitzar per a diferents estudis sense que calgui cap modificació al respecte.

Quant als valors obtinguts, es demostra que se superen els valors mínims establerts per a cada paràmetre i s'observa:

- Amb els valors obtinguts de CR per a cada RF, valor menor  $^{11}\text{C}$ -PIB 215,34 MBq/mL i  $^{18}\text{F}$ -FMISO 468,05 MBq/mL, considerant les dosis a administrar: 740 MBq i 370MBq respectivament, i la semivida del radioisòtop de cadascun d'ells, 20,4 min<sup>65</sup> i 110 min<sup>65</sup> respectivament, es podria administrar més d'una dosi de RF de la mateixa síntesi en cas que es disposés de diferents tomògrafs o els requeriments d'estudi ho permetessin.
- Els valors obtinguts d'Asp dels dos RFs estan per sobre dels valors establerts, valor menor obtingut de  $^{11}\text{C}$ -PIB 41,54 GBq/ $\mu\text{mol}$  (Asp  $\geq$  14,56 GBq/ $\mu\text{mol}$ ) i el de  $^{18}\text{F}$ -FMISO 160,96 GBq/ $\mu\text{mol}$  (Asp  $\geq$  4,662 GBq/ $\mu\text{mol}$ ). A més, aquests valors són semblants a valors publicats per a cada RF,  $^{11}\text{C}$ -PIB: 30-60 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>70</sup> i  $^{18}\text{F}$ -FMISO: 48,1 – 122,1 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>71</sup>, 47-70 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>72</sup>. Pel  $^{11}\text{C}$ -PIB existeixen publicacions recents d'optimització de la síntesi que aconseguixen valors d'Asp:  $143 \pm 26$  GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>73</sup> i 180 GBq/ $\mu\text{mol}$ <sup>61</sup>. Traslladant-ho al treball aquí presentat; es creu que optimitzant el mòdul de síntesi s'aconseguirien valors majors. De totes maneres són valors aptes per a realitzar assajos clínics.

### 5.1.3.7 Conclusions

- El valors obtinguts de CR i d'Asp en els tres lots de validació estan dins el criteri d'acceptació de cada RF considerant les dosis a administrar establertes.
- El procés i els materials de síntesi definits i utilitzats per a la producció dels dos RF d'estudi permeten obtenir una CR i una Asp al final de la síntesi adequades per realitzar els estudis PET en les condicions definides.



### 5.1.4 Dissolvents residuals

#### 5.1.4.1 Introducció

Els dissolvents residuals són compostos químics orgànics volàtils que s'utilitzen o es produeixen durant la fabricació de substàncies actives o excipients o en la preparació de medicaments i que no s'eliminen completament per tècniques de fabricació convencionals<sup>74-77</sup>. Per a determinar-los s'utilitza el test de dissolvents residuals que forma part dels tests analítics per determinar impureses, ja sigui del producte objecte d'anàlisi, d'un principi actiu, d'un excipient o d'un medicament.

Els RFs PET d'estudi, <sup>18</sup>F-FMISO i <sup>11</sup>C-PIB, utilitzen compostos químics volàtils durant les diferents etapes de la seva producció, per tant, cal realitzar el test de dissolvents residuals. La monografia de la Ph. Eur. sobre preparacions radiofarmacèutiques<sup>36</sup> en fa referència i especifica que els límits per a cadascun d'ells vénen determinats pel capítol general de la mateixa Ph. Eur. 5.4. Dissolvents residuals<sup>75</sup> que inclou la ICH Q3C (R5) *Impurities: Guideline for Residual Solvents* (Impureses: Guia dels dissolvents residuals)<sup>77</sup>.

La metodologia més utilitzada per a determinar-los són les tècniques cromatogràfiques com és la cromatografia de gasos (CG). Concretament, la Ph. Eur. recomana un mètode basat en la CG, capítol 2.4.24. *Identification and control of residual solvents*<sup>78</sup> (Identificació i control dels dissolvents residuals). En cas que no sigui possible aplicar-lo, es permet l'ús d'un altre mètode si està validat de forma apropiada<sup>75</sup>; es a dir, seguint la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>. En el cas dels RFs d'estudi, atès a la curta semivida dels radioisòtops, es desenvolupa un mètode per CG que en poc temps pugui determinar tots els possibles dissolvents residuals presents en el producte final.

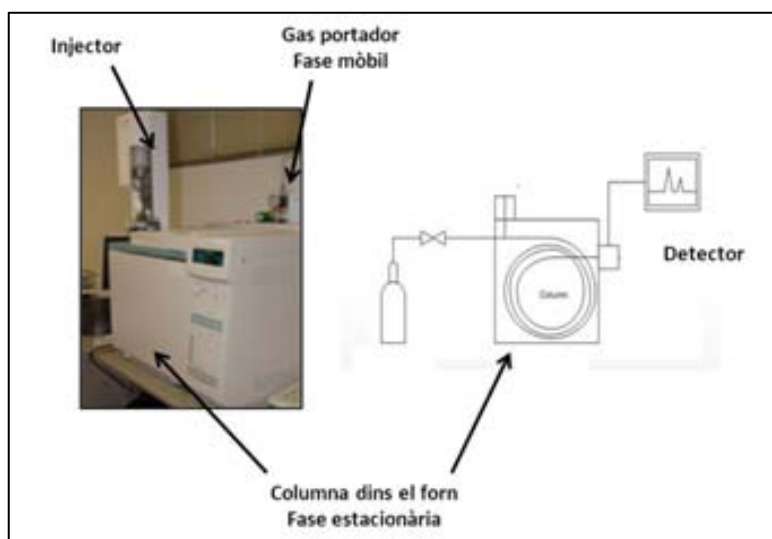
Per tant, considerant tot el que s'ha exposat, s'utilitzarà el capítol 5.4. Dissolvents residuals de la Ph. Eur.<sup>74</sup> per establir els dissolvents residuals a determinar i definir els seus límits, i la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> per a validar el mètode analític desenvolupat específicament per als RFs d'estudi.

### Mètode analític a validar

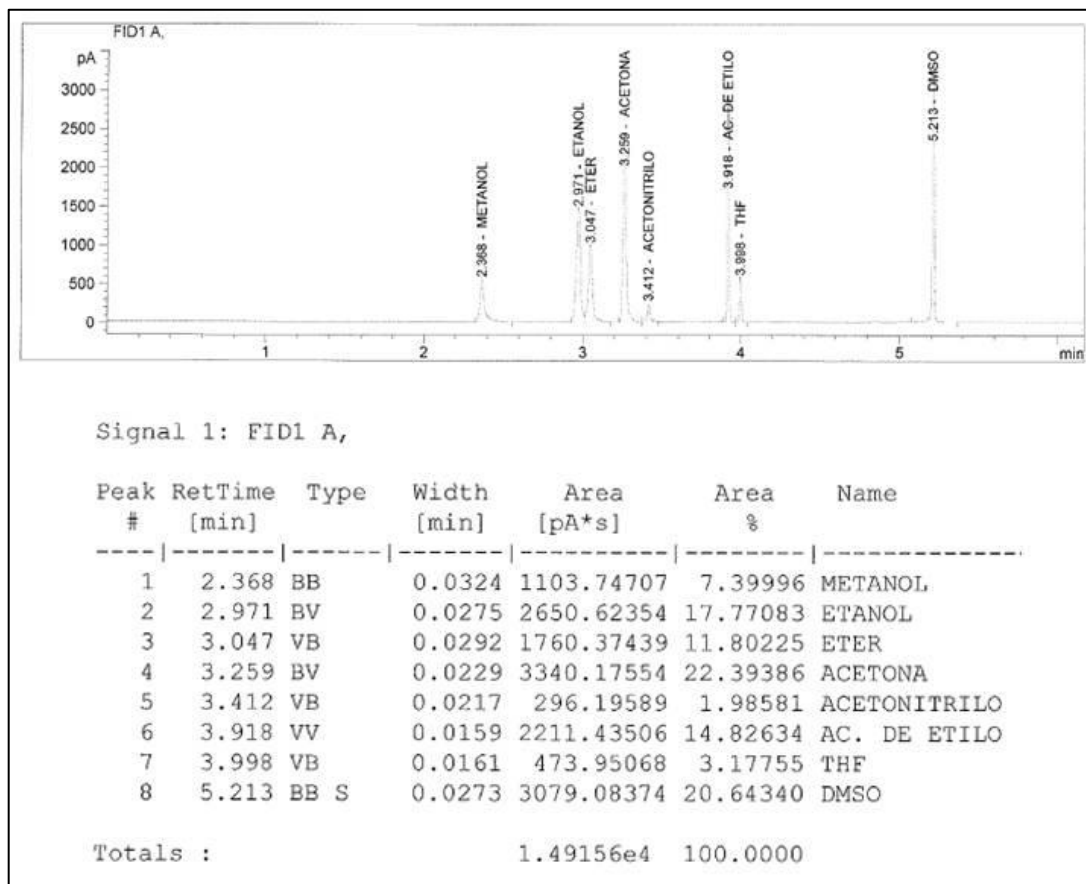
La CG és una tècnica cromatogràfica de separació de mesclades de productes volàtils o semi-volàtils basada en la diferent distribució entre compostos al passar per dues fases no miscibles: la fase mòbil que és el gas transportador, que passa per la fase estacionària que es troba compactada en una columna<sup>79,80</sup>.

La mostra s'introdueix en el port d'injecció del cromatògraf (figura 28) on es volatilitza i els vapors o gasos formats són arrossegats per un gas inert a una columna cromatogràfica. El diferent grau d'interacció dels components de la mescla amb la fase estacionària de la columna permet la seva separació. Finalment, els components separats poden ser detectats, caracteritzats i quantificats emprant diversos detectors. De l'anàlisi s'obté un cromatograma, on els paràmetres més rellevants per a obtenir els resultats de la mostra són (figura 29), el TR i l'àrea de la mostra, que tal com s'ha comentat en l'apartat 5.1.1 PQ, el TR és un paràmetre qualitatiu que permet identificar l'analit en comparació amb un patró estàndard analitzat a les mateixes condicions cromatogràfiques, i l'àrea de l'analit és un paràmetre quantitatiu, que prèviament havent analitzat un estàndard de l'analit de concentració coneguda es pot determinar la quantitat d'aquest analit a la mostra.

**Figura 28.** Components d'un Cromatògraf de Gasos: injector, fase mòbil (gas portador), fase estacionària (columna introduïda dins el forn) i detector.



**Figura 29.** Cromatograma obtingut d'una mostra de diferents patrons de dissolvents residuals, RetTime és el temps de retenció (paràmetre qualitatiu) i Area és l'àrea de la mostra (paràmetre quantitatiu).



### Dissolvents residuals a determinar i especificacions

Els dissolvents residuals són un paràmetre crític de la síntesi d'un medicament i cal realitzar una selecció adequada tant per aconseguir un bon rendiment de reacció com per obtenir uns paràmetres adequats del producte final (solubilitat, puresa, estabilitat...). Segons el capítol 5.4. Dissolvents residuals de la Ph. Eur.<sup>75</sup>, els dissolvents residuals s'han d'eliminar el màxim possible del producte final per tal de complir amb les especificacions, ja que el producte final no pot contenir nivells més elevats que els nivells que les dades de seguretat no puguin justificar.

Tant la Ph. Eur.<sup>75</sup> com la ICH<sup>76,77</sup> classifiquen els dissolvents residuals en 3 nivells en funció de la seva toxicitat:

- Classe 1: Dissolvents dels quals cal evitar-ne l'ús.  
Són dissolvents de toxicitat no acceptable que el seu ús no està permès excepte sota justificació basada en una anàlisi de risc-benefici.

- Classe 2: Dissolvents a limitar.  
Són dissolvents de menor toxicitat que els de classe 1, el seu ús s'ha de limitar per tal de protegir els pacients de possibles efectes adversos.
- Classe 3: Dissolvents de baixa toxicitat.  
Són els dissolvents menys tòxics, els que preferiblement s'han d'utilitzar.

Aquests dissolvents estan llistats en un annex de la Ph. Eur. on es mostra la seva classificació en base als estudis disponibles de seguretat de cadascun d'ells.

Per tal de poder identificar quins dissolvents residuals s'han de determinar en el control de qualitat dels RFs d'estudi i per a definir el seus límits, es procedeix a estudiar el procés de producció de cada RF.

Els dissolvents en un RF PET poden provenir:

- De la neteja del mòdul de síntesi: en el cas dels RFs d'estudi, a diferència dels medicaments convencionals, acabada una producció els mòduls de síntesi queden amb uns nivells de radioactivitat que no permeten la càrrega manual dels dissolvents de neteja per tant la neteja del mòdul de síntesi és un pas previ immediat a la fabricació. Així que en cada lot que es produeix es determinen els dissolvents de neteja en el producte final.
- Del procés de producció: els dissolvents són necessaris per dissoldre els diferents materials de partida que intervenen en la síntesi dels RFs, com per exemple els PRs de síntesi.
- De la purificació: les fases mòbils d'HPLC o de purificació en cartutx necessiten de dissolvents per a poder-se realitzar.
- De la reconstitució final: a part de l'aigua per a injectables o el sèrum fisiològic, a vegades és necessari afegir dissolvents i estabilitzants del procés radiolític com és el cas de l'etanol.

A continuació s'adjunta una taula (taula 46) amb els dissolvents que participen en cada etapa de síntesi dels RFs d'estudi.

**Taula 46.** Llistat de dissolvents utilitzats en les diferents etapes de producció dels RFs d'estudi amb una breu explicació de la seva funció en el procés de producció.

Etapa procés producció	<sup>11</sup> C-PIB	<sup>18</sup> F-FMISO
<b>Neteja</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetona, èter, etanol: neteja del mòdul de síntesi.</li> <li>- Etanol 70 % neteja del HPLC.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetona i èter: per a la neteja del mòdul de síntesi.</li> <li>- Etanol 70 % neteja del HPLC.</li> </ul>
<b>Síntesi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetona: dissolució del precursor de síntesi.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetonitril: dissolució del criptand i del precursor de síntesi, i també per a la fase de destil·lació azeotròpica.</li> </ul>
<b>Purificació</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acetonitril fase mòbil (45 % Acetonitril/ 55 % Formiat amònic).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etanol: fase mòbil (97,5 % Aigua per injectables/ 2,5 % Etanol).</li> </ul>
<b>Formulació</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etanol: dissolvent i estabilitzant al 10 %.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etanol dissolvent i estabilitzant al 2,5 %.</li> </ul>

Detectats els dissolvents que cal determinar en el mètode analític, per tal d'establir els seus límits, es classifiquen segons la seva toxicitat seguint l'apèndix 1 capítol 5.4 de la Ph. Eur.<sup>75</sup>:

- Classe 2: acetonitril.
- Classe 3: etanol, èter, acetona.

Quant als seus límits, també s'estableixen en funció de la Ph. Eur.<sup>75</sup>, que considera que:

- Per als dissolvents de classe 2 s'estableix a partir de la PDE, *Permitted Daily Exposure* o exposició diària permesa, de cada dissolvent.
- Per als dissolvents de classe 3, al ser menys tòxics, es considera que quantitats de 50 mg/dia que corresponen a una dosi de 5.000 ppm són acceptables sense justificació. En cas de tenir un dissolvent de classe 3 amb una concentració final major de 5.000 ppm cal justificar-ho.

A la taula 47 es llisten els dissolvents a validar on s'indica la seva classificació i els seus límits.

**Taula 47.** Classificació dels dissolvents a validar pel mètode analític de cromatografia de gasos dels RFs d'estudi en funció del capítol 5.4. Dissolvents residuals de la Ph. Eur.<sup>75</sup>.

Dissolvent	Classe	Especificació	PDE
Etanol	Classe 3	5.000 ppm	NA
Èter	Classe 3	5.000 ppm	NA
Acetona	Classe 3	5.000 ppm	NA
Acetonitril	Classe 2	410 ppm	4,1 mg/dia

PDE: *Permitted Daily Exposure* o exposició diària permesa, NA =no aplica.

En el cas dels dissolvents de classe 3, la Ph. Eur.<sup>75</sup> cita que es poden acceptar quantitats superiors sempre que sigui justificable en base a les capacitats de producció i a les NCF. Aquest és el cas dels nivells d'etanol en els RFs d'estudi, ja que es requereixen nivells superiors de 5.000 ppm a causa de la poca solubilitat dels principis actius, tant de PIB com FMISO en solució salina, demostrada en els estudis de solubilitat realitzats en PEI nº 09-006<sup>37</sup> i PEI nº10-105<sup>38</sup> respectivament. En aquest estudis es conclou que es necessita que la solució final contingui un 10 % i un 2,5 % d'etanol respectivament. Per tant, l'ús de nivells d'etanol superiors als permesos es deu a problemes de solubilitat i es pot considerar que l'administració és segura en base a què en la pràctica mèdica s'utilitza solució d'etanol al 10 % amb una dosi de 7,6 - 10 mL/kg durant 30-60 min via intravenosa com a tractament de l'acidosi metabòlica associada a la ingesta de metanol o etilenglicol<sup>81</sup>. De tal manera que, els RFs d'estudi, mai sobrepassaran aquesta dosi, ja que s'administren en una dosi única de com a màxim 10 mL. Per tant, l'etanol es determinarà, però serà un paràmetre merament informatiu.

#### **Validació dels mètodes analítics**

Per tal de poder-los utilitzar en la rutina, cal procedir a la validació del mètode analític seguint la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> adoptada per l'EMA.

En el cas del mètode d'estudi es tracta d'un test límit per al control d'impureses (*Limit test for the control of impurities*) pel qual, segons la guia, només aplicarà la validació dels següents paràmetres: selectivitat i LD (Figura 15). Això no obstant, igual que s'ha fet en la validació de PRQ (apartat 5.1.2. PRQ), es decideix a profunditzar en la validació i estudiar el paràmetre de linealitat que ens donarà una estimació de la capacitat de quantificació del mètode respecte a la concentració d'analit.

### Paràmetres de validació

#### - **Selectivitat**

Es valorarà la capacitat que té el mètode analític de separar els diferents dissolvents que es poden trobar en la solució final de cada RF d'estudi i que la matriu dels patrons i de cada RF no interfereix en la determinació.

#### - **Linealitat/rang**

La linealitat és la capacitat que té el mètode analític, dins un rang, d'obtenir un resultat directament proporcional a la concentració de l'analit a la mostra.

Cal estudiar l'interval de linealitat de cada dissolvent.

#### - **Límit de detecció**

El LD és la mínima quantitat d'un analit que es pot detectar utilitzant un mètode analític i es determinarà per a cada dissolvent residual.

S'haurà de valorar l'impacte i revalidar els paràmetres pertinents, en cas de qualsevol canvi en el procés de fabricació (síntesi, composició del producte final) i en els mètodes analítics.

#### **5.1.4.2 Hipòtesi**

El mètode analític definit per determinar els dissolvents residuals dels RFs d'estudi  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB és validable per a la determinació dels dissolvents residuals seguint la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup>.

#### **5.1.4.3 Objectius**

Validar el mètode analític per determinar els dissolvents residuals dels dos RFs d'estudi,  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB, definint:

#### - Test de dissolvents residuals

##### ▪ Selectivitat:

- Demostrar que el mètode analític és capaç de separar els diferents dissolvents residuals identificats i que la matriu usada no constitueix una interferència.

##### ▪ Linealitat:

- Determinar l'interval en el qual el mètode analític és proporcional a la concentració de cada analit.

##### ▪ Límit de detecció

- Determinar la mínima quantitat de cada analit que es pot detectar.

## 5.1.4.4 Metodologia

- Mètode analític

Els paràmetres i les condicions analítiques del mètode analític a validar per a cada RF s'expressen a la taula 48.

**Taula 48.** Cromatografia de Gasos: Condicions i paràmetres analítics a validar per determinar els dissolvents residuals.

**Dissolvents residuals per Cromatografia de Gasos**

Columna cromatogràfica	VF-624 ms Varian (30 m x 32 mm ID, PF=1,80)
Rampa de Temperatura	45°C (2,3 min) x 40°C/min x 200°C
Rampa de flux de gas portador (Heli)	2 mL/min (3 min) x 3 mL/min <sup>2</sup> x 9 mL/min
Flux d'aire sintètic	400 mL/min
Flux d'hidrogen	30 mL/min
Temperatura de l'injector (inlet)	230°C
Temperatura del detector	230°C
Volum d'injecció	1 µL
Mètode	<i>Splitless</i> (sense divisió de flux)
Dissolvent de rentat de xeringa	Aigua
Temps d'anàlisi	6,2 min
Patró intern	Acetat d'etil
Detector	Detector d'ionització de flama (FID, <i>Flame Ionization Detector</i> )

- Selectivitat

- Es preparen les següents dissolucions de referència

Dissolucions mare: es preparen les dissolucions per separat de cada patró agafant la quantitat indicada de cada dissolvent de la taula 49 enrasant amb aigua purificada mitjançant un matràs aforat de capacitat segons s'indica.

Patrons DDRR: es preparen les segones dissolucions diluint a la meitat la concentració. S'agafa la quantitat indicada de cada patró anterior enrasant amb aigua purificada mitjançant un matràs aforat de capacitat segons s'indica a la taula 50.



**Taula 49.** Dissolucions patró mares per a la validació del mètode analític de dissolvents residuals. A la taula s'indica el volum que cal agafar de cada patró i el volum d'enràs. També s'anota la densitat per al càlcul de la concentració final.

Patró	Dissolvent	Densitat (g/mL)	Volum a pipetejar ( $\mu$ L)	Volum d'enràs (mL)	Concentració (ppm)
ETL1	Etanol	0,790	633	50	10.000
EDL1	Èter dietílic	0,715	699	50	10.000
ACT1	Acetona	0,790	633	50	10.000
ACN1	Acetonitril	0,786	52	50	820
PI1	Acetat d'etil	0,903	277	25	10.000

**Taula 50.** Cromatografia de gasos, selectivitat: Preparació de les dissolucions patró diluïdes a la meitat. A la taula s'indica el volum que cal agafar de cada patró i el volum d'enràs. També s'anota la concentració final.

Patró	Dissolvent	Patró a pipetejar	Volum a pipetejar ( $\mu$ L)	Volum d'enràs (mL)	Concentració (ppm)
ETL2	Etanol	ETL1	5	10	5.000
EDL2	Èter dietílic	EDL1	5	10	5.000
ACT2	Acetona	ACT1	5	10	5.000
ACN2	Acetonitril	ACN1	5	10	410
PI2	Acetat d'etil	PI1	5	10	5.000

Dissolucions de la mostra problema: La mostra de cada RF es prepara agafant un volum conegut de mostra (100  $\mu$ L) i el mateix volum de patró intern (PI) (100  $\mu$ L) a concentració 10.000 ppm (PI1) i agitant amb vòrtex per tal d'homogeneïtzar el contingut.

- Es realitzen 6 injeccions de cada patró DRR.
- Es calcula el CV i el TR per patró DRR.
- Es realitza una injecció d'aigua purificada i una injecció d'una dissolució final de cada RF.

- Criteri d'acceptació:
  - Es comprova que no existeixi cap dissolvent residual que elueixi en el mateix TR i que ni l'aigua ni la mostra interfereixin en la detecció.
  - El CV del TR de cada dissolvent ha de ser inferior al 2 %.
- Linealitat
  - Es preparen els patrons segons les indicacions següents:
    - Solució patró mare de tots els dissolvents (PMP): es pipetegen 7.500 µL d'etanol i 1.250 µL de cadascun dels dissolvents a estudiar i s'enrasa amb aigua fins un volum de 25 mL (concentració: etanol 23.7000 ppm, èter dietílic 35.750 ppm, acetona 39.500 ppm, acetonitril 39.300 ppm).
    - Solució de patró intern (PI): es pipetegen 1.000 µL d'acetat d'etil i s'enrasa amb aigua fins un volum de 100 mL (concentració: 9.030 ppm).
    - Solucions patró de linealitat (Pnº): Segons la taula 51, per a cada patró Pnº, es pipeteja el volum indicat de solució PMP i 5 µL de PI, finalment s'enrasa a 10 mL amb aigua purificada.

**Taula 51.** Cromatografia de gasos, linealitat: Dissolucions patró per a la validació del paràmetre de linealitat del mètode analític de Cromatografia de gasos per a la determinació de dissolvents residuals. A la taula s'indica els volums necessaris de patró PMP per preparar cada patró Pnº i la concentració final de cada analit i del patró intern.

Patrons Pnº	µL patró PMP	Etanol ppm	Èter ppm	Acetona ppm	Acetonitril ppm	Acetat d'etil ppm
<b>P1</b>	3.000	71.100	10.725,0	11.850	11.790	4.515
<b>P2</b>	2.000	47.400	7.150,0	7.900	7.860,0	4.515
<b>P3</b>	1.500	35.550	5.362,5	5.925	5.895,0	4.515
<b>P4</b>	1.000	23.700	3.575,0	3.950	3.930,0	4.515
<b>P5</b>	500	11.850	1.787,5	1.975	1.965,0	4.515
<b>P6</b>	200	4.740	715,0	790	786,0	4.515
<b>P7</b>	100	2.370	357,5	395	393,0	4.515
<b>P8</b>	70	1.659	250,2	276,5	275,1	4.515
<b>P9</b>	50	1.185	178,7	197,5	196,5	4.515
<b>P10</b>	30	711,0	107,2	118,5	117,9	4.515
<b>P11</b>	20	474,0	71,5	79,0	78,6	4.515
<b>P12</b>	10	237,0	35,8	39,5	39,3	4.515

Patrons Pnº	µL patró PMP	Etanol ppm	Èter ppm	Acetona ppm	Acetonitril ppm	Acetat d'etil ppm
P13	5	118,5	17,9	19,8	19,7	4.515
P14	2	47,4	7,2	7,9	7,9	4.515
P15	1	23,7	3,6	4,0	3,9	4.515
P16	0,5	11,9	1,8	2,0	2,0	4.515
P17	0,3	7,1	1,1	1,2	1,2	4.515

- S'injecta cada solució preparada per ordre de concentració creixent (de P1 a P17).
- Es calcula el FR de cada concentració de cada patró que és l'àrea corregida (àrea dissolvent/àrea PI) dividida per la concentració corregida (concentració dissolvent /concentració PI) del patró.
- Es representa l'equació de la recta per a cada dissolvent amb els patrons que compleixin el criteri d'acceptació del FR.
  - Abscisses: concentració d'analit dividida per la corresponent concentració de PI (ppm analit/ppm acetat d'etil).
  - Ordenades: àrea obtinguda per a cada concentració dividida per l'àrea corresponent obtinguda de PI (àrea analit/àrea d'acetat d'etil).
- Criteri d'acceptació:
  - Els FRs per a cadascuna de les concentracions de cada dissolvent no presenten dispersió.
    - $CV < 10 \%$
  - S'estima l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats:
    - Coeficient de correlació de la recta de calibració:  $R^2 > 0,990$ .
    - L'interval de confiança de l'ordenada a l'origen inclou el zero (veure equació 1 dins metodologia linealitat de l'apartat 5.1.1. PQ).
- Límit de detecció
  - Es realitza la inspecció visual de tots els cromatogrames de l'estudi de linealitat.
  - Criteri d'acceptació:
    - LD és la concentració mínima de cada analit que el seu senyal es diferencia del soroll instrumental.

## 5.1.4.5 Resultats

- Selectivitat
  - Es realitzaren les 6 injeccions de cada patró DRR i es va calcular el corresponent CV dels TR de les 6 injeccions per a cada analit (Taula 52).

**Taula 52.** Cromatografia de gasos, selectivitat: Resultats estudi de selectivitat pel mètode analític de dissolvents residuals. A la taula, es mostra per a cada dissolvent la mitjana del temps de retenció de les 6 injeccions i el coeficient de variació (CV).

Dissolvent	Mitjana del temps de retenció (min)	CV (%)
Etanol	2,975	0,19
Èter dietílic	3,037	0,13
Acetona	3,254	0,11
Acetonitril	3,409	0,07
Acetat d'etil	3,934	0,82

- Es realitzà la injecció única d'aigua purificada i de mostra de cada RF. Els resultats foren:
  - Mostra d'aigua purificada: no es va obtenir cap pic.
  - Mostra de cada RF: només s'obtingué un pic corresponent al TR de l'etanol.
- Linealitat
  - Es realitzaren les injeccions de cada patró (Pn<sup>o</sup>) per ordre creixent de concentració.
  - Es va calcular el FR i el seu CV. Es descartaren per a cada analit els patrons que no complien un CV del FR menor al 10 % .
  - Es va representar l'equació de la recta de cada analit amb els patrons que complien el FR. El coeficient de correlació de la recta de calibració de cada analit presentà un valor de  $R^2 > 0,990$ .
  - Es va estimar l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats.
  - S'adjunten taules i gràfiques amb els resultats de cada analit: èter dietílic (taula 53 i figura 30), Acetona (taula 54 i figura 31), Acetonitril (taula 55 i figura 32) i Etanol (taula 56 i figura 33).

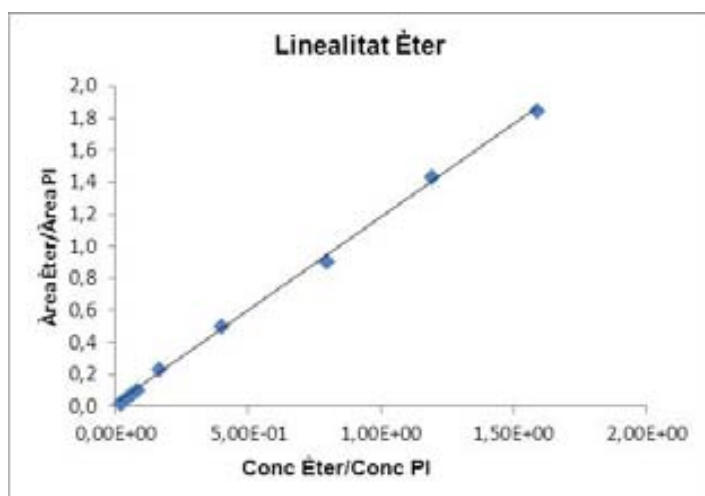
**Taula 53.** Cromatografia de gasos, linealitat: Taula dels resultats obtinguts en l'estudi de linealitat del test de dissolvents residuals per a l'analit èter dietílic. A la taula s'indiquen els patrons analitzats que donaren resposta cromatogràfica per a l'analit d'estudi, per a cadascun d'ells s'indica l'àrea i la concentració (conc) corregida per la respectiva del patró, el factor de resposta (FR) i el seu coeficient de variació (CV), l'equació de la recta (Figura 30), el coeficient de correlació ( $R^2$ ) i l'interval de linealitat.

## Èter dietílic

Patró	Conc Èter/ Conc PI	Àrea analit	Àrea PI	Àrea Èter/ Àrea PI	FR (Àrea corregida /Conc corregida)
P2	1,58E+00	8.864	4.802	1,846	1,166
P3	1,19E+00	7.671	5.345	1,435	1,208
P4	7,92E-01	3.379	3.744	0,903	1,140
P5	3,96E-01	2.182	4.380	0,498	1,258
P6	1,58E-01	961	4.184	0,230	1,450
P7	7,92E-02	373	3.642	0,102	1,293
P8	5,54E-02	238	3.197	0,074	1,343
P9	3,96E-02	191	3.753	0,051	1,285
P10	2,38E-02	143	4.826	0,030	1,247
P11	1,58E-02	75	4.135	0,018	1,145
P12*	7,93E-03	16	3.897	0,004	0,524
P13*	3,96E-03	36	3.389	0,011	2,675

P14-17 descartats per falta de senyal, P1 només s'estudia per a l'analit etanol, \*Patrons descartats no compleixen amb el CV del FR definit.

**Figura 30.** Linealitat: equació de la recta per a l'èter dietílic.



CV FR	7,69 %
Rang lineal	71,5 – 7.150 µg/mL
Recta de calibració	$y=1,1682x+0,0127$
IC 95 %	(-0,0099, 0,0354)
$R^2$	0,9988

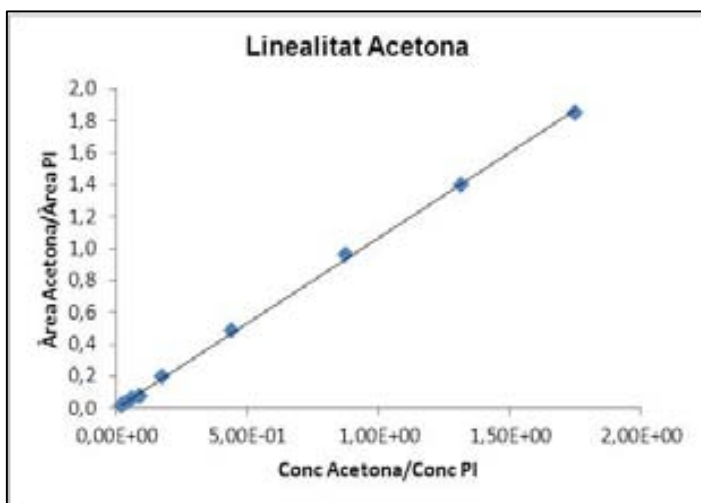
**Taula 54.** Cromatografia de gasos, linealitat: Taula dels resultats obtinguts en l'estudi de linealitat del test de dissolvents residuals per a l'analit acetona. A la taula s'indiquen els patrons analitzats que donaren resposta cromatogràfica per a l'analit d'estudi, per a cadascun d'ells s'indica l'àrea i la concentració (conc) corregida per la respectiva del patró, el factor de resposta (FR) i el seu coeficient de variació (CV), l'equació de la recta (Figura 31), coeficient de correlació ( $R^2$ ) i l'interval de linealitat.

## Acetona

Patró	Conc Acetona/ Conc PI	Àrea analit	Àrea PI	Àrea Acetona/ Àrea PI	FR (Àrea corregida /Conc corregida)
P2	1,75E+00	8.881	4.802	1,849	1,057
P3	1,31E+00	7.486	5.345	1,401	1,067
P4	8,75E-01	3.605	3.744	0,963	1,101
P5	4,37E-01	2.122	4.380	0,484	1,108
P6	1,75E-01	839	4.184	0,201	1,146
P7	8,75E-02	277	3.642	0,076	0,869
P8	6,12E-02	183	3.197	0,057	0,935
P9	4,37E-02	167	3.753	0,044	1,017
P10	2,62E-02	138	4.826	0,029	1,090
P11	1,75E-02	69	4.135	0,017	0,954
P12*	8,75E-03	15	3.897	0,004	0,440
P13*	4,39E-03	29	3.389	0,009	1,951

P14-17 descartats per falta de senyal, P1 només s'estudia per a l'analit etanol, \*Patrons descartats no compleixen amb el CV FR definit.

**Figura 31.** Linealitat: equació de la recta per a l'acetona.



CV RF	8,576 %
Rang lineal	79 – 7.900 µg/mL
Recta de calibració	$y=1,066x+0,002$
IC 95 %	(-0,0156, 0,0124)
$R^2$	0,9995

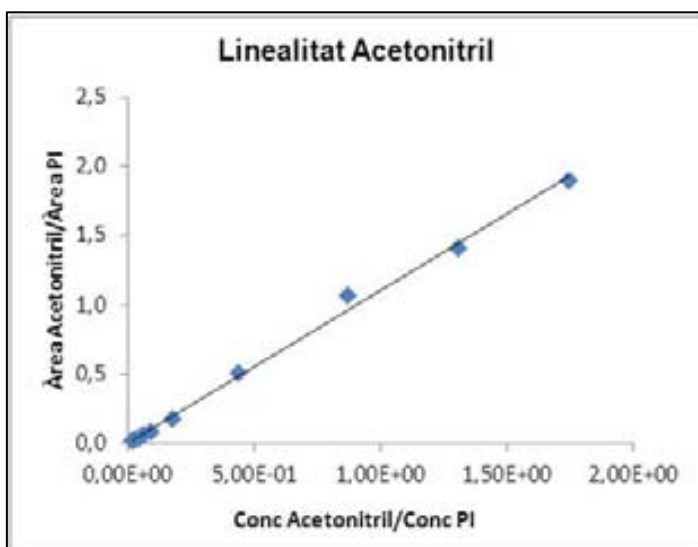
**Taula 55.** Cromatografia de gasos, linealitat: Taula dels resultats obtinguts en l'estudi de linealitat del test de dissolvents residuals per a l'analit acetonitril. A la taula s'indiquen els patrons analitzats que donaren resposta cromatogràfica per a l'analit d'estudi, per a cadascun d'ells s'indica l'àrea i la concentració (conc) corregida per la respectiva del patró, el factor de resposta (FR) i el seu coeficient de variació (CV), l'equació de la recta (Figura 32), coeficient de correlació ( $R^2$ ) i l'interval de linealitat.

## Acetonitril

Patró	Conc ACN/ Conc PI	Àrea analit	Àrea PI	Àrea ACN/ Àrea PI	FR (Àrea corregida /Conc corregida)
P2	1,74E+00	9.121	4.802	1,899	1,091
P3	1,31E+00	7.520	5.345	1,407	1,078
P4	8,70E-01	3.997	3.744	1,068	1,226
P5	4,35E-01	2.208	4.380	0,504	1,158
P6	1,74E-01	757	4.184	0,181	1,039
P7	8,70E-02	290	3.642	0,080	0,915
P8	6,09E-02	193	3.197	0,060	0,991
P9	4,35E-02	176	3.753	0,047	1,078
P10	2,61E-02	140	4.826	0,029	1,111
P11	1,74E-02	73	4.135	0,018	1,014
P12*	8,70E-03	15	3.897	0,004	0,421
P13*	4,36E-03	30	3.389	0,009	2,054

P14-17 descartats per falta de senyal, P1 només s'estudia per a l'analit etanol, \*Patrons descartats no compleixen amb el CV del FR definit.

**Figura 32.** Linealitat: equació de la recta per a l'acetonitril.



CV FR	8,18 %
Rang lineal	78,6-7.860 µg/mL
Recta de calibració	$y=1,1034x+0,0039$
IC 95 %	(-0,0352, 0,0431)
$R^2$	0,9967

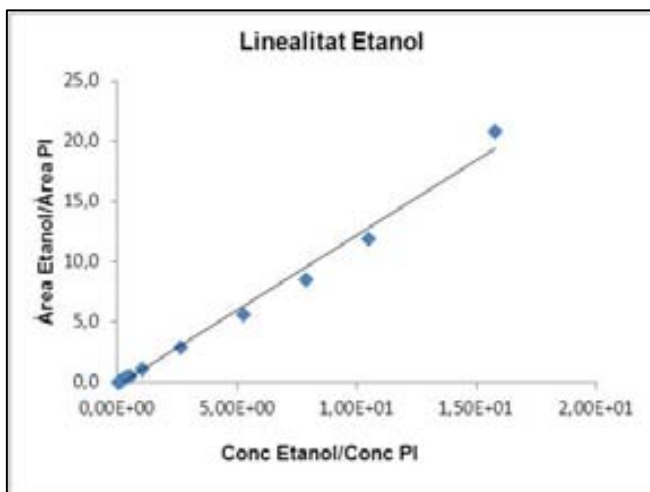
**Taula 56.** Cromatografia de gasos, linealitat: Taula dels resultats obtinguts en l'estudi de linealitat del test de dissolvents residuals per a l'analit etanol. A la taula s'indiquen els patrons analitzats que donaren resposta cromatogràfica per a l'analit d'estudi, per a cadascun d'ells s'indica l'àrea i la concentració (conc) corregida per la respectiva del patró, el factor de resposta (FR) i el seu coeficient de variació (CV), l'equació de la recta (Figura 33), coeficient de correlació ( $R^2$ ) i l'interval de linealitat.

## Etanol

Patró	Conc Etanol/ Conc PI	Àrea analit	Àrea PI	Àrea Etanol/ Àrea PI	FR (Àrea corregida /Conc corregida)
P1	1,57E+01	88.910	4.272	20,812	1,322
P2	1,05E+01	57.313	4.802	11,935	1,137
P3	7,87E+00	45.794	5.345	8,568	1,088
P4	5,25E+00	20.897	3.744	5,581	1,063
P5	2,62E+00	12.917	4.380	2,949	1,124
P6	1,05E+00	4.741	4.184	1,133	1,079
P7	5,25E-01	1.928	3.642	0,529	1,009
P8	3,67E-01	1.281	3.197	0,401	1,090
P9	2,62E-01	1.108	3.753	0,295	1,125
P10	1,57E-01	821	4.826	0,170	1,080
P11	1,05E-01	505	4.135	0,122	1,163
P12	5,25E-02	171	3.897	0,044	0,836
P13	2,62E-02	105	3.389	0,031	1,180
P14*	1,05E-02	44	2.849	0,015	1,471
P15*	5,25E-03	34,8	4.645	0,007	1,427
P16*	2,64E-03	14,5	4.674	0,003	1,177

P17 descartat per falta de senyal, \*Patrons descartats, no compleixen amb el CV FR definit

**Figura 33.** Linealitat: equació de la recta per a l'etanol.



CV FR	9,91 %
Rang lineal	118,5-71.100 µg/mL
Recta de calibració	$y=1,2486x-0,234$
IC 95 %	(-0,7226, 0,2546)
$R^2$	0,9910



- Límit de detecció
  - Es va realitzar la inspecció visual de tots els cromatogrames de l'estudi de linealitat. La concentració mínima observada de cada analit que el seu senyal es diferencia del soroll de fons (LD observat) es detalla a la taula 57.

**Taula 57.** Cromatografia de gasos, límit de detecció: Taula que indica el límit de detecció per a cada dissolvent estudiat.

	Èter dietílic	Acetona	Acetonitril	Etanol
<b>Límit de detecció</b> (ppm)	18	20	20	12

#### 5.1.4.6 Discussió

El mètode estudiat per a la determinació de dissolvents residuals mitjançant CG, requereix la utilització de PI. Això es deu a que la metodologia de CG és molt susceptible a la manipulació de les mostres i al volum d'injecció, cal tenir en compte que s'injecta 1 µL mentre que per HPLC el volum és de 25 µL. Al mateix temps és un mètode que s'utilitza tant amb injector automàtic com manual, per tant, poden haver-hi oscil·lacions en el volum d'injecció. Per aquest motiu es necessita afegir un PI. Aquest és l'acetat d'etil, dissolvent que compleix tots els requeriments per poder ser usat com a PI<sup>82</sup>:

- no suposa cap interferència per a l'anàlisi,
- proporciona un senyal analític distingible i suficient per tal de ser determinat,
- no es troba a la matriu de la mostra d'estudi.

Amb l'addició d'una quantitat coneguda de PI a totes les mostres i estàndards, fa que les fluctuacions del mètode analític afectin proporcionalment tant al PI com a l'analit, d'aquesta manera el senyal obtingut corregit pel del PI permet ser independent d'aquestes fluctuacions<sup>82</sup>.

Referent a la toxicitat relacionada amb els dissolvents residuals que poden estar presents en el producte final de cada RF d'estudi, es pot observar que, segons la classificació de la Ph. Eur. i de la ICH, cap d'ells és de classe 1, és a dir de toxicitat no acceptable. A causa dels problemes de solubilitat dels principis actius PIB i FMISO en solució salina, la solució final dels RFs estudiats requereix contenir un 10 % i un 2,5 % d'etanol respectivament. Per tant, tal com permet la Ph. Eur., cal justificar els valors superiors de 5.000 ppm establerts pel dissolvent etanol, la justificació

es basa en els estudis de solubilitat del respectius PEIs (PEI nº 09-006<sup>37</sup> i PEI nº10-105<sup>38</sup>) i en la utilització a la pràctica clínica d'etanol en el tractament de l'acidosi metabòlica que supera les dosis mencionades. Cal esmentar que els dos PEIs i, per tant, aquesta justificació ha estat acceptada per l'AEMPS.

En les instal·lacions on es produeixen els RFs d'estudi es fabriquen altres RFs que comparteixen el mateix equip. Per tal d'evitar temps d'espera entre anàlisis de RFs (canvi de condicions d'anàlisi, de columnes, condicionament d'equip), s'utilitza el mateix mètode analític per a determinar els dissolvents residuals en tots ells. Per això, es creu oportú mencionar que és un mètode analític que també s'utilitza per a la determinació de: metanol, tetrahidrofurà i dimetilsulfòxid, dissolvents residuals presents en el producte final d'altres RFs sintetitzats a les instal·lacions. Per aquest motiu, certs cromatogrames adjunts presenten com a patró aquests dissolvents residuals, però no s'ha considerat reportar la validació al no aplicar als RFs d'estudi. El que sí que s'ha volgut reportar és la validació d'etanol a 50.000 ppm ja que és el límit usat per a un altre RF que presenta problemes de solubilitat i es té definida com especificació no superar el màxim de 50.000 ppm d'etanol en el producte final. Amb aquesta concentració es valida al mateix temps la linealitat de la concentració d'etanol de la Ph. Eur. 5.000 ppm, especificació vàlida per a la resta de RFs.

Resumint, el mètode analític escollit per a determinar els dissolvents residuals presenta l'avantatge de poder determinar tots els possibles dissolvents residuals presents en tots els RFs que es fabriquen a les instal·lacions, incloent els dissolvents de neteja. A més, permet realitzar-ho en poc temps (< 10 min) i en les mateixes condicions, així es pot dur a terme l'anàlisi en sèrie, sense temps d'espera.

### - Selectivitat

- El TR de cada dissolvent presenta un CV inferior al 2 % complint-se el criteri d'acceptació (taula 52).
- La separació entre els TR dels diferents analits és òptima, així que encara que es disposi d'un curt temps d'anàlisi (< 10 min) el mètode permet una òptima separació entre analits (taula 52).
- No s'observa cap pic en el dissolvent emprat per a la preparació dels patrons (aigua), l'aigua no interfereix en la determinació dels dissolvents residuals.
- Quant a la mostra de cada RF només s'observa un pic corresponent a l'etanol, ja que:

- La mostra no conté cap component que interfereixi en el mètode d'estudi.
- La mostra estudiada només conté etanol, per tant, exceptuant l'etanol que és un excipient estabilitzant i necessari per a la dilució del principi actiu a quantitats detectables, el mètode de neteja i de síntesi eliminen els possibles dissolvents orgànics que participen en la fabricació dels RFs d'estudi, fet a contrastar amb els resultats de la validació de procés (apartat 5.2 *Validació de procés*).
- Linealitat  
Es preparen unes solucions que inclouen l'interval de concentració del 5 - 150 % dels valors límits permesos per a cada dissolvent residual.

- Linealitat de l'èter dietílic, de l'acetona i de l'acetonitril:

- Els patrons de P14 a P17 no presentaren àrea ni d'èter ni d'acetona ni d'acetonitril, patrons corresponents a una concentració inferior a 8 ppm (taules 53, 54 i 55).
- Es va calcular el FR de cada patró de P2 a P13 per a cada dissolvent residual, descartant-se per a cadascun d'ells els patrons P12 i P13, ja que si se'ls considerava, no es complia un CV del RF menor al 10 % (taules 53, 54 i 55).
- Es va representar l'equació de la recta de cada analit considerant els patrons que permeten obtenir un CV pel FR inferior al 10 %. El coeficient de correlació de la recta de calibració de cada analit va presentar un valor de  $R^2 > 0,990$  (Figures 30, 31 i 32).
- Es va estimar l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats (Figures 30, 31 i 32).
- Amb tots els resultats obtinguts es pot considerar que el mètode analític per a la determinació dels dissolvents residuals és lineal dins del rang:
  - Èter dietílic: 71,5-7.150 ppm
  - Acetona: 79-7.900 ppm
  - Acetonitril: 78,6-7.860 ppm

S'observa que els tres analits responen de forma semblant al mètode analític. Tenint en compte els valors límits per a cada analit (5.000 ppm excepte 420 ppm per acetonitril) es pot considerar que el mètode analític

és adequat per a les condicions d'assaig. Fora de l'interval de cada analit no es pot assegurar la linealitat.

▪ Linealitat de l'etanol:

- El patró P17 no presentà àrea per a l'etanol, patró corresponent a una concentració inferior a 8 ppm, coincidint amb els altres analits (taula 56).
- Es va calcular el FR de cada patró de P1 a P16, descartant-se els patrons P14-P16 ja que si se'l considerava no es complia un CV del FR menor al 10 % (taula 56).
- Es va representar l'equació de la recta de cada analit considerant els patrons que permeten obtenir un valor del CV del FR inferior al 10 %. El coeficient de correlació de la recta de calibració per a l'etanol va presentar un valor de  $R^2 > 0,990$  (Figura 33).
- Es va estimar l'interval de linealitat realitzant un test d'ajust per mínims quadrats (Figura 33).
- Per tant, es pot considerar que el mètode analític per a la determinació de dissolvents residuals és lineal per a l'analit etanol dins del rang:

- Etanol: 118,5-71.100 ppm

S'observa que l'etanol presenta una resposta diferent en estar validat a major concentració, de totes maneres, considerant els valors límits de 5.000 ppm – 50.000 ppm, es pot considerar que el mètode analític és adequat per a les condicions d'assaig. Fora de l'interval de cada analit no es pot garantir la linealitat.

- Límit de detecció

Existeixen diferents mètodes descrits a la guia de Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> per determinar els límits de detecció i de quantificació depenent de si el mètode és instrumental o no.

Tal com s'ha fet per a la PQ (apartat 5.1.1 PQ) s'escull el mètode d'inspecció visual per tal de determinar el LD, el fet que el mètode determini els possibles dissolvents residuals de neteja i també que determini dissolvents que el mètode de fabricació té passos per eliminar-los, fa que els patrons de menor concentració usats per a l'estudi de linealitat siguin molt pròxims a la línia base (senyal/soroll) i a les condicions d'ús, pel què es pot

treure profit d'aquests cromatogrames i establir visualment la mínima quantitat de cada analit que es pot determinar en cada mètode analític.

Els LD obtingut per a cada dissolvent residual són semblants, essent pròxims a 10 - 20 ppm (Taula 57).

### 5.1.4.7 Conclusions

- Selectivitat
  - El mètode analític per a determinar els dissolvents residuals presenta una separació òptima entre els diferents dissolvents residuals.
  - No existeix cap component en el dissolvent utilitzat (aigua) i en la matriu de la mostra que interfereixi en la determinació dels analits.
- Linealitat: El mètode analític és lineal dins els rangs indicats a continuació per a cada dissolvent.
  - Èter dietílic: 71,5 - 7.150 ppm
  - Acetona: 79,0 - 7.900 ppm
  - Acetonitril: 78,6 - 7.860 ppm
  - Etanol: 118,5 - 71.100 ppm
- Límit de detecció per a cada dissolvent residual:
  - Èter dietílic: 18 ppm
  - Acetona: 20 ppm
  - Acetonitril: 20 ppm
  - Etanol: 12 ppm

### 5.1.5 Esterilitat

#### 5.1.5.1 Introducció

L'esterilitat fa referència a la probabilitat que existeixi una unitat no estèril en un lot de producte. El concepte de probabilitat es basa en el fet que la mort microbiana segueix una progressió geomètrica. Per tant, cal tenir en compte que un producte es considera estèril quan la probabilitat de trobar una unitat no estèril és d'1 unitat entre  $10^6$  unitats, és a dir, tenir un *Sterility Assurance Level* de  $10^{-6}$ . Per tant, un resultat satisfactori en el test d'esterilitat només indica que no s'ha detectat contaminació microbiana en la mostra analitzada a les condicions del test<sup>83</sup>.

Els RFs com a productes d'administració parenteral han de complir el test d'esterilitat<sup>36</sup>. Bàsicament el test consisteix a processar la mostra d'incubant-la durant 14 dies en medis de cultius adequats i detectar al final de la incubació l'existència o no de creixement microbià.

En el cas dels RFs, i particularment dels RFs PET, no és possible disposar del resultat d'esterilitat abans de l'alliberació del lot produït a causa de la seva curta semivida. Les NCF en l'annex 3 de RFs<sup>29</sup> i la monografia de preparacions radiofarmacèutiques<sup>36</sup> contempen aquest fet i permeten realitzar el test després de l'alliberació, sempre que es respecti una de les següents premisses:

- El test d'esterilitat: s'ha de realitzar tan aviat com sigui possible considerant els nivells de radiació de la mostra. En cas que no es pugui iniciar de forma immediata i calgui l'emmagatzematge de la mostra, s'ha de fer en condicions que previnguin falsos negatius.
- Alliberació paramètrica del producte<sup>84</sup>: conformitat d'un conjunt de tests i controls durant el procés que garanteixen que el producte acabat compleix l'especificació. L'alliberació paramètrica la concedeix l'AEMPS.

Totes aquestes condicions impliquen una adequada validació del test d'esterilitat per a cada RF i l'adequada síntesi dels RFs, especialment si segueixen un procés asèptic.

#### **Síntesi dels radiofàrmacs: influència en el test d'esterilitat**

Existeixen dues vies per produir medicaments d'administració parenteral: l'esterilització terminal i el procés asèptic.

El procés d'esterilització terminal consisteix a esterilitzar el producte en l'envàs final ja segellat, és a dir, al final del procés. En canvi, en el procés asèptic s'esterilitza el producte abans de ser dispensat en l'envàs final. Per tant, el procés asèptic és el més crític.

Per tal d'escollir el procés d'esterilització d'un nou producte se segueix el *decision trees for the selection of sterilization methods* de l'EMA<sup>85</sup> (arbre de decisió per escollir el mètode

d'esterilització), on s'estableix com a mètode de primera elecció l'esterilització terminal (esterilització per calor humida, autoclau). Aquest procés suposa sotmetre el producte final a elevades temperatures durant un temps determinat (condicions estàndard: 121°C durant 15 min)<sup>85</sup>. En el cas de <sup>11</sup>C-PIB que té una semivida de 20,4 min<sup>65</sup>, sotmetre el producte a un procés final de producció de 15 minuts addicionals suposaria perdre com a mínim una semivida. En el cas de <sup>18</sup>F-FMISO, la semivida no és un fet determinant ja que és de 110 min<sup>65</sup>, però a l'estudi d'estabilitat realitzat en el PEI n°10-105<sup>38</sup> on es va sotmetre el producte final a un procés d'autoclau, no es varen obtenir resultats conformes. Per tant, els dos RFs d'estudi no són esterilitzables al final del procés de producció per calor humida, així que es fabriquen seguint el procés més crític, el procés asèptic, i s'esterilitzen per doble filtració esterilitzant.

- Procés asèptic

Seguint el procés asèptic, descrit a l'annex 1 de les NCF<sup>30</sup>, els dos RFs es preparen en un entorn ambientalment controlat. Concretament tots els processos de la producció dels RFs abans de la seva filtració (síntesi, purificació i formulació) es realitzen en un ambient de classe C<sup>xx</sup> i un cop el RF està formulat se sotmet a filtració i envasat en un ambient de classe A<sup>xxi</sup> en un entorn de classe B<sup>xxii</sup>. Aquest procés implica controlar: l'ambient de producció, el personal, l'ús de material adequat a les operacions, realitzar el de test de càrrega microbiana i portar a terme periòdicament la validació del procés asèptic (*Media fill*).

- Esterilització per doble filtració esterilitzant

En el cas dels RFs d'estudi al no ser esterilitzables per calor humida, es fa l'esterilització mitjançant filtració esterilitzant, havent realitzat prèviament la validació filtre producte (compatibilitat, retenció, extractables,...). El procés d'esterilització terminal consisteix a utilitzar filtres amb una mida de porus de  $\leq 0,22 \mu\text{m}$ , aquesta porositat permet la retenció de bacteris, llevats i fongs<sup>30</sup>. A causa del risc potencial associat a aquest procés d'esterilització i, en el cas dels RFs d'estudi, com que s'allibera el producte abans d'obtenir el resultat del test d'esterilitat, s'utilitza la doble filtració esterilitzant. Aquest tipus d'esterilització es basa en utilitzar dos filtres disposats en sèrie per esterilitzar el producte final<sup>30</sup>. El control del procés d'esterilització per filtració esterilitzant és realitzar

---

Per a la fabricació de medicaments estèrils es distingeixen 4 classificacions ambientals<sup>30</sup>:

<sup>xx</sup> Classe C i D: Zones netes per realitzar fases menys crítiques de la fabricació de productes estèrils.

<sup>xxi</sup> Classe A: Zones on es realitzen operacions d'alt risc com és la zona d'envasat, de safates de taps, d'ampolles, de vials oberts i de realització de connexions asèptiques.

<sup>xxii</sup> Classe B: Entorn de la zona de classe A en el cas de preparació i d'envasat asèptic.

el test d'integritat dels filtres usats abans i després del seu ús. Aquest test consisteix en un test no destructiu que mesura la integritat del filtre.

Per tant, el control de tots els paràmetres que poden influenciar en el procés asèptic i en la realització del test d'integritat dels dos filtres utilitzats abans de l'alliberació del producte és especialment important en el cas dels RFs, ja que s'allibera el producte abans d'obtenir el dictamen d'esterilitat.

### **Test d'esterilitat**

Les condicions ambientals del lloc on es realitza un test d'esterilitat han d'estar controlades igual que l'ambient d'un procés asèptic per tal d'evitar tota contaminació externa al producte final i han de complir amb els requeriments de l'annex 1 de les NCF<sup>30</sup>. Conseqüentment, l'àrea on es realitza el test ha de ser una cabina de flux laminar de classe A en un entorn de classe B o bé un aïllador de classe A<sup>86</sup>.

Han d'existir controls periòdics de les condicions de treball mitjançant mostres ambientals de l'àrea de treball (aire i superfícies); controls durant l'assaig del test d'esterilitat mitjançant plaques de sedimentació obertes dins la cabina de flux laminar, i control de guants dels operadors.

El laboratori analista ha de tenir un pla de formació per als tècnics que realitzen el test, incloent qualificació de la vestimenta i manipulació en àrees asèptiques i qualificació per realitzar el test d'esterilitat.

El material a utilitzar ha de ser estèril i adequat a les operacions a realitzar.

Per tal de realitzar un test d'esterilitat a un nou producte s'ha de validar el test mitjançant un test d'idoneïtat i posteriorment ja es pot dur a terme el test d'esterilitat per a cada producte. A continuació es descriu en què consisteix cada test.

### **Test d'esterilitat del producte**

El test d'esterilitat es pot portar a terme segons la monografia Ph. Eur. 2.6.1 *Sterility* 04/2011:20601<sup>83</sup>, seguint dues tècniques: la filtració per membrana o la inoculació directa.

- Test d'esterilitat per filtració per membrana

La filtració per membrana està especialment indicada per a les preparacions filtrables següents:



- preparacions aquoses
- productes sòlids solubles
- preparacions alcohòliques, grasses, miscibles o solubles en solvents aquosos o grassos sempre que els solvents no posseïxin activitat antimicrobiana a les condicions d'assaig.

Aquesta metodologia consisteix a filtrar el volum de mostra per una membrana, retirar asèpticament la membrana i incubar-la en el medi de cultiu indicat.

- Test d'esterilitat per inoculació directa

La inoculació directa està especialment indicada per a medicaments no filtrables:

- líquids grassos
- olis i cremes
- sutures de catgut i altres materials d'ús veterinari.

El test consisteix a transferir la quantitat de mostra directament al medi de cultiu i procedir a la seva incubació.

En els dos casos per a realitzar el test es requereixen dos medis de cultiu:

- Fluid de Tioglicolat (FTG): usat principalment per al cultiu de bacteris anaeròbiques, encara que també pot detectar certes bacteris aeròbiques.
- Caldo de Triptona i Soja (TSB): usat per al cultiu de bacteris aeròbics i fongs.

Els medis de cultiu els poden preparar els mateixos laboratoris analistes o bé obtenir-los de certs proveïdors homologats en existir-ne de comercials. Cal tenir en compte que cada lot de medi de cultiu abans de ser utilitzat ha de superar un test d'esterilitat i un test de promoció del creixement<sup>83</sup>.

Al final de la incubació, si no s'observa creixement en les mostres incubades, el producte compleix amb el test.

Si s'observa creixement, s'ha d'obrir una investigació per a determinar-ne la causa.

- Si es detecta que la causa és externa a la mostra, s'invalida l'assaig i es pot repetir; si el resultat és conforme, el producte es dona com a apte, i si el test no és conforme el producte es dona com a no apte.
- En el cas que la causa no sigui externa al producte, es considera el test no apte.

En cas d'un test no apte en un lot de RF que s'ha alliberat abans de la conformitat del test, s'ha de comunicar a les autoritats sanitàries pertinents i establir una sèrie d'accions, com per exemple la revalidació del procés asèptic.

Existeixen una sèrie d'aspectes del test d'esterilitat pels RFs, que cal tenir en compte:

- Nombre d'unitats a analitzar
- Quantitat de mostra per medi de cultiu

Aquests dos paràmetres figuren en dues taules a la corresponent monografia d'esterilitat de la Ph. Eur.<sup>83</sup>. Considerant que en els RFs d'estudi el volum final de producció és de com a màxim 15 mL i que com a màxim es dispensen 5 unitats (2 vials de dosi, 1 control de qualitat, 1 de mostra de referència, 1 control esterilitat), apliquen els següents paràmetres (taula 58 i 59):

**Taula 58.** Nombre mínim d'unitats a analitzar<sup>83</sup>

Número d'unitats del lot	Mínim d'unitats a ser analitzades*
Preparacions parenterals de ≤ 100 unitats	el 10 % o 4 unitats (utilitzar el número major)

*\*excepte justificació*

**Taula 59.** Mínima quantitat a utilitzar per a cada medi de cultiu<sup>83</sup>

Quantitat per vial (productes líquids)	Mínima quantitat a utilitzar per medi*
< 1 mL	Tot el contingut de cada vial
1-40 mL	Porcions de cada vial, no menys de 1mL

*\*En el cas de la tècnica d'inoculació directa es permet l'ús de menys quantitat de volum si és justificable<sup>83</sup>.*

Per tant, segons la taula 58 que defineix el nombre mínim d'unitats a analitzar, en els RFs d'estudi només es pot analitzar una unitat del lot produït, i queda justificat per la peculiaritat que el volum del producte final només és de 15 mL i que l'anàlisi d'una unitat representa més del 10 % de les unitats finals.

Respecte el volum de producte a analitzar, la taula 59 cita que es requereix com a mínim 1 mL de mostra per a cada medi de cultiu. Considerant el pitjor dels casos: obtenir un baix rendiment de síntesi on es necessita 10 mL de dosi pel pacient dels 15 mL produïts, per tant només resten 5 mL. D'aquests 5 mL se'n necessiten 1 mL per al vial de control de qualitat (aspecte, pH, PQ, PRQ, puresa radionucleídica, dissolvents residuals, concentració, Asp i endotoxines) i 1 mL per al vial de mostra de referència. Per tant, queden 3 mL per al test d'esterilitat, dels quals s'ha de poder realitzar el test d'esterilitat per duplicat per si existeix una no conformitat en el primer test i s'ha de repetir. Així que en el pitjor dels casos, no és possible disposar d'1 mL de mostra per a cada

medi de cultiu. Aquest és un punt característic i crític per als RFs al validar i realitzar el test d'esterilitat.

### **Test d'idoneïtat**<sup>83</sup>

L'objectiu del test d'idoneïtat és demostrar que el producte subjecte d'anàlisi no posseeix activitat antimicrobiana i, per tant, s'ha de realitzar per a cada nou producte com assaig de validació inicial. Està indicat repetir l'assaig quan existeix un canvi en les condicions experimentals del test d'esterilitat, per tal de demostrar que el canvi no influeix en el test.

El test d'idoneïtat es pot portar a terme seguint les dues possibles metodologies descrites en el test d'esterilitat, la filtració per membrana o la inoculació directa, en funció del test escollit per realitzar el test d'esterilitat del producte se n'utilitza una o altre.

El test es basa a afegir un inòcul de microorganismes viables a la mostra a incubar.

Obtenint un creixement microbià clarament visible al final de la incubació i comparable amb l'obtingut en un vial control sense producte, es pot afirmar que el producte no posseeix activitat antimicrobiana a les condicions del test o bé que aquesta activitat ha estat satisfactòriament eliminada. Per tant, el test d'esterilitat es pot portar a terme sense cap modificació.

Si no s'obté un creixement microbià clarament visible al final de la incubació i comparable amb l'obtingut amb el vial de control sense producte, es conclou que el producte posseeix una activitat antimicrobiana que no s'ha eliminat a les condicions d'assaig. Per tant, cal modificar les condicions per tal d'eliminar l'activitat antimicrobiana del producte i repetir el test d'idoneïtat.

Així que, amb tot el que s'ha exposat i considerant que el producte final s'allibera sense el test d'esterilitat, és de gran importància la validació d'aquest test. En la validació del test d'esterilitat s'ha de considerar que es disposa de poc volum final de producte i que la mostra de producte posseeix una activitat radioactiva intrínseca que no permet l'anàlisi de forma immediata. Al mateix temps, per a l'alliberació del producte és imprescindible considerar tots els paràmetres periòdics de manteniment del procés asèptic i el test de d'integritat dels filtres usats en l'envasat asèptic per tal d'assegurar la conformitat en el test d'esterilitat.

#### **5.1.5.2 Hipòtesi**

És possible validar el test d'esterilitat en els RFs d'estudi, considerant el poc volum disponible de RF i la radioactivitat intrínseca de la mostra.

### 5.1.5.3 Objectius

Validar el test d'esterilitat pels dos RFs d'estudi,  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO:

- Determinar els paràmetres de validació
  - Conservació de les mostres (període, condicions...) fins a la realització del test d'esterilitat.
  - Determinar la metodologia a utilitzar per a realitzar el test d'esterilitat (filtració per membrana o inoculació directa).
  - Definir el volum mínim a utilitzar de mostra per medi de cultiu.
- Realitzar la validació del test d'esterilitat portant a terme el test d'idoneïtat.
- Determinar el test d'esterilitat segons paràmetres de validació.

### 5.1.5.4 Metodologia

#### Paràmetres de validació

- Conservació de les mostres

El test d'esterilitat es realitza en un laboratori extern que no disposa de permís d'instal·lació radioactiva. Per tant, és necessari un transport del producte que es realitzarà quan la mostra a analitzar hagi decaïgut. Es considera una mostra de radioisòtops C-11 i F-18 desclassificada com a material radioactiu quan la mostra conté  $< 10 \text{ Bq/g}$  (Orden ECO 1449/2003<sup>87</sup>).

S'estableix que:

  - Es conserva el vial de mostra dins el contenidor de blindatge en un ambient de temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durant 24 hores.
  - En el cas que no es pugui enviar al cap de 24 h (dia festiu), es conserva en refrigeració controlada ( $2 - 8^\circ\text{C}$ ).
- Determinació de la metodologia del test d'esterilitat

Tal com s'ha explicat a la introducció, considerant que en el pitjor dels casos no és possible disposar d'1 mL per a cada medi de cultiu en la realització del test d'esterilitat i que en el cas de la tècnica d'inoculació directa es permet l'ús de menys quantitat de volum si és justificable, s'estableix com a metodologia a usar en el test d'esterilitat la tècnica d'inoculació directa.
- Determinació del volum a usar de mostra per medi de cultiu

Usar 0,5 mL per medi de cultiu considerant que en el pitjor cas es disposa d'1mL de mostra per realitzar el test.

#### **Validació del test d'esterilitat: Test d'idoneïtat**

S'utilitza el mètode d'inoculació directa.

- Control del medi de cultiu
  - Test d'esterilitat del medi de cultiu<sup>83</sup>
    - S'incuben porcions de medi durant 14 dies.
    - Criteri d'acceptació: no ha d'existir creixement microbià.
  - Promoció del creixement del medi de cultiu<sup>83</sup>
    - Es preparen inòculs de microorganismes que no continguin més de 100 ufc<sup>xxiii</sup> i es preparen porcions de cada medi de cultiu.
    - S'inoculen les mostres de medi de cultiu amb els inòculs de microorganismes, seguint taula adjunta, fent-ho de forma separada per a cada microorganisme.
    - S'incuba cada porció a les condicions de temperatura i temps que indica la taula 60.
    - Criteri d'acceptació: s'ha d'observar creixement visible en tots els vials.

**Taula 60.** Paràmetres i requeriments per a realitzar el test de promoció del creixement<sup>83</sup>

Microorganisme	Nº Cultiu de referència	Medi	Temperatura	Temps d'incubació
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC® 16404	TSB	20 – 25°C	≤ 5 dies
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC® 6633	TSB	30 – 35°C	≤ 3 dies
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231	TSB	20 – 25°C	≤ 5 dies
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC® 19404	FTG	30 – 35°C	≤ 3 dies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 9027	FTG	30 – 35°C	≤ 3 dies
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 6358	FTG	30 – 35°C	≤ 3 dies

- Anàlisi de la mostra:
  - Es realitza una síntesi de cada RF per tal d'obtenir un vial de 6 mL de producte filtrat.
  - S'envia la mostra al laboratori extern respectant les mesures de conservació, deixant decaure la radioactivitat del producte fins a valors < 10 Bq/g.

<sup>xxiii</sup> ufc: Unitats formadores de colònies.

- Es transfereix 0,5 mL de mostra a un vial amb medi de cultiu (TSB o FTG) considerant que el volum de producte no pot ser superior al 10 % del volum del medi.
- Es repeteix el procés 6 vegades per tal d'obtenir 3 vials amb medi TSB i 3 vials amb medi FTG.
- S'afegeix a cada vial l'inòcul corresponent de microorganismes viables de no més de 100 ufc segons taula 60.
- Control positiu: es realitza un test de promoció del creixement en paral·lel.
  - Es preparen 3 vials amb medi de cultiu TSB i 3 vials en medi de cultiu FTG.
  - S'afegeix a cada vial un inòcul corresponent de microorganismes viables de no més de 100 ufc segons taula 60.
- S'incuben tots els 12 vials a les condicions de temperatura adequades segons medi de cultiu i microorganisme inoculat i es procedeix a la lectura dels vials.
- Criteri d'acceptació:
  - Observació de creixement en tots els vials amb mostra que ha de ser comparable amb el creixement corresponent al vial de control positiu.

### **Test d'esterilitat: Inoculació directa**

En cas que el test d'idoneïtat doni un resultat conforme, es realitza el test d'esterilitat en els tres lots de validació de cada RF seguint la metodologia descrita a continuació:

- S'envia la mostra per al test d'esterilitat (1 vial d'1mL) de cada lot de validació de cada RF d'estudi al laboratori extern respectant les mesures de conservació i de radioactivitat.
- Es transfereix 0,5 mL de mostra a un vial amb medi de cultiu TSB.
- Es transfereix 0,5 mL de mostra a un vial amb medi de cultiu FTG.
- S'incuben els vials que contenen TSB a 20 – 25°C i els que contenen FTG a 30 – 35°C durant 14 dies.
- Es procedeix a la lectura.
- Criteri d'acceptació: no s'ha d'observar creixement en cap dels dos vials.

## 5.1.5.5 Resultats

Validació del test d'esterilitat: Test d'idoneïtat del producte mitjançant inoculació directa:

- Control del medi de cultiu
  - Test d'esterilitat del medi de cultiu:
    - No es va observar creixement.
  - Promoció del creixement del medi de cultiu:
    - Es va observar creixement en tots els vials.
- Anàlisi de la mostra
  - En tots els vials amb mostra de cada RF es va obtenir un creixement visible.
  - El creixement va ser comparable al corresponent vial de control positiu.

**Taula 61.** Esterilitat: resultats test d'idoneïtat <sup>11</sup>C-PIB. La taula indica l'inòcul de cada microorganisme usat i l'observació del creixement en els 5 dies d'incubació tant del vial amb producte com el vial de control positiu.

<sup>11</sup> C-PIB	Vial	Creixement visible (dies)					Inòcul (ufc)
		1	2	3	4	5	
<b>Microorganisme</b> <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	Vial amb producte	-	-	+	+	+	18
	Vial control positiu	-	-	+	+	+	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Vial amb producte	-	+	+	+	+	92
	Vial control positiu	-	+	+	+	+	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	Vial amb producte	-	-	+	+	+	92
	Vial control positiu	-	-	+	+	+	
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC® 19404	Vial amb producte	-	+	+	+	+	71
	Vial control positiu	-	+	+	+	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Vial amb producte	-	+	+	+	+	86
	Vial control positiu	-	+	+	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6358	Vial amb producte	+	+	+	+	+	56
	Vial control positiu	+	+	+	+	+	

(-) No s'observa creixement, (+) s'observa creixement.

**Taula 62.** Esterilitat: resultats test d' idoneïtat  $^{18}\text{F}$ -FMISO. La taula indica l' inòcul de cada microorganisme usat i l' observació del creixement en els 5 dies d' incubació tant del vial amb producte com del vial de control positiu.

$^{18}\text{F}$ -FMISO	Vial	Creixement visible (dies)					Inòcul (ufc)
		1	2	3	4	5	
<b>Microorganisme</b> Aspergillus brasiliensis ATCC® 16404	Vial amb producte	-	-	+	+	+	24
	Vial control positiu	-	-	+	+	+	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Vial amb producte	-	+	+	+	+	23
	Vial control positiu	-	+	+	+	+	
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	Vial amb producte	-	-	+	+	+	92
	Vial control positiu	-	-	+	+	+	
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC® 19404	Vial amb producte	+	+	+	+	+	99
	Vial control positiu	+	+	+	+	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027	Vial amb producte	+	+	+	+	+	38
	Vial control positiu	+	+	+	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6358	Vial amb producte	+	+	+	+	+	29
	Vial control positiu	+	+	+	+	+	

(-) No s' observa creixement, (+) s' observa creixement

#### Test d' esterilitat

- No es va observar creixement en cap de les mostres analitzades dels 3 lots de validació de cada RF.



### 5.1.5.6 Discussió

#### Paràmetres de validació

- Conservació de les mostres

Considerant que el test d'esterilitat s'ha de realitzar tan aviat com sigui possible respectant els nivells de radioactivitat de la mostra, en cas que no es pugui iniciar de forma immediata i cal per tant, emmagatzematge de la mostra en condicions que previnguin falsos negatius. Els paràmetres establerts de conservació de la mostra durant 24h són suficients. Doncs, en el cas del  $^{11}\text{C}$ -PIB al cap de 24 h hauran passat 70 semivides i en el cas del  $^{18}\text{F}$ -FMISO 13 semivides, per tant, el període de 24 hores permet assegurar que la mostra contingui  $< 10 \text{ Bq/g}$ .

- Determinació de la metodologia del test d'esterilitat i determinació del volum a usar de mostra per medi de cultiu.

Segons la monografia del test d'esterilitat<sup>83</sup> descrit a la introducció, en medicaments filtrables és indicat l'ús de la metodologia de filtració per membrana. En el cas dels RFs d'estudi els dos són filtrables, per tant, la tècnica d'elecció hauria de ser la filtració per membrana. Però una de les problemàtiques que tenen els RFs d'estudi, és que es disposa de poc volum per a realitzar el test d'esterilitat (menys d'1 mL de producte final per medi de cultiu). Aquest fet fa que no es pugui complir amb els requeriments descrits a la Ph. Eur. que és l'ús d'1 mL de producte per medi de cultiu. Per tant cal considerar diferents aspectes:

- Metodologia a usar en el test d'esterilitat: la inoculació directa permet manipular millor petits volums en comparació amb la tècnica de la filtració per membrana.
- Normativa que estableix:
  - La guia per a l'ús del test d'esterilitat<sup>86</sup> de la Ph. Eur., descriu que es permet l'ús d'un mètode modificat o altres mètodes alternatius sempre que es demostrï que els resultats obtinguts són equivalents al mètode oficial modificat.
  - La normativa de medicaments de teràpies avançades<sup>88</sup>, que també presenten semblants dificultats als RFs com l'alliberació del producte abans del test d'esterilitat i la poca disponibilitat de volum per realitzar el test, permet l'ús de menys volum de producte en el cas de la tècnica de la inoculació directa sota justificació.

Per tant, s'escull l'ús de la tècnica de la inoculació per a realitzar el test d'esterilitat i respecte al volum, s'estableix que s'usarà com a mínim uns 0,5 mL per medi de cultiu.

### **Test d'idoneïtat del producte: inoculació directa**

El resultat del test d'idoneïtat ha estat conforme (taules 61 i 62), per tant ha permès demostrar i justificar que l'ús de la sembra directa i l'ús d'un mínim de 0,5 mL per medi de cultiu, permeten la recuperació de creixement en cas de contaminació del producte i que aquesta metodologia es pot utilitzar en l'anàlisi en rutina del test d'esterilitat dels dos RF d'estudi.

Al mateix temps, s'ha demostrat que tant el  $^{11}\text{C}$ -PIB com el  $^{18}\text{F}$ -FMISO no presenten activitat antimicrobiana en les condicions d'estudi.

### **Test d'esterilitat**

El test d'esterilitat no només implica obtenir el resultat conforme en la mostra de producte sinó que també són importants els paràmetres relacionats amb les condicions asèptiques que requereix el test<sup>89</sup>, els controls periòdics de les condicions de treball i el pla de formació per als tècnics que realitzen el test.

En el cas dels tres lots de validació de cada RF d'estudi, tant eren conformes els paràmetres de validació anteriors com el propi resultat del test d'esterilitat, tenint en compte que això només indica que no s'ha detectat contaminació microbiana en la mostra analitzada en les condicions del test.

Tal com s'ha descrit prèviament es pot demanar l'autorització de l'alliberació paramètrica del test d'esterilitat pels RFs d'estudi. En el cas dels RF d'estudi no s'ha procedit a la seva autorització ja que no compleixen amb el requeriment descrit a l'annex 17 de les NCF<sup>84</sup> que cita que l'alliberació paramètrica només és acceptable per a productes esterilitzats mitjançant esterilització terminal en el seu envàs final.

### 5.1.5.7 Conclusions

Considerant el poc volum disponible de RF i la radioactivitat intrínseca de la mostra, és possible validar el test d'esterilitat dels RFs d'estudi seguint les pautes següents:

- Determinació dels paràmetres de validació
  - Conservació de les mostres:
    - Es guarda el vial de mostra dins el contenidor de blindatge en un ambient de temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durant 24 hores. En el cas que no es pugui enviar al cap de 24 hores (dia festiu), la mostra es pot conservar en refrigeració controlada ( $2 - 8^{\circ}\text{C}$ ).
  - S'utilitza la tècnica d'inoculació directa per a realitzar el test d'esterilitat.
  - Volum mínim a utilitzar de mostra per medi de cultiu:
    - Un volum de 0,5 mL de mostra per medi de cultiu.
- Validació del test d'esterilitat: Test d'idoneïtat
  - El resultat del test d'idoneïtat és conforme, per tant:
    - El producte no té activitat antimicrobiana en les condicions d'estudi.
    - L'ús d'un volum de 0,5 mL de mostra per medi de cultiu permet la recuperació de creixement en cas de contaminació del producte.
- Test d'esterilitat
  - El procediment a seguir pel test d'esterilitat dels dos RFs queda definit de la manera següent:
    - Es transfereixen 0,5 mL de mostra a un vial amb medi de cultiu TSB i 0,5 mL de mostra a un vial amb medi de cultiu FTG.
    - S'incuben els vials que contenen TSB a  $20 - 25^{\circ}\text{C}$  i els que contenen FTG a  $30 - 35^{\circ}\text{C}$  durant 14 dies i es procedeix a la lectura.

Queda validat el test d'esterilitat per als dos RFs d'estudi,  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB, i es pot utilitzar el procediment descrit per a l'anàlisi en rutina d'aquest dos RFs d'estudi.

### 5.1.6 Endotoxines

#### 5.1.6.1 Introducció

##### Pirògens i test d'endotoxines bacterianes

Un pirogen és tot agent que administrat via parenteral pot produir una resposta fisiològica febril. Els pirògens són molt resistents a la destrucció tèrmica i química i poden resistir als mètodes d'esterilització, per això cal determinar-los en productes d'administració parenteral. Existeixen molts tipus de pirògens, però els més predominants són les endotoxines bacterianes que són lipopolisacàrids provinents de bacteries gram negatives (una dosi de 1-10 ng/kg d'endotoxines, pot produir una resposta febril)<sup>90</sup>.

Els RFs com a productes d'administració parenteral han de complir amb el test de pirògens<sup>91</sup> o amb el test d'endotoxines bacterianes<sup>92</sup> (BET, *Bacterial Endotoxins Test*)<sup>36</sup>. El test de pirògens és un test més complex que els BET, ja que requereix manipulació d'animals, normalment la indústria farmacèutica utilitza el test BET.

La Ph. Eur. considera justificable l'ús del BET en lloc del test de pirògens basant-se en què les endotoxines bacterianes són el pirogen més potent i la causa més comuna de contaminació en els productes farmacèutics. Concretament cita que la utilització d'un test o altre depèn de la naturalesa de la preparació farmacèutica. Si aquesta presenta una interferència amb el BET que activa o inhibeix el test i no és possible eliminar el factor d'interferència, el test de pirògens és el d'elecció<sup>93</sup>. Cal considerar que totes les monografies de RFs PET indiquen la utilització del test BET i, per tant, s'inicia la validació amb aquest test<sup>45-50</sup>.

##### Test d'endotoxines bacterianes

El BET és un test utilitzat per a quantificar endotoxines provinents de les bacteries gram negatives utilitzant lisat d'amebòcit que s'extreu del cranc de ferradura, el *Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus* (LAL, *Limulus Amoebocyte Lysate*). El LAL és un reactiu amb elevada sensibilitat a les endotoxines que la presència del qual inicia una cascada de reaccions quantificable en el BET. Existeixen tres tècniques per aquest test: gelificació o *gel-clot* (mesura la gelificació resultant de la reacció), turbidimetria (mesura la turbidesa que genera la reacció) i cromogènia (mesura del canvi de color associat a la reacció). La Ph. Eur. descriu 6 mètodes desenvolupats a partir d'aquests 3 mètodes: Mètode A (*Gel-clot* mètode: *Limit test*), Mètode B (*Gel-clot* mètode: *quantitative test*), Mètode C (*Turbidimetric Kinetic method*), Mètode D (*Chromogenic kinetic method*), Mètode E (*Chromogenic end-point method*), Mètode F

(*Turbidimetric end-point method*). El mètode de referència es considera el mètode A, en cas que s'utilitzi un altre mètode cal demostrar que aquest és apropiat per al producte<sup>92</sup>.

A causa de la curta semivida dels RFs PET i que la major part dels mètodes BET requereixen elevat temps per a la seva realització, no és possible disposar del resultat d'endotoxines abans de la seva alliberació. Les NCF en l'annex 3 de RFs<sup>29</sup>, contempen aquest fet i permeten realitzar el control de qualitat en dues fases (abans i després de l'alliberació) sempre que estigui ben descrit en procediments normalitzats de treball. Addicionalment les autoritats sanitàries volen que aquests tests es realitzin el més aviat possible.

Existeix un nou producte al mercat que permet la determinació d'endotoxines bacterianes aproximadament en 15 minuts basant-se en la cinètica de reacció cromogènica del BET. Es tracta del Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> (*Portable Test System*)<sup>94</sup> fabricat pels laboratoris Charles River (Wilmington, MA, USA). Aquest sistema està aprovat per la FDA<sup>95</sup> i està essent molt utilitzat per productes on el temps d'alliberació és crític, com la teràpia cel·lular<sup>96</sup> i els RFs. En el cas dels RFs PET de semivida més llarga com el F-18, la realització d'aquest test permet l'obtenció del resultat d'endotoxines abans de la seva alliberació.

Per tant, és un test especialment indicat per als RFs PET, on és molt important realitzar una validació correcta d'aquest mètode, tant per demostrar que no existeixen interferències en la preparació radiofarmacèutica com per justificar el seu ús en front del mètode de referència.

### **El sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup>**

El sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> (figura 34) mesura la cinètica de la reacció cromogènica entre el reactiu LAL i les endotoxines, basant-se en que la intensitat de color resultant de la reacció entre el reactiu LAL i les endotoxines és proporcional a la concentració d'endotoxines<sup>97</sup>.

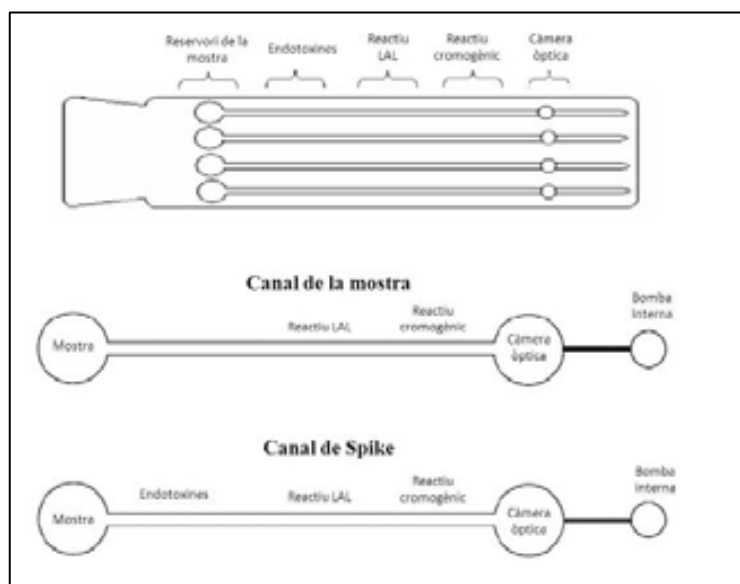
**Figura 34.** Imatge del Sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup>



L'equip està format per un sistema portable que mesura uns cartutxos d'un sol ús on s'inocula la mostra (Figura 35). Cada cartutx consisteix en 4 canals que es diferencien entre ells de la següent manera:

- 2 canals de mostra que contenen una quantitat coneguda de reactiu LAL, reactiu cromogènic i tampons de pH.
- 2 canals de *Spike* que conte els mateixos components que els canals de la mostra més una quantitat coneguda d'endotoxines bacterianes.

**Figura 35.** Imatge d'un cartutx que mostra els seus components i la composició dels diferents canals.



La potència de cada lot de cartutx és avaluada pel fabricant i la seva corba de calibració s'integra a un codi de cartutx identificable pel sistema portable Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup>.

El test consisteix en, prèvia preparació de la mostra (dilució i/o ajust de pH), inocular 25 µL de mostra a cadascun dels 4 canals.

El sistema utilitza una bomba interna que barreja i incuba els diferents reactius de cada canal a uns intervals de temps donats. Posteriorment els envia a la càmera òptica que conté un espectrofotòmetre que determina la concentració d'endotoxines utilitzant la gràfica de calibració de cada cartutx i calculant la dilució de la mostra introduïda prèviament<sup>94, 97</sup>.

### 5.1.6.2 Hipòtesi

Verificar l'aplicació del sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> per a la realització del BET en RFs PET.

### 5.1.6.3 Objectius

Realitzar la validació del BET usant el sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> pels RF <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO:

- Establiment dels límits d'endotoxines
- Determinació dels paràmetres de validació:
  - Màxima dilució vàlida
  - Criteris d'acceptació
- Definició del mètode de validació
- Realització de la validació del BET mitjançant l'ús del sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> en tres lots de cada RF a validar, <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO.

### 5.1.6.4 Metodologia

#### **Establiment dels límits d'endotoxines**

Els RFs d'estudi són preparacions radiofarmacèutiques que no posseeixen monografia específica i per tant no tenen establerta la seva especificació d'endotoxines, així que es va realitzar una revisió de les monografies de la Ph. Eur. de RFs marcats amb C-11 i amb F-18<sup>45-50</sup> i es va determinar el límit d'endotoxines per a les preparacions radiofarmacèutiques d'estudi. Aquesta revisió va donar com a resultat que totes les monografies revisades consideraven que el límit d'endotoxines és de 175 IU/V<sup>xxiv</sup>, essent V el Volum màxim d'injecció recomanat per dosi. Aplicant-ho en el cas dels RFs d'estudi, <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO, el volum màxim d'injecció és de 10 mL, per tant s'estableix que el límit d'endotoxines de les dissolucions d'estudi ha de ser menor a 17,5 IU/mL.

#### **Determinació dels paràmetres de validació**

Utilitzant com a referència les monografies de la Ph. Eur.: *Bacterial endotoxins*<sup>92</sup> i *Guidelines for using the test for bacterial endotoxins*<sup>93</sup>, la monografia de la USP: *Bacterial endotoxins test*<sup>98</sup> i les recomanacions definides a la guia ICH Q4B annex (*Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on bacterial endotoxins tests – general chapter*)<sup>99</sup>, s'estableix la metodologia per realitzar la validació del sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> per a la determinació del BET:

---

<sup>xxiv</sup> 1 International Unit (IU) Endotoxin és igual a 1 Endotoxin Unit (EU).

- Es determina la dilució màxima vàlida de la mostra d'estudi (MVD, *Maximum Valid Dilution*).

La MVD és la dilució de la mostra d'estudi que permet assegurar que un resultat negatiu del test significa que la concentració d'endotoxines del producte és menor al límit d'endotoxines i que un resultat positiu significa que el lisat ha detectat una concentració d'endotoxines superior o igual al límit.

Per a la seva determinació s'aplica l'equació indicada a les monografies consultades (Equació 7)

**Equació 7.** Equació pel càlcul de la dilució màxima vàlida (MVD).

$$MVD = \frac{\text{Límit d'endotoxines} \times \text{concentració de la mostra}}{\lambda}$$

On:

- Límit d'endotoxines és el valor límit definit com especificació: 17,5 IU/mL.
- Concentració de la mostra en (mL/mL). En usar-se la mostra final sense diluir es considera el valor de: 1 mL/mL.
- $\lambda$  és la sensibilitat del reactiu LAL del cartutx, que té un valor de: 0,05 IU/mL.

Determinació de la MVD de la mostra d'estudi:

$$MVD = \frac{17,5 \text{ IU/ml} \times 1 \text{ ml/ml}}{0,05 \text{ IU/ml}} = 350$$

Per tant, es defineix que la MVD té un valor de **350**.

- Determinació de la dilució d'estudi

Segons les monografies es recomana iniciar la validació usant una dilució de MVD/2, valor que es pot arrodonir fins al següent valor enter menor. En cas que el resultat sigui positiu, cal repetir el test a una dilució major sense sobrepassar la MVD.

Per tant, es determina iniciar la validació utilitzant una dilució **1:100** (arrodonit al següent valor enter menor).

- Criteris d'acceptació:

Revisant les recomanacions del fabricant i la metodologia descrita a les monografies consultades, s'estableix que el test ha de complir:



- Test d' idoneïtat: aquest test forma part integral dels mètodes analítics i serveix per mesurar que tot el sistema és adequat per a la mesura a realitzar.
- Especificació: és el valor que ha de tenir la mostra d'endotoxines per mL per tal de determinar si la mostra compleix amb el criteri per considerar apta la mostra.

Qualsevol assaig que no superi el test d' idoneïtat no pot ser acceptable encara que la mostra compleixi el criteri d' especificació establert.

**Taula 63.** Test endotoxines bacterianes: taula on s' indiquen els valors dels paràmetres del test d' idoneïtat i el valor de l' especificació.

Paràmetre	Definició	Valor d' acceptació	
<b>Test d' idoneïtat</b>	% <i>Spike Recovery</i>	Mesura la interferència de la mostra amb la matriu d' anàlisi comparant els resultats entre un canal de mostra i un canal de <i>Spike</i> .	50 - 200 %
	% CV <i>Spike</i>	Compara la diferència de resultats entre els dos canals de <i>Spike</i> .	≤ 25 %
	% CV <i>Mostra</i>	Compara la diferència de resultats entre els dos canals de mostra.	≤ 25 %
<b>Test</b>	Especificació	Valor d' endotoxines de la mostra.	< 17,5 IU/mL.

– Altres consideracions:

Segons especificacions Endofase®-PTS™, la mostra ha de tenir un valor de pH comprès entre 6.0 - 8.0<sup>94</sup>. En cas de no compliment, s'ha d'ajustar el pH de la mostra considerant la MVD d' estudi.

Tot el material que s' utilitza en un BET que està en contacte amb la mostra ha de ser lliure en endotoxines. Per tan es defineix que:

- L' aigua per a la dilució ha de ser de qualitat aigua BET (lliure d' endotoxines detectables).
- En cas de requerir-se ajust de pH s' han d' usar tampons BET proporcionats pel proveïdors.
- Tubs de dilució i puntes de pipeta despirogenitzats.

– Mètode de validació:

En tres lots de cada RF d'estudi es realitza el test d'endotoxines seguint la següent metodologia:

1) Dilució de la mostra:

a. S'inicia la validació amb la dilució MVD/2, és a dir, una dilució 1:100 de la mostra en un tub despirogenitzat.

i. Si el pH està dins l'interval (10 µL de la mostra en 900µL d'aigua BET).

ii. Si el pH no està dins l'interval (6.0 - 8.0), s'ajusta el pH amb tampons lliures d'endotoxines respectant la dilució 1:100 de la mostra.

2) Preparació de l'equip:

a. S'inicia l'equip i es deixa que realitzi el *self test*.

b. S'introdueix el cartutx i les dades de la mostra (lot, dilució, sensibilitat cartutx).

3) Introducció de la mostra:

a. Es pipetegen 25 µL de mostra diluïda en cada canal del cartutx.

b. S'inicia el test.

4) Es procedeix a la lectura dels resultats.

5) En cas d'obtenir resultats no satisfactoris, cal estudiar la causa dels resultats i en cas necessari procedir a la repetició del test utilitzant una dilució major a MVD/2.

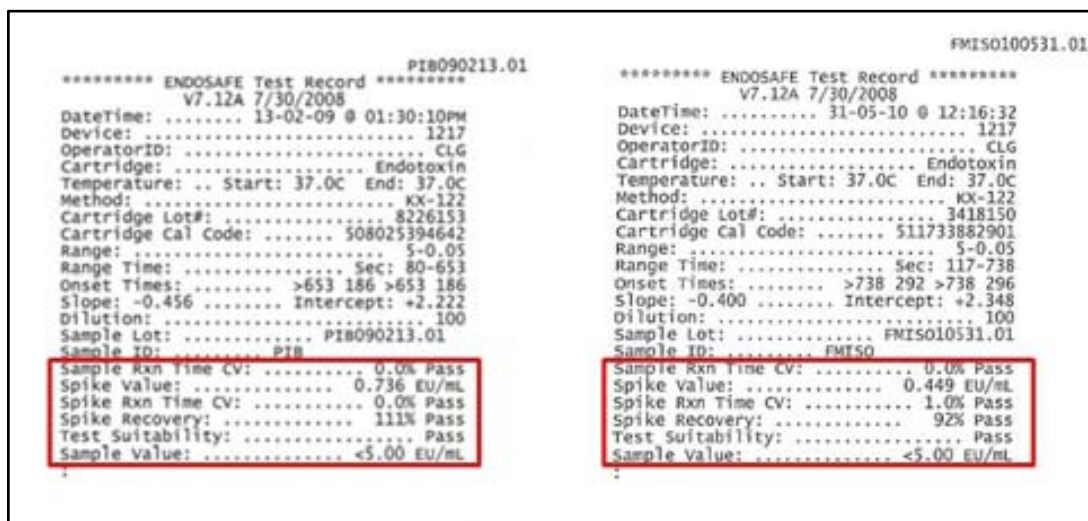
### 5.1.6.5 Resultats

Es va realitzar la validació del test BET en els tres lots de validació de cada RF.

De cada lot es va obtenir un registre del test. A la figura 36 s'adjunta un registre tipus final de test BET de cada RF en estudi.

Els valors que es van obtenir del test d'esterilitat en els 3 lots de cada RF d'estudi es resumeixen a les taules que s'adjunten a continuació: Taula 64 resultats <sup>11</sup>C-PIB i taula 65 <sup>18</sup>F-FMISO. En tots els casos només es va procedir a una dilució de la mostra i no es va requerir ajust de pH.

**Figura 36.** Registres del test d'endotoxines bacterianes: a l'esquerra registre d'un lot de <sup>11</sup>C-PIB i a la dreta registre d'un lot de <sup>18</sup>F-FMISO. S'indiquen, dins el requadre, els valors resultants del test d'idoneïtat (*Test Suitability*): CV Spike(%), CV mostra (%), *recovery* (%) i el valor de l'especificació d'endotoxines (EU/mL que equival a IU/mL).



**Taula 64.** Test d'endotoxines bacterianes: resultats obtinguts dels tres lots de <sup>11</sup>C-PIB.

Paràmetres	<sup>11</sup> C-PIB Dilució 1:100			
	Límits	Lot 1	Lot 2	Lot 3
- pH	6,0-8,0	6,5	6,5	6,0
- % Spike Recovery	50 - 200 %	111 %	109 %	89 %
- % CV mostra	≤ 25 %	0,0 %	0,0 %	0 %
- % CV Spike	≤ 25 %	0,0 %	9,0 %	10,3 %
- Valor de la mostra (IU/mL)	<17,5	< 5,0	< 5,0	< 5,0

**Taula 65.** Test d'endotoxines bacterianes: resultats obtinguts dels tres lots de <sup>18</sup>F-FMISO.

Paràmetres	<sup>18</sup> F-FMISO Dilució 1:100			
	Límits	Lot 1	Lot 2	Lot 3
- pH	6,0-8,0	7,9	7,6	7,7
- % Spike Recovery	50 - 200 %	130 %	101 %	92 %
- % CV mostra	≤ 25 %	0 %	0 %	0 %
- % CV Spike	≤ 25 %	1,6 %	4,0 %	1,0 %
- Valor de la mostra (IU/mL)	<17,5	< 5,0	< 5,0	< 5,0

### 5.1.6.6 Discussió

El sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> és una alternativa al mètode de referència, mètode A, i per tant cal complir amb una sèrie de requisits descrits al punt 13, *validation of alternative methods*, de la monografia de la Ph. Eur., *Guidelines for using the test for bacterial endotoxins*<sup>93</sup>. Bàsicament la monografia exigeix que es demostrï que el mètode és apropiat per al producte en estudi i que permet l'obtenció d'uns resultats consistents.

Un dels requeriments de la monografia de validació del test BET és demostrar que no existeixen factors d'interferència en almenys tres lots del producte en estudi. En el cas del sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup>, en disposar dins del test d'idoneïtat del paràmetre CV % *Spike*, es pot descartar l'existència d'interferències en la mostra. En haver superat en els tres lots de cada RF estudiat aquest test, s'ha pogut demostrar que no existeixen interferències a la mostra que no permetin la validació del test.

Un altre requeriment que contempla la monografia de validació del test BET<sup>92</sup> és que els materials i els reactius que s'utilitzen durant el test han d'estar validats. Considerant que en el cas de l'Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> tots els materials utilitzats provenen d'un proveïdor amb el corresponent certificat d'anàlisi on s'especifiquen els controls realitzats sobre cada reactiu/material i l'especificació d'absència d'endotoxines i que tots els resultats obtinguts, tant del test d'idoneïtat com d'especificació són correctes, es consideren validats els materials i reactius que s'utilitzen en el test.

En el disseny de l'estudi no es va considerar analitzar les mostres de RF mitjançant el mètode de referència recomanat per la Ph. Eur.: mètode A, i el mètode d'estudi: PTS, en paral·lel i establir una comparativa; al considerar que el sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup> mitjançant el test de d'idoneïtat, permet assegurar el correcte desenvolupament de cada test de forma individual.

Procedint a l'estudi del desenvolupament del mètode i dels resultats obtinguts en els tres lots de cada RF estudiat, s'observa que en tots els casos:

- No s'ha requerit dilució de la mostra mitjançant tampons per ajustar als requeriments de pH necessaris per a realitzar el test.
- La primera dilució definida, 1:100, va complir el test en els sis casos, sense necessitat de repetir el test utilitzant una dilució més elevada.

- El test d'idoneïtat es va complir en totes les mostres, per tant es demostra que els RFs d'estudi no interfereixen en la realització del test BET mitjançant el sistema Endofase®-PTS™.
- El valor d'especificació d'endotoxines es va complir en les 6 determinacions, essent un valor molt per sota del valor establert com a especificació (valor mostres < 5,0 IU/mL; valor especificació < 17,5 IU/mL)

Quant a la utilització del sistema Endofase®-PTS™ s'han observat una sèrie d'avantatges respecte als altres mètodes descrits a la Ph. Eur.:

- Permet obtenir un valor quantitatiu de la mostra d'estudi (IU/mL) mentre el mètode de referència és semi-quantitatiu.
- És possible obtenir el valor de la mostra en 15 minuts, mentre que amb altres mètodes de referència poden trigar fins a una hora per a obtenir el resultat. Aquest fet és un avantatge en el cas dels RFs PET, ja que permet obtenir els resultats el més ràpidament possible, complint amb els requeriments de les autoritats i, en el cas de RFs de llarga semivida, com el F-18, permet obtenir el resultat abans de la seva alliberació.
- Permet realitzar un test d'idoneïtat per a cada mostra d'estudi.

S'ha realitzat la validació en tres lots de cada RF i els resultats tant del test d'idoneïtat com del valor de la mostra han estat conformes als criteris d'acceptació definits, per tant es pot considerar validat el mètode. Aquestes validacions han estat sotmeses a l'avaluació per part de les autoritzats sanitàries i el mètode per a la realització del test BET ha estat aprovat en els dos RF d'estudi.

### 5.1.6.7 Conclusions

És possible realitzar la validació del BET usant el sistema Endofase®-PTS™ pels RFs <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO, considerant:

- L'especificació d'endotoxines per als dos RF d'estudi queda establert a < 17,5 IU/mL.
- Paràmetres de validació:
  - La màxima dilució vàlida és de 350, utilitzant cartutxos amb una sensibilitat de 0,05 IU/mL.
  - Criteris d'acceptació:
    - % *Spike Recovery*: 50 - 200 %
    - % CV Mostra ≤ 25 %
    - % CV *Spike* ≤ 25 %
  - Mètode de validació
    - Realitzar el test en tres lots per a cada RF a validar.

Queda validat el test BET mitjançant el sistema Endofase®-PTS™ pels dos RFs, <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO, a les condicions d'estudi: dilució 1:100 i cartutxos de sensibilitat 0,05 IU/mL.

### 5.1.7 Mètodes analítics validats

Tal com s'ha comentat en l'apartat: *5.1 Validació dels mètodes analítics i definició de les especificacions*, a continuació es descriuen aquells mètodes analítics que a causa de les seves característiques (senzillesa metodològica, tests validats en existir una monografia oficial) s'agrupen i es descriuen conjuntament.

Aquells mètodes analítics de les farmacopees que formen part de monografies individuals o bé aquells que estan descrits als capítols generals, són mètodes que ja han estat validats d'acord amb la normativa i recomanacions vigents. Per tant, si s'utilitzen tal i com estan descrits a la farmacopea i el text no presenta cap menció específica, es consideren mètodes analítics validats i com a tals no cal procedir a la seva validació per a ser utilitzats a la pràctica<sup>100</sup>. Aquest és el cas de la determinació de l'aspecte i del pH.

#### 5.1.7.1 Aspecte

Una de les característiques definides pels RFs PET a la monografies de la Ph. Eur. és l'aspecte: tota solució ha de ser una solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles.

Per a la determinació de l'aspecte i absència de partícules s'ha de considerar el risc a l'exposició a la radioactivitat que produeix la manipulació de radioactivitat i l'especial radiosensibilitat de l'ull<sup>64</sup>. Per tant, s'agafa com a referència la monografia de la Ph. Eur. de contaminació de partícules: partícules visibles<sup>101</sup>, i la monografia de limpidesa i degradació de l'opalescència dels líquids<sup>102</sup>, i es defineix el procediment per a la seva determinació que consisteix en utilitzar un panell la meitat negra i la meitat blanc il·luminat per una làmpada de llum blanca. A davant del panell se situa un panell protector d'acord amb el nivell de la radioactivitat a manipular. La mostra de control de qualitat dispensada dins el vial de condicionat (vial de vidre tipus I de 10 mL), es manipula darrere el panell protector amb vidre plomat. El vial de la mostra, que no pot contenir cap etiqueta a l'exterior del vidre perquè interferiria en la determinació, s'inverteix evitant que es formin bombolles i se situa sota la llum blanca 5 segons primer davant del panell blanc i posteriorment 5 segons davant del panell negre i es determina la limpidesa i l'absència de partícules. Cal tenir un vial equivalent al de la mostra on s'ha dispensat aigua per a injectables per comparar la coloració.

D'aquesta manera, es determina l'aspecte i l'absència de partícules amb la mínima manipulació de la mostra i assegurant una baixa exposició a la radiació.

### 5.1.7.2 pH

El pH és la determinació de la concentració d'hidrogenions de la solució aquosa que s'analitza. En el cas de productes injectables, la determinació del pH és necessària ja que el seu valor condiciona la tolerància fisiològica (la sang té un pH de 7,35 - 7,4) i alhora és un indicador d'impureses provinents del propi procés de fabricació o bé de productes de degradació, important en el test d'estabilitat.

El pH en el procés de producció es controla addicionant solucions tampó, per exemple en el cas de la fabricació de  $^{18}\text{F}$ -FMISO, en l'etapa de síntesi posteriorment a la hidròlisi àcida es neutralitza l'acidesa amb hidròxid sòdic (veure figura 6).

L'especificació del valor de pH pels dos RFs es determina considerant el procés de fabricació de cadascun i agafant com a referència les monografies existents de RFs. L'especificació definida pels RFs d'estudi és un valor de pH entre 4,5 i 8,5; igual que a les monografies de  $^{18}\text{F}$ -FMISO<sup>26</sup>,  $^{18}\text{F}$ -FDG<sup>41</sup>,  $^{11}\text{C}$ -Racloprida<sup>48</sup>,  $^{11}\text{C}$ -Acetat<sup>49</sup> i  $^{11}\text{C}$ -Metionina<sup>50</sup> de la Ph. Eur.

Existeixen dos possibles mètodes per procedir a la determinació de pH: la determinació potenciomètrica i la determinació colorimètrica.

#### **Determinació potenciomètrica del pH**

Aquesta metodologia es basa en la mesura de la diferència de potencial entre dos elèctrodes submergits en la solució d'anàlisi: un elèctrode és sensible als hidrogenions i l'altre és l'elèctrode de referència<sup>103</sup>.

L'equip que s'utilitza és un pHmetre Mettler Toledo S40 Seven Multi. Per procedir a l'anàlisi, diàriament es calibra l'equip amb tres solucions tampó de referència seguint l'ordre segons el pH de la solució: pH 4, 9 i 7 respectivament. El valor obtingut de l'última solució tampó, pH 7, no pot variar més de  $\pm 0,05$  unitats de pH del valor real. Un cop calibrat, es pot procedir a l'anàlisi de la mostra<sup>104,105</sup>.

Una condició important en la determinació del pH és la temperatura, ja que petites variacions de temperatura produeixen resultats diferents en el valor del pH. Aquest fet és rellevant durant la calibració de l'equip. Per tant, totes les mesures de pH s'han de realitzar a la mateixa temperatura compresa a l'interval de 20 - 25°C<sup>103</sup>.

Aquest és el mètode d'elecció ja que es tracta d'una tècnica més exacta que la determinació amb tires reactives. Per contrapartida, necessita un volum aproximat de 0,3 a 0,5 mL per poder submergir l'elèctrode en la solució de RF, per tant en casos on el volum de RF és limitant, la tècnica colorimètrica és la indicada.



### **Determinació colorimètrica del pH**

La metodologia es basa en la utilització de tires reactives de pH d'un sol ús. Aquestes tires porten fixats indicadors que canvien de color de forma gradual en funció del pH de la solució analitzada.

La tècnica consisteix a utilitzar tires reactives que permetin la determinació dels valors de pH dins l'especificació, en el cas dels dos RFs d'estudi l'interval de pH és entre 4,5 i 8,5. Amb l'ajuda d'una agulla s'humidifica una tira amb la mostra del RF a analitzar. Un cop la tira ha virat de color es compara amb la carta de colors de la tira reactiva per a determinar el valor de pH.

Es tracta d'una metodologia menys exacta que l'anterior, però presenta l'avantatge de no necessitar tant volum de mostra d'anàlisi i no cal calibrar ni mantenir un equip; pel que es converteix en una tècnica més ràpida i econòmica.

En totes les versions de la Ph. Eur. anterior a la versió 8.0, en les monografies de RF només s'indicava la determinació del pH capítol 2.2.3. que correspon a la determinació potenciomètrica del pH. Però amb la publicació de la monografia de  $^{18}\text{F}$ -FMISO<sup>26</sup>, s'introdueix per primera vegada en una monografia de RF PET la determinació mitjançant tires reactives de pH. Per tant, es tracta d'una millora en el control de qualitat dels RFs i una adaptació de la normativa a les condicions especials dels RFs PET on el volum del RF és limitant i el temps d'anàlisi és crític.

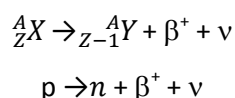
### 5.1.7.3 Puresa radionucleídica

Els RFs d'estudi estan formats pels radionúclids C-11 i F-18, que són emissors de positrons en desintegrar-se seguint les següents etapes:

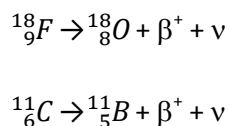
#### - Desintegració

Els radionúclids que són "deficients en neutrons" o "rics en protons", és a dir, que tenen una ratio  $N/Z^{xxv}$  menor que el nucli estable, com és el cas dels radionúclids d'interès C-11 o F-18, s'estabilitzen per desintegració  $\beta^+$ , que consisteix en l'emissió d'un positró ( $\beta^+$  o  ${}^0_1\beta$ ) i un neutrí ( $\nu$ ). En la desintegració  $\beta^+$  un protó ( $p$ ) es transforma en un neutró ( $n$ ) emetent un positró ( $\beta^+$ ) i un neutrí ( $\nu$ ). D'aquesta desintegració es genera un nucli fill més estable que té un protó menys que el nucli pare. A causa de la doble emissió del positró i del neutrí que coincideix en el temps, fa que l'energia del positró sigui variable, és a dir, que tingui un valor màxim i valor mínim que és característic per a cada radionúclid<sup>64,65</sup> (equació 8 i 9).

**Equació 8.** Esquema de la desintegració  $\beta^+$ , on un protó es transforma en un positró i un neutrí, el nucli inestable es transforma en un nucli fill més estable que té un protó menys que el pare.



**Equació 9.** Desintegració dels radionúclids d'interès. Seguint l'esquema de la desintegració  $\beta^+$ , F-18 i C-11 que són nuclis inestables es transformen en el respectiu nucli fill O-18 i B-11.



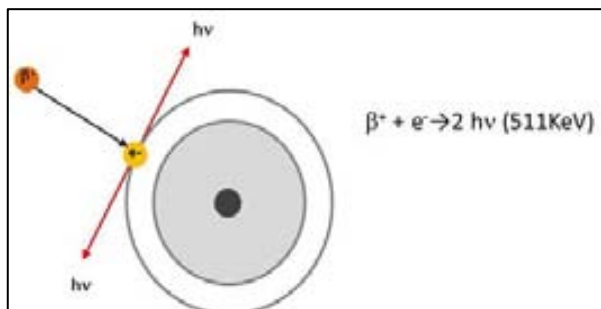
#### - Aniquilació

El positró ( $\beta^+$ ) emès en l'etapa de desintegració recorre una distància, que és major quan major és l'energia d'emissió del mateix positró, abans de xocar amb un electró i produir-se l'aniquilació. La distància recorreguda pel positró és de l'ordre de mm i succeeix en un temps molt curt,  $10^{-9}$  segons aproximadament<sup>2</sup>. En aquesta etapa la massa de les dues

<sup>xxv</sup> N= nombre de neutrons, Z=número atòmic=nombre de protons, A=número màssic= suma protons més els neutrons.

partícules es transforma en energia en forma de dos fotons de 511 KeV cadascun. Aquests fotons són emesos simultàniament i en sentit oposat<sup>64,65</sup>.

**Figura 37.** Esquema de l'anihilació del positró provinent de la desintegració ( $\beta^+$ ). El positró recorre una distància fins a xocar amb un electró emetent simultàniament dos fotons de 511 KeV, que surten en direccions oposades.



S'ha de considerar també que l'activitat d'aquests nuclis inestables o radionúclids disminueix amb els temps seguint una equació exponencial que es coneix com a desintegració de l'activitat (equació 10).

**Equació 10.** Equació de desintegració: l'activitat disminueix amb el temps seguint una equació exponencial que depèn de la constant de desintegració ( $\lambda$ ) característica de cada radionúclid. En l'equació:  $A_t$  és l'activitat a temps  $t$ ,  $A_0$  és l'activitat inicial ( $t=0$ ).

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

Un paràmetre característic de cada radionúclid és el període de semidesintegració o semivida ( $t_{1/2}$ ), que es defineix com el temps necessari per reduir a la meitat l'activitat inicial. Aquest paràmetre està relacionat amb la constant de desintegració seguint la següent equació 11<sup>65,106</sup>.

**Equació 11.** Equació que relaciona el període de semidesintegració o semivida ( $t_{1/2}$ ) amb la constant de desintegració ( $\lambda$ ), ambdós característics de cada radionúclid.

$$A_{t_{1/2}} = \frac{A_0}{2} ; t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Per tant, un radionúclid s'identifica per la naturalesa i/o energia de la seva radiació i per la seva semivida. La identificació del radionúclid i el percentatge que representa de l'activitat total en el producte final obtingut de la síntesi, formen part dels tests d'identificació i de la determinació de la puresa radionucleídica (PRN) a determinar en els RFs PET i, per tant, en els RFs d'estudi.

S'entén com a PRN d'una preparació radiofarmacèutica, la relació, expressada en percentatge, entre la radioactivitat provinent del radionúclid d'interès respecte al total de la radioactivitat de la preparació radiofarmacèutica<sup>36</sup>, essent el radionúclid d'interès per al <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO, el C-11 i el F-18, respectivament.

Respecte a la identificació, els valors dels paràmetres d'identificació de cada radionúclid venen especificats a l'apartat 5.7 de la Ph. Eur., a la taula de les característiques físiques dels radionúclids (taula 66)<sup>107</sup>.

**Taula 66.** Puresa radionucleídica: taula de les característiques físiques dels radionúclids que formen part dels RFs d'estudi (C-11 i F-18)<sup>107</sup>.

Radionúclid	Semi-vida	Emissió electrònica			Emissió fotònica		
	(min)	Tipus	Energia (MeV)	Probabilitat d'emissió*	Tipus	Energia (MeV)	Probabilitat d'emissió*
Carboni-11	20,385	β <sup>+</sup>	0,386 <sup>(I)</sup> (max:0,960)	99,8	γ	0,511	199,5 <sup>(II)</sup>
Flúor-18	109,77	β <sup>+</sup>	0,250 <sup>(I)</sup> (max:0,633)	96,7	γ	0,511	193,5 <sup>(II)</sup>

\* per 100 desintegracions; (I) Energia mitjana en l'espectre β; (II) Probabilitat màxima d'emissió corresponent a l'aniquilació total en la font per 100 desintegracions.

Per definir l'especificació de PRN i la identificació radionucleídica de les preparacions radiofarmacèutiques d'estudi, es realitza una revisió per separat de les monografies publicades de RFs marcats amb C-11 i de RF marcats amb F-18<sup>45-50</sup>. A la taula 67 s'adjunta un resum de les especificacions.

**Taula 67.** Puresa radionucleídica: a la taula s'adjunten les especificacions definides per al test de puresa radionucleídica i identificació radionucleídica dels RFs d'estudi.

Test	<sup>11</sup> C-PIB	<sup>18</sup> F-FMISO
<b>Test PRNA (Identificació A)</b>	Espectrometria gamma: Un únic pic de 0,511MeV corresponent a l'emissió de fotons gamma per aniquilació dels positrons (1,022 MeV pic sumatori)*	Espectrometria gamma: Un únic pic de 0,511MeV corresponent a l'emissió de fotons gamma per aniquilació dels positrons (1,022 MeV pic sumatori)*
<b>Test PRNB (Identificació B)</b>	Determinació de la semivida: 19,9 min - 20,9 min	Determinació de la semivida: 105 min - 115 min

\*Pic sumatori derivat de la detecció simultàniament de fotons d'energia de 511 KeV cadascun.

Tal com s'ha comentat en altres tests que formen part del control de qualitat dels RFs PET, com l'esterilitat (*apartat 5.1.5*) i endotoxines (*apartat 5.1.6*), a causa de la curta semivida dels radionúclids dels RFs d'estudi, tant les NCF en l'annex 3 de RFs<sup>29</sup>, com la monografia de preparacions radiofarmacèutiques de la Ph. Eur.<sup>36</sup>, permeten l'alliberació del lot de RF sense haver finalitzat els test de PRN sempre que el procés estigui controlat, és a dir, que estiguin procedimentades les diferents fases d'anàlisi i tenint definides les responsabilitats en cadascuna de les fases.

La metodologia utilitzada per a la determinació dels diferents tests de la PRN es descriu a continuació.

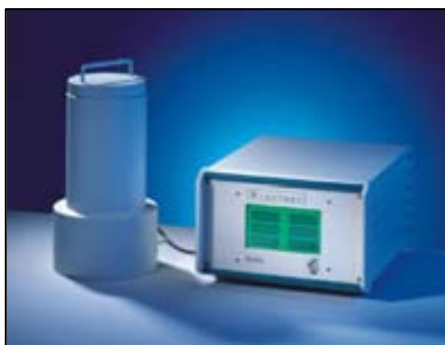
### **Test de puresa radionucleídica A**

Els radionúclids es poden identificar pel seu espectre d'emissió. Cada tipus d'emissió (partícules alfa, beta, electrons, radiació gamma i X) requereix d'un equip específic per poder adquirir l'espectre.

En el cas dels RFs PET, s'utilitza l'espectrometria de radiació gamma per tal de detectar l'energia de 511 KeV emesa pels fotons resultants de la fase d'aniquilació, característics de la desintegració  $\beta^+$ . Es poden utilitzar equips amb dos tipus de detectors: detector de centelleig i detector semiconductor. En ambdós casos de l'absorció de radiació gamma i X en resulta un impuls elèctric que l'amplitud de la qual és proporcional a l'energia de la radiació absorbida<sup>106</sup>.

L'equip utilitzat per a la determinació de la puresa radionucleídica A (PRNA) dels dos RFs és un espectròmetre multicanal Mucha (figura 38), que consisteix en un detector de centelleig de iodur sòdic, NaI (TI), situat l'interior d'un blindatge de plom de 50 mm d'espessor, que està connectat mitjançant un cable blindat a la unitat de mesura.

**Figura 38.** Imatge d'un espectròmetre multicanal Mucha. Parts de l'equip: detector de centelleig de iodur sòdic, NaI (TI), situat l'interior d'un blindatge de plom de 50 mm d'espessor, que està connectat mitjançant un cable blindat a la unitat de mesura.



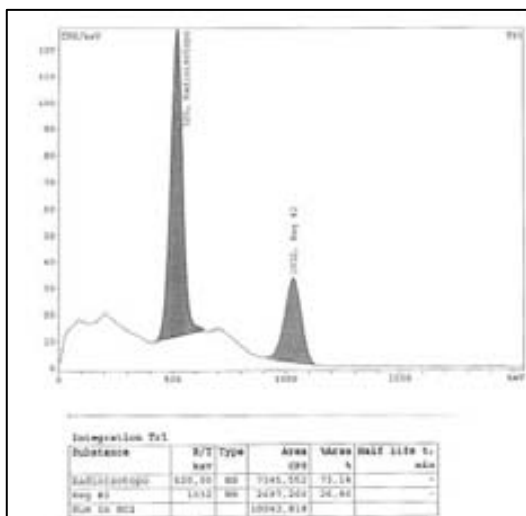
– Metodologia

Es realitza un *background* o mesura del fons com a punt zero de l'equip. Posteriorment es calibra amb una font homologada de Cesi-137. A continuació s'introdueix una mostra en un vial de 2 mL diluïda per obtenir entre 1.000 i 5.000 comptes, en cas de no aconseguir el nombre de comptes desitjats cal ajustar la dilució. Posteriorment es pot procedir a l'adquisició (temps aproximat 1 minut). Un cop finalitzada, s'integra l'àrea obtinguda i s'obté l'energia gamma.

– Especificació

Existeix un únic pic situat a 511 KeV ( $\pm 25$  KeV)<sup>108</sup> corresponent a l'emissió de fotons gamma a causa de l'anihilació de positrons, que depenent de la geometria de la mesura també es pot observar el pic sumatori de 1.022 KeV<sup>108</sup> (Figura 39).

**Figura 39.** Espectre obtingut d'una mostra de <sup>18</sup>F-FMISO, on es pot observar el pic situat a 520 KeV que correspon a l'emissió de fotons gamma a causa de l'anihilació de positrons (511 KeV  $\pm$  25 KeV). També s'observa el pic sumatori de la detecció simultània dels dos fotons que surten en direccions oposades.



– Observacions

El mètode i les especificacions varen ser definits amb anterioritat a la publicació de l'edició 8.0 de la Ph. Eur., on s'ha editat una nova monografia titulada detecció i mesura de la radioactivitat, 2.2.66. *Detection and measurement of radioactivity* (01/2014:20266)<sup>106</sup>, que per primera vegada descriu com procedir a la mesura de la radioactivitat. Aquesta monografia conté un apartat que fa referència a la determinació mitjançant espectrometria de radiació gamma. Tota la metodologia: determinació de la radiació de fons, calibració amb una font homologada de Cesi-137 i determinació de la

mostra, segueix la monografia. Però aquesta monografia per primera vegada proporciona un criteri d'acceptació per a la PRNA. Primer de tot considera que cal fer una anàlisi de risc on s'estudii la possible presència d'impureses radionucleídiques que l'energia fotònica de les quals estigui entre el  $\pm 10\%$  de l'energia fotònica del radionúclid d'interès a la mostra d'anàlisi. En funció del risc, estableix un interval d'acceptació de l'energia del pic:

- Si la mostra pot contenir aquestes impureses, l'energia del pic determinada ha d'estar compresa dins l'interval de  $\pm 2\text{ KeV}$  o  $\pm 2\%$  (escollir el valor major).
- Si es descarta el risc que la mostra contingui aquests tipus d'impureses, l'energia del pic determinada ha d'estar compresa dins d'un interval més ampli, entre  $\pm 10\text{ KeV}$  o  $\pm 6\%$  (escollir el valor major).

Per tant, a continuació es procedeix a estudiar el risc per a cada radionúclid per observar si l'interval definit compleix la nova monografia.

- Carboni-11

En el cas del C-11, l'origen de les impureses radionucleídiques prové del procés de producció del radionúclid en el ciclotró, per tant cal estudiar aquesta etapa.

Tal com s'ha comentat en l'apartat 4.6.1.1. *Generació de  $^{11}\text{C-CO}_2$* , el C-11 es genera de la reacció nuclear [ $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ ] en un ciclotró model Cyclone 18/9 (IBA), bombardejant una mescla gasosa de  $\text{N}_2 / 0.5\% \text{ O}_2$  durant 45-60 minuts amb una intensitat en el blanc de  $28\ \mu\text{A/h}$  obtenint-se finalment l'espècie  $^{11}\text{C-CO}_2$ .

Les possibles impureses que es generen provinents del bombardeig principalment són metàl·liques i queden integrades com a part metàl·lica del blanc, essent molt baixa la probabilitat que es desprenguin i passin a formar part del producte final. En el cas que es desprengui una partícula d'alumini procedent del cos del blanc o de la finestra, i que aquesta partícula contingui adherida alguna d'aquestes impureses, cal tenir en compte que es tracta d'un blanc on la mescla bombardejada és un gas, per tant aquesta partícula no podria ser arrossegada cap al mòdul de fabricació, a diferència dels blancs líquids. I si per algun motiu s'arribés a produir, existeix posteriorment un altre filtre que és la trampa de metà empaquetada amb Carbosphere 60/80, que és un absorbent. Així que es descarta la possibilitat que impureses provinents del blanc puguin formar part del producte final<sup>37</sup>.

- F-18

En el cas del F-18, també es troba l'origen de les impureses en l'etapa de producció del radionúclid en el ciclotró.

Així que tal com s'ha comentat en l'apartat 4.6.2.1 *Generació i concentració d'ió fluorur ( $^{18}\text{F}^-$ )*, el  $^{18}\text{F}^-$  es genera de la reacció nuclear [ $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ ] en un ciclotró model Cyclone 18/9 (IBA), bombardejant aigua enriquida amb Oxigen-18 amb una intensitat ( $\mu\text{A}$ ) depenent de la mida del blanc que s'utilitzi, essent el blanc de niobi.

Les possibles impureses que es generen del bombardeig principalment són metàl·liques i queden integrades com a part metàl·lica del blanc. Si s'allibera alguna impuresa posteriorment a l'etapa de transferència del fluorur generat al mòdul de síntesi, quedarien atrapades al cartutx d'intercanvi aniònic (QMA). Cal mencionar que l'aigua enriquida no és reciclada, i prové d'un proveïdor validat. Així que també en el cas del F-18 es descarta la possibilitat que impureses provinents del blanc puguin formar part del producte final<sup>38</sup>.

En no haver-hi risc de presència d'impureses radionuclídiques en el producte final en cap dels dos casos, seguint la nova monografia de la Ph. Eur. (01/2014:20266)<sup>106</sup>, l'especificació a complir és l'interval més ampli: entre  $\pm 10$  KeV o  $\pm 6$  % (escollir el valor major). Per tant, l'especificació definida compleix amb el criteri del 6 % definit per la nova monografia.

### **Test de puresa radionuclídica B**

En el test de Puresa radionuclídica B (PRNB) es determina la semivida que és una característica de cada radionúclid i s'utilitza per a la seva identificació<sup>106</sup>. Aquest paràmetre es calcula mesurant la variació de la radioactivitat d'una mostra de RF en funció del temps mitjançant un instrument calibrat.

- Metodologia

S'utilitza la mostra i el mateix equip utilitzat per a calcular la CR, un activímetre model CRC-15PET de Capintec.

Es van agafant mesures en el temps segons el radionúclid d'estudi registrant l'hora i l'activitat<sup>106</sup>:

- F-18: 1 mesura cada 15 minuts, 9 mesures en total (135 min).
- C-11: 1 mesura cada 5 minuts, 5 mesures en total (25 min).

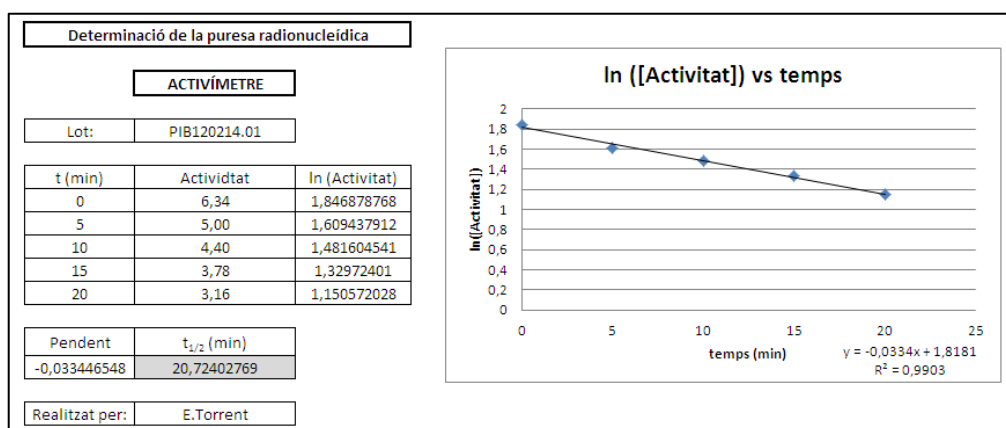


Posteriorment es calcula la semivida: amb les dades obtingudes es dibuixa una gràfica on les abscisses representen el temps i l'ordenada el logaritme de l'activitat mesurada (Figura 40). Del pendent de la recta, segons equació 12, es pot calcular la semivida ( $t_{1/2}$ ).

**Equació 12.** Equació per a calcular la semivida. Substituint a l'equació 11 l'equació 10, s'obté l'equació de la recta d'on es pot extrapolar la semivida.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \ln 2 \times \frac{t_x - t_0}{\ln A_0 - \ln A_{t_x}}$$

**Figura 40.** Operacions per al càlcul de la semivida: gràfica i extrapolació mitjançant l'aplicació de l'equació 12.



- Especificació
  - Determinació de la semivida C-11 : 19,9 min - 20,9 min.
  - Determinació de la semivida F-18: 105 min - 115 min.

- Observacions

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, amb la publicació de la nova monografia de la Ph. Eur. (01/2014:20266)<sup>106</sup> detecció i mesura de la radioactivitat de la de la Ph. Eur. edició 8.0, també es troba establert com procedir a la determinació de la semivida. La Ph. Eur. descriu que en el cas de radionúclids de curta semivida, com és el cas del C-11 i F-18, procedir a la determinació de la semivida aproximada forma part de la identificació del radionúclid. El procediment a seguir per determinar la semivida aproximada és:

- S'utilitza un aparell calibrat que permeti determinar l'activitat i la seva variació en el temps dins de la seva linealitat.
- Es realitzen com a mínim 3 mesures d'activitat de la mostra intercalades amb una periodicitat de com a mínim un quart de la semivida del radionúclid a determinar.
- S'utilitza la mateixa geometria de la mostra en l'equip per a les diferents mesures.

En el cas de la metodologia aplicada, s'observa que compleix allò que s'esmenta en la nova monografia:

- S'ha utilitzat un activímetre calibrat diàriament amb una font de Cesi i subjecte a calibracions i manteniment periòdic.
- S'han realitzat més de 3 mesures per a cada radionúclid en períodes que són iguals o inferiors a un quart de la semivida del radionúclid:
  - C-11: 1 mesura cada 5 minuts, total 5 mesures ( $t_{1/2} = 19,9 \text{ min} - 20,9 \text{ min}$ ).
  - F-18: 1 mesura cada 15 minuts, total 9 mesures ( $t_{1/2} = 105 \text{ min} - 115 \text{ min}$ ).
- La mostra s'ha deixat a l'interior de l'activímetre i s'han agafat les mesures al llarg del temps, per tant, es manté la mateixa geometria dins l'equip.

A la nova edició 8.0 de la Ph. Eur. també existeixen revisions de monografies de RFs PET que afegeixen com a requisit per a realitzar el test de PRNB de RFs marcats amb F-18 la determinació de la quantitat de F-18 i de les impureses de semivida superior a 2h. Per tal de procedir a aquesta determinació, les monografies de  $^{18}\text{F-FMISO}^{26}$ ,  $^{18}\text{F-FDG}^{41}$ ,  $^{18}\text{F-Alovudine}^{109}$  citen que s'ha de deixar decaure una mostra de RF fins que el F-18 hagi decaigut (aproximadament 24h), de tal manera que permeti la detecció d'impureses. Mitjançant un espectròmetre de radiació gamma es determina que la radiació deguda a les impureses no representa més del 0,1 %. Per contra la monografia de Fludopa<sup>110</sup> descriu el mateix procediment sense limitar a 24h el temps de *decay* de la mostra, i com a resultat es compara l'espectre obtingut amb el *background*. El criteri d'acceptació és que no difereixin significativament. Al ser un test introduït l'any 2014 i considerant que la fase experimental va ser desenvolupada durant el període 2009 - 2012 en laboratori farmacèutic CRC-Centre d'Imatge Molecular que es troba sense activitat des de l'any 2013, aquest nou requeriment no ha estat realitzat. Així que es recomana la seva realització seguint el procediment descrit.

### 5.1.7.4 PQ: Residus metàl·lics

#### Introducció

Alguns metalls s'utilitzen, sols o combinats, com a catalitzadors de reaccions químiques, és a dir, com a substàncies que s'addicionen a les etapes de producció per tal de canviar la velocitat de les reaccions. Això fa que puguin quedar com a residus en les preparacions farmacèutiques sense aportar un efecte terapèutic beneficiós per al pacient<sup>111</sup>. Per tant, es fa necessari avaluar el risc en qualitat i seguretat de la presència d'aquests compostos en el producte final.

La guia de l'EMA sobre les especificacions per als residus de metàl·lics catalítics o dels reactius metàl·lics (*Guideline on the specification for residues of metal catalysts or metal reagent*)<sup>111</sup>, descriu els límits a aplicar pels residus metàl·lics en funció del risc que cadascun suposa. Pel fet que els metalls presenten diferent biodisponibilitat a dosis orals, la guia adjudica diferents límits en funció de la via d'administració: oral o parenteral.

Primerament la guia classifica els metalls en tres categories considerant el risc potencial sobre la salut humana<sup>111</sup>:

- Classe 1: Metalls que suposen un risc de seguretat significatiu  
Aquest grup inclou metalls dels quals es coneix o se sospita que són carcinògens o que poden ser agents que causen altres toxicitats.
- Classe 2: Metalls que suposen un baix risc de seguretat  
Aquest grup inclou metalls que tenen associada una baixa toxicitat. Generalment presenten una bona tolerància a l'exposició de dosis que formen part dels medicaments. Poden ser metalls requerits com a nutrients o aquells que trobem als aliments o en els complements nutricionals.
- Classe 3: Metalls que suposen un mínim risc de seguretat  
Aquest grup inclou metalls que no presenten toxicitat. El seu perfil de seguretat està ben establert. Generalment presenten bona tolerància a l'exposició de dosis que sobrepassen els nivells que es troben amb l'administració de medicaments. S'acostumen a trobar a l'ambient o en el regne animal o vegetal.

Una vegada classificats els metalls, la guia estableix uns límits de seguretat en unitats de concentració per a cada metall en funció de la seva PDE<sup>xxvi</sup> (taula 68).

**Taula 68.** Límits d'exposició dels metalls en la substància activa en funció de la seva classificació segons la guia de l'EMA, *Guideline on the specification for residues of metal catalysts or metal reagent*<sup>111</sup>, i considerant la via d'administració parenteral.

Classificació	Metall	Exposició parenteral	
		PDE (µg/dia)	Concentració (ppm)
Classe 1A:	Pt, Pd	10	1
Classe 1B:	Ir, Rh, Ru, Os	10	1*
Classe 1C:	Mo, Ni, Cr, V	25	2,5
Classe 2:	Cu, Mn	250	25
Classe 3:	Fe, Zn	1300	130

\* Límit de la subclasse: La suma total dels metalls llistats no pot superar la concentració límit.

Com els residus metàl·lics provenen de la síntesi de la substància activa, es poden substituir els límits dels metalls en la substància activa pels límits en el producte final.

Segons la guia de l'EMA<sup>111</sup> hi ha diferents maneres de realitzar-ho:

- **Opció 1:** Per a cada metall s'estableix el límit de la taula 68, que ha estat calculat segons l'equació 13 considerant la PDE de cada classe de metall i assumint una dosi diària de 10 g/dia.

**Equació 13.** Equació que estableix la concentració límit per a cada metall en la substància activa en funció de la seva PDE i assumint una dosi diària de la preparació farmacèutica final de 10 g/dia.

$$\text{Concentració (ppm)} = \frac{\text{PDE } (\mu\text{g/dia})}{\text{dosi diària (g/dia)}}$$

Si totes les substàncies actives que formen part de la preparació farmacèutica final compleixen el límit anterior, es poden usar en la producció sempre que la dosi del medicament no superi els 10 g/dia. En cas que se superi, cal aplicar l'opció 2.

<sup>xxvi</sup> Des d'un punt de vista farmacèutic la PDE es defineix com l'exposició crònica màxima acceptable a un metall que és improbable que produeixi un efecte advers.

- Opció 2:

Per a calcular el límit de cada metall en la substància activa, s'utilitza l'equació 13 on s'aplica la PDE corresponent al metall i la dosi diària de la substància activa en el producte final.

- Alternativa a l'opció 1 i 2.

Es calcula el límit de cada metall provinent de qualsevol de les substàncies actives en el producte final, utilitzant la PDE i la dosi màxima coneguda del producte final. Aquesta opció es pot usar sempre que es demostrï que els residus metàl·lics han estat reduïts pràcticament al mínim en cada substància. Aquesta opció implica que per a certs metalls es poden permetre nivells superiors per substància activa que els permesos en les altres dues opcions, però queden compensats pels mínims nivells en altres substàncies actives de la fórmula del producte final.

Respecte als mètodes analítics per determinar els residus metàl·lics, cal utilitzar mètodes validats i específics per a cada metall.

Quan hi ha l'evidència que en un procés sintètic se'n poden obtenir residus metàl·lics en el producte final, cal que els metalls siguin analitzats i formin part de l'especificació del producte final. Això fa que la determinació de metalls sigui un punt important a considerar en el desenvolupament d'un medicament.

Per altra banda cal considerar que la guia de l'EMA permet passar els tests de residus metàl·lics com a no rutinaris, si es pot demostrar que el procés de producció elimina els metalls de les substàncies actives. Cal demostrar-ho en sis lots pilots consecutius o bé en tres lots fabricats a escala comercial complint amb el requeriment que el contingut final en metalls sigui menor al 30 % del límit establert. En aquest cas la determinació de metalls podrà passar de control rutinari per a cada lot a control no rutinari, però no es podrà mai eliminar la seva determinació. Només en el cas dels metalls de classe 3 podran eliminar-se de les especificacions si es demostra que es garanteix l'eliminació del residu metàl·lic en el producte final<sup>111</sup>.

En el cas dels RFs ens trobem amb una diferència respecte al text de la guia que aplica als medicaments convencionals. Els metalls en el producte final d'un RF poden provenir tant de les substàncies actives de la fórmula de fabricació com del propi procés de producció del RF, ja que aquest procés implica la síntesi del principi actiu a partir del PRad i PR no radioactiu. En aquest procés es pot requerir l'addició de metalls catalítics i aquests poden passar a formar part del producte final. Per tant, cal estudiar tant els residus metàl·lics de la substància activa que

participen en la síntesi del RF, com és el cas del PR de síntesi, com aquells metalls que participen en la síntesi del producte final. Alhora, a causa del poc volum final que es té de cada RF (15 mL), seria interessant poder justificar una reducció del control de metalls i passar-lo a fer com a no rutinari.

En el cas dels RFs d'estudi s'ha extrapolat tot allò que refereix la guia a les substàncies actives als metalls que participen en la síntesi del producte final, per tant s'ha aplicat la mateixa taula de límits en funció de la PDE.

Per poder conèixer els metalls que s'han de determinar en els RFs d'estudi cal estudiar el procés de síntesi i/o certificat de substàncies actives i el procés de síntesi del RF.

– <sup>11</sup>C-PIB

De la fórmula de fabricació del <sup>11</sup>C-PIB, la substància activa per a la síntesi de la qual s'utilitzen metalls és el PR-PIB. Avaluant el Dossier del CMC del PR-PIB (Dossier sobre les propietats químiques, procés de producció i control: *Chemistry, Manufacturing and Control*)<sup>112</sup>, observem que per a la seva síntesi s'utilitza com a metalls catalitzadors l'acetat de pal·ladi (II) i el iodur de coure (I), essent l'especificació en la substància activa de ≤ 100 ppm per a cadascun dels metalls.

Quant al procés de síntesi del RF, tal com està descrit en el capítol de síntesi de <sup>11</sup>C-PIB, concretament en el punt 4.6.1.2 *Generació de <sup>11</sup>C-CH<sub>4</sub>*, s'utilitza una columna d'acer inoxidable emplenada de tamís molecular i níquel per tal de concentrar el gas <sup>11</sup>C-CO<sub>2</sub> provinent del ciclotró i reduir-lo a <sup>11</sup>C-CH<sub>4</sub>. Per tant, cal determinar níquel en el producte final.

Per establir els límits de cada metall en el producte final, s'aplica l'equació 13 considerant la PDE corresponent a cada metall i la dosi màxima de producte final que és de 10 g/dia<sup>xxvii</sup>, quedant els límits segons la taula 69. També es calcula el 30 % del límit de cada metall per poder valorar si el producte final compleix aquesta especificació i per tant poder justificar el fet de realitzar un control reduït i no en cada lot de producte.

---

<sup>xxvii</sup> El volum màxim a injectar és de 10 mL per transformar-ho a grams s'assumeix l'equivalència 1 g = 1 mL.

**Taula 69.** Límits dels metalls presents al producte final  $^{11}\text{C}$ -PIB. A la taula s'observa la classificació de cada metall i la PDE segons la guia de l'EMA, *Guideline on the specification for residues of metal catalysts or metal reagents*<sup>111</sup> i el càlcul del límit en el producte final segons l'equació 13 considerant que la dosi màxima de producte final és de 10 g/dia. Es calcula també el 30 % del límit per a cada metall.

Metall	Classe	PDE	Límit EMA	Límit 30 % EMA
Pal·ladi	1A	10	1 ppm	0,3 ppm
Níquel	1C	25	2,5 ppm	0,75 ppm
Coure	2	250	25 ppm	7,5 ppm

PDE: exposició diària permesa.

–  $^{18}\text{F}$ -FMISO

Quant a la fórmula de fabricació del  $^{18}\text{F}$ -FMISO s'observa, consultant el CMC<sup>113</sup> de la substància activa, PR-FMISO, que per a la seva síntesi no s'utilitza cap metall.

Pel que fa al procés de síntesi del RF, tal com està descrit en l'apartat 4.6.2 *Síntesi de  $^{18}\text{F}$ -FMISO*, no s'utilitza cap metall catalític per a la seva síntesi.

Per tant per aquest RF queda exclòs el control de metalls tant en les substàncies actives com en el producte final.

Per a la determinació de metalls se segueix la següent metodologia.

### **Metodologia**

Es realitzen tres produccions de  $^{11}\text{C}$ -PIB, generalment es poden aprofitar els tres lots de validació ja que es necessitarà un total de tres mostres de tres lots diferents de cada RF i cal que siguin lots equivalents a les produccions rutinàries si es vol justificar un control reduït.

De cada síntesi s'agafa una mostra d'aproximadament de 1,5 mL del producte.

Com que no es disposa d'equip per a la determinació de metalls, el test de metalls es realitza en una instal·lació externa a la instal·lació radioactiva PET on es produeixen els RFs, que no disposa de permís d'instal·lació radioactiva. Per tant segueix el mateix criteri per a l'enviament de la mostra al laboratori extern descrit a l'apartat 5.1.5 *Esterilitat*. El transport del producte es realitzarà quan la mostra a analitzar sigui classificada com a no radioactiva. Es considera una mostra de radioisòtops C-11 i F-18 desclassificada com a material radioactiu quan la mostra contingui  $< 10 \text{ Bq/g}$  (Orden ECO 1449/2003<sup>87</sup>).

El mètode que el laboratori extern utilitza per a la determinació dels metalls és ICP-MS (Espectroscopia de masses amb plasma acoblat inductivament)<sup>114</sup> dissolent prèviament la mostra en medi àcid i seguint la monografia 2.4.20. Determinació dels metalls catalítics o residus metàl·lics (04/2013:20420)<sup>115</sup>.

### **Resultats**

A continuació s'adjunten els resultats de la determinació dels metalls en els tres lots de validació de <sup>11</sup>C-PIB.

**Taula 70.** Resultats de la determinació de metalls dels tres lots de validació del RF <sup>11</sup>C-PIB. A la taula s'indica el valor obtingut de cada metall per a cada lot analitzat i els límits de la guia de l'EMA<sup>111</sup> i el límit del 30 % per justificar el control reduït.

<b>Metall</b>	<b>Lot 1</b>	<b>Lot 2</b>	<b>Lot 3</b>	<b>Límit EMA</b>	<b>Límit 30% EMA</b>
Pal·ladi	< 0,3 ppm	< 0,3 ppm	< 0,3 ppm	1 ppm	0,3 ppm
Níquel	< 0,3 ppm	< 0,3 ppm	< 0,3 ppm	2,5 ppm	0,75 ppm
Coure	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm	25 ppm	7,5 ppm

### **Conclusió**

Els resultats de cadascun dels metalls en els tres lots de validació de <sup>11</sup>C-PIB són menors al límit del 30 % dels límits calculats per a cada metall segons la guia de l'EMA, per tant amb els resultats obtinguts no només s'assegura que el mètode de síntesi no deixa residus de metalls majors als permesos en el producte final, sinó que també permet justificar un control reduït. Al tenir metalls de classe 1 i 2, no es pot eliminar el control però si que es pot reduir en base als resultats obtinguts. Per tant, el control dels metalls no es realitzarà per a cada lot de RF sinó que passarà a ser una especificació del producte que es durà a terme semestralment tal com es fa amb la càrrega microbiana, veure apartat 5.1.7.5 Càrrega microbiana.



### 5.1.7.5 Càrrega microbiana (Bioburden)

Tal com s'ha comentat en l'apartat 5.1.5 *Esterilitat*, els RFs d'estudi són medicaments d'administració parenteral que es produeixen seguint un procés asèptic i s'esterilitzen per doble filtració. Per tant, el procés de fabricació és molt crític des d'un punt de vista microbiològic. A més, cal sumar-hi el concepte introduït d'esterilitat com a la probabilitat que existeixi una unitat no estèril en un lot de producte. Per tant, la probabilitat d'obtenir un producte estèril al final de l'esterilització, dependrà també del nombre, tipus i resistència dels microorganismes presents en el producte abans del procés d'esterilització<sup>83</sup>.

Per aquest motiu existeix el test de càrrega microbiana (*bioburden*), que és un assaig que forma part de la monitorització en procés que s'utilitza per estimar el nombre total de microorganismes presents en una mostra abans de la seva esterilització<sup>116</sup>.

Les NCF en el capítol de producció<sup>117</sup> puntualitzen que en totes les fases de producció d'un medicament s'ha de protegir tant el producte com el material de la contaminació microbiana i, específicament en l'annex 1 de fabricació de medicaments estèrils<sup>30</sup>, cita que la càrrega microbiana ha de ser controlada abans de l'esterilització, que s'han de definir límits en funció del mètode d'esterilització i que aquest test s'ha de determinar per a cada lot de producte.

Considerant els RFs com a medicaments estèrils cal realitzar el test de la càrrega microbiana. Aquest test es realitza seguint la monografia de la Ph. Eur. Avaluació microbiològica de productes no estèrils: test de recompte microbiològic 07/2010:20612 "*Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests*"<sup>118</sup> que descriu dues metodologies validades: filtració esterilitzant o recompte en placa. Els dos mètodes són de farmacopea per tant es poden aplicar i seguir segons monografia.

Quant a l'especificació, ni la monografia de la Ph. Eur.<sup>118</sup> ni les NCF en l'annex 1<sup>30</sup> especifiquen un valor de microorganismes límit a complir, només comenten que cal tenir uns límits definits en funció del mètode esterilitzant que s'utilitza. Per establir-lo se segueix el que s'ha descrit en la guia de l'EMA nota de la guia de la producció de formes farmacèutiques finals (*note for guidance on manufacture of the finished dosage form*)<sup>116,119</sup> on s'especifica que per a l'esterilització per filtració en molts casos un límit no superior de 10 ufc/100 mL es considera acceptable, depenent del volum i del diàmetre del filtre. En el cas que no s'aconsegueixi aquest criteri cal utilitzar un pre-filtre per aconseguir reduir-lo. Per tant, es considera aplicar aquest límit com a especificació de la càrrega microbiana pels dos RFs d'estudi. Cal considerar que en els dos casos s'utilitza doble filtració esterilitzant, és a dir, dos filtres esterilitzants acoblats en sèrie de grandària de porus de 0,22 µm que permet l'esterilització.

La problemàtica associada al test de càrrega microbiana és la pròpia determinació en els RFs d'estudi ja que tenen un volum final molt petit, de 15 mL, comparat amb els medicaments convencionals. Pel test de càrrega microbiana és necessita un volum aproximat de 6 mL. Per tant, complir amb l'annex 1 de fabricació de medicaments estèrils<sup>30</sup> que cita que s'ha de realitzar el test per a cada lot produït, no és viable ja que no es disposa de suficient volum de producte final per a realitzar el control de qualitat i dispensar la dosi del pacient. Si es consulta l'annex 3 de RFs<sup>29</sup> i les monografies de RFs de la Ph. Eur., cap d'aquests texts menciona el test de la càrrega microbiana. Davant d'aquesta incongruència, per a cada RF primer es realitza el test de càrrega microbiana en els tres lots de validació i després, en funció dels resultats, s'estableix la periodicitat del test.

### **Metodologia**

Es realitzen tres produccions de cada RF, generalment es poden aprofitar els tres lots de validació ja que es necessita un total de tres mostres de tres lots diferents de cada RF.

En cada síntesi s'agafa una mostra d'aproximadament 6 mL del producte abans de filtrar.

El test de la càrrega microbiana, igual que el test d'esterilitat, es realitza en una instal·lació externa a la instal·lació on es produeixen els RF, que no disposa de permís d'instal·lació radioactiva. Per tant, se segueix el mateix criteri per a l'enviament de la mostra al laboratori extern. El transport del producte es realitzarà quan la mostra a analitzar sigui classificada com a no radioactiva. Es considera una mostra de radioisòtops C-11 i F-18 desclassificada com a material radioactiu quan la mostra contingui < 10 Bq/g (Orden ECO 1449/2003<sup>87</sup>). A diferència del test d'esterilitat (*apartat 5.1.5*), com que la mostra del producte no és estèril es conserva en refrigeració controlada (2-8°C) i l'enviament també es fa en fred per tal d'evitar creixement no desitjat, ja que allò que interessa és saber la càrrega microbiana just en el moment abans d'esterilitzar el producte.

### **Resultats**

A continuació s'adjunten els resultats de la càrrega microbiana obtinguts pels tres lots de validació de cada RF (taula 71 i 72).

**Taula 71.** Resultats de la càrrega microbiana dels tres lots de validació del <sup>11</sup>C-PIB.

<sup>11</sup> C-PIB	Aeròbics	Anaeròbics	Fongs i llevats
Lot 1	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL
Lot 2	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL
Lot 3	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL

**Taula 72.** Resultats de la càrrega microbiana dels tres lots de validació del <sup>18</sup>F-FMISO.

<sup>18</sup> F-FMISO	Aeròbics	Anaeròbics	Fongs i llevats
Lot 1	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL
Lot 2	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL
Lot 3	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL	< 1 ufc/mL

**Conclusió**

Els resultats dels tres lots de validació de cada RF són menors a 1 ufc/mL (especificació  $\leq 10$  ufc/100 mL), per tant permeten assegurar que el mètode d'esterilització per doble filtració serà capaç d'esterilitzar el producte.

Tal com s'ha comentat no es pot realitzar el test de càrrega microbiana per a cada lot ja que el volum requerit per al test és de 6 mL, mentre el volum final d'una producció és de 15 mL. Observant els resultats obtinguts es decideix passar el control a freqüència semestral on es realitzarà una producció destinada per a la determinació de la càrrega microbiana.

### 5.1.7.6 Identificació

El test d'identificació té com a objectiu obtenir la confirmació, dins un grau acceptable de certesa, que la preparació és conforme amb la descripció de l'etiqueta. Moltes vegades aquests control està format per més d'un test que es complementen entre si o per tests que fan referència a altres paràmetres que cal realitzar dins el control de qualitat del producte<sup>100</sup>.

En el cas dels RFs PET, el test d'identificació es basa en la confirmació de la identificació del radionúclid que marca la molècula d'interès més el test d'identificació de la molècula d'interès o principi actiu. Per això són tests que formen part de la PRN (*apartat 5.1.7.3*) i de la PQ i PRQ (*apartats 5.1.1 i 5.1.2*). A la taula 73, adjunta a continuació, es detallen els tests d'identificació per als RFs d'estudi.

**Taula 73.** Identificació dels RFs d'estudi<sup>37, 38</sup>.

Test	<sup>11</sup> C-PIB	<sup>18</sup> F-FMISO
<b>Identificació A (Test PRNA)</b>	Espectrometria gamma: un únic pic de 0,511MeV (1,022 MeV pic sumatori)	Espectrometria gamma: un únic pic de 0,511MeV (1,022 MeV pic sumatori)
<b>Identificació B (Test PRNB)</b>	Determinació de la $t_{1/2}$ : 19,9 min – 20,9 min	Determinació de la $t_{1/2}$ : 105 min – 115 min
<b>Identificació C (PQ)</b>	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra ha de ser aproximadament igual al TR del pic principal del cromatograma del patró PIB.	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra ha de ser aproximadament igual al TR del pic principal del cromatograma del patró FMISO.

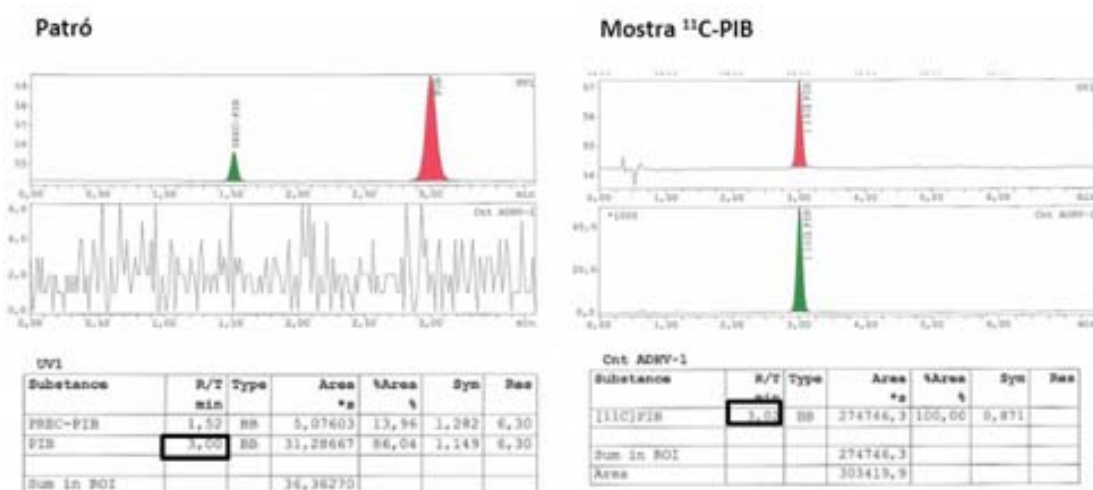
PRNA: puresa radionucleídica A, PRNB: puresa radionucleídica B, PQ:puresa química,  $t_{1/2}$ : semivida, TR: temps de retenció.

Els tests d'identificació A i B identifiquen el radionúclid que marca la molècula d'interès, són paràmetres que es determinen en la PRN i, per tant, ja es consideren validats.

El test d'identificació C identifica el principi actiu o molècula d'interès. Per a la seva determinació s'utilitza el cromatograma de la mostra radioactiva que s'injecta en el test de PRQ i PQ, i el cromatograma del patró no radioactiu del principi actiu de la PRQ i PQ. Demostrant que el pic principal de la mostra en el cromatograma radioactiu coincideix amb el pic principal del patró de principi actiu en el cromatograma UV, s'assegura que el compost principal marcat radioactivament és la molècula d'interès (Figura 41). Cal comentar que es parla de coincidència ja

que s'estan considerant dos detectors diferents, el detector UV i el detector RAD, que estan disposats en sèrie, per tant, hi ha un retard de la mostra en arribar a l'últim detector de la sèrie. Per a la identificació C s'utilitza un test analític que està validat amb la PQ i PRQ. Concretament la guia ICH sobre Validació de mètodes analítics ICH Q2 (R1)<sup>57</sup> cita que per al test d'identificació s'ha de validar la selectivitat (Figura 15), el mètode analític utilitzat per a cada RF d'estudi el paràmetre de selectivitat ja ha estat validat.

**Figura 41.** Identificació C: A la figura es pot observar a l'esquerra el cromatograma patró de PR-PIB i PIB del test de puresa química i radioquímica on el pic corresponent a PIB té un temps de retenció (R/T min) de 3 min. A la dreta s'observa l'anàlisi de la mostra per al mètode de puresa química i radioquímica on en el radiocromatograma (ADHV-1) el temps de retenció del pic principal és de 3,02 min. Amb la coincidència del temps de retenció entre el patró PIB i el pic principal en la mostra, es pot identificar aquest pic com a <sup>11</sup>C-PIB.



### 5.2 Validació de procés

#### 5.2.1 Introducció

La validació es basa en obtenir proves, seguint les NCF, que qualsevol procés, equip, material, activitat o sistema produeix en realitat el resultat previst<sup>120</sup>. Pel que fa al procés de producció d'un medicament aplica el que s'anomena la validació de procés, que és la verificació documentada de que el procés realitzat, dins els paràmetres establerts, poden oferir resultats eficaços i reproduïbles per a elaborar un medicament que compleixi les seves especificacions i atributs de qualitat predeterminats<sup>32</sup>.

La validació de procés forma part de la documentació a presentar a les autoritats sanitàries per tal que autoritzin l'ús d'un medicament. Es tracta d'una etapa que cal completar abans de la utilització clínica d'un RF (validació prospectiva). Així que, un cop finalitzat el disseny de procés de fabricació, estudiats i identificats els punts crítics del procés, validats els mètodes analítics i elaborats els lots pilots, s'ha de procedir a assegurar i disposar de documents que evidencin que el procés és consistent i capaç d'obtenir un producte final de la qualitat requerida<sup>121</sup>.

Segons les NCF la validació prospectiva ha d'incloure, entre altres aspectes<sup>32,121</sup>:

- Breu descripció del procés.
- Resum de les fases crítiques del procés de fabricació.
- Llistat dels equips/instal·lacions que s'utilitzaran i incloure el seu estat de calibració.
- Especificacions del producte final per a la seva alliberació.
- Llistat dels mètodes analítics.
- Controls de procés i criteris d'acceptació.
- Assajos addicionals, criteris d'acceptació i validació analítica, segons correspongui.
  - o Pla de mostreig: mètodes de registre i avaluació dels resultats.
- Funcions i responsabilitats.
- Calendari proposat.

Per tant, pel que fa al marc dels mètodes analítics a què es refereix la tesi, apliquen els següents paràmetres:

- Realització d'un llistat dels equips/instal·lacions que s'utilitzaran per a realitzar el control de qualitat i incloure el seu estat de qualificació<sup>xxviii</sup>, calibració i verificació.
- Especificacions del producte final per a la seva alliberació.

---

<sup>xxviii</sup> Comprovació que un equip funciona correctament i produeix realment els resultats previstos<sup>120</sup>.

- Llistat dels mètodes analítics.
- Controls de procés i criteris d'acceptació. En aquest cas per als RFs d'estudi el procés de fabricació és continu i es controla per paràmetres de procés que no impliquen la realització d'un test analític.
- Assajos addicionals, criteris d'acceptació i validació analítica, segons correspongui. En el cas dels RFs d'estudi no es realitzen controls de qualitat addicionals més que els definits per a cadascun.

Definits tots aquests aspectes, s'ha de procedir a realitzar una sèrie de lots de producte en les condicions habituals. El número de lots ha de ser suficient per establir el grau de variació, tendències i ser representatius dels lots que es produiran en rutina. Generalment s'accepta realitzar tres lots consecutius que satisfacin els paràmetres definits<sup>32,121</sup>.

Per això és molt important que durant el procés de desenvolupament d'un RF, s'hagi estudiat el comportament i les característiques físiques i químiques del principi actiu i s'hagin identificat els paràmetres crítics de procés.

Cal considerar que de qualsevol canvi en el procés que pugui afectar la qualitat del producte o la reproductibilitat del procés se n'ha d'estudiar el seu impacte. Per exemple, un canvi en les instal·lacions, equips, sistemes, paràmetres de procés cal que sigui avaluat mitjançant l'eina d'anàlisi de risc i determinar, en cas d'impacte, si cal realitzar una extensió de la validació o una revalidació del procés<sup>32,121</sup>.

Darrerament a causa de l'aparició de les guies ICH Q8 (desenvolupament farmacèutic, *Pharmaceutical development*)<sup>122</sup>, ICH Q9 (Anàlisi de risc, *Quality Risk Management*)<sup>123</sup> i ICH Q10 (Sistema de qualitat farmacèutic, *Pharmaceutical Quality System*)<sup>124</sup>, les NCF amb l'annex 15 de validació<sup>32</sup> estan en revisió per tal d'introduir l'anàlisi de risc en l'avaluació dels paràmetres crítics, l'estudi de la qualitat per disseny (*quality by design*) i el concepte de validació de procés en continu, és a dir, en tot el cicle de vida del producte (*ongoing process verification*) introduït a l'avaluació de la qualitat del producte per tal de controlar les variacions existents en el procés i implementar mesures correctores.

### 5.2.2 Hipòtesi

Es poden obtenir tres síntesis consecutives de cada RF que compleixin totes les especificacions definides per a la validació de procés.

Els mètodes analítics validats i les especificacions definides per als dos RFs d'estudi,  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO, són aplicables a la validació de procés de cada RF.

### 5.2.3 Objectius

Validar el procés de producció de cada RF obtenint tres síntesis consecutives de cada RF que compleixin totes les especificacions definides.

Els mètodes analítics validats permeten demostrar que el procés definit assegura la qualitat del producte final d'acord amb les especificacions definides.

### 5.2.4 Metodologia

Es realitzen tres síntesis consecutives per RF, que compleixin especificacions, de la següent manera:

- Es porten a terme les síntesis seguint el procés de producció definit en l'apartat 4.6.1 *Síntesi de  $^{11}\text{C}$ -PIB* i 4.6.2 *Síntesi de  $^{18}\text{F}$ -FMISO*
- S'analitza cada lot produït seguint els mètodes analítics descrits a continuació.

**Taula 74.** Validació de procés: taula resum on s'indica el test analític, la metodologia que cal aplicar per a cada test i, en cas que apliqui, l'apartat on s'ha validat el mètode analític.

Test	Mètode analític	Validació
Identificació	<i>Apartat 5.1.7.6</i>	Aplica la validació de la puresa química, radioquímica i radionucleídica.
Aspecte i pH	<i>Apartat 5.1.7.1 i 5.1.7.2</i>	No aplica
Puresa radioquímica	<i>Apartat 5.1.2.4</i>	<i>Apartat 5.1.2</i>
Puresa química	<i>Apartat 5.1.1.4, taula 5</i>	<i>Apartat 5.1.1</i>
Dissolvents residuals	<i>Apartat 5.1.4.4, taula 48</i>	<i>Apartat 5.1.4</i>
Puresa radionucleídica	<i>Apartat 5.1.7.3</i>	No aplica
Test esterilitat	<i>Apartat 5.1.5</i>	<i>Apartat 5.1.5</i>
Test Endotoxines	<i>Apartat 5.1.6</i>	<i>Apartat 5.1.6</i>

A continuació s'adjunten taules ampliades de la metodologia per a aquells controls que requereixen patrons i test d'idoneïtat no comentats en els apartats indicats de la Taula 74.



**Taula 75.** Validació de procés: Taula de la metodologia a aplicar per a la determinació de la puresa química i radioquímica per HPLC<sup>125,126</sup>.

		Puresa química i radioquímica per HPLC	
		<sup>11</sup> C-PIB	<sup>18</sup> F-FMISO
Patrons		<p><u>Blanc:</u> fase mòbil (FM) composició 55% format amònic pH 5 : 45 % Acetonitril.</p> <p><u>Patró etanol:</u> 100 µL d'etanol s'enrasa fins 10 mL amb FM.</p> <p><u>Patró sèrum fisiològic:</u> vial 2 mL sèrum fisiològic.</p> <p><u>Patró CQP1:</u> dissoldre 1,5 mg Patró PIB<sup>51</sup> en 200 µL DMSO i s'enrasa a 10 mL amb FM. (150 µg/mL PIB).</p> <p><u>Patró CQP2:</u> dissoldre 1,0 mg Patró PR-PIB<sup>52</sup> en 200 µL DMSO i s'enrasa a 10 mL amb FM. (100 µg/mL PR-PIB).</p> <p><u>Patró CQP3:</u> es pipeteja 86 µL Patró CQP1 i 13 µL de Patró CQP2, s'enrasa a 10 mL amb FM. (1.3 µg/mL PIB, 0.13 µg/mL PR-PIB).</p>	<p><u>Blanc:</u> fase mòbil (FM) composició 80 % aigua : 20 % acetonitril.</p> <p><u>Patró etanol:</u> 100 µL d'etanol s'enrasa fins 10 mL amb FM.</p> <p><u>Patró sèrum fisiològic:</u> vial 2 mL sèrum fisiològic.</p> <p><u>Patró CQP1:</u> es pesa 1mg FMISO<sup>53</sup> + 1 mg PR-FMISO<sup>54</sup> + 1mg IMP-FMISO<sup>55</sup> i es dissol enrasant a 10 mL amb FM. De la solució anterior s'agafa 1 mL i s'enrasa a 10 mL amb FM. S'agafa 1 mL solució i s'enrasa a 10 mL amb FM. ( 1 µg/mL FMISO, 1 µg/mL PR-FMISO, 1 µg/mL IMP-FMISO).</p>
	Mètode	Es realitza una injecció dels patrons: blanc, etanol, sèrum fisiològic i 3 injeccions de Patró CQP3.	Es realitza una injecció de cada patró excepte del patró CQP1 que es realitzen 3.
Test	CV de l'àrea i del temps de retenció de cada pic ha de ser ≤ 5 %. Els pics han de tenir una resolució idònia. Test que s'ha de superar abans de l'anàlisi de la mostra problema.		
Anàlisi	Es realitza 1 injecció de la solució problema: <u>solució <sup>11</sup>C-PIB.</u>	Es realitza 1 injecció de la solució problema: <u>solució <sup>18</sup>F-FMISO.</u>	
Identificació	<p>S'integren les àrees del detector UV i del RAD.</p> <p><u>Cromatograma detector RAD</u></p> <p>S'identifica com a <sup>11</sup>C-PIB el pic del detector isotòpic que té un TR semblant al TR corresponent a PIB del patró CQP3.</p> <p><u>Cromatograma UV</u></p> <p>S'identifica com a PIB, PR-PIB, etanol i sèrum fisiològic els pics segons corresponguin amb els respectius TR dels patrons injectats.</p>	<p>S'integren les àrees del detector UV i del RAD.</p> <p><u>Cromatograma detector RAD</u></p> <p>S'identifica com a <sup>18</sup>F-FMISO el pic del detector isotòpic que té un TR semblant al TR corresponent a FMISO del patró CQP1.</p> <p><u>Cromatograma UV</u></p> <p>S'identifica com a FMISO, PR-FMISO, IMP-FMISO, etanol i sèrum fisiològic els pics segons corresponguin amb els respectius TR dels patrons injectats.</p>	

## Puresa química i radioquímica per HPLC

<sup>11</sup>C-PIB<sup>18</sup>F-FMISO

Càlculs	<p><u>Cromatograma UV</u> Quantitat de PIB en el lot (µg/mL): <b>Equació 14</b></p> $\mu\text{g PIB/mL} = \frac{C_{\text{PIB,P}} \times A_{\text{PIB,M}}}{A_{\text{PIB,P}}}$ <p>Quantitat d'impureses totals (IMPP) en el lot (µg/mL), incloent PR-PIB:</p> <p><b>Equació 16</b></p> $\mu\text{g IMPP/mL} = \frac{C_{\text{PIB,P}} \times \sum A_{\text{IMPP,M}}}{A_{\text{PIB,P}}}$ <p><u>Detector RAD</u> El % PRQ corresponent a <sup>11</sup>C-PIB.</p>	<p><u>Cromatograma UV</u> Quantitat de FMISO en el lot (µg/mL): <b>Equació 15</b></p> $\mu\text{g FMISO/mL} = \frac{C_{\text{FMISO,P}} \times A_{\text{FMISO,M}}}{A_{\text{FMISO,P}}}$ <p>Quantitat d'impureses totals (IMPF) en el lot (µg/mL), incloent PR-FMISO i IMP-FMISO:</p> <p><b>Equació 17</b></p> $\mu\text{g IMPF/mL} = \frac{C_{\text{FMISO,P}} \times \sum A_{\text{IMPF,M}}}{A_{\text{FMISO,P}}}$ <p><u>Detector RAD</u> El % PRQ corresponent a <sup>18</sup>F-FMISO.</p>
	<p>Quantitat màxima per dosi PIB ≤ 13 µg.</p> <p>Considerant que la dosi màxima és de 10 mL, es calcula la quantitat de PIB per una dosi màxima:</p> <p><b>Equació 18</b></p> $\mu\text{g PIB} = \mu\text{g PIB/mL lot} \times 10\text{mL}$ <p>Si la quantitat de µg PIB és superior a 13 µg, cal limitar per volum:</p> <p><b>Equació 20</b></p> $V \text{ màxim (mL)} = \frac{13 \mu\text{g PIB}}{\mu\text{g PIB/mL lot}}$	<p>Quantitat màxima per dosi FMISO ≤ 15 µg.</p> <p>Considerant que la dosi màxima és de 10 mL, es calcula la quantitat de FMISO per una dosi màxima:</p> <p><b>Equació 19</b></p> $\mu\text{g FMISO} = \mu\text{g FMISO/mL lot} \times 10\text{mL}$ <p>Si la quantitat de µg FMISO és superior a 15 µg, cal limitar per volum:</p> <p><b>Equació 21</b></p> $V \text{ màxim (mL)} = \frac{15 \mu\text{g FMISO}}{\mu\text{g FMISO/mL lot}}$
Limitació per volum	<p>Quantitat màxima per dosi d'impureses totals PIB (IMPP) ≤ 1,3 µg.</p> <p>Considerant que la dosi màxima és de 10 mL, es calcula la quantitat d'IMPP per una dosi màxima:</p> <p><b>Equació 22</b></p> $\mu\text{g IMPP} = \mu\text{g IMPP/mL lot} \times 10 \text{ mL}$ <p>Si la quantitat en µg IMPP és superior a 1,3 µg, cal limitar per volum:</p> <p><b>Equació 24</b></p> $\text{Volum màxim (mL)} = \frac{1,3 \mu\text{g IMPP}}{\mu\text{g IMPF/mL lot}}$	<p>Quantitat màxima per dosi d'impureses totals FMISO (IMPF) ≤ 35 µg.</p> <p>Considerant que la dosi màxima és de 10 mL, es calcula la quantitat d'IMPF per una dosi màxima:</p> <p><b>Equació 23</b></p> $\mu\text{g IMPF} = \mu\text{g IMPF/mL lot} \times 10 \text{ mL}$ <p>Si la quantitat en µg IMPF és superior a 35 µg, cal limitar per volum:</p> <p><b>Equació 25</b></p> $\text{Volum màxim (mL)} = \frac{35 \mu\text{g IMPF}}{\mu\text{g IMPF/mL lot}}$

FM: fase mòbil, C: concentració, A: àrea, P: patró, M: mostra, IMPP: quantitat d'impureses totals del PIB, IMPF: impureses totals de FMISO, CV: coeficient de variació, TR: temps de retenció, ND: no detectable, Detector RAD (detector isotòpic).

**Taula 76.** Validació de procés: taula de la metodologia a aplicar per a la determinació de la puresa química per TLC, aquest test només aplica a FMISO per a la determinació criptand<sup>126</sup>.

## Puresa química per TLC

<sup>18</sup>F-FMISO

<b>Patrons</b>	Patró FC2 (50 µg/mL Criptand) es prepara segons apartat 5.1.1 PQ
<b>Mètode</b>	En una tira de TLC es realitzen 2 injeccions de 3 µL del reactiu iodeplatinat potàssic i es deixa assecar.  A sobre dels punts d'injecció realitzats: a sobre del punt d'injecció de l'esquerra es dipositen 3 µL de patró FC2 i a sobre del punt d'injecció dret es dipositen 3 µL de mostra problema.
<b>Test idoneïtat</b>	Coloració fosca en el punt d'injecció del patró FC2.
<b>Anàlisi de la Mostra</b>	Presència d'una taca en el punt d'injecció de la mostra de menor intensitat que la taca que s'observa en el punt d'injecció del patró FC2.

**Taula 77.** Validació de procés: taula de la metodologia a aplicar per a la determinació dels dissolvents residuals<sup>127</sup>.

## Dissolvents residuals per cromatografia de gasos

<sup>11</sup>C-PIB<sup>18</sup>F-FMISO

<b>Patrons</b>	<u>Blanc</u> : aigua purificada. <u>Patró DRR1</u> : es prepara una solució en funció de la densitat de cada dissolvent enrasant amb aigua purificada per tal que la concentració final de cada dissolvent sigui: etanol, èter dietílic i acetona, de 10.000 ppm, i acetonitril, de 820 ppm. <u>Patró Intern</u> : es prepara una solució en funció de la densitat de l'acetat d'etil enrasant amb aigua purificada per tal que la concentració final sigui de 10.000 ppm d'acetat d'etil. <u>Patró DRR2</u> : solució 1:1 patró DRR1 i patró intern. Concentració final: etanol, èter dietílic, acetona i acetat d'etil, de 5.000 ppm, i d'acetonitril, de 410 ppm.
<b>Mètode</b>	Es realitzen 3 injeccions del patró DRR2.

## Dissolvents residuals per cromatografia de gasos

<sup>11</sup>C-PIB<sup>18</sup>F-FMISO

<b>Test idoneïtat</b>	Es calcula el quocient per a cada dissolvent i per a cada injecció: àrea dissolvent/àrea acetat d'etil. El CV dels quocients de cada dissolvent han de ser $\leq 10\%$ . Test que s'ha de superar abans de l'anàlisi de la mostra problema.
<b>Anàlisi de la Mostra</b>	Es dilueix la mostra 1:1 amb patró d'acetat d'etil. Es realitza una injecció de la mostra.
<b>Càlculs</b>	Es calcula el quocient per a cada dissolvent detectat en la mostra: àrea dissolvent / àrea acetat d'etil. El quocient obtingut per a cada dissolvent ha de ser inferior al quocient d'àrees mitjà obtingut en les 3 injeccions de patró DRR2. D'aquesta manera s'assegura que no es supera el límit per a cada dissolvent. En el cas de l'etanol el paràmetre és informatiu.

**Criteri d'acceptació:**

- Obtenció de tres lots consecutius de cada RF que compleixin les especificacions definides a la taula 78.

**Taula 78.** Validació de procés: taula on s'indiquen les especificacions que cada lot de radiofàrmac ha de complir<sup>37,38</sup>.

Test analític	Especificacions <sup>11</sup> C-PIB	Especificacions <sup>18</sup> F-FMISO	
<b>Identificació</b>	A	Test PRNA	Test PRNA
	B	Test PRNB	Test PRNB
	C	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra és aproximadament igual al TR del patró PIB.	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra és aproximadament igual al TR del patró FMISO.
<b>Aspecte i pH</b>	Aspecte i partícules	Solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles	Solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles
	pH	4,5 - 8,5	4,5 - 8,5

Test analític		Especificacions $^{11}\text{C}$ -PIB	Especificacions $^{18}\text{F}$ -FMISO
<b>Puresa radioquímica</b>	%	$^{11}\text{C}$ -PIB $\geq 95,00$ %	$^{18}\text{F}$ -FMISO $\geq 95,00$ %
<b>Puresa química</b>	contingut	dosi $\leq 13$ $\mu\text{g}$ PIB	dosi $\leq 15$ $\mu\text{g}$ FMISO
	impureses	Suma d'impureses a la dosi $\leq 1,3$ $\mu\text{g}$	Suma d'impureses a la dosi $\leq 35$ $\mu\text{g}$ $\leq 50$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ Criptand
<b>Dissolvents residuals</b>	Etanol	Informatiu	Informatiu
	Èter	5.000 ppm	5.000 ppm
	Acetona	5.000 ppm	5.000 ppm
	Acetonitril	410 ppm	410 ppm
<b>Puresa radionucleídica</b>	A (Test PRNA)	511 KeV ( $\pm 25$ KeV) (1,022 MeV pic sumatori)	511 KeV ( $\pm 25$ KeV) (1,022 MeV pic sumatori)
	B (Test PRNB)	19,9 min – 20,9 min	105 min – 115 min
<b>Test esterilitat</b>	Esterilitat	Estèril	Estèril
<b>Test d'endotoxines</b>	Endotoxines	$< 17,5$ IU/mL	$< 17,5$ IU/mL

PRNA: puresa radionucleídica A, PRNB: puresa radionucleídica B, TR: temps de retenció.

### 5.2.5 Resultats

A continuació s'adjunten els resultats de cada RF per separat.

L'estat de qualificació, calibració i verificació, segons apliqui, de tots els equips/instal·lacions utilitzats per a realitzar el control de qualitat eren conformes.

#### $^{11}\text{C}$ -PIB

Es varen realitzar quatre síntesis de  $^{11}\text{C}$ -PIB seguint el procés de producció definit en apartat 4.6.1 Síntesi de  $^{11}\text{C}$ -PIB. La conformitat dels lots en funció de les especificacions es representen a la taula 79.

**Taula 79.** Validació de procés: taula resum on s'indiquen els lots realitzats per a la validació de procés per al  $^{11}\text{C}$ -PIB.

	Conformitat especificacions	Lot de validació
<b>Lot 1</b>	No conforme*	-
<b>Lot 2</b>	Conforme	1r Lot
<b>Lot 3</b>	Conforme	2n Lot
<b>Lot 4</b>	Conforme	3r Lot

\* Existeix una desviació, no es pot considerar lot de validació (veure discussió).

Els resultats obtinguts per a cada lot de validació s'indiquen a la taula 80.

**Taula 80.** Validació de procés: taula on s'indiquen els resultats obtinguts dels tres lots de validació consecutius que compleixen especificacions per al  $^{11}\text{C}$ -PIB.

Test	Lots de validació $^{11}\text{C}$ -PIB				
	Especificació	1er Lot	2on Lot	3er Lot	
Identificació	A	PRNA	Conforme	Conforme	Conforme
	B	PRNB	Conforme	Conforme	Conforme
	C	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra és aproximadament igual al TR del patró PIB.	TR <sub>M</sub> =2,88 min TR <sub>p</sub> = 2,80 min	TR <sub>M</sub> =2,97 min TR <sub>p</sub> = 2,92 min	TR <sub>M</sub> =2,96 min TR <sub>p</sub> = 2,93 min
Aspecte i pH	Aspecte i partícules	Solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles	Conforme	Conforme	Conforme
	pH	4,5 - 8,5	6,5	6,5	6,0
PRQ	Àrea $^{11}\text{C}$ -PIB	≥ 95,00 %	99,59 %	99,11 %	99,37 %

Lots de validació <sup>11</sup> C-PIB					
Test		Especificació	1er Lot	2on Lot	3er Lot
PQ	PIB *	Dosi <sub>max</sub> ≤ 13 µg	13 µg (Vmax:5,4mL)	12,7 µg	12,6 µg
	ΣA imp	Suma Impureses Dosi <sub>max</sub> ≤ 1,3 µg	ND	ND	ND
Dissolvents residuals	Etanol	Informatiu	≤ 10 %	≤ 10 %	≤ 10 %
	Èter	5.000 ppm	ND	ND	ND
	Acetona	5.000 ppm	ND	ND	ND
	Acetonitril	410 ppm	ND	ND	ND
PRN		511KeV ± 25 KeV			
	PRNA	(1,022 MeV pic sumatori)	516 KeV	510 KeV	514 KeV
	PRNB Semivida	19,9 min – 20,9 min	20,32 min	20,09 min	20,23 min
Test ** esterilitat	Esterilitat	Estèril	Conforme	Conforme	Conforme
	Test ** endotoxines	Endotoxines	< 17,5 IU/mL	Conforme	Conforme

M: mostra, P: patró, Dosi<sub>max</sub>: dosi màxima equivalent a 10 mL de volum d'injecció, ND: no detectable, IMPP: impureses totals de PIB, PQ: puresa química, PRQ: puresa radioquímica, PRN: puresa radionucleídica. \*Dosi limitada per volum: veure taula 81 on s'indica la quantitat de PIB en mostra, en dosi i la limitació per volum. \*\*Resultats detallats dels tests d'endotoxines a la taula 64 i test esterilitat a l'apartat 5.1.5 Esterilitat.

A la taula següent (taula 81) s'indiquen els càlculs realitzats en el test de PQ per comprovar si la dosi màxima de 10 mL compleix l'especificació o bé cal limitar per volum.

**Taula 81.** Validació de procés: taula on s'indica la concentració de PIB en cada lot, la quantitat de PIB per a la dosi màxima de 10mL, el compliment amb l'especificació i en cas de no compliment, la limitació per volum de la dosi màxima.

	$\mu\text{g PIB/mL}$ per lot	Volum dosi màxima (mL)	$\mu\text{g PIB}$ dosi màxima	Especificació dosi màxima $\leq 13 \mu\text{g PIB}$	Limitació dosi màxima (mL)
<b>Lot 1</b>	2,41	10	24,10	No conforme	5,4 mL
<b>Lot 2</b>	1,27	10	12,70	Conforme	No necessària
<b>Lot 3</b>	1,26	10	12,60	Conforme	No necessària

### <sup>18</sup>F-FMISO

Es varen realitzar cinc síntesis de <sup>18</sup>F-FMISO seguint el procés de producció definit en l'apartat 4.6.2 Síntesi de <sup>18</sup>F-FMISO. La conformitat dels lots en funció de les especificacions es representen a la taula 82.

**Taula 82.** Validació de procés: taula resum on s'indiquen els lots realitzats per a la validació de procés per al <sup>18</sup>F-FMISO.

	Conformitat especificacions	Lots de validació
Lot 1	Conforme	No
Lot 2	No conforme*	No
Lot 3	Conforme	1r Lot
Lot 4	Conforme	2n Lot
Lot 5	Conforme	3r Lot

\* Existeix una desviació, no es pot considerar lot de validació el lot 2 ni tampoc el lot 1 (veure discussió).

Els resultats obtinguts per als tres lots de validació consecutius conformes s'indiquen a la taula 83.



**Taula 83.** Validació de procés: Taula on s'indiquen els resultats obtinguts dels tres lots de validació consecutius que compleixen especificacions per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

		Lots de validació $^{18}\text{F}$ -FMISO			
Test	Especificació	1er Lot	2on Lot	3er Lot	
Identificació	A	PRNA	Conforme	Conforme	Conforme
	B	PRNB	Conforme	Conforme	Conforme
	C	El TR del pic principal del radiocromatograma de la mostra és aproximadament igual al TR del patró FMISO.	$\text{TR}_M=3,60$ min $\text{TR}_p= 3,53$ min	$\text{TR}_M=3,60$ min $\text{TR}_p= 3,53$ min	$\text{TR}_M=3,58$ min $\text{TR}_p= 3,53$ min
Aspecte i pH	Aspecte i partícules	Solució límpida, incolora o lleugerament groga, sense partícules visibles	Conforme	Conforme	Conforme
	pH	4,5 - 8,5	7,9	7,6	7,7
PRQ	Àrea $^{18}\text{F}$ -FMISO	$\geq 95,00$ %	99,68 %	99,61 %	100 %
PQ	FMISO	$\text{Dosi}_{\max} \leq 15$ $\mu\text{g}$	5,00 $\mu\text{g}$	5,50 $\mu\text{g}$	12,90 $\mu\text{g}$
	$\Sigma$ A IMPF	Suma Impureses $\text{Dosi}_{\max} \leq 35$ $\mu\text{g}$	ND	ND	ND
	Criptand	$\leq 50$ $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\leq 50$ $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\leq 50$ $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\leq 50$ $\mu\text{g}/\text{mL}$
Dissolvents residuals	Etanol	Informatiu	$\leq 2,5$ %	$\leq 2,5$ %	$\leq 2,5$ %
	Èter	5.000 ppm	ND	ND	ND
	Acetona	5.000 ppm	ND	ND	ND
	Acetonitril	410 ppm	ND	ND	ND
PRN	PRNA	511KeV $\pm$ 25 KeV (1,022 MeV pic sumatori)	520 KeV	522 KeV	526 KeV
	PRNB	105 min – 115 min	107,15 min	109,2 min	109,5 min
	Semivida				

Lots de validació <sup>18</sup>F-FMISO

Test	Especificació	1er Lot	2on Lot	3er Lot
Test * esterilitat	Esterilitat Estèril	Conforme	Conforme	Conforme
Test * endotoxine	Endotoxines < 17,5 IU/mL	Conforme	Conforme	Conforme

M: mostra, P: patró, Dosi<sub>max</sub>: dosi màxima equivalent a 10 mL de volum d'injecció, ND: no detectable, IMPF: impureses totals de FMISO, PQ: puresa química, PRQ: puresa radioquímica, PRN: puresa radionucleídica.\* Resultats detallats dels tests d'endotoxines a la taula 65 i test esterilitat a l'apartat 5.1.5 Esterilitat.

A la taula següent (taula 84) s'indiquen els càlculs realitzats en el test de PQ per comprovar si la dosi màxima de 10 mL compleix l'especificació o bé cal limitar per volum.

**Taula 84.** Taula on s'indica la concentració de FMISO en cada lot, la quantitat de FMISO per a la dosi màxima de 10mL, compliment amb l'especificació i en cas de no compliment, limitació per volum de la dosi màxima.

	µg FMISO/mL per lot	Volum Dosi màxima (mL)	µg FMISO Dosi màxima	Especificació Dosi màxima ≤ 15 µg FMISO	Limitació Dosi màxima (mL)
Lot 1	0,50	10	5,00	Conforme	No necessària
Lot 2	0,55	10	5,50	Conforme	No necessària
Lot 3	1,29	10	12,90	Conforme	No necessària

## 5.2.6 Discussió

Per normativa generalment s'accepta per a realitzar la validació de procés obtenir tres lots consecutius que satisfacin els paràmetres definits<sup>32,121</sup>. Ara bé es considera esmentar que un cop obtinguda l'aprobació del producte presentat i s'inicien les produccions rutinàries, els lots estan sotmesos a una revisió periòdica (*Product Quality review*) que té l'objectiu de verificar la consistència del procés, les especificacions del producte final i de les matèries primeres, estudiar les tendències i identificar millores en el procés<sup>128</sup>.

En el cas del  $^{11}\text{C}$ -PIB, es varen haver de realitzar quatre síntesis per tal d'obtenir tres lots consecutius conformes amb les especificacions. Com es pot observar a la Taula 79, el primer lot va ser no conforme a causa d'una desviació lligada al procés de producció, la fase mòbil de l'etapa de purificació no estava correctament preparada. Com a mesura preventiva es va afegir la comprovació del TR d'un patró de PIB un cop preparada la fase mòbil.

En el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO varen ser necessàries cinc síntesis per tal d'obtenir tres lots consecutius conformes a les especificacions. Tal com contempla la Taula 82, el primer lot va ser conforme, però el segon lot no, a causa d'una desviació lligada al procés de producció en l'etapa de fluoració, un error en una connexió va fer que no s'obtingués producte. Com a mesura preventiva es va afegir la comprovació de les connexions a la guia de producció.

Les mesures preventives lligades a les desviacions varen ser efectives de tal manera que no es van repetir en els lots següents.

En l'apartat de metodologia es descriu com portar a terme el test de PQ, PRQ i dissolvents residuals ja que en els corresponents apartats de la tesi només es fa referència a la validació i no al mètode amb el test d'idoneïtat que es porta a terme per a l'anàlisi de la mostra.

Com que en els RFs, a diferència dels medicaments convencionals, el volum d'injecció per una mateixa dosi varia en funció del temps a causa de la semivida del RF, les especificacions de PQ s'expressen per dosi màxima. La dosi màxima es calcula en base a què el volum màxim d'injecció és de 10 mL de solució final de RF. En el cas que la dosi màxima superi l'especificació de la PQ es limita per volum la dosi per tal de complir amb les especificacions. Una altra estratègia és limitar la PQ per concentració ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  lot). Però això fa que certs lots siguin no aptes quan es podrien injectar en els primers pacients complint l'especificació límit de PQ al tenir la solució major activitat i requerir menys volum d'injecció. Aquest seria el cas del Lot 1 de validació de PIB del qual es podrien administrar dosis fins a un volum de 5,4 mL. Al mateix temps la limitació per volum permet el control del compliment de les especificacions de forma individualitzada, és a dir, per a cada injecció. Cal mencionar que es permet la limitació per volum a causa del marc d'ús d'aquests RFs al ser no comercials i destinat el seu ús a la unitat clínica del mateix servei de radiofarmàcia, fet que permet la comunicació i el control en cas de limitació per volum de la dosi a injectar.

Pel que fa als resultats de validació per a cada RF:

- Test d'identificació, la conformitat en aquest test certifica que el producte obtingut és corresponentment  $^{11}\text{C}$ -PIB i  $^{18}\text{F}$ -FMISO.
- Aspecte i pH, els dos RFs tenen la mateixa especificació de pH, 4,5 - 8,5, però es pot observar una tendència dins de l'ampli marge: els tres lots de validació de  $^{11}\text{C}$ -PIB estan dins l'interval de pH de 6,0 a 6,5 i en el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO de 7,5 a 8,0.
- PRQ, pels dos RFs els valor obtinguts són pròxims al 99 %, certificant que el procés de marcatge i purificació són efectius.
- PQ:
  - $^{11}\text{C}$ -PIB:
    - Quantitat de PIB: dos dels lots tenen valors semblants de quantitat de PIB en la dosi màxima ( $\approx 12,5 \mu\text{g}$ ) valor pròxim a l'especificació límit ( $\approx 13 \mu\text{g}$ ). El primer lot requereix limitar el volum a 5,4 mL\*.
    - Quantitat de IMPP: les impureses són no detectables en els tres lots.
  - $^{18}\text{F}$ -FMISO:
    - Quantitat de FMISO: cap dels 3 lots requereix limitar el volum, s'observa que dos lots tenen quantitat de FMISO semblant de l'ordre de  $0,5 \mu\text{g}$  en la dosi màxima. El tercer lot conté més quantitat, uns  $12,9 \mu\text{g}$  en la dosi màxima\*.
    - Quantitat d'IMPF: les impureses són no detectables en els tres lots.
    - Quantitat de criptand: no se supera el límit especificat, per tant en els lots de producció en rutina no s'espera superar l'especificació de criptand.

\*Per a interpretar aquests resultats cal consultar l'apartat 5.1.3 *Concentració radioactiva i activitat específica*, taules 44 i 45, on s'adjunten els resultats d'Asp i CR per a cada lot de validació. S'observa que el lot que conté més quantitat de PIB (1r lot PIB) i de FMISO (3r lot FMISO), són els lots on s'ha obtingut més activitat al final de la síntesi. En el cas de FMISO coincideix amb el lot de major Asp, però en el cas del PIB correspon amb el lot de menys. Això s'atribueix a què els processos de síntesi de C-11 són molt influenciables a variacions en l'Asp, on la incorporació d'isòtops diferents al C-11 és més fàcil, com per exemple la incorporació de contaminants provinents de l'atmosfera ( $^{12}\text{C}$ -CO<sub>2</sub>).

- Dissolvents residuals: no només els valors estan per sota dels límits sinó que els dissolvents no són detectables en la mostra. Per tant, no s'espera superar els límits establerts dels dissolvents residuals en les produccions rutinàries.
- El test de PRN: confirma que l'isòtop de la molècula d'interès és C-11 en el cas de  $^{11}\text{C}$ -PIB i F-18 en el cas de  $^{18}\text{F}$ -FMISO, i que no existeixen impureses isotòpiques.
- El test d'esterilitat és conforme, per tant, totes les mesures de reducció de càrrega microbiana i el mètode d'esterilització per doble filtració, permeten obtenir una solució final estèril.
- Test d'endotoxines, tal com es comenta en l'apartat 5.1.6, taules 64 i 65, els valors d'endotoxines són molt menors a la especificació  $< 17,5 \text{ IU/mL}$ ,  $^{11}\text{C}$ -PIB  $< 5,0 \text{ IU/mL}$  i  $^{18}\text{F}$ -FMISO  $< 5,0 \text{ IU/mL}$ .

Es pot observar que existeixen tests dels quals no s'ha mencionat la metodologia, aquests són especificacions que no es realitzen per a cada lot de producte:

- Residus metàl·lics: tal com es comenta en l'apartat 5.1.7.4, els residus metàl·lics es varen determinar en els lots de validació i aquests resultaren ser menors al límit del 30 % dels límits calculats per a cada metall segons la guia de l'EMA, per tant, amb els resultats obtinguts s'assegura que el mètode de síntesi no deixa residus de metalls majors als permesos en el producte final i que es pot procedir a un control reduït semestral.
- Càrrega microbiana: tal com es comenta en l'apartat 5.1.7.5, la càrrega microbiana dels tres lots és inferior a 1 ufc/mL (especificació  $\leq 10 \text{ ufc/100 mL}$ ), per tant, el procés de fabricació no aporta càrrega microbiana al producte. El mètode d'esterilització per doble filtració és capaç d'esterilitzar el producte i es pot procedir a un control de càrrega microbiana reduït semestral.
- CR i Asp, paràmetres que no es consideren especificacions per a cada lot sinó que són paràmetres que es defineixen en l'assaig clínic segons l'ús del RF. Veure l'apartat 5.1.3 on es calcula aquests paràmetres en els tres lots de validació.

### 5.2.7 Conclusions

- S'han obtingut tres lots consecutius que compleixen especificacions, per tant, queda validat el procés de producció de cada RF.
- Els mètodes analítics permeten demostrar que el procés definit assegura la qualitat del producte final d'acord amb les especificacions requerides.

### 5.3 Estudi d'estabilitat

#### 5.3.1 Introducció

L'objectiu d'un test d'estabilitat és proporcionar evidències de com la qualitat del producte final varia en el temps, amb la influència de diferents factors ambientals com són la temperatura, la humitat i la llum, permetent així establir un període de re-anàlisi o semivida del producte final i recomanacions sobre les condicions d'emmagatzematge o conservació<sup>129</sup>.

Existeixen diferents guies publicades per l'ICH i que han estat adoptades per l'EMA, (*Stability Testing of new Drug Substances and Products*, ICH Topic Q 1 A (R2))<sup>129</sup> i avaluació de dades d'estabilitat (*Evaluation of stability data*, ICH Topic Q 1 E)<sup>130</sup>, que expliquen de forma general com dur a terme aquests estudis: test d'estabilitat per a noves substàncies i productes. Per als medicaments convencionals, són estudis de llarga durada, uns 12 mesos mínims, on en diferents períodes pre-establerts i en condicions controlades d'humitat i temperatura, es van determinant les especificacions del producte susceptibles a canviar en el temps. Al mateix temps també es realitzen estudis d'estabilitat accelerada, on se sotmet el producte a temperatures més elevades durant menys temps, uns 6 mesos, per tal de forçar l'aparició dels productes de degradació. Amb totes les dades es pot definir un perfil de degradació del producte i determinar un període de re-anàlisi o semivida del medicament<sup>129</sup>.

Però la guia de RFs de l'EMA<sup>60</sup> especifica que les guies generals d'estabilitat no són aplicables en la seva totalitat als RFs a causa de les seves característiques intrínseques i detalla una sèrie d'aspectes a tenir en compte, que són:

- En els lots d'estudi d'estabilitat:
  - S'han de considerar els valors màxims i mínims de quantitat d'activitat o CR en el moment de la síntesi.
  - Han de ser lots representatius del que es vol produir en rutina considerant els límits màxims del lot.
- Les especificacions i els tests a estudiar han de considerar les característiques específiques del RF.
- Els períodes mínims establerts per les guies generals d'estabilitat (12 mesos) no són aplicables pels RFs de semivida inferior a un any. En aquests casos, cal adaptar i justificar la freqüència de re-anàlisi.
- La guia de l'EMA sobre avaluació dels valors obtinguts en el test d'estabilitat<sup>130</sup> no és aplicable de forma general als RFs.

Per tant, ens trobem davant d'unes guies enfocades als medicaments convencionals i, per tant, en la seva major part no són aplicables als RFs. Al mateix temps la guia específica per als RFs<sup>60</sup> indica uns aspectes a tenir en compte al realitzar estudis d'estabilitat en RFs que són poc detallats i insuficients.

### 5.3.2 Hipòtesi

És possible redactar unes pautes més detallades i específiques de com realitzar estudis d'estabilitat en RFs PET que assegurin la qualitat del producte final fins a la caducitat.

### 5.3.3 Objectius

Indicar pautes específiques per a la realització dels estudis d'estabilitat per als RF PET:

- Establir què es considera com a representatiu dels lots susceptibles a ser valorats al llarg dels estudis d'estabilitat.
- Determinar les condicions ambientals per realitzar els estudis d'estabilitat (temperatura, humitat).
- Establir els estudis d'estabilitat aplicables als RFs (estabilitat a temperatura ambient, estabilitat accelerada, fotoestabilitat).
- Determinar els períodes recomanables de re-anàlisi durant el test d'estabilitat.
- Establir les especificacions dels RFs PET susceptibles a canviar en un estudi d'estabilitat, i per tant, a ser estudiades.
- Determinar el tipus de tractament de les dades obtingudes.
- Definir els criteris d'acceptació.
- Realitzar estudis d'estabilitat de <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO i establir el seu període de validesa i les condicions de conservació.

### 5.3.4 Metodologia

Utilitzant com a suport les guies generals de l'EMA i de l'ICH<sup>129,130</sup> i les recomanacions definides a la guia específica de RFs de l'EMA<sup>60</sup>, es va establir la metodologia per a realitzar els estudis d'estabilitat dels RFs en estudi, <sup>18</sup>F-FMISO i <sup>11</sup>C-PIB.

- S'estudien tres lots de cada RF amb diferents activitats/concentracions a final de la síntesi. Tots aquests lots hauran de complir amb totes les especificacions definides. Veure taula 78, apartat anterior, on estan es descriuen les especificacions per a cada RF.
- Sobre cada lot es dispensen dos vials, un destinat a l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient i l'altre destinat a l'estudi del test d'estabilitat accelerada.
- Per a l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient es conserva el vial en el seu contenidor original a les condicions ambientals controlades del laboratori d'anàlisi  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}/50 \pm 5 \%$  (temperatura/humitat relativa).
- Per a l'estudi de l'estabilitat accelerada es sotmet el vial a  $40^{\circ}\text{C}$ , mitjançant l'ús d'un calefactor. Les condicions d'humitat relativa han de ser les mateixes que en l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient ( $50 \pm 5 \%$ ).
- Al llarg del període d'anàlisi es retiren a diferents temps alíquotes de cada vial de cada lot per a cada RF i s'estudien les especificacions.
- La durada del període de re-anàlisi queda establert com el temps que es preveu d'ús de cada RF. En el cas de <sup>11</sup>C-PIB de 2 hores i en el cas de <sup>18</sup>F-FMISO de 6 hores. Al llarg d'aquest període es realitzen un mínim de sis determinacions repartides proporcionalment al llarg del temps total pre-definit.
- Es consideren com a tests d'estudi i especificacions els mètodes d'anàlisi definits en els apartats anteriors, consular la taula 74 on s'indica el test analític i la seva metodologia, i la taula 78 on estan definides les especificacions.
- Les especificacions que es consideren informatives i no susceptibles a re-anàlisi al llarg de l'estudi d'estabilitat són: CR, Asp, PRN, dissolvents residuals, endotoxines bacterianes i esterilitat. Les especificacions sotmeses a re-anàlisi a diferents períodes són PQ, PRQ, aspecte i pH. Per a l'estudi d'estabilitat, en la PQ s'estudia la variació en el temps de la concentració  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de principi actiu (PIB o FMISO) en lloc de la quantitat de principi actiu per dosi.
- Per al tractament de les dades es calcula el CV respecte el valor inicial.
- Els criteris d'acceptació són els mateixos que els definits per a cada especificació. Es considerarà que els RFs són estables al llarg del període definit d'ús si:



- Compleixen amb les especificacions dels tests susceptibles de variar en el temps al llarg del període d'estudi.
- Si no existeixen canvis significatius en les especificacions estudiades.

### 5.3.5 Resultats

Es van produir tres lots de cada RF i es va procedir al control de qualitat, essent tots ells conformes a les especificacions d'alliberació. A la taula 85 s'adjunten les dades més rellevants dels tres lots produïts de cada RF.

**Taula 85.** Estabilitat: taula amb les dades de concentració i activitat específica dels tres lots produïts de radiofàrmac per a l'estudi del test d'estabilitat.

	<sup>11</sup> C-PIB			<sup>18</sup> F-FMISO		
	Lot PE1	Lot PE2	Lot PE3	Lot FE1	Lot FE2	Lot FE3
<b>Concentració radioactiva</b> (MBq/mL) EOS	125,06	329,28	166,48	849,29	930,14	514,3
<b>Activitat específica</b> (GBq/μmol) EOS	42,44	133,81	170,5	105,34	77,79	194,41

EOS: Hora de la mesura que es realitza al final de la síntesi (*end of synthesis*). Lot PE: Lot PIB Estabilitat número 1, 2 o 3; Lot FE: Lot FMISO Estabilitat 1, 2 o 3.

Es va procedir a l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient i d'estabilitat accelerada de cada lot anterior analitzant les especificacions en sis períodes durant el temps pre-definit d'estudi, en el cas de <sup>11</sup>C-PIB fou de 2 hores i en el cas de <sup>18</sup>F-FMISO fou de 6 hores.

A continuació s'adjunten les taules dels resultats obtinguts i les gràfiques de la variació del contingut de principi actiu i/o impureses en cas que apliqui.

**Taula 86.** Estabilitat: taula de les determinacions de les especificacions sotmeses a variació al llarg de l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient de  $^{11}\text{C}$ -PIB.

**Estudi d'estabilitat de  $^{11}\text{C}$ -PIB a temperatura ambient al llarg de 2 hores**

Lot PE1	1	2	3	4	5	6	7	CV
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:14	00:26	00:35	00:45	01:17	02:04	<b>(%)</b>
$^{11}\text{C}$ -PIB (%)	98,49	98,43	98,20	98,45	98,37	98,06	100,00	0,66
PIB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,75	0,71	0,72	0,66	0,69	0,71	1,21	24,75
Impureses ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
pH	6,0	6,5	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	3,11
Aspecte	C	C	C	C	C	C	C	NA
Lot PE2	1	2	3	4	5	6	7	CV
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:15	00:37	00:56	01:20	01:44	02:01	<b>(%)</b>
$^{11}\text{C}$ -PIB (%)	98,49	98,97	99,20	99,04	99,21	99,30	100,00	0,46
PIB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,63	0,66	0,61	0,58	0,64	0,62	0,64	4,25
Impureses ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	NA
Aspecte	C	C	C	C	C	C	C	NA
Lot PE3	1	2	3	4	5	6	7	CV
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:14	00:33	00:51	01:10	01:25	01:57	<b>(%)</b>
$^{11}\text{C}$ -PIB (%)	98,12	98,71	98,74	98,15	98,72	98,82	98,95	0,33
PIB ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,25	0,27	0,28	0,27	0,28	0,26	0,25	4,70
Impureses ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	NA
Aspecte	C	C	C	C	C	C	C	NA

NA= no aplica, C= conforme a les especificacions, CV: coeficient de variació.

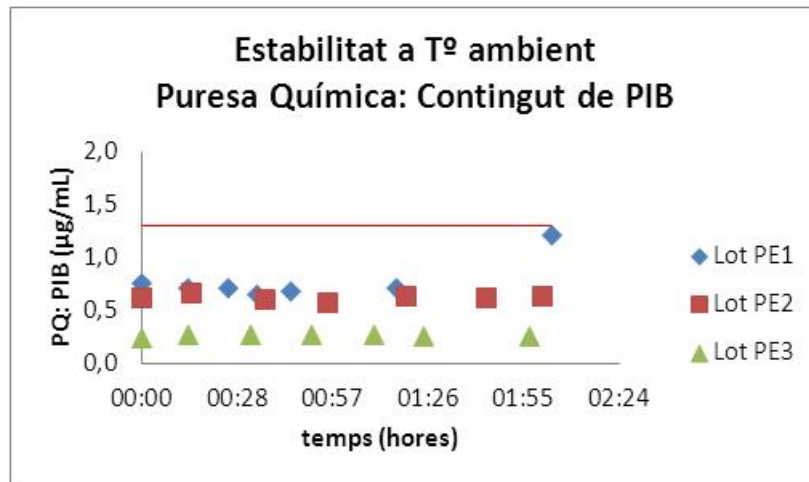
**Taula 87.** Estabilitat: Taula de les determinacions de les especificacions sotmeses a variació al llarg de l'estudi d'estabilitat accelerada de  $^{11}\text{C}$ -PIB.

**Estudi d'estabilitat accelerada de  $^{11}\text{C}$ -PIB al llarg de 2 hores**

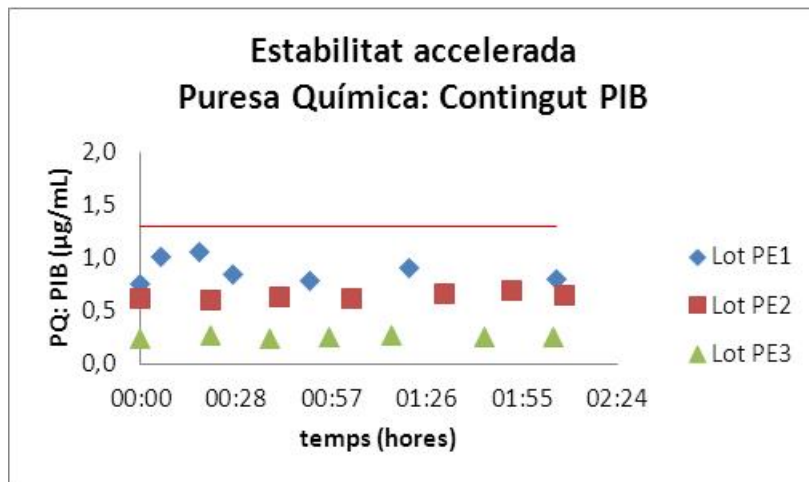
<b>Lot PE1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:06	00:18	00:28	00:51	01:21	02:06	<b>(%)</b>
<b><math>^{11}\text{C}</math>-PIB (%)</b>	98,49	98,44	98,94	98,96	98,57	99,01	100,00	0,54
<b>PIB (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,75	1,02	1,06	0,85	0,79	0,92	0,80	13,19
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
<b>pH</b>	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,5	6,5	3,97
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot PE2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:21	00:42	01:04	01:32	01:52	02:08	<b>(%)</b>
<b><math>^{11}\text{C}</math>-PIB (%)</b>	98,49	99,08	99,13	99,00	98,87	99,00	99,35	0,27
<b>PIB (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,63	0,61	0,63	0,63	0,67	0,70	0,66	4,90
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
<b>pH</b>	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	NA
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot PE3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:21	00:39	00:57	01:16	01:44	02:05	<b>(%)</b>
<b><math>^{11}\text{C}</math>-PIB (%)</b>	98,12	98,77	98,78	98,84	98,73	98,72	98,82	0,26
<b>PIB (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,25	0,27	0,25	0,26	0,27	0,26	0,27	4,41
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
<b>pH</b>	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	NA
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA

NA= no aplica, C= conforme a les especificacions, CV: coeficient de variació.

**Figura 42.** Estabilitat: gràfica de la variació del contingut de PIB en funció del temps en l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient.



**Figura 43.** Estabilitat: gràfica de la variació del contingut de PIB en funció del temps en l'estudi d'estabilitat accelerada.



**Taula 88.** Estabilitat: taula de les determinacions de les especificacions sotmeses a variació al llarg de l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient de  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

Estudi d'estabilitat de $^{18}\text{F}$ FMISO a temperatura ambient al llarg de 6 hores								
<b>Lot FE1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:32	02:02	03:05	04:04	04:47	05:44	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	99,52	99,45	99,35	99,12	98,93	98,76	99,22	0,28
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,09	1,15	1,09	1,11	1,10	1,10	1,11	1,86
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,35	1,27	1,13	1,34	1,12	1,23	1,42	8,97
<b>pH</b>	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	7,80	NA
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot FE2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:48	01:52	02:49	03:50	05:01	06:15	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	100	100	100	100	100	100	99,79	0,08
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,63	1,58	1,54	1,45	1,48	1,50	1,60	4,32
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,95	1,08	0,95	0,9	0,82	0,85	1,03	9,90
<b>pH</b>	8,08	8,05	8,04	8,04	8,00	8,03	8,04	0,30
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot FE3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	01:24	02:18	03:07	04:06	05:08	06:07	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	99,68	99,59	99,61	99,67	99,32	99,55	99,42	0,13
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,50	0,56	0,50	0,49	0,47	0,50	0,49	5,57
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	NA
<b>pH</b>	7,50	7,30	7,35	7,50	7,40	7,35	7,20	1,46
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	C	NA

NA= no aplica, C= conforme a les especificacions, CV: coeficient de variació.

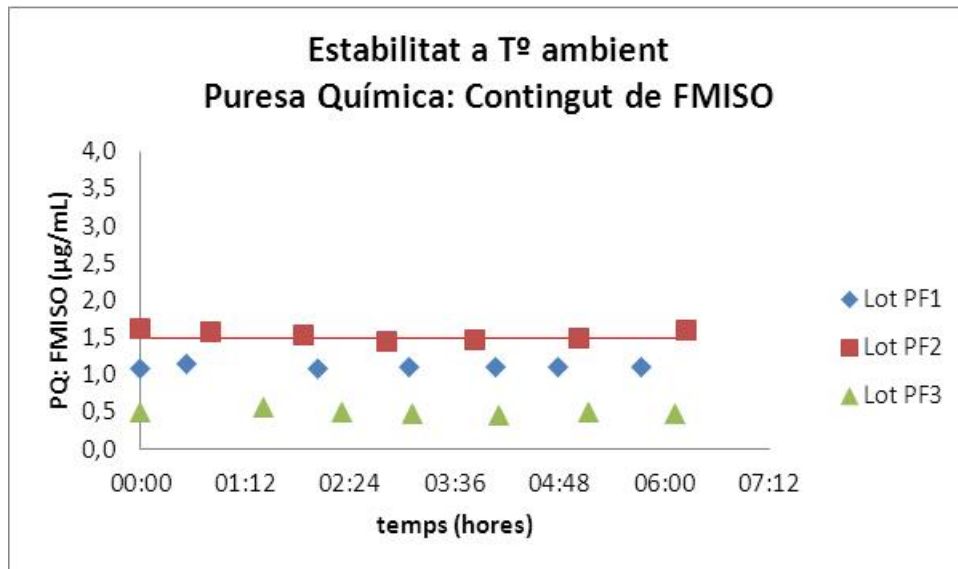
**Taula 89.** Estabilitat: taula de les determinacions de les especificacions sotmeses a variació al llarg de l'estudi d'estabilitat accelerada de  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

**Estudi d'estabilitat de  $^{18}\text{F}$ FMISO a temperatura accelerada al llarg de 6 hores**

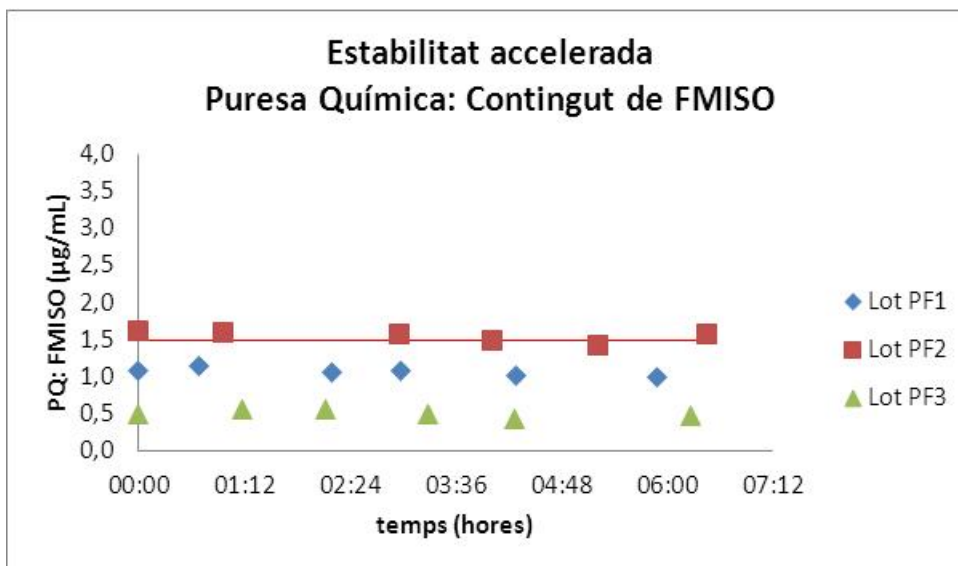
<b>Lot FE1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:41	02:12	02:59	04:17	05:53	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	99,52	99,29	98,76	99,06	98,52	97,72	0,65
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,09	1,14	1,06	1,09	1,03	0,99	4,91
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,35	1,26	2,48	2,83	2,64	2,12	31,65
<b>pH</b>	7,80	7,75	7,76	7,80	7,77	7,80	0,29
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot FE2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	00:58	02:58	04:01	05:13	06:27	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	100	98,98	99,87	99,9	99,89	99,91	0,38
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	1,63	1,61	1,58	1,5	1,43	1,58	4,86
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,95	0,87	1,2	1,15	1,16	1,33	15,28
<b>pH</b>	8,08	8,10	8,12	7,90	8,00	7,90	1,24
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	NA
<b>Lot FE3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>CV</b>
<b>Temps d'anàlisi</b>	00:00	01:11	02:07	03:17	04:16	06:16	<b>(%)</b>
<b><math>^{18}\text{F}</math>-FMISO (%)</b>	99,68	99,61	99,68	99,61	99,58	99,54	0,06
<b>FMISO (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,50	0,57	0,56	0,50	0,44	0,48	9,67
<b>Impureses (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
<b>pH</b>	7,50	7,50	7,50	7,40	7,36	7,23	1,47
<b>Aspecte</b>	C	C	C	C	C	C	NA

NA= no aplica, C= conforme a les especificacions, CV: coeficient de variació.

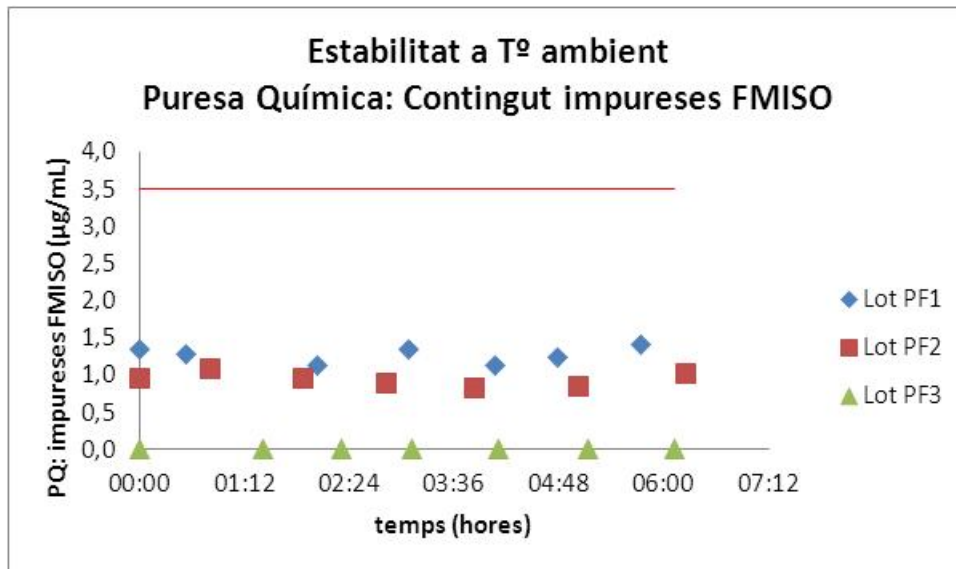
**Figura 44.** Estabilitat: gràfica de la variació del contingut de FMISO en funció del temps en l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient.



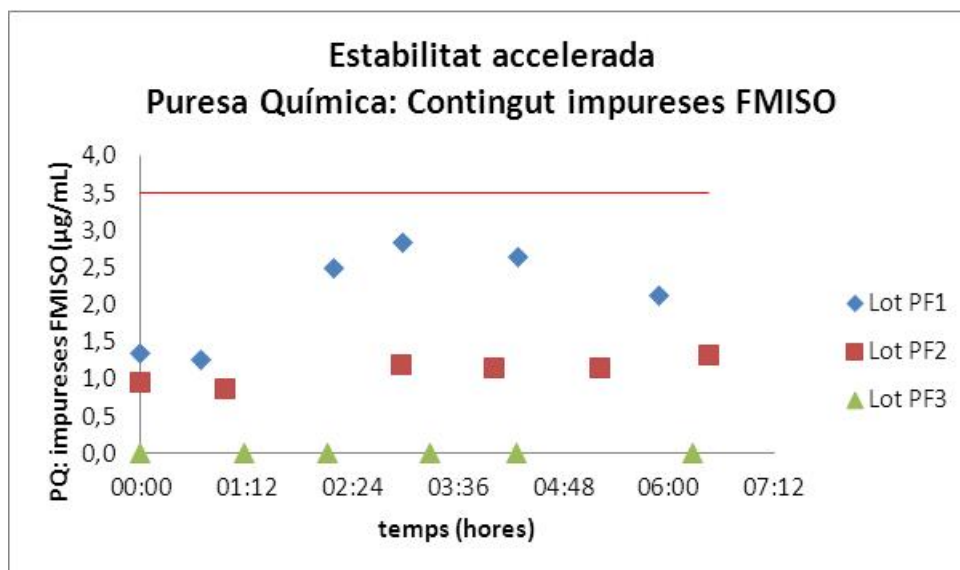
**Figura 45.** Estabilitat: gràfica de la variació del contingut de FMISO en funció del temps en l'estudi d'estabilitat accelerada.



**Figura 46.** Estabilitat: gràfica de la variació del contingut d'impureses de FMISO en funció del temps en l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient.



**Figura 47.** Estabilitat: Gràfica de la variació del contingut d'impureses FMISO en funció del temps en l'estudi d'estabilitat accelerada.





### 5.3.6 Discussió

A continuació es procedeix a la discussió de diferents aspectes que s'han observat en efectuar els estudis d'estabilitat.

#### **Representativitat dels lots per a l'estudi d'estabilitat**

Tal com indiquen les guies d'estabilitat de l'ICH adoptades per l'EMA<sup>129,130</sup>, es va procedir a realitzar els estudis d'estabilitat sobre tres lots conforme a les seves especificacions. Es varen escollir lots amb activitats/concentracions finals representatives de les activitats finals que es predeia per a l'ús de cada RF. Pel que fa a l'activitat/concentració final, considerant la possibilitat de radiòlisi que presenten els RFs a activitats/concentracions elevades i el període de semidesintegració dels RFs, s'observa la importància que en els estudis d'estabilitat s'utilitzin lots amb activitats elevades al final de síntesi. D'aquesta manera es disposa de suficient activitat per a determinar, al llarg de tot el període d'estudi, la PRQ i per poder valorar la possibilitat de radiòlisi del producte final. Per tant, es creu oportú que almenys un o dos dels tres lots dels estudis d'estabilitat tinguin l'activitat/concentració màxima dins de l'interval que es preveu que es pot produir. En el cas que, un cop aprovat el RF PET per al seu ús, en les produccions rutinàries se superin les activitats/concentracions validades en l'estudi d'estabilitat, s'hauria de fer el seguiment al llarg de la validesa establerta pel RF per tal d'assegurar que amb aquells nivells màxims no es produeixen productes de degradació i el lot continuï essent apte.

#### **Estudis de fotoestabilitat**

No es consideren aplicables als RFs atès a les característiques intrínseques que posseeix la radiació que emeten i a la normativa de radioprotecció, el vial del producte final és inseparable del blindatge extern i per aquest motiu la qualitat del producte final no es pot veure influenciada per la llum ambiental.

#### **Període d'estudi**

Tal com s'ha indicat a la introducció, la guia de RF<sup>60</sup> especifica que els períodes mínims establerts per les guies generals d'estabilitat (12 mesos) i d'estabilitat accelerada (6 mesos) no són aplicables als RFs de semivida inferior a un any, com és el cas dels RFs PET, i, per tant, s'han de justificar els períodes que s'utilitzin.

En el cas dels estudis realitzats, s'ha definit com a període d'estudi el temps que es preveu d'ús de cada RF calculat a partir de l'activitat màxima que es pot obtenir, la dosi del pacient i la semivida

del radioisòtop. En tractar-se de períodes curts, hores i no mesos, els estudis d'estabilitat i d'estabilitat accelerada es van anar realitzant al llarg de tot el període que es preveu d'ús, no com en les guies convencionals que redueixen a la meitat el temps d'estudi de l'estabilitat accelerada. Així d'aquesta manera, es coneix el perfil de degradació del producte al llarg de tota la seva vida útil.

Per una altra banda, allargar més el temps d'aquests estudis, no es considera acceptable ja que passat el temps establert, en el lot no hi hauria suficient dosi per a un pacient, per tant, no seria injectable. Alhora amb el temps disminueix l'activitat i la PRQ es fa no determinable cromatogràficament.

### **Nombre de determinacions al llarg del període d'estudi**

Al llarg del període d'estudi definit tant per als estudis d'estabilitat com per als d'estabilitat accelerada, es van anar fent diferents determinacions de totes les especificacions que es van considerar que es podrien veure afectades per la influència de les condicions ambientals. Aquest nombre de determinacions es va anar repartint de forma proporcional en el temps. Com es pot observar a les taules, la primera mesura és la determinació per a la conformitat del lot. En tots els estudis, excepte els d'estabilitat accelerada de  $^{18}\text{F}$ -FMISO, hi ha unes sis determinacions posteriors a l'alliberació del lot fins al període d'ús del RF. En el cas dels estudis d'estabilitat accelerada de  $^{18}\text{F}$ -FMISO hi ha 5 determinacions. Això es deu a què els temps cromatogràfics per a  $^{18}\text{F}$ -FMISO són més llargs que pel PIB i en disposar només d'un HPLC s'havien d'anar intercalant injeccions d'estabilitat a temperatura ambient i d'estabilitat accelerada.

Respecte al nombre de determinacions al llarg del període d'ús, és suficient realitzar unes 4 o 6 determinacions. Un avantatge que presenten els RFs respecte als medicaments convencionals, és que els seus controls analítics són curts, ràpids i permeten saber just acabat de fer el control el resultat obtingut, així en el cas que es determinés una impuresa mentre s'està realitzant l'estudi d'estabilitat, es podrien incrementar els intervals de control per tal de monitoritzar millor el comportament de la impuresa.

### Especificacions a determinar en els estudis d'estabilitat

A continuació es procedeix a exposar i discutir els criteris usats per a establir les especificacions dels RFs susceptibles de ser estudiades en un estudi d'estabilitat.

- CR (MBq/mL) i l'Asp (GBq/ $\mu$ mol)

Aquests són paràmetres que depenen de la radioactivitat de la solució final i aquesta depèn del radionúclid i de la seva semivida que és una constant que varia amb el temps. Per tant la seva variació és coneguda en el temps. En el cas de l'Asp aquest paràmetre també depèn de la PQ, però aquest test ja es determina individualment en els estudis d'estabilitat. Per tant, ens trobem davant de dos paràmetres dels quals només es considera d'interès la seva determinació al final de la síntesi sense haver d'estudiar la seva variació al llarg del temps.

- PRN

La PRN és un paràmetre que també depèn del radionúclid i l'identifica, a més, el propi test té una durada llarga, per exemple en el cas del C-11 d'uns 25 min. La pròpia inestabilitat del radionúclid és coneguda, per tant, no es creu necessària la seva determinació al llarg dels períodes d'estudi del test d'estabilitat.

- Dissolvents residuals

El producte final es manté en un vial estanc, per tant, la quantitat de dissolvents residuals en el producte final no varia. Per aquest motiu es considera un paràmetre que no té interès la seva determinació al llarg dels estudis d'estabilitat.

- Endotoxines bacterianes i esterilitat

No es considera que pugui existir cap procés que alteri l'esterilitat ni la quantitat d'endotoxines del producte final, ja que aquest es manté en un vial estanc. A part, són paràmetres que es poden determinar després de l'alliberació del producte final, ja que requereixen cert temps d'anàlisi. Per tant, no es determinaran en els estudis d'estabilitat.

- PRQ

La PRQ és un test que permet l'estudi de les possibles impureses radioactives que es puguin crear al llarg del període de validesa del RF i permet estudiar la radiòlisi del RF. Per tant, és un paràmetre imprescindible a ser determinat al llarg dels estudis d'estabilitat.

- PQ

Igual que la PRQ, la PQ és un test clau per tal d'estudiar l'estabilitat del producte final i les possibles impureses en massa que es poden crear.

En el test de PQ, es determinen certes impureses químiques conegudes que pot contenir el producte final, com és el cas del criptand en el RF  $^{18}\text{F}$ -FMISO, en aquest cas el criptand no es degrada ni es transforma ni es concentra amb el pas del temps, per tant, només es determina al final de la síntesi per assegurar que el producte final compleix l'especificació. Tota impuresa que no es determini és recomanable justificar-ne la seva no determinació.

- Aspecte i pH

L'aspecte i el pH són paràmetres susceptibles de canviar en el temps, pels possibles productes de degradació que puguin aparèixer, i, per tant, cal que siguin determinats al llarg dels estudis d'estabilitat.

### **Tractament de les dades i criteri d'acceptació**

Les guies generals de l'EMA i de l'ICH<sup>129,130</sup> estableixen diferents mètodes per tractar les dades d'estabilitat:

1. Regressió lineal per tal de poder extrapolar l'aparició de la degradació del producte en el temps.
2. Coeficient de variació respecte al valor inicial.
3. També considera que quan les dades demostren visualment que les variacions són molt petites no cal aplicar cap test estadístic, amb una justificació és suficient.

Amb el nombre de valors que es tenen de cada estudi s'escull el càlcul del CV per estudiar les dades d'estabilitat. Però en molts tests, sobretot la determinació d'impureses del test de PQ, en tractar amb àrees cromatogràfiques molt petites, petites variacions produïen una gran variació en el càlcul del CV. Per tant, es considera un criteri més ampli d'acceptació, un 10 % davant del 5 % que recomanen les guies. I, en el cas que la variació superi el 10 %, es considera aplicar el punt 3 i estudiar la variació en el temps a partir d'una gràfica de tendències i considerant els valors obtinguts a temperatura ambient i accelerada.

### **Condicions de l'estudi**

La guia d'estabilitat de l'ICH adoptada per l'EMA<sup>129</sup> indica les condicions per a portar a terme l'estudi d'estabilitat: estabilitat a llarg termini ( $25 \pm 2^\circ\text{C} / 60 \pm 5 \%$ ) i l'estabilitat accelerada ( $40 \pm 2^\circ\text{C} / 75 \pm 5 \%$ ). Les condicions en què s'ha fet l'estudi han estat lleugerament diferents en realitzar-se en les condicions ambientals controlades del laboratori d'anàlisi: estudi a temperatura ambient ( $22 \pm 2^\circ\text{C} / 50 \pm 5 \%$ ) i d'estudi estabilitat accelerada ( $40 \pm 2^\circ\text{C} / 50 \pm 5 \%$ ). S'observa que les condicions d'humitat són diferents en els dos estudis, però amb la conformitat del test d'estanqueïtat del producte final queda justificat que les condicions d'humitat ambiental no influeixen en el producte final en ser un vial estanc. Pel que fa a la temperatura de l'estudi a temperatura ambient, es realitza a les condicions del laboratori que són les mateixes a les que es conservarà la mostra. La influència de temperatures majors s'estudia a l'estabilitat accelerada.

### **Resultats obtinguts en els lots de validació**

#### <sup>11</sup>C-PIB

- Activitat específica i concentració radioactiva

Es realitzen tres síntesis, dues d'elles amb una Asp alta: de l'ordre de 150 GBq/ $\mu\text{mol}$ , i l'altra amb una CR elevada: al voltant 300 MBq/mL (taula 85). Per tant s'estudia l'estabilitat sobre lots amb elevada Asp i CR, complint la recomanació especificada anteriorment.<sup>xxix</sup>

- Puresa radioquímica

Les variacions observades tant a temperatura ambient com a accelerada presenten CV < 1 % (taules 86 i 87), pel que es considera que la PRQ es manté estable al llarg del temps d'ús del RF.

- Puresa química, concentració de principi actiu.

El contingut de PIB en els lots PE2 i PE3 es mantenen estables, amb un CV < 5 % en els dos tipus d'estudis (taules 86 i 87). S'observa que el lot PE1, que és el lot que conté més quantitat de PIB, presenta un CV > 10 %, per tant, es procedeix a observar les gràfiques de variació al llarg del temps (figures 42 i 43). En l'estudi d'estabilitat a temperatura ambient s'observa que es tracta de l'últim punt el que fa variar el CV (figura 42). En observar l'estudi d'estabilitat accelerada es veu una tendència a l'alça en contingut de PIB

---

<sup>xxix</sup> La síntesi dels estudis d'estabilitat de <sup>11</sup>C-PIB es realitza amb un mòdul de síntesi diferent, Bioscan Mei Plus<sup>TM</sup>, que està més optimitzat i permet obtenir majors activitats específiques i per tant estudiar el perfil d'impureses en el pitjor cas tal com és necessari en els estudis d'estabilitat: posteriorment es va realitzar tres lots de validació amb el mòdul de síntesi de GEHC i amb els resultats obtinguts es va demostrar l'equivalència entre estudis.

que posteriorment es recupera (figura 43). En cap dels casos se supera el límit en quantitat de PIB (1,3 µg/mL), per tant en tots els casos el producte seria apte per a ser injectat. Com que no s'observa una tendència clara en el comportament del paràmetre quantitat de PIB, es recomanaria incloure algun lot d'estabilitat amb quantitat de PIB superior o igual 0,75 µg/mL<sup>xxx</sup>.

– Puresa química, concentració d'impureses

No es detecten impureses en cap dels tres lots. Pel que es considera el producte estable al llarg del temps en no generar-se cap impuresa ni en els estudis d'estabilitat accelerada. Cal considerar que, si mai es realitza un lot on es detecti una impuresa, caldrà estudiar el comportament de la impuresa al llarg de 2 hores, definides d'estabilitat, per observar si varia al llarg del temps. En els lots de validació de procés, *apartat 5.2*, tampoc es detecten impureses.

– pH

Aquest paràmetre s'observa que no varia al llarg del temps en dos dels lots (PE2 i PE3) i en cap dels dos tipus d'estudi, només existeix un lot (PE1) on la variació és < 4 % (taules 86 i 87). Aquest valor es deu a què la determinació del pH es realitza per tira reactiva i els valors viren de 0,5 unitats en 0,5. De totes maneres, amb els valors obtinguts es pot considerar que el pH es manté al llarg de la vida útil del RF.

### <sup>18</sup>F-FMISO

– Especificacions:

Els tres lots de validació compleixen especificacions (taules 88 i 89). En el cas del Lot PF2, està limitat per volum ja que el lot conté 1,63 µg FMISO/mL, aplicant l'equació 21 de la taula 75, sabent que el màxim a injectar és de 15 µg FMISO, s'obté que el volum màxim a injectar és de 9,2 mL. Al cap de 6 h es continua complint l'especificació ja que la concentració de 930,14 MBq/mL passaria a tenir un valor de 95,65 MBq/mL, si la dosi a injectar de <sup>18</sup>F-FMISO és de 370 MBq el volum de la dosi seria de 3,9 mL, per tant, no se superaria el volum màxim.

– Activitat específica i concentració radioactiva:

Un dels lots, al final de síntesi, conté una concentració elevada, al voltant de 1.000 MBq/mL (taula 85) tal com es recomana per poder estudiar les impureses derivades d'un possible procés radiolític.

---

<sup>xxx</sup> Els tres lots realitzats amb el mòdul de GEHC, tant els estudis d'estabilitat accelerada com a temperatura ambient ,el CV té un valor < 10 %. Per tant, el que va succeir en l'últim punt del Lot PE1 es considera un fet aïllat.

- Puresa radioquímica:

Les variacions observades tant a temperatura ambient com a accelerada presenten CV < 1 % (taules 88 i 89), per tant, es considera que la PRQ es manté estable al llarg del temps definit per al RF.

- Puresa química, concentració de principi actiu

S'observa que en els dos estudis el CV < 10 % (taules 88 i 89) i en les gràfiques de variació (figura 44 i 45) no s'observa cap tendència de variació, per tant, el comportament és estable.

- Puresa Química, concentració d'impureses

El lot FE3 no presenta impureses (taules 88 i 89). En els altres dos lots sí que s'observen impureses. En l'estudi a temperatura ambient la variació es manté estable < 10 %. Però s'observa que en l'estudi d'estabilitat accelerada se supera el valor del 10 % de CV i en consultar les gràfiques (figura 46 i 47) s'observa una tendència a l'augment de la quantitat d'impureses. Aquest fet té sentit, ja que és un producte que no es pot autoclavar perquè a temperatures de 120°C es generen impureses. Per tant, es pot concloure que és un producte sensible a la temperatura i que cal conservar-lo com a temperatura ambient.

- pH

S'observa que en tots tres lots i en els dos tipus d'estudi, la variació és < 1,5 % (taules 88 i 89). Per tant, queda demostrat que el pH es manté al llarg de la vida útil definida per al RF.

### 5.3.7 Conclusions

Amb els resultats obtinguts es considera que el <sup>11</sup>C-PIB és estable al llarg de les 2 hores i que el <sup>18</sup>F-FMISO és estable al llarg de 6 hores. Per tant, el període de validesa d'aquests RFs conservats a temperatura ambient és de 2 h i 6 h respectivament.

D'altra banda, es poden donar unes pautes específiques per a la realització dels estudis d'estabilitat dels RFs PET que són:

- Realitzar els estudis sobre tres lots de RF que continguin, almenys dos d'ells, l'activitat final i/o concentració màxima.
- Les condicions ambientals dels estudis d'estabilitat a temperatura ambient i estabilitat accelerada han de ser controlades i semblants a les definides a les guies convencionals.
- Els estudis de fotoestabilitat no són aplicables als RFs PET.

- El període d'anàlisi del test d'estabilitat s'ha de definir prèviament a la realització de l'estudi en funció de l'activitat màxima que es pot obtenir, la dosi del pacient i la semivida del radioisòtop.
- Realitzar un mínim de quatre determinacions de les especificacions sotmeses a l'estudi d'estabilitat. Aquestes han d'estar repartides proporcionalment al llarg del període pre-definit d'ús del RF. Caldrà Justificar increments o disminucions.
- Les especificacions a determinar al llarg dels estudis d'estabilitat són: PRQ, PQ, aspecte i pH.
- Aplicar pel tractament de les dades: regressió lineal, coeficient de variació o valoració visual de les dades.
- Criteri d'acceptació: compliment de totes les especificacions susceptibles a variar al llarg del període d'estudi i que les variacions observades siguin no significatives.





## 6 Discussió

Al llarg d'aquesta tesi s'ha anat discutint cada apartat de forma específica. Com a discussió resum de tot el treball realitzat es considera rellevant tractar a continuació els principals inconvenients que justifiquen la realització d'aquesta tesi.

### Normativa/guies a aplicar

Tot el desenvolupament del treball s'ha realitzat en base a les guies/normatives vigents: NCF, ICH, Farmacopees (principalment Ph. Eur. i RFE) per tal de poder assegurar la qualitat de la preparació radiofarmacèutica. Encara que existeixen textos específics per als RFs com:

- Annex 3 de les NCF sobre Fabricació de RF<sup>29</sup>.
- Monografia sobre preparacions radiofarmacèutiques de la Ph. Eur. (*Radiopharmaceutical preparations* 01/2014:0125)<sup>36</sup>.
- Guia de Bones practiques radiofarmacèutiques de la EANM (*Guidelines on current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals*)<sup>42</sup>.
- Guia de RFs (*Guideline on Radiopharmaceuticals: EMEA/CHMP/QWP/306970/2007*) de l'EMA<sup>60</sup>.

Aquests apliquen a l'ampli grup dels diferents tipus de RFs: generadors de radionúclids, kits per a preparar solucions extemporànies de RFs, PRs de radionucleïds com a RFs i RFs PET. Això fa que siguin poc detallats a l'hora de desenvolupar i definir les especificacions i mètodes analítics per tal de validar un RF PET. Addicionalment, a l'hora de validar els mètodes analítics s'ha d'utilitzar la normativa vigent per als medicaments convencionals que no tenen en compte les peculiaritats associades als RFs. Un dels casos on es veu més reflectida aquesta problemàtica és a l'hora de portar a terme els estudis d'estabilitat. Tot i existir la guia de l'EMA de RFs (EMEA/CHMP/QWP/306970/2007)<sup>60</sup>, que cita concretament que les guies generals d'estabilitat no són aplicables en la seva totalitat als RFs, entre elles: *Stability Testing of new Drug Substances and Products* (ICH Topic Q 1 A (R2))<sup>129</sup> i *Evaluation of stability data* (ICH Topic Q 1 E)<sup>130</sup>. La guia dóna unes indicacions per als estudis d'estabilitat, però aquestes no són suficients per portar-los a terme. Per això, el que s'ha realitzat és una adaptació d'aquestes guies ICH, respectant les directrius de la guia de l'EMA.

Una altra problemàtica ha estat la definició de les especificacions, ja que els RFs, en el moment del desenvolupament de la tesi, eren RFs sense monografia específica a les farmacopees. En

aquest aspecte s'ha trobat de gran utilitat recórrer a les monografies de RFs PET existents per tal de definir les especificacions.

Un altre aspecte a tenir en compte és que la normativa i les guies s'actualitzen de forma periòdica i sorgeixen nous requeriments. Per exemple, en aquest any 2014, a la Ph. Eur. 8.0 s'han publicat noves monografies com:

- La monografia sobre detecció i mesura de la radioactivitat (2.2.66. *Detection and measurement of radioactivity*, 01/2014:20266)<sup>106</sup> que especifica un criteri d'acceptació per a la PRNA (Espectrometria gamma:  $\pm 10$  KeV o  $\pm 6$  % (escollir el valor major)). El treball aquí presentat compleix amb el criteri definit, tot i que la part experimental es va realitzar anteriorment a la publicació.
- La primera monografia específica per al <sup>18</sup>F-FMISO (*Fluoromisonidazole (<sup>18</sup>F) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup>, fet que reforça la importància de l'aplicació clínica del RF validat en el treball i agilitza els tràmits per al seu ús. Més endavant, dins aquest apartat, es compara la validació realitzada amb la nova monografia publicada.

Amb tot el que s'ha esmentat es vol recalcar que la validació realitzada no és definitiva, ja que s'ha d'anar actualitzant i adaptant als nous requeriments que puguin anar sorgint per normativa i al mateix temps per qualsevol canvi a les instal·lacions, en el procés de fabricació i control dels RFs que pugui afectar a la validació realitzada. Però, si compleix el requisit de demostrar que el medicament elaborat és segur, estable i de qualitat.

### **Volum del producte final**

Generalment el volum dels RFs PET és molt petit (de l'ordre de mL, en el cas dels RFs d'estudi és de 15 mL) comparat amb els medicaments convencionals (de l'ordre de litres). Això fa que es disposi de molt poc volum per a poder realitzar tota la bateria d'anàlisis per lot. Aquest fet s'ha solucionat de diverses maneres:

- Utilitzant i/o validant volums petits pels mètodes analítics definits, com és el cas del test d'esterilitat on s'han validat 0,5 mL per medi de cultiu quan per normativa s'utilitza 1 mL, la determinació del pH per tira reactiva que requereix menys volum que fer la determinació per potenciometria, el test d'endotoxines que necessita només 10 µL de mostra.

- Demostrant que el producte final està molt per sota del límit de les especificacions i, per tant, és justificable un control reduït del test, com és el cas dels residus metàl·lics on es corrobora que el producte final conté valors de cada metall menors al 30 % del límit establert o la càrrega microbiana on s'obtenen valors de 0 ufc/mL, i es justifica un control reduït del test davant la impossibilitat de poder-lo realitzar per a cada lot.

### **Dosi traça**

Els RFs estan presents en el producte final a nivells traça (ordre de µg) això fa que es requereixin mètodes molt sensibles per a la determinació quantitativa del principi actiu i de les possibles impureses que es puguin generar al llarg del procés de síntesi.

Al mateix temps és una característica que es converteix en un avantatge, ja que difícilment els analits estaran presents a unes concentracions que superin els límits toxicològics permesos, fet que també es reforça considerant que generalment els pacients reben una dosi única de RF.

### **Semivida**

Els RFs PET presenten una semivida molt curta de l'ordre de minuts o hores, que en el cas dels RFs d'estudi és aproximadament de 20,4 min per al <sup>11</sup>C-PIB i de 110 min per al <sup>18</sup>F-FMISO. Això fa que calguin mètodes analítics molt curts, fet que dificulta el seu desenvolupament i validació. Per exemple, els mètodes utilitzats per determinar la PQ, PRQ i dissolvents residuals tenen un temps d'anàlisi inferior a 10 min. També en el cas del test d'endotoxines, encara que les NCF en l'annex 3 de RFs<sup>29</sup> i la monografia de la Ph. Eur. sobre preparacions radiofarmacèutiques<sup>36</sup> permeten alliberar el lot produït sense obtenir la conformitat del test, s'ha utilitzat una tècnica que permet la determinació d'endotoxines en només 15 minuts, avantatge per al F-18, de major semivida que el C-11, ja que es pot obtenir el resultat abans de l'administració del RF.

### **Radioactivitat**

El tret característic que diferencia els RFs dels medicaments convencionals és la radioactivitat. Això fa que existeixin paràmetres específics a determinar en els RFs com: la PRQ, l'Asp, la CR, la PRN i la identificació del radioisòtop.

Per definir les especificacions d'aquests paràmetres, a part de consultar la monografia sobre preparacions radiofarmacèutiques de la Ph. Eur. (*Radiopharmaceutical preparations* 01/2014 :0125)<sup>36</sup>, ha estat de gran utilitat fer una revisió de les monografies existents de RFs marcats amb el radioisòtop del RF d'estudi.

### **Síntesi del RF**

La síntesi dels RFs PET té la peculiaritat que el principi actiu se sintetitza “in situ” en el procés de producció, és a dir, es parteix de dos PRs, el PRad provinent del ciclotró i el PR “fred” o centre actiu. Per tant, s’ha de tenir en compte que els dos PRs poden quedar com a impuresa en el producte final i, per tant, s’han de determinar en la PRQ i la PQ respectivament. També cal tenir en compte que cal conèixer el procés de producció del PR “fred” ja que les possibles impureses del PR poden quedar en el producte final. Per aquest motiu s’han determinat els residus metàl·lics del PR en el producte final.

### **Monografia específica per al $^{18}\text{F}$ -FMISO**

Tal com s’ha comentat, a l’any 2014 s’ha publicat la primera monografia específica per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO (*Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ ) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup>. A continuació s’adjunta una taula (taula 90) amb la comparativa d’especificacions i dels mètodes analítics recomanats per la Ph. Eur. i els que han estat utilitzats en el treball.

De forma general, es pot observar que es coincideix en les especificacions definides, encara que existeixen certs tests on el límit usat és més restrictiu o bé, aquells que es supera el límit definit per la nova monografia, els lots de validació complirien les noves especificacions. En el cas de la PRNB caldria afegir un test analític que, a causa de la impossibilitat de realitzar el test posteriorment a la publicació de la monografia, no s’ha pogut demostrar.

Un altra observació és que en el cas que s’hagin utilitzat mètodes analítics diferents aquests han estat validats.

Cal esmentar que tant les especificacions i certs mètodes analítics s’han basat en el Dossier públic de producte en investigació de  $^{18}\text{F}$ -FMISO del *National Cancer Institute (Investigator’s Brochure: [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO)*<sup>58</sup>. Les especificacions i validacions realitzades van ser avaluades per l’AEMPS per tal d’aconseguir l’aprovació del PEI FMISO, obtenint-se un resultat favorable (PEI nº10-105<sup>38</sup>).

**Taula 90.** Conclusió: Taula on es realitza la comparativa entre les especificacions i els mètodes analítics recomanats per la monografia específica de  $^{18}\text{F}$ -FMISO (*Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ ) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup> i els proposats en el treball.

Test analític	Ph. Eur. (01/2014:2459) <sup>26</sup>	Especificacions $^{18}\text{F}$ -FMISO	Justificació	
<b>Identificació</b>	A (Test PRNA)	0,511 MeV (1,022 MeV pic sumatori)	0,511 MeV (1,022 MeV pic sumatori)	
	B (Test PRNB)	105 min – 115 min	105 min – 115 min	
	C	TR principal del radiocromatograma mostra aproximadament el mateix TR que el pic principal del cromatograma de la solució de referència.	TR principal del radiocromatograma mostra aproximadament el mateix TR que el pic principal del cromatograma del patró FMISO.	Les especificacions i la metodologia d'anàlisi definides en el treball per a cada test analític coincideixen amb la monografia.
<b>Aspecte i pH</b>	Aspecte i partícules	Solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles.	Solució límpida, incolora o lleugerament grogosa, sense partícules visibles.	Les especificacions i la metodologia d'anàlisi definides en el treball per a cada test analític coincideixen amb la monografia.
	pH	4,5 - 8,5 Tira indicadora de pH.	4,5 - 8,5 Tira indicadora de pH.	
<b>Concentració radioactiva i activitat específica</b>	Concentració	No descrit.	Informatiu per contingut.	No està definida en la monografia reforçant el fet que en el treball doctoral s'hagi recomanat de deixar-los com a paràmetres informatius.
Activitat específica	No descrit.	Informatiu definir per estudi.		
<b>Puresa radioquímica</b>	Àrea $^{18}\text{F}$ -FMISO	≥ 95,00 %	≥ 95,00 %	Es coincideix amb l'especificació de la PRQ de $^{18}\text{F}$ -FMISO. La diferència la trobem en el mètode analític que és diferent, punt no crític al haver-se validat.
	$^{18}\text{F}$ -	≤ 5 % TLC	Forma part del sumatori d'impureses que ha de ser ≤ 5 %	En el treball el test de determinar el $^{18}\text{F}$ - en el producte final s'ha inclòs dins de la validació del mateix mètode analític per determinar la PRQ i entra dins l'especificació definida de ≤ 5 %.

Test analític	Ph. Eur. (01/2014:2459) <sup>26</sup>	Especificacions <sup>18</sup> F-FMISO	Justificació	
Puresa química	FMISO	≤ 0,1 mg/V (≤ 10 µg si Vmax=10 mL)	dosi ≤ 15 µg	El límit definit per FMISO és 5 µg major que el de Ph. Eur. El límit es va establir segons el NCI-IB-FMISO <sup>58</sup> . En cas que fos requerit el límit menor, observant els resultats de validació, es compliria amb aquest criteri i més considerant la possibilitat de limitar per volum la dosi a injectar. Com es pot observar, la mateixa monografia expressa els límits en funció del volum. Una altra diferència és que s'utilitzen mètodes analítics diferents, punt no crític al validar el mètode proposat.
	Impureses	IMP-FMISO ≤ 0,1 mg/V (≤ 10 µg si Vmax=10 mL)	No es va definir límit.	La Ph. Eur. defineix un límit individual per impuresa i després un de global. En el cas del treball no es va definir un límit individual per impuresa però si un límit global que és més restrictiu que el global definit per Ph. Eur.
		Altres impureses: per cada impuresa ≤ 0,1 mg/V (≤ 10 µg si Vmax=10 mL)	No es va definir límit.	Una altra diferència és que s'utilitzen mètodes analítics diferents, punt no crític al validar el mètode proposat.
	Suma total ≤ 0,5 mg/V (≤ 50 µg si Vmax=10 mL)	Suma total ≤ 35 µg suma d'impureses	En cas que es volgués determinar cada impuresa individualment el mètode analític ho permetria al incloure IMP-FMISO en la validació. La Ph. Eur., a diferència de la metodologia proposada, introdueix la determinació de la mescla d'estereoisòmers en el producte final però especifica que no és necessària aquesta determinació per demostrar el compliment del producte final. Per tant no es considera crític el fet de no haver determinat aquests compost. Tant l'especificació com el mètode analític es va establir en base al NCI-IB-FMISO <sup>58</sup> .	

Test analític	Ph. Eur. (01/2014:2459) <sup>26</sup>	Especificacions <sup>18</sup> F-FMISO	Justificació	
Dissolvents residuals	Criptand	≤2,2 mg/Vmax (≤220 µg/mL si Vmax=10 mL)	≤ 50 µg/mL criptand	<p>Considerant que el volum màxim és de 10mL el límit establert pel criptand està per sota per sota del Ph. Eur., per tant és més restrictiu.</p> <p>El mètode analític descrit per la Ph. Eur. també es realitza per TLC però amb diferents reactius. Aquest punt no es considera crític al haver validat el mètode analític.</p> <p>Tant l'especificació com el mètode analític es va establir en base al NCI-IB-FMISO<sup>58</sup>.</p>
	TBA	≤2,6 mg/V	ND	<p>En el procés de síntesi de <sup>18</sup>F-FMISO utilitza criptand en lloc de TBA com a catalitzador de transferència de fase així que no es requereix la seva determinació.</p>
	Etanol Èter Acetona Acetonitril	10 % (V/V) amb un màxim de 2,5 g per administració Resta dissolvents residuals d'acord amb monografia 5.4. Residual Solvents (01/2008:50400) <sup>75</sup> .	Informatiu 5.000 ppm <sup>75</sup> 5.000 ppm <sup>75</sup> 410 ppm <sup>75</sup>	<p>S'observa que es compleix amb les especificacions definides per la nova monografia. L'etanol en el producte final està present al 2,5 % valor dins els límits definits per la Ph. Eur. (10 %). La resta de dissolvents s'han limitat usant la monografia 5.4 <i>Residual Solvents</i><sup>75</sup> tal com cita la Ph. Eur.</p> <p>Respecte al mètode analític proposat tal com permet la monografia, s'utilitza un mètode alternatiu al 2.4.24<sup>78</sup> que s'ha validat.</p> <p>Com a punt important la monografia cita que es pot alliberar el lot abans de completar aquest test. Amb el mètode analític validat en el treball s'obté el resultat amb la conformitat del test abans de l'alliberació del lot produït</p>



Test analític	Ph. Eur. (01/2014:2459) <sup>26</sup>	Especificacions <sup>18</sup> F-FMISO	Justificació	
<b>Puresa radionucleídica</b>	A (Test PRNA)	Diferents 0,511MeV (1,022 MeV pic sumatori)	0,511MeV (1,022 MeV pic sumatori)	La monografia, a diferència de la metodologia proposada, deixa el càlcul de la semivida com a identificació B i inclou com a PRNB deixar decaure una mostra de RF unes 24h per tal que el F-18 hagi decaigut i determinar que les impureses no siguin superiors al 0,1 %. Al ser un test introduït recentment no va ser realitzat i en el IMPD de FMISO no es va incloure. Per tant es recomana la seva realització. De totes maneres amb la investigació a priori es descarta tota impuresa provinent del blanc. Cal esmentar que l'especificació es va establir en base al NCI-IB-FMISO <sup>58</sup> i que les especificacions definides es varen presentar en el PEI nº10-10538 amb resolució favorable per part de l'AEMPS.
	B (Test PRNB)	24h < 0,1 % impureses	105 min – 115 min	
<b>Test esterilitat</b>	Esterilitat	Estèril	Estèril	D'acord amb la monografia de preparacions radiofarmacèutiques <sup>36</sup> .
<b>Test Endotoxines</b>	Mostra	175/V (< 17,5 IU/mL si Vmax=10 mL)	< 17,5 IU/mL	Considerant el volum màxim de 10 mL es compleix especificació.

PRQ: puresa radioquímica, PRNA: puresa radionucleídica A, PRNB: puresa radionucleídica B, TR: temps de retenció, NCI-IB-FMISO: Dossier públic de producte en investigació de <sup>18</sup>F-FMISO del *National Cancer Institute (Investigator's Brochure [<sup>18</sup>F]FMISO)<sup>58</sup>, Vmax: volum màxim d'injecció.*

## 7 Conclusions

Per als dos RFs d'estudi  $^{18}\text{F}$ -FMISO i  $^{11}\text{C}$ -PIB:

- Han estat definides les especificacions que ha de complir cada lot de producte per a ser alliberat per al seu ús.
- S'han validat els mètode analítics desenvolupats per a la determinació de:
  - Puresa radioquímica
  - Puresa química
  - Dissolvents residuals
  - Esterilitat
  - Endotoxines
- La validació de procés ha estat superada amb la conformitat en totes les especificacions definides de tres lots consecutius de cada RF.
- S'ha determinat l'estabilitat dels RFs d'estudi essent de 2 h per al  $^{11}\text{C}$ -PIB i de 6 h per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO.

La tesi serveix com a model de procediment de treball general per dur a terme la validació dels mètodes analítics dels RFs PET per al seu ús en humans.

D'altra banda es creu convenient remarcar el valor més important del treball realitzat al haver-se aconseguit simplificar certes metodologies analítiques davant el buit normatiu, entre elles:

- Puresa química

Els mètodes analítics validats permeten en menys de 10 minuts determinar la PQ i la PRQ del lot produït.

- Puresa radioquímica

Tal com s'ha comentat, la primera monografia específica per al  $^{18}\text{F}$ -FMISO (*Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ ) injection*, 01/2014:2459)<sup>26</sup> inclou un control addicional al mètode per HPLC que és la determinació del  $^{18}\text{F}$ -Fluorur per TLC. En el cas del mètode definit i validat de HPLC per a determinar la PRQ del  $^{18}\text{F}$ -FMISO s'ha validat la determinació de  $^{18}\text{F}$ -Fluorur en el mateix mètode analític, per tant, no es necessita una anàlisi complementària per TLC per determinar la impuresa  $^{18}\text{F}$ -Fluorur.

- Concentració radioactiva i activitat específica

Es recomana que es determinin com a paràmetres informatius no com a especificació, ja que les monografies específiques de RFs no donen cap valor de concentració radioactiva ni d'activitat específica.

La concentració radioactiva s'utilitza per definir el contingut del producte final, incloent sempre una referència temporal.

En el cas de l'activitat específica, pot variar en funció de la utilitat clínica del RF i ja ve limitada per la PQ.

- Dissolvents residuals

S'ha validat un mètode analític que, en menys de 10 minuts, es determinen tots els dissolvents residuals que poden estar presents en el producte final i aquest és aplicable també a altres RFs PET.

En cada lot es determinen els dissolvents residuals que poden provenir de l'etapa de neteja del mòdul de síntesi que es realitza com a pas previ i inseparable de la síntesi del RF.

- Esterilitat

S'ha validat i justificat l'ús d'una tècnica analítica diferent de la recomanada per la farmacopea, la tècnica de la inoculació, utilitzant un volum menor a l'indicat per la farmacopea, per tal de poder solucionar el fet de disposar d'un volum molt reduït de producte final.

- Endotoxines

S'ha validat un mètode analític per a la determinació d'endotoxines, sistema Endofase<sup>®</sup>-PTS<sup>™</sup>, que permet la determinació de les endotoxines en un temps aproximat de 15 min amb molt poc volum de mostra. Això suposa, en el cas del F-18, que es pot obtenir el resultat d'endotoxines fins i tot abans de l'alliberació del lot.

- Puresa radionucleídica

L'any 2014 s'ha publicat la monografia titulada Detecció i mesura de la radioactivitat, 2.2.66. *Detection and measurement of radioactivity* (01/2014:20266)<sup>106</sup> que, per primera vegada, defineix un criteri d'acceptació per a la PRNA (Espectrometria gamma:  $\pm 10$  KeV o  $\pm 6$  % (escollir el valor major)). S'observa que tot i que el desenvolupament de la part experimental es va realitzar abans de la publicació de la monografia, es compleix amb el criteri definit en la mateixa.

- Residus metàl·lics

S'ha justificat un control reduït dels residus metàl·lics demostrant que el procés de producció elimina els metalls de les substàncies actives. Tres lots de cada RF han donat valors de cada metall menors al 30 % del límit establert seguint la monografia 2.4.20. Determinació dels metalls catalítics o residus metàl·lics (04/2013:20420)<sup>115</sup>.

- Càrrega microbiana

Atès que el volum de síntesi dels RFs és mot petit i es requereixen 6 mL per a la determinació de la càrrega microbiana i que en els tres lots d'estudi de cada RF s'ha demostrat que s'obté un valor molt per sota del límit: 0 ufc/mL (especificació  $\leq 10$  ufc/100 mL), es justifica el control reduït amb freqüència semestral d'aquesta especificació.

- Validació de procés

Amb l'obtenció de la conformitat dels tres lots consecutius de cada RF es verifica que el procés realitzat, les especificacions definides i els mètode analítics validats ens permeten obtenir uns resultats eficaços i reproduïbles per tal de garantir la qualitat del producte final.

- Estudi d'estabilitat

S'ha definit una metodologia detallada aplicable als RFs PET que omple el gran buit normatiu dels estudis d'estabilitat en aplicar-los en RFs.

En aquesta tesi doctoral s'han definit especificacions i validat els mètodes analítics per a cada RF d'estudi. Aquests mètodes han estat aplicats tant en la validació de procés com en la determinació de l'estabilitat de <sup>11</sup>C-PIB i <sup>18</sup>F-FMISO. Considerant que tot el treball s'ha vertebrat seguint una normativa poc detallada i en certs punts no aplicable als RFs PET, es pot concloure que s'ha aconseguit disposar d'una part de la documentació necessària per tal de garantir que els RFs d'estudi satisfan les garanties de qualitat. La metodologia aplicada en el treball, es pot extrapolat als RFs PET d'administració parenteral, per tant la tesi doctoral contribueix a agilitzar els passos per a obtenir la conformitat de les autoritats sanitàries per tal que els RFs PET puguin ser utilitzats tant en el camp de la investigació com en la pràctica clínica, i, per tant, ens puguem beneficiar d'aquesta eina de gran utilitat en l'actualitat.



## 8 Bibliografia

1. Mosessian S, Duarte-Vogel SM, Stout DB, Roos KP, Lawson GW, Jordan MC, Ogden A, Matter C, Sadeghi S, Mills GQ, Schelbert HR, Radu CG, Czernin J, Couto M, Phelps ME. INDs for PET Molecular Imaging Probes - Approach by an Academic Institution. *Mol Imaging Biol.* 2014; 16(4): 441-8.
2. Peñuelas I. Radiofármacos PET. *Rev Esp Med Nuclear.* 2001; 20(6):477-98.
3. Cortés-Blanco A. Radiofármacos PET de uso humano en España: pasado y presente. *Seguridad Nuclear.* 2007; 42(1): 28-35.
4. Torrent E. Estudis PET amb [C-11] Racloprida en animals petits de laboratori. Valoració dels mètodes de quantificació no invasius [Treball de recerca]. Barcelona: Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona; 2009.
5. Matthews PM, Rabiner EA, Passchier J, Gunn RN. Positron emission tomography molecular imaging for drug development. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 73(2): 175-86.
6. Vallabhajosula S, Solnes L, Vallabhajosula B. A broad overview of positron emission tomography radiopharmaceuticals and clinical applications: what is new?. *Semin Nucl Med.* 2011; 41(4): 246-64.
7. Committee for Proprietary Medicinal Products For Human Use (CHMP). Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. CPMP/SWP/2599/02/Rev 1. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2004 [accés el 10 de desembre de 2013]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
8. Nordberg A. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2004; 3(9): 519-27.
9. Ye L, Morgenstern JL, Gee AD, Hong G, Brown J, Lockhart A. Delineation of positron emission tomography imaging agent binding sites on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem.* 2005; 280(25): 23599-604.
10. Klunk WE, Wang Y, Huang GF, Debnath ML, Holt DP, Mathis CA. Uncharged Thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sci.* 2001; 69(13): 1471-84.

11. Ni R, Gillberg PG, Bergfors A, Marutle A, Nordberg A. Amyloid tracers detect multiple binding sites in Alzheimer's disease brain tissue. *Brain*. 2013; 136(7): 2217-27.
12. National Cancer Institute - Comprehensive Cancer Information [seu Web]. Maryland: NCI; 2013-[actualitzada el 10 de desembre de 2013; accés el 10 de desembre de 2013]. Disponible a: <http://www.cancer.gov/>
13. Organización Mundial de la Salud [seu Web]. Ginebra: OMS; 2013-[actualitzada el 10 de desembre de 2013; accés el 10 de desembre de 2013]. Disponible a: <http://www.who.int/es/>
14. Asensio C, Cabrera A, Carreras JL, Llamas JM, Peñuelas I, Pons F, Richter J. Propuesta de la Sociedad Española de Medicina Nuclear (SEMN) para la aprobación de indicaciones de Radiofármacos PET por la vía del uso compasivo. Madrid: SEMN; 2009.
15. Lee ST, Scott AM. Hypoxia Positron Emission Tomography imaging with <sup>18</sup>F-Fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med*. 2007; 37(6): 451-61.
16. Brown JM. Therapeutic targets in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 49(2):319-26.
17. Rajendran JG, Krohn KA. Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin North Am*. 2005; 43(1): 169-87.
18. Ley del Medicamento. Ley 25/1990 de 20 de diciembre. Boletín Oficial del Estado, nº 306, (22-12-1990).
19. Real Decreto por el que se regulan los medicamentos radiofármacos de uso humano. Real Decreto 479/1993 de 2 de abril. Boletín Oficial del Estado, nº 109, (07-05-1993).
20. Real Decreto por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. Real Decreto 561/1993 de 16 de abril. Boletín Oficial del Estado, nº 114, (13-05-1993).
21. Orden por la que se aprueba el Formulario Nacional. Orden SCO/3262/2003 de 18 noviembre. Boletín Oficial del Estado, nº 2838, (26-11-2003).
22. Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Ley 29/2006 de 26 de julio. Boletín Oficial del Estado, nº 178, (27-07-2006).
23. Real Decreto por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Real Decreto 1345/2007 de 11 de octubre. Boletín Oficial del Estado, nº 267, (07-11-2007).
24. Real Decreto por el que se regula los ensayos clínicos con medicamentos. Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero. Boletín Oficial del Estado, nº 33, (07-02-2004).

25. Real Decreto por el que se regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales. Real Decreto 1015/2009 de 19 de junio. Boletín Oficial del Estado, nº 174, (20-07-2009).
26. European Pharmacopoeia. Fluoromisonidazole (<sup>18</sup>F) injection 01/2014:2459. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [acceso el 14 de junio de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
27. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Parte I: Requisitos básicos para medicamentos. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2010.
28. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Prólogo. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2010.
29. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo 3: Fabricación de radiofármacos. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2009.
30. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo 1: Fabricación de medicamentos estériles. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2009.
31. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo 13: Fabricación de medicamentos en investigación. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2010.
32. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo 15: Cualificación y validación. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2001.
33. Real Farmacopea Española. [monografía a Internet]. 4a ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo y Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2010. [acceso el 12 de junio de 2014]. Disponible a: <http://extranet.boe.es/index.php?referer=/farmacopea/index.php>



34. European Pharmacopoeia. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 12 de juny de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
35. United States Pharmacopeia, USP. [monografia a Internet]. Maryland: The United States Pharmacopeia Convention; 2014 [accés el 12 de juny de 2014]. Disponible a: <http://www.usp.org/es/usp-nf>
36. European Pharmacopoeia. Radiopharmaceutical preparations 01/2014:0125. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 14 de juny de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
37. CRC-Centre d'Imatge Molecular. Investigational Medicinal Product Dossier, Disolució inyectable de [<sup>11</sup>C]-Pittsburgh. PEI nº 09-006. 3a ed. 2011.
38. CRC-Centre d'Imatge Molecular. Investigational Medicinal Product Dossier, Disolució inyectable de [<sup>18</sup>F]-Fluoromisonidazol. PEI nº 10-105. 2a ed. 2011.
39. Committee for Proprietary Medicinal Products. Specifications: test procedures and acceptance Criteria for new drug products: Chemical substances. CPMP/ICH/367/96. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 1999 [accés el 15 de juny de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
40. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on impurities in new drug products. CPMP/ICH/2738/99. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2003 [accés el 15 de juny de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
41. European Pharmacopoeia. Fludeoxyglucose (<sup>18</sup>F) injection 01/2014:1325. [monografia a Internet]. 8a ed (8.2). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 14 de juny de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
42. EANM Radiopharmacy Committee. Guidelines on current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the preparation of radiopharmaceuticals. Londres: cGRPP-guidelines European Commission; Març 2007.
43. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Part 1: Quality Control. Brussel·les: European Commission; 2014.
44. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Glossary. Brussel·les: European Commission; 2004.
45. European Pharmacopoeia. Fludeoxyglucose (<sup>18</sup>F) injection 01/2008:1325. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors;

- 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
46. European Pharmacopoeia. Flumazenil (N-[<sup>11</sup>C]methyl) injection 01/2008:1917. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
47. European Pharmacopoeia. Fluorodopa (<sup>18</sup>F) (prepared by electrophilic substitution) injection 07/2008:1918. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
48. European Pharmacopoeia. Raclopride ([<sup>11</sup>C]methoxy) injection 01/2008:1924. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
49. European Pharmacopoeia. Sodium acetate (1-[<sup>11</sup>C]) injection 01/2008:1920. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
50. European Pharmacopoeia. L-Methionine ([<sup>11</sup>C]methyl) injection 01/2008:1617. [monografia a Internet]. 7a ed (7.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
51. Advanced Biochemicals Compounds. 6-OH-BTA-1 (free base), Reference standard for [N-Methyl-<sup>11</sup>C]-6-OH-BTA-1. Catalogue number 5140. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>
52. Advanced Biochemicals Compounds. 6-OH-BTA-0, Precursor for [N-Methyl-<sup>11</sup>C]-6-OH-BTA-1. Catalogue number 5100. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>
53. Advanced Biochemicals Compounds. Fluoromisonidazole, Reference standard for [<sup>18</sup>F]FMISO. Catalogue number 1410. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>

54. Advanced Biochemicals Compounds. NITTP (GMP), Precursor for [<sup>18</sup>F]FMISO. Catalogue number 1402. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>
55. Advanced Biochemicals Compounds. Desmethylmisonidazole, Reference standard for byproduct of [<sup>18</sup>F]FMISO synthesis ([<sup>18</sup>F]Fluoromisonidazole). Catalogue number 1420. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>
56. Advanced Biochemicals Compounds. Criptand 222 Aminopolyether used to dissolve K+ salts in nucleophilic [<sup>18</sup>F]labelling reactions. Catalogue number 800. [Document a Internet]. Radeberg: ABX; 2012 [accès el 10 de setembre de 2013]. Disponible a: <http://www.abx.de/chemicals/product-list.html>
57. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). CPMP/ICH/381/95. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 1995 (Part I), 1997 (Part II) [accès el 15 de juny de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
58. National Cancer Institute. Investigator's Brochure for [<sup>18</sup>F] fluoromisonidazole, 1H-1-(3-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-hydroxy-propyl)-2-nitro-imidazole, [<sup>18</sup>F]FMISO. IND 76,042. 5a ed. [Document a Internet]. Bethesda; 2013 [accès el 28 de juny de 2013]. Disponible a: [http://www.acrin.org/Portals/0/Protocols/6697/6697\\_FMISO%20-IB\\_Edition5\\_ReleaseDate-February5,%202013.pdf](http://www.acrin.org/Portals/0/Protocols/6697/6697_FMISO%20-IB_Edition5_ReleaseDate-February5,%202013.pdf)
59. Committee for Proprietary Medicinal Products For Human Use (CHMP). Guideline on the limits of genotoxic impurities. EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; Juny 2006 [accès el 25 de juny de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
60. Committee for Proprietary Medicinal Products For Human Use (CHMP). Guideline on Radiopharmaceuticals. EMEA/CHMP/QWP/306970/2007. [monografia a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2007 [accès el 1 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
61. Philippe C, Haeusler D, Mitterhauser M, Ungersboeck J, Viernstein H, Dudczak R, Wadsak W. Optimization of the radiosynthesis of the Alzheimertracer 2-(4-N-[<sup>11</sup>C]methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole([<sup>11</sup>C]PIB). Applied Radiation and Isotopes. 2011; 69(9): 1212–7.

62. Solbach C, Uebele M, Reischl G, Machulla HJ. Efficient radiosynthesis of carbon-11 labelled uncharged Thioflavin T derivatives using [<sup>11</sup>C]methyl triflate for beta-amyloid imaging in Alzheimer's Disease with PET. *Appl Radiat Isot.* 2005; 62(4): 591-5.
63. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of <sup>11</sup>C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem.* 2003; 46(13): 2740–54.
64. Ortega X, Jorba J. Radiaciones ionizantes: Utilización y riesgos. 2a ed. Barcelona: Ediciones UPC; 1996.
65. Gopal B Saha. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 5a ed. New York: Pringer Science and Business Media Inc; 2004.
66. Gómez-Vallejo V, Gaja V, Kozirowski J, Llop J. Specific Activity of <sup>11</sup>C-Labelled Radiotracers: A Big Challenge for PET Chemists, Positron Emission Tomography - Current Clinical and Research Aspects. [article a Internet]. Rijeka: Dr Chia-Hung Hsieh, editors; 2012 [accés el 09 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.intechopen.com/books/positron-emission-tomography-current-clinical-and-research-aspects/specific-activity-of-11c-labelled-radiotracers-a-big-challenge-for-pet-chemists>
67. Dahl, J. R., & Schlyer D. J. Target Materials. Proceedings of The First Workshop on Targetry and Target Chemistry. [Document a Internet]. Heidelberg: Institut fur Nuklearmedizin; 1985 [accés el 09 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://wttc.triumf.ca/proceedings.html>
68. Pei Yuin Keng. Fluorine-18 Radiochemistry. Scholars Trained in Advanced Radiochemistry Technology. [Document a Internet]. Los Angeles: Crump Institute for Molecular Imaging University of California; 2009 [accés el 09 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.crump.ucla.edu/start/course/Lecture%20%20-%20F18%20Radiochemistry.pdf>
69. Kung MP, Kung HF. Mass effect of injected dose in small roedent imaging by SPECT and PET. *Nucl Med Biol.* 2005; 32(7): 673-8.
70. Wilson A, Garcia A, Chestakova A, Kung H, Houle S. A rapidone-step radiosynthesis of the  $\beta$ -amyloid imaging radiotracer N-methyl-[<sup>11</sup>C]2-(40- methylaminophenyl)-6-hydroxybenzthiazole([<sup>11</sup>C]-6-OH-BTA-1). *J Label Compd Radiopharm.* 2004; 10(47): 679-82.

71. Segard T, Robins PD, Yusoff IF, Ee H, Morandea L, Campbell EM, Francis RJ. Detection of hypoxia with <sup>18</sup>F-Fluoromisonidazole (<sup>18</sup>F-FMISO) PET/CT in suspected or proven pancreatic cancer. Clin Nucl Med. 2013; 38(1): 1-6.
72. Hatano T, Zhao S, Zhao Y, Nishijima K, Kuno N, Hanzawa H, Sakamoto T, Tamaki N, Kuge Y. Biological characteristics of intratumoral [F-18]-fluoromisonidazole distribution in a rodent model of glioma. Int J Oncol. 2013; 42(3): 823-30.
73. Gómez-Vallejo V, Llop J. Fully automated and reproducible radiosynthesis of high specific activity [<sup>11</sup>C]raclopride and [<sup>11</sup>C]Pittsburgh compound-B using the combination of two commercial synthesizers. Nucl Med Commun. 2011; 32(11): 1011-7.
74. Circular de la Agencia Española de Medicamentos sobre disolventes residuales en especialidades autorizadas. Circular 5/2001 de 28 de marzo. Ministerio De Sanidad y Consumo. Boletín Oficial del Estado, nº 89, (13-04-2001).
75. European Pharmacopoeia. 5.4. Residual Solvents 01/2008:50400. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
76. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Annexes to: CPMP/ICH/283/95 Impurities: Guideline for residual solvents & CVMP/VICH/502/99 Guideline on impurities: residual solvents. CPMP/QWP/450/03, EMEA/CVMP/511/03. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2013 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
77. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Impurities: guideline for residual solvents Q3C (R5). [monografía a Internet]. Londres: International Conference on Harmonisation; 2011 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>
78. European Pharmacopoeia. 2.4.24. Identification and control of residual solvents 01/2008:20424. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
79. European Pharmacopoeia. 2.2.28. Gas Chromatography 01/2008:20228. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
80. Universitat autònoma de Barcelona. Cromatografia de gasos. [document a Internet]. Barcelona: Servei d'Anàlisi Clínica; 2013 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://sct.uab.cat/saq/content/cromatografia-de-gasos>

81. Ballesteros S, Ramón F, Torrecilla JM Sancho M. Los antídotos: el centro antitóxico como botiquín de referencia. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 1999; 23(3): 74-87.
82. Castillo J. Aplicación del método de estándar Interno a la Cromatografía de Gases. Laboratorio de análisis instrumental. Humacao: Universidad de Puerto Rico. 2010.
83. European Pharmacopoeia. 2.6.1. Sterility 04/2011:20601. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 19 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
84. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo 17: Liberación paramétrica. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2002.
85. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Decision trees for the selection of sterilization methods. Annex to note for guidance on development pharmaceuticals. CPMP/QWP/054/98. EMA/ICH/529785/2010. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2000 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
86. European Pharmacopoeia. Guidelines for using the test for sterility 01/2009:50109. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 19 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
87. Orden sobre gestión de materiales residuales sólidos con contenido radiactivo generados en las instalaciones radiactivas de 2ª y 3ª Categoría en las que se manipulen o almacenen isótopos radiactivos no encapsulados. Orden ECO/1449/2003, de 21 de mayo. Boletín Oficial del Estado, nº 134 (05-06-2003).
88. Lopez S. Control de Esterilidad para medicamentos de terapias avanzadas. [article a Internet]. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios: División de Productos Biológicos y Biotecnología; 2010 [accés el 18 de juliol de 2014]. [cited 2013 feb 22]. Disponible a: [http://www.aemps.gob.es/eventosCongresos/2010/docs/terapias-avanzadas\\_marzo-2010/ponencias/Esterilidad\\_S.Lopez.pdf](http://www.aemps.gob.es/eventosCongresos/2010/docs/terapias-avanzadas_marzo-2010/ponencias/Esterilidad_S.Lopez.pdf)
89. Steven G R. Sterility testing Essential things you must know. [article a Internet]. Massachusetts: Microtest; 2006 [accés el 18 de juliol de 2014]. Disponible a: [http://medicaldesign.com/Whitepapers/SterilityTestin\\_00000021071.pdf](http://medicaldesign.com/Whitepapers/SterilityTestin_00000021071.pdf)

90. Hochstein HD, Fitzgerald EA, McMahon, FG, Vargas R. Properties of US Standard (EC-5) in human male volunteers. *J Endotox Res.* 1994; 1:52-6.
91. European Pharmacopoeia. 2.6.8. Pyrogens 01/2008:20608. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
92. European Pharmacopoeia. 2.6.14 Bacterial endotoxins 01/2010:20614. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
93. European Pharmacopoeia. 5.1.10 Guidelines for using the test for bacterial endotoxins 01/2010:50110. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
94. Charles River Laboratories International. Inc. The Endofase<sup>®</sup> PTS<sup>™</sup> Portable Test System. User's Guide. Version 7. [Document a Internet]. Charleston: Charles River Laboratories International; 2003 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.criver.com>
95. Dawson M. Withdrawal of FDA Guideline. LAL Update. Associates of Cape Cod Incorporated. 2011; 1(27) [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: [http://www.acciusa.com/pdfs/newsletter/LAL\\_Vol27No1.pdf](http://www.acciusa.com/pdfs/newsletter/LAL_Vol27No1.pdf)
96. Gee AP, Sumstad D, Stanson J, Watson P, Proctor J, Kadidlo D, et al. A multicenter comparison study between the Endofase<sup>®</sup> PTS<sup>™</sup> rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytotherapy.* 2008; 10(4): 427-35.
97. Charles River Laboratories International, Inc. Endofase<sup>®</sup> PTS<sup>™</sup>. [Document a Internet]. Charleston: Charles River Laboratories International; 2011 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.criver.com>
98. United States Pharmacopoeia. 85 Bacterial Endotoxins Test. [monografia a Internet]. 6a ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention editors; 2013 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.usp.org/>
99. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on Bacterial Endotoxins Test general chapter Q4B Annex 14. EMA/ICH/529785/2010. Londres: European Medicines Agency; 2010 [accès el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>

100. European Pharmacopoeia. General notices 07/2014:10000. [monografia a Internet]. 8a ed (8.2). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2013. [accés el 09 de setembre de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
101. European Pharmacopoeia. 8.2 Particulate contamination: visible particles 01/2008:20920. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
102. European Pharmacopoeia. 8.2. Clarity and degree of opalescence of liquids 01/2008:20201. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
103. European Pharmacopoeia. Potentiometric determination of pH 01/2008:20203. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 23 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
104. CRC-Centre d'Imatge Molecular. PNT EQU-51-03: pHmetro Mettler Toledo S40 Seven Multi. 3a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2010.
105. CRC-Centre d'Imatge Molecular. PNT CQA-32-02: Método analítico para la determinación del pH en radiofármacos de uso humano. 2a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2011.
106. European Pharmacopoeia. Detection and measurement of radioactivity 01/2014:20266. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
107. European Pharmacopoeia. Table of physical characteristics of radionuclides mentioned in the European Pharmacopoeia 01/2008:50700. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
108. CRC-Centre d'Imatge Molecular. PNT CQA-33-02: Determinación de la pureza radionucleídica de los radiofármacos marcados con F-18, C-11 y N-13. 3a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2011.
109. European Pharmacopoeia. Alovudine (<sup>18</sup>F) injection 01/2014:2460. [monografia a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>



110. European Pharmacopoeia. Fluorodopa (<sup>18</sup>F) (prepared by electrophilic substitution) injection 07/2008:1918. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
111. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the specification for residues of metal catalysts or metal reagents. EMEA/CHMP/SWP/4446/2000. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2008 [accés el 26 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
112. Advanced Biochemicals Compounds. Documentation 6-OH-BTA-0 (GMP) Precursor for [N-Methyl-<sup>11</sup>C]-6-OH-BTA-1. 3a ed. Radeberg: ABX; 2010.
113. Advanced Biochemicals Compounds. Documentation NITTP Precursor for <sup>18</sup>F-FMISO. 1a ed. Radeberg: ABX, Advanced Biochemicals Compounds, gener 2011.
114. European Pharmacopoeia. 2.2.58. Inductively coupled plasma-mass spectrometry 01/2008:20258. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
115. European Pharmacopoeia. 2.4.20. Determination of metal catalyst or metal reagent residues 04/2013:20420. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>
116. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on manufacture of the finished dosage forms. CPMP/QWP/486/95. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 1996 [accés el 26 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
117. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Capítulo 5: Producción. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2012.
118. European Pharmacopoeia. Microbiological examination of non-sterile products: Microbial enumeration tests 07/2010:20612. [monografía a Internet]. 8a ed (8.0). Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission editors; 2014 [accés el 25 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>

119. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Concept paper on the need for revision of the note for guidance on manufacture of the finished dosage forms. EMA/CHMP/QWP/324350/2013. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2013 [accés el 26 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
120. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Glosario. Madrid: Subdirección General de Inspección y Control de Medicamentos; 2011.
121. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on process validation. CPMP/QWP/848/96, EMEA/CVMP/598/99. [monografía a Internet]. Londres: European Medicines Agency; 2001 [accés el 26 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
122. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical development (ICH Topic Q 8 R2). [monografía a Internet]. Londres: International Conference on Harmonisation; 2009 [accés el 29 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>
123. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Quality Risk Management Q9. [monografía a Internet]. Londres: International Conference on Harmonisation; 2005 [accés el 29 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>
124. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Quality System Q10. [monografía a Internet]. Londres: International Conference on Harmonisation; 2008 [accés el 29 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>
125. CRC-Centre d'Imatge Molecular. PNT CQA-55-04: determinación de la pureza radioquímica, química y actividad específica de la disolución inyectable <sup>11</sup>C-PIB. 4a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2012.
126. CRC-Centre d'Imatge Molecular. PNT CQA-59-02: Control de calidad de la disolución inyectable <sup>18</sup>F-FMISO. 2a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2012.
127. CRC-Centre d'Imatge Molecular. Método analítico CG para la determinación de disolventes residuales en radiofármacos para uso humano marcados con C-11 y F-18, except <sup>18</sup>F-FDG. 4a ed. Barcelona: CRC-CIM; 2011.
128. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Chapter 1: Pharmaceutical Quality System. Brussel·les: European Comission; 2014.

129. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on stability testing: Stability Testing of new Drug Substances and Products (ICH Topic Q 1 A (R2)). CPMP/ICH/2736/99. Londres. European Medicines Agency; 2003. [accés el 30 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
130. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on evaluation of stability data. CPMP/ICH/420/02. [monografia a Internet]. Londres. Londres: European Medicines Agency; 2003 [accés el 30 de juliol de 2014]. Disponible a: <http://www.ema.europa.eu/ema/>

