

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY

Marcin Szydło

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Optymalizacja zautomatyzowanego procesu
syntezy i oczyszczania związków biologicznie
aktywnych znakowanych izotopem węgla [^{11}C]
wraz z opracowaniem innowacyjnej linii
kontroli jakości**

promotor: prof. dr hab. n. med. Maria Sokół

GLIWICE 2019

Spis treści

Przedmowa	4
1. Wprowadzenie	7
2. Cel pracy	10
3. Pozytonowa tomografia emisyjna	12
4. PET/TK: pozytonowa tomografia emisyjna łączona z tomografią komputerową	30
5. Znaczniki stosowane w diagnostyce PET	37
6. Wytwarzanie radioznaczników	49
7. Cykl produkcyjny	60
8. Materiały i metody	62
9. Procesy syntezy [¹¹ C]-choliny	77
10. Kontrola jakości	88
11. Wyniki	100
12. Podsumowanie	103
13. Przyszłość radiofarmaceutyków	105
14. Wnioski	108
15. Streszczenie/Abstract	110
Piśmiennictwo	112
Publikacje	122
Załączniki	144

Przedmowa

Źródłem podstawowych standardów jakości produktów leczniczych, ich składników oraz systemu stosowania produktów leczniczych jest farmakopea. W Unii Europejskiej jest to Farmakopea Europejska, tworzona zgodnie z zapisami *Konwencji o opracowaniu Farmakopei Europejskiej*, w ramach Europejskiej Dyrekcji ds. Jakości Leków i Opieki Zdrowotnej (ang. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*, EDQM). Zasady stosowania wymagań farmakopealnych w Polsce określone są w art. 25 ustawy z dnia 6 września 2001 r. *Prawo farmaceutyczne* (tj. Dz. U. z 2017 r. poz. 2211). Ustęp 1. tego artykułu stanowi, że *Podstawowe wymagania jakościowe oraz metody badań produktów leczniczych i ich opakowań oraz surowców farmaceutycznych określa Farmakopea Europejska lub jej tłumaczenie na język polski zawarte w Farmakopei Polskiej*.

Farmakopea omawia technologie wytwarzania leków, ogólne metody ich analizowania, bazowe wymagania jakościowe, a najważniejszą częścią standardów jakości substancji czynnych jest sekcja dotycząca zanieczyszczeń. W świetle krajowego ustawodawstwa, radioznaczniki PET (PET, ang. *Positron Emission Tomography*, pozytonowa tomografia emisyjna) są produktami leczniczymi, stąd równoważna nazwa radiofarmaceutyki, a ich wytwarzanie musi być prowadzone zgodnie z właściwymi rozporządzeniami, regułami i wytycznymi jakościowymi. Pomimo regularnej aktualizacji farmakopei nie zawsze są w niej dostępne zalecenia zapewnienia jakości (ang. *Quality Assurance, QA*) i kontroli jakości (ang. *Quality Control, QC*) dla nowych czy też niedawno opisanych w piśmiennictwie naukowym radiofarmaceutyków – tak też jest w przypadku niektórych znakowanych izotopowo związków biologicznie aktywnych stosowanych w diagnostyce obrazowej PET, które omawiane są w niniejszej pracy. Taki brak w monografiach farmakopei nie uniemożliwia ich dopuszczenia do zastosowań medycznych, oznacza jednak konieczność wypracowania standardów naukowych niezbędnych do rejestracji leku. W Polsce organem kompetentnym w zakresie wydawania zezwoleń na wytwarzanie i pozwoleń na wprowadzenie do obrotu produktów leczniczych jest Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, a proces produkcji pozostaje w każdym przypadku pod nadzorem Głównego Inspektoratu Farmaceutycznego.

Korzystając z metodologii postępowania opisanych w farmakopeach dla już stosowanych substancji i leków, oraz uzupełniając je o procedury analityczne dostosowane do specyfiki

radiofarmaceutyków o krótkim okresie półtrwania – na tyle krótkim, że nie zawsze jest możliwe przeprowadzenie wszystkich analiz jakościowych, a przede wszystkim analizy jałowości, przed wygaśnięciem produktu, postanowiłem dokonać optymalizacji procesów syntezy i oczyszczania związków biologicznie aktywnych znakowanych izotopem węgla [^{11}C] na przykładzie [^{11}C]-choliny oraz opracować innowacyjną linię kontroli jakości dla tego radioznacznika.

Dzięki zoptymalizowaniu procesów syntezy i oczyszczania oraz wprowadzeniu usystematyzowanej kontroli jakości otworzy się możliwość włączenia tego radiofarmaceutyku PET do praktyki diagnostycznej. Obok wymiaru naukowego, praca ta ma więc swój aspekt praktyczny oraz ekonomiczny, bowiem może przyczynić się do poszerzenia możliwości diagnostyki molekularnej PET oraz pozwolić na zwiększenie liczby i typu kontraktowanych procedur medycznych z zakresu PET.

Do rozprawy dołączone zostały trzy publikacje (patrz: *Publikacje*), których jestem pierwszym autorem. Pierwsze dwie podsumowują kolejne etapy prac nad optymalizacją syntezy radioznacznika PET znakowanego izotopem węgla [^{11}C] i nad systemem kontroli jakości. Natomiast trzecia publikacja dotyczy przyszłości badań nad radiofarmaceutykami nowej generacji – takimi, które nakierowane są na konkretny problem diagnostyczny, u konkretnego pacjenta, a więc wpisującymi się w koncepcję teranostyki:

1. **Marcin Szydło**, Michał Jadwiński, Agnieszka Chmura, Kamil Gorczewski, Maria Sokół. *Synthesis, isolation and purification of [^{11}C]-Choline*. *Contemp Oncol* 2016; 20(3): 229–236 (**IF=0.215**).
2. **Marcin Szydło**, Agnieszka Chmura, Tomasz Kowalski, Mateusz Pocięgiel, Andrea d’Amico, Maria Sokół. *Optimisation of [^{11}C]-Choline synthesis*. *Contemp Oncol* 2018; 22 (4): 260-265 (**IF=0.215**).
3. **Marcin Szydło**, Dawid Pogoda, Tomasz Kowalski, Mateusz Pocięgiel, Michał Jadwiński, Andrea Amico. *Synthesis and Quality Control of [^{68}Ga]-PSMA, PET/CT Tracer used in Prostate Cancer Imaging and Comparison with [^{18}F]-Fluorocholine as a Reference Point*. *J Pharm Sci Emerg Drugs* 2018;6(1). doi:10.4172/2380-9477.1000126. (**IF=0.370**).

Ponadto zagadnienia poruszane w rozprawie były prezentowane przeze mnie na XIX Gliwickich Spotkaniach Naukowych (rok 2015) [GSM2015 S20], [GSM2015 S21], podczas Jesiennej Szkoły Fizyki Medycznej Polskiego Towarzystwa Fizyki Medycznej Oddziału

Śląskiego (rok 2016) [PTFM2016] oraz na 16. Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizyki Medycznej (rok 2019) [PTFM2019].

1. Wprowadzenie

Konwencjonalne metody obrazowania, w tym klasyczne metody radiologiczne (RTG), ultrasonografia (USG), tomografia komputerowa (TK, ang. *Computed Tomography*, CT) i obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) stosuje się od wielu lat w celu identyfikacji i scharakteryzowania procesów patologicznych w tkankach i ich dynamiki na podstawie różnic anatomicznych gęstości tkanek, zawartości wody, kształtu i wielkości zmiany. Do grupy tej dołączyły niedawno techniki funkcjonalne i molekularne, w tym pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *Positron Emission Tomography*, PET). Metoda ta pozwala na charakteryzowanie zaburzeń na poziomie molekularnym. Jej szczególne zalety widoczne przede wszystkim w diagnostyce onkologicznej to wysoka czułość i swoistość w wykrywaniu wielu nowotworów, w porównaniu z obrazowaniem anatomicznym [Shim et al., 2005]. Porównanie możliwości poszczególnych metod obrazowych przedstawione zostało w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie charakterystyk diagnostycznych metod obrazowych [Źródło 1]:

Technika obrazowania	Rodzaj techniki	Rozdzielczość przestrzenna	Czułość
RTG/TK	Anatomiczna	300 μm	Niska (>mM)
MRI	Anatomiczna	800 μm	Niska (>mM)
USG	Anatomiczna	500 μm	Średnia (nM)
SPECT	Funkcjonalna/molekularna	5 – 10 mm	Wysoka (nM – pM)
PET	Funkcjonalna/molekularna	2 – 8 mm	Wysoka (nM – pM)

Pozytonowa tomografia emisyjna, jak i jej technika hybrydowa połączona z tomografią komputerową – PET/TK są obecnie szeroko stosowane w onkologii: w diagnostyce wstępnej i ocenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, w monitorowaniu procesu terapeutycznego oraz w ocenie prognostycznej [Królicki et al., 2012]. Radiofarmaceutykiem najczęściej stosowanym w tych badaniach jest 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoksy-D-glukoza (równoważne nazwy tego związku chemicznego to [¹⁸F]-FDG, FDG, fluorodeoksyglukoza, lub [¹⁸F]-fluorodeoksyglukoza – będą one stosowane zamiennie w niniejszej pracy). Znacznik ten zawdzięcza swoją popularność uniwersalności, ponieważ jako pochodna glukozy, jednego z najważniejszych źródeł energii komórek żywych, dystrybuowany jest w obrębie całego organizmu tworząc gradienty stężeń w zależności od nasilenia metabolizmu [Kołodziejczyk et

al., 2003][Masoomi et al., 2013]. W tkance nowotworowej obserwuje się często wzmożony wychwyty $[^{18}\text{F}]$ -FDG, co odzwierciedla przyspieszony metabolizm. Jedną z ważniejszych cech komórek nowotworowych jest metabolizm oparty na glikolizie (nie zaś na fosforylacji oksydacyjnej), która zachodzi również w obecności tlenu. Zjawisko to zwane jest efektem Warburga [Vander Heiden et al., 2009]. Dzięki zastosowaniu analogu glukozy wyznakowanego przez fluor pozytonowy ^{18}F możliwa jest ocena cyklu metabolicznego glukozy – cząsteczki FDG są transportowane przez te same mechanizmy transportujące jak dla glukozy, następnie ulegają fosforylacji w pierwszej reakcji cyklu Krebsa. Produkt tej reakcji, FDG-6 fosforan, nie jest substratem dla kolejnych enzymów szlaku glikolizy, nie może również dyfundować na zewnątrz komórki, ani ulegać defosforylacji do FDG – zostaje uwięziony w komórce. Rejestrowana radioaktywność jest więc odzwierciedleniem stopnia metabolizmu glukozy. Jednak podobny mechanizm obserwuje się także w komórkach objętych stanem zapalnym. Jako uniwersalny radioznacznik, 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-2-deoksy-D-glukoza nie jest więc specyficzna [Potter et al., 2016], a niektóre rodzaje nowotworów, jak rak gruczołu krokowego [Fricke et al., 2003], rak wątrobowokomórkowy HCC (ang. *hepatocellular carcinoma*) [Yamamoto et al., 2008], czy rak nerkowokomórkowy RCC (ang. *renal cell carcinoma*) [Schröder et al., 1996], mogą zostać ocenione niedokładnie [Lopci et al., 2010], ponieważ często nie wykazują zwiększonego wychwyty FDG. $[^{18}\text{F}]$ -fluorodeoksyglukoza również okazuje się mało użytecznym znacznikiem do oceny złośliwych mas znajdujących się w tkankach o fizjologicznie wysokim metabolizmie glukozy, jak w przypadku nowotworów centralnego układu nerwowego [Nanni et al., 2010]. Dlatego poszukuje się nowych radioznaczników, które pozwolą na uzyskiwanie obrazów o wyższej czułości i specyficzności. Wśród już stosowanych są $[^{11}\text{C}]$ -cholina i $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholina (fluorometylocholina, $[^{18}\text{F}]$ -FCH) – ich zadaniem jest uwidocznienie choliny, składnika fosfolipidów błony komórkowej [Lopci et al., 2010], [Nanni et al., 2010], [Caroli et al. 2010].

Choć cholina znakowana węglem-11 została po raz pierwszy zastosowana w diagnostyce onkologicznej w 1997 roku [Fanti et al., 2010], to dopiero w 2012 amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) dopuściła ją do zastosowań klinicznych w USA. Niestety ani Farmakopea europejska, ani polska nie opublikowały dotychczas procedur jej produkcji i kontroli jakości. Choć niedawno pojawiła się monografia farmakopealna poświęcona $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholinie [PhEurFCH], to jednak różnice między nią a $[^{11}\text{C}]$ -choliną nie pozwalają na wykorzystanie opisanych tam procedur w kontroli jakości $[^{11}\text{C}]$ -choliny.

[¹¹C]-cholina jest szczególnie przydatna w diagnostyce wczesnego stadium raka prostaty oraz wtórnych przerzutów do węzłów chłonnych [Yamaguchi et al. 2005], [Mitchell et al., 2013][Picchio et al., 2014]. Nowotwory prostaty charakteryzują się obniżonym metabolizmem glukozy, a zwiększone wchłanianie i gromadzenie FDG obserwuje się tylko w odróżnicowanych, agresywnych i przerzutowych nowotworach prostaty [Schwarzenböck et al., 2012]. Badanie PET/TK z użyciem znacznika [¹¹C]-cholina poprawia precyzję detekcji umiejscowienia zmiany nowotworowej, jej rozległości, a przede wszystkim czułość detekcji przerzutów do węzłów chłonnych przewyższając inne techniki obrazowe, w tym MRI czy TK [Bouchelouche et al., 2011]. Może ono pomóc w lepszej ocenie zaawansowania choroby lub w zmianie podejścia terapeutycznego przy użyciu bardziej agresywnych terapii i terapii adresowanych. Znacznik ten – co ważne – jest tylko śladowo wydalany z moczem (więc nie zaburza obszaru poszukiwań w miednicy mniejszej poprzez obecność znacznika niezwiązaną z aktywnością metaboliczną; dzięki temu diagnostyka jest pewniejsza) [de Jong et al., 2002].

2. Cel pracy

Ze względu na rosnące zainteresowanie znacznikiem [¹¹C]-cholina, którego właściwości diagnostyczne są szczególnie cenne w badaniu raka stercza, konieczne jest opracowanie i udostępnienie protokołów nadzoru nad produkcją i protokołów kontroli jakości tego radioznacznika, aby mógł on zostać zastosowany medycznie. Jest to podstawowy cel tej pracy. W chwili obecnej, zarówno w Farmakopei polskiej, jak i europejskiej brak jest receptur syntezy oraz szczegółowych wytycznych dla systemu kontroli jakości znacznika [¹¹C]-cholina.

Jako punkt wyjścia do stworzenia takiego systemu przyjąłem ogólne zalecenia zawarte w rozdziałach farmakopei dotyczących potencjometrycznego oznaczania pH (2.2.3), chromatografii gazowej (2.2.28), identyfikacji i oznaczania pozostałości rozpuszczalników (4.2.24), badania jałowości (2.6.1) oraz detekcji endotoksyn bakteryjnych (2.6.14). Wymagają one jednak istotnego dostosowania z uwzględnieniem specyfiki syntezowanego radioznacznika.

Ponadto, praca ta koncentruje się nie tylko na optymalizacji procesu wytwarzania [¹¹C]-choliny pod kątem zarówno zwiększenia wydajności syntezy jak i poprawienia czystości produktu końcowego - między innymi poprzez redukcję rozpuszczalników stosowanych w czasie syntezy, ale również na implementacji dodatkowych metod analitycznych, w tym technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) wysokiej rozdzielczości, w szczególności metod ilościowych wykorzystujących metodologię qNMR (ang. *quantitative NMR*).

Celem nadrzędnym stała się potrzeba dostosowania warunków produkcyjnych do wymagań stawianych wytwórcom dążącym do rejestracji [¹¹C]-choliny jako produktu leczniczego.

Część teoretyczna

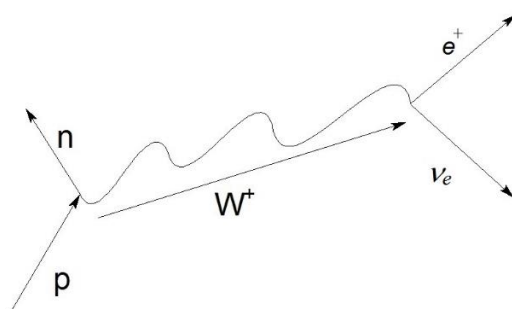
3. Pozytonowa tomografia emisyjna

Protony i neutrony jądra atomowego związane są poprzez dwa rodzaje oddziaływań: oddziaływania silne, czyli siły jądrowe o krótkim zasięgu które działają między wszystkimi nukleonami, oraz odpychające siły elektryczne działające między elektrycznie naładowanymi, jednoimiennymi protonami. Te drugie powodują, że jądra bogate w protony są niestabilne i rozpadają się tworząc jądra stabilne o mniejszych ładunkach dodatnich. Jednym z takich procesów jest rozpad e^+ (1), w którym proton ulega przemianie w neutron i bozon pośredniczący W^+ , a ten niemal natychmiastowo rozpada się na pozyton e^+ oraz neutrino elektronowe ν_e :



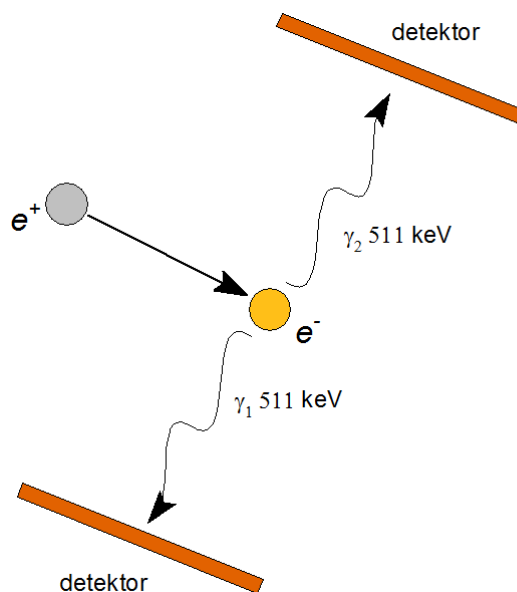
Pozyton (e^+) jest antycząstką elektronu (e^-), a neutrino elektronowe (ν_e) jest cząstką obojętą elektrycznie, o masie spoczynkowej – jak wskazują najnowsze doniesienia – sześć rzędów wielkości mniejszej od masy elektronu [Mertens, 2016].

Rozpad e^+ zachodzi wewnątrz jądra, a powstałe w skutek rozpadu jądro ma identyczną masę co jądro pierwotne, ale różni się od niego liczbą protonów mniejszą o jeden i liczbą neutronów większą o jeden (Rysunek 3.1):



Rysunek 3.1. Rozpad e^+

W wyniku kontaktu pozytonu (e^+) z elektronem (e^-) dochodzi do anihilacji, podczas której masy cząstek zostają zamienione w energię ($E=mc^2$) w postaci dwóch fotonów. Przemiana e^+ zachodzi tylko wówczas, jeżeli masa atomu początkowego jest większa o dwie masy elektronu od atomu końcowego. Fotony o energii 511 keV rozchodzą się pod kątem bliskim 180° (Rysunek 3.2). Efekt ten jest podstawą działania pozytonowej tomografii emisyjnej.



Rysunek. 3.2. Schemat anihilacji pozytonu z elektronem

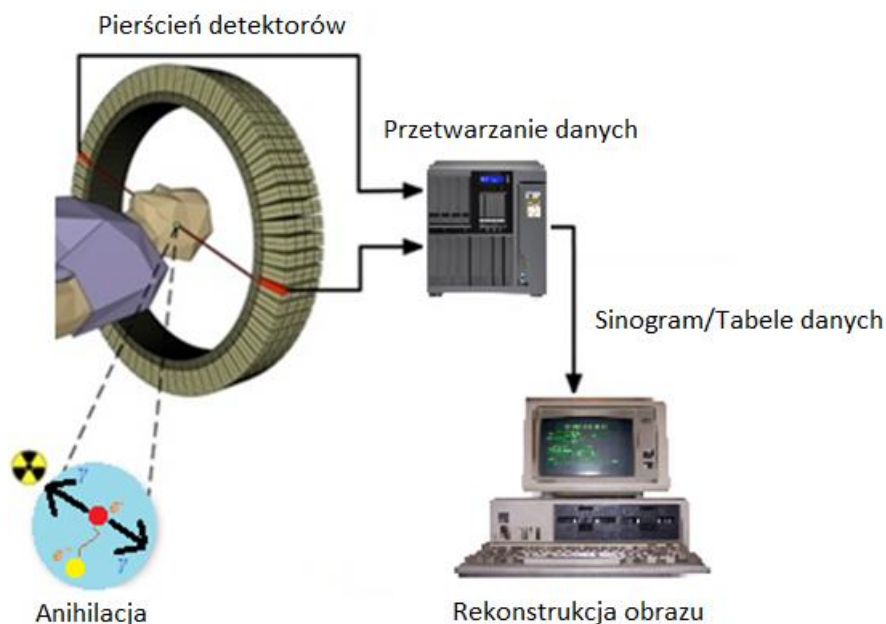
Energia kinetyczna uwolniona podczas rozpadu jądra rozkłada się pomiędzy pozyton i neutrino elektronowe, dlatego też rzeczywiste energie emitowanych pozytonów tworzą widmo ciągłe – przyjmując wartości od energii bliskiej zeru do niemalże całkowitej energii wyemitowanej podczas tego rozpadu [Derenzo, 1979]. Zasięg wyemitowanych pozytonów jest krótki i wynosi (dla najpowszechniej stosowanych izotopów e^+) od 0.2 mm do 2 mm [Cho et al., 1976]. Po wytraceniu energii kinetycznej zachodzi proces anihilacji. Tabela 2 przedstawia średnie wartości energii kinetycznej pozytonów emitowanych przez powszechnie stosowane izotopy.

Tabela 2. Właściwości fizyczne niektórych z najpopularniejszych izotopów e^+ [Baghaei et al., 2004]

Izotop	^{11}C	^{13}N	^{15}O	^{18}F	$^{68}\text{Ga}^*$
Czas półtrwania (min.)	20.4	9.96	2.07	109.7	68.3
Średnia energia pozytonów (MeV)	0.3	0.4	0.6	0.2	0.7
Średnie odchylenie pozytonu (mm)	0.28	-	-	0.22	1.35

* ^{68}Ga jest izotopem otrzymywanym z generatorów $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Powstaje w skutek rozpadu ^{68}Ge , którego czas półtrwania wynosi 275 dni.

W urządzeniu PET anihilacje są zliczane przez zewnętrzne detektory i wyznaczane jest umiejscowienie źródła promieniowania γ powstałego w wyniku anihilacji (Rysunek 3.3).



Rysunek 3.3. Schemat urządzenia PET.

Nie wszystkie powstałe podczas badania PET fotony 511 keV docierają do detektorów. Wygenerowane fotony mogą bowiem uczestniczyć w konkurencyjnych zdarzeniach, jakimi przede wszystkim są: zjawisko fotoelektryczne, rozpraszanie Comptonowskie oraz tworzenie par (proces odwrotny do anihilacji) [Burger et al., 2002]. Zjawisko fotoelektryczne polega na całkowitym pochłonięciu fotonu przez atom ośrodka, w taki sposób, że z atomu zostaje wybity elektron, zwykle z powłok leżących blisko jądra (K, L). Elektron ten nazywany jest fotoelektronem. Aby to zjawisko nastąpiło, energia fotonu zderzającego się z atomem musi przewyższać energię wiązania elektronu na danej powłoce. Energia ta nazywana jest też czasami pracą wyjścia elektronu z atomu. Dużo częstszym zjawiskiem dla fotonów 511 keV jest jednak efekt Comptona – jest to proces nieelastycznego rozproszenia kwantów promieniowania na elektronie swobodnym lub słabo związanym elektronie walencyjnym. W procesie tym kwant promieniowania elektromagnetycznego przekazuje część swojej energii elektronowi, a tor jego emisji zostaje zakrzywiony [Kąkol et al., 2015]. Ponadto natężenie I wiązki przechodzącej przez ośrodek o grubości x i gęstości ρ ulega osłabieniu – ma ono charakter wykładniczy i wyraża się wzorem (2):

$$I = I_0 \exp(-\mu\rho x) \quad (2)$$

gdzie I_0 jest natężeniem wyjściowym, a μ jest współczynnikiem tłumienia.

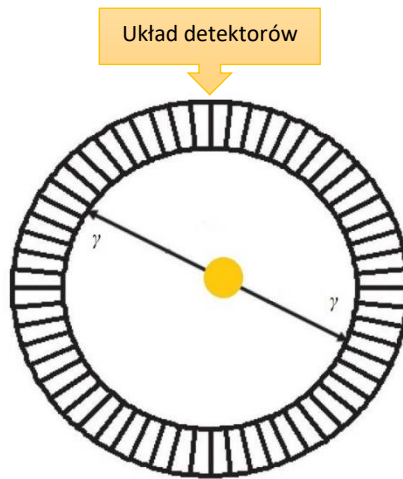
Powyższe równanie jest słuszne dla wąskich, monoenergetycznych wiązek promieniowania, które są trudne do uzyskania w praktyce. Dla szerokich wiązek promieniowania w równaniu (2) stosowana jest stała empiryczna $B(t, E_\gamma)$, zależna od czasu t i energii fotonów E_γ [Źródło 2] – tzw. współczynnik narastania promieniowania (ang. *build-up factor*), uwzględniająca rozproszenie wiązki gamma przez dowolne medium (3):

$$I = BI_0 \exp(-\mu\rho x) \quad (3)$$

Wspomniane wcześniej oddziaływania powodują, że do układu detektorów dociera mniejsza liczba fotonów, niż została wyemitowana. Takie osłabienie wiązki fotonów nazwane jest *atenuacją*. Zakrzywienie toru emisji kwantu γ w wyniku efektu Comptona zaburza dokładność określenia położenia źródła tego promieniowania. Na tę dokładność wpływa negatywnie również fakt, iż fotony nie są emitowane pod kątem równym dokładnie 180° , lecz z odchyleniem wynoszącym $\pm 0.6^\circ$. Jeśli kryształy scyntylicyjne są małych rozmiarów, odchylenie kąta emisji może sprawić, że dwa fotony nie zostaną uznane za zbieżne (a więc pochodzące z jednego zdarzenia anihilacji), co w rezultacie spowoduje ich odrzucenie. Z drugiej strony, zwiększanie powierzchni kryształów skutkuje obniżeniem rozdzielczości zarejestrowanego obrazu (efekt paralaksy) [Baghaei et al., 2004].

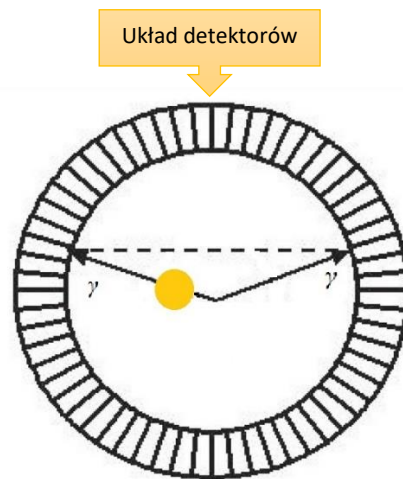
Detekcja koincydencji bazuje na koincydencji czasowej. Ponieważ dwa fotony generowane są jednocześnie w jednym akcie anihilacji, zarejestrowane fotony uważane są za koincydencyjne, jeżeli moment ich detekcji mieści się we właściwym interwale czasowym (zwykle od 1 do 10 nanosekund). Koincydencje klasyfikowane są według trzech typów:

- *Koincydencja prawdziwa* zachodzi podczas jednoczesnej detekcji dwóch fotonów pochodzących z jednego rozpadu jądra (Rysunek 3.4).



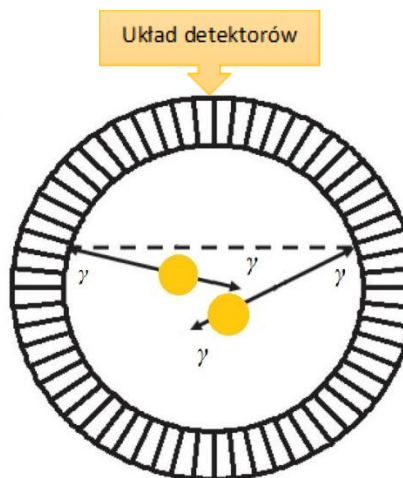
Rysunek. 3.4. Koincydencja prawdziwa

Koincydencja rozproszona to zdarzenie, w czasie którego rejestrowane są fotony pochodzące z jednego rozpadu jądra, lecz co najmniej jeden foton uległ rozproszeniu (Rysunek 3.5).



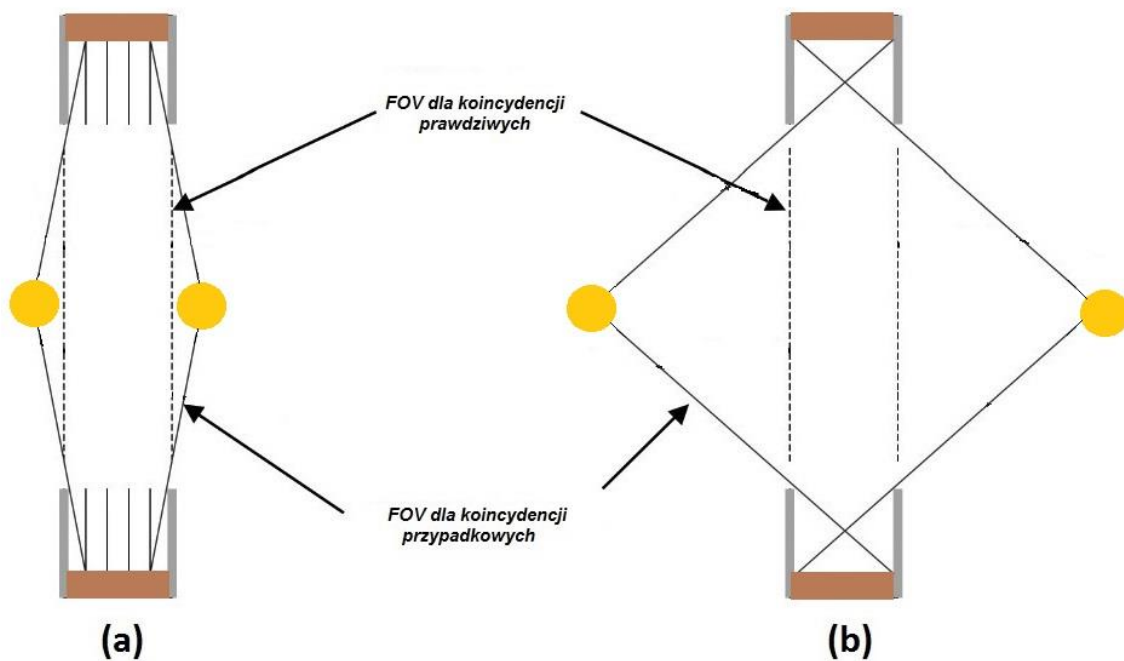
Rysunek. 3.5. Koincydencja rozproszona

- *Koincydencja przypadkowa* polega na jednoczesnej detekcji dwóch fotonów wyemitowanych z różnych jąder (Rysunek 3.6) [Shukla et al. 2006].



Rysunek. 3.6. Koincydencja przypadkowa

Koincydencje prawdziwe i rozproszone zależą liniowo od stężenia aktywności promieniotwórczej, natomiast liczba koincydencji przypadkowych rośnie z kwadratem aktywności promieniotwórczej. Koincydencje rozproszone i przypadkowe tworzą szum tła obniżający jakość obrazu, a ich występowanie dodatkowo indukuje pozorną migrację aktywności promieniotwórczej z obszarów gorących do zimnych. W celu poprawy jakości obrazu stosowane są techniki redukujące wpływ koincydencji rozproszonych i przypadkowych. Do takich technik zalicza się stosowanie przegród ołowiano-wolframowych między pierścieniami detektora w aparatach wielopierścieniowych oraz osłon ekranujących na zewnętrznych końcach układu detekcji ograniczających udział promieniowania pochodzącego spoza pola widzenia detektorów (ang. *Field of View*, FOV) (Rysunek. 3.7) [Cherry et al. 2003].



Rysunek.3.7. Obszar pola widzenia detektora oraz wpływ promieniowania z zewnątrz; (a) - z zastosowaniem przegród między pierścieniami detektora (w aparatach PET 2D), (b) - bez zastosowania przegród między pierścieniami detektora (w aparatach PET 3D).

Aparaty, w których zastosowano przegrody między pierścieniami, to aparaty pracujące w trybie 2D. W obrazowaniu 2D rozpatrywane są jedynie koincydencje zachodzące w określonym wycinku ograniczonym przegrodami (rejestrowane przez jeden z pierścieni detektorów), prostopadle do osi ciała pacjenta. Obraz objętościowy uzyskuje się przez wielokrotne powtórzenie akwizycji wzdłuż osi ciała pacjenta.

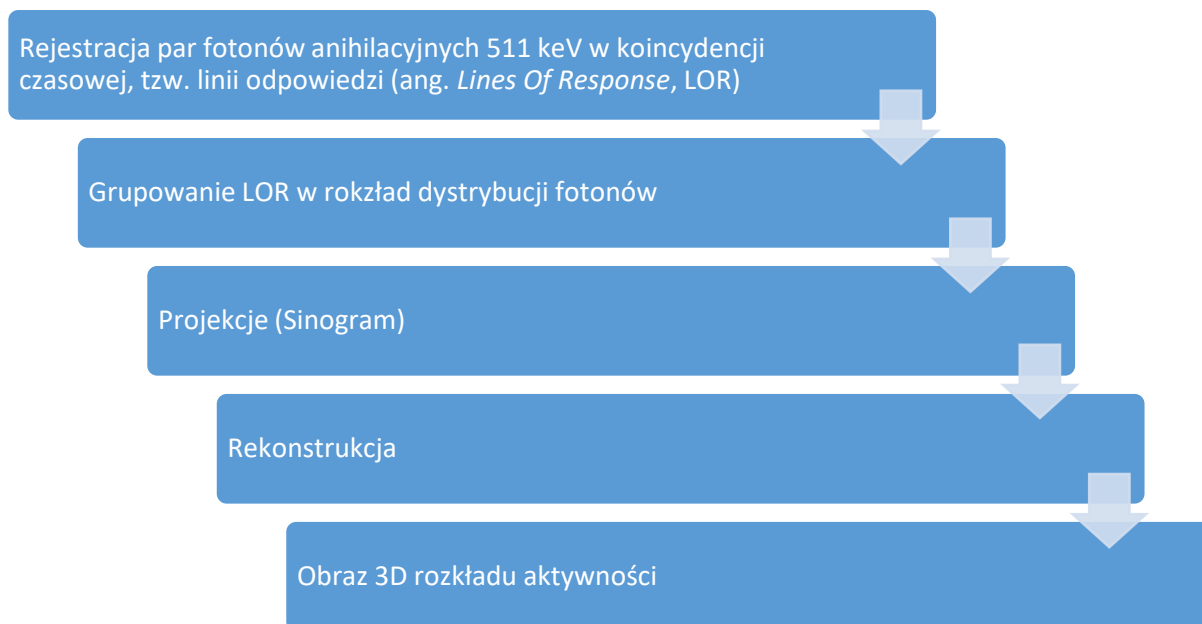
W obrazowaniu PET 3D, ze względu na brak przegród między pierścieniami, rejestrowane są zarówno koincydencje rozchodzące się w płaszczyznach prostopadłych, jak i ukośnych względem osi ciała pacjenta. Skanery PET 3D charakteryzują się większą czułością, a tym samym wyższym stosunkiem sygnału do szumu, co wymaga jednak zarejestrowania dużo większej liczby danych (około 10^3 więcej względem PET 2D) oraz większej mocy obliczeniowej przy rekonstrukcji. Obie techniki obrazowania – 2D, jak i 3D – pozwalają otrzymać obrazy objętościowe, a stosowane nazewnictwo odnosi się jedynie do sposobu akwizycji danych [Alessio et al., 2006], [Ollinger, 1996], [Wollenweber, 2002].

Inną techniką redukującą wpływ koincydencji przypadkowych jest stosowanie okienek detektora o mniejszych rozmiarach, ponieważ udział tych zdarzeń zależy liniowo od pola powierzchni okienek detektora.

Z kolei jakość zarejestrowanego obrazu, zaburzonego przez koincydencje rozproszone, można poprawić poprzez dyskryminację energii (czyli wyznaczenie wartości progowych dla energii rejestrowanych zdarzeń), ponieważ fotony ulegające rozproszeniu tracą część swojej energii. Dla aparatów PET 2D udział koincydencji rozproszonych wynosi od 10% do 20%, natomiast dla aparatów PET 3D od 30% do 60% (Rysunek 3.8) [Baghaei et al., 2004]. W celu korekcji obrazu wykorzystuje się między innymi modelowanie Monte Carlo [Motwani et al., 1995] oraz ocenę udziału koincydencji rozproszonych poprzez pomiar koincydencji w jednym lub wielu oknach energetycznych względem okna standardowego [Dawood et al., 2012].

Generowanie obrazu PET

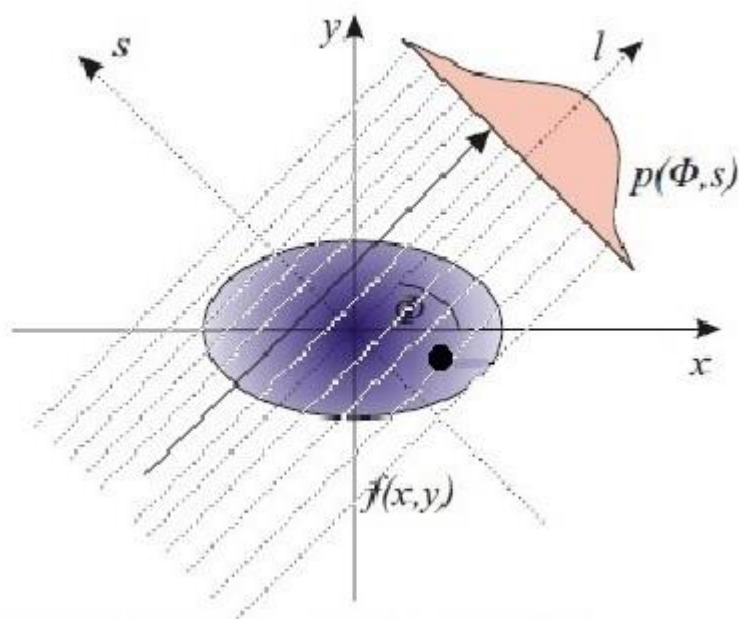
Podstawowe etapy procedury rejestracji danych i generowania obrazu diagnostycznego PET przedstawione zostały na rysunku 3.8.



Rysunek 3.8. Schemat ideowy akwizycji obrazu diagnostycznego PET.

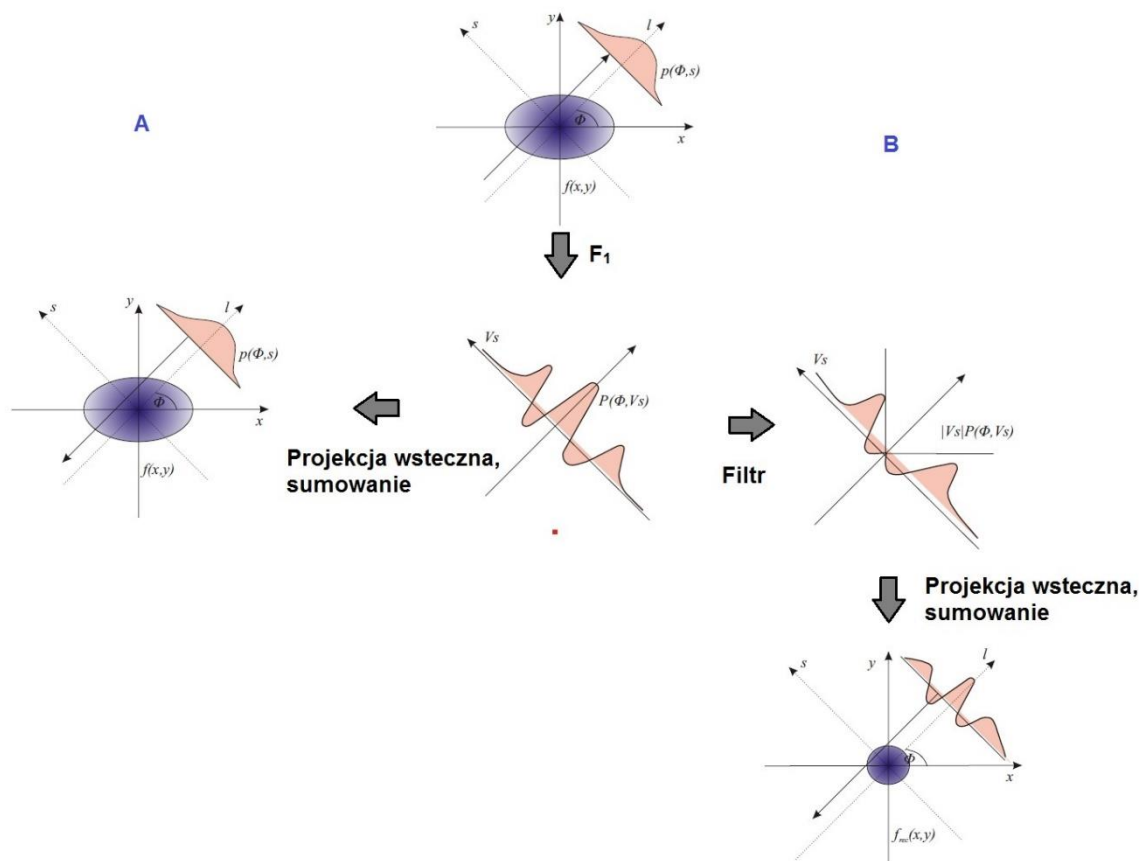
Zarejestrowane przez skaner PET dane to projekcje dla pojedynczych warstw prostopadłych do długiej osi ciała pacjenta i dla różnych kątów z przedziału $(0, \pi)$. Aby uzyskać rozkład aktywności izotopu w obrazowaniu 2D lub w obrazowaniu 3D dla pojedynczej warstwy, dane te muszą zostać przetworzone.

Techniki rekonstrukcji obrazu tomograficznego bazują na analizie rozchodzenia się fotonów wzdłuż linii wyznaczonej przez tory przelotu pary fotonów rozchodzących się w przeciwnych kierunkach. Linia odpowiedzi (ang. *Line Of Response*, LOR) łączy dwa detektory rejestrujące te fotony i zawiera informacje o lokalizacji cząsteczki radioznacznika, z której pochodzi pozyton. Zbiór linii odpowiedzi o tym samym kierunku kątowym zawiera projekcję dystrybucji fotonów pod tym kątem (Rysunek 3.9). Przeprowadzenie kolejnych pomiarów pod różnymi kątami wokół źródła promieniowania dostarcza informacji o położeniu źródeł promieniowania (ulokowania kolejnych aktów anihilacji) i jest podstawą do odtworzenia obrazu tomograficznego [Baghaei et al., 2004][Alessio et al., 2006].



Rysunek. 3.9. Rozkład dystrybucji fotonów wokół źródła promieniowania. Funkcja $p(\Phi,s)$ przedstawia projekcję rozkładu dystrybucji fotonów rozchodzących się po linii przelotu (l) wzdłuż linii odpowiedzi (s) zarejestrowanych pod kątem (Φ) dla punktów położonych w punktach $f(x,y)$ w polu widzenia detektora.

Rekonstrukcję obrazu można przeprowadzić z wykorzystaniem wielu technik. Technika najczęściej wykorzystywaną w tomografii PET jest filtrowana projekcja wsteczna, inaczej *filtrowany rzut wsteczny* (ang. *Filtered Back Projection*, FBP), czy też metoda sumacyjna z filtrowaniem [Shepp et al., 1974]. Jest to również technika szeroko stosowana w tomografii komputerowej. Opiera się ona na transformacji Fouriera $F_1\{p(\Phi,s)\}$, jest liniowa, szybka i zakłada uproszczony model fizyczny. Metoda FBP zapobiega powstawaniu rozmycia występującego przy bezpośrednim zastosowaniu metody Fouriera [Schultz et al., 1984]. Rekonstrukcja obrazu wymaga przeprowadzenia filtracji i operacji rzutu wstecznego. Idea techniki FBP przedstawiona została na Rysunku 3.10. Popularność filtrowanej projekcji wstecznej wynika z połączenia dokładności, szybkości obliczania i łatwości wdrażania. Jeżeli w punkcie w przestrzeni znajduje się emiter e^+ , pary fotonów będą emitowane jednorodnie pod wszystkimi kątami. Każda zarejestrowana linia odpowiedzi jest rzutowana z powrotem na siatkę obrazu, gdzie poprzez nakładanie, tworzy obraz zbliżony do oryginalnego obiektu [Tong et al., 2010].

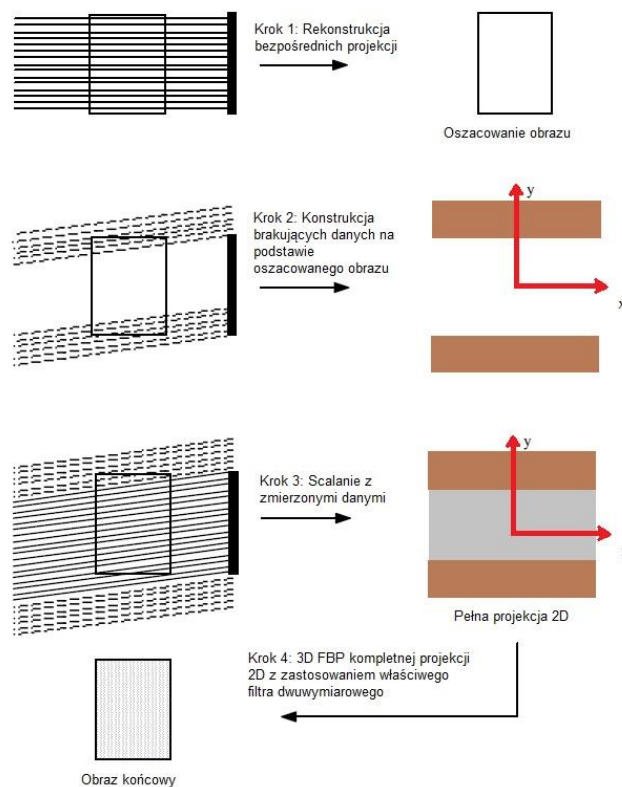


Rysunek 3.10. Techniki projekcji wstecznej bez filtrowania (A) i z filtrowaniem (B), gdzie v_s jest sprzężoną domeną Fouriera dla s .

Sama projekcja wsteczna przedstawia obraz faktycznego rozkładu aktywności, ale jest on niewyraźny, ponieważ zliczenia rozłożone są równomiernie wzdłuż linii odpowiedzi. Stopień eliminacji rozmycia obrazu zależy od zastosowanego filtra. Źle dobrany filtr rekonstrukcji (górnoprzepustowy) może bardzo dobrze eliminować rozmycie, jednak pozostawi szum, który wpłynie negatywnie na jakość obrazu. Dlatego istotny jest dobór filtra.

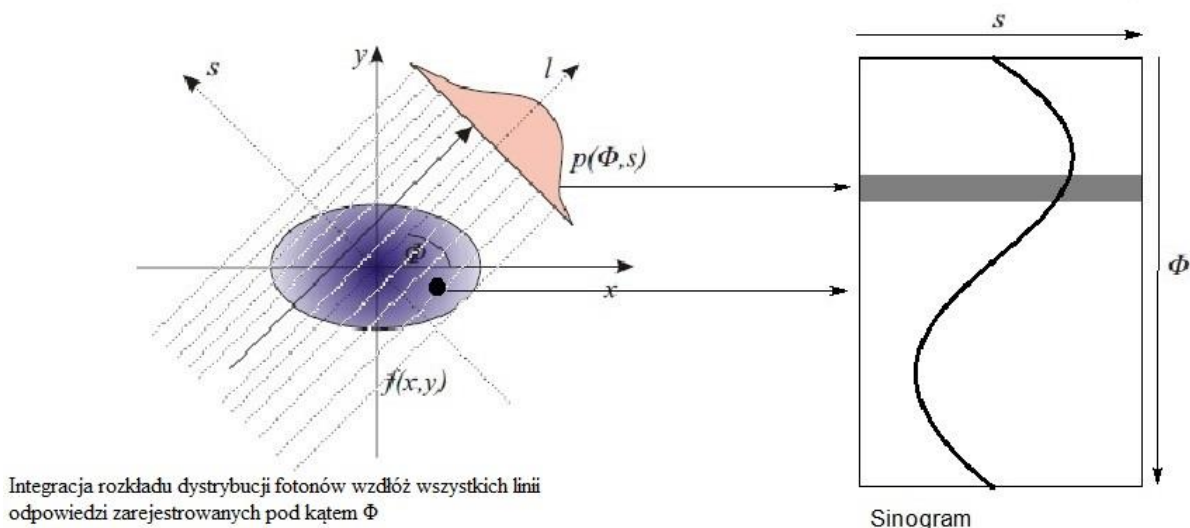
W latach 80. XX wieku, we wczesnym stadium rozwoju techniki PET zaproponowana została metoda obrazowania wykorzystująca czas przelotu fotonów (ang. *Time Of Flight*, TOF). Metoda ta bazuje na analizie różnicy czasowej w rejestracji na detektorze obu fotonów pochodzących z danego aktu anihilacji. Analiza ta ma na celu określenie punktu na linii odpowiedzi, w którym miało dojść do anihilacji. Obrazowanie TOF wymaga wyjątkowo szybkich pomiarów, w zamian oferując na rekonstruowanym obrazie znaczną poprawę stosunku sygnału do szumu [Tong et al., 2010].

Obecnie większość wielopierścieniowych kamer PET pracuje w trybie 2D PET (z zastosowaniem przegród wolframowo-ołowianych umieszczonych między pierścieniami), jednak kwestia wyższości któregoś z trybów akwizycji, 2D lub 3D, pozostaje wciąż otwarta. Wzrost czułości i krótszy czas akwizycji obrazu – główne zalety systemu 3D – pociągają za sobą wzrost udziału zdarzeń losowych i fotonów rozproszonych, co wpływa negatywnie na jakość obrazu. W celu rekonstrukcji obrazów 3D PET został opracowany i jest szeroko stosowany algorytm 3DRP (ang. *Three-Dimensional Reprojection Algorithm*, 3DRP) (Rysunek 3.11.).

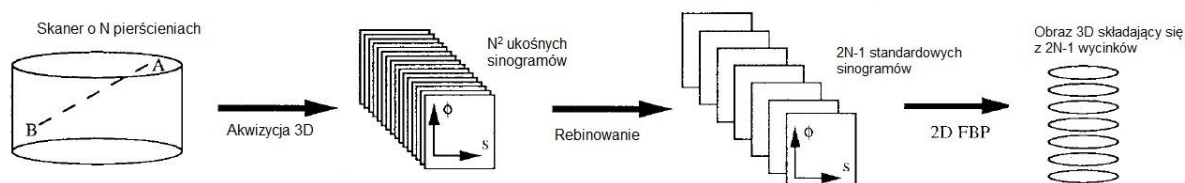


Rysunek 3.11. Algorytm 3DRP

Jest on rozszerzeniem filtrowanej projekcji 2D uwzględniającym wymagania techniki trójwymiarowej. Rekonstrukcja obrazu 3D z zastosowaniem tego algorytmu jest jednak bardzo czasochłonna, ze względu na większą liczbę linii odpowiedzi, co przekłada się na długi czas procedowania [Labbé et al., 2008]. Alternatywą są projekcje 3D z rebinowaniem (sortowaniem) sinogramów w zbiór standardowych sinogramów 2D, czyli zbiorów projekcji zarejestrowanych w zakresie $0 \leq \Phi \leq 2\pi$ (rysunek 3.12.) [Alessio et al., 2006] poprzez dokonanie pewnych przybliżeń, a następnie rekonstruowanych z wykorzystaniem algorytmów stosowanych w systemach 2D (rysunek 3.13) [Defrise et al., 1997]. Zabieg taki może jednak skutkować utratą rozdzielczości przestrzennej i pogorszeniem jakości obrazu.



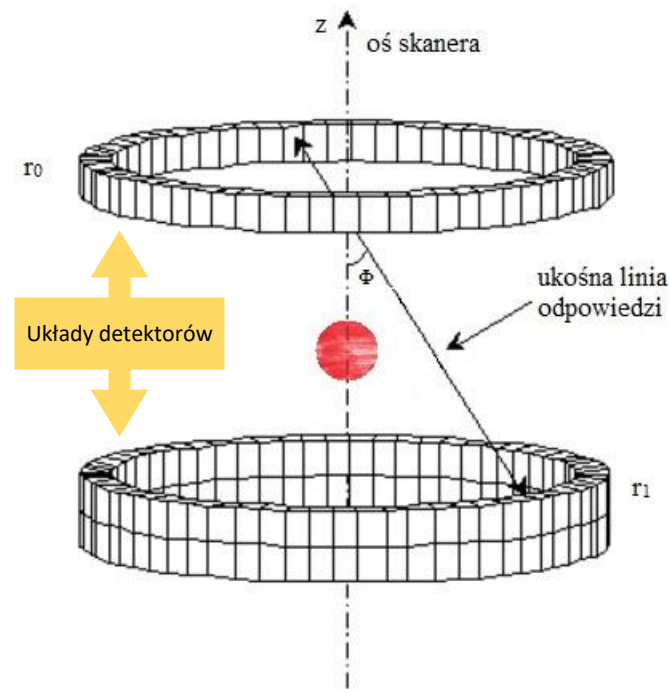
Rysunek 3.12. Projektcja $p(s, \Phi)$ pochodząca z integracji rozkładu dystrybucji fotonów wzdłuż wszystkich linii odpowiedzi s zarejestrowanych pod kątem Φ . Zbiór projekcji zarejestrowanych w zakresie $0 \leq \Phi \leq 2\pi$ tworzy sinogram. Na sinogramie każdy punkt $f(x, y)$ w polu widzenia (FOV) przedstawiony jest pod postacią linii sinusoidalnej.



Rysunek 3.13. Zasada algorytmu 3D z rebinowaniem. Reprojekcja skonstruowana jest z N bezpośrednich wycinków w płaszczyznach N pierścieni detektora oraz $N-1$ wycinków ukośnych..

Najczęściej stosowanymi algorytmami są algorytmy SSRB (ang. *Singe-Slice ReBinning*), MSRB (ang. *MultiSlice ReBinning*) oraz Fourierowska redukcja danych FORE (ang. *Fourier ReBinning*) [Baghaei et al., 2004]. Algorytm SSRB jest zdecydowanie szybszy niż 3DRP, ale daje dokładne wyniki tylko wtedy, gdy rozkład znacznika skoncentrowany jest blisko osi skanera. Dla przykładu, w przypadku obrazowania mózgu z wykorzystaniem [^{18}F]-fluorodeoksyglukozy, dystrybucja znacznika występuje szerzej transosiowo i dlatego można się spodziewać większych zakłóceń, szczególnie jeżeli głowa pacjenta nie jest właściwie ułożona w środku pola widzenia. Wówczas wymagana jest dokładniejsza rekonstrukcja 3D czy też dokładniejsze metody redukcji danych. Umożliwia to algorytm MSRB, w którym ukośne linie odpowiedzi (Rysunek 3.14) wchodzą w skład sinogramów wszystkich pierścieni detektora, które LOR przecinają. Algorytm ten jest niestety mniej stabilny przy wyższych poziomach szumu niż algorytm SSRB. Kolejna metoda, FORE, charakteryzuje się największą precyzją z wszystkich tu wymienionych, jest też zdecydowanie bardziej odporna na wpływ szumu oraz

wykazuje najmniejszy spadek rozdzielczości przestrzennej związanej z redukcją danych [Defrise et al., 1997].



Rysunek 3.14. Szkic skanera cylindrycznego. Ukośna linia odpowiedzi łączy detektory dwóch pierścieni skanera.

Dystrybucja aktywności może być odtwarzana zarówno przy wykorzystaniu wymienionych wcześniej metod, jak i algorytmów iteracyjnych zwiększających stopniowo szacowanie dystrybucji w kierunku maksymalizacji funkcji rozwiązania kosztem długiego czasu potrzebnego na przeprowadzenie iteracji. Najpopularniejsze obecnie algorytmy iteracyjne to metoda maksymalnej wiarygodności (ang. *Maximum Likelihood Expectation Maximization*, ML-EM) oraz jej zmodyfikowana, znacznie szybsza wersja OSEM (ang. *Ordered Subset Expectation Maximization*, OSEM). Ideę ich działania przedstawia Rysunek 3.15 [Słomski et al., 2014]. Najpoważniejszą wadą obu algorytmów jest tendencja do generowania artefaktów szumu przy rosnącej liczbie iteracji [Baghaei et al., 2004].



Rysunek 3.15. Schemat blokowy iteracyjnych metod rekonstrukcji obrazu.

Obrazowanie ilościowe i parametryczne

Dynamika i wychwyty znacznika mogą zostać określone na podstawie danych zawartych w obrazie dzięki regularnemu prowadzeniu testów określających sprawność skanera PET. W pomiarach stosowany jest fantom cylindryczny jednorodnie wypełniony izotopem promieniotwórczym ^{68}Ge lub ^{18}F o zadanej aktywności. Testy są prowadzone z określoną częstotliwością i polegają na wyznaczeniu m. in. takich parametrów systemu obrazowania jak: rozdzielczość przestrzenna (ang. *spatial resolution*), czułość (ang. *sensitivity*), dokładność korekcji osłabienia strumieni fotonów (ang. *attenuation correction*), dokładność korekcji koincydencji przypadkowych oraz strat sygnału. Procedury testowe określone są normami *National Electrical Manufacturers Association* [NEMA, 2012] oraz *International Electrotechnical Commission* [IEC, 2013], [Geworski et al., 2002], [Tomaszuk et al., 2015].

Na wychwyty radioznacznika w tkance mają wpływ między innymi szybkość metabolizmu, objętość i prędkość przepływu krwi oraz gęstość receptorów [Routsalainen et al., 1997], [Patlak et al., 1983], [Phelps et al., 1979]. Analiza wychwyty radioznacznika pozwala określić poziom aktywności metabolicznej obrazowanej tkanki, a na tej podstawie ocenić typ toczącego się w niej procesu (metabolizm prawidłowy/proces zapalny/nowotworowy łagodny/złośliwy) lub monitorować odpowiedź na zastosowane leczenie. Najłatwiejszym, choć bardzo zgrubnym, sposobem takiego szacowania jest wizualna ocena zarejestrowanego obrazu. Za patologiczny uznaje się wychwyty znacznika wyższy niż w otaczających tkankach. Nieco lepszą metodą jest wizualne porównanie ze zdrową tkanką przy zastosowaniu skali barw, której stopnie (od pięciu do dziesięciu) reprezentują poziom wychwyty znacznika w tkance. Kolejną techniką bazuje na określeniu współczynnika aktywności tkanki nowotworowej względem tkanki zdrowej. Określenie współczynnika wymaga korekcji osłabienia, jednak uzyskane wartości wciąż są zależne od lokalizacji obszaru zainteresowania (ang. *Region Of Interest*, ROI), aktywności

tkanki zdrowej, zastosowanego algorytmu rekonstrukcji obrazu i jego rozdzielczości oraz sposobu zdefiniowania aktywności tkanek (czy określone zostały przy użyciu maksymalnych czy też uśrednionych wartości liczby zliczeń).

W metodzie wizualnej półilościowej stosowanym parametrem oceny wychwytu radioznacznika jest standaryzowana wartość wychwytu, SUV (ang. *Standardized Uptake Value*, SUV) [Thie, 2004]. Jest to wartość odpowiadająca maksymalnej wartości piksela w analizowanym obszarze ROI. Parametr SUV został zdefiniowany jako stosunek aktywności skoncentrowanej w tkance do całkowitej aktywności podanej pacjentowi na jednostkę masy ciała pacjenta (4):

$$SUV = \frac{[aktywność\ w\ ROI\ (mikroCi/ml)]}{[(dawka\ (mCi)) / (waga\ (kg))]} \quad (4)$$

Zastosowanie parametru SUV jako miary względnej absorpcji tkanki (lub narządu) ułatwia porównywanie badań. Jednakże należy pamiętać, że wartości SUV charakteryzują się dużym stopniem zmienności ze względu na fizyczne i biologiczne źródła błędów, a także ze względu na przyczyny związane z akwizycją i przetwarzaniem obrazów [Boellaard et al., 2004]. Wielokrotnie wykazano, że zastosowanie progów SUV (np. SUV > 2.5) separujących procesy łagodne i złośliwe często jest błędne. W wielu procesach zapalnych obserwuje się znaczący wychwyty FDG o wysokiej wartości SUV; i odwrotnie – liczne procesy nowotworowe charakteryzują się niską absorpcją FDG i niskimi wartościami SUV. Parametr SUV odzwierciedla stężenie radioznacznika w analizowanej objętości tkanki nowotworu. Najwyższa z wartości SUV, SUV_{max}, zależy od wielkości obszaru.

Aby wyznaczyć parametr SUV, wymagana jest korekcja osłabienia (ang. *attenuation correction*) oraz dokładne określenie podanej dawki aktywności z uwzględnieniem aktywności pozostałej w strzykawce i kaniuli oraz skorygowanie dawki pod względem czasu półtrwania izotopu pozytonowo-emisyjnego względem czasu akwizycji obrazu PET [Baghaei et al., 2004].

Aparaty PET

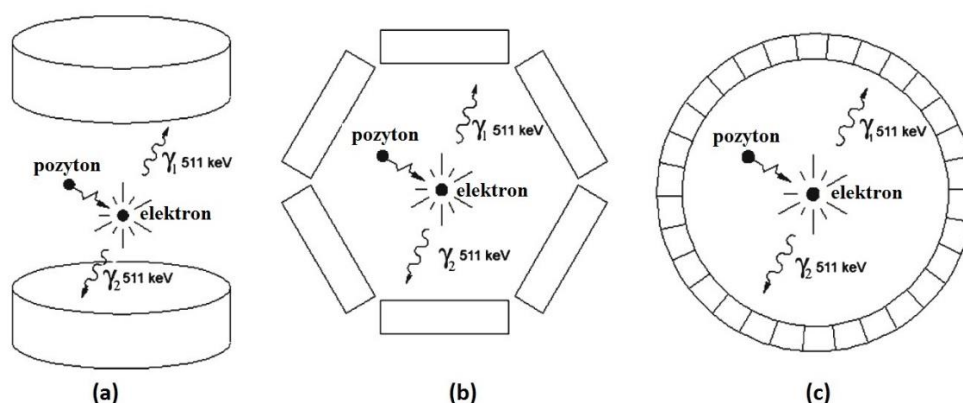
Każdy aparat zdolny do rejestracji znaczników pozytonowo emisyjnych może być uważany za aparat emisyjnej tomografii pozytonowej. Tak więc do grupy urządzeń PET zaliczyć można zarówno proste i tanie gamma kamery, jak i kosztowne, wielopierścieniowe, dedykowane

aparaty PET i aparaty multimodalne. W grupie tej wyróżnia się sześć podgrup (schematy trzech przykładowych rodzajów aparatów PET przedstawiono na Rysunku 3.16):

1. Gamma kamery ze scyntylatorami wykonanymi z jodku sodu aktywowanego talem NaJ(Tl) (ponieważ powszechnie stosuje się nomenklaturę angielską – NaI(Tl), więc tak też będę oznaczał kryształ scyntylacyjny w tej pracy) z zastosowanymi przesłonami ołowianymi. Są to popularnie stosowane w medycynie nuklearnej aparaty SPECT służące do tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (ang. *Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) z detekcją fotonów o energii 140 keV pochodzących z rozpadu metastabilnego jądra technetu ^{99m}Tc . Są one najtańsze, a jednocześnie umożliwiają rejestrację fotonów powstałych w skutek anihilacji pozytonów. Jednak ich dużą wadą jest niska gęstość kryształów jodku sodu i związana z nią niska zdolność do zatrzymywania fotonów o wyższej energii, co utrudnia detekcję fotonów 511 keV, pochodzących z anihilacji pozytonów [Townsend, 2004]. Wydajność absorpcji fotonów jest proporcjonalna do gęstości i efektywnej liczby atomowej kryształu scyntylacyjnego. Tę wydajność prezentuje wartość ρZ^4_{eff} , gdzie ρ to gęstość kryształu, a Z^4_{eff} efektywna liczba atomowa kryształu [Murty, 1965]. Wartość ρZ^4_{eff} dla NaJ(Tl) wynosi $24.5 \cdot 10^6$ (dla porównania ρZ^4_{eff} kryształu germanianu bizmutu, $\text{Bi}_4\text{Ge}_3\text{O}_{12}$ (ang. *Bismuth Germanium Oxide*, BGO) wynosi $227 \cdot 10^6$) [van Eijk, 2002]
2. Dwugłowicowe kamery SPECT ze zmodyfikowanym układem elektronicznym dostosowanym do detekcji fotonów koincydencyjnych i zdemontowanymi kolimatorami ołowianymi. Usunięcie ołowianych kolimatorów znacznie zwiększa czułość detektorów względem jednogłowicowej kamery SPECT. Mimo to, zmodyfikowane aparaty dwugłowicowe wciąż pozostawiają wiele do życzenia z powodu zastosowania cienkich (zwykle o grubości 9.5 mm) kryształów NaJ(Tl). Ich stosunkowo niska gęstość sprawia, że czułość detekcji wysokoenergetycznych fotonów 511 keV, które mogą oddziaływać w sieci krystalicznej scyntylatora (oddziaływania fotoelektryczne i Comptona), jest niewielka [Patton et al., 1999].
3. Następcami aparatów dwugłowicowych są dedykowane aparaty PET z detektorem zamkniętym w pierścieniu składający się zwykle z sześciu, płaskich lub wygiętych, głowic. Jako kryształy scyntylacyjne wykorzystywane są kryształy NaJ(Tl), jednak o znacznie większej grubości (19.0 mm [Patton et al., 1999], a nawet 25.4 mm [Adam et al., 2001]), co zwiększa czułość detekcji. Dzięki zamkniętemu pierścieniowi detektorów, wydajność detekcji jest jednorodna w obrębie pola widzenia. Pomimo

wielu usprawnień, w tym przyspieszających rejestrację impulsu i skracających czas martwy detektora, konstrukcja ta wciąż bazuje na konstrukcji gamma kamery, co może spowodować przesylenie detektora. Aby tego uniknąć, podawana pacjentowi dawka jest zredukowana o 60% do 80% względem aparatów wykorzystujących scyntylatory BGO [Adam et al., 2001][Baghaei et al., 2004].

4. Kolejny etap ewolucji kamer PET to wielopierścieniowe kamery z detektorami BGO. Dzięki zastosowaniu kryształów o niemal dwukrotnie większej gęstości niż NaJ(Tl) uzyskano detektor zdolny do rejestracji większej liczby zliczeń, co przekłada się na wyższą jakość obrazów. Zastosowanie kryształów BGO umożliwiło zastąpienie dużych detektorów wieloma małymi kryształami upakowanymi w kilkanaście pierścieni [Townsend, 2004], a w dalszej konsekwencji wyeliminowało konieczność konstruowania detektorów obrotowych. Eliminacja rotacji detektora okazuje się bardzo ważna przy obrazowaniu znaczników o krótkich czasach półtrwania (np. znaczniki oparte o tlen-15 czy azot-13) [Baghaei et al., 2004].



Rysunek. 3.16. Schematy trzech różnych konstrukcji aparatów PET: (a). Dwugłowicowa kamera SPECT ze zmodyfikowanym układem elektronicznym dostosowanym do detekcji fotonów koincydencyjnych i usuniętymi kolimatorami; (b). Dedykowana kamera PET wykorzystująca dużych rozmiarów kryształy NaI(Tl); (c). Dedykowana kamera PET wykorzystująca małych rozmiarów kryształy BGO.

Zastosowanie w urządzeniach PET kryształów scyntylacyjnych nowej generacji, takich jak ortokrzemiany gadolinu, $Gd_2SiO_5[Ce]$ (ang. *cerium-doped gadolinum oxyorthosilicate*, GSO) i lutetu, $Lu_2SiO_5[Ce]$ (ang. *cerium-doped lutetium oxyorthosilicate*, LSO) z domieszką ceru, przyniosło istotne zwiększenie wydajności aparatów. Właściwości fizyczne wspomnianych kryształów zostały porównane w Tabeli 3 [Townsend, 2004].

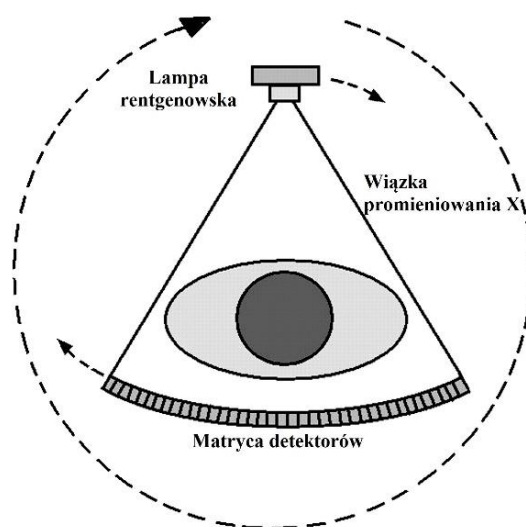
Tabela 3. Porównanie właściwości fizycznych kryształów scyntylacyjnych stosowanych w aparatach PET.

Kryształ	Gęstość (g/cm ³)	Efektywna liczba atomowa	Współczynnik tłumienia (cm ⁻¹)	Ilość światła [NaI(Tl) = 100]	Czas wygaszania (ns)
BGO	7.13	75	0.96	15	300
NaI(Tl)	3.67	51	0.35	100	230
GSO	6.71	59	0.67	41	65
LSO	7.40	65	0.87	75	40

- Osobną grupę tworzą także aparaty multimodalne, hybrydowe kamery łączące w sobie różne techniki obrazowania, jak na przykład SPECT/PET, SPECT/TK, PET/TK czy PET/MRI – najmłodsza z hybryd. Techniki multimodalne stanowią nowe wyzwanie dla fizyki medycznej i wymagają rozwiązania szeregu kwestii związanych z oprzyrządowaniem, na przykład z doбором detektora, który będzie odpowiedni dla obu technik hybrydy PET/TK. Przykładem jest detektor bazujący na bromku lantanu domieszkowanym cerem LaBr₃(Ce). Umożliwia on uzyskanie pełnej zgodności geometrycznej obrazów PET i TK, a w efekcie zwiększenie dokładności diagnostycznej aparatów. Zalety metody hybrydowej, jaką jest PET/TK, przewyższają jej wady, a dowodem na to jest obserwowany wzrost zainteresowania tą techniką w środowiskach medycznych związanych z radiodiagnostyką obrazową i radioterapią. Zastosowanie PET/TK w planowaniu radioterapii przyczynia się do wzmocnienia pozycji tej techniki i jest tylko kwestią czasu, aby stała się ona standardem w diagnostyce i planowaniu leczenia nowotworów [Mawlawi et al., 2004], [Nassalski, 2010].
- Aparaty mikroPET do obrazowania małych zwierząt mają swoje zastosowanie w pracach badawczo-wdrożeniowych i nie są istotne z punktu widzenia celów niniejszej pracy.

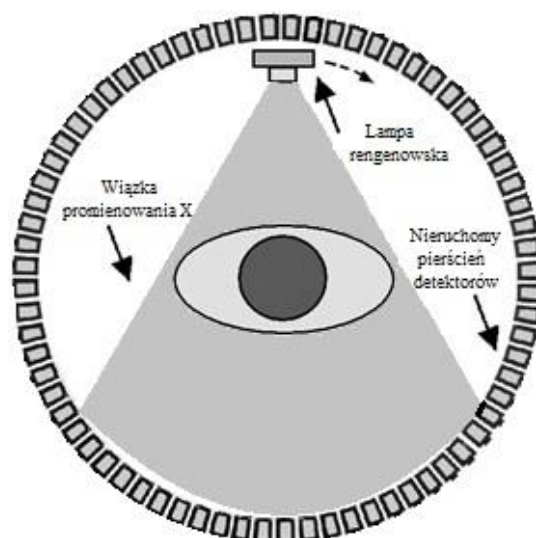
4. PET/TK: pozytonowa tomografia emisyjna łączona z tomografią komputerową

PET/TK to technika hybrydowa, łącząca pozytonową tomografię emisyjną z tomografią komputerową (TK) (ang. *Computed Tomography*). Skan pacjenta wykonany techniką tomografii komputerowej, tak samo jak i wykonany techniką PET, stanowi zbiór warstw. Obecnie najpowszechniej stosowane są aparaty TK trzeciej generacji. Promieniowanie rentgenowskie jest w nich skolimowane do wiązki o kształcie wachlarza w płaszczyźnie wycinka obejmującego pole widzenia całą szerokość ciała pacjenta dzięki szerokiej matrycy detektorów. Źródło promieniowania i matryca detektorów są przeciwległe względem ciała pacjenta. Taka konfiguracja aparatu nie wymaga prowadzenia translacji, w przeciwieństwie do aparatów wcześniejszych generacji, w których wiązka promieniowania X obejmowała tylko wąską część wycinka. Schemat skanowania wycinka przy użyciu aparatu trzeciej generacji przedstawiony jest na Rysunku 4.1.



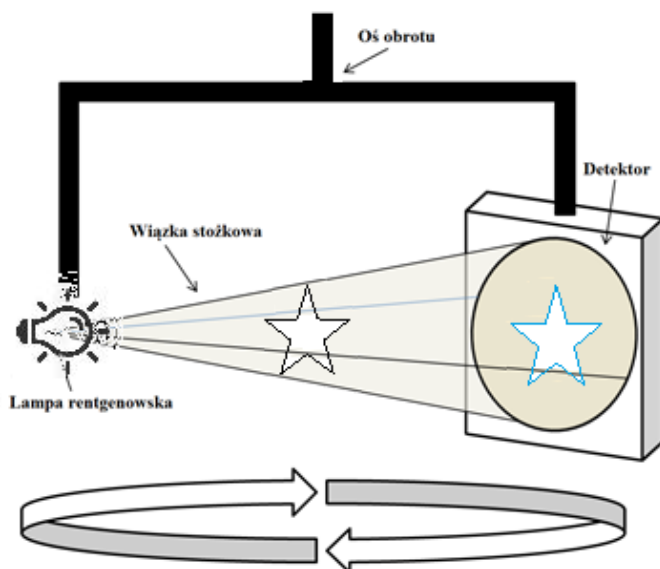
Rysunek 4.1. Schemat obrazowania TK z użyciem aparatu trzeciej generacji.

Na rynku aparatów TK są też dostępne aparaty czwartej generacji. W tych aparatach matrycę detektorów w kształcie łuku zastąpiono pierścieniem nieruchomych detektorów (Rysunek 4.2). Aparaty te nie są popularne, ponieważ są droższe oraz charakteryzują się wyższym rozproszeniem wiązki [Goldman, 2007].



Rysunek 4.2. Schemat obrazowania TK z użyciem aparatu czwartej generacji.

Ostatnie postępy w tomografii komputerowej to zastosowanie wielorzędowych matryc detektorów, skanowanie spiralne oraz TK z wiązką stożkową (ang. *Cone Beam Computed Tomography*, CBCT). Skanowanie wielorzędowe (16 rzędów detektorów) umożliwia akwizycję obrazów kilku przekrojów jednocześnie, co znacząco skraca czas skanowania. Konwencjonalne skanery TK przeznaczone są przede wszystkim do skanowania całego ciała pacjenta z dużą prędkością, aby zminimalizować artefakty spowodowane ruchem serca, płuc i jelit, przez co są duże i kosztowne. Pojawienie się aparatów TK z wiązką stożkową (Rysunek 4.3) otworzyło drogę dla rozwoju stosunkowo małych i niedrogich aparatów dedykowanych do obrazowania szczękowo-twarzowego. Aparaty TK z wiązką stożkową znajdują zastosowanie głównie w gabinetach stomatologicznych, gdzie ważne są względy ekonomiczne, przestrzeń odgrywa nieraz rolę kluczową, a potrzeby diagnostyczne dotyczą obrazowania wyłącznie głowy pacjenta [Sukovic, 2003].



Rysunek 4.3. Zasada działania tomografu CBCT (z lewej). Aparat CBCT KODAK Carestream CS 8100 3D (z prawej). Przedstawiony aparat znajduje się na wyposażeniu gabinetu stomatologicznego Macieja i Wioletty Szewczyk w Gliwicach.

Trzy powody przemawiają na korzyść połączenia technik PET i TK w jeden aparat multimodalny. Po pierwsze możliwość redukcji szumów na obrazach PET poprzez korekcję osłabienia emisji. Obrazy TK są znacznie słabiej zakłócone, wiązka promieniowania jest skolimowana i stała na całej powierzchni wycinka, a zarejestrowany obraz odzwierciedla jej osłabienie przy przejściu przez badany ośrodek. Różne tkanki w różnym stopniu tłumią promieniowanie (standardowy zakres energii promieniowania rentgenowskiego stosowanych w tomografii komputerowej to 40-140 keV [Kinahan et al., 1998]).

Kolejną kwestią jest konieczność wykonania korekcji osłabienia PET w możliwie najkrótszym czasie, aby skrócić czas trwania obrazowania PET. Krótki czas badania jest ważny nie tylko ze względu na komfort pacjenta, ale i ze względu na artefakty obrazu związane z ruchomością oddechową pacjenta. Obecnie stosowane są w tym celu techniki *okienkowania transmisji* i/lub *segmentacji obrazu transmisji*. Okienkowanie transmisji odrzuca te koincydencje w obrębie pola widzenia, które nie są kompatybilne z położeniem źródła emisji. Segmentacja z kolei predefiniuje typy tkanek (powietrze, woda, kości) bazując na z góry ustalonych wartościach korekcji osłabienia. Każdy segment jest skorelowany ze stałą wartością osłabienia przypisaną danej tkance.

Trzecim powodem przemawiającym za budową aparatów hybrydowych jest potrzeba dokładnego ulokowania anatomicznego obszarów o zmienionym metabolizmie. Największą

trudność w interpretacji obrazów PET stwarza bowiem brak struktur anatomicznych. Obrazy PET charakteryzują się niższą rozdzielczością i są mniej dokładne w anatomicznych obszarach ognisk anormalnego wychwytu, zwłaszcza dla mniej doświadczonych lekarzy. Dokładna anatomiczna lokalizacja zmiany chorobowej w połączeniu z jej aktywnością metaboliczną mogą mieć znaczenie dla diagnozy, określenia stadium choroby oraz leczenia pacjenta. [Mawlawi et al., 2004]. Wadę tę usuwa fuzja obrazów PET i TK, w wyniku której informacje fizjologiczne dostarczone przez pozytonową tomografię emisyjną skorelowane zostają z ramami anatomicznymi pochodzącymi z obrazowania TK. Po przeprowadzeniu skanowania, korekcji osłabienia i rekonstrukcji obrazu PET, wynik obrazowania wyświetlany jest dla oceny klinicznej. Obszary zainteresowania ROI to obszary o zwiększonej aktywności promieniotwórczej pochodzącej od radioznacznika PET. Można im przypisać pewne charakterystyki, w tym na przykład standaryzowaną wartość wychwytu (SUV).

Łączenie technik ma również pewne wady i niedogodności. Trudności sprawiają, między innymi, ciała obce o wysokiej gęstości znajdujące się w ciele pacjenta, jak na przykład implanty (np. stawu biodrowego) czy wypełnienia stomatologiczne. Generują one na obrazie TK wyraźne artefakty w postaci smug – są one rezultatem silnego osłabienia promieniowania przez materiały ceramiczne czy metalowe. Artefakty te są propagowane do obrazu PET, bowiem podczas korekcji osłabienia współczynnik korekcji zostaje przeszacowany, co z kolei skutkuje pozornym zwiększeniem stężenia znacznika na obrazie PET [Nahmias et al., 2008] Wiele współczesnych aparatów, jak te stosowane w gabinetach stomatologicznych, prowadzą redukcję artefaktów automatycznie i nie jest możliwe wyodrębnienie nieskorygowanego obrazu. Obrazy nieskorygowane były dotychczas wielokrotnie publikowane, jak np. w pracy zbiorowej [Nahmias et al., 2008]. Niekiedy artefakty są na tyle intensywne, że pozostają widoczne nawet po zastosowaniu współczesnych zaawansowanych algorytmów redukujących (Rysunek 4.4).

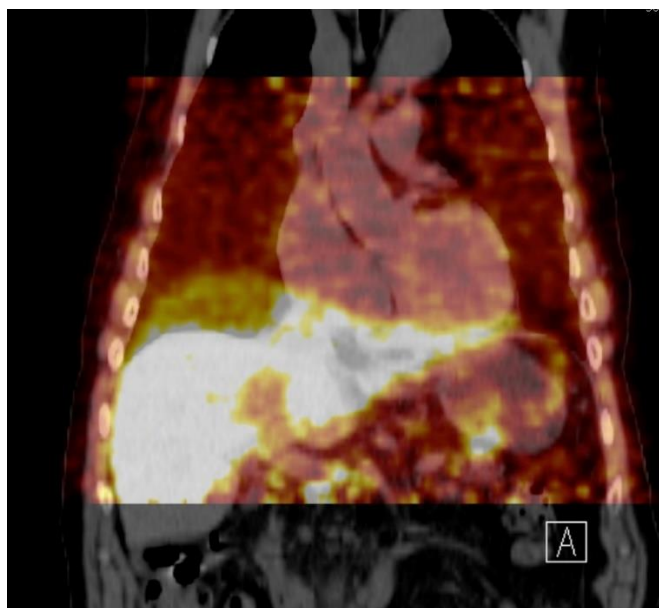


Rysunek 4.4. Obraz zarejestrowany przez aparat KODAK Carestream CS 8100 3D (A) obraz lewego trzonu żuchwy z widocznymi implantami metalowymi.; (B) powiększenie obrazu z wyeksponowaniem implantu metalicznego. Po obu stronach korony implantu widoczne są jasne smugi. Zdjęcia zamieszczone dzięki uprzejmości państwa Macieja i Wioletty Szewczyk prowadzących swój gabinet stomatologiczny w Gliwicach.

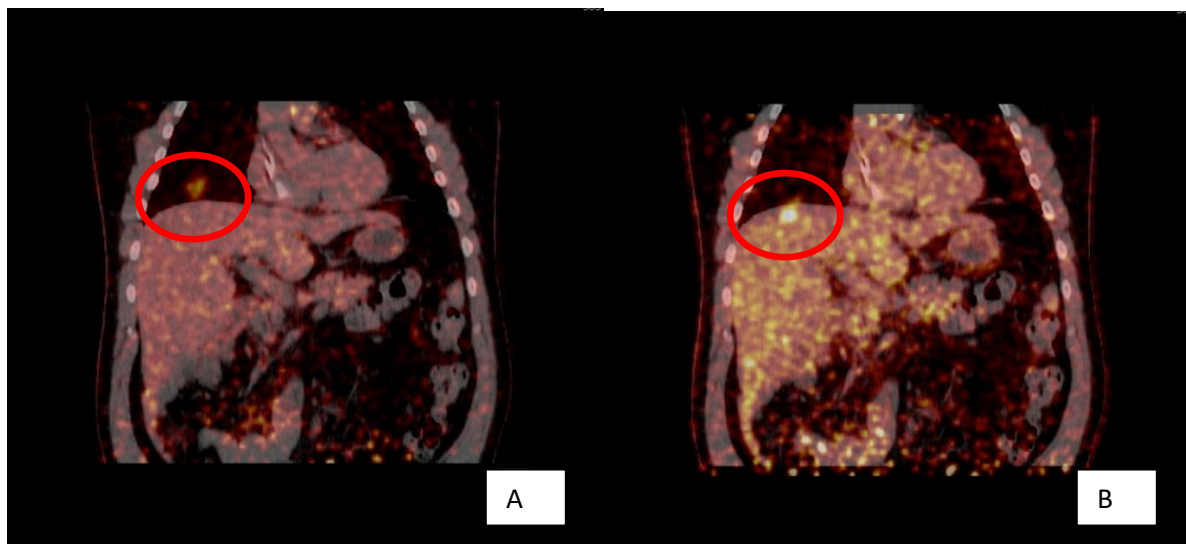
Źródłem artefaktów może stać się dożylny lub doustny środek kontrastujący, zwany żargonowo *kontrastem*, stosowany często w badaniach prowadzonych techniką tomografii komputerowej. Jest to substancja pochłaniająca znaczną część promieniowania rentgenowskiego podawana w celu uzyskania dokładniejszego obrazu lub wzmocnienia obrazu struktury patologicznej. Takie wzmocnienie obrazu TK może przekładać się na niedokładności rekonstrukcji obrazu PET [Antoch et al., 2002]. Niedokładność ta polega na przeszacowaniu współczynnika korekcji osłabienia PET i jest zależna od stężenia podanego środka kontrastującego. Stężenie to nie jest w organizmie ani stałe, ani jednorodne, dlatego przeszacowanie współczynnika korekcji osłabienia również nie jest stałe. Różnice wynikają z takich czynników jak masa ciała pacjenta, gęstość tkanki, przepływ krwi oraz, co najistotniejsze, zależą od czasu jaki upłynął pomiędzy podaniem środka kontrastującego a przeprowadzeniem badania TK. Zastosowanie kontrastu przed badaniem PET/TK wpływa na dokładność obrazu PET – zarówno ilościową, jak i jakościową [Mawlawi et al., 2004].

Jeśli ruch oddechowy nie jest uwzględniany w sekwencji akwizycji, na obrazie powstaną artefakty oddechowe. Zaburzają one objętość docelową i jej pozycję. Artefakty te występują, ponieważ skany rejestrowane są w krótkim czasie, więc są uzyskiwane na różnych etapach cyklu oddechowego pacjenta. Mogą być generowane w obrębie wycinka, ponieważ algorytmy rekonstrukcji zakładają, że obrazowany obiekt jest niezmienny w czasie akwizycji. Artefakty ruchowe są częste na obrazach klatki piersiowej (Rysunek 4.5) i prowadzą do błędnego

wyznaczenia granicy między tkankami patologicznymi i zdrowymi. Należy pamiętać, że ruch oddechowy może generować artefakty we wszystkich technikach obrazowania, w tym w tomografii emisyjnej PET, która stała się standardową techniką obrazowania niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*, NSCLC). Skany PET wymagają dłuższych niż w TK czasów akwizycji i dlatego rejestrowane są w ciągu wielu cykli oddechowych. Jeżeli ruch oddechowy nie zostanie uwzględniony, obraz guza będzie rozmyty, co utrudnia wyraźnie wyznaczenie granic tkanek oraz może powodować pominięcie małych objętości ruchomych, które potencjalnie mogą się okazać nowotworowymi [AAPM, 2006]. Takie obrazy, wykonane przy użyciu dwóch technik, wykazują rozbieżności w anatomicznej lokalizacji różnych narządów. Jest to szczególnie widoczne w takich obszarach anatomicznych jak kupała wątroby (Rysunek 4.6) i podstawy płuc. Niedopasowanie między obrazami PET i TK skutkuje więc błędami ilościowymi i jakościowymi. Standaryzowanie akwizycji TK do akwizycji na wydechu pozwala na najdokładniejsze dopasowanie obrazów PET i TK i redukcję wpływu ruchomości oddechowej [Mawlawi et al., 2004] [Goerres., 2003].



Rysunek 4.5. Obraz PET/TK pacjenta zarejestrowany podczas swobodnego oddychania. Nad wątrobą widoczne jest halo powstałe w wyniku ruchów oddechowych.



Rysunek 4.6. Obraz PET/TK: (A) brak bramkowania oddechowego – miejsce zwiększonego wychwytu powyżej wątroby mogłoby wskazywać na zmiany metaboliczne w obrębie płuca. (B) po bramkowaniu oddechowym – miejsce zwiększonego wychwytu wskazuje kopolę wątroby.

Na dedykowanych skanerach PET pacjenci są zazwyczaj skanowani z rękami ułożonymi wzdłuż ciała, ponieważ sesja skanowania jest długa, a takie ułożenie rąk jest dla pacjenta najbardziej komfortowe. W przypadku aparatów multimodalnych PET/TK pacjenci są zwykle skanowani z rękami nad głową, aby zapobiec występowaniu artefaktów obciążenia. Artefakty obciążenia występują z powodu różnicy wielkości pól widzenia w technikach TK (50 cm) i PET (70 cm). Artefakty te są najczęściej spotykane w przypadku pacjentów o dużej posturze lub u pacjentów skanowanych z ramionami wzdłuż ciała, tak jak w przypadku diagnostyki czerniaka oraz w badaniach głowy i szyi. Gdy pacjent nie mieści się w polu widzenia tomografu TK, obraz nie uwzględnia części ciała wystających poza FOV. To z kolei powoduje brak wartości korekcji tłumienia dla danych emisji w tym regionie PET, zaniżając tym samym wartość SUV dla tych regionów. Obciążenie wywołuje artefakty w postaci smug na granicy obrazu TK spowodowanych przeszacowaniem współczynnika korekcji osłabienia obrazu PET. Ten wzrost współczynnika tłumienia tworzy na obciążonych krawędziach obrazu linie wysokiej radioaktywności, co może skutkować błędną (pod względem jakościowym, jak i ilościowym) interpretacją obrazu PET. To właśnie dlatego jest istotne, aby technicy przygotowujący pacjenta do badania PET/TK dokładnie pozycjonowali go w centrum pola widzenia aparatu oraz z rękami nad głową [Sureshababu et al., 2005].

Nieprawidłowe ułożenie pacjenta w trakcie badania może również skutkować, jak np. przedstawiono na Rysunku 4.7, rozmyciem obrazu. W tym przypadku jest ono wywołane ułożeniem rąk pacjenta skrzyżowanych nad brzuchem.



Rysunek 4.7. (A) Obraz PET/TK pacjenta z rękami skrzyżowanymi nad brzuchem. Widoczne rozmycie obrazu na wysokości łokci. (B) Dla porównania obraz PET/TK pacjenta z rękami ułożonymi wzdłuż ciała.

5. Znaczniki stosowane w diagnostyce PET

Nadzór nad wytwarzaniem radioznaczników PET

Wciąż rozszerzająca się gama radioznaczników sprawia, że opisanie chemizmu ich powstawania jest zadaniem niezwykle złożonym. Różne znaczniki otrzymuje się wychodząc z różnych prekursorów i wykorzystując różne mechanizmy reakcji chemicznych, ale zawsze elementem wspólnym jest praktyka wytwarzania, która musi spełniać surowe normy prawne dotyczące ścieżki powstawania radioznacznika, będącego w świetle prawa lekiem. Normy te

narzucają wymogi już od momentu wyboru dostawcy reagentów, materiałów pomocniczych i opakowaniowych poprzez chemizm, procedury kontroli jakości po transport i monitorowanie cyklu życia leku (monitorowanie działań niepożądanych) [Źródło 5].

Krótkie okresy półtrwania radiofarmaceutyków (78 s ~ 110 min) generują nieuniknione ograniczenia w wytwarzaniu radiomarkerów stosowanych w diagnostyce PET. Z racji tych ograniczeń w większości krajów na świecie komercyjne wytwarzanie radiofarmaceutyków PET jest dozwolone bezpośrednio w miejscu ich stosowania, a więc w szpitalach, o ile posiadają one odpowiednią infrastrukturę. Taka radiofarmaceutyczna produkcja jest jednak regulowana, tak samo jak produkcja pozostałych produktów leczniczych, przez krajowe organy ds. Kompetencji, takie jak FDA w USA czy Europejska Agencja Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) w Unii Europejskiej. Wymagania jakościowe oraz metody badania produktów leczniczych i ich opakowań oraz surowców farmaceutycznych narzuca farmakopea – na przykład US Pharmacopeia (USP) w Stanach Zjednoczonych, wydawana przez Europejską Dyрекcję Jakości Leków (ang. *European Directorate for the Quality of Medicines – EDQM*) European Pharmacopeia (EP) w Unii Europejskiej, czy zgodna z unijną Farmakopea Polska. Farmakopea zawiera szczegółowy opis substancji chemicznych wykorzystywanych w farmacji jako substancje czynne oraz pomocnicze, szczepionki czy preparaty ziołowe w zakresie ich przygotowania, sporządzenia, dawkowania oraz sposobu prowadzenia ich badań jakościowych i ilościowych. Brak radiofarmaceutyku PET w monografiach farmakopei nie oznacza braku pozwolenia na dopuszczenie do zastosowania medycznego, zdecydowanie jednak utrudnia proces produkcji i kontroli jakości poprzez konieczność wypracowania standardów naukowych niezbędnych do usystematyzowania w celu rejestracji leku. W Polsce organem kompetentnym w zakresie wydawania zezwoleń na wytwarzanie i pozwoleń na wprowadzenie do obrotu produktów leczniczych jest Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, a proces produkcji pozostaje w każdym przypadku pod nadzorem Głównego Inspektoratu Farmaceutycznego.

Zastosowania radioznaczników PET w diagnostyce medycznej

Techniki diagnostyki obrazowej wykorzystujące radionuklidy są technikami mającymi za zadanie mapowanie położenia i koncentracji radioznaczników typowych dla ścieżek metabolicznych komórek tworzących poszczególne tkanki. Poza dokładnym wskazaniem miejsca wystąpienia guza, określeniem jego rozmiaru i kształtu, PET daje możliwość „oglądania” nowotworu na poziomie molekularnym i obserwowania jego aktywności

metabolicznej. Mimo, iż technika PET zapewnia bardzo dokładny obraz obszarów metabolicznie aktywnych, jej zdolność do wskazywania cech anatomicznych jest ograniczona. Stąd pojawienie się hybrydowych urządzeń PET/TK, które nie mają już tej wady. Tak więc, poprawa diagnostyki, prognozowania, planowania i monitorowania leczenia nowotworu czy określenia charakteru tkanki nowotworowej są obecnie uzależnione przede wszystkim od nowych radiofarmaceutyków, które będą specyficzne dla określonych typów nowotworów. Znakowane izotopami promieniotwórczymi ligandy i przeciwciała otworzyły drogę rozwoju nowej gałęzi farmacji.

Technika PET jest stosowana obecnie nie tylko w onkologii, lecz także coraz szerzej w kardiologii i neurologii. W onkologii jako transportery promieniotwórczych izotopów stosowane są m.in. FDG, cholina, metionina, tymidyna, octany czy analogi somatostatyny. W badaniach neurologicznych wykorzystywana jest m.in. [^{18}F]-DOPA i [^{15}O]-woda [Otsuka et al., 1991], [Viñas et al., 1997], a w kardiologii [^{18}F]-FDG i [^{13}N]-amoniak [Burt et al., 1995], [Fiechter et al., 2012]. Jako znaczniki stosowane są też izotopy galu-68 z czasem półtrwania wynoszącym 67.6 min., węgla-11 (20.4 min.), azotu-13 (9.97 min.), tlenu-15 (2.0 min.), czy rubidu-82 (1.27 min.) [Lautamäki et al., 2009].

Poniżej scharakteryzowane zostały krótko podstawowe radioznaczniki, już stosowane od dawna i dobrze opisane w farmakopeach, takie jak [^{18}F]-fluorodeoksyglukoza (monografia EP 01/2014:1325), [^{11}C]-metionina (monografia EP 01/2008:1617), [^{18}F]-DOPA (monografia EP 01/2008:1918), [^{68}Ga]-DOTA-somatostatyny (opisane w EP na przykładzie DOTA edotreotydu *DOTATOC* w monografii 01/2013:2482), [^{18}F]-fluorku sodu (01/2008:2100) oraz [^{11}C]-octanu (01/2008:1920), jak również takie, jak [^{11}C]-cholina i [^{18}F]-fluorometylocholina, których produkcja i kontrola jakości wymagają indywidualnego potraktowania ze względu na brak standardów odniesienia.

[^{18}F]-fluorodeoksyglukoza

[^{18}F]-fluorodeoksyglukoza (FDG-PET) – najpopularniejszy z radiofarmaceutyków – znajduje zastosowanie w diagnozowaniu i określaniu stadiów guzów, ocenie uszkodzeń związanych z zawałem mięśnia sercowego oraz w diagnostyce chorób neurologicznych. 2-deoksy-2-[^{18}F]-fluoro-D-glukoza została opracowana w 1979 [Wagner, 1998]. Jej podstawowym zadaniem miało być mapowanie metabolizmu glukozy w mózgu. Pierwsze syntezy prowadzone były na drodze mechanizmu elektrofilowego fluorowania gazowym $^{18}\text{F}_2$. Bardzo szybko jednak zostały opracowane tarcze o małej objętości napełniane wodą wzbogaconą w tlen ^{18}O , które pozwalają

na wytwarzanie dużych ilości izotopu ^{18}F w postaci jonów fluorkowych dzięki wysokiej wydajności reakcji jądrowej zachodzącej zgodnie z mechanizmem $^{18}\text{O} (p, n) ^{18}\text{F}$.

Kolejnym kamieniem milowym był rozwój metody nukleofilowego fluorowania pozwalającej na uzyskiwanie wysokich wydajności syntezy [^{18}F]-FDG. Te postępy i szerokie zastosowanie [^{18}F]-FDG w znacznym stopniu rekompensują niedogodność, jaką jest czas półtrwania izotopu ^{18}F wynoszący 110 minut [Yang et al., 2004].

Kwestią kluczową w obrazowaniu mięśnia sercowego jest określenie, czy dana część mięśnia sercowego jest żywa. FDG PET pozwala określić żywotność mięśnia na podstawie oceny metabolizmu glukozy [Franek et al., 2008]. Pacjent, u którego fragment mięśnia sercowego nie wykazuje metabolizmu glukozy (na przykład z powodu zawału i następczej martwicy), nie skorzysta na przywróceniu perfuzji i będzie wymagał leczenia lub przeszczepu. Dzięki zastosowaniu badania FDG-PET możliwe jest więc wyselekcjonowanie rokującej grupy pacjentów. Około 35% pacjentów z chorobą wieńcową po zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego czy angioplastyki celem rewaskularyzacji serca nie wykazuje poprawy funkcjonowania pracy serca, ponieważ uszkodzenie tkanki jest nieodwracalne [Gambhir et al., 2001].

Zastosowania [^{18}F]-fluorodeoksyglukozy w neurodiagnostyce, w tym przede wszystkim w diagnostyce guzów mózgu oraz chorób neurologicznych, jak demencja i epilepsja, wynikają z faktu, że glukoza jest podstawowym paliwem energetycznym mózgu. Demencja jest definiowana jako utrata pamięci i co najmniej jednego innego złożonego zachowania wpływającego na zaburzenie codziennego funkcjonowania. Skala problemu wzrasta i szacuje się, że 5% populacji w wieku powyżej 65 lat, a nawet do 25% populacji w wieku powyżej 80 lat cierpi z powodu jakiejś odmiany demencji. Wśród przyczyn występowania demencji wymienia się zmiany neurodegeneracyjne (np. w efekcie chorób Alzheimer, Picka, Parkinsona, czy Huntingtona), niewydolność naczyniową, urazy, zmiany endokrynologiczne i inne przyczyny. Zostało wykazane, że zmiany metaboliczne w mózgu poprzedzają zmiany strukturalne nawet o pięć lat. FDG-PET jest skutecznym narzędziem diagnostyki różnicującej chorobę Alzheimer od innych form demencji [Herholz et al., 2002] i pozwala monitorować postęp demencji. Może także służyć jako narzędzie prognostyczne w celu określenia prawdopodobieństwa pogorszenia stanu psychicznego w późniejszych latach. Choć wyniki są zróżnicowane, prawie wszystkie badania ukierunkowane na diagnostykę choroby Alzheimer, wskazują czułość diagnostyczną techniki FDG-PET na poziomie 90%, a jej specyficzność jako wynoszącą ok. 75% [Herholz et al., 2002], [Mosconi et al., 2008], [Foster et al., 2007].

Epilepsja jest schorzeniem stosunkowo częstym, występującym u około 1 na 200 osób. Obrazowanie FDG-PET wszystkich typów epilepsji pozwala zlokalizować nieprawidłowości w pracy mózgu, a w połączeniu z elektroencefalografią (EEG – monitorowanie sygnałów elektrycznych głowy) może pomóc w doborze leków przeciwpadaczkowych i kwalifikacji pacjentów lekoopornych do leczenia operacyjnego [Roberts et al., 2015], [Gambhir et al., 2001], [Peter et al., 2016].

Szczególną grupą chorób, w których techniki obrazowe mają ogromne znaczenie zarówno w fazie diagnostyki, jak i monitorowania skutków leczenia, są choroby nowotworowe. W przeciwieństwie do zaburzeń neurologicznych, komórki nowotworowe charakteryzują się zazwyczaj hipermetabolizmem. Z tego względu [¹⁸F]-FDG jest w diagnostyce nowotworów jednym z podstawowych radioznaczników. W Tabeli 4 zostały zebrane wskazania do stosowania go w diagnostyce onkologicznej [Fletcher et al., 2008].

Tabela 4. Wskazania do stosowania ¹⁸F-FDG w diagnostyce onkologicznej.

Schorzenie	Cel badania	Wskazanie
Rak piersi Diagnostyka Ocena Nawroty	Lokalne (pachowych węzłów chłonnych) Wykrywanie przerzutów	Nie Nie Tak, dla pacjentów z klinicznymi podejrzeniami przerzutu / nawrotu
Rak jelita grubego Diagnostyka Ocena Nawroty	Ocena przerzutów z wątroby	Nie Tak Tak
Rak przelyku Diagnostyka Ocena Nawroty	Ocena przed rozpoczęciem leczenia	Nie Tak, zwłaszcza w celu wykrycia odległych przerzutów Nie
Nowotwory głowy i szyi Diagnostyka Ocena Nawroty	Diagnostyka nowotworów nieznanego pochodzenia Diagnostyka nowotworów głowy i szyi	Tak Nie Tak Tak
Chłoniak Diagnostyka Ocena Nawroty	Ocena ogólna Ocena szpiku kostnego	Nie Sugerowane Tak Tak, w przypadku zakończenia leczenia wstępnego ziarnicy złośliwej i chłoniaka niezarniczego Nie, w obserwacji bezobjawowej ziarnicy złośliwej i chłoniaka niezarniczego
Rak płuc Diagnostyka Ocena Nawroty		SNP*: tak NCLC**: tak SCLC: ***brak podstaw Nie
Czerniak Diagnostyka Ocena Nawroty		Nie Tak, dla odległych przerzutów Nie
Rak trzustki Diagnostyka Ocena Nawroty		Tak, w przypadkach, gdy badanie TK jest niejednoznaczne Nie Nie
Mięsak Diagnostyka Ocena Nawroty		Brak podstaw Brak podstaw Nie
Rak tarczycy Diagnostyka Ocena Nawroty		Nie Nie Tak, gdy scyntygrafia jodem-131 jest ujemna, a poziom tyreoglobuliny podwyższony Nie, gdy scyntygrafia jodem-131 jest ujemna a poziom tyreoglobuliny w normie
Guzy nieznanego pochodzenia Diagnostyka Ocena Nawroty		Tak Nie Nie

* SNP (*solitary pulmonary nodule*) – pojedynczy guzek płuc.

** NCLC (*non-small cell lung cancer*) – niedrobokomórkowy rak płuc.

*** SCLC (*small cell lung cancer*) – drobnokomórkowy rak płuc.

Znacznik [¹⁸F]-FDG jest jednak nieprzydatny w obrazowaniu nowotworów hipometabolicznych, czyli takich, które ze względu na obniżony metabolizm nie wychwytyją glukozy (do tej grupy należą na przykład rak prostaty, rak wątrobowokomórkowy czy nowotwory neuroendokryne) [Talbot et al., 2010]. Tak więc, choć [¹⁸F]-FDG jest radiofarmaceutykiem najczęściej stosowanym w badaniach klinicznych PET, to nie jest znacznikiem uniwersalnym, co pokazuje Tabela 5.

Tabela 5. Status metaboliczny procesu nowotworowego przekładający się na możliwość stosowania ¹⁸F-FDG w diagnostyce onkologicznej.

Rodzaj nowotworu	Status metaboliczny	Możliwość stosowania FDG	Piśmiennictwo
Chłoniak	Gorący**	+	[Farwell][Elstrom]
Raki regionu głowy i szyi	Gorący	+	[Halfpenny]
Rak płuc	Gorący	+	[Nestle][Inoue]
Rak jelita grubego	Zróżnicowany***	+	[Marcus][Miles]
Rak piersi	Zróżnicowany	+	[Pinker][Baba]
Rak przełyku	Gorący	+	[Farwell][Kelloff]
Rak szyjki macicy	Zróżnicowany	+	[Kelloff][Chen]
Rak tarczycy	Zróżnicowany	+	[Wong][Khan]
Rak trzustki	Zróżnicowany	+	[Kalra][Castaldi]
Rak płaskonabłonkowy	Gorący	+	[Schuurbiers][Huang]
Rak prostaty	Zimny****	-	[Farwell][Hara]
Rak neuroendokryny	Zimny	-	[Kayani][Adams]
Wysokozróżnicowany rak wątrobowokomórkowy	Zimny	-	[Farwell][Ho]
Czerniak	Gorący	+	[Farwell][Delbeke]
Stan zapalny spowodowany obecnością nowotworu*	Gorący	+	[Delbeke][Hicks]

* Pozanowotworowe przyczyny zwiększonego wychwytu FDG to infekcje, stany zapalne różnego pochodzenia, aktywność mięśniowa czy procesy metaboliczne w brunatnej tkance tłuszczowej odpowiadającej za termoregulację organizmu. Powyższe przyczyny można jednak łatwo odróżnić od efektów wywołanych przez obecność procesu nowotworowego stosując techniki łączone, jak PET/TK [Wójcik] [Kelloff].

** Gorący – charakteryzuje się wzmożoną aktywnością metaboliczną (większe zużycie glukozy).

*** Zróżnicowany – wykazuje zróżnicowany charakter zmian metabolicznych w różnych typach nowotworów.

**** Zimny – nie wykazuje aktywności metabolicznej (mniejsze zużycie glukozy).

Pozytonowa tomografia emisyjna z użyciem radiofarmaceutyków alternatywnych do ^{18}F -fluorodeoksyglukozy

Nie tylko hipometabolizm patologicznych tkanek uniemożliwia stosowanie FDG w wielu przypadkach onkologicznych, kardiologicznych czy neurologicznych, lecz także zbyt wysoki wychwyty znacznika przez tkanki otaczające podejrzany obszar. W związku z tym powstały i zostały wprowadzone do praktyki klinicznej alternatywne znaczniki PET [Lopci et al., 2010], [Heuveling et al., 2011], [Nanni et al., 2010].

^{11}C -metionina

Metionina jest istotnym aminokwasem biorącym udział w metabolizmie białek i transporcie aminokwasów. Procesy te zachodzą znacznie intensywniej w komórkach nowotworowych w wyniku przyspieszonej proliferacji komórek.

Znakowana ^{11}C metionina jest szczególnie przydatna w śledzeniu metabolizmu mózgowia. Główną zaletą ^{11}C -metioniny w porównaniu do ^{18}F -FDG jest prawie zerowy wychwyty znacznika w zdrowej tkance mózgowej i słabe gromadzenie się w zmianach łagodnych. ^{11}C -metionina jest użytecznym narzędziem do monitorowania pacjenta po zakończonym leczeniu. Obrazowanie PET z zastosowaniem ^{11}C -metioniny pozwala różnicować między zmianami złośliwymi a innymi, na przykład wywołanymi przez wcześniejsze zabiegi chirurgiczne, radioterapię czy zmianami patologicznymi takimi jak stan zapalny, zator bądź krwotok. Te zalety sprawiły, że radioznacznik jest wykorzystywany w planowaniu radioterapii i jest też pomocny przy stereotaktycznej biopsji mózgu [Lopci et al., 2010].

^{18}F -DOPA

^{18}F -dihydroksyfenyloalanina (^{18}F -DOPA) jest znakowanym radioaktywnie aminokwasem. Została zsyntetyzowana w celu badania *in vivo* aktywności prążkowania u pacjentów z podejrzeniem choroby Parkinsona [Brooks et al., 1990]. W późniejszym czasie znalazła zastosowanie w onkologii jako narzędzie służące do wykrywania guzów złośliwych, pochodzących od komórek grzebienia nerwowego. Nowotwory tego pochodzenia (rakowiak, guz chromochłonny, nerwiak niedojrzały, rak rdzeniasty tarczycy, microcytoma, guz kłębkowy szyjnego oraz czerniak) są zwykle mocno zróżnicowane, a technika ^{18}F -FDG-PET jest nieefektywna w ich diagnostyce [Heiss et al., 1996]. Kiedy wynik konwencjonalnego

obrazowania u pacjentów z charakterystycznymi objawami związanymi z tego rodzaju nowotworami jest negatywny, wykonuje się badanie [^{111}In]-octreoscan SPECT lub [^{123}I]-MIBG SPECT (Metajodobenzyloguanidyna- ^{123}I (MIBG- ^{123}I)) w celu wykrycia zarówno zmian pierwotnych, wtórnych, jak i oceny nawrotu choroby [Hoefnagel, 1994]. Badania te cechują się dobrą czułością i swoistością, ale rozdzielczość przestrzenna jest słaba w porównaniu z obrazami uzyskanymi techniką PET. Oznacza to, że małe zmiany mogą zostać pominięte. Ponieważ nowotwory pochodzące od grzebienia nerwowego mają zdolność koncentracji aminokwasów wewnątrz przestrzeni cytoplazmatycznej, [^{18}F]-DOPA to znacznik specyficzny o bardzo dobrej czułości i swoistości obrazowania [Nanni et al., 2010]. Radioznacznik ten jest przydatny również w neurologii. L-DOPA (L-dihydroksyfenyloalanina) jest bezpośrednim prekursorem dopaminy, neuroprzekaźnika obwodowego układu nerwowego (OUN), głównie funkcjonującego w obszarze nigrostriatalnym, a dysfunkcje tego regionu są silnie związane z chorobami neurodegeneracyjnymi i zaburzeniami ruchu [Ruottinen et al., 2000]. Choć dopamina nie przechodzi przez barierę krew-mózg, L-DOPA transportowana jest do mózgu transporterami aminokwasów, a tam przekształcana do dopaminy poprzez działanie

L-dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych. Następnie dopamina przechowywana jest w pęcherzykach wewnątrzneuronowych, z których jest uwalniana po aktywacji komórek nerwowych. [^{18}F]-DOPA jest analogiem L-DOPA, dlatego jest stosowana klinicznie w śledzeniu szlaku dopaminergicznego oraz w celu oceny dopaminergicznych funkcji presynaptycznych w prążkowie [Nanni et al., 2010].

[^{68}Ga]-DOTA-somatostatyny

Wdrożenie do użycia analogów somatostatyny znakowanych izotopem galu-68 w badaniach PET guzów neuroendokrynych przyczyniło się do ograniczenia użycia [^{18}F]-DOPA w onkologii. Ze względu na zróżnicowaną ekspresję receptorów somatostatyny oraz dużo łatwiejsze otrzymywanie radioznaczników opartych o jej analogi, [^{68}Ga]-DOTA-peptydy znalazły zastosowanie jako narzędzia obrazujące raka rdzeniastego tarczycy oraz guzy chromochłonne [Nanni et al., 2010]. [^{111}In]-DTPA-oktreotydy (OctreoScan), stosowany w obrazowaniu SPECT, wykazuje wysoką czułość w wykrywaniu nowotworów neuroendokrynych (ang. *neuroendocrine tumors*, NET) i jest powszechnie stosowany we wstępnej fazie oceny biodystrybucji związku terapeutycznego na podstawie powinowactwa z

receptorami somatostatynowymi typu sst2 [Hoefnagel, 1994]. Radioterapia tego typu nowotworów, wśród pacjentów nieoperacyjnych, polega na użyciu radioznakowanych analogów somatostatyny, jak np. DOTA-TOC (znakowany izotopem itru-90 czy lutetu -177) [Caroli et al., 2010]. [⁶⁸Ga]-DOTA-peptydy dają znakomite wyniki obrazowania i określenia stadium guzów neuroendokrynych, w tym lokalizacji guzów pierwotnych u pacjentów z rozpoznanymi przerzutami guzów neuroendokrynych (raka pierwotnego nieznanego pochodzenia). Ponadto badanie PET z użyciem [⁶⁸Ga]-DOTA-peptydów dostarcza informacji na temat postępów zastosowanej terapii poprzez porównanie wychwytu znacznika i ekspresji receptora przed i po zastosowanym leczeniu. Wartość wychwytu (SUV_{max}) [⁶⁸Ga]-DOTA-peptydów koreluje z klinicznymi i patologicznymi cechami guzów neuroendokrynych, będąc jednocześnie precyzyjnym czynnikiem w rokowaniu stanu pacjenta. Oszacowanie ekspresji receptora umożliwia zakwalifikowanie pacjenta do terapii radionuklidowej receptorów peptydowych (ang. *Peptide Receptor Radionuclide Therapy*, PRRT) i selekcji środka leczniczego, który zostanie podany pacjentowi (np. [⁹⁰Y]-DOTATOC lub [¹⁷⁷Lu]-DOTATATE) [Lopci et al., 2010].

[¹⁸F]-NaF

Radioznacznik [¹⁸F]-NaF ([¹⁸F]-fluorek sodu) był wykorzystywany w standardowej metodzie scyntygrafii kości w latach 60. ubiegłego wieku. W kolejnej dekadzie został w dużym stopniu zastąpiony przez ⁹⁹Tc w postaci difosfonianu, ze względu na większą funkcjonalność tego jądra w obrazowaniu SPECT [Woldring, 1981]. Powrót do obrazowania kości z wykorzystaniem [¹⁸F]-NaF miał miejsce wraz z wprowadzeniem technik PET i PET/TK, które umożliwiają dokładniejszą diagnostykę chorób kości niż tomografia planarna czy obrazowanie SPECT [Schirrmester et al., 1999]. Zainteresowanie badaniami [¹⁸F]-NaF-PET rośnie tym bardziej, że dostępność generatorów ⁹⁹Mo/⁹⁹Tc gwałtownie spada od czasu zamknięcia dwóch największych reaktorów, w których otrzymywany był molibden-99 (są to reaktory National Research Universal Reactor w Kanadzie [Źródło 3] oraz Petten Nuclear Reactor w Holandii [Źródło 4]). Ilościowe obrazowanie PET [¹⁸F]-fluorkiem sodu jest również użyteczne w ocenie chorób kości pochodzenia metabolicznego, między innymi osteodystrofii nerkowej, osteoporozy czy też choroby Pageta, a nawet zmian pourazowych. W wielu wskazaniach klinicznych obraz PET z użyciem ¹⁸F-fluorku sodu można uzyskać bez korekcji osłabienia. Technika [¹⁸F]-NaF-PET oferuje dodatkowe korzyści, takie jak krótszy czas badania,

usprawnienie płynności pracy w klinice medycyny nuklearnej, większą wygodę pacjenta i szybkie przekazanie lekarzowi kierującemu wyników badania [Czernin et al., 2010]. Powszechny powrót [¹⁸F]-NaF jako radioznacznika stosowanego w obrazowaniu kości został jednak zahamowany przez wieloletnie wdrażanie scyntygrafii [^{99m}Tc]-difosfonianami i niższe koszty badania SPECT [Grant et al., 2008].

[¹¹C]-octan

Ten znakowany węglem ¹¹C znacznik znalazł zastosowanie w diagnostyce PET jako prekursor kwasów tłuszczowych będących budulcem błon biologicznych. Równolegle może zostać przekształcony w acylokoenzym A (acetylo-CoA), wchodząc tym samym w cykl kwasów trójkarboksylowych. [¹¹C]-octan można uznać zarówno za cząsteczkę pośrednią szlaku katabolizmu glukozy oraz szlaku metabolizmu membran komórkowych. Pierwotnie [¹¹C]-CH₃COO⁻ znajdował zastosowanie w kardiologii, ponieważ akumulowany jest w mięśniu sercowym proporcjonalnie do nasilenia procesów utleniania kwasów tłuszczowych – dlatego służy do oceny metabolizmu energetycznego serca. W onkologii [¹¹C]-octan okazał się użyteczny początkowo jako analog choliny w diagnostyce raka prostaty, wykazując zbliżoną do niej czułość i specyficzność [Caroli et al., 2010], a później w ocenie takich nowotworów jak rak nerki czy rak wątrobowokomórkowy, czyli tam, gdzie FDG-PET ma ograniczone zastosowanie. Nowotwory te charakteryzują się zwiększonym wychwytem [¹¹C]-octanu, co jest związane ze wzmożoną ekspresją syntazy kwasów tłuszczowych, głównego enzymu odpowiedzialnego za wychwyt [¹¹C]-acetylo-CoA w różnych strukturach komórkowych i cyklach metabolicznych [Lopci et al., 2010].

[¹¹C]-cholina / [¹⁸F]-fluorometylocholina

W ludzkim ciele cholina bierze udział w syntezie fosfolipidów w błonach komórkowych, metabolizmie grup metylowych, w procesach sygnalizacji transbłonowej oraz transportu i metabolizmu lipidów i cholesterolu [Ackerstaff et al., 2003]. Wewnątrz komórki cholina jest szybko metabolizowana do fosforylochliny, a fosforylacja jest katalizowana przez kinazę cholinową. Po kolejnych przemianach, fosforylocholina jest włączana do fosfatydylochliny (lecytyny) – związku fosfolipidowego, który wchodzi w skład błony komórkowej,

a jednocześnie jest zaangażowany w sygnalizację transbłonową – i staje się budulcem błon komórkowych [Glunde et al., 2011], [Schoeder et al., 2004].

Ścieżka metaboliczna choliny jest więc związana z aktywnością błony komórkowej. Biologiczną podstawą wychwytu znakowanej radioaktywnie choliny w tkance nowotworowej jest indukowana przez proces nowotworowy wzmożona aktywność kinazy cholinowej, co prowadzi do wychwytywania choliny (w postaci fosfatydylocholiny) w błonie komórkowej guza, przy czym nasilenie tych procesów jest związane z szybkością proliferacji komórek nowotworowych [Jadvar, 2013], [Bouchelouche et al., 2011].

Skoro zwiększona synteza fosfolipidów i zwiększony wychwyt choliny odzwierciedlają nasilenie procesów proliferacji komórek i transformacji komórek nowotworowych, zależności te można wykorzystać w diagnostyce raka prostaty. Z tego względu [¹¹C]-cholina okazała się być szczególnie przydatna w diagnostyce wczesnego stadium raka prostaty. **Jest preferowana do obrazowania PET/TK prostaty ze względu na lepszą dystrybucję, większą przyswajalność tego znacznika w ciele pacjenta w porównaniu z [¹⁸F]-fluorometylocholiną [Umbehre et al., 2013], [Picchio et al., 2014] oraz krótszy zasięg pozytonów skutkujący wyższą rozdzielczością obrazu diagnostycznego [DeGrado et al., 2001].**

Badania naukowe prowadzone z użyciem [¹¹C]-choliny pozwoliły zauważyć aktywność metaboliczną choliny również w przypadku innych schorzeń onkologicznych, zarówno złośliwych, jak i niezłośliwych [Welle et al., 2016]. Inwazyjny grasiczak, rak nerkowokomórkowy, brodawkowy rak tarczycy czy gruczolak przytarczyc to tylko niektóre ze schorzeń diagnozowanych z użyciem [¹¹C]-choliny [Takesh et al., 2013], [Schöder et al., 2004], [Wu et al., 2011], [Quak et al., 2013]. Podobnie jak w przypadku pewnych procesów patologicznych obserwowanych w sercu z wykorzystaniem [¹⁸F]-FDG, gdy hipometabolizm lub brak wychwytu glukozy wskazują na procesy patologiczne, tak i zmniejszenie lub całkowity brak wychwytu choliny w niektórych narządach to cechy charakterystyczne ich zmian chorobowych, bowiem narządy te wykazują wysoki metabolizm choliny jako zdrowe. Przykładem takich procesów są zmiany nowotworowe wątroby, które na tle wysoce aktywnej tkanki są obrazowane jako strefy „zimne” [Talbot et al. 2010].

Rak prostaty zajmuje jedno z czołowych miejsc na liście najczęściej występujących nowotworów niedrobnokomórkowych. Prawdopodobieństwo jego wystąpienia jest podobne u mężczyzn na całym świecie, bez względu na dietę, zawód, styl życia i inne czynniki. Wysoki poziom krążącego testosteronu i niski poziom SHBG (ang. *sex hormone-binding globulin*) – białka wiążącego, a następnie transportującego hormony płciowe, m.in. estrogeny (estradiol)

i androgeny (testosteron); jego synteza zachodzi przede wszystkim w wątrobie, w mniejszych ilościach globulina ta wytwarzana jest w endometrium, jajowodach i gruczołach piersiowych (u kobiet) oraz w gruczole krokowym (u mężczyzn) wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka prostaty; ryzyko istnieje również wtedy, gdy poziom SHBG mieści się w akceptowalnych granicach endogennych. Zasadniczo mikroskopowy rak gruczołu krokowego rozwinię się u każdego mężczyzny, u którego występuje cyrkulacja androgenów, a ryzyko to wzrasta z wiekiem [Gann et al., 1996], [Bostwick et al., 2004].

[¹⁸F]-fluorometylocholina ma podobne jak [¹¹C]-cholina zastosowania, a proces jej wytwarzania został obszernie opisany przez [Shao et al., 2011] i in. Ze względu na znakowanie izotopem fluoru-18, okres półtrwania [¹⁸F]-fluorometylocholiny jest dłuższy (109 minut w porównaniu do 20 minut w przypadku węgla-11). Dłuższy okres półtrwania umożliwia dystrybucję poza wytwórnictwo farmaceutyczne.

6. Wytwarzanie radioznaczników

W procesie radiosyntezy znaczników przeznaczonych do obrazowania PET wykorzystuje się zautomatyzowane moduły syntezy, które, zainstalowane w specjalnie zaprojektowanych komorach osłonnych (Rysunek 6.1), mają za zadanie ochronę operatora przed działaniem promieniowania jonizującego. Moduły Bioscan MeI+ oraz ReFORM+ dostępne w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie (Oddział w Gliwicach) przedstawione zostały na Rysunku 6.2.



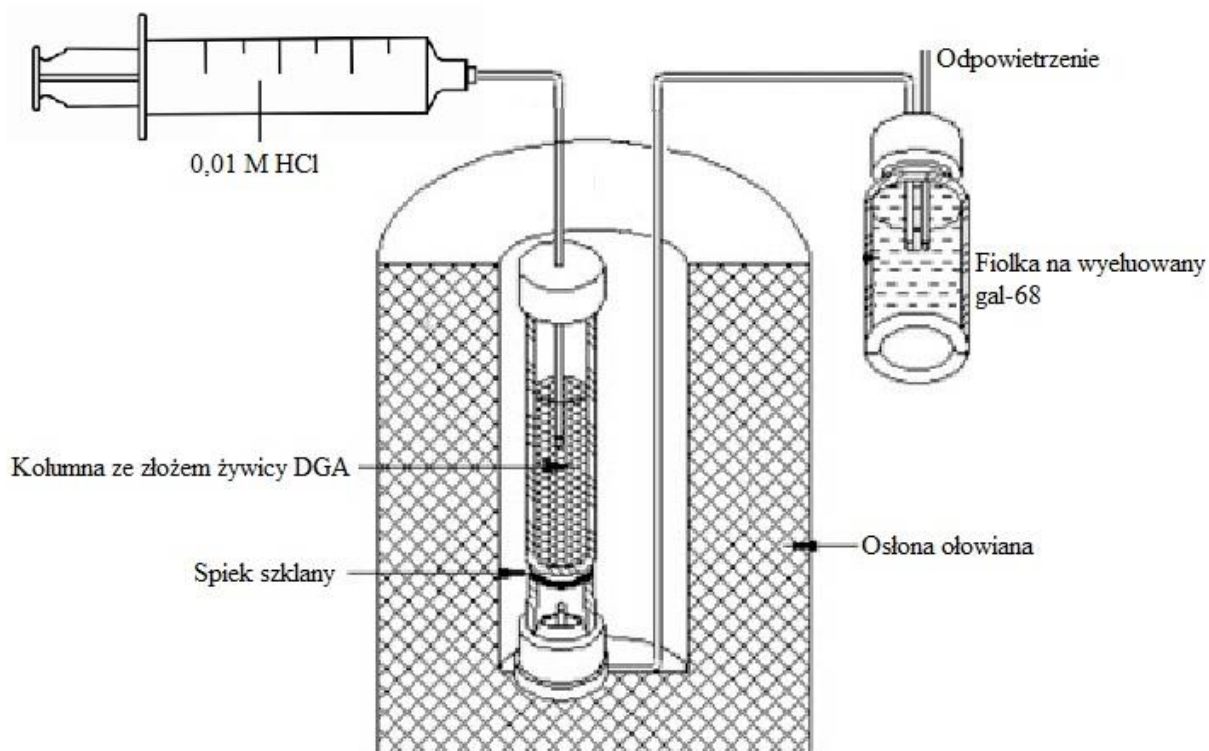
Rysunek 6.1. Komory osłonne marki Comecer zainstalowane w Centrum Onkologii-Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach.



Rysunek 6.2. Zestaw modułów firmy Bioscan składający się z modułu Mel+ (po lewej) służącego do syntezy $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$; oraz modułu ReFORM+ (po prawej), w którym następuje przyłączenie grupy metylowej znakowanej węglem-11 do cząsteczki prekursora.

Fizycznym celem procesu radiosyntezy jest otrzymanie jądra emitującego cząstki e^+ . Istnieją dwa źródła izotopów e^+ : są to generatory izotopów i cyklotrony.

Generatory izotopów działają w oparciu o rozpad izotopów osadzonych na złożach kolumn (Rysunek 6.3).



Rysunek 6.3. Schemat generatora $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.

Kryterium wyboru izotopu użytego do wytworzenia generatora jest produkt jego rozpadu. Produkt rozpadu izotopu upakowanego na złożu generatora jest eluowany, a następnie wykorzystywany do znakowania prekursora. Przykładem jest generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, w którym izotop germanu-68 osadzonego na żywicy kationowymiennej rozpada się do izotopu galu-68 [Arino et al., 1978], [Rösch et al., 2013], [Loktionova et al., 2011].

Cyklotron

Drugim źródłem izotopów e^+ są cyklotrony, których zasada działania jest niezmienna od blisko pięćdziesięciu lat, a kolejne modyfikacje ich budowy mają na celu zwiększenie wydajności pracy. Cyklotrony stosuje się zarówno do celów teleradioterapii, jak i w produkcji radioznaczników stosowanych w diagnostyce obrazowej [Friesel et al., 2009], [Nowak, 2016], [Ruth, 2009]. Urządzenia te można schematycznie sklasyfikować w pięciu kategoriach, na podstawie energii i natężenia wiązek protonów [Tabela 6] [Braccini, 2016]. Obecnie w Polsce funkcjonuje 9 cyklotronów kompaktowych wykorzystywanych do produkcji radiofarmaceutyków. W gliwickim oddziale Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie zainstalowany jest cyklotron firmy IBA, model Cyclone 18/9,

o maksymalnej energii wiązki protonów 18 MeV – jest on przedstawiony na Rysunku 6.4. Cyklotron ten służy do codziennej produkcji fluoru-18 używanego w syntezie znaczników PET zgodnie z normą DPW (*Dobra Praktyka Wytwarzania*; ang. *Good Manufacturing Practice, GMP*). Dzięki sieci połączeń transferowych służących do przesyłu wyprodukowanych izotopów prowadzone są również badania nad wytwarzaniem takich izotopów jak węgiel-11, jod-123, jod-124, a w najbliższych latach planowane są prace nad takimi izotopami jak metastabilny technet-99 czy miedź-64.



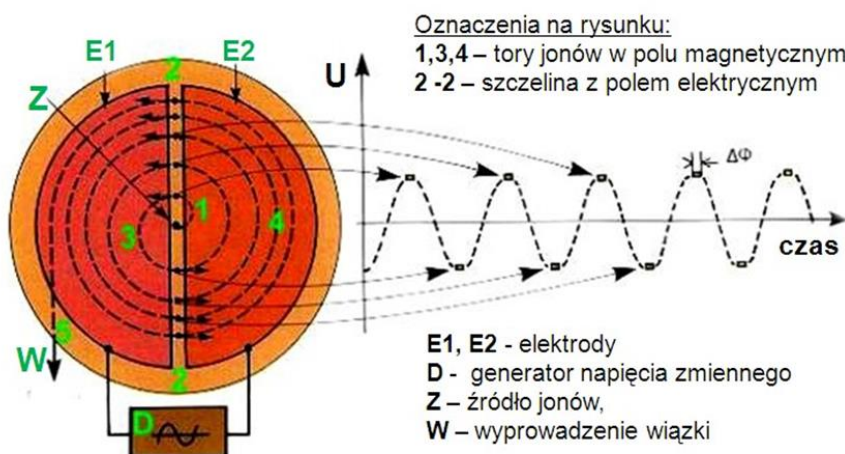
Rysunek 6.4. Cyklotron Cyclone 18/9 firmy IBA zainstalowany w Centrum Onkologii-Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach. (a) cyklotron gotowy do pracy, (b) otwarty cyklotron przygotowany do prac serwisowych.

Tabela 6. Klasyfikacja cyklotronów.

Zastosowanie	Sugerowany użytkownik	Maksymalna energia wiązki protonów [MeV]	Maksymalne natężenie wiązki protonów [μA]
Terapia protonowa	Szpital	200 – 250	10^{-3}
Produkcja radioizotopów/ badawcze	Laboratoria badawcze	70	500 – 700
Produkcja izotopów stosowanych w SPECT	Laboratoria badawcze/ przemysł radiofarmaceutyczny	30	500 – 1000
Produkcja izotopów stosowanych w PET	Szpital/ przemysł radiofarmaceutyczny	15 – 25	100 – 400
Produkcja izotopów stosowanych w PET	Szpital	10 - 12	50

Izotop e^+ powstaje na drodze reakcji jądrowej zachodzącej w tarczy cyklotronu na skutek napromieniania nieaktywnego promieniotwórczo izotopu wiązką cząstek elementarnych

(najczęściej protonów lub deuteronów) [Brownell et al., 1969]. Rysunek 6.5. przedstawia schemat ideowy działania cyklotronu. Konstrukcje tarcz cyklotronu pozwalają na napromienianie materiału tarczowego o ciekłym stanie skupienia (woda wzbogacona w tlen-18 do wytwarzania fluoru-18) [Lepera et al., 1997], gazowym (azot-14 jako materiał tarczowy do produkcji węgla-11) [Szydło et al., 2016] i stałym (dwutlenek telluru-124 do wytwarzania jodu-124) [Bzowski, 2015].



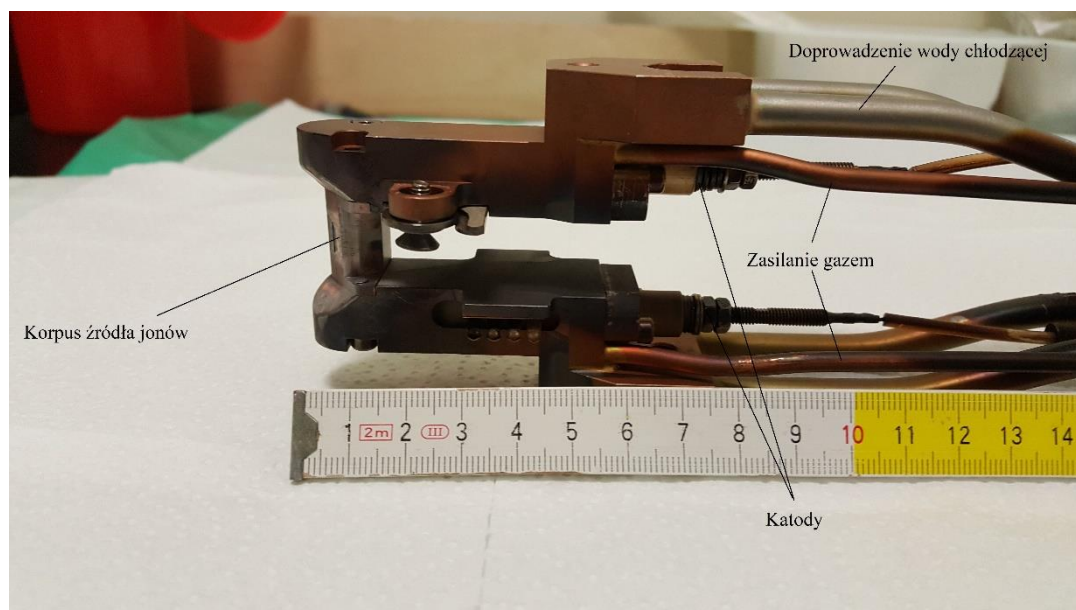
Rysunek 6.5. Schemat ideowy zasady działania cyklotronu (<http://ilf.fizyka.pw.edu.pl/podrecznik/1/3/9?type=accessible>)

Standardowe radionuklidy są wytwarzane głównie w tarczach gazowych lub ciekłych. Są one proste w użyciu i nie wymagają ręcznej obsługi podczas rutynowych czynności produkcyjnych. W przypadku nowych radionuklidów często stosuje się tarcze stałe – w porównaniu z tarczami gazowymi i ciekłymi stanowią one jednak większe wyzwanie [Synowiecki et al., 2018].

Reakcje jądrowe zachodzące w tarczy cyklotronu mają różny przebieg, jak na przykład ${}^A\text{X}(p,n) {}^A\text{Y}$; ${}^A\text{X}(p,2n) {}^{A-1}\text{Y}$ czy ${}^A\text{X}(p,\alpha) {}^{A-3}\text{Y}$ [Choppin et al., 2002]. Przykładem jest otrzymywanie fluoru-18 na drodze reakcji ${}^{18}\text{O}(p,n) {}^{18}\text{F}$. Jony H^- są wytwarzane poprzez jonizację w łuku plazmy z gazowego wodoru. Następnie pod wpływem działania zmiennego pola magnetycznego wiązka H^- rozpędzana jest do energii niezbędnej dla zajścia zmian w jądrach materiału tarczowego – w tym przypadku wody wzbogaconej o jądra tlenu-18. Przed wprowadzeniem wiązki do materiału tarczowego konieczne jest pozbycie się elektronów otaczających proton. Uzyskuje się to dzięki ekstrakcji na folii strippera, wykonanej na przykład z materiału Havar® [Deville et al., 2013], [Calabretta et al., 2000], [Lepera et al., 1997].

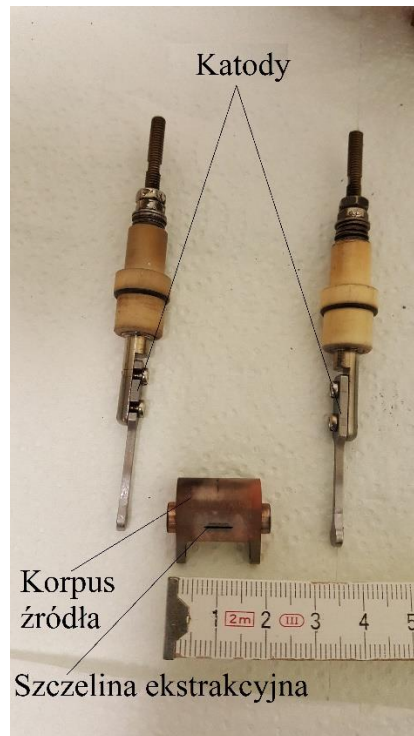
Źródło jonów (Rysunek 6.6) wytwarza ujemnie naładowane jony. Najczęściej instalowane w cyklotronach źródła wytwarzają jony H^- oraz D^- . Źródło jonów zasilane jest gazem, który następnie zostaje zjonizowany w łuku elektrycznym źródła [Bzowski, 2015]. Kwestią istotną

jest tu czystość gazu. Szczególnie niepożądanym zanieczyszczeniem gazowego wodoru czy też deuteru są cząsteczki tlenu. Znacząco zmniejszają one liczbę wytwarzanych jonów, a ponadto wpływają destrukcyjnie na elementy konstrukcyjne źródła [Braccini, 2016].



Rysunek 6.6. Źródło jonów cyklotronu IBA Cyclone 18/9.

Do zasilania źródła jonów gliwickiego cyklotronu używany jest wodór o czystości 99.9999% i zawartości tlenu poniżej 5 ppm. Gaz zasilający źródło dozowany jest między dwie katody, między którymi, dzięki różnicy potencjałów na poziomie kilkuset woltów, oscylują elektrony [Bzowski, 2015]. Wytworzone jony opuszczają obszar między katodami poprzez szczelinę ekstrakcyjną w korpusie źródła jonów (Rysunek 6.7) do regionu centralnego cyklotronu (Rysunek 6.8) przyciągane przez anodę oddaloną od źródła o około 2 mm. Po przejściu jonów przez szczelinę ekstrakcyjną dyfuzja jonów w kierunku anody jest ograniczana przez pole magnetyczne o natężeniu około 0.6 T utrzymywane przez główną cewkę (Rysunek 6.9). Siła Lorentza zakrzywia tor jonów w polu magnetycznym i zmusza je do ruchu po okręgu [Braccini, 2016] [Bzowski, 2015]. Gliwicki cyklotron jest cyklotronem izochronicznym, co oznacza, że czas, w jakim przyspieszane jony przebywają drogę równą 2π , jest stały. Innymi słowy, wszystkie przyspieszane cząstki mają tę samą częstotliwość obrotową, niezależnie od promienia toru.



Rysunek 6.7. Zdemontowane elementy źródła jonów cyklotronu IBA Cyclone 18/9.

Cząstki są przyspieszane przez zmienne pole elektryczne o częstotliwości 10-100 MHz, przykładane na dwie elektrody, tzw. duanty [Nuttens et al., 2010], [Zhang et al., 2011] [Kleeven et al., 2018] w momencie ich przejścia między duantami. Aby to mogło zajść, częstotliwość zmian pola elektrycznego musi odpowiadać częstotliwości cząstki w ruchu obrotowym w polu magnetycznym duantów [Kleeven et al., 2018] [Braccini, 2016]. Dlatego duanty połączone są z oscylatorem wytwarzającym prąd zmienny o częstotliwości radiowej (system RF – ang. *Radio Frequency*) i napięciu w zakresie 25-50 kV [Braccini, 2016] wytwarzającym pole magnetyczne powodujące zakrzywienie toru wiązki oraz jej przyspieszenie [Szepke, 1982], [Kleeven et al., 2018].

Przyspieszanie jest możliwe, gdy spełniony jest podstawowy warunek rezonansu między częstotliwością obrotową f a częstotliwością przyspieszającego pola RF, f_{RF} (5):

$$f_{RF} = h \cdot f \quad (5)$$

Naturalna liczba h nazywana jest numerem harmoniczej, na której pracuje cyklotron; dla gliwickiego cyklotronu wartość h wynosi 2 do 4. Dla H^- jest to druga harmoniczna, a dla D^- czwarta harmoniczna.

Częstotliwość obrotowa f określona jest jednoznacznie przez wartość indukcji B pola magnetycznego (0.6 T) oraz ładunek q i masę spoczynkową m_0 przyspieszanej cząstki (6):

$$f = \frac{1}{2\pi} \frac{qB}{m_0\gamma} \quad (6)$$

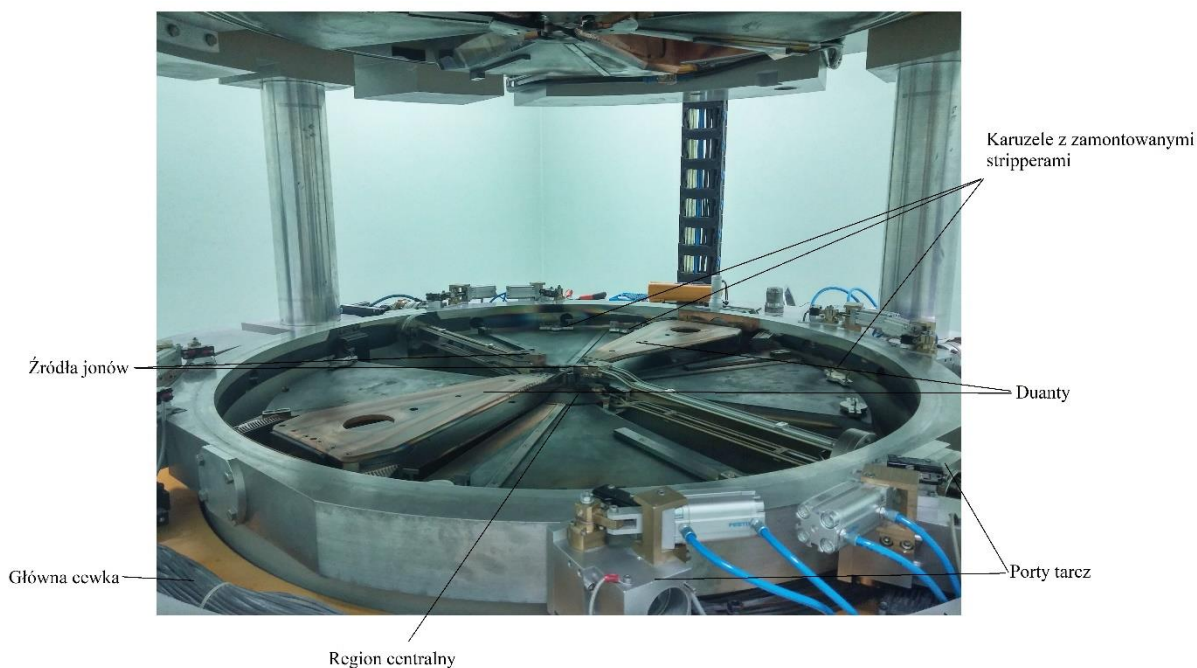
gdzie γ to czynnik relatywistyczny równy $\frac{1}{\sqrt{1-\beta^2}}$, a β to prędkość względna cząstki (w stosunku do prędkości światła w próżni).



Rysunek 6.8. Region centralny cyklotronu IBA Cyclone 18/9.

W cyklotronie izochronicznym pole magnetyczne zmienia się wraz z przyrostem prędkości cząstki proporcjonalnie do czynnika γ i rośnie wraz z promieniem ruchu cząstki.

Aby uniknąć strat w natężeniu przyspieszanej wiązki, konieczne jest zminimalizowanie ryzyka zderzeń przyspieszanych jonów z innymi cząstkami mogącymi znajdować się na drodze przelotu wiązki. Do tego celu wykorzystywane są olejowe pompy dyfuzyjne (ang. *Oil Diffusion Pump*, ODP) o dużej sprawności [Bzowski, 2015] [Braccini, 2016]. Gliwicki cyklotron wyposażony jest w cztery pompy ODP pracujące w trybie ciągłym, co pozwala na utrzymanie ciśnienia wewnątrz cyklotronu na poziomie 10^{-7} bar w spoczynku oraz od 9×10^{-6} do 1×10^{-5} bar w trakcie pracy.



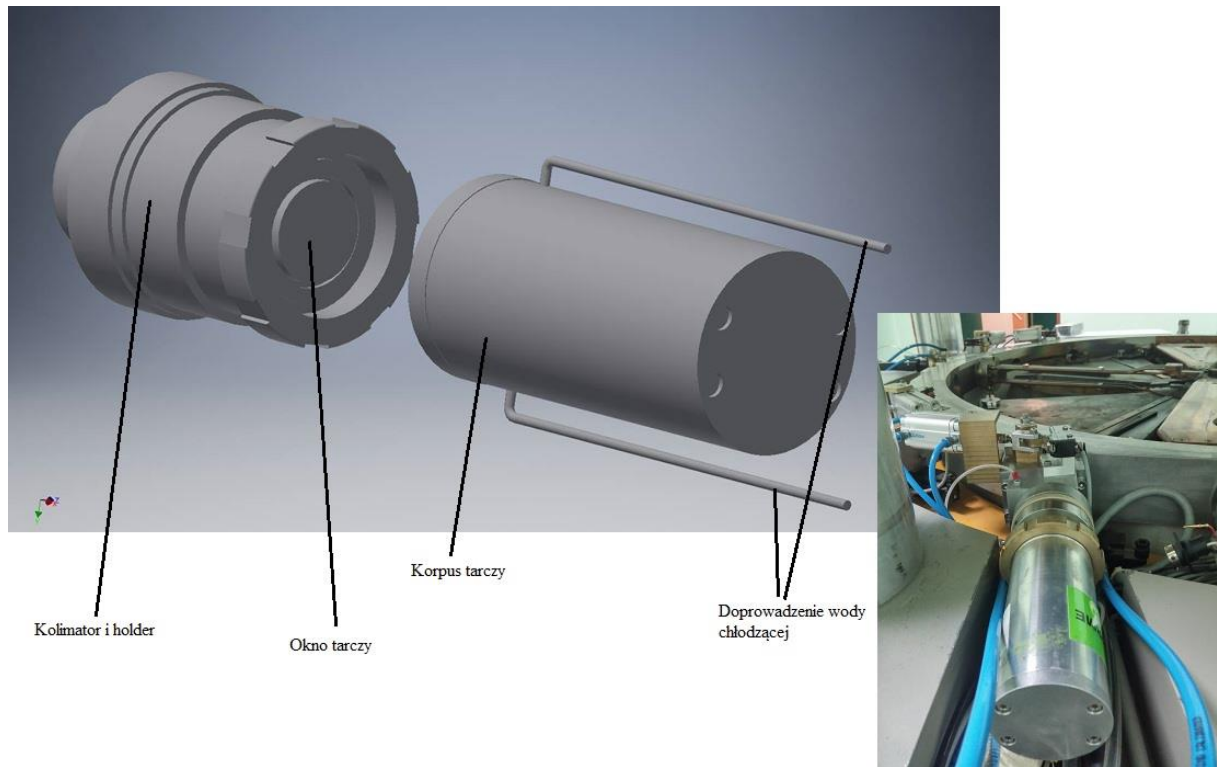
Rysunek 6.9. Układ podzespołów cyklotronu IBA Cyclone 18/9.

Aby mogła zajść reakcja jądrowa, po przyspieszeniu wiązki konieczna jest ekstrakcja elektronów z jonów. W tym celu, tuż przed portem tarczy zainstalowane są pirolityczne folie węglowe, tak zwane *strippery* [Devillet et al., 2013], [Calabretta et al., 2000], [Lepera et al., 1997], które pod wpływem wiązki osiągają temperaturę przekraczającą 1500°C. Ekstrakcja elektronów zmienia ładunek przyspieszanej cząstki kierując trajektorię wiązki w stronę tarczy [Bzowski, 2015] [Kleeven et al., 2018].

Jak wspomniano na początku tej sekcji, konstrukcje tarczy różnią się w zależności od stanu skupienia materiału tarczowego. Tarcze ciekłe oraz gazowe mają bardzo zbliżoną budowę, na którą składają się korpus tarczy, kolimator, okienko tarczy oraz holder mocujący folie (Rysunek 6.10). W przypadku tarcz stałych korpus tarczy zastępowany jest platynowym dyskiem, na który nałożony jest materiał tarczowy [Bzowski, 2015] [Szydło et al., 2018]. Z kolei z punktu widzenia wygenerowania określonego produktu radioaktywnego istotnymi parametrami napromieniania są rodzaj i natężenie wiązki, czas napromieniania tarczy oraz energia wiązki, a także liczba jąder docelowych, przekrój reakcji jądrowej i okres półtrwania wytwarzanego radioizotopu [Synowiecki et al., 2018].

Po przejściu przez stripper wiązka zachowuje stałą energię. W przypadku gliwickiego cyklotronu wynosi ona 18 MeV dla protonów. Jednak najwyższa gęstość jonizacji a tym samym najwyższa wydajność reakcji (pik Bragga) występuje przy różnych energiach w zależności od

reakcji [Freund, 1983]. W celu tłumienia energii wiązki padającej na materiał tarczowy wykorzystywane są folie hamujące protony. Folie te są wykonane najczęściej z tytanu lub aluminium [Bzowski, 2015].



Rysunek 6.10. Schemat budowy tarczy (po lewej) oraz tarcza gazowa IBA (po prawej).

Producent cyklotronu zainstalowanego w gliwickim oddziale Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie udostępnił w jednym z ogólnodostępnych serwisów internetowych krótki film przybliżający zasadę działania cyklotronu. Film jest dostępny pod adresem www.youtube.com/watch?v=6BxyqFK2KRI.

W roku 2015 było zainstalowanych na świecie ponad 950 małych cyklotronów medycznych o energii wiązki w zakresie 15–25 MeV, a liczba nowych instalacji wciąż rośnie [Schaffer et al., 2015].

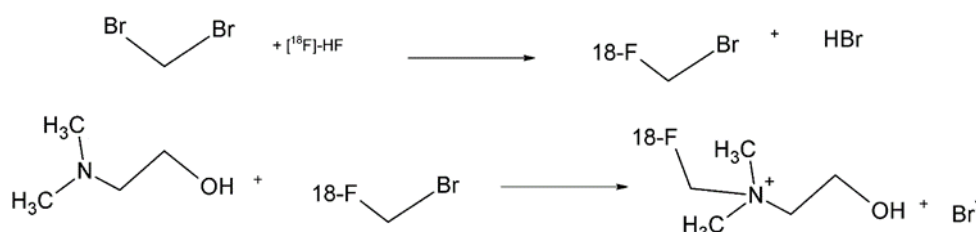
Część eksperymentalna

7. Cykl produkcyjny

Głównym celem pracy była optymalizacja procesu syntezy i oczyszczania radioznacznika znakowanego izotopem ^{11}C , takiego jak $[^{11}\text{C}]$ -cholina, oraz przygotowanie usystematyzowanego systemu kontroli jego jakości. Realizacja tego celu wymaga samodzielnego opracowania odpowiednich protokołów QA/QC dla tego radioznacznika, w tym dla jego prekursorów i materiałów wyjściowych, ponieważ w aktualnej na 2019 rok 10. edycji Farmakopei Europejskiej $[^{11}\text{C}]$ -cholina nadal nie została opisana [PhEur.10, 2019].

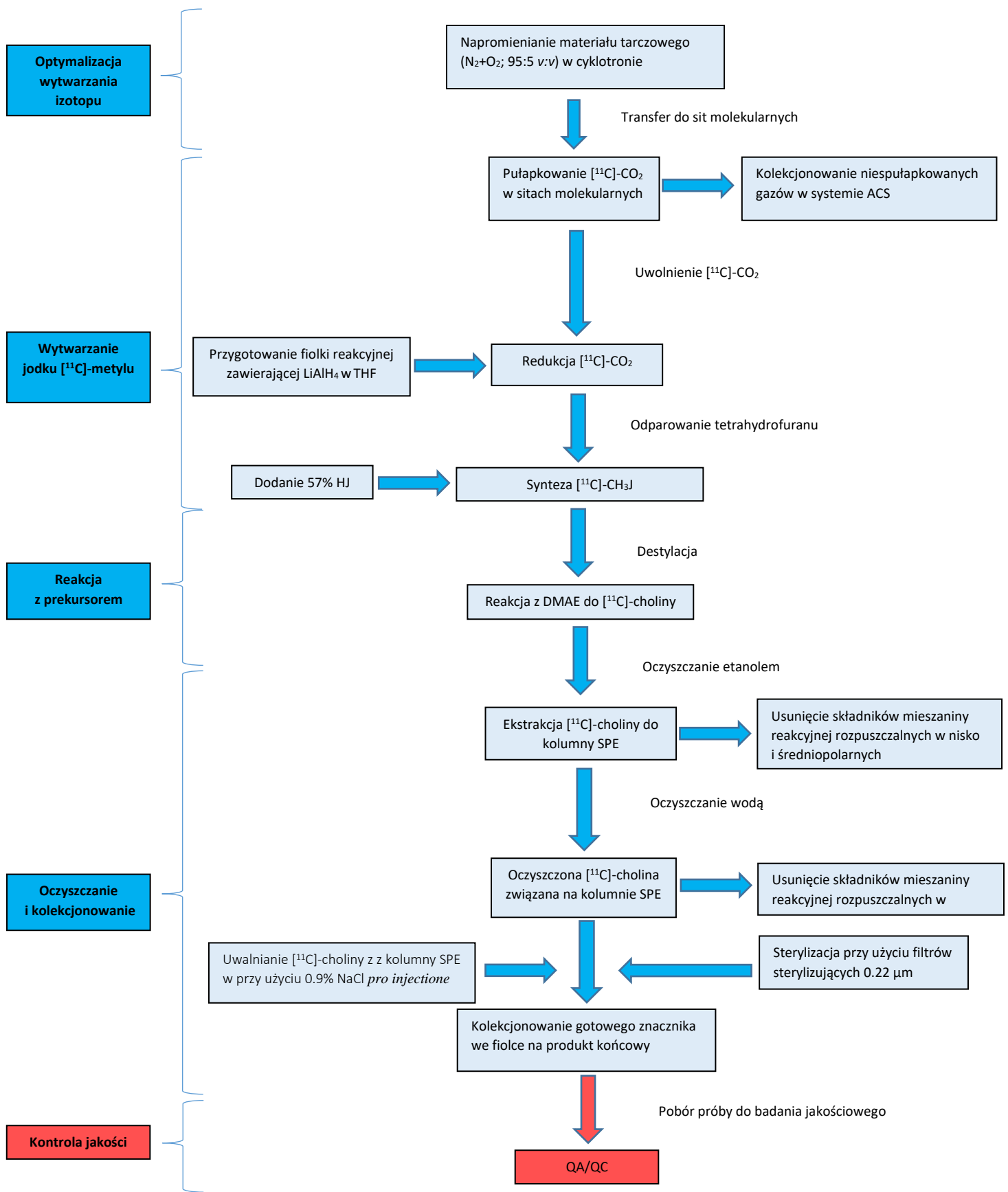
Opracowanie technologii produkcji znacznika $[^{11}\text{C}]$ -choliny i nadzór nad jego jakością nie jest też bez znaczenia dla otrzymywania jego pochodnej, $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholiny, która choć ma już swoje miejsce w farmakopei [Evangelista et al., 2016], [PhEurFCH], to jednak jedynie w zakresie procedur kontroli jakości produktu końcowego. Dzięki doświadczeniom zdobytym przy syntezie $[^{11}\text{C}]$ -choliny $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholina będzie mogła być syntezowana efektywniej i przy zredukowanej ilości substancji potencjalnie szkodliwych.

Prekursorem używanym przy wytwarzaniu zarówno $[^{11}\text{C}]$ -choliny, jak i $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholiny jest bowiem dimetyloaminoetanol (DMAE). Dodatkowo, w procesie wytwarzania $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholiny wykorzystywany jest dibromometan (DBM), substrat wyjściowy do otrzymania bromo- $[^{18}\text{F}]$ -fluorometanu, a schemat pełnej syntezy przedstawiony został na rysunku 7.1. [Szydło et al., 2016] [DeGrado et al., 2001].



Rysunek 7.1. Schemat syntezy $[^{18}\text{F}]$ -fluorocholiny.

Pełny cykl produkcyjny radioznacznika $[^{11}\text{C}]$ -choliny – począwszy od wytworzenia izotopu do zbadania jakości gotowego produktu, został przedstawiony na schemacie (Rysunek 7.2). W poszczególnych podrozdziałach części eksperymentalnej niniejszej rozprawy zostaną omówione poszczególne elementy procesu produkcyjnego oraz system kontroli jakości.



Rysunek 7.2. Schemat blokowy cyklu produkcyjnego $[^{11}\text{C}]\text{-choliny}$. Kolorem niebieskim oznaczone zostały procedury syntezy omawiane w rozdziale 9., natomiast kolorem czerwonym procedury QA/QC z rozdziału 10.

8. Materiały i metody

Częścią *Dobrej Praktyki Wytwarzania* związaną z Kontrolą Jakości jest specyfikacja materiałów wyjściowych, pobór ich prób oraz badania zapewniające, że materiały te są zwalniane do użycia po ocenie ich jakości jako zadowalającej [Źródło 5]. Wytwórnia radiofarmaceutyczna wytwarzająca znaczniki stosowane w emisyjnej tomografii pozytonowej charakteryzuje się wyjątkowo niskimi ilościami (rzędu miligramów czy mililitrów) wykorzystywanych materiałów wyjściowych, substancji aktywnych (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) oraz gotowego produktu leczniczego na jedną serię produkcyjną. Dlatego ważne jest opracowanie procedur analitycznych zoptymalizowanych pod względem liczby prób badanych. Technikami stosowanymi na szeroką skalę – i często wskazywanymi w monografiach farmakopealnych – są głównie techniki chromatograficzne i spektroskopowe.

Procedury analityczne

Analiza chemiczna realizowana była poprzez zastosowanie wielu technik i metod analitycznych w celu uzyskania i oszacowania informacji o istocie badanych substancji. Ponieważ techniki analityczne wykorzystują różne właściwości fizykochemiczne analitów, wybór konkretnej metody zależał zarówno od właściwości analizowanej próbki, jak i od postawionego zadania analitycznego (odpowiednie do potrzeb wypełnienie kryteriów dokładności pomiaru, selektywności, specyficzności, precyzyjności, szybkości, oznaczalności, powtarzalności, pracochłonności i kosztochłonności).

Podstawowa kwestia to wiarygodne oznaczenie czystości próby, ponieważ badane próby zawsze zawierają pozostałości substancji wykorzystywanych podczas ich wytwarzania. Oznaczenie czystości wymaga często zastosowania kilku badań analitycznych. Do identyfikacji, badania tożsamości i czystości wymienionych wyżej cholinowych związków chemicznych niezbędnych przy wytwarzaniu radiofarmaceutyków zastosowano w tej pracy takie metody analityczne jak pomiar gęstości względnej, spektroskopia w podczerwieni (IR) chromatografia gazowa (GC) i spektroskopia NMR.

Określenie zawartości zanieczyszczeń chemicznych jest zadaniem trudnym i wymaga serii wielu eksperymentów nie będących istotą niniejszej pracy, dlatego jako limity

czystości prekursorów i związków wykorzystywanych w reakcjach syntezy uznano deklaracje producenta wskazane w certyfikatach (czystość dimetyloaminoetanolu oraz dibromometanu nie mniejsza niż 95.0%). Odpowiednie certyfikaty dostępne są w sekcji *Załączniki*.

Pomiar gęstości względnej

W celu przeprowadzenia wstępnej identyfikacji DMAE i DBM zastosowano pomiar gęstości względnej tych związków [Źródło 6]. Pomiar gęstości względnej jest testem chętnie sugerowanym przez autorów farmakopei. Dzięki użyciu gęstościomierzy oscylacyjnych uzyskane wyniki są bardzo dokładne (nawet do siedmiu miejsc znaczących), powtarzalne, a czas pomiaru wynosi poniżej jednej minuty. O ile gęstość dimetyloaminoetanolu (0.8879 g/cm^3 w 20°C) [Załącznik 1] jest zbliżona do gęstości popularnie stosowanych rozpuszczalników organicznych, przydatność jej pomiaru w celu określenia czystości jest ograniczona. Z kolei w przypadku dibromometanu (2.477 g/cm^3 w 20°C) [Załącznik 2], zanieczyszczenia mają większy wpływ na wartości gęstości.

Pomiar gęstości względnej DMAE i DBM przeprowadzony został przy użyciu gęstościomierza oscylacyjnego Anton-Paar DMA 4100 M o dokładności pomiaru 0.0001 g/cm^3 , odchyleniu standardowym 0.00005 g/cm^3 w zakresie pomiarowym do 3 g/cm^3 zaopatrzonym w rurkę pomiarową o pojemności 1 ml termostatowaną w zakresie od 0°C do 100°C z dokładnością do 0.03°C . Oprogramowanie urządzenia posiada funkcje niezbędne do obliczenia wartości końcowej, dzięki czemu nie są wymagane dodatkowe obliczenia [Źródło 7].

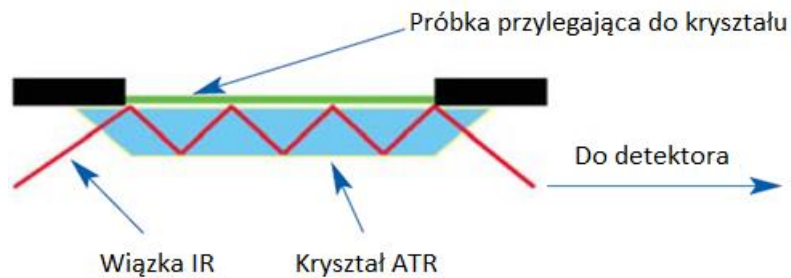
Uzyskane wyniki gęstości względnej badanych związków wyniosły kolejno 0.8868 g/cm^3 dla DMAE oraz 2.4952 g/dm^3 dla DBM. Wyniki różnią się od wartości podanych w specyfikujących je kartach charakterystyki o mniej niż 0.15% dla DMAE i 0.80% dla DBM. Różnice te są na tyle małe, że można założyć, iż odczynniki te kwalifikują się do dalszych analiz.

Spektroskopia w podczerwieni

Podstawowym celem spektrometrii w podczerwieni jest potwierdzenie tożsamości badanych substancji. Nie umożliwia ona bowiem jednoznacznej i precyzyjnej identyfikacji zanieczyszczeń i ich zawartości.

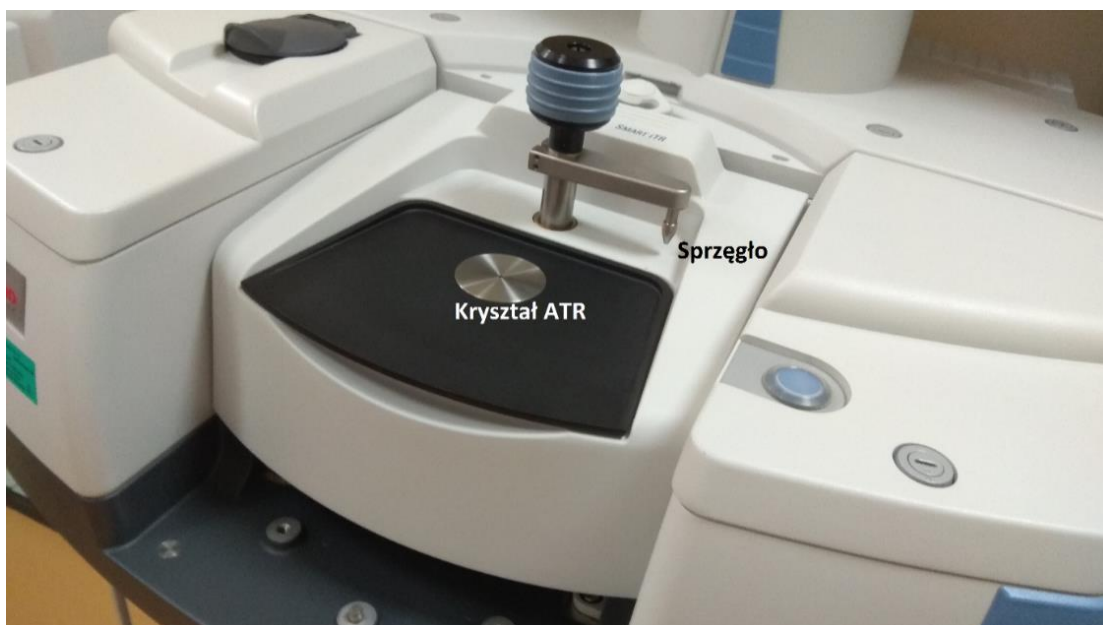
Analizy DMAE i DBM w podczerwieni wykonano na spektrometrze FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) Thermo Fisher Scientific serii Nicolet iS50 zaopatrzone w moduł Smart iTR. Moduł Smart iTR jest modułem prowadzącym akwizycję techniką wykorzystującą zjawisko osłabionego całkowitego odbicia promieniowania IR (ang. *Attenuated Total Reflectance*, ATR). Technika ATR polega na wielokrotnym odbiciu wiązki światła podczerwonego w kryształach o wysokim współczynniku załamania światła (znacznie wyższym, niż współczynnik załamania światła dla badanego materiału) (Rysunek 8.1).

Aby analiza ATR była poprawna, próbka powinna idealnie przylegać do powierzchni kryształu. Widmo uzyskane techniką ATR nie jest identyczne z widmem uzyskanym klasyczną techniką transmisyjną wykorzystującą celę pomiarową.



Rysunek 8.1. Eksperyment ATR.

W module Smart iTR wbudowany jest diament (jako kryształ ATR), o współczynniku załamania światła wynoszącym 2.41. Widoczne na rysunku 8.2 sprzęgło jest odpowiedzialne za dociśnięcie próbek stałych do powierzchni kryształu.

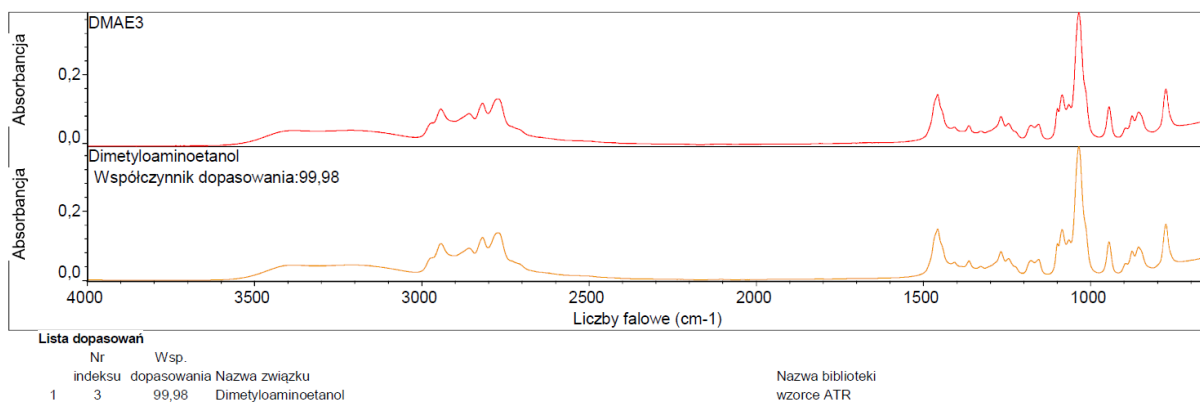


Rysunek 8.2. Moduł Smart iTR do spektrometrii FT-IR techniką ATR.

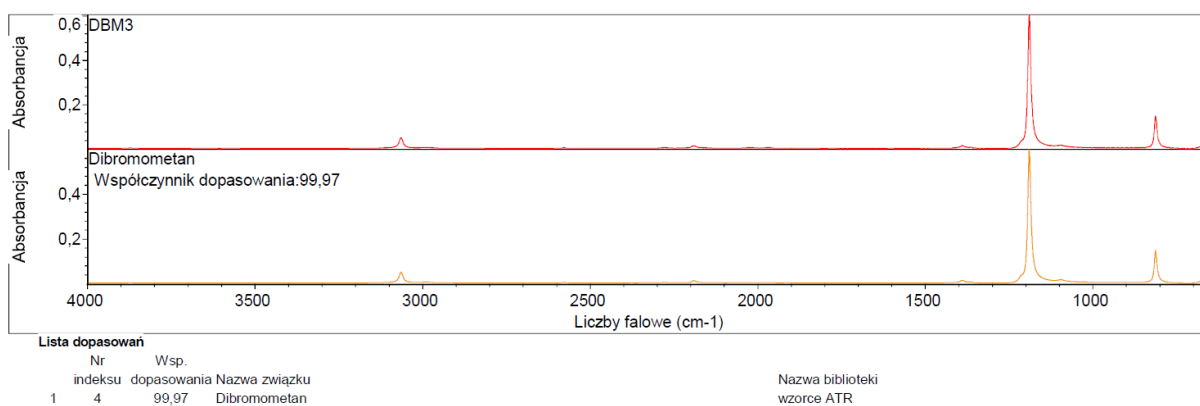
Analiza próbek ciekłych, jakimi są DMAE i DBM, nie wymaga użycia sprzęgła. Aplikacja próby polega na całkowitym zakryciu kryształu próbką o objętości około 100 μl .

Określenie czystości próbki polegało na porównaniu uzyskanego widma z widmem referencyjnym. Widma referencyjne ATR pochodzą od producenta urządzenia (próba odniesienia widma z eksperymentu ATR do widm referencyjnych z ogólnodostępnych bibliotek obarczona będzie dużym błędem, ponieważ pomimo działania algorytmu korygującego, sygnały nie będą się pokrywały).

Akwizycja widm została przeprowadzona ośmiokrotnie. Stosowany zakres spektralny mieścił się między 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} . Wyniki pomiaru określają w procentach zgodność dopasowania widm pomiarowych do widm referencyjnych. Dla DMAE uzyskano zgodność nie mniejszą niż 99.98% (Rysunek 8.3), a dla DBM powyżej 99.97% (Rysunek 8.4).



Rysunek 8.3. Widmo ATR dimetyloaminoetanolu.



Rysunek 8.4. Widmo ATR dibromometanu.

Chromatografia gazowa

W celu identyfikacji zanieczyszczeń oraz ich udziału w próbce zastosowana została metoda chromatografii gazowej (ang. *gas chromatography*, GC) z detekcją w detektorze płomieniowo-jonizacyjnym (ang. *Flame Ionization Detector*, FID).

Analizy GC przeprowadzono przy użyciu aparatu Agilent 6850 z rozdziałem mieszaniny na kolumnie kapilarnej HP-Innowax (30×0.32 mm, wypełnionej glikolem polietylenowym o grubości filmu wynoszącej 50 μm).

Rozdział chromatograficzny umożliwia jakościową identyfikację zanieczyszczeń, a dzięki możliwości opracowania krzywej kalibracyjnej, chromatografia gazowa pozwala na ich ilościowe oznaczenie [Witkiewicz et al., 2001]. Wstępna znajomość potencjalnych zanieczyszczeń to istotna informacja o próbce, która ułatwia sporządzenie krzywej kalibracyjnej. Bez tej wiedzy próba określenia związku dającego sygnał przy danej wartości

czasu retencji R_t metodą prób i błędów z użyciem kolejnych związków jest wyjątkowo żmudna, co jest spowodowane dużą liczbą związków dających odpowiedź na detektorze FID. W niniejszej pracy nie zostały opracowane krzywe kalibracyjne dla zanieczyszczeń ze względu na niemożność uzyskania od producenta odczynników odpowiedzi odnośnie wyspecyfikowania użytych w syntezie odczynników oraz zanieczyszczeń oznaczonych w certyfikatach analizy jako *unknown* (Załącznik 1 oraz Załącznik 2). Nie mniej jednak, chromatografia gazowa nadal pozostaje przydatną techniką analityczną dla procentowego oznaczenia czystości substratów pod kątem zanieczyszczeń.

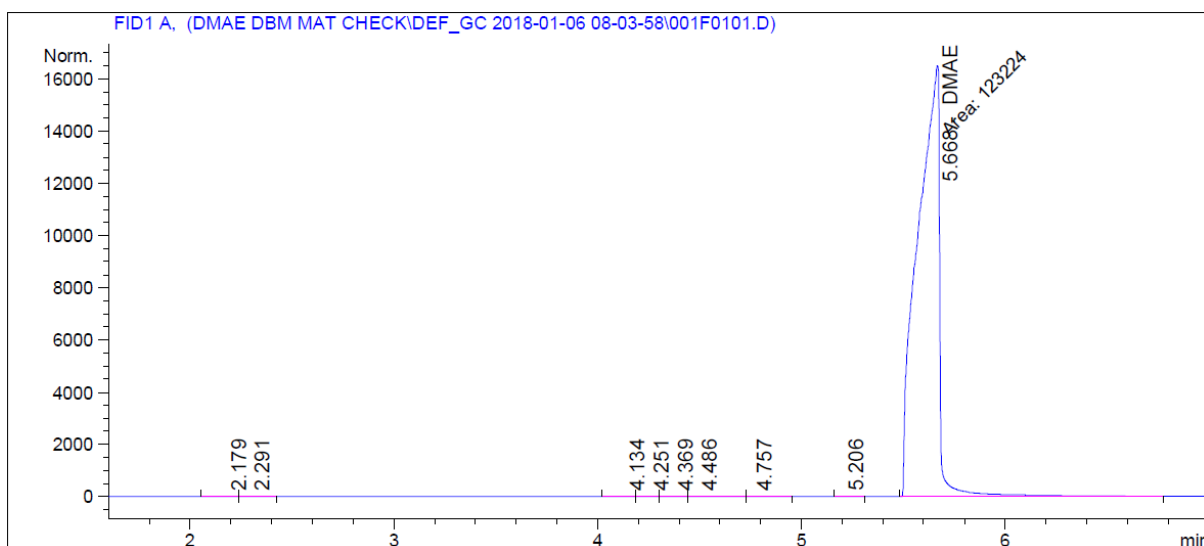
Szczegóły pomiarów dla DMAE i DBM przedstawiono w kolejnych podpunktach.

Dimetyloaminoetanol

Nastrzyk 0.2 μ l wprowadzono na dozownik typu *split* o współczynniku podziału 30.0:1 przy całkowitym przepływie helu (użytego jako gaz nośny) równym 72.3 ml/min. w temperaturze utrzymywanej na iniektorze wynoszącej 250 °C. Temperatura pieca, 60 °C, utrzymywana była przez dwie minuty, a następnie podwyższono ją do 150 °C stosując skok 15 °C/min.

Warunki detekcji na detektorze FID w temperaturze 260 °C przy przepływach gazów w palniku: wodór 30.0 ml/min; powietrze syntetyczne (mieszanina azot : wodór w stosunku 80% : 20% v:v) 400.0 ml/min.

Udział DMAE na chromatogramie (czas retencji 5.6 minuty) wynosił powyżej 99.93% wszystkich związków ulegających jonizacji w płomieniu detektora (Rysunek 8.5), co jest wartością zbliżoną do tej uzyskanej techniką ATR. Chromatografia gazowa prowadzona w wyżej opisanych warunkach jest wystarczająco skutecznym narzędziem do oceny czystości dimetyloaminoetanolu, pomimo wysokiego powinowactwa tego związku do złoża kolumny wymagającego wysokiej temperatury termostatu, co skutkuje wysokim czasem retencji i niską symetrią uzyskanego sygnału w zamian za dużą czułość detektora.

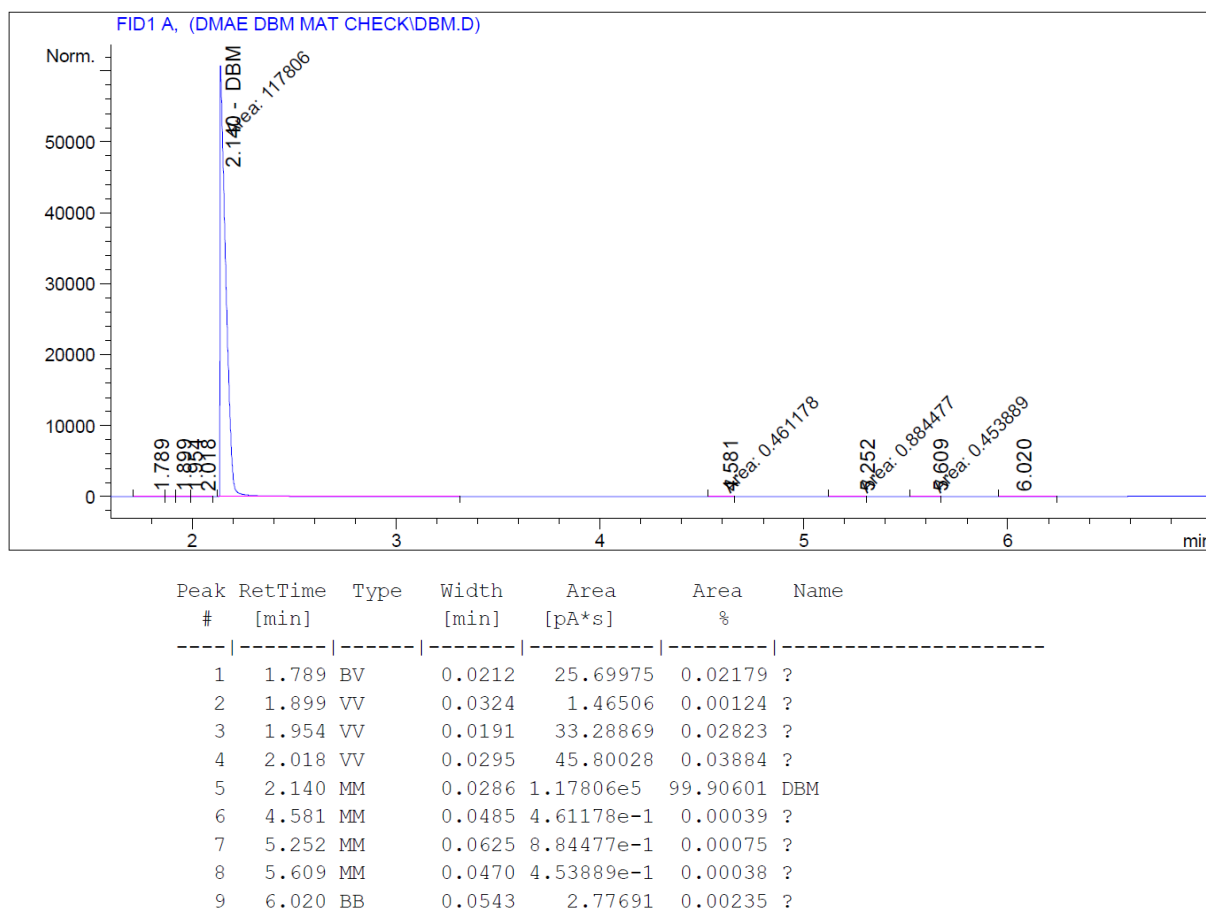


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	2.179	BV	0.0916	5.32919e-1	0.00043	?
2	2.291	VB	0.0220	19.67475	0.01596	?
3	4.134	VV	0.0754	5.44357e-1	0.00044	?
4	4.251	VV	0.0431	5.49247e-1	0.00045	?
5	4.369	VV	0.0340	26.63637	0.02160	?
6	4.486	VV	0.0512	33.80649	0.02742	?
7	4.757	VB	0.0655	2.10510	0.00171	?
8	5.206	BB	0.0441	2.42564e-1	0.00020	?
9	5.668	MM	0.1244	1.23224e5	99.93180	DMAE

Rysunek 8.5. Chromatogram GC dimetyloaminoetanolu.

Dibromometan

W analizach dibromometanu wykorzystano aparaturę GC o tej samej konfiguracji sprzętowej i o identycznych parametrach pracy. Ze względu na dużo większą lotność DBM względem DMAE, czas retencji wynosił w tym przypadku 2.1 minuty. Sygnał DBM jest wąski i symetryczny. Czystość próby wyniosła 99.91%. Na rysunku 8.6 przedstawiono chromatogram dibromometanu wraz z charakterystykami sygnałów związku głównego i zanieczyszczeń.



Rysunek 8.6. Chromatogram GC dibromometanu.

Spektroskopia NMR

Farmakopea zaleca korzystanie z technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego fluoru-19 przy oznaczaniu czystości 1,3,4,6-tetra-O-acetylo-2-O-trifluorometanosulfonylo-β-D-mannopiranozy (triflattu tetra-O-acetylomannozy) będącej prekursorem w wytwarzaniu [¹⁸F]-fluorodeoksyglukozy [Źródło 8]. Jednak możliwość korzystania z technik NMR w nadzorowaniu procesu produkcji radiofarmaceutyków przy użyciu małych szpitalnych cyklotronów jest nadal ograniczona wysokimi kosztami zakupu spektrometru NMR i jego gabarytami. Od niedawna na rynku dostępne są aparaty nastołowe, dużo tańsze, o niewielkich rozmiarach, jednak pracujące przy niższych częstotliwościach rezonansowych protonów, a tym samym oferujące widma o niższej rozdzielczości niż spektrometry laboratoryjne [Thermo]. Jednak rosnąca dostępność wersji uproszczonych pozwala oczekiwać, że wkrótce NMR stanie się standardową techniką stosowaną w procedurach kontroli jakości radiofarmaceutyków, tym bardziej, że jest to technika szybka, względnie tania eksploatacyjnie, wysoce powtarzalna oraz

ilościowa, co jest istotne przy rutynowym jej stosowaniu w kontroli jakości. Z tego względu spektroskopia protonowa ^1H NMR została zaimplementowana do systemu kontroli jakości konstruowanego w tej pracy na potrzeby badania czystości odczynników do produkcji radioznaczników cholinowych.

Techniki NMR nie wymagają dużych ilości analitu, jednak ze względu na niską czułość nie są odpowiednie do analizy produktów syntezy podstawienia izotopu promieniotwórczego, bowiem z serii produkcyjnej otrzymuje się zaledwie około 0.1 mmol/ml radioznacznika [Yonekura et al., 1982].

Potwierdzenie tożsamości związku

Widma ^1H NMR zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru Bruker Avance III 400 MHz (9.4 T) wyposażonego w głowicę szerokopasmową PABBI 5 mm.

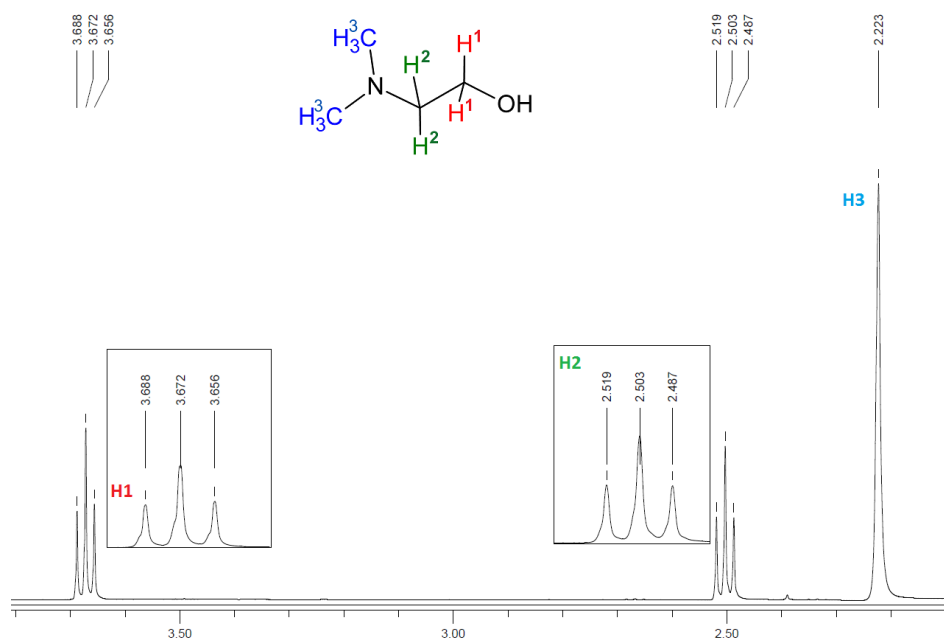
Do akwizycji i obróbki widm wykorzystano program TopSpin® w wersji 3.1. Analiza danych została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Mnova® (wersja 10.0). Rejestracja widm prowadzona była z wykorzystaniem programu pulsowego NOESYGPPR1D pochodzącego ze standardowej biblioteki Bruker. Zastosowano następujące parametry akwizycji: szerokość okna pomiarowego 20 ppm, liczba punktów pomiarowych 65536, czas akwizycji 4.1 s, czas trwania impulsu P1 30 μs , opóźnienie relaksacji D1 równe 1 s oraz liczba powtórzeń 32 skany. W widmach dokonano automatycznej korekcji fazy oraz zastosowano poszerzenie linii widmowej 0.3 Hz.

Analizie techniką ^1H NMR poddano próbę handlowego odczynnika stosowanego w rutynowym wytwarzaniu radioznaczników cholinowych o stężeniu 15 mg/ml i objętości 0.6 ml w wodzie deuterowanej (D_2O). Akwizycja została przeprowadzona względem kwasu 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowego (TSP) jako wzorca przesunięcia chemicznego.

DMAE zawiera w budowie cząsteczki jedenaście protonów, a widmo NMR tego związku składa się z trzech sygnałów (Rysunek 8.7). Jest to efekt występowania jąder równocennych oraz grupy hydroksylowej – proton grupy hydroksylowej nie jest widoczny na widmie, gdyż protony związane z atomem tlenu, azotu lub siarki podlegają procesom wymiany i często są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych, co powoduje poszerzenie linii rezonansowych nawet do takiego stopnia, że sygnał „wtapia” się w linię tła [Silverstein et al., 2007]. Widma ^1H NMR DMAE są wyraźne, o bardzo dobrej rozdzielczości, co pozwala

jednoznacznie potwierdzić tożsamość związku. Poza charakterystycznym singletem pochodzącym od grup metylowych, dobrze identyfikowalne są multiplety grup $-\text{CH}_2$, a ich stałe sprzężenia zostały zmierzone. Końcowe dane uzyskane z widma ^1H NMR DMAE prezentują się następująco:

^1H NMR (400 MHz, TSP, D_2O , 10 mg/0.6 ml) $\delta(\text{ppm})$ 3.67 (*t*, 2H, $J = 6.5$ Hz, H-1), 2.50 (*t*, 2H, $J = 6.5$ Hz, H-2), 2.22 (*s*, 6H, H-3), gdzie *t* to tryplet, a *s* to singlet.



Rysunek 8.7. Identyfikacja sygnałów NMR dimetyloaminoetanolu.

Oznaczanie czystości związku

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego może być też stosowana w ilościowych oznaczeniach czystości związku chemicznego. Tego typu metodologia nosi nazwę qNMR (*ang. quantitative NMR*). Co ważne, ilościowe wymagania techniki NMR są stosunkowo niewielkie, biorąc pod uwagę dostępne ilości związków chemicznych będących produktami wyjściowymi do syntezy radiofarmaceutyku. Niestety nie dotyczy to już samego produktu radiofarmaceutycznego, ze względu na jego zbyt małe stężenie o czym wspomniałem powyżej. Szczegóły procedury qNMR wyjaśnili Pauli et al. w monografii [Pauli et al., 2014]. Monografia ta proponuje dwie metody prowadzenia obliczeń qNMR: metodę względną oraz bezwzględną.

W metodzie względnej (znormalizowanej metodzie „100%”) suma intensywności integralnych (tzw. całek) wszystkich zarejestrowanych sygnałów daje wartość 100%. Wymaga ona od osoby

prowadzącej analizę umiejętności rozróżnienia sygnałów związku oznaczanego i sygnałów pochodzących od zanieczyszczeń zgodnie ze wzorem (7) [Pauli et al., 2014]:

$$P[\%] = \frac{nInt_t \cdot MW_t}{nInt_t \cdot MW_t + \sum_1^u (nInt_u \cdot MW_u)} \cdot 100 \quad (7)$$

gdzie:

P – czystość,

nInt – liczba całkowanych protonów,

MW – masa molowa,

u – ilość zanieczyszczeń,

t – oznaczany związek.

W przypadku metody bezwzględnej nie jest konieczna znajomość sygnałów zanieczyszczeń, w zamian jednak wymagane jest zastosowanie wewnętrznego kalibranta o znanej naważce i czystości oraz, co nie jest istotne podczas stosowania metody względnej, dokładnej naważki analizowanej próby. Metoda bezwzględna jest często metodą z wyboru podczas pomiarów, w których nacisk kładzie się na określenie czystości głównego związku, na przykład czystości materiału wyjściowego do syntezy. Korzystając z metody bezwzględnej czystość oblicza się zgodnie ze wzorem (8) [Pauli et al., 2014]:

$$P[\%] = \frac{n_{IC} \cdot Int_t \cdot MW_t \cdot m_{IC}}{n_t \cdot Int_{IC} \cdot MW_{IC} \cdot m_s} \cdot P_{IC} \quad (8)$$

gdzie:

P – czystość,

I_{nt} – wartość integralnej intensywności sygnału,

MW – masa molowa,

n – liczba protonów dających swój wkład do sygnału,

A dolne indeksy oznaczają:

IC - wewnętrzny kalibranta,

T - oznaczany związek

S - badaną próbę.

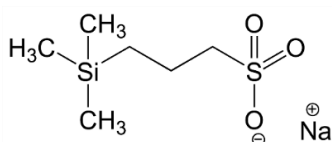
W celu określenia czystości dimetyloaminoetanolu wykorzystana została metoda bezwzględna z użyciem wewnętrznego kalibranta. Pomiar przeprowadzono przy jednakowych parametrach akwizycji przedstawionych w Tabeli 7.

Tabela 7. Parametry akwizycji widm NMR w eksperymencie qNMR.

Parametry akwizycji widm NMR	
Program impulsowy	ZG (Bruker)
Szerokość pasma impulsu	90°
Liczba punktów pomiarowych	65 536
Czas pojedynczego skanu	2.7263 s
Liczba skanów	64
Temperatura próbki	300 K
Rotacja próbki	Bez obrotu

W pierwszej kolejności zarejestrowano widmo mrówczanu sodu. Mrówczan sodu, zakupiony od Sigma Aldrich, o deklarowanej przez producenta czystości wynoszącej 99.2%, został użyty jako próba referencyjna (certyfikat analizy załączony jako załącznik [Załącznik 3]).

W kolejnym kroku zostało zarejestrowane widmo DMAE – związku używanego do syntezy zarówno [¹³C]-choliny jak i jej fluorowej pochodnej. Obie próby zostały przygotowane w wodzie deuterowanej (D₂O) zawierającej 1% wagowy 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonianu sodu (DSS) (Rysunek 8.8) o czystości 97%. DSS został użyty w podwójnej roli: jako wzorzec przesunięcia chemicznego oraz wewnętrzny kalibrant.

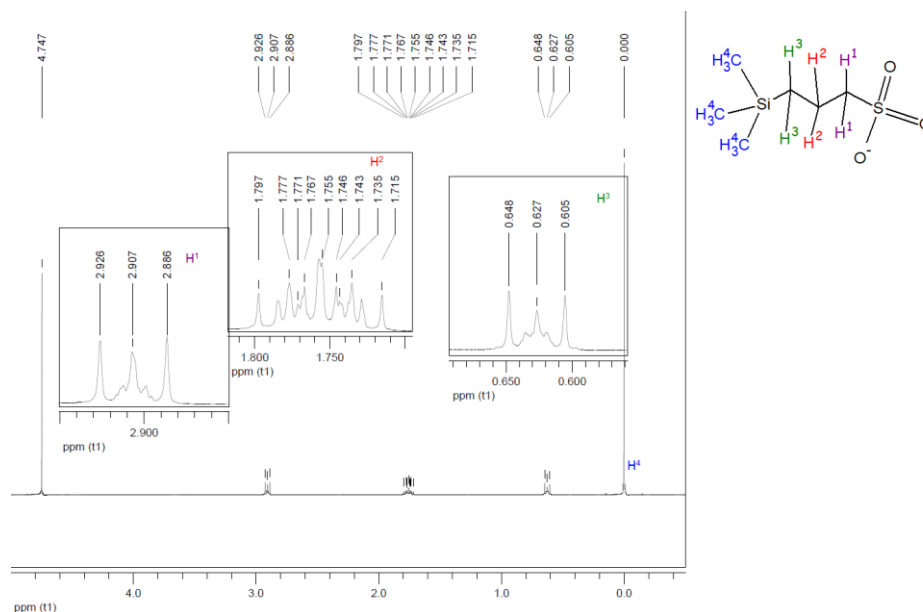


Rysunek 8.8. Wzór strukturalny 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonianu sodu.

Próba referencyjna mrówczanu sodu została przygotowana z naważki 4.06 mg CHOONa. Ta naważka została rozpuszczona w 669.13 mg D₂O +1% (w/w) DSS (zawartość DSS w próbce referencyjnej wynosiła 6.69 mg). Natomiast próbka prekursora została przygotowana z naważki 5.56 mg DMAE rozpuszczonego w 673.98 mg D₂O +1% (w/w) DSS (zawartość DSS w próbce badanej wynosiła 6.74 mg). Widmo ¹H NMR DMAE wraz ze zidentyfikowanymi liniami zostało zaprezentowane na rysunku 8.7.

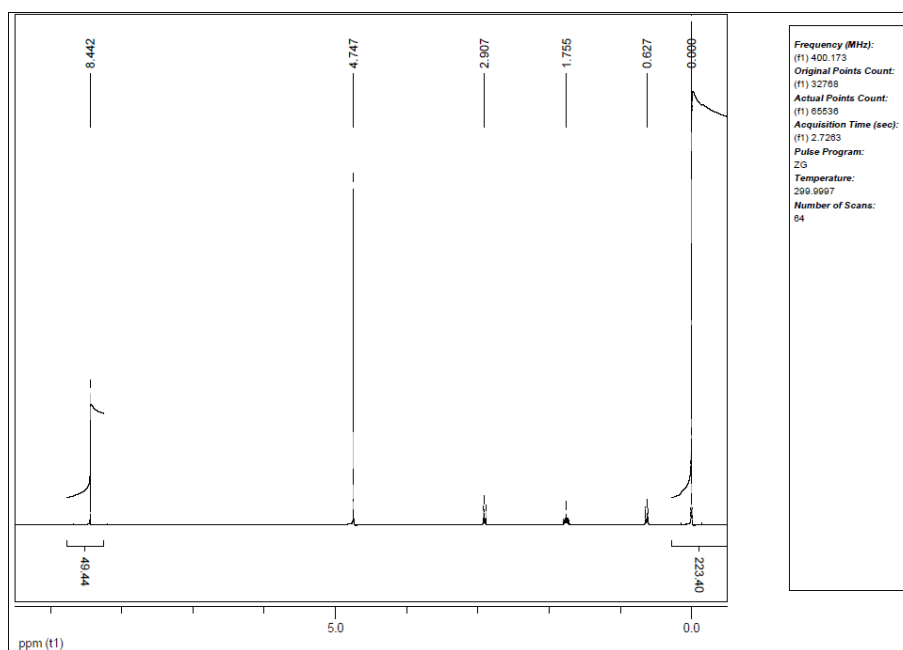
Widmo NMR mrówczanu sodu zawiera tylko jeden sygnał (singlet) pochodzący od jedyne go wodoru w tym związku.

Analiza widma NMR DSS została przedstawiona na Rysunku 8.9. Sygnał o przesunięciu chemicznym około $\delta = 4.76$ ppm jest pozostałością po presaturacji sygnałów wody. Identyfikacja linii widma DSS przedstawia się następująco: ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 2.91 (*t*, 2H, $J = 8.3$ Hz, H-1), 1.76 (*tt*, 2H, $J_{\text{H-1}} = 8.3$ Hz, $J_{\text{H-3}} = 8.4$ Hz, H-2), 0.63 (*t*, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-3), 0.00 (*s*, 9H, H-4), gdzie *t* to tryplet, *tt* tryplet trypletów, a *s* to singlet.

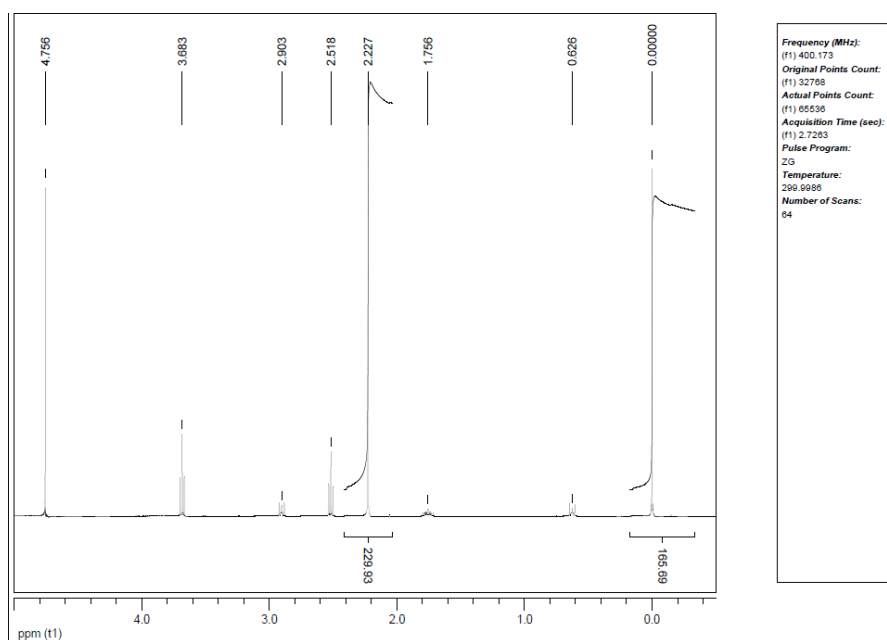


Rysunek 8.9. Widmo 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonianu sodu.

Rysunek 8.10 oraz Rysunek 8.11 przedstawiają widma zarejestrowane w tym eksperymencie kolejno dla próby referencyjnej oraz badanej.



Rysunek 8.10. Widmo próby referencyjnej (mrówczanu sodu z DSS).



Rysunek 8.11. Widmo próby badanej (DMAE z DSS).

Sygnaly pochodzące od protonów grupy metylenowej CH_2 łańcucha propanowego charakteryzują się zbyt niską intensywnością, a wartości ich integralnych intensywności, z dużym prawdopodobieństwem, będą obarczone grubym błędem. Dlatego w celu oznaczenia czystości próby referencyjnej oraz próby DMAE wykorzystano jedynie wartości całek zmierzone dla singletów. Z tego też powodu do wzoru (8) podstawiono jako wartości Int_t oraz Int_{IC} wartości integralnych intensywności singletu o przesunięciu chemicznym $\delta = 8.44$ ppm, pochodzącego od CHCOONa , oraz singletu o przesunięciu $\delta = 0.00$ ppm pochodzącego od DSS, a także wartości $n_t = 1$ proton i $n_{\text{IC}} = 9$ protonów dla próby referencyjnej oraz singletu o przesunięciu chemicznym $\delta = 2.23$ ppm pochodzącego od DMAE oraz singletu o przesunięciu $\delta = 0.00$ ppm pochodzącego od DSS; dla próby DMAE $n_t = 6$ protonów, $n_{\text{IC}} = 9$ protonów.

Czystość mrówczanu sodu użytego do przygotowania próby referencyjnej wyznaczona ze wzoru (8) wyniosła 99.19%, co jest zbliżone z informacją podaną w *Certyfikacie Analizy* producenta [Załącznik 3]. Obliczenia przeprowadzone dla próby badanego prekursora wskazują na czystość dimetyloaminoetanolu wynoszącą 99.93%.

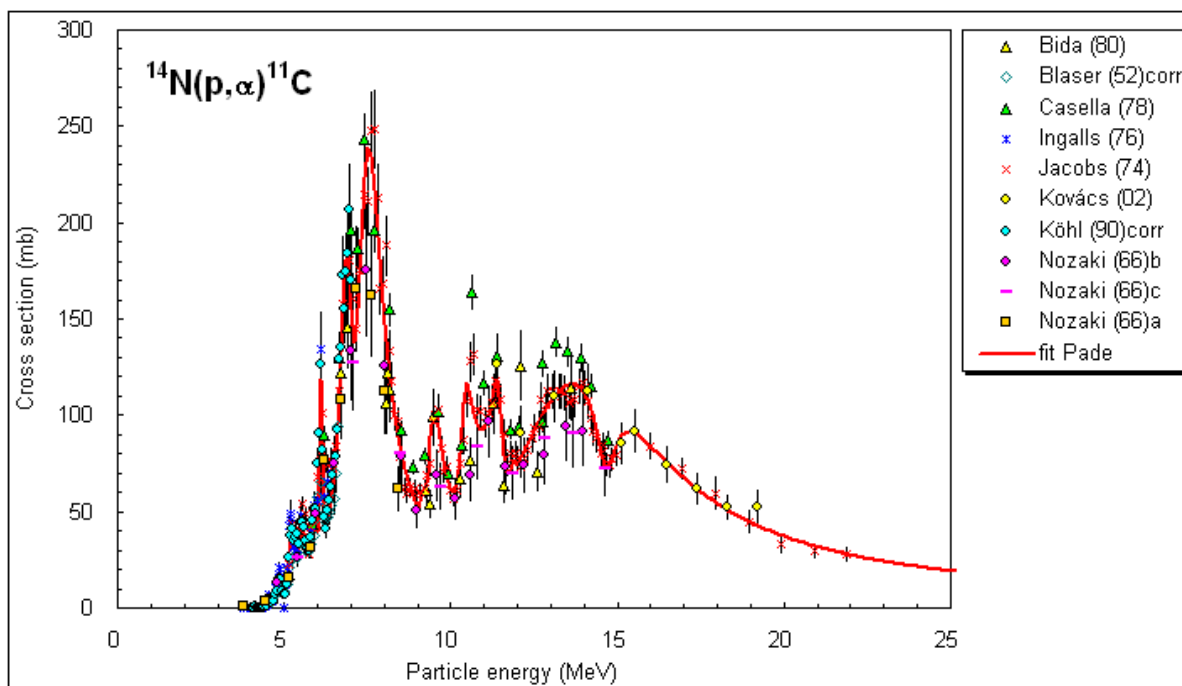
Czas rejestracji widma ^1H NMR w procedurach kontroli jakości wynosi około 5 minut, a więc jest to analiza szybka. Także ocena kryterium kosztowego wypadu bardzo korzystnie, bowiem ceny powszechnie stosowanych rozpuszczalników deuterowanych są przystępne, tym bardziej że do przygotowania pojedynczej próbki potrzebne są niewielkie ilości odczynników. To, co może przysporzyć trudności laborantowi prowadzącemu analizę, to wymagana duża dokładność przy przygotowywaniu próbek i opracowywaniu widm – widma muszą być dobrej

jakości, aby integracja sygnałów była precyzyjna. Zalecane jest użycie wagi laboratoryjnej o dokładności odczytu co najmniej $d = 0.01$ mg. Jak wykazały własne doświadczenia, przy zastosowaniu wagi o wartości $d = 0.1$ mg różnice obliczonej czystości wyniosły ok. 2.5%.

Podsumowując, techniki spektroskopii NMR są wygodnym i szybkim sposobem jednoznacznej identyfikacji tożsamości odczynników w medycznej produkcji radiofarmaceutyków prowadzonej przy użyciu niewielkiego cyklotronu szpitalnego. Z kolei metodyka qNMR, wykorzystana w celu określenia czystości związków, pozwala na uzyskanie dokładnych i powtarzalnych wyników. Tak więc NMR może być stosowany komplementarnie z innymi metodami analitycznymi w kontroli jakości.

9. Procesy syntezy [^{11}C]-choliny

Punktem wyjścia dla produkcji radiofarmaceutyków znakowanych węglem-11 jest reakcja jądrowa $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$. Zakres energii dla zajścia tej reakcji wynosi od 4 do 20 MeV, a odpowiednie przekroje czynne przedstawiono na Rysunku 9.1 [IAEA].



Rysunek 9.1. Przekroje czynne dla reakcji $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$ [IAEA].

Cyklotron IBA Cyclone 18/9 zainstalowany w gliwickim oddziale Centrum Onkologii jest zdolny przyspieszać protony do energii 18 MeV, a deuterony do energii 9 MeV, natomiast reakcja prowadzona jest w tarczy gazowej.

W procesach syntezy [^{11}C]-choliny zastosowano aparaturę firmy Bioscan, która znajduje się na wyposażeniu Samodzielnej Pracowni Cyklotronu i Produkcji Radioizotopów gliwickiego oddziału Centrum Onkologii. Aparatura ta składa się z dwóch modułów: MeI PLUSTM oraz ReFORM PLUSTM (Rysunek 6.2) zainstalowanych w dwóch sąsiednich komorach osłonnych (Comecer MIP1) z nawiewem laminarnym i systemem ACS (ang. *Air Compressing Station*)

mającym za zadanie gromadzenie skażonego radioaktywnie powietrza w specjalnych zbiornikach do czasu wygaśnięcia aktywności promieniotwórczej.

Synteza [^{11}C]-choliny jest procesem dwuetapowym, a każdy z modułów odpowiedzialny jest za jeden etap.

Optymalizacja wytwarzania izotopu

Jako materiał tarczowy stosowany jest gazowy azot zawierający 0.5% dodatku cząsteczkowego tlenu. Zastosowanie takiej mieszaniny jako materiału tarczowego pozwala na otrzymanie węgla-11 w postaci dwutlenku węgla [^{11}C]- CO_2 . W pierwszych seriach produkcyjnych tarcza gazowa cyklotronu o pojemności 50 cm^3 napełniana była gazem tarczowym do ciśnienia 20 bar, co pozwalało na prowadzenie reakcji przy wiązce protonów o natężeniu do $36\text{ }\mu\text{A}$, a to z kolei skutkowało wydajnością reakcji jądrowej wynoszącą $3.11\text{ GBq}/\mu\text{A}$, bez przekraczania maksymalnego ciśnienia dla tarczy wynoszącego 45 bar.

W pierwszym kroku optymalizacji procesu wytwarzania izotopu zdecydowałem się na obniżenie ciśnienia napełnienia tarczy z 20 bar do 17 bar. Pozwoliło to na zwiększenie natężenia wiązki protonów do wartości średniej $40\text{ }\mu\text{A}$. Zmiana ta zwiększyła także wydajność reakcji jądrowej do $3.96\text{ GBq}/\mu\text{A}$ (wzrost o 27%). W praktyce unika się napromieniania tarczy dłużej, niż dwukrotność czasu półtrwania, uznając to za nieopłacalne z punktu widzenia przyrostu wytworzonej aktywności promieniotwórczej, co wynika ze wzoru (9) na wydajność reakcji jądrowej [Hoehr et al., 2014]:

$$Y = \frac{A}{I(1 - \text{EXP}\left(\frac{-\ln 2}{t_{1/2} * t}\right))} \quad (9)$$

gdzie:

Y – wydajność reakcji jądrowej [$\text{MBq}/\mu\text{A}$],

A – aktywność w czasie zakończenia napromieniania (*ang. end-of-beam activity; EOB*) [MBq],

I – całkowite natężenie wiązki w czasie napromieniania [μA],

$t_{1/2}$ – czas półtrwania wytwarzanego izotopu [min],

t – czas napromieniania [min].

Rysunek 9.2. przedstawia podsumowanie szarży napromieniania materiału tarczowego. Raport zawiera czas napromieniania, parametry pracy źródła, cewki głównej cyklotronu oraz napięcie prądu przyłożonego na duantach oraz wartości prądowe tarczy.



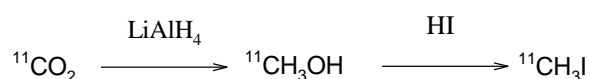
Rysunek 9.2. Raport serii z wytwarzania izotopu węgla-11. Górny wykres przedstawia natężenie wiązki padającej na tarczę w czasie napromieniania. Dolny wykres przedstawia ciśnienie w tarczy (linia czerwona), natężenie prądu w łuku elektrycznym źródła (linia zielona) oraz wartość próżni utrzymywanej w cyklotronie (linia czarna).

Wytworzenie jodku [^{11}C]-metylu

Pierwszym etapem procesu otrzymywania jest synteza [^{11}C] jodku metylu. Wytworzony w cyklotronie [^{11}C]- CO_2 przesyłany jest kapilarami stalowymi do modułu MeI PLUSTM, gdzie jest pułapkowany na sitach molekularnych przed uruchomieniem skryptu modułu. Przed użyciem, sita molekularne są kondycjonowane w celu zwiększenia ich wydajności pułapkowania. Kondycjonowanie ma na celu usunięcie z porów sit dwutlenku węgla i wilgoci pochodzących z powietrza atmosferycznego, a polega na ogrzewaniu sit w temperaturze 250°C przez 60 minut przy jednoczesnym przedmuchiwaniu ich objętości azotem. W przypadku

dwóch następujących bezpośrednio po sobie szarż produkcyjnych można skrócić czas kondycjonowania sit do 20 minut.

Transfer zaadsorbowanego na sitach dwutlenku węgla-11 do reaktora prowadzony jest tak samo jak kondycjonowanie. Sita ogrzewane są przez 90 sekund, a uwalniane z nich [^{11}C]- CO_2 transportowany jest azotem przy przepływie 15 ml/min do reaktora zawierającego odmierzone wcześniej w pętli dozującej 300 μl roztworu o stężeniu 0.1 mol/dm³ glinowodorku litu rozpuszczonego w tetrahydrofuranie (certyfikat analizy producenta jest dostępny jako załącznik [Załącznik 4]). W reaktorze następuje natychmiastowa redukcja dwutlenku węgla-11 do [^{11}C]-metanolu. Po odparowaniu z mieszaniny reakcyjnej tetrahydrofuranu, przy pomocy pętli dozującej o pojemności 500 μl do reaktora dozowany jest 57% kwas jodowodorowy. Finalnie w reaktorze tworzy się znakowany jodek metylu [^{11}C]- CH_3J , zgodnie z formułą przedstawioną na Rysunku 9.3 [Wuest et al., 2007]:



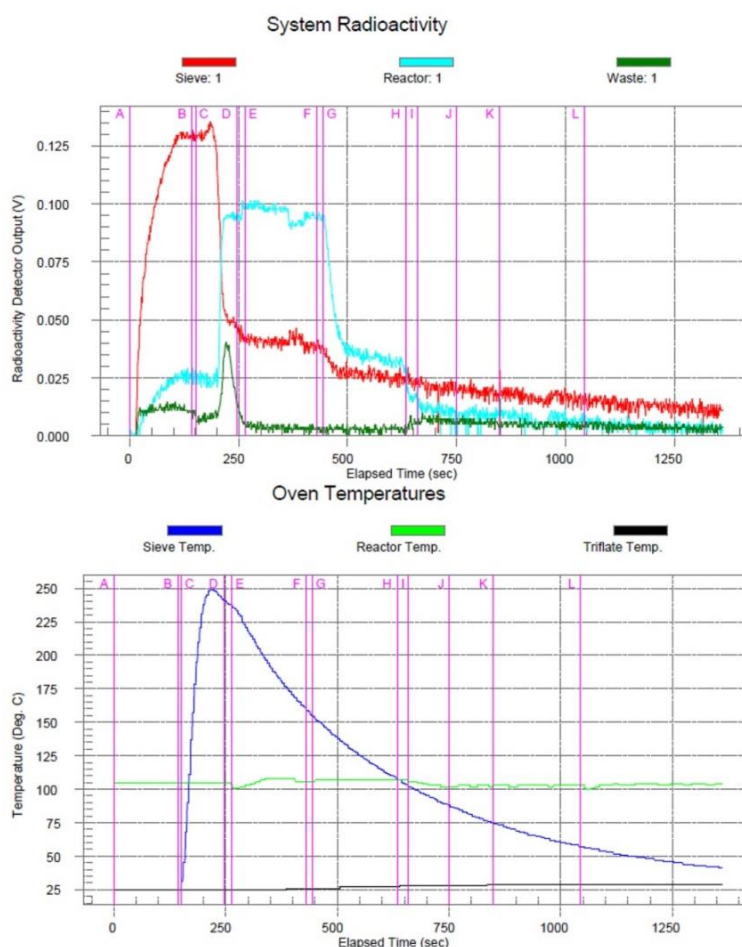
Rysunek 9.3. Formuła redukcji dwutlenku węgla-11 do jodku [^{11}C]-metylu.

Certyfikat analizy kwasu jodowodorowego został załączony jako [Załącznik 5].

Końcową operacją jednostkową tego etapu jest ogrzewanie reaktora i destylacja jodku [^{11}C]-metylu z mieszaniny poreakcyjnej i transport azotem o przepływie 10 ml/min do modułu ReFORM PLUSTM odpowiedzialnego za przeprowadzenie reakcji prekursora z [^{11}C]- CH_3J , a następnie izolację produktu tej reakcji i jego oczyszczenie.

Czas pracy podczas jednej serii produkcyjnej modułu MeI PLUSTM, licząc od rozpoczęcia grzania sit molekularnych do zakończenia destylacji jodku [^{11}C]-metylu, wynosił 11 minut, a wydajność etapu wahała się między 85% a 90%. Zmiany temperatury i aktywności promieniotwórczej etapu były stale monitorowane i automatycznie drukowane przez oprogramowanie sterujące modułem jako część raportu z wytwarzania serii (Rysunek 9.4).

A	Begin CO2 Trapping
B	Sieve Oven On
C	Begin CO2 Release
D	Sieve Oven Off
E	Begin THF
F	Mel Output Opened
G	Begin Mel Distillation
H	End Mel Distillation
I	Start Wash 1
J	Start Wash 2
K	Start Wash 3
L	Start N2 Drying



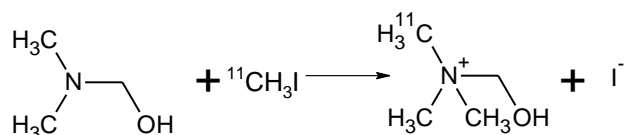
Rysunek 9.4. U góry: zmiany aktywności promieniotwórczej monitorowane na sitach molekularnych (linia czerwona), reaktorze (linia niebieska) oraz zbiorniku na odpady (linia zielona). Na dole: temperatura monitorowana na sitach molekularnych (linia niebieska) oraz bloku grzewczego reaktora (linia zielona) – zrzut ekranu komputera sterującego.

Na Rysunku 9.4. przedstawione są również wykresy monitorowania aktywności promieniotwórczej w butli na odpady. Monitorowanie aktywności promieniotwórczej butli na odpady pozwala dokładnie kontrolować przebieg etapu, choć interwencja operatora nie jest możliwa ze względu na skażenie radiologiczne. Ułatwia to jednak i znacząco skraca czas diagnostyki urządzenia oraz czas jego przygotowania do kolejnej serii produkcyjnej w przypadku niepowodzenia lub wystąpienia awarii w trakcie trwania wytwarzania. Jak wynika z Rysunku 10.2 temperatura pieca reaktora pozostaje niemal stała w trakcie całej operacji. Nie oznacza to bynajmniej, że reaktor jest stale ogrzewany. Gdy grzanie jest potrzebne (jak np. przy konieczności odparowania tetrahydrofuranu czy przy destylacji jodku $[^{11}\text{C}]$ -metylu), piec reaktora jest unoszony, a po zakończonym grzaniu opuszczany. System odczytuje wartości ze wszystkich zainstalowanych w urządzeniu termometrów i radiometrów bez możliwości ich wyłączenia z poziomu oprogramowania, stąd widoczny również wykres temperatury dla

kolumny wypełnionej triflatem srebra (trifluorometanosulfonianem srebra) (czarna linia na rysunku 10.2). Kolumna ta jest wyposażeniem dodatkowym i nie jest zainstalowana w gliwickim module.

Reakcja jodku [^{11}C]-metylu z prekursorem

Oddestylowany z modułu MeI PLUSTM jodek [^{11}C]-metylu transportowany jest strumieniem azotu o stałym przepływie do modułu ReFORM PLUSTM, gdzie w temperaturze pokojowej reaguje natychmiastowo z prekursorem radioznaczników cholinowych jakim jest dimetyloaminoetanol (DMAE). Reakcja przebiega według schematu przedstawionego na Rysunku 9.5. [Rosen et al., 1985]:



Rysunek 9.5. Reakcja metylacji DMAE.

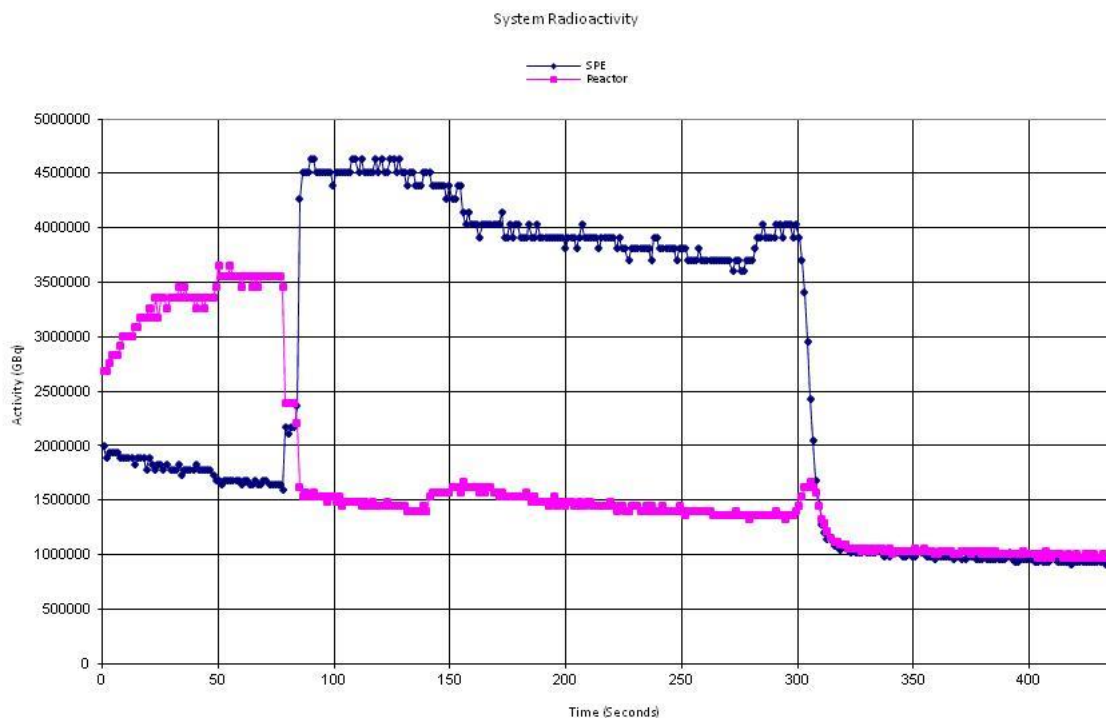
W pierwotnym podejściu dimetyloaminoetanol w fiolce stożkowodennej – zamkniętej gumową septą i zabezpieczonej kapslem aluminiowym – był rozpuszczany w N,N-dimetyloformamidzie (DMF) w stosunku objętościowym 10 μl DMAE : 200 μl DMF [Szydło et al., 2016]. Podejście to pozwalało na otrzymanie produktu z wydajnością 20% przy całkowitym czasie trwania procesu 17 minut. Tak prowadzony proces umożliwia wytworzenie ośmiu dawek radioznacznika gotowego do użycia (względniając rozpad izotopu w trakcie kontroli jakości). Możliwości diagnostyczne Zakładu Diagnostyki PET w gliwickim oddziale CO-I pozwalają na przeprowadzenie badania PET u trzydziestu pacjentów dziennie, dlatego pożądane jest zwiększenie wydajności procesu. Dodatkowym wskazaniem do modyfikacji procesu wytwarzania radioznacznika jest wysoka toksyczność DMF, dlatego choć przy zastosowaniu pierwotnej procedury zawartości DMF mieściły się w limitach farmakopealnych ($c_{\text{DMF}} \leq 880 \mu\text{g/ml}$), pełne zestawienie parametrów jakościowych zostało zebrane w Tabelach 10 oraz 11

w rozdziale 13), opracowano i przetestowano alternatywne metody przygotowania prekursora, które pozwalają na obniżenie poziomu DMF i zwiększenie liczby dawek.

Optymalizacja reakcji z prekursorem

Podstawowa modyfikacja procedury dotyczy zastąpienia DMF, stosowanego jako rozpuszczalnik dla DMAE, etanolem. Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH*) i Farmakopei Europejskiej etanol jest sklasyfikowany jako rozpuszczalnik klasy 3. Rozpuszczalniki klasy 3 są mniej toksyczne niż rozpuszczalniki klasy 2 (do których jest zaliczany DMF), a ryzyko ich stosowania jest znacznie niższe, gdy występują na poziomach akceptowalnych przez wspomniane wyżej regulacje [Grodowska et al., 2010]. Etanol jest uważany za jeden z grupy rozpuszczalników zielonej chemii. Pochodzi ze źródeł naturalnych i ulega biodegradacji do związków nieszkodliwych, często występujących naturalnie w środowisku [Sherman et al., 1998]. Zastosowanie takich samych proporcji DMAE:EtOH jak przy użyciu DMF, tj. 10 µl DMAE : 200 µl EtOH, pozwoliło na uzyskanie wydajności na poziomie zaledwie 10%.

Rysunek 9.6. przedstawia transfer aktywności promieniotwórczej w obrębie modułu ReFORM PLUS™ podczas procesu wytwarzania metodą „mokrą” (tzn. rozpuszczony prekursor znajduje się w fiolce reakcyjnej). W tym przypadku prekursor rozpuszczony był w DMF. Podczas prawidłowo przebiegającego procesu zauważalne jest niemal ilościowe przeniesienie radioaktywności z fiolki na kartridż kationowymienny stosowany w celu izolacji produktu, a następnie jego uwolnienie do fiolki produktu końcowego (FPV, ang Final Product Vial). Proces izolacji i oczyszczania produktu końcowego jest opisany w rozdziale 10.



Rysunek 9.6. Wykres pochodzący z monitorowania transferu radioaktywności w module ReFORM PLUS™ w trakcie procesu wytwarzania metodą „mokrą”. Radioaktywność fiolki reakcyjnej – linia fioletowa, radioaktywność kartridża SPE – linia granatowa – zrzut ekranu komputera sterującego.

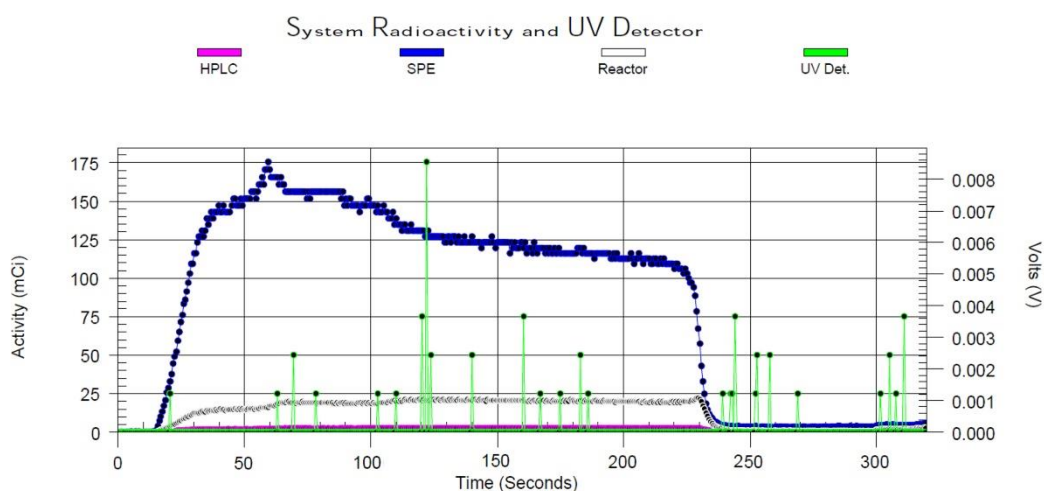
Doświadczenie z produkcją [^{18}F]-fluorocholiny ([^{18}F]FCH) z wykorzystaniem modułu syntezy IBA Synthera® [Slaets et al., 2010] podsunęło pomysł przeniesienia środowiska metylacji do fazy stałej [Pascali et al., 2000]. Dlatego też fiolka reakcyjna została zastąpiona kartridżem ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *Solid Phase Extraction*) Oasis HLB plus firmy Waters [Załącznik 6]. Zmiana ta wymagała dostosowania skryptu sterującego pracą modułu ReFORM PLUS™ w zakresie sekwencji pracy zaworów tak, aby media kierowane były przez kartridż zamiast do fiolki reakcyjnej.

Optymalizacja oczyszczania i konfekcjonowania

Zmiana skryptu wymusiła optymalizację czasu trwania poszczególnych jego kroków, co w efekcie pozwoliło na skrócenie procesu wytwarzania z 17 minut do 12 minut – taki zysk czasowy to blisko 25% czasu półtrwania izotopu. Kartridż HLB został połączony szeregowo z kartridżem kationowymiennym Sep-Pak Accell Plus CM (Waters) [Załącznik 7] poprzedzając go. Na złoża kartridża HLB naniesiona została porcja 0.5 ml DMAE, a następnie kartridż został przedmuchiowany 3 porcjami powietrza, po 10 ml każda, w celu usunięcia nadmiaru prekursora ze złoża kartridża. Pomimo użycia zdecydowanie większej ilości prekursora niż

w opisanych wcześniej metodach „mokrych”, zawartość DMAE pozostała poniżej limitu zalecanego przez monografię farmakopealną [Monografia 2793]. Choć dimetyloaminoetanol nie jest substancją toksyczną, a nawet jest stosowany jako dodatek do produktów spożywczych, jego poziom w radioznaczniku cholinowym musi być limitowany ze względu na konkurencyjny wychwyty względem radioznaczników cholinowych w komórce [Reischl et al., 2004]. Planując przeniesienie środowiska reakcji do fazy stałej, na podstawie procesu wytwarzania [¹⁸F]-fluorocholiny, gdzie wydajność mieści się w zakresie 30% - 35%, a czas syntezy zajmuje około 60 minut, założyłem wzrost wydajności do maksymalnie 45%. Oczekiwałem, że wprowadzenie modyfikacji polegających na skróceniu czasu procesu o ¼ wartości czasu półtrwania węgla-11 spowoduje wzrost wydajności o około 10%. Dodatkowy zysk wydajności miał pochodzić z modyfikacji polegającej na skierowaniu środowiska reakcji do fazy stałej dzięki unieruchomieniu prekursora na złożu kartridża SPE. Miało to zwiększyć kontakt między prekursorem a przepływającym przez kartridż jodkiem [¹¹C]-metylu, czego skutkiem było zwiększenie stopnia przereagowania dimetyloaminoetanolu. Wprowadzenie powyższych modyfikacji pozwoliło na otrzymanie 68% wydajności.

Rysunek 9.7. przedstawia transfer aktywności promieniotwórczej w obrębie modułu ReFORM PLUS™ podczas procesu wytwarzania metodą „suchą”, gdzie środowisko reakcji przeniesione zostało na kartridż SPE. Zauważalny wzrost promieniowania na detektorze przy fiole reakcyjnej pochodzi od kartridży SPE, które znajdują się zaledwie kilka centymetrów niżej.



Rysunek 9.7. Wykres monitorowania transferu radioaktywności w module ReFORM PLUS™ w trakcie procesu wytwarzania metodą „suchą”. Radioaktywność zestawu kartridży SPE przedstawiona jest kolorem granatowym – zrzut ekranu komputera sterującego.

Podczas całego procesu, zarówno w metodzie „mokrej”, jak i „suchej” zauważalny jest nieznaczny spadek radioaktywności wynikający z rozpadu izotopu oraz usunięcia z układu nieprzereagowanego jodku [^{11}C]-metylu. Zaburzenia w przebiegu wykresów przedstawionych na rysunkach 9.6. oraz 9.7. mogą być spowodowane zanieczyszczeniem jednorazowego zestawu drenów wykorzystywanych przez moduł (potocznie nazywanych kitami) lub jego nieszczelnościami.

Podczas przygotowania modułu ReFORM PLUSTM do pracy ważne jest dokładne sprawdzenie ustawienia zaworów kitu tak, aby mieć pewność, że żaden z przygotowanych odczynników nie przedostanie się do kitu przed transferem [^{11}C]CH₃J z modułu MeI PLUSTM. Z powodu wysokiej reaktywności jodku metylu może bowiem dojść do jego reakcji z odczynnikami pomocniczymi, które znalazły się w drenach z powodu niedokładnego przygotowania kitu do pracy. Ze względu na radioaktywność znajdującą się w komorze izolatora, ewentualne powtórzenie szarży produkcyjnej jest możliwe dopiero po kilku godzinach lub nawet dnia następnego, dlatego zalecane jest dwukrotne sprawdzenie czystości drenów i ustawienia zaworów przez dwie osoby, o ile jest taka możliwość. Moduł MeI PLUSTM nie wymaga od operatora specjalnych czynności między seriami produkcyjnymi (skrypt syntezy jodku [^{11}C]-metylu zawiera w swojej sekwencji końcowe czyszczenie układu modułu), natomiast moduł ReFORM PLUSTM, ze względu na znacznie szersze spektrum jego funkcji, nie daje możliwości zautomatyzowania czynności wstępnych lub końcowych, co oznacza przerzucenie ich na operatora.

Oczyszczanie i konfekcjonowanie

W przypadku obu metod wykorzystujących fiolkę reakcyjną proces wyizolowania produktu z mieszaniny poreakcyjnej, jego oczyszczenie i konfekcjonowanie w fiołce FPV jest procedurą czteroetapową prowadzoną przez moduł ReFORM PLUSTM.

W pierwszym kroku, do fiołki reakcyjnej dodawany jest 1 ml etanolu 99.8% o czystość zgodnej z wymaganiami farmakopealnymi (w dalszej części pracy może być stosowane określenie „czystość PhEur”), co ma na celu homogenizację mieszaniny (*Świadectwo kontroli jakości* dostępne jako [Załącznik 8]). Następnie cała zawartość fiołki reakcyjnej przenoszona jest objętościowo na kartridż SPE wypełniony złożem kationowymiennym Sep-Pack Accell Plus CM firmy Waters [Shao et al., 2011]. [^{11}C]-cholina, jako związek jonowy, posiadający ładunek dodatni na atomie azotu, zostaje wychwycona przez kolumnę SPE, podczas gdy pozostałe

składniki mieszaniny poreakcyjnej zostają usunięte do dedykowanego na odpady poreakcyjne naczynia.

Strumień powietrza sprężonego przez pompę będącą podzespołem modułu ReFORM PLUS™ nie jest wystarczająco wydajny, aby skutecznie usunąć wszystkie płyny, które pozostają w objętości kartridża w skutek adhezji. Dlatego kartridż Accell Plus CM jest dodatkowo przemywany dwiema pięciomililitrowymi porcjami wody [Załącznik 9].

Wyizolowana i oczyszczona w ten sposób [¹¹C]-cholina zostaje wymyta z kartridża SPE do fiolki FPV przy użyciu 10 ml 0.9% roztworu soli fizjologicznej (0.9% NaCl *pro injectione*) [Załącznik 10]. Kation sodowy ulega wymianie na złożu kationowymiennym kartridża SPE uwalniając [¹¹C]-cholinę, która w postaci roztworu soli chlorkowej zbierana jest w jałowej, apirogennej fiolce zaopatrzonej w igłę odpowietrzającą z filtrem wentylowanym Millex GS (Waters) o średnicy porów 0.22 μm [Załącznik 11], co pozwala zatrzymać na filtrze również najmniejsze nanobakterie [Schulz et al., 2001]. W celu zapewnienia jałowości produktu, również linia transferowa między modułem ReFORM PLUS™ a fiolką została zaopatrzona, tuż przy wlocie do fiolki, w filtr sterylizacyjny Millex GV o średnicy porów 0.22 μm (Waters) [Załącznik 12].

W przypadku metylacji DMAE w fazie stałej, etanol przepływa bezpośrednio przez kartridż HLB, wmywając z niego zanieczyszczenia rozpuszczalne w nisko i średnio polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Następnie kartridż HLB płukany jest wodą, analogicznie do procedury opisanej powyżej, w celu wymycia z niego związków jonowych i innych rozpuszczalnych w wodzie, w tym [¹¹C]-choliny. Substancje niepożądane wmywane są do naczynia na odpady, podczas gdy [¹¹C]-cholina zatrzymana zostaje na żywicy kationowymiennej kartridża Sep-Pak Accell Plus CM połączonego szeregowo z kartridżem HLB. Skąd produkt uwalniany jest roztworem soli fizjologicznej, w podobny sposób jak dla metod „mokrych”.

Moje pierwsze próby wytworzenia [¹¹C]-choliny prowadzone były z zastosowaniem kartridża SCX Maxi-Clean firmy Alltech w miejsce Sep-Pak Accell Plus CM. Próby te kończyły się niepowodzeniem, ponieważ powinowactwo złoża kartridża SCX Maxi-Clean z [¹¹C]-cholimą było zbyt silne, co uniemożliwiało jej uwolnienie przy użyciu roztworu soli fizjologicznej.

10. Kontrola jakości

Zarówno polska, jak i europejska Farmakopea nie zawierają monografii opisującej wytwarzanie oraz kontrolę jakości [^{11}C]-choliny. Choć niedawno opublikowana została monografia farmakopealna opisująca kontrolę jakości [^{18}F]-fluorocholiny [PhEurFCH], to jednak różnice między radioznacznikami, [^{18}F]-fluorocholiną a [^{11}C]-choliną, nie pozwalają na wykorzystanie opisanych tam procedur w kontroli jakości [^{11}C]-choliny. Jedynym wyjątkiem jest oznaczanie zawartości pozostałości dimetyloaminoetanolu.

Konstruując system QA/QC skorzystałem jednak z wytycznych i zaleceń ogólnych, zawartych w następujących rozdziałach farmakopealnych [PhEur]: *Potencjometryczne oznaczanie pH* (2.2.3), *Chromatografia gazowa* (2.2.28), *Identyfikacja i kontrola pozostałości rozpuszczalników* (2.4. 24), *Sterylność* (2.6.1) i *endotoksyny bakteryjne* (2.6.14).

Procedury kontroli jakości zostały opisane w kolejnych punktach, omawiających oznaczanie czystości chemicznej i czystości radiochemicznej, identyfikację radionuklidową oraz oznaczanie czystości mikrobiologicznej.

Czystość chemiczna i radiochemiczna

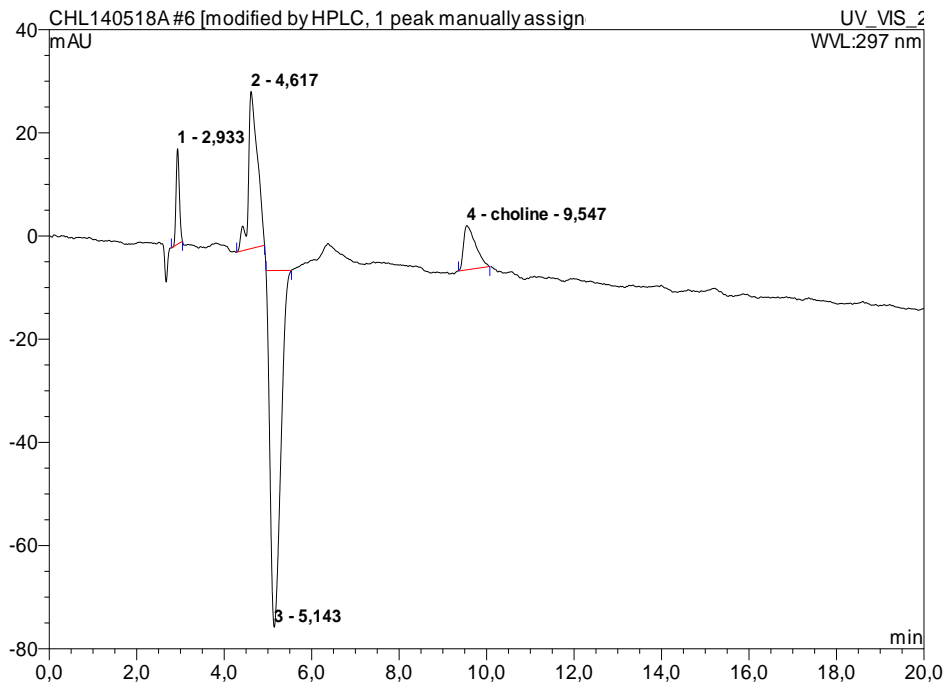
Czystość chemiczna radiofarmaceutyków odnosi się do ilości niepożądanych substancji chemicznych. Zanieczyszczenia chemiczne obejmują wszystkie substancje nieradioaktywne, które mogą wpływać negatywnie na proces wychwytu znacznika w organizmie lub bezpośrednio powodować niekorzystne skutki fizjologiczne [Schwarz et al., 2004]. Czystość radiochemiczna jest definiowana jako procent obecnej pożądanej postaci chemicznej wykazującej aktywność promieniotwórczą w jednostce aktywności promieniotwórczej produktu [Mahoney et al., 1998]. To kryterium czystości produktu jest kluczowym zagadnieniem w diagnostycznej interpretacji obrazu PET, zwłaszcza w przypadku krótkotrwałych radiofarmaceutyków – niewypełnienie warunku czystość radiochemicznej może prowadzić do nieswoistego wychwytu radiofarmaceutycznego, a to z kolei do napromieniowania krytycznych narządów i fałszywej diagnozy.

Czystość chemiczna i radiochemiczna badane były przy użyciu aparatu UHPLC DIONEX Ultimate 3000 z detektorami UV-VIS DAD, detektora wyładowań koronowych Esa Corona

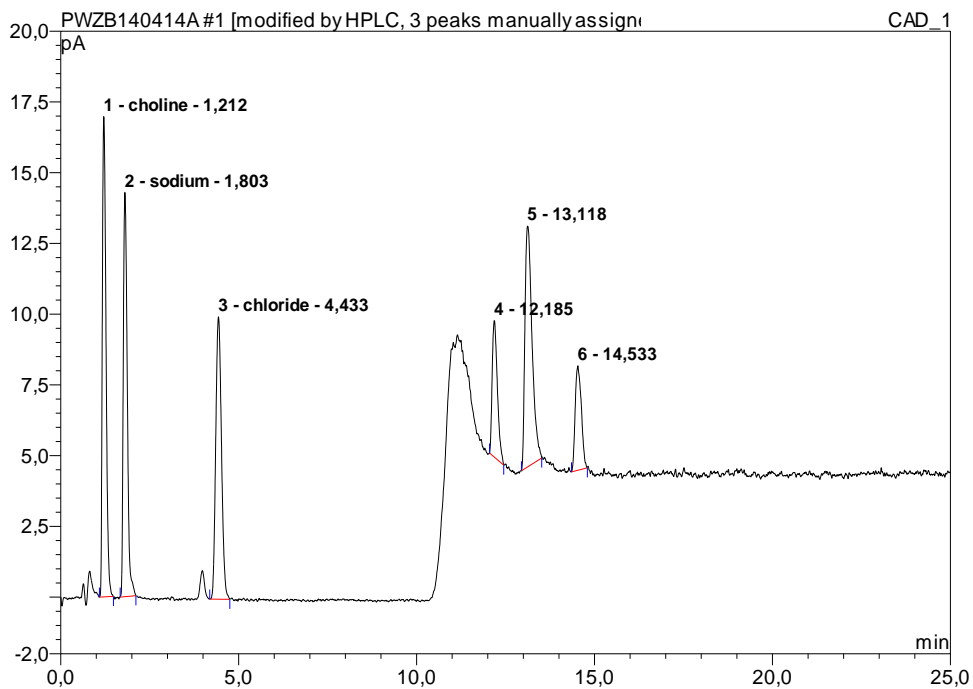
CAD (ang. *Charged Aerosol Detector* – detektor naładowanego aerozolu) oraz detektora scyntylicyjnego Bioscan Count Flow.

Linia kontroli jakości dla [^{11}C]-choliny została oparta na dwu metodach chromatograficznych służących do oznaczania czystości chemicznej i radiochemicznej. Pierwsza, opisana przez [Boschi et al., 2009] wykorzystuje kolumnę C18 RP ($\mu\text{Bondapak}^{\text{®}}$ C18; 3.9 x 300 mm firmy Waters), a fazą ruchomą jest mieszanina 3 mM 2-naftalenosulfonianu sodu i 1mM kwasu ortofosforowego. Ze względu na niedostępność rynkową kwasu 2-naftaleosulfonowego o odpowiednio wysokim stopniu czystości zastosowałem sól sodową. Faza ruchoma pracuje przy przepływie 1 ml/min. Druga metoda wykorzystuje kombinowaną, trójmodułową kolumnę Acclaim $^{\text{®}}$ Trinity $^{\text{TM}}$ [Załącznik 13] umożliwiającą rozdział składników kationowych, anionowych i obojętnych ładunkiem w trakcie jednej analizy [Crafts et al., 2009]. W kolumnie Acclaim $^{\text{®}}$ Trinity $^{\text{TM}}$ P1 (3.0 x 50 mm firmy Dionex) zastosowano jako fazy ruchome: roztwór 200 mM octanu amonu (pH=4) (faza A), wodę dejonizowaną (faza B) i acetonitryl (faza C). Fazy ruchome pracują przy natężeniu przepływu wynoszącym 0.7 ml/min w gradiencie: 5% (A), 35% (B) i 60% (C) w zakresie czasu od 0 do 10 minut, a następnie 40% (B) i 60% (C) między 10. a 25. minutą.

W obu metodach detekcja radiochemiczna odbywa się za pomocą detektora scyntylicyjnego wyposażonego w kryształ CsJ (Bioscan). W przypadku metody wykorzystującej mieszaninę roztworów 2-naftalenosulfonianu sodu i H_3PO_4 detekcja czystości chemicznej rejestrowana jest przy użyciu detektora UV-VIS przy długości fali 297 nm. Metoda gradientowa prowadzi detekcję chemiczną przy użyciu detektora wyładowań koronowych (ang. *charged aerosol detector*, CAD). Wybór metody leży po stronie Wytwórni (zgodnie z ustawą *Prawo Farmaceutyczne* Wytwornią jest podmiot wytwarzający radiofarmaceutyk). Pierwsza z metod rejestruje sygnał choliny przy czasie retencji 9.5 minuty, o wysokiej granicy wykrywalności (Rysunek 10.1). Z kolei drugą z metod cechuje niska rozdzielczość – sygnał choliny jest rejestrowany przy czasie retencji 1.2 minuty, a sygnał jonów sodowych, pochodzących od soli fizjologicznej (0.9% NaCl), będącej składnikiem produktu, już przy czasie retencji 1.8 minuty. Relatywnie niska rozdzielczość jest jednak rekompensowana dziesięciokrotnie lepszą wykrywalnością (Rysunek 10.2).



Rysunek 10.1. Chromatogram chlorku choliny o stężeniu 0.4 mg/ml.



Rysunek 10.2. Chromatogram chlorku choliny o stężeniu 20 µg/ml.

Identyfikacja radionuklidowa

Identyfikacja radionuklidu została przeprowadzona w oparciu o cechy charakteryzujące jądro promieniotwórcze, takie jak energia promieniowania [Hine, 1967] oraz okres półtrwania radionuklidu.

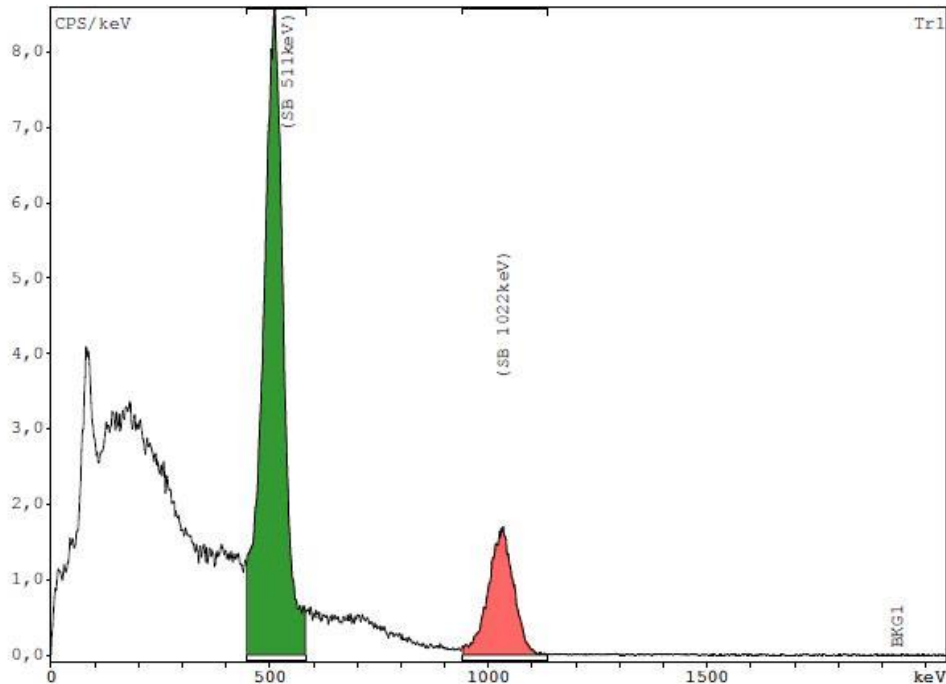
Dla izotopu węgla-11 pasmem energetycznym o największej intensywności, więc i najłatwiej identyfikowalnym, jest pasmo 511 keV pochodzące od anihilacji pozytonów. Natomiast przewidywany czas półtrwania izotopu węgla-11 wynosi 20.4 minuty [Tabela radionuklidów PhEur]. Charakterystykę rozpadu węgla-11 przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka rozpadu jądra węgla-11.

Izotop macierzysty	$T_{1/2}$	Rodzaj rozpadu	E_{γ}	Intensywność względna*	E_{max}	Izotop pochodny
$^{11}_6C$	20.38 min	β^+	511 keV	99.8%	960.2 keV	$^{11}_5B$

* Intensywność względna oznacza jakiemu procentowi rozpadów danego izotopu (beta, alfa itp.) towarzyszy emisja promieniowania gamma o podanej energii [Conti et al., 2016].

Analizę widma energetycznego promieniowania gamma prowadzono za pomocą analizatora wielokanałowego Raytest MUCHA zaopatrzonego w kryształ scyntylacyjny z NaJ o rozmiarze 3”×3” zastosowany jako detektor promieniowania. Widmo charakteryzuje się dwoma sygnałami typowymi dla izotopów, które ulegają rozpadowi β^+ : sygnał o energii 511 keV pochodzi od fotonów powstałych w skutek anihilacji, a sygnał o energii 1022 keV to „sygnał sumaryczny” wygenerowany przez losowe zdarzenie, jakim jest interakcja z kryształem scyntylatora dwóch fotonów anihilacyjnych w jednym czasie. Rysunek 10.3. przedstawia widmo promieniowania gamma dla próbki [^{11}C]-choliny.



Rysunek 10.3. Widmo promieniowania gamma izotopu węgla-11.

Do wyznaczenia czasu półtrwania izotopu $T_{1/2}$ wykorzystano aktywnościomierz z komorą jonizacyjną ISOMED 1010 skalibrowany na izotop węgla-11. Pomiar aktywności powtarzano piętnastokrotnie, co minutę. Czas $T_{1/2}$ obliczono z równania [Serway et al., 2008]:

$$T_{1/2} = -\ln 2 \left(\frac{dt}{\ln \left(\frac{A_1}{A_0} \right)} \right) \quad (10)$$

gdzie:

$T_{1/2}$ – czas półtrwania wytwarzanego izotopu [min],

dt – czas między pomiarami [min],

A_1 – aktywność końcowa (po zakończeniu cyklu pomiarów),

A_0 – aktywność początkowa (w momencie rozpoczęcia pomiaru)

Czystość mikrobiologiczna

Badanie czystości mikrobiologicznej ma na celu określenie ogólnej ilości flory tlenowej: bakterii i grzybów oraz wykluczenie lub potwierdzenie obecności wybranych drobnoustrojów, a odpowiednie wymagania dla danej grupy produktów są zdefiniowane w Farmakopei. W przypadku preparatu radiofarmaceutycznego badana jest jego jałowość oraz zawartość

endotoksyn bakteryjnych (liposacharydów będących składnikami błon komórkowych bakterii Gram-ujemnych) [Rietschel et al., 1994]. Oznaczenia jałowości produktu są zlecane do akredytowanego laboratorium zewnętrznego. Parametr jałowości preparatu do iniekcji jest bardzo ważny z punktu widzenia bezpieczeństwa pacjenta, jednak ze względu na czas inkubacji prób mikrobiologicznych, niemożliwy do potwierdzenia przed medycznym użyciem radioznacznika, gdyż cała procedura trwa około miesiąca (monitoring mikrobiologiczny środowiska wytwarzania na płytkach sedymentacyjnych wymaga minimum 6 dni, natomiast wyniki jałowości preparatu radiofarmaceutycznego są odsyłane przez laboratorium mikrobiologiczne zazwyczaj po trzech tygodniach). Dlatego w przypadku znaczników PET ważna jest prewencja w postaci okresowych badań higienicznych sprzętu, pomieszczeń oraz personelu, bieżącego monitoringu czystości pomieszczeń i urządzeń, zapewnienia klas czystości izolatora wykorzystywanego do rozdozowania, jak i utrzymania klas czystości pomieszczeń produkcyjnych zgodnie z zaleceniami stawianymi przez rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie [Źródło 5].

Metodologia oznaczania endotoksyn jest przedstawiona w monografii dotyczącej [¹⁸F]-fludeoksyglukozy [PhEurFDG] i jako taka została zastosowana do [¹¹C]-choliny.

Jako dopuszczalny poziom endotoksyn bakteryjnych przyjąłem limit przedstawiony w monografii 1325 Farmakopei Europejskiej [PhEurFDG] wynoszący ≤ 175 EU/dawkę przy maksymalnej dawce objętościowej 10 ml na pacjenta ($\leq 17,5$ EU/ml). Zawartość endotoksyn bakteryjnych oznaczana była metodą kinetyczną chromogenną LAL (ang. *Limulus Amebocyte Lysate* test, LAL) przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Endosafe® PTS™ firmy Charles River. Odczynnikiem stosowanym w teście LAL jest lizat amebocytów (komórek krwi) skrzypłocza, jednego z przedstawicieli stawonogów (*Arthropoda*) należącego do gromady staroraków (*Merostomata*) w podtypie szczękoczułkowców (*Chelicerata*) o nazwie łacińskiej *Limulus polyphemus* [Cooper et al., 2008], co jest zgodne z wytycznymi farmakopealnymi dla tego oznaczenia [PhEurEndotoksyny]. Test ten polega na jednoczesnym pomiarze absorbancji światła widzialnego oraz czasu wybarwienia roztworu metodami spektrofotometrii UV-VIS i określeniu zależności między absorbancją a stężeniem analitu, co pozwala wyznaczyć kinetykę reakcji enzymatycznej lipopolisacharydów z lizatem amebocytozy skrzypłocza przebiegającej zgodnie z równaniem Michaelisa-Mentena [Styer et al., 2009]:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (11)$$

gdzie:

V – szybkość reakcji enzymatycznej,

V_{max} – maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej,

$[S]$ – stężenie substratu,

K_m – stała Michaelisa,

Jak wynika z równania (11), przy stałym stężeniu enzymu (odczynnik LAL) na szybkość reakcji ma wpływ stężenie substratu.

Dzięki powstawaniu barwnego produktu reakcji endotoksyn z odczynnikiem LAL – endotoksyny bakteryjne w reakcji z lizatem amebocytozy skrzyplacza dają bowiem roztwór o jasnożółtym kolorze – szybkość reakcji w czasie pomiaru jest możliwa do monitorowania. Jednorazowa kasetka zawiera cztery kanały pomiarowe: dwa do pomiaru próbki oraz dwa zawierające referencyjną ilość lipopolisacharydów, odpowiednią dla zakresu pomiarowego kasetki. Każdy z kanałów kasetki stanowi celę spektrofotometrii UV-VIS, a pomiar wykorzystuje zależność między absorbancją roztworu a stężeniem powstałego produktu (prawo absorpcji, prawo Lamberta) [Silverstein et al., 2007]. Osłabienie natężenia wiązki światła monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o znanej grubości wyraża się wzorem (12):

$$I = I_0 e^{-kbc} \quad (12)$$

Stąd (13), (14):

$$\ln \frac{I_0}{I} = A \quad (13)$$

$$A = kbc \quad (14)$$

gdzie:

I_0 – natężenie wiązki światła monochromatycznego padającego na celę pomiarową,

I – natężenie światła po przejściu przez celę,

A – absorbancja (zdolność ośrodka do pochłaniania światła),

k – współczynnik absorpcji,

c – stężenie absorbentu,

Zależność absorbancji A od stężenia ma postać funkcji liniowej, a tym samym możliwe jest wyznaczenie krzywej kalibracyjnej. W oznaczeniach zawartości endotoksyn bakteryjnych korzystałem z dostępnych handlowo kaset (certyfikat analizy dostępny jest jako Załącznik 14) o zakresie pomiarowym 0.1 – 10 EU/ml. Ponieważ matryca gotowego produktu farmaceutycznego może wpływać na wynik pomiaru dając fałszywe wyniki, metodologia [PhEurEndotoksyny] zakłada rozcieńczenie próbki. Ważne, żeby do tego celu użyć wody niezawierającej endotoksyn (Farmakopea opisuje taką wodę jako wodę BET (*ang. Bacterial Endotoxins Test* – test endotoksyn bakteryjnych). W rozdziale 2.6.14. Farmakopei Europejskiej został zamieszczony wzór (15) do obliczenia maksymalnego dopuszczalnego rozcieńczenia (*ang. MVD – Maximum Valid Dilution*) [PhEurEndotoksyny]:

$$MVD = \frac{\text{limit endotoksyn} \times \text{stężenie próby badanej}}{\lambda} \quad (15)$$

gdzie:

λ – stężenie odpowiadające najniższej wartości zakresu pomiarowego kasety,

stężenie próby badanej – ma na celu uwzględnienie rozcieńczeń podczas przygotowania próby innych niż rozcieńczenie wodą BET.

Na drodze prób i błędów, zaczynając od analizy nierozcieńczonego produktu poprzez stopniowy wzrost rozcieńczenia, określiłem rozcieńczenie robocze jako stukrotne, co spowodowało zwiększenie dolnego limitu oznaczalności kasety do 10 EU/ml. Próby o mniejszym rozcieńczeniu dawały wyniki spełniające wyżej założone kryterium akceptacji, lecz powodowały negatywne wyniki testu własnego aparatu, przez co wynik nie mógł być uznany za wiarygodny.

Dla wszystkich wytworzonych serii otrzymałem wyniki zawartości endotoksyn bakteryjnych mieszczące się poniżej dolnej granicy oznaczalności (< 10 EU/ml).

Oznaczanie pozostałości rozpuszczalników

Reszkowe poziomy rozpuszczalników pozostałych po syntezie zostały oznaczone metodami chromatografii gazowej zgodnie z metodologią farmakopealną [PhEurResSolv]. Jednak sposoby wyznaczenia niektórych parametrów, takich jak współczynnik podziału (*ang. split ratio*) i całkowite natężenie przepływu gazu nośnego zostały zmodyfikowane metodą prób

i błędów, aby dostosować je do sprzętu używanego w analizie oraz do jednoczesnego pomiaru nieprzereagowanych substratów w jednym cyklu analitycznym. **Ta modyfikacja jest istotna z punktu widzenia kryterium czasochłonności procedury, co jest niezwykle ważnego w przypadku krótkożyciowych radionuklidów.**

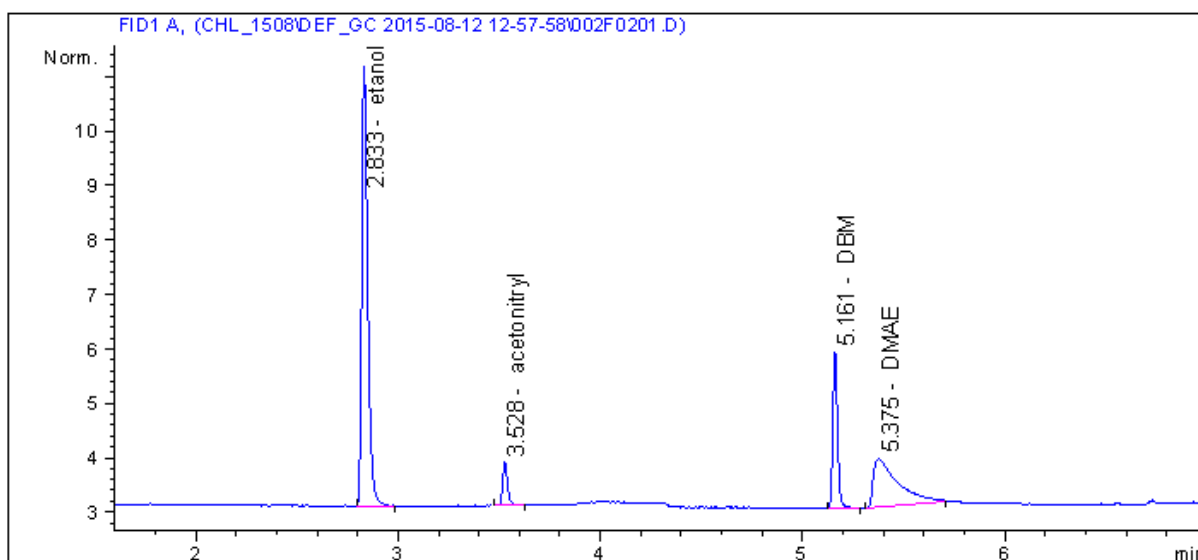
Metoda chromatografii gazowej została uwspólniona tak, by była użyteczna nie tylko podczas kontroli jakości [^{11}C]-choliny, ale też [^{18}F]-fluorocholiny. Ponieważ w czasie prac nad niniejszą dysertacją opublikowana została monografia farmakopealna dotycząca [^{18}F]-fluorocholiny [PhEurFCH], metodologie analizy pozostałości nieprzereagowanych DMAE oraz DBM potraktowane zostały jako punkt wyjścia dla procedur, które mogłyby być stosowane dla obu związków wymiennie.

Oznaczanie DMAE i DBM zgodnie z wymienioną wyżej monografią [PhEurFCH] wymaga użycia różnych kolumn i zastosowania innego gazu nośnego niż te będące w stałym użyciu w naszym laboratorium. Ze względu na istotną rolę jaką odgrywa czas w kontroli jakości radiofarmaceutyków, zmiany kolumny i przypięć gazów w ogóle nie wchodzi w grę, natomiast wyposażenie laboratorium w kolejny aparat jest kwestią kosztowną, gdyż wraz z chromatografem gazowym niezbędne jest doprowadzenie instalacji zasilających urządzenie w gazy (gaz nośny oraz wodór i mieszanka powietrza syntetycznego $\text{N}_2:\text{O}_2$ (80%:20%; v:v). Co więcej, podwojenie wyposażenia sprzętowego oznacza podwojenie kosztów serwisów oraz pracy personelu związanej z utrzymaniem chromatografu w ruchu, jego okresowymi testami i kalibracjami. Metoda łącząca w sobie użyteczność oznaczania zawartości pozostałych rozpuszczalników oraz nieprzereagowanych DMAE i DBM została więc opracowana i opublikowana jeszcze przed publikacją wspomnianej monografii dotyczącej [^{18}F]-fluorocholiny [Szydło et al., 2016].

Chromatograf gazowy Agilent 6850 z autosamplerem został wyposażony w kolumnę chromatograficzną długości 30 metrów i średnicy wewnętrznej 0.32 mm HP-Innowax wypełnioną filmem glikolu polietylenowego o grubości 0.50 μm [Załącznik 15]. W wyniku adjustacji parametrów pracy chromatografu ustalone zostały: objętość nastrzyku (wynosząca 1 μl) i współczynnik podziału (ang. *split*) w stosunku 5.0:1 (tzn. jedna część na pięć nastrzykniętej próby zostaje skierowana na kolumnę) przy całkowitym przepływie helu o czystości 5.0 jako gazu nośnego wynoszącym 16 ml/min. Kolumna w trakcie rozdziału związków zawartych w kalibracji była termostatowana w temperaturze 50°C, ze wzrostem do 250°C między 6 a 16 minutą w celu oczyszczania kolumny i zabezpieczenia przed

kontaminacją próbek analizowanych jako następne. Detekcja prowadzona była przy użyciu detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID (ang. *Flame Ionization Detector*).

Chromatogram roztworu kalibracyjnego o stężeniach 5000 $\mu\text{l/ml}$ EtOH, 410 $\mu\text{l/ml}$ MeCN, 240 $\mu\text{l/ml}$ DBM oraz 2000 $\mu\text{l/ml}$ DMAE, przedstawiony został na Rysunku 10.4. Zauważalna jest zdecydowanie duża szerokość połówkowa sygnału pochodzącego od DMAE i zachwiana symetria tego sygnału, jednak rutynowa praca z metodą, poprzedzona pomiarem roztworu referencyjnego, potwierdziła wiarygodność analizy ilościowej DMAE. Próby zmiany kształtu sygnału powodowały nakładanie się sygnału DMAE i DBM lub przesunięcie czasu retencji na czas wygrzewania kolumny, a tym samym nakładanie się sygnału DMAE z sygnałami pochodzącymi od niezidentyfikowanych związków uwalnianych z kolumny w czasie jej oczyszczania.



Rysunek 10.4. Chromatogram roztworu kalibracyjnego GC.

Czystość radionuklidowa

Spektroskopię gamma [Zappata et al., 2003] próbki produktu końcowego znakowanego węglem-11 w celu pomiaru czystości radionuklidowej przeprowadzono przy użyciu spektrometru gamma Canberra-Packard wyposażonego w detektor germanowy o wysokiej czystości (ang. *High Purity Germanium*, HPGe). Pomiary spektralne wykonano dwa dni po syntezie ze względu na bardzo dużą intensywność linii energetycznej 511 keV (identyfikacja linii jest możliwa po wygaszeniu głównego izotopu). Wadą takiego podejścia jest brak

możliwości oznaczenia zawartości nuklidów o czasie półtrwania krótszym, niż okres półtrwania izotopu wchodzącego w skład cząsteczki badanego radioznacznika.

Czas rejestracji widma wynosił 180 minut, aby uzyskać wysoki stosunek sygnału do szumu (S/N), co przekłada się na wiarygodność interpretacji widma. Objętość próbki wynosiła co najmniej 1 ml. Widma analizowano za pomocą oprogramowania Genie 2000 – jest to pakiet, w którym zaprogramowana jest zarówno kalibracja energetyczna, pozwalająca jednoznacznie identyfikować sygnały i przyporządkować zestawy pasm energetycznych konkretnym nuklidom (na podstawie stosunku ich intensywności), jak i kalibracja wydajnościowa, pozwalająca na przeliczenie liczby zliczeń na wartość aktywności promieniotwórczej na czas zadany przez operatora. Dzięki temu wynik podany na raporcie [Załącznik 16] wskazuje wartość aktywności każdego z zidentyfikowanych nuklidów, umownie - na czas pomiaru aktywności promieniotwórczej analizowanej próby.

Rysunek 10.5. prezentuje widmo gamma produktu końcowego syntezy. Dysponując wartościami aktywności promieniotwórczej zanieczyszczeń radionuklidowych oraz całkowitej aktywności promieniotwórczej analizowanej próby na czas jej przygotowania można określić procentową zawartość zanieczyszczeń radionuklidowych w produkcie korzystając ze wzoru:

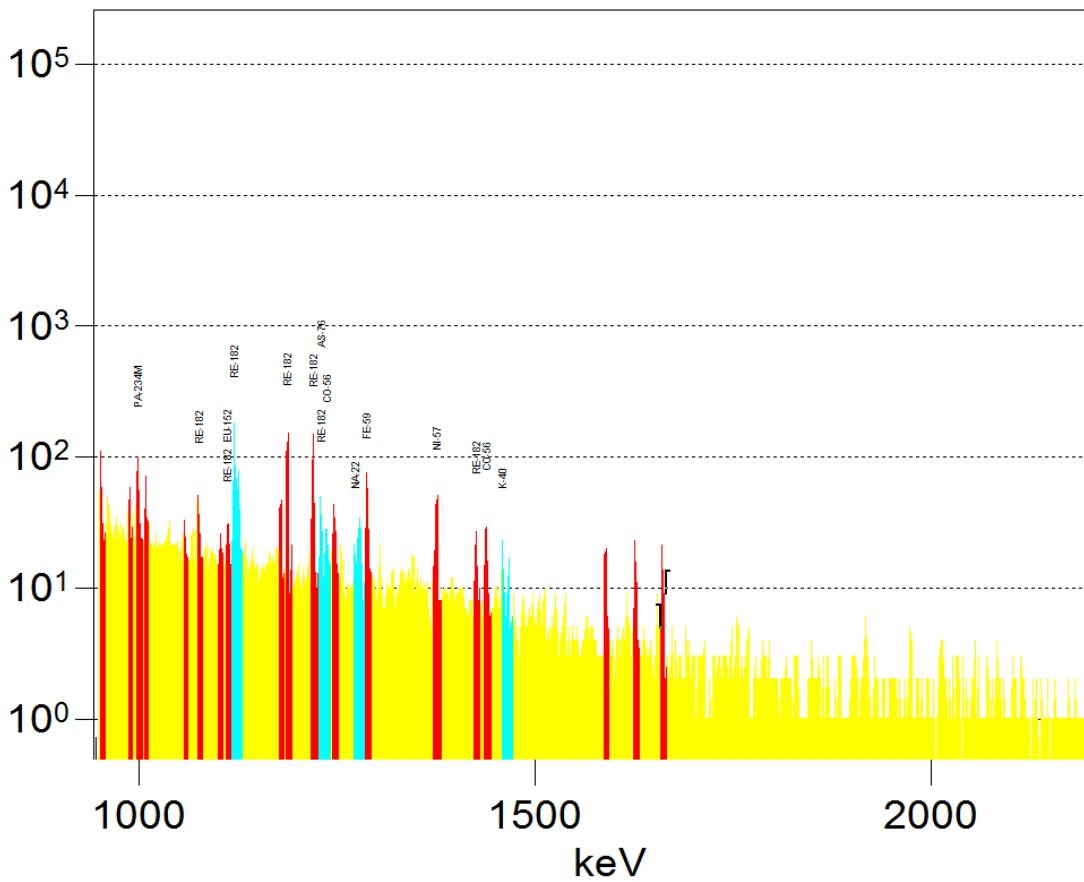
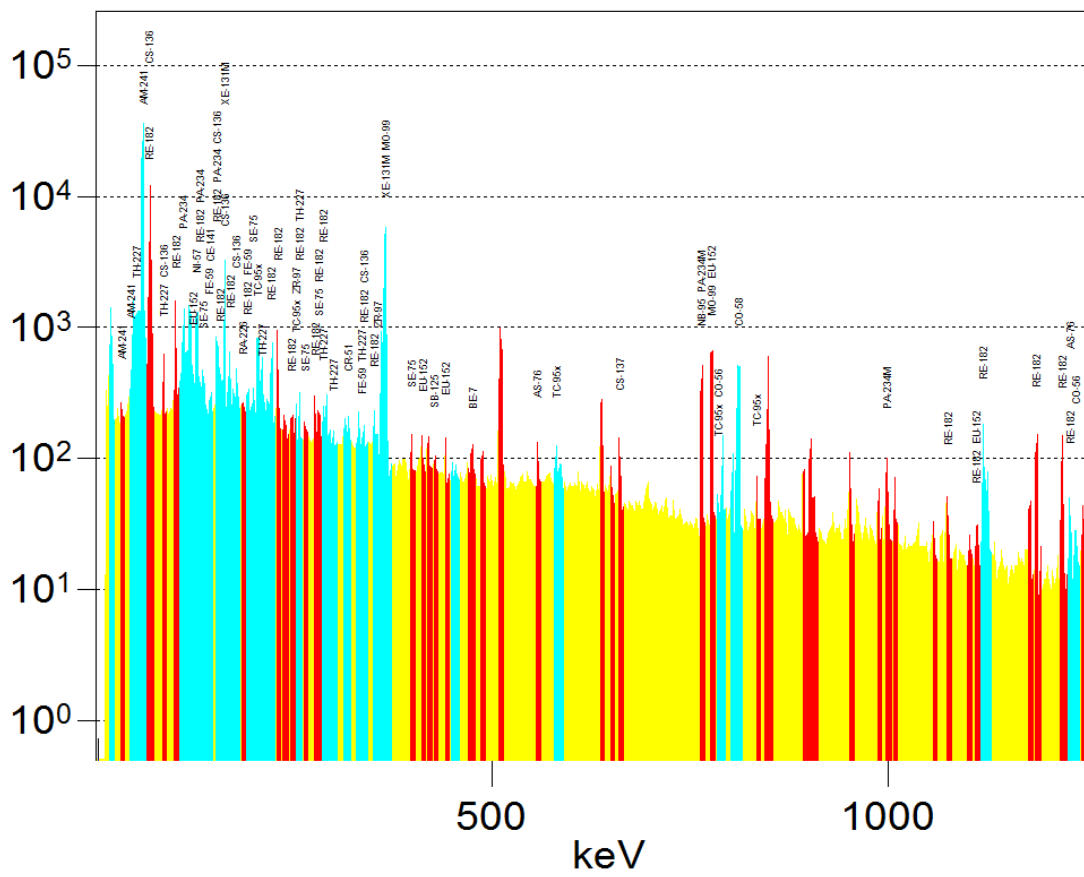
$$c_{\sum Axi} = \frac{A_{\sum xi}}{A_0 \times 10^6} \times 100\% \quad (16)$$

gdzie:

$c_{\sum Axi}$ – zawartość zanieczyszczeń radionuklidowych,

$A_{\sum Axi}$ – aktywność zanieczyszczeń radionuklidowych [Bq] przeliczona na czas pomiaru próby,

A_0 – całkowita aktywność badanej próby na czas jej pomiaru [MBq].



Rysunek 10.5. Widmo gamma wygaszonej próbki $[^{13}\text{C}]$ -choliny.

11. Wyniki

Wyniki – wytwarzanie radioizotopu $[^{11}\text{C}]$ -choliny

Najszybszy wzrost aktywności węgla-11 wytwarzanego w tarczy cyklotronu miał miejsce w pierwszej minucie napromieniowania. Podczas pierwszych testów z wytworzeniem węgla-11 (marzec 2013 roku) otrzymywałem do 2 GBq tego izotopu w czasie napromieniania poniżej dwóch minut. Dane te nie zostały wcześniej opublikowane. Nasycenie tarczy uzyskano po około dwóch godzinach, przy aktywności promieniotwórczej węgla-11 wynoszącej blisko 110 GBq. Po przekroczeniu punktu nasycenia tarczy następuje spadek aktywności. Wynika to z nasycenia materiału tarczowego i procesów rozpadu węgla-11. Proces rozpadu węgla-11 nie umożliwia, tak jak w przypadku fluoru-18, utrzymania w tarczy cyklotronu równowagi między liczbą jąder ulegających rozpadowi a liczbą jąder powstających na drodze substytucji proton-neutron. **Dzięki zwiększeniu wydajności napromieniania materiału tarczowego, a więc dzięki efektom optymalizacji procesu syntezy obejmującej jednocześnie zmniejszenie ciśnienia napelnienia tarczy i zwiększenie natężenia wiązki protonów (Rozdział 9), otrzymano aktywność 77 GBq w czasie 25 minut napromieniania, co oznacza wzrost aktywności o 14% względem wyników wstępnych.**

W zoptymalizowanych przeze mnie warunkach produkcji transfer z tarczy cyklotronu do modułu wraz z pułapkowaniem $[^{11}\text{C}]$ -CO₂ w objętości sit molekularnych trwa około 5 minut. Czas pracy modułu MeI PLUS™, od rozpoczęcia uwalniania dwutlenku węgla-11 z sit molekularnych do zakończenia destylacji $[^{11}\text{C}]$ -CH₃J wynosi około 11 minut. Przedmuchiwanie sit molekularnych o temperaturze 250°C azotem o natężeniu przepływu 15 ml/min pozwala na uwolnienie 85% do 90% zaabsorbowanej w nich aktywności węgla-11. Reformulacja i zbieranie produktu w fiolce z produktem końcowym przy użyciu modułu ReFORM PLUS™, w zależności od użytego skryptu, wynosi 6 minut dla metody „mokrej” i 4 minuty dla metody „suchej”. **Podczas opracowywania skryptu dla metody suchej możliwe okazało się uwspólnienie poszczególnych kroków skryptów sterujących pracą tych modułów, co skróciło sumaryczny czas wytwarzania z 17 do 12 minut, co stanowi 25% wartości okresu półtrwania izotopu węgla-11.** Wyniki identyfikacji radionuklidowej (Tabela 8, podrozdział *Identyfikacja radionuklidowa*) potwierdziły powtarzalność procesu produkcyjnego i pozwoliły zidentyfikować otrzymany radionuklid jako

węgiel-11 poprzez dopasowanie mierzonych parametrów charakterystycznych dla rozpadu tego jądra względem podanych wartości granicznych.

Sumaryczne porównanie parametrów wytwarzania dla trzech zmodyfikowanych przez mnie metod produkcji [¹¹C]-choliny: wykorzystującej DMF, metody opartej na „zielonej chemii” i metody suchej przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Parametry wytwarzania [¹¹C]-choliny stosowane w każdej z przedstawionych metod.

Parametr	Metoda EtOH (zielona chemia)	Metoda sucha (w fazie stałej)	Metoda DMF
Ciśnienie napełniania tarczy	17 bar	17 bar	20 bar
Natężenie wiązki na tarczy	40 μA	40 μA	30 μA
Wydajność prądowa	3.96 GBq/μA	3.96 GBq/μA	3.11 GBq/μA
Ilość użytego DMF	Nie użyto	Nie użyto	200 μl na cykl produkcyjny
Ilość użytego DMAE	10 μl (rozpuszczony w etanolu)	Do 500 μl (osadzony na kartridżu HLB)	10 μl (rozpuszczony w DMF)
Wydajność*	9%	68%	23%
Czas trwania cyklu produkcyjnego	17 min	12 min	17 min

* Wydajność obliczona jako stosunek aktywności promieniotwórczej produktu na czas zakończenia konfekcjonowania względem aktywności teoretycznej transferowanej z cyklotronu.

Przy tak dobranych parametrach wytwarzanie radionuklidu cechowało się niezawodnością i odtwarzalnością, a produkt końcowy wykazywał odpowiednią jakość w zakresie czystości chemicznej, radiochemicznej, radionuklidowej i mikrobiologicznej.

Wyniki – kontrola jakości

W myśl obowiązujących w Polsce aktów prawnych radiofarmaceutyki, jak wszystkie produkty lecznicze, są dopuszczane do podania pacjentom wyłącznie wtedy, gdy zostały wytworzone w warunkach kontrolowanych, sprawdzone zgodnie z obowiązującymi u wytwórcy zwalidowanymi metodami, są przechowywane w warunkach określonych dla danego produktu

i dopuszczone do użycia przez kompetentną osobę. Dlatego procedury kontroli jakości są ważną częścią procesu produkcyjnego. Operacje kontrolne obejmowały kontrolę czystości chemicznej, jak i czystości radiochemicznej, identyfikację nuklidową, kontrolę czystości mikrobiologicznej oraz w zakresie pozostałości rozpuszczalników wykorzystywanych w procesie produkcyjnym.

W Tabeli 10 zostały zebrane wyniki kontroli jakości pięciu kolejnych serii produkcyjnych [¹¹C]-choliny wytworzonych „metodą DMF”. Porównano je z kryteriami akceptacyjnymi. **Czystość radiochemiczna, określona metodą chromatografii cieczowej, przekroczyła 99%, a ilość zanieczyszczeń radionuklidowych była mniejsza niż 0.1%. Zawartość etanolu i dimetyloformamidu spełniła wymagania farmakopealne [PhEurResSolv], co potwierdzono metodą chromatografii gazowej.**

Tabela 10. Wyniki kontroli jakości serii wytworzonych metodą DMF.

Test	Kryteria akceptacji	Seria 1	Seria 2	Seria 3	Seria 4	Seria 5
pH	4,5-8,5	8,23	8,16	8,27	8,19	8,29
Wygląd	Klarowny, bezbarwny roztwór	Klarowny, bezbarwny roztwór	Klarowny, bezbarwny roztwór	Klarowny, bezbarwny roztwór	Klarowny, bezbarwny roztwór	Klarowny, bezbarwny roztwór
Zawartość etanolu	≤ 5000 µg/mL	4251.36 µg/mL	3017.87 µg/mL	3981.82 µg/mL	3964.24 µg/mL	3682.47 µg/mL
Zawartość DMF	≤ 880 µg/mL	717.62 µg/mL	730.56 µg/mL	662.97 µg/mL	877.21 µg/mL	710.29 µg/mL
Zawartość DMAE	100 µg/mL	36.1 µg/mL	34.7 µg/mL	35.2 µg/mL	35.4 µg/mL	32.8 µg/mL
Czystość radiochemiczna	[¹¹ C]cholina ≥ 95%	99.09%	99.36%	99.20%	99.32%	99.30%
Identyfikacja promieniowania gamma	511 ± 10 KeV	511 keV	512 keV	514 keV	514 keV	510 keV
Czystość radionuklidowa	≥ 99,9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%
Okres półtrwania izotopu	19.9-20.9 min	20.3 min.	20.3 min.	20.3 min.	20.4 min.	20.2 min.
Zawartość endotoksyn bakteryjnych	<17.5 EU/mL	< 10 EU/mL	< 10 EU/mL	< 10 EU/mL	< 10 EU/mL	< 10 EU/mL
Jałowość	Jałowy	Jałowy	Jałowy	Jałowy	Jałowy	Jałowy

Różnice między syntezą „mokrą” z prekursorem rozpuszczonym w DMF lub EtOH oraz syntezą „suchą”, w której prekursor został osadzony na wkładzie HLB, przedstawiono w Tabeli 11. Obejmują one czystość chemiczną (brak DMF) oraz różnice w stężeniach nieprzereagowanego prekursora i pozostałości etanolu. Dla pozostałych parametrów otrzymano wartości zbliżone do wyników uzyskanych dla produktu wytworzonego metodą DMF. Zaobserwowano natomiast znaczącą różnicę w stężeniu etanolu między syntezami „mokrą” i

„suchą”, co wynika ze zmian w skrypcie. Czas przepływu etanolu przez kartridż HLB został wydłużony z 50 sekund do 75 sekund, co umożliwiło dokładniejsze usunięcie etanolu. **Wydłużenie „etapu etanolu” w skrypcie, z jednoczesnym skróceniem czasu trwania całego skryptu, było możliwe dzięki przyśpieszeniu takich etapów, jak płukanie kartridża HLB poprzez użycie dwóch porcji wody po 5 ml, zamiast jednej porcji 10 ml. Podział objętości na dwie mniejsze części skutkuje obniżeniem ciśnienia wstecznego w kapilarach, co zapewnia szybszy przepływ.**

Tabela 11. Porównanie różnic parametrów jakościowych pomiędzy metodami.

Parametr	Metoda DMF	Metoda EtOH ("zielonej chemii")	Metoda sucha (w fazie stałej)
Zawartość DMAE	36.1 µg/ml	20.2 µg/ml	70.1 µg/ml
Zawartość etanolu	2.93 mg/ml	2.24 mg/ml	0.58 mg/ml
Zawartość DMF	< 0.7 µg/ml	-	-

12. Podsumowanie

Badanie diagnostyczne PET/TK z użyciem choliny znakowanej węglem ^{11}C jest wartościowym badaniem w ocenie zaawansowania raka gruczołu krokowego. Obecne metody obrazowania (w tym ultrasonografia przezodbytnicza, rezonans magnetyczny, tomografia komputerowa i skanowanie kości) wykazują bowiem słabe wyniki w diagnostyce i ocenie zaawansowania tej choroby. ^{11}C -cholina wydaje się również otwierać obiecującą drogę do badania zaburzeń genetycznych związanych z przemianami metabolicznymi procesów bazujących na szlakach syntetycznych związanych z choliną [Małydk et al., 2014].

Celem nadrzędnym pracy było nie tyle opisanie procesu wytwarzania ^{11}C -choliny, ile potrzeba dostosowania warunków produkcyjnych do wymagań stawianych wytwórcom dążącym do rejestracji tego radiofarmaceutyku jako produktu leczniczego a następnie skupienie uwagi na korzystnym zoptymalizowaniu procesu jego wytwarzania – poprzez zwiększenie wydajności syntezy przy jednoczesnym uzyskaniu wysokiej czystości chemicznej (brak DMF) oraz zredukowaniu nieprzereagowanego prekursora.

Proces wytwarzania ^{11}C -choliny oparty na „metodzie DMF” (a więc bez optymalizacji) umożliwia przygotowanie do ośmiu dawek radioznacznika do stosowania klinicznego, podczas gdy całkowity czas wymagany do wytworzenia jednej partii radiofarmaceutyku (wraz z kontrolą jakości) wynosi około jednej godziny. Czystość i jakość otrzymanego

radiofarmaceutyku są wystarczające, aby bezpiecznie podawać go pacjentom. Produkcja jest również bezpieczna dla operatora – ze względu na krótki okres półtrwania węgla-11, skażenie radiologiczne w komorze izolatora jest zredukowane do bezpiecznego poziomu w ciągu dwóch godzin, co pozwala na wytworzenie trzech serii na dzień roboczy z łączną liczbą 24 dawek [¹¹C]-choliny.

Zastosowane zostały dwa podejścia do usprawnienia procesu produkcji [¹¹C]-choliny względem metody DMF: metodę wykorzystującą etanol, jako „zielony” rozpuszczalnik, i syntezę „metodą suchą”, w której DMAE jest osadzony na złożu kartridża Oasis HLB plus. W syntezie „zielonej” pozostałości prekursora DMAE są najniższe, z kolei synteza w fazie stałej okazała się skuteczna w znacznym zwiększeniu wydajności procesu, a czas syntezy był najkrótszy (Tabela 11, Rozdział 11). Niestety, zawartość prekursora DMAE w produkcie końcowym okazała się wyższa niż w dwóch „metodach mokrych”, wykorzystujących rozpuszczalniki organiczne w celu wprowadzenia prekursora do środowiska reakcji. Chociaż jest to związek nietoksyczny i stosowany jako dodatek żywieniowy, może konkurować z wychwytem [¹¹C]-choliny przez komórkę [Reischl et al., 2004]. Nie mniej, jego stężenie pozostaje poniżej wymagań Farmakopei Europejskiej [PhEurFCH], przez co „metoda sucha” wydaje się być jak najbardziej godna polecenia laboratoriom cyklotronowym. Obie powyższe metody umożliwiają całkowitą eliminację DMF.

Stosowanie DMF jako rozpuszczalnika prekursora było pionierskim sposobem syntezy [¹¹C]-choliny. Jednak pomimo rozsądnej wydajności wskaźnika promieniotwórczego, stężenie rozpuszczalnika pozostaje na niebezpiecznie wysokim poziomie, co sprawia, że jest to metoda potencjalnie ryzykowna. Zastąpienie tego rozpuszczalnika etanolem czyni produkt dużo bezpieczniejszym dla pacjentów, ale niska wydajność radiochemiczna może zniechęcać wytwórców ze względu na stosunek kosztów do korzyści. **Zatem przeniesienie środowiska reakcji do fazy stałej wydaje się być najbardziej skutecznym sposobem zwiększenia liczby dawek radioznacznika do 12 na partię, jednocześnie czyniąc go bezpieczniejszym dla pacjenta bez utraty właściwości diagnostycznych.**

W 2017 roku opublikowana została monografia farmakopealna opisująca kontrolę jakości [¹⁸F]-fluorocholiny [PhEurFCH]. Ze względu na istotne różnice między obydwojema radioznacznikami, jedynie metodologia kontroli zawartości DMEA może zostać wykorzystana w systemie QA/QC [¹¹C]-choliny. W monografii podano limit zawartości nieprzereagowanego DMAE w produkcie końcowym (1,0 mg na dawkę) – wcześniej limit ten pozostawał

nieokreślony. Wszystkie techniki opisane w niniejszej pracy spełniają ten limit, co zostało przedstawione w Tabeli 11.

Shao et al. [Shao et al., 2011] odrzucili zastosowanie hydrofobowego kartridża SPE na bazie krzemionki (jak C18 czy HLB plus) prowadząc syntezę na pojedynczym kartridżu kationowymiennym (Sep-Pak CM-Light), argumentując to niższym ciśnieniem wstecznym w kapilarach modułu syntezy. O ile niższe ciśnienie wsteczne może skrócić czas syntezy, zwiększając jej wydajność na czas zakończenia (*ang. End Of Synthesis; EOS*), o tyle użycie dwóch kartridży w ułożeniu szeregowym powinno dać wyższy poziom oczyszczania ze względu na różnicę mechanizmów sorpcyjnych między tymi dwoma kartridżami.

13. Przyszłość radiofarmaceutyków

W ostatnich latach coraz powszechniejsza staje się koncepcja *medycyny celowanej* czy też *medycyny spersonalizowanej*, a więc zindywidualizowanego, nakierowanego na konkretnego pacjenta podejścia do diagnostyki i terapii. Ta koncepcja w medycynie nuklearnej znana jest jako *teranostyka* (nazwa ta powstała z połączenia słów terapia i diagnostyka). W terapii teranostatycznej stosowany jest biologicznie czynny radiofarmceutyk wytwarzany w oparciu o pary radionuklidów o podobnych lub identycznych właściwościach chemicznych, lecz będących emiterami różnego rodzaju promieniowania. W fazie diagnostycznej podejścia teranostycznego pacjentowi podaje się wersję radiofarmaceutyku znakowaną radionuklidem emitującym promieniowanie gamma w celu diagnostycznego scyntygraficznego zobrazowania zmiany nowotworowej. W fazie terapeutycznej pacjent otrzymuje radiofarmceutyk znakowany emiterem beta lub alfa, jak ma to obecnie miejsce w gliwickim oddziale CO-I z zastosowaniem peptydu DOTATATE (analogu somatostatyny) w celu diagnostyki i leczenia guzów neuroendokrynych (NET) [Werner et al., 2015]. Z perspektywy historycznej koncepcja leżąca u podstaw strategii teranostycznej jest dobrze znana w medycynie nuklearnej i stanowiła podstawę wielu procedur obrazowania jądrowego stosowanych obecnie w praktyce klinicznej. Na przykład, radioznakowane peptydy są obiecującą klasą związków już od ponad 20 lat [Schwaiger et al., 2011], [Hamburg et al., 2010], [Funkhouser, 2002], a specyficzny dla prostaty antygen błonowy PSMA (*ang. Prostate Specific Membrane Antigen*) jest obiecującym celem diagnostyki obrazowej i ukierunkowanej terapii radionuklidowej (teranostyki) raka prostaty i jego przerzutów [Rahbar et al., 2018]. Antygen PSMA znakowany izotopem β^+ może się także

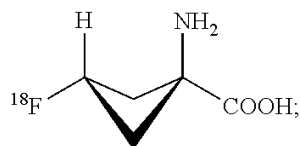
stać konkurencyjnym znacznikiem dla znaczników cholinowych ze względu na wyższą czułość i specyficzność [Szydło et al., 2018].

Procedury syntezy [⁶⁸Ga]-PSMA i analogów choliny różnią się. W przypadku znaczników cholinowych proces syntezy prowadzony jest wieloetapowo i wymaga zastosowania licznych odczynników jako reagentów, rozpuszczalników czy katalizatorów, w tym na przykład takich jak dibromometan (DBM) czy kryptofix® 222, używanych w syntezie [¹⁸F]-fluorocholiny. Są one toksyczne i stwarzają trudności podczas prac laboratoryjnych, a ich półprodukty znajdują się w fazie gazowej [Krasikova, 2007]. Zmusza to do instalowania kosztownych systemów dekontaminacji powietrza z gazów radioaktywnych. Z kolei związki używane podczas znakowania PSMA galem-68 są łatwe w operowaniu i nie wymagają specjalnych warunków, a sam proces charakteryzuje się wysoką wydajnością.

Fluor-18 i węgiel-11, stosowane w produkcji radiofarmaceutyków cholinowych są wytwarzane w tarczach cyklotronu, którego idea działania i budowa zostały opisane w rozdziale 6. Choć akcelerator (wraz z utrzymaniem) jest kosztowny, to jednak pozwala na wytwarzanie izotopów, zwłaszcza fluoru-18, o zdecydowanie dużej aktywności z pojedynczego cyklu produkcyjnego. W przypadku [⁶⁸Ga]-PSMA izotop galu-68 ma okres półtrwania 62 minuty. Izotop ten otrzymywany jest z generatora ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga w postaci chlorku galu-68. Generator ten może być w użyciu nawet kilka miesięcy i umożliwia nawet do dwustu elucji. Synteza [⁶⁸Ga]-PSMA jest prostym procesem, bez skomplikowanych operacji jednostkowych [Nanabala et al., 2016]. Krótki okres półtrwania galu-68 pozwala na częste eluowanie generatora w ciągu dnia, ale w porównaniu z radioznacznikami opartymi o cholinę, pojedyncza synteza [⁶⁸Ga]-PSMA pozwala na diagnostykę co najwyżej trzech pacjentów z jednej szarży produkcyjnej. Ważnym parametrem w porównywaniu obu związków jest czas syntezy. Synteza [¹⁸F]-FCH trwa około 90 minut, natomiast czas syntezy [⁶⁸Ga]-PSMA wynosi tylko 15 minut, podobnie jak czas syntezy [¹¹C]-choliny. Co ważne, w przypadku [⁶⁸Ga]-PSMA pacjent otrzymuje niższą dawkę niż w przypadku podania radioznacznika cholinowego, co ma znaczenie z punktu widzenia ochrony radiologicznej [Giesel et al., 2017].

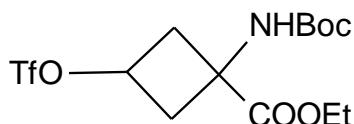
Obecny kierunek zainteresowań związanych z wdrażaniem nowych radiofarmaceutyków skutkuje bardzo szybkim tempem opracowywania kolejnych znaczników PET. Efektem tego trendu jest opracowanie między innymi preparatu o nazwie handlowej Axumin®, którego substancją czynną jest *fluciclovine* [¹⁸F], czyli kwas anti-1-amino-3-[¹⁸F]-fluorocyklobutan-1-karboksyłowego ([¹⁸F]-FACBC) [EMA], [Filipek]. [¹⁸F]-FACBC jest syntetycznym

aminokwasem [Rysunek 13.1] charakteryzującym się wysokim wychwytem w proliferujących komórkach nowotworowych, np. raka stercza [Sörensen et al., 2013].



Rysunek 13.1. Wzór strukturalny [¹⁸F]-FACBC.

Synteza [¹⁸F]-FACBC jest procesem trzyetapowym. W pierwszym etapie następuje znakowanie prekursora izotopem fluoru-18, następnie ma miejsce usunięcie z prekursora grup zabezpieczających. W trzecim etapie [¹⁸F]-FACBC jest oczyszczany na kolumnach SPE i kolekcjonowany w fiolece na produkt końcowy. Prekursorem używanym w procesie jest ester etylowy kwasu syn-1-(N-(tert-butyloksykarbonylo)amino)-3-(trifluorometanosulfonylo)cyklobutano-1-karboxyloвого (Rysunek 13.2). Fluor-18 jest podstawiany do cząsteczki prekursora zgodnie z mechanizmem substytucji SN₂, w wyniku której cząsteczkę opuszcza reszta kwasu trifluorometanosulfonowego.



Rysunek 13.2. Wzór strukturalny cząsteczki prekursora.

Hydroliza grup zabezpieczających odbywa się w dwóch krokach. W pierwszym kroku hydrolizowana jest grupa estrowa przy użyciu 2M NaOH, w drugim kroku grupa tert-butyloksykarbonylowa przy użyciu 4M kwasu solnego. Według danych opublikowanych w patencie proces zajmuje 43 minuty, a wydajność radiochemiczna wynosi około 62% [PatentSwarm].

Znacznik [¹⁸F]-FACBC okazuje się skuteczniejszym narzędziem diagnostycznym w zakresie wykrywalności ognisk raka prostaty względem znaczników cholinowych, jednak nie tak skutecznym jak [⁶⁸Ga]-PSMA, który z trzech omówionych ma najlepsze wyniki diagnostyczne wśród pacjentów z nawrotem raka prostaty oraz przerzutami do węzłów chłonnych [Nanni et al., 2015] [Calais et al., 2018].

14. Wnioski

- 1. Modyfikacje warunków syntezy [^{11}C]-choliny umożliwiają zwiększenie nawet o 30% liczby dawek tego radionuclidu do stosowania klinicznego.** Wśród czynników decydujących o wzroście wydajności procesu syntezy należy wymienić pierwsze w kolejności podwyższenie natężenia prądu wyjścia na etapie wytwarzania izotopu w tarczy cyklotronu, co pozwala na zwiększenie aktywności promieniotwórczej o blisko 15%. Następnie, użycie kartridża SPE zamiast stosowania rozpuszczalników organicznych celem wprowadzenia prekursora do reakcji oraz modyfikacje skryptu sterującego modułem syntezy na etapie reformulacji. Modyfikacje te wynikają bezpośrednio z pominięcia fiolki reakcyjnej i skierowania destylatu z modułu MeI^+ na kartridż SPE zawierający prekursor. Taki zabieg pozwolił zoptymalizować czas trwania kolejnych kroków skryptu, a to z kolei przełożyło się na skrócenie całego etapu o pięć minut, tzn. o czas równy aż 1/4 czasu półtrwania izotopu węgla-11.
- 2. Proces jest w pełni zautomatyzowany, a parametry jakościowe dawek radiofarmaceutycznych do użytku klinicznego spełniają, a nawet przewyższają ustalone kryteria kontroli jakości.** Zarówno metoda „zielonej chemii” jak i metoda „sucha” pozwalają na całkowitą eliminację DMF. Każda z przedstawionych metod (zoptymalizowane jak i bez optymalizacji) pozwalają otrzymywać produkt jałowy, aprotogeny, spełniający wymagania stawiane produktom leczniczym podawanym dożylnie. **Jednak to synteza [^{11}C]-choliny w fazie stałej pozwala na najwyższe uwolnienie produktu przy jednocześnie najkrótszym czasie syntezy zachowując tym samym kryterium ekonomiczne.**
- 3. Choć zawartość nieprzereagowanego prekursora DMAE w produkcie końcowym jest wyższa w metodzie „suchej” niż w przypadku obu technologii „mokrych”, to jednak nadal spełnione są wymagania farmakopealne.**
- 4. Opracowano i zoptymalizowano system QA/QC syntezy [^{11}C]-choliny.** Dzięki połączeniu możliwości oznaczania pozostałości rozpuszczalników oraz nieprzereagowanego prekursora podczas jednej analizy metodą chromatografii gazowej zoptymalizowane zostały kryteria zarówno czasochłonności kontroli jakości, jak i kryteria kosztowe tego systemu.

- 5. Optymalizacja parametrów syntezy [¹¹C]-choliny pozwoliła na zapewnienie niezawodnych i odtwarzalnych warunków wytwarzania radionuklidu, a produkt końcowy wykazywał odpowiednią jakość w zakresie czystości chemicznej, radiochemicznej, radionuklidowej i mikrobiologicznej. Uzyskany radioznacznik pozwala na skuteczne monitorowanie szlaków metabolicznych wykorzystujących cholinę, jak w przypadku procesów proliferacji komórek nowotworowych raka stercza.**

- 6. Poza aspektami medycznymi, produkcja [¹¹C]-choliny według metod opisanych w niniejszej dysertacji niesie za sobą również korzyści biznesowe, jak na przykład zmniejszenie kosztu wytworzenia dawki diagnostycznej i możliwość przeprowadzenia większej liczby badań w ciągu dnia, co daje temu znacznikowi bezdyskusyjną przewagę nie tylko nad jego fluorowym analogiem, ale również nad stosowanym od niedawna w procedurach klinicznych znacznikiem [⁶⁸Ga]- PSMA.**

- 7. Centra PET posiadające cyklotron wyposażony w tarczę do produkcji węgla-11, mogą rozważyć wdrożenie produkcji [¹¹C]-choliny, której właściwości diagnostyczne są lepsze niż analogu znakowanego izotopem fluoru-18, a ilości dawek terapeutycznych uzyskanych z serii produkcyjnej są znacznie większe niż w przypadku znakowanego izotopowo antygenu błonowego [⁶⁸Ga]- PSMA.**

15. Streszczenie/Abstract

Streszczenie

Praca podsumowuje kolejne etapy prac nad optymalizacją syntezy radioznacznika PET znakowanego izotopem węgla [^{11}C] i nad systemem kontroli jego jakości.

Znaczenie [^{11}C]-choliny jako markera PET/TK zostało obszernie opisane jako skutecznego, choć nadal nieobecnego w farmakopeach polskiej i europejskiej znacznika stosowanego do obrazowania zmian nowotworowych. Wytwarzanie tego radiofarmaceutyku stwarza znaczne trudności techniczne. Przede wszystkim chodzi tu o krótkie okresy półtrwania i obecność dimetyloformamidu (DMF) jako resztkowego rozpuszczalnika. Podczas gdy straty wynikające z rozpadu radionuklidu można zminimalizować przez skrócenie czasu trwania procesu, najlepszym rozwiązaniem dla zmniejszenia zawartości DMF jest jego eliminacja ze środowiska reakcji.

W niniejszej pracy porównano dwie zoptymalizowane technologie syntezy [^{11}C]-choliny: opartą na „zielonej chemii” (z etanolem jako „zielonym” rozpuszczalnikiem) i syntezę na sucho, z metodą opartą na DMF. Synteza w fazie stałej okazała się najbardziej skuteczna w całkowitej eliminacji DMF, jej końcowe uwalnianie było najwyższe, a czas syntezy najkrótszy. Zoptymalizowana synteza doprowadziła do powstania pożądanego znacznika promieniotwórczego o wysokiej wydajności radiochemicznej ($65\% \pm 3\%$) w krótkim czasie produkcji (12 minut) i resztkowym prekursorze w produkcie końcowym na poziomie poniżej $100 \mu\text{g/ml}$. Możliwe było zwiększenie wydajności prądowej o niemal 30%, co spowodowało zwiększenie aktywności o 9 GBq po 40 minutach napromieniania materiału tarczowego. Każda partia testowa spełniała wszystkie standardowe wymagania kontroli jakości, a poziomy resztkowego DMEA były poniżej limitów opublikowanych w ostatniej monografii Farmakopei.

W pracy nakreślono także kierunki rozwoju badań nad radiofarmaceutykami nowej generacji – takimi, które nakierowane są konkretny problem diagnostyczny, u konkretnego pacjenta, a więc wpisującymi się w koncepcję teranostyki.

Abstract

The work summarizes the subsequent stages of optimization of the synthesis of [¹¹C] radiolabelled PET tracer and on the quality assurance and control systems.

The importance of [¹¹C]-choline as a PET/CT marker has been extensively described as an effective, although still absent in Polish and European pharmacopoeia tracer used for imaging cancerous lesions. The production of this radiopharmaceutical creates considerable technical difficulties. First of all, it is about short half-lives and the presence of dimethylformamide (DMF) as a residual solvent. While losses due to radionuclide degradation can be minimized by shortening the duration of the process, the best solution to reduce DMF is to eliminate it from the reaction environment.

The current work compares two optimized [¹¹C]-choline synthesis technologies: the process based on "green chemistry" (with ethanol as the "green" solvent) and dry synthesis, with a method based on DMF. The solid phase synthesis proved to be the most effective in the complete elimination of DMF, its final release was the highest and the synthesis time was the shortest. Optimized synthesis led to the desired radioactive label with high radiochemical efficiency ($65\% \pm 3\%$) in a short production time (12 minutes) and a residual precursor in the final product less than 100 µg/ml. It was possible to increase saturation efficiency by almost 30%, which resulted in an increase in activity by 9 GBq after 40 minutes of transmission. Each test batch met all standard quality control requirements, and residual DMEA levels were below the limits published in the latest Pharmacopoeia monograph.

The directions for the development of research on new generation radiopharmaceuticals have also been outlined in the dissertation – first of all those that address a specific diagnostic problem in a particular patient, and thus fit into the concept of teranostics.

Piśmiennictwo

- [AAPM] – American Association of Physicists in Medicine; The Management of Respiratory Motion in Radiation Oncology; (2006); AAPM Report No. 91.
- [Ackerstaff] E, Glunde K, Bhujwalla ZM; Choline Phospholipid Metabolism: A Target in Cancer Cells?; *Journal of Cellular Biochemistry* (2003); 90(3):525-533 (DOI: 10.1002/jcb.10659).
- [Adam] LE, Karp JS, Daube-Witherspoon ME, Smith RJ; Performance of a whole-body PET scanner using curve-plate NaI(Tl) detector; *J. Nucl. Med.* (2001); 42:1821-1830.
- [Adams] S, Baum R, Rink T et al.; Limited Value of Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for the Imaging of Neuroendocrine Tumors; *Eur J Nucl Med* (1998); 25:79-83.
- [Alessio], A, Kinahan P.; PET image reconstruction; *Nuclear Medicine 1* (2006): 1-22.
- [Antoch] Gerald, Freudenberg Lutz S., Egelhof Thomas, Stattaus Jörg, Jentzen Walter, Debatin Jörg F., Bockisch Andreas; Focal Tracer Uptake: A Potential Artifact in Contrast – Enhanced Dual – Modality PET/CT Scans; *J Nucl Med.* (2002); 43:1339-1342.
- [Arino] H, Skraba WJ, Kramer HH; A new ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radioisotope generator system; *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* (1978); 29(2):117-120.
- [Baba] S, Isoda T, Maruoka Y et al.; Diagnostic and Prognostic Value of Pretreatment SUV in 18F-FDG/PET in Breast Cancer: Comparison with Apparent Diffusion Coefficient from Diffusion-Weighted MR Imaging; *J Nucl Med* (2014); 55(5):736-742.
- [Baghaei] Hossain, Wong Wai-Hoi, Uribe Jorge; Principles of Positron Emission Tomography Imaging; Kim E. Edmund, Lee Myung-Chul, Inoue Tomio, Wong Wai-Hoi; *Clinical PET Principles and Applications*; 2004 Springer-Verlag New York (3-31). ISBN -387-40854-1.
- [Boellaard] R, Krak NC, Hoekstra OS, et al.; Effects of Noise, Image Resolution, and ROI Definition on the Accuracy of Standard Uptake Values: A Simulation Study; *J Nucl Med.* (2004);45:1519–1527.
- [Boschi] S, Lodi F, Cicoria G, et al. Development of a modular system for the synthesis of PET [¹¹C]labeled radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isotopes.* 2009;67:1869–73,
- [Bostwick] DG, Burke HB, Djakiew D et al.; Humane Prostate Cancer Risk Factors; (2004); 101(10):2371-2490.
- [Bouchelouche] K, Tagawa ST, Goldsmith SJ et al.; PET/CT imaging and radioimmunotherapy of prostate cancer; *Semin Nucl Med* (2011); 41(1):29-44.
- [Bouchelouche] K, Tagawa ST, Goldsmith SJ, Turkbey B, Capala J, Choyke P. PET/CT imaging and radioimmunotherapy of prostate cancer. *Seminars in Nuclear Medicine.* 2011;41(1):29-44. doi:10.1053/j.semnuclmed.2010.08.005.
- [Braccini] S; Compact Medical Cyclotrons and their use for Radioisotope Production and Multi-disciplinary Research; In *Proceeding of the International Conference on Cyclotrons and Their Applications*, Cape Town, South Africa, 8-13 October 2016; JACoW: Geneva, Switzerland, 2017; 229-234.
- [Brooks] DJ, Ibanez V, Sawle GV et al.; Differing patterns of striatal 18F-DOPA uptake in Parkinson's disease multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy; *Annals of Neurology* (1990); 28(4):547-555.
- [Brownell] GL, Burnham CA, Wilensky S et al.; New developments in positron scintigraphy and the application of cyclotron-produced positron emitters; *Medical Radioisotope Scintigraphy. VI Proceedings of a Symposium on Medical Radioisotope Scintigraphy* (1969).
- [Burger] C, Goerres G, Schoenes S, Buck A, Lonn A.H.R, von Schulthess G.K.; PET attenuation coefficients from CT images: experimental evaluation of the transformation of CT into PET 511-keV attenuation coefficients; *Eur J Nucl Med* (2002) 29:922–927. DOI 10.1007/s00259-002-0796-3.
- [Burt] RW, Perkins OW, Oppenheim BE, Schauwecker DS., Stein L, Wellman H, Witt RM.; Direct Comparison of Fluorine-18-FDG SPECT, Fluorine-18-FDG PET and Rest Thallium-201 SPECT for Detection of Myocardial Viability; *J Nucl Med.* (1995); 36: 176-179.

[Bzowski] P. Otrzymywanie i ekstrakcja izotopu jodu ^{124}I z tlenku telluru (TeO_2). Praca dyplomowa magisterska pod kierownictwem dra Kamila Gorczewskiego. Fizyka Medyczna, Wydział Matematyki Fizyki Chemii Uniwersytet Śląski. Katowice, październik 2015.

[Calabretta] L, Rifuggiato D, Maggiore M, Shchepounov V; A Superconducting Ring Cyclotron to Deliver High Intensity Proton Beams; Proceedings of EPAC (2000).

[Calais] J, Fendler WP, Herrmann K, Eiber M, Ceci F. Comparison of ^{68}Ga -PSMA-11 and ^{18}F -Fluciclovine PET/CT in a Case Series of 10 Patients with Prostate Cancer Recurrence. *J. Nucl. Med.* 2018; 59(5): 789-794

[Caroli] P, Nanni C, Rubello D, Alavi A, Fanti S; Non-FDG PET in the practice of oncology; *Indian J Cancer*; (2010); 47:120-125.

[Castaldi] E, Muzio V, D'Angeli L, Fugazza L; ^{68}Ga DOTATATE lyophilized ready to use kit for PET imaging in pancreatic cancer murine model; *J Nucl Med* (2014); 55(1):1926-1926.

[Chen] MY, Chou HH, Liu FY et al.; ^{18}F -FDG PET in small-cell cervical cancer: a prospective study with long-term follow-up; *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (2016); 43(4): 663-674. (DOI 10.1007/s00259-015-3229-9).

[Cherry] SR, Sorensen JA, Phelps ME; *Physics in Nuclear Medicine*, 3rd ed.; 2003 Saunders/Elsevier Science. ISBN 0-7216-8341-X.

[Cho] Z.H, Chan J.K, Ericksson L, Singh M, Graham S, MacDonald N.S, Yano Y.; Positron Ranges Obtained from Biomedically Important Positron-Emitting Radionuclides; *Journal of Nuclear Medicine* 1976;16(12):1174-1176.

[Choppin] GR, Liljenzin JO, Rydberg J.; *Mechanisms and Models of Nuclear Reactions; Radiochemistry and Nuclear Chemistry* third edition (2002); 313-338. Butterworth-Heinemann; ISBN: 978-0-7506-7463-8.

[Conti] M, Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. *EJNMMI Physics*. 2016; 3(1): 8.

[Cooper] JF, Hung JC. Bacterial Endotoxin Test and Sterility Test for Radiopharmaceuticals. University of New Mexico, Health Sciences Center, College of Pharmacy. 2008; 14(5): 30-35.

[Crafts] C, Bailey B, Plante M, Acworth I. Evaluation of methods for the simultaneous analysis of cations and anions using HPLC with charged aerosol detection and a zwitterionic stationary phase. *Journal of chromatographic science*. 2009; 47(7): 534-539.

[Czernin] J., Satyamurthy N., Schiepers C.; Molecular Mechanisms of Bone ^{18}F -NaF Deposition; *J Nucl Med.*; (2010); 51:1826–1829.

[Dawood] Mohammad, Jiang Xiaoyi, Schäfers Klaus; *Correction Techniques in Emission Tomography*; 2012 CRC Press. ISBN 978-1-4398-1301-0.

[de Jong] IJ, Pruim J, Elsinga PH, Jongen MM, Mensink HJ, Vaalburg W; Visualisation of bladder cancer using ^{11}C -choline PET: first clinical experience; *Eur J Nucl Med*. 2002; 10(29): 1283-1288.

[Defrise] M, Kinahan PE, Townsend DW, Michel C, Sibomana M, Newport DF; Exact and approximate rebinning algorithms for 3-D PET data; *IEEE Transaction on Medical Imaging* (1997); 16:145-158.

[DeGrado] TR, Baldwin SW, Wang S, et al. Synthesis and Evaluation of ^{18}F - Labeled Choline Analogs as Oncologic PET Tracers. *JNM* 2001, 42: 1805 – 1814.

[Delbeke] D; Oncological Applications of FDG PET Imaging: Brain Tumors, Colorectal Cancer Lymphoma and Melanoma; *J Nucl Med* (1999); 40:591-603.

[Derenzo] SE.; Precision Measurement of Annihilation Point Spread Distributions for Medically Important Positron Emitters; *Proceeding of 5th International Conference on Positron Annihilation*, Sendai, Japan 1979, pp. 819-824.

[Devillet] F, Geets JM, Ghyoot M, Kral E, Nactergal B, Mooij R, Vosjan M; Performance of IBA New Conical Shaped Niobium [^{18}O] Water Target; http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/16498/21%20WTTC15_proceedings_FDDevillet-kw.pdf

- [Elstrom] R, Guan L, Baker G, et al.; Utility of FDG PET scanning in lymphoma by WHO classification; *Blood* (2003); 101(10):3875-3876.
- [EMA] <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/axumin#overview-section>,
- [Evangelista] L, Briganti A, Fanti S, et al. New Clinical Indications for 18F/11C-choline, New Tracers for Positron Emission Tomography and a Promising Hybrid Device for Prostate Cancer Staging: A Systematic Review of the Literature. *Eur Urol* 2016, 70: 161-175.
- [Fanti] S, Farsad M, Mansi L; PET-CT Beyond FDG: A Quick Guide to Image Interpretation; 2010 Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [Farwell] MD, Pryma DA, Mankoff DA; PET/CT Imaging in Cancer: Current Applications and Future Directions; *Cancer* (2014); 120:3433-3445.
- [Fiechter] M, Ghadri JR, Gebhard C, Fuchs TA, Pazhenkottil AP, Nkoulou RN, Herzog BA, Wyss CA, Gaemperli O, Kaufmann PA.; Diagnostic Value of 13N-Ammonia Myocardial Perfusion PET: Added Value of Myocardial Flow Reserve; *J Nucl Med.* (2012); 53: 1230-1234.
- [Filipek] J, Skrzyńska K. Rejestracje i nowości na rynku 2017. *Aptekarz Polski. Pismo Naczelnej Izby Aptekarskiej.* 25.03.2018.
- [Fletcher] James W., Djulbegovic Benjamin Soares Heloisa Pet al.; Recommendations on Use of 18F-FDG PET in Oncology; *J. Nucl. Med.* (2008); 49:480-508.
- [Foster] NL, Heidebrink JL, Clark CM et.al.; FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia and Alzheimer's disease; *Brain* (2007) 130(10):2616-2635.
- [Franek] E, Miernik S, Dziuk M; Metody hybrydowe (SPECT-CT, PET-CT) w diagnostyce choroby wieńcowej i ocenie żywotności mięśnia sercowego; *Choroby Serca i Naczyń* (2008); 5(2):93-101.
- [Freund] AK.; Cross-section of materials used as neutron monochromators and filters; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* (1983); 213(2-3): 495-501.
- [Fricke], E., Machtens, S., Hofmann, M. et al.; Positron Emission Tomography with 11C-Acetate and 18F-FDG in Prostate Cancer Patients; *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2003) 30: 607. doi:10.1007/s00259-002-1104-y.
- [Friesel] DL, Antaya TA; Medical Cyclotrons; *Reviews of Accelerator Science and Technology (RAST)* (2009); 2: 133.
- [Funkhouser J. Reinventing pharma: The theranostic revolution. *Current Drugs Discovery.* 2002; 2:17-19.
- [Gambhir] Sanjiv S., Czernin Johannes, Schwimmer Judy, Silverma Daniel H. S., Coleman R. Edward, Phelps Michael E.; A Tabulated Summary of the FDG PET Literature; *J. Nucl. Med.* (2001); 42:1S-93S.
- [Gann] PH, Hennekens CH, Ma j Longcope C, Stampfer MJ; Prospective Study of Sex Hormone Levels and Risk of Prostate Cancer; *J Natl Cancer Inst* (1996); 88(16):1118-1126 (DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/88.16.1118>).
- [Geworski] L, Knoop B.O, de Wit M, Ivancevic V, Bares R, Munz D.L; Multicenter Comparison of Calibration and Cross Calibration of PET Scanners; *J. Nucl. Med.* (2002); 43:635-639.
- [Giesel] FL, Hadaschik B, Cardinale J, Radtke J, et al. F-18 labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2017; 44:678-688.
- [Glunde] K, Bhujwala ZM, Ronen SM.; Choline metabolism in malignant transformation; *Nat Rev Cancer.*; (2011); 11(12): 835-848.
- [Goerres] Gerhard W., Burger Cyrill, Kamel Ehab, Seifert Burkhardt, Kaim Achim H, Buck Alfred, Buehler Tobias C., von Schulthess Gustav K.; Respiration-induced Attenuation Artifact at PET/CT: Technical Considerations; *Radiology* (2003); 226(3):906-910.
- [Goldman] Lee w.; Principles of CT and CT Technology; *J Nucl Med. Technol.* (2007); 35:115-128.
- [Grant] F.D., Fahey F.H., Packard A.B., Davis R.T., Alavi Abass, Treves S.T.; Skeletal PET with 18F-Fluoride: Applying New Technology to an Old Tracer; *J Nucl Med* (2008); 49:68–78.
- [Grodowska] K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm.* 2010;67:3–12.

[GSM2015 S20] Szydło M, Jadwiński M, Chmura A, Gorczewski K, Sokół M; Synthesis, isolation and purification of [¹¹C]-choline, a PET tracer; XIXth Gliwice Scientific Meeting book of abstracts (2015) abstract S20, p. 149.

[GSM2015 S21] Szydło M, Jadwiński M, Chmura A, Gorczewski K, Sokół M; [¹¹C]-choline as an accurate and effective PET/CT diagnostic tool and its Comparison to [¹⁸F]-fluoromethylcholine; XIXth Gliwice Scientific Meeting book of abstracts (2015) abstract S21, p. 148.

[Halfpenny] W, Hain SF, Biassoni L, Maisey MN, Sherman JA, McGurk M; FDG-PET. A possible prognostic factor in head and neck cancer; *British Journal of Cancer* (2002); 86:512-516.

[Hamburg] MA, Collins FS. The Path to Personalized Medicine. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363:301-304.

[Hara] T, Kosaka N, Kishi H; PET Imaging of Prostate Cancer Using Carbon-11-Choline; *J Nucl Med* (1998); 39:990-995.

[Heiss] WD, Wienhard K, Wagner R et al.; F-DOPA as an Amino Acid Tracer to Detect Brain Tumors; *J Nucl Med* (1996); 37:1180-1182.

[Herholz] K, Salomon E, Perani D et. al.; Discrimination between Alzheimer Dementia and Controls by Automated Analysis of Multicenter FDG PET; *Neuroimage* (2002); 17(1):302-316.

[Heuveling] Derrek A., de Bree Remco, van Dongen Guus A.M.S.; The potential role of non-FDG-PET in the management of head and neck cancer; *Oral Oncology* (2011); 47:2-7.

[Hicks] R, MacManus MP, Matthews JP et al.; Early FDG-PET imaging after radical radiotherapy for non-small-cell lung cancer: Inflammatory changes in normal tissues correlate with tumor response and do not confound therapeutic response evaluation; *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* (2004); 60(2):412-418.

[Hine] GJ. Instrumentation In Nuclear Medicine. In: Hine GJ, editor. Sodium Iodine Scintillators. Vol. 1. Academic Press Inc; 1967. pp. 95–119.

[Ho] CL, Yu SCH, Yeung DWC; ¹¹C-Acetate PET Imaging in Hepatocellular Carcinoma and Other Liver Masses; *J Nucl Med* (2003); 44:213-221.

[Hoefnagel] CA; Metaiodobenzylguanidine and somatostatin in oncology: role in the management of neural crest tumors; *European journal of nuclear medicine* (1994); 21(6):561-581.

[Hoehr] C, Oehlke E, Benard F, et. Al. ⁴⁴Sc production using a water target on a 13 MeV cyclotron; *Nucl Med. Biol*; 2014: 401 – 406.

[Huang] YC, Lu HI, Huang SC et al.; FDG PET using SUVmax for preoperative T-staging of esophageal squamous cell carcinoma with and without neoadjuvant chemoradiotherapy; *BMC Medical Imaging* (2017); 17(1) (DOI: 10.1186/s12880-016-0171-7).

[IAEA] Recommended cross sections for ¹⁴N(p,n)¹¹C reaction: <https://www-nds.iaea.org/medical/n4p11c0.html>

[IEC] Radionuclide Imaging Devices – Characteristics and Test Conditions – Part 1: Positron Emission Tomographs, IEC 61675-1, IEC, Geneva, 1998, 2008, 2013.

[Inoue] T, Kim EE, Komaki R et al.; Detecting Recurrent or Residual Lung Cancer with FDG-PET; *J Nucl Med* (1995); 36:788-793.

[Jadvar] H. Molecular imaging of prostate cancer with PET. *Journal of Nuclear Medicine* 2013; 54(10): 1685-1688.

[Jadvar2] H, J.A. Parker. *Clinical PET and PET/CT*. Springer Science & Business Media, 20 sty 2006 - 279

[Kalra] MK, Maher MM, Mueller PR, Saini S; State-of-the-art imaging of pancreatic neoplasms; *The British Journal of Radiology* (2003); 76:857-865 (DOI 10.1259/bjr/16642775).

[Kayani] I, Bomanji JB, Groves A et al.; Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors with Combined PET/CT Using ⁶⁸Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe1,Tyr3-octreotate) and ¹⁸F-FDG; *Cancer* (2008); 112(11):2447-2455.

[Kąkol] Z, Morawski P, Wiendlocha B; *Elementy Fizyki Współczesnej*; AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowane (2015); ISBN: 978-83-952550-2-1.

[Kelloff] GJ, Hoffman JM, Johnson Bruce et al.; Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer Patient Management and Oncologic Drug Development; *Clin Cancer Res* (2005); 11(8):2785-2808.

[Khan] N, Oriuchi N, Highuchi T, Zhang H, Endo K; PET in follow-up of differentiated thyroid cancer; *The British Journal of Radiology* (2003); 76:690-695 (DOI 10.1259/bjr/31538331).

[Kinahan] PE, Townsend DW, Beyer T, Sashin D; Attenuation correction for a combined 3D PET/CT scanner; *Med. Phys.* (1998); 25:2046-2053.

[Kleeven] W, Zaremba S.; *Cyclotrons: Magnetic Design and Beam Dynamics*; arXiv preprint:1804.08961, 2018.

[Kołodziejczyk] Aleksander; *Naturalne związki organiczne*; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

[Krasikova] R. Synthesis modules and automation in f-18 labeling. *Ernst Schering Rea Found Workshop 2007*; 62:289-316.

[Królicki] L, Bajera A, Kunikowska J.; *Obrazowanie struktury i czynności narządów wewnętrznych metodą PET*; *Inżynier i Fizyk Medyczny* (2012); 1: 39-43.

[Labbé] C, Zaidi H, Morel C.; *Description of the STIR implementation of FBP 3DRP*; Ver. 0.91 (<http://stir.sourceforge.net/documentation/STIR-FBP3DRP.pdf>).

[Lautamäki] R, George RT, Kitagawa K, Higuchi T, Merrill J, Voicu C, DiPaula A, Nekolla SG, Lima JAC Lardo AC, Bengel FM.; *Rubidium-82 PET-CT for quantitative assessment of myocardial blood flow: validation in a canine model of coronary artery stenosis*; *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (2009); 36(4): 576-586.

[Lepera] CEG, Dembowski B; *Production of [¹⁸F] fluoride with a high-pressure disposable [¹⁸O] water target*; *Applied Radiation and Isotopes* (1997); 48(5): 613-617.

[Loktionova] NS, Belozub AN, Filosofov DV, Zhernosekov KP, Wagner T, Türler A, Rösch F.; *Improved column-based radiochemical processing of the generator produced ⁶⁸Ga*; *Appl Radiat Isot* (2011); 69(7): 942-946.

[Lopci] E, Nanni C, Castellucci P, Montini GC et.al.; *Imaging with non-FDG PET tracers: outlook for current clinical applications*; *Insights Imaging* (2010) 1:373-385.

[Mahoney] DW, McGough CG. *Alternative Radiochemical Purity Testing Procedures for the Compounded Radiopharmaceuticals Approved from 1988-Washington, DC*. Apha. 1998.

[Małdyk] J, Rybczyńska J, Piotrowski D, Kozielski R. *Evaluation of calretinin immunohistochemistry as an additional tool in confirming the diagnosis of Hirschsprung disease*. *Pol J Pathol.* 2014; 65:34–9.

[Marcus] C, Marashdeh W et al.; *18F-FDG PET/CT and Colorectal Cancer: Value of Fourth and Subsequent Post therapy Follow-up Scans for Patients Management*; *J Nucl Med* (2015); 56(7):989-994.

[Masoomi] A. Michael, McLean H. Anne, Bouchareb Yassine, Ryder Will, Robinson Andy; *Impact of PET-CT motion correction in minimizing the gross tumor volume in non-small cell lung cancer*; *Asia Oceania J Nucl Med. Biol.* 2013; 1(2):35-46.

[Mawlawi] Osama, Wendt Richard, Wong Wai-Hoi; *Principles of PET/CT*; Kim E. Edmund, Lee Myung-Chul, Inoue Tomio, Wong Wai-Hoi; *Clinical PET Principles and Applications*; (2004) Springer-Verlag New York (44-61). ISBN -387-40854-1.

[Mertens], S. "Direct Neutrino Mass Experiments". *Journal of Physics: Conference Series.* 2016; 718: 022013. arXiv:1605.01579Freely accessible. doi:10.1088/1742-6596/718/2/022013.

[Miles] Ken; *FDG-PET and colon cancer*; *Cancer Imaging* (2015); 3(2):135,

[Mitchell] CR, Lowe VJ, Rangel LJ, Hung JC, Kwon ED, Karnes RJ. *Operational characteristics of (11)C-choline positron emission tomography/computerized tomography for prostate cancer with biochemical recurrence after initial treatment*. *J Urol.* Apr 2013;189(4):1308-1313.

[Monografia 2793] *European Pharmacopoeia . supplement 8; monography 2793. Fluorocholine (18F) Injection. 8th edition.*

[Mosconi] L, Tsui WH, Herholz K et.al.; *Multicenter Standardized 18F-FDG PET Diagnosis of Mild Cognitive Impairment, Alzheimer's Disease, and Other Dementias*; *J Nucl Med* (2008); 49(3):390-398.

[Motwani] Rajeev, Raghavan Prabhakar; *Randomized Algorithms*; 1995 Cambridge University Press. ISBN 0-521-47465-5,

[Murty] RC.; *Effective Atomic Numbers of Heterogeneous Materials*; *Nature* (1965); 207: 398-399.

[Nahmias] Claude, Lemmens Catherine, Faul David, Carlson Eric, Long Misty, Blodgett Todd, Joha Nuyts, Townsend David; *Does Reducing CT Artifacts from Dental Implants Influence the PET Interpretation in PET/CT Studies of Oral Cancer and Head and Neck Cancer?*; *J. Nucl. Med.* (2008); 49:1047-1052.

[Nanabala] R, Anees MK, Sasikumar A et al. Preparation of [⁶⁸Ga]PSMA-11 for PET-CT imaging using a manual synthesis module and organic matrix based ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator. *Nucl. Med. Biol.* 2016; 43:463-469.

[Nanni] C, Fantini L, Nicolini S, Fanti S; Non FDG PET; *Clinical Radiology*; (2010); 65:536-548.

[Nanni] C, Schiavina R, Brunocilla E, et al. 18F-Fluciclovine PET/CT for the Detection of Prostate Cancer Relapse: a Comparison to 11C-Choline PET/CT. *Clin. Nucl. Med.* 2015; 40(8): 386-391.

[Nassalski] Antoni Tadeusz; Wspólny detektor do tomografii pozytonowej i rentgenowskiej; *Świerk* (2010); Rozprawa doktorska pod kierunkiem prof. Marka Moszyńskiego.

[NEMA] NU 2: Performance measurement of positron emission tomographs, National Electrical Manufacturers Association, Rosslyn, VA, 1994, 2001, 2007, 2012.

[Nestle] U, Walter K, Schmidt S et al.; 18F-Deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for the planning of radiotherapy in lung cancer: High impact in patients with atelectasis; *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* (1999); 44(3):593-597.

[Nowak] A; Ośrodki protonoterapii w Polsce i na świecie; *Zeszyty Naukowe WCO, Letters in Oncology Science* (2016); 13(3): 58-63.

[Nuttens] V, Kleeven W, Nactergal B, Servais T, Zaremba S.; Design of IBA CYCLONE®11 cyclotron magnet; *Cyclotrons 2010 – Proceedings*.

[Ollinger] J.M; Model-Based Scatter Correction for Fully 3D PET; *Phys Med Biol.* (1996); 41:153-176.

[Otsuka] M, Ichiya Y, Hosokawa S, Kuwabara Y, Tahara T, Fukumura T, Kato M, Masuda K, Goto I.; Striatal blood flow, glucose metabolism and ¹⁸F-DOPA uptake: difference in Parkinson's disease and atypical parkinsonism; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; (1991); 54: 898-904.

[Pascali] C, Bogni A, Itawa R, Cambiè M, Bombardieri E. [¹¹C]Methylation on a C18Sep-Pak cartridge: a convenient way to produce [N-methyl-¹¹C]choline. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2000;43:195–203.

[PatentSwarm] US 10 023 525 B2: <https://patentswarm.com/patents/US10023525B2>,

[Patlak] C, Blasberg R, Fenstermacher J.; Graphical Evaluation of Blood-to-Brain Transfer Constants from Multiple-Time Uptake Data; *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1983); 3:1-7.

[Patton] JA, Turkington TG; Coincidence imaging with dual-head scintillation camera; *J. Nucl. Med.* (1999); 40:432-441,

[Pauli] GF, Chen SN, Simmler C, et al. Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative ¹H NMR as a Purity Assay. *J. Med. Chem* 2014, 57: 9220-9231.

[Peter] J, Houshmand S, Werner T, Alavi A; Novel global quantitative analysis of temporal lobe epilepsy using FDG-PET; *J Nucl Med* (2016); 57(2):1840-1840.

[Phelps] ME, Huang SC, Hoffman EJ, et al.; Tomographic Measurements of Local Cerebral Glucose Rate in Humans with [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Validation of Method; *Ann. Neurol.* (1979); 6:371-388.

[PhEur] European Pharmacopoeia – 8th edition. Vol. 1 and 2; supplement 8. European Directorate for the Quality of Medicines; 2013,

[PhEur10] European Pharmacopoeia – edition 10.1. Vol. 1 and 2. European Directorate for the Quality of Medicines; Oct.2019.

[PhEurEndotoksyny] European Pharmacopoeia – 8th edition. Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines; 2013. 2.6.14. Bacterial endotoxins.

[PhEurFCH] European Pharmacopoeia – 8th edition. Monography 2793.

[PhEurFDG] European Pharmacopoeia – 8th edition. Monography 1325.

[PhEurResSolv] European Pharmacopoeia – 8th edition. Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines; 2013. Gas chromatography; pp. 43–45.

[Picchio] M, Berardi G, Fodor A, Busnardo E, Crivellaro C, Giovacchini G, Fiorino C, Kirienko M, Incerti E, Messa C, Gianolli L, Di Muzio N.: 11C-Choline PET/CT as a guide to radiation treatment planning of lymph-node relapses in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2014) 41:1270-1279.

- [Pinker] K, Riedl CC, Ong L et al.; The Impact That Number Analyzed Metastatic Breast Cancer Lesions Has on Response Assessment by 18F-FDG PET/CT Using PERCIST; *J Nucl Med* (2016); 57(7):1102-1104.
- [Potter] M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*. 2016;44(5):1499-1505. doi:10.1042/BST20160094.
- [PTFM2016] Szydło M; Synteza i kontrola jakości radiofarmaceutyków zgodnie z systemem GMP; sesja: Medycyna Nuklearna, prowadzący Gorczewski K; Jesienna Szkoła Fizyki Medycznej 2016 – książka abstraktów, pkt.12 str. 9.
- [PTFM2019] Szydło M, Kowalski T, Chmura A, Pocięgiel M, d'Amico A, Sokół M; Optymalizacja warunków wytwarzania [¹¹C]-choliny. *Abstrakt MN_11; Inżynier i Fizyk Medyczny*. 2019; 3(8): 233-234.
- [Quak] E, Lheureux S, Reznik Y, Bardet S, Aide N.; F18-Choline, a Novel PET Tracer for Parathyroid Adenoma?; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2013); 98(8): 3111-3112.
- [Rahbar] K, Afshar-Oromieh A, Jadvar H, Ahmadzadehfar H. PSMA Theranostics: Current Status and Future Directions. *Mol Imaging*. 2018;17:1536012118776068.
- [Reischl] G, Bieg C, Schmiedl O, Solbach C, Machulla HJ. Highly efficient automated synthesis of [¹¹C] choline for multi dose utilization. *Appl Radiat Isot*. 2004;60:835–838.
- [Rietschel]ET, Kirikae T, Schade FU et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal* 8.2 1994; 8(2): 217-225.
- [Roberts] J.I et al.; Neurologists' Knowledge of and Attitudes Toward Epilepsy Surgery. A National Survey; *Neurology* (2015); 84(2):159-166.
- [Rösch] F.; ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga Generators and ⁶⁸Ga Radiopharmaceutical Chemistry on Their Way into a New Century; *Journal of Postgraduate Medicine, Education and Research* (2013); 47(1): 18-25.
- [Rosen] MA, Jones RM, Yano Y, Budinger TF. Carbon-11 Choline: Synthesis, Purification, and Brain Uptake Inhibition by 2-Dimetylaminoethanol. *J Nucl Med*. 1985;26:1424–28.
- [Routsalainen] U, Raitakari M, Nuutila P, et al.; Quantitative Blood Flow Measurement of Skeletal Muscle Using Oxygen-15-water and PET; *J. Nucl. Med.* (1997); 38:314-319.
- [Ruottinen] HM, Partinen M, Hublin C et al.; An FDOPA PET study in patients with periodic limb movement disorder and restless legs syndrome; *Neurology* (2000); 54(2):502-502.
- [Ruth] TJ; The Production of Radionuclides for Radiotracers in Nuclear Medicine; *Reviews of Accelerator Science and Technology (RAST)* (2009); 2: 17.
- [Schaffer] P, Bénard F, Bernsteind A, Buckley K, Celler A, Cockburn N, Corsaut J, Dodd M et al. Direct Production of ^{99m}Tc via ¹⁰⁰Mo(p,2n) on Small Medical Cyclotrons. *Physics Procedia* (2015); 66: 383 - 395.
- [Schirmeister] H, Guhlmann A, Elsner K et al.; Sensitivity in Detecting Osseous Lesions Depends on Anatomic Localization: Planar Bone Scintigraphy Versus 18F PET; *J Nucl Med* (1999); 40:1623-1629.
- [Schöder] H, Larson SM.; Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer; *Seminars in Nuclear Medicine* (2004); 34(4):274-292.
- [Schoeder] H, Larson S.; Positron Emission Tomography for Prostate, Bladder and Renal Cancer; *Sem Nucl Med* (2004); 34: 274-292,
- [Schroder] H, Larson S.M.; Positron Emission Tomography for Prostate, Bladder, and Renal Cancer; *Seminars in Nuclear Medicine*. 1996;26(4):308-314. doi: 10.1016/S0001-2998(96)80006-7
- [Schultz] C.L, et al.; The effect of motion on two-dimensional Fourier transformation magnetic resonance images; *Radiology* (1984) 152(1):117-121.
- [Schulz] HN, Jorgenses BB. *Big Bacteria*. *Annu Rev Microbiol*. 2001; 55: 105-137.
- [Schoorbiers] OCJ, Meijer TWH, Kaanders JHAM, Looijen-Salamon MG, de Geus-Oei LF; Glucose Metabolism in NSCLC Is Histology-Specific and Diverges the Prognostic Potential of 18FDG-PET for Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma; *Journal of Thoracic Oncology* (2014); 9(10):1485-1493.
- [Schwaiger] M, Wester HJ. How Many PET Tracers Do We Need? *J Nucl. Med.* 2011; 52: 36S-41S.

- [Schwarz] SW, Anderson CJ. Radiochemistry and radiopharmacology. In: Christian PE, Bernier D, Langan JK, editors. Nuclear Medicine and PET Technology and Techniques. 5th ed. St. Louis: Mosby; 2004. pp. 137–183.
- [Schwarzenböck] S, Souvatzoglou M, Krause BJ. Choline PET and PET/CT in Primary Diagnosis and Staging of Prostate Cancer. *Theranostics*. 2012;2(3):318-330. doi:10.7150/thno.4008.
- [Serway] RA, Jewett JW. Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics, Chapters 39-46. In: Serway RA, Jewett JW, editors. Nuclear Structure. Thomson Learning Inc; 2008. pp. 1380–17.
- [Shao] X, Hockley BG, Hoareau R, Schnau PL, Scott PJH. Fully automated preparation of [¹¹C]choline and [¹⁸F]fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. *Appl Radiat Isotopes*. 2011;69:403–9.
- [Shepp] L., Logan B.; The Fourier reconstruction of a head section; *IEEE Transactions on Nuclear Science*, 1974;NS-21:21-43
- [Sherman] J, Chin B, Huibers PDT, Garcia-Valls R, Hatton TA. Solvent Replacement for Green Processing. *Environ Health Perspect*. 1998;106:253–271.
- [Shim] SS, Lee KS, Kim BT, et al.; Non-small cell lung cancer: prospective comparison of integrated FDG PET/CT and CT alone for preoperative staging; *Radiology*. 2005; 236:1011-1019.
- [Shukla] A. K., Kumar Utham; Positron emission tomography: An overview; *J. Med. Phys*; 2006 Jan-Mar; 31(1): 13-21,
- [Silverstein] RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007: 127 – 204.
- [Slaets] D, De Bruyne S, Dumolyn C, Moerman L, Mertens K, De Vos F. Reduced Dimethylaminoethanol in [¹⁸F]fluoromethylcholine: an important step towards enhanced tumor visualization. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:2136–2145.
- [Słomski] A, Rudy Z, Bednarski T, Białas P, Czerwiński E, Kapłon Ł, Kochanowski A, Korcyl G, Kowal J, Kowalski P, Kozik T, Krzemień W, Molenda M, Moskal P, Niedźwiecki S, Pałka M, Pawlik M, Raczyński L, Salabura P, Gupta – Sharma N, Silarski M, Smyrski J, Strzelecki A, Wiślicki W, Zieliński M, Zoń N; 3D PET image reconstruction based on Maximum Likelihood Estimation Method (MLEM) algorithm; *Bio-Algorithms and Med.-Systems* (2014), 10(1), pp.1-7.
- [Sörensen] J, Owenius R, Lax M, Johansson S. Regional distribution and kinetics of [¹⁸F]fluciclovine (anti-[¹⁸F]FACBC), a tracer of amino acid transport, in subjects with primary prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2013; 40(3): 349-402,
- [Styer] L, Berg JM, Tymoczko JL. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN; Warszawa 2009.
- [Sukovic] P; Cone beam computed tomography in craniofacial imaging; *Orthod. Craniofacial Res*. 6 (suppl. 1); 2003:31-36.
- [Sureshababu] Waheeda, Mawlawi Osama; PET/CT Imaging Artifacts; *J. Nucl. Med. Technol.* (2005); 33:156-161.
- [Synowiecki] MA, Perk LR, Nijsen FW.; Production of novel diagnostic radionuclides in small medical cyclotrons; *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* (2018); 3:3.
- [Szepke] R.; 1000 słów o atomie i technice jądrowej. Wydawnictwo Ministerstwa Obrony Narodowej (1982), ISBN 83-11-06723-6.
- [Szydło] M, Chmura A, Kowalski T, Pociągiew M, d'Amico A, Sokół M.; Optimisation of [¹¹C]-choline synthesis; *Contemp Oncol* (2018); 22(4): 260-265.
- [Szydło] M, Pogoda D, Kowalski T, Pociągiew M, Jadwiński M, d'Amico A. Synthesis and Quality Control of ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT Tracer used i Prostate Cancer Imaging and Comparison with ¹⁸F-Fluorocholine as a Reference Point. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Emerging Drugs*. 2018; 6:1.
- [Szydło] M., Jadwiński M., Chmura A., Gorczewski K., Sokół M.; Synthesis, isolation and purification of [¹¹C]-choline; *Contemp Oncol* (2016); 20(3):229–236.
- [Tabela radionuklidów PhEur] *European Pharmacopoeia – 8th edition*. Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines; 2013. Table of physical characteristic of radionuclides mentioned in the European Pharmacopoeia; pp. 665–673.
- [Takesh] M, Adams S.; Imaging Comparison between ¹⁸F-FDG-PET/CT and ¹⁸F-Fluoroethyl Choline PET/CT in Rare Case of Thymus Carcinoma Exhibiting a Positive Choline Uptake; *Case Reports in Oncology Medicine* (2013); Article ID 464396.

[Talbot] JN, Fartoux L, Balogova S et al.; Detection of Hepatocellular Carcinoma with PET/CT: A prospective Comparison of 18F-Fluorocholine and 18F-FDG in Patients with Cirrhosis or Chronic Liver Disease; *J Nucl Med* (2010); 51(11):1699-1706.

[Targoński] A, Praisner A. Biomarkery raka stercza. *NOWOTWORY Journal of Oncology*; 2014. 64(3): 258–263.

[Thermo]Fisher Scientific™ picoSpin™ 80 Series II NMR Spectrometer: www.thermofisher.com/order/catalog/product/912A0832.

[Thie] JA.; Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage; *J Nucl Med* (2004); 45: 1431-1434.

[Tomaszuk] M, Kabat D, Lenda-Tracz W, Przegląd zaleceń dotyczących kontroli jakości systemów PET – kierunek zmian; *Inżynier i Fyzyk Medyczny*. (2015); 3:123-132.

[Tong] Shan, Alessio Adam M., Kinahan Paul E.; Image reconstruction for PET/CT scanners: past achievements and future challenges; *Imaging in Medicine*, (2010) vol 2:5, pp529-545.

[Townsend] David N; Physical principles and technology of clinical PET imaging; *Ann Acad Med. Singapore* (2004); 33:133-45.

[Umbehr] MH, Müntener M, Hany T, Sulser T, Bachmann LM. The Role of [¹¹C]-Choline and [¹⁸F]-Fluorocholine Positron Emission Tomography (PET) and PET/CT in Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2013;64(1 Suppl):106–17.

[van Eijk] Carel W.E; Inorganic Scintillators in Medical Imaging; *Phys. Med. Biol.* (2002); 47:R85-R106.

[Vander Heiden] MG, Cantley LC, Thompson CB; Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation; *Science* (2009); 324: 1029-1033.

[Viñas] F, Zamorano L, Mueller RA, Zhaowei J, Chugani H, Fuerst D, Muzik O, Mangner T, Diaz F.; [¹⁵O]-water PET and intraoperative brain mapping: A comparison in the localization of eloquent cortex; *Neurological Research*; (1997); 19(6): 601-608.

[Wagner] HN.; A Brief History of Positron Emission Tomography (PET); *Seminars in Nuclear Medicine*, Vol XXVIII, No 3 (July), 1998: 213-220.

[Welle] CL, Cullen EL, Peller PJ, Lowe VJ, Murphy RC, Johnson GB, Binkovitz LA; 11C-Choline PET/CT in Recurrent Prostate Cancer and Nonprostatic Neoplastic Processes; *RadioGraphics* (2016); 36:279-292.

[Werner] RA, Bluemel C, Allen-Auerbach MS, et al. ⁶⁸Gallium- and ⁹⁹Yttrium-/¹⁷⁷Lutetium: “theranostic twins” for diagnosis and treatment of NETs. *Ann Nucl Med*. 2015; 29(1): 1-7.

[Witkiewicz] Z., Heter J., *Chromatografia gazowa*, WNT, Warszawa 2001.

[Woldring] MG; Radiopharmaceuticals and Good Radiopharmacy Practice; *Pharmaceutisch Weekblad* (1981); 3(1):1285-1301.

[Wollenweber]S.C; Parametrization of a Model-Based 3-D PET Scatter Correction; *IEEE Trans Nuclear Science* (2002); 49:722-727.

[Wong] KK, Zarzhevsky N, Cahill JM et al.; Hybrid SPECT-CT and PET-CT imaging of differentiated thyroid carcinoma; *The British Journal of Radiology* (2009); 82:860-876 (DOI 10.1259/bjr/25645894).

[Wójcik] B, Górski J; Brunatna tkanka tłuszczowa u dorosłego człowieka: występowanie i funkcja; *Endokrynol. Otył. Zab. Przem. Mat* (2011); 7(1):34-40.

[Wu] H, Wang Q, Wang M.; Utility of ¹¹C-Choline Imaging as a Supplement to F-18 FDG PET Imaging for Detection of Thyroid Carcinoma; *Clinical Nuclear Medicine* (2011); 36(2):91-95.

[Wuest] F, Berndt M, Knies T. Carbon-11 Labeling Chemistry Based upon [¹¹C]Methyl Iodide. In: Schaubiger PA, Lehmann L, Friebe M. *PET Chemistry The Driving Force in Molecular Imaging*. Springer; 2007. pp. 184-213.

[Yamaguchi] T, Lee J, Uemura H, et al. Prostate cancer: a comparative study of [¹¹C]-choline PET and MR imaging combined with proton MR spectroscopy. *Eur J Nucl Med. Mol Imaging* 2005; 32 (7 Suppl): 742-48.

[Yamamoto] Y, Nishiyama Y, Kameyama R, Okano K, Kashiwagi H, Deguchi A, Kaji M, Ohkawa M.; Detection of Hepatocellular Carcinoma Using ¹¹C-Choline PET: Comparison with ¹⁸F-FDG PET; *J Nucl Med*. 2008;49:1245-1248.

- [Yang] David J., Inoue Tomio, Kim E. Edmund; Principles of PET/CT; Kim E. Edmund, Lee Myung-Chul, Inoue Tomio, Wong Wai-Hoi; Clinical PET Principles and Applications; (2004); Springer-Verlag New York (44-61). ISBN -387-40854-1.
- [Yonekura] Y, Benua RS, Brill AB, et al. Increased Accumulation of 2-Deoxy-2-[¹⁸F]Fluoro-D-Glucose in Liver Metastases from Colon Carcinoma. JNM 1982, 23: 1133 – 1137.
- [Zappata] F. Handbook for the Assessment of Soil Erosion and Sedimental Using Environmental Radionuclides. In: Wallbrink PJ, Walling DE, He Q, editors. Radionuclides Measurement Using HPGe Gamma Spectrometry. Springer; 2003. pp. 67–96.
- [Zhang] T, Ming L, Zhong J, An S, Wei S.; Beam dynamics study for a small, high current 14 MeV PET cyclotron; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms (2011); 269(24): 2955-2958.
- [Źródło 1] <https://www.meduniwien.ac.at/neuroimaging/diss/mien.pdf>
- [Źródło 2] http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TCS-31_web.pdf
- [Źródło 3] - http://www.cnl.ca/en/home/news-and-publications/bulletins/2015/NRU_decision.aspx
- [Źródło 4] - <http://www.cancernetwork.com/imaging-center/nuclear-medicine-braces-effects-petten-reactor-shutdown>
- [Źródło 5] – Rozporządzenie Ministra Zdrowie w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania
- [Źródło 6] – Relative density, Rozdział 2.2.5; Farmakopea Europejska, edycja 8, European Directorate for the Quality of Medicines.
- [Źródło 7] – Specyfikacja techniczna gęstościomierza oscylacyjnego: <https://www.anton-paar.com/pl-pl/produkty/szczegoly/gestosciomierz-dmatm-4100-m/>
- [Źródło 8] – Monografia 2294, Farmakopea Europejska, edycja 8, European Directorate for the Quality of Medicines.

Marcin Szydło, Michał Jadwiński, Agnieszka Chmura, Kamil Gorczewski, Maria Sokół. *Synthesis, isolation and purification of [¹¹C]-Choline.* Contemp Oncol 2016; 20(3): 229–236

Original paper

[¹¹C]-choline is an effective PET tracer used for imaging of neoplastic lesions and metastases of the prostate cancer. However, its production can be a challenge for manufacturers, as it has not yet been described in Polish or European pharmacopoeia. In this study the technical aspects of [¹¹C]-choline production are described and detailed process parameters are provided. The quality control procedures for releasing [¹¹C]-choline as solutio inieciabilis are also presented. The purity and quality of the radiopharmaceutical obtained according to the proposed method were found to be high enough to safely administer the radiopharmaceutical to patients. Application of an automated synthesizer makes it possible to carry out the entire process of [¹¹C]-choline production, isolation and purification within 20 minutes. It is crucial to maintain all aspects of the process as short as possible, since the decay half-time of carbon-11 is 20.4 minutes. The resulting radiopharmaceutical is sterile and pyrogen-free and of a high chemical, radiochemical, and radionuclide purity proved by chromatographic techniques. The yield of the process is up to 20%. [¹¹C]-choline PET scanning can be used as accurate and effective diagnostic tool in all centers equipped with [¹¹C]-target containing cyclotron.

Contemp Oncol (Pozn) 2016; 20 (3): 229–236
DOI: 10.5114/wo.2016.61566

Synthesis, isolation and purification of [¹¹C]-choline

Marcin Szydło¹, Michał Jadwiński², Agnieszka Chmura¹, Kamil Gorczewski¹, Maria Sokół²

¹PET Diagnostics Department, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland

²Department of Medical Physics, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland

Introduction

Medical imaging using the positron emission tomography method has been proven to be a unique tool in cancer diagnosis due to its sensitivity and specificity [1]. Despite being a relatively new diagnostic method in Poland, PET's popularity continues to grow due to the application of a wide range of possible PET tracers, also outside the oncology field.

In PET imaging, [¹⁸F]-FDG (fluorodeoxyglucose) was one of the first tracers described, and it is still the most popular one due to its high sensitivity to neoplastic processes. However, its value is limited in diagnosing cancers characterised by low glucose metabolism, for example prostate cancer [2], the most commonly diagnosed cancer among men and the second (after lung cancer) most common malignant cause of death. Beside Fluorine-18, tracers containing Gallium-68 [3, 4], Iodine-124 [5], or Carbon-11 are also widely used. The carbon atoms are present in the construction of almost all biologically active compounds. Therefore, the use of isotope Carbon-11 allows the construction of an extremely rich group of PET tracers. [¹¹C]-methionine, [¹¹C]-acetate, and [¹¹C]-choline are the most popular ones [6–8]. However, [¹¹C]-DASB used in imaging of serotonin transporters (SERT) [9] and [¹¹C]-Raclopride, which is applied in imaging of the post-synaptic receptors of dopamine [10], and many others [11] are worth noting.

Increased phospholipid synthesis and increased uptake of choline have been associated with cell proliferation and the transformation process that occurs in tumour cells. It happens because choline is involved in the synthesis of structural components of cell membranes, as well as modulation of trans-membrane signalling [12].

[¹¹C]-choline tracers were revealed to be especially useful in early-state prostate cancer diagnostic imaging [13]. Although imaging with this tracer is a high-cost procedure due to the short half-life of this agent and the requirement of its on-site production, choline PET/CT can detect both bone and soft-tissue metastases with a single examination, making it cheaper.

This study was focused on the key stages of the synthesis and quality control of [¹¹C]-choline. The use of this tracer in PET imaging is very vast. However, its production can be a challenge for manufacturers because it has not yet been described in Polish or European pharmacopoeia.

It is also worth noting that in 2012 [¹¹C]-choline was approved by the U.S. Food & Drug Administration (FDA) for clinical use.

Material and methods

The procedure of [¹¹C]-choline production fulfils the Guidelines on Good Radiopharmacy Practice issued by the Radiopharmacy Committee of the EANM (European Association of Nuclear Medicine) [14]. Its general aspects, provided by Hockley *et al.* [15], have been developed and presented in detail together with the quality-assurance procedures.

Isotope production

The starting point of the production of Carbon-11-labelled radiopharmaceuticals is the $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction [16] – it takes place on the gaseous target of the Cyclone 18/9 (IBA) cyclotron with protons of 18 MeV energy.

The radioisotope is produced by proton irradiation (target current = 38 μA) of a gas N_2/O_2 mixture (the nitrogen target gas contains 0.5% oxygen, filling pressure equals 19 bar) with the proton beam energy of 18 MeV. The in-target activity of ^{11}C - CO_2 peaks at 20–25 minutes of beam time, yielding 68 GBq.

Synthesis of ^{11}C -methyl iodide

The ^{11}C - CO_2 produced in a cyclotron is trapped on the molecular sieve of the synthesis module. To increase their efficiency the molecular sieves are conditioned. This process involves removing moisture from the filling volume by heating it to a temperature of 250°C and simultaneously purging with nitrogen. The first conditioning should last 60 minutes, and before each subsequent use of the molecular sieves, the conditioning can be shortened to

20 minutes. The Bioscan synthesis module is used for preparation of ^{11}C -choline. It consists of the Mel-PLUS™ unit adapted for the synthesis of ^{11}C -methyl iodide and the Reform-PLUS™ unit in which the ^{11}C - CH_3I precursor's synthesis, isolation, purification, and final product collection take place. The modules are installed in hot cells to decrease the operator's exposure to ionising radiation. Since Carbon-11 is produced in the form of a gaseous ^{11}C -carbon dioxide, the chamber is adapted to collect potentially radioactive air from inside of the chambers.

The release of ^{11}C - CO_2 into the reaction vial is performed identically as the conditioning: by heating the molecular sieves of the Mel PLUS™ unit to a temperature of 250°C for 90 seconds while purging the sieves with a nitrogen gas flow of 15 ml/min. Using a vial, ^{11}C - CO_2 is reduced to methanol with LiAlH_4 in a tetrahydrofuran (THF) environment. After the evaporation of THF from the reaction mixture, a 57% solution of hydriodic acid is added to the reaction vial – it reacts with ^{11}C -MeOH and forms ^{11}C - CH_3I [17]. Figure 1 shows the radioactivity and oven temperature changes taking place during the subsequent stages of the ^{11}C -Mel synthesis.

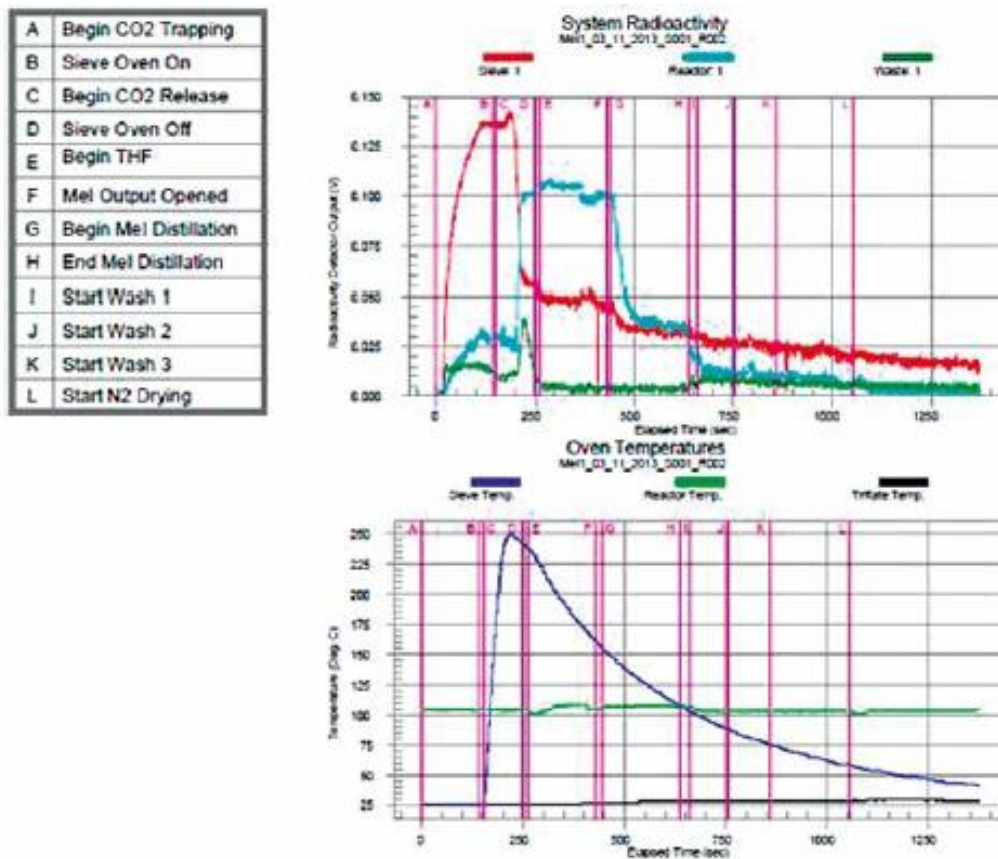
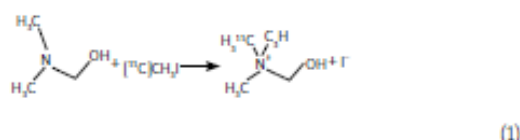


Fig. 1. System activity and oven temperature changes during Mel synthesis

[¹⁴C]-CH₃I distillation and reaction with the precursor

The [¹⁴C]-methyl iodide distilled from the Mel PLUS™ unit is then transported into the vial by a constant flow of nitrogen (10 mL/min). The vial, which is a part of the ReFORM PLUS™ kit, contains the precursor, dimethylaminoethanol (DMAE) dissolved in dimethylformamide (DMF) in the ratio of 10 µL DMAE : 200 µL DMF. The reaction of [¹⁴C]-CH₃I with DMAE takes place almost instantaneously at room temperature, according to the formula [18]:



Competitive reactions with water, saline, or ethanol may also take place because methyl iodide is highly reactive. Such reactions are facilitated by the diffusion of the mentioned reagents into the ReFORM PLUS™ tubing assembly. Thus, the valves of the ReFORM PLUS™ kit should be carefully checked and closed. The reagents may be loaded after double-checking the valves.

Isolation and purification of [¹⁴C]-choline

The isolation and purification process is a four-step procedure conducted by the ReFORM PLUS™ unit. First, 1 mL of ethanol is added to the reaction vial to homogenise the mixture. Afterward, the whole mixture is extracted to solid phase on a cation exchange resin (Sep-Pack Accell Plus CM; Waters [8]). As the ionic compound, [¹⁴C]-choline is captured by the SPE column, and the remaining components of the reaction mixture are removed. To confirm the proper purification of the product, especially from the insoluble substances present in organic solvents, the SPE

column should be washed twice with 5 mL of water. The final product is released from the SPE column using 0.9% saline solution and collected in a sterile, pyrogen-free vial with septum enclosure after the previous filtration on a 0.22-µm membrane sterile filter. Figure 2 shows the changes of the system radioactivity during the reformulation process.

In our first attempts at the synthesis of [¹⁴C]-choline a SPE SCX Maxi-Clean (Altech) column was used instead of a Sep-Pack Accell Plus CM. However, the product could not be released from SCX Maxi-Clean cartridge with saline.

In a series of eleven subsequent approaches [¹⁴C]-choline was obtained with the yield up to 20%, as measured relative to the activity of [¹⁴C]-CO₂ captured on molecular sieves.

The synthesised and purified product is a sterile, colourless solution of pH 7.5–8.5. Its sterility is determined by an accredited laboratory.

Quality control

The Polish and European Pharmacopoeia do not provide any guidelines on [¹⁴C]-choline quality control. However, some quality parameters can be customised on the basis of the general information from the pharmacopoeial chapters [19]: Potentiometric determination of pH (2.2.3), Gas chromatography (2.2.28), Identification and control of residual solvents (2.4.24), Sterility (2.6.1), and Bacterial endotoxins (2.6.14).

The quality control procedures based on the mentioned chapters are described in the subsequent points.

Chemical and radiochemical purity

The chemical and radiochemical purity are controlled using UHPLC apparatus DIONEX Ultimate 3000 with UV-VIS DAD, scintillation detector, and Corona CAD.

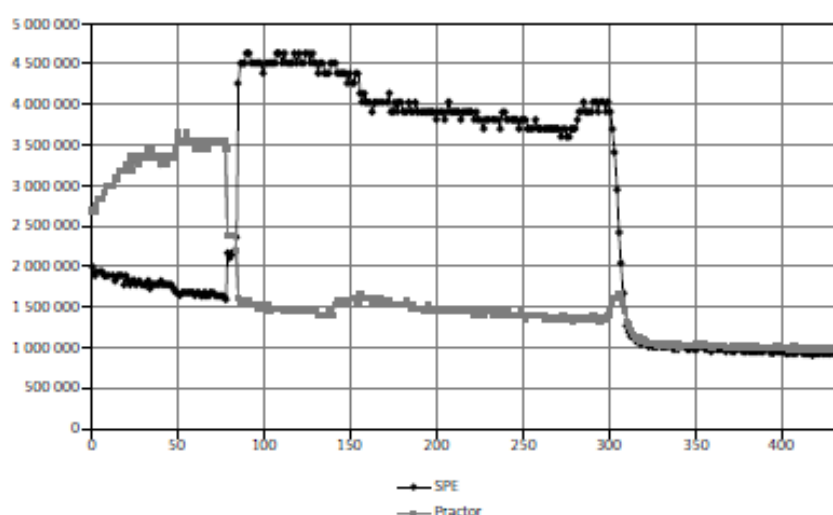


Fig. 2. System radioactivity changes during the reformulation process

This study applies two analytical approaches to serve different application purposes. The first method, described by Boschi *et al.* [20], uses a phase-reversed C18 column (μ Bondapak® C18; 3.9 × 300 mm; Waters) and a mobile phase, which is a mixture of 3 mM sodium 2-naphthalenesulfonate (in place of 2-naphthalenesulfonic acid) with the addition of 1 mM H₃PO₄ with a flow rate of 1 ml/min.

The second approach is especially suitable for quality assurance, impurity analysis, and trace-level residue analysis, and it suits qualitative, confirmative, and semi-quantitative applications. The HPLC method, benefiting from an Acclaim® Trinity™ trimode column, is able to separate cations, anions, and neutral species in a single run. It is based on the method described by Crafts *et al.* [21] and combines an Acclaim Trinity P1 column (3.0 × 50 mm; DI-ONEX) – a high-purity silica column designed for pharmaceutical applications – and three mobile phases (with flow rate 0.7 ml/min): 200 mM of ammonium acetate (pH = 4) (A), distilled water (B), and acetonitrile (C) with gradients of 5% (A), 35% (B), and 60% (C) (gradient time from 0 to 10 min) and of 40% (B) and 60% (C) (gradient time from 10 to 25 min).

The radiochemical detection was carried out using a scintillation detector with a CsI crystal.

Both analytical methods identify [¹⁴C]-choline. However, the first technique suffers from a detection limit that is too high, although the resolution of the choline signal detected at the retention time of 9.5 minutes (on the UV-VIS detector tuned to the wavelength of 297 nm) is satisfactory (Fig. 3). In the second method (the detection performed using charged aerosol detector – Corona CAD) the retention time is 1.2 minutes and the resolution is worse, but the detection limit is over 10-times better (Fig. 4).

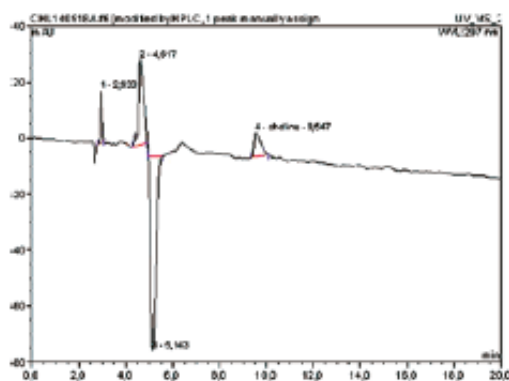


Fig. 3. Chromatogram of choline chloride method 1

Nuclide identification

The radionuclide identification was based on the results of gamma radiation energy measurements [22] and the calculation of a radionuclide half-life.

For the positron emitting isotopes – such as Carbon-11 – the energy of the detected gamma quanta should be 511 keV, as the positrons annihilate with electrons. The expected half-life of Carbon-11 is 20.4 minutes [23]. The decay properties of Carbon-11 are shown in Table 1.

The gamma-ray spectroscopy was done using RAYTEST MUCHA multichannel analyser with NaI 3 × 3" detector. The 511 keV photons and a sum peak of 1022 keV are observed in the gamma-ray spectrum, thus confirming the positron decay mechanism of the obtained radionuclide, as shown in Fig. 5.

The radiotracer half-life was obtained using calibrated radiometric method and applying an ionisation chamber dose calibrator for the activity measurements. Each activity measurement lasts 15 minutes and is repeated every minute. The radionuclide half-life can be calculated using the following equation [24]:

$$T_{1/2} = -\ln 2 \left(\frac{dt}{\ln \left(\frac{A_t}{A_0} \right)} \right) \quad (2)$$

where:

dt – time difference, A_t – ending activity, and A₀ – starting activity.

The half-life time equals 20.3 ± 0.1 minutes and uniquely identifies the nuclide as Carbon-11.

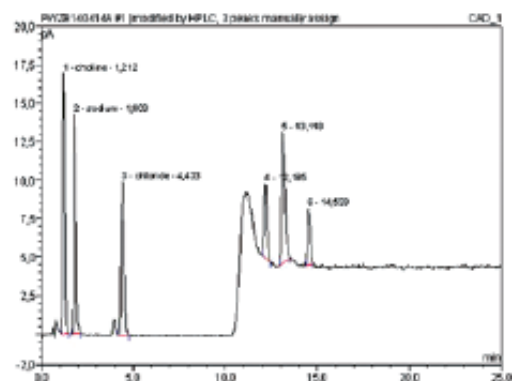


Fig. 4. Chromatogram of choline chloride method 2

Table 1. Carbon-11 decay scheme

Parent nuclide	T _{1/2}	Decay mode	E _{max}	Relative intensity	E _γ	Daughter nuclide
¹¹ ₆ C	20.38 min	+	960.2 keV	99.759%	511 keV	¹¹ ₆ C

Bacterial endotoxin purity

The same bacterial endotoxin limit for [¹¹C]-choline was accepted as [¹⁸F]-FDG, i.e. < 175 EU/dose; maximum dose 10 ml per patient [25].

The bacterial endotoxin test was performed using Endosafe®-PTS™ (Charles River) apparatus and the kinetic chromogenic LAL-test method [26] was applied, in accordance with the European Pharmacopoeia [25].

Residual solvents

The methodology for organic residual solvents testing was in accord with the pharmacopoeial method [27]. However, some parameters (such as split ratio and total flow rate) were modified by a trial-and-error method, to adjust the procedure to the equipment used in the analysis.

A gas chromatography system equipped with an HP-Innowax column (30 m × 0.32 mm; film: polyethylene glycol 0.50 μm) was used. The adjusted parameters were as follows: the volume of sample injection was 1 μl; split 5.0 : 1 at a total flow of 16 ml/min with helium as a carrier. The column's oven temperature: 50°C. Detection was carried out on an FID detector.

Radionuclide purity

Gamma spectroscopy [28] of the final sample was carried out in a Canberra-Packard gamma spectrometer equipped with a high-purity germanium (HPGe) detector. The spectral measurements were performed two days after the synthesis. The spectrum was measured for 180 minutes to integrate enough counts for high a signal-to-noise ratio (S/N) and to resolve the spectrum. The sample volume should be at least 1 ml. The gamma spectrum, shown in Fig. 6, was analysed using Genie 2000 software and the radionuclide content was determined to be below 0.1%.

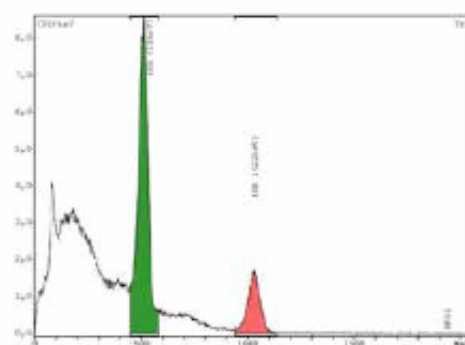


Fig. 5. Gamma-ray spectrum of Carbon-11

Results

The highest activity output of Carbon-11 isotope produced in a cyclotron target took place in the first minute of irradiation. During the first minute of the process the Carbon-11 radioactivity reached about 3.7 GBq. A target irradiation for 25 minutes yielded about 68.45 GBq of Carbon-11 radioactivity. Saturation of the target was obtained after about two hours and the activity gained was 110 GBq. Then, the activity yield decreased – this was due to saturation of the target material and the decay processes of Carbon-11.

Within five minutes, the target was discharged and the product – [¹¹C]-CO₂ – was trapped on the molecular sieves. The operating time of the Mel PLUS™ unit, from the start of heating of the molecular sieves until the end of the [¹¹C]-methyl iodide distillation was approximately 11 minutes, and the yield of the released [¹¹C]-CO₂ from the molecular sieves was between 85 and 90%. Reformulation and collection of the product in the final product vial took

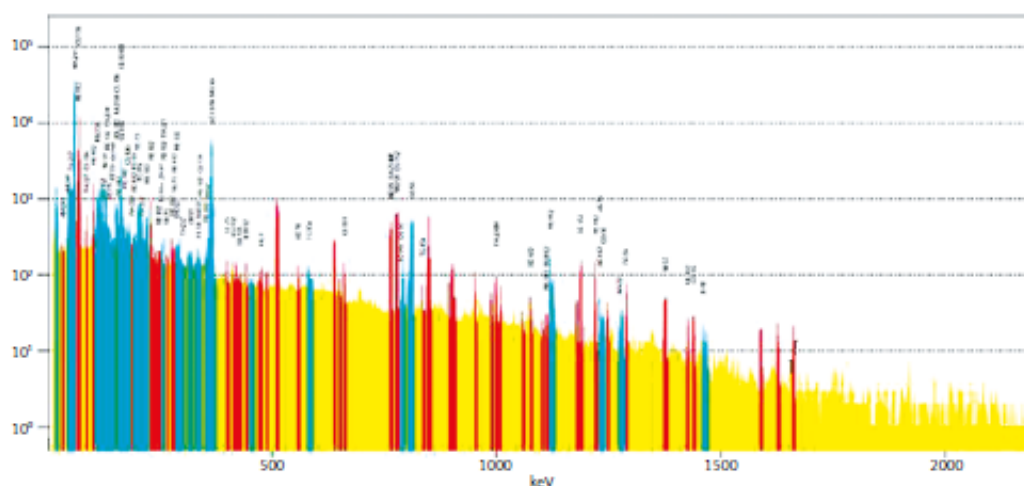


Fig. 6. HPGe spectrum of radionuclides content

six minutes. Thus, the total time required for production, purification, and packaging of [^{11}C]-choline equaled approximately a half-life time of Carbon-11, with a yield of up to 20%, as calculated on the basis of activity. In practice, when starting from an initial activity of 65 GBq, it was possible to obtain 14 GBq of [^{11}C]-choline in a form of sterile, pyrogen-free isotonic solution.

Table 2 summarises the quality control data of the final product (its chemical, radiochemical, radionuclidic, and biological purities). The results confirm the batch-to-batch reproducibility of the production process and identify a radionuclide as Carbon-11 by a match of measured decay characteristics to the listed values. The radiochemical purity, determined by liquid chromatography method, exceeded 99%, and the amount of radionuclide impurities was less than 0.1%. The levels of ethanol and dimethylformamide meet the pharmacopoeia requirements [29], as confirmed by gas chromatography.

Application of Corona CAD detector enhances the signal-to-noise ratio and chemical purity of the synthesised [^{11}C]-choline is at least 98%.

Discussion

Radiopharmaceuticals are only supplied for use in patients if they have been correctly processed, checked and stored in accordance with the defined procedures and released by a competent person. Thus, the quality control procedure is an important part of the production process. Control operations involve chemical purity control, radiochemical purity control, nuclide identification, bacterial endotoxin purity control, and residual solvent detection.

Chemical purity of radiopharmaceuticals refers to the amount of undesirable chemical species present. Chemical impurities include all nonradioactive substances that

can either affect the radiolabeling process or directly produce adverse biological effects [30].

Radiochemical purity is defined as the percentage of the total radioactivity present in the desired chemical form in a radioactive pharmaceutical [31]. This kind of purity is a crucial issue in a diagnostic PET image interpretation, especially in case of short-lived radiopharmaceuticals – an unacceptable radiochemical purity can lead to radiopharmaceutical unspecific uptake, which may result in irradiation of critical organs and false diagnosis. The described [^{11}C]-choline manufacturing process allows eight doses of the radionuclide to be prepared for clinical applications, whereas total time required to produce one batch of the radiopharmaceutical, including quality control, is approximately one hour, which allows to produce three series per working day with a total number of 24 doses of [^{11}C]-choline.

Another radiotracer with a similar use as [^{11}C]-choline is [^{18}F]-fluoromethylcholine, and its manufacturing processes is described elsewhere [8]. Due to [^{18}F]-labelling, the half-life of [^{18}F]-fluoromethylcholine is longer (109 minutes vs. 20 minutes in the case of [^{11}C]), whereas the [^{18}F] positron range is shorter [32]. The longer half-life makes it possible to distribute the product away from the manufacturing site. However, the [^{11}C]-choline is preferred for prostate PET/CT imaging due to better distribution and higher assimilation of this tracer in the patient's body as compared to [^{18}F]-fluoromethylcholine [33, 34] – the advantage of the latter is its nearly four-times longer half-life, which makes shipping possible and facilitates commercial availability of the choline containing tracer.

The purity and quality of the obtained radiopharmaceutical are high enough to safely administer it to patients. The production is also safe for the operator – due to the

Table 2. Experimental quality control data

Test	QUALITY CONTROL					
	Acceptance criteria	Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 4	Batch 5
pH	4.5–8.5	8.23	8.16	8.27	8.19	8.29
Appearance	Clear, colourless	Clear, colourless	Clear, colourless	Clear, colourless	Clear, colourless	Clear, colourless
EtOH	≤ 5000 µg/ml	4251.36 µg/ml	3017.87 µg/ml	3981.82 µg/ml	3964.24 µg/ml	3682.47 µg/ml
DMF	≤ 880 µg/ml	717.62 µg/ml	730.56 µg/ml	662.97 µg/ml	877.21 µg/ml	710.29 µg/ml
DMAE	10 µg/ml	< 7 µg/ml	< 7 µg/ml	< 7 µg/ml	< 7 µg/ml	< 7 µg/ml
Radiochemical purity	≥ 95% of [^{11}C]-choline	99.09%	99.36%	99.20%	99.32%	99.30%
Gamma-ray identification	511 ± 10 keV	511 keV	512 keV	514 keV	514 keV	510 keV
Radionuclidic purity	≥ 99.9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%	> 99.9%
Half-life	19.9–20.9 min	20.3 min	20.3 min	20.3 min	20.4 min	20.2 min
Bacterial endotoxin	Ph. Eur. Conform (< 175 IU/ml)	< 10 IU/ml	< 10 IU/ml	< 10 IU/ml	< 10 IU/ml	< 10 IU/ml
Sterility	Ph. Eur. Conform	Sterile	Sterile	Sterile	Sterile	Sterile

short half-life of Carbon-11, radiological contamination in the hot cell is reduced to a safe level within two hours.

[¹¹C]-choline-PET/CT may offer new hope to patients with prostate cancer and lymph node metastasis because current imaging modalities (including transrectal ultrasound, MRI, CT, and bone scan) demonstrate poor performance in the diagnosis and staging of this disease. [¹¹C]-choline seems also to open a promising path for the study of genetic disorders involving metabolic alternations of choline-containing metabolites [35].

Conclusions

The described [¹¹C]-choline manufacturing process allows eight doses of the radionuclide to be prepared for clinical applications.

The total time required to produce one batch of the radiopharmaceutical, including quality control, is approximately one hour, which allows the production of three series per working day with a total number of 24 doses of [¹¹C]-choline.

The radiopharmaceutical purity and its quality are high enough to safely administer the radiopharmaceutical to patients. The production is also safe for the operator.

All cyclotron-PET centres equipped with a [¹¹C]-target containing cyclotron can consider using [¹¹C]-choline because it has better diagnostic properties over Fluorine-18 analogue.

The authors declare no conflict of interest.

References

- Jones T. The role of positron emission tomography within the spectrum of medical imaging. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 207-11.
- Jadvar H. Molecular imaging of prostate cancer with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose PET. *Nat Rev Urol* 2009; 6: 317-23.
- Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, et al. PET imaging with a [⁶⁸Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 40: 486-95.
- Al-Nahhas A, Win Z, Szyzko T, Singh A, Nanni C, Fantì S, Rubello D. Gallium-68 PET: A New Frontier in Receptor Cancer Imaging. *Anticancer Research* 2007; 27: 4087-94.
- Chacko AM, Divgi CR. Radiopharmaceutical chemistry with iodine-124: a non-standard radiohalogen for positron emission tomography. *Med Chem* 2011; 7 (5 Suppl): 395-12.
- Comar D, Carton JD, Maziere M, Marazano C. Labeling and Metabolism of Methionine-Methyl-¹¹C. *Eur J Nucl Med* 1976; 1: 11-4.
- Soloviev D, Tamburella C. Captive solvent [¹¹C]acetate synthesis in GMP conditions. *Appl Radiat Isotopes* 2006; 64: 995-1000.
- Shao X, Hockley BG, Hoareau R, Schnau PL, Scott PJH. Fully automated preparation of [¹¹C]-choline and [¹⁸F]-fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. *Appl Radiat Isotopes* 2011; 69: 403-9.
- Meyer JH, Wilson AA, Sagrati S, et al. Serotonin transporter occupancy of five selective serotonin reuptake inhibitors at different doses: an [¹¹C]DASB positron emission tomography study. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 826-35.
- Kapur S, Remington G, Jones C, Wilson A, Dasilva J, Houle D, Zisursky R. High levels of dopamine D-2 receptor occupancy with low-dose haloperidol treatment: A PET study. *Am J Psychiatry* 1996; 153: 948-50.
- Shao X, Hoareau R, Runkle AC, Tluczek IJM, Hockley BG, Henderson BQ, Scott PJH. Highlighting the versatility of the TracerLab synthesis modules. Part 2: fully automated production of [¹¹C]-labeled radiopharmaceuticals using a TracerLab FX₂™. *J Label Compd Radiopharm* 2011; 54: 819-38.
- de Jong IJ, Pruim J, Elsinga PH, Vaalburg W, Mensink HJ. Preoperative Staging of Pelvic Lymph Nodes in Prostate Cancer by ¹¹C-Choline PET. *J Nucl Med* 2003; 44 (3 Suppl): 331-35.
- Yamaguchi T, Lee J, Uemura H, et al. Prostate cancer: a comparative study of ¹¹C-choline PET and MR imaging combined with proton MR spectroscopy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32 (7 Suppl): 742-48.
- Elsinga P, Todde S, Penuelas I, Meyer G, Farstad B, Faviere-Chauvet A, Mikolajczak R, et al. Guidance on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37 (5): 1049-62.
- Scott PJH, Hockley BG. Radiochemical Syntheses Vol. 1: Radiochemicals for Positron Emission Tomography. In: Hockley, BG, Henderson B, Shao X. Synthesis of [¹¹C]-Choline Chloride ([¹¹C]CHL). John Wiley & Sons 2012; 169-177.
- Hara T, Yuasa M. Automated synthesis of [¹¹C]-choline, a positron-emitting tracer for tumor imaging. *Appl Radiat Isotopes* 1999; 50: 531-33.
- Marazano C, Maziere M, Berger G, Comar D. Synthesis of methyl iodide-¹¹C and formaldehyde-¹¹C. *Int J Appl Radiat Is* 1977; 28 (1-2 Suppl): 49-52.
- Rosen MA, Jones RM, Yano Y, Budinger TF. Carbon-11 Choline: Synthesis, Purification, and Brain Uptake Inhibition by 2-Dimethylaminoethanol. *J Nucl Med* 1985; 26: 1424-28.
- European Pharmacopoeia – 8th edition Vol. 1 and 2. European Directorate for the Quality of Medicines, 2013.
- Boschi S, Lodi E, Cicoña G, et al. Development of a modular system for the synthesis of PET [¹¹C]-labeled radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isotopes* 2009; 67: 1869-73.
- <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87447-PO-11CS-A-PI-Counterion-CAD-18Oct2010-IPN2610-01.pdf>
- Hine GJ. Instrumentation In Nuclear Medicine: Vol. 1. In: Hine GJ. Sodium Iodine Scintillators. Academic Press Inc 1967; 95-119.
- Table of physical characteristic of radionuclides mentioned in the European Pharmacopoeia. In: European Pharmacopoeia – 8th edition. Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines, 2013; 665-673.
- Serway RA, Jewett JW. Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics, Chapters 39-46. In: Serway RA, Jewett JW. Nuclear Structure. Thomson Learning Inc 2008; 1380-17.
- European Pharmacopoeia – 8th edition; monography 1325.
- http://pharmacoe.unm.edu/nuclear_program/freelessonfiles/Vol1Lesson5.pdf
- Gas chromatography. In: European Pharmacopoeia – 8th edition Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines, 2013; 43-45.
- Zappata F. Handbook for the Assessment of Soil Erosion and Sedimental Using Environmental Radionuclides. In: Wallbrink PJ, Walling DE, He Q. Radionuclides Measurement Using HPGe Gamma Spectrometry. Springer 2003; 67-96.
- Identification and control of residual solvents. In: European Pharmacopoeia – 8th edition Vol. 1. European Directorate for the Quality of Medicines 2013; 141-145.
- Schwarz SW, Anderson CJ. Radiochemistry and radiopharmacology. In: Christian PE, Bemier D, Langan JK, eds. Nuclear Medicine and PET Technology and Techniques, 5th ed., Mosby, St. Louis 2004; 137-183.
- Mahoney DW, McGough CG. Alternative Radiochemical Purity Testing Procedures for the Compounded Radiopharmaceuticals Approved from 1988-Washington, DC. Apha 1998.
- DeGrado T, Baldwin S. Synthesis and evaluation of (18)F-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. *J Nucl Med* 2001; 42: 1805-14.
- Umbuhr MH, Müntener M, Hany T, Sulser T, Bachmann IM. The Role of [¹¹C]-Choline and [¹⁸F]-Fluorocholine Positron Emission Tomography (PET) and PET/CT in Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol* 2013; 64 (1 Suppl): 106-17.

34. Picchio M, Berardi G, Fodor A, et al. ^{18}F -Choline PET/CT as a guide to radiation treatment planning of lymph-node relapses in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41: 1270-79.
35. Małyk J, Rybczyńska J, Piotrowski Q, Koziełski R. Evaluation of calretinin immunohistochemistry as an additional tool in confirming the diagnosis of Hirschsprung disease. *Pol J Pathol* 2014; 65: 34-9.

Address for correspondence

Marcin Szydło
PET Diagnostic Department
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center –
Institute of Oncology
Branch in Gliwice
Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice, Poland

Submitted: 25.09.2015

Accepted: 30.11.2015

The importance of [¹¹C]-choline as a PET/CT marker has been extensively described, although its production presents considerable technical difficulties. The main ones are short half-lives and the occurrence of dimethylformamide (DMF) as a residual solvent. While the losses resulting from the radionuclide decay can be minimised by shortening the duration of the process, the best solution for reducing the content of DMF is its elimination from the reaction environment. In the current work two methods are compared for [¹¹C]-choline synthesis – a green chemistry approach (with ethanol as a green solvent) and a dry synthesis. The results were compared with each other and with those of the method based on DMF. The solid phase synthesis proved to be the most effective in total elimination of DMF; its final release was the highest, and the synthesis time was the shortest. The optimised synthesis led to the formation of the desired radiotracer with a high radiochemical yield (65% ±3%) in a short production time (12 min) and the residual precursor in the final product at the level of 1 µg/ml. 27% increase of the saturation yield was possible, which resulted in 9 GBq higher activity from 40 minutes of beaming. Each test batch passed all standard quality control requirements, and the levels of residual DMEA were below the limits that have been published in the last Pharmacopoeia monograph.

Key words: PET chemistry, carbon-11, SPE, ¹¹C-choline, cyclotron, DMF, dimethylformamide, European Pharmacopoeia.

Contemp Oncol (Pozn) 2018; 22 (4): 260–265
DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2018.81751>

Optimisation of [¹¹C]-choline synthesis

Marcin Szydło¹, Agnieszka Chmura¹, Tomasz Kowalski¹, Mateusz Pocięgiel¹, Andrea d'Amico¹, Maria Sokół²

¹PET Diagnostics Department, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland

²Department of Medical Physics, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Poland

Introduction

Cyclotrons are the most commonly used device for positron-emission isotope production by charged particle-induced nuclear reactions. The radioisotope production for diagnostic imaging purposes like ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, and ¹⁸F is commonly achieved in hospital-based cyclotrons. The principal advantage of such an approach is the high specific activities (SA) that can be obtained through the (p,xn) and (p,α) reactions resulting in the product being a different element from the target [1, 2].

Carbon-11 is particularly suited for labelling compounds with short biological half-lives. It is a positron-emitting radionuclide with a half-life of 20.3 min, which finds widespread use as a tracer in PET. Because carbon atoms are the basic element for biomolecules, a large amount of carbon-11 labelled compounds are currently synthesised and used in diagnostics to investigate different metabolic pathways reflecting the heterogeneity of the malignant tumours. In fact, easy-to-introduce carbon substituents are present in the majority of drugs and bioactive compounds.

[¹¹C]-choline is a tracer applied for PET/CT imaging of prostate cancer [3] and brain tumours [4], given that the cancer cells, which rapidly proliferate, are characterised by a greater uptake of choline, a constituent of membrane phospholipids [5].

Due the short half-life of carbon-11 and relatively low yield of the production process, the [¹¹C]-choline production is limited to centres equipped with a cyclotron. The radiosynthesis process, including purification, formulation, and quality control, should generally not exceed three half-lives of the radionuclide and can be fulfilled even for the short-lived PET radionuclides (half-lives from less than a few hours to a few days). There are definite advantages in using short-lived radionuclides, such as a low radiation dose associated with each study, the possibility of serial studies, sometimes on the same day for tracers such as carbon-11, and minimising or even eliminating the risks associated with radioactive waste [1]. On the other hand, for very short-lived radionuclides an in-site chemical lab is necessary. Clinical use of these radionuclides requires extensive validation, and strict operational conditions are essential as well as strict control of product quality before its application. Any subsequent change in the synthesis conditions should be re-validated.

Previously [6] a safe and reliable method for preparing [¹¹C]-choline and a description of the quality assurance procedures was presented. This process of synthesis fulfils the Guidelines on Good Radiopharmacy Practice issued by the Radiopharmacy Committee of the European Association of Nuclear Medicine (EANM) [7], but also presents some weaknesses. First of all, the actual yield of the synthesis product is only about 20%. Another disadvantage is the solvent used – dimethylformamide (DMF), being a Class 2 solvent. Its average content (740 µg/ml) in the final product is far below the limit imposed by the European Pharmacopoeia (880 µg/ml) [8], but according to the recommendations of the International Council for Harmonisation

of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Class 2 solvents should be limited due to their potential toxicity [9].

The main aim of this work was to modify the procedure in such way as to eliminate DMF from the final product as well as to increase the efficiency of the final product activity and its yield. Two different approaches were tested: the [¹⁴C]-choline synthesis with green chemistry approach (with ethanol as a green solvent) [10] and a dry synthesis. The results were compared with those reported for DMF-based methods [6].

Material and methods

Materials

The chemicals were purchased from ABX Advanced Biochemical Compound and the solvents from Avantor Performance Materials Poland. The substrates were used without further purification. Target gas mixture (N₂ + 0.5% O₂) was purchased from Linde.

For preparation of [¹⁴C]-choline, Sep-Pak Plus Accell CM cation-exchange cartridge and Oasis HLB Plus Short reverse phase cartridge were purchased from Waters and used, as received, without any preconditioning.

To assure sterility of the final product a MILLEX-GS 0.22 µm filter unit was used.

Instrumentation

The radioactivity of the [¹⁴C]-choline tracer and carbon-11 half-life was measured using a dose calibrator ISOMED 1010.

The HPLC analysis of chemical and radiochemical purity was done using an Acclaim Trinity HPLC column from Thermo Fisher Scientific. The HPLC system (DIONEX Ultimate 3000) was equipped with a UV-VIS DAD, scintillation detector (Bioscan Flow-Count), and Corona CAD (ESA). Three mobile phases were used: 200 mM of ammonium acetate (pH = 4) (A), distilled water (B), and acetonitrile (C) with gradients of 5% (A), 35% (B), and 60% (C) (gradient time from 0 to 10 min), and of 40% (B) and 60% (C) (gradient time from 10 to 25 min), with a flow rate of 0.7 ml/min.

Gamma radiation energy was measured with Raytest MUCHA multichannel analyser.

Bacterial endotoxin test was performed using Endosafe-PTS apparatus (Charles River).

Radionuclide purity was checked using a Canberra-Packard gamma spectrometer with a High-Purity Germanium (HPGe) detector. The spectra were acquired one day after synthesis, and the spectrum acquisition time was three hours.

The concentrations of dimethylaminoethanol (DMAE) and the residual solvents (ethanol and DMF) were determined using an Agilent 6850 gas chromatography system equipped with an autosampler and a flame ionisation detector (split ratio 5.0: 1 at a total flow 16 ml/min with helium as a carrier). An HP-Innowax column (30 m × 0.32 mm with 0.50 µm polyethylene glycol film) was used.

The final product quality control procedures were performed according to the methodology described in previ-

ous work [6]. Sterility testing was carried out by a certified laboratory.

Isotope production

The general procedures of [¹⁴C]-choline production and quality control management are based on the recommendations of Hockley *et al.* [11] with further modifications [6].

The starting point for the production of the carbon-11 labelled radiopharmaceuticals is the ¹⁴N(p,α)¹¹C nuclear reaction. The optimum energy for this reaction is between 4 and 20 MeV, whereas the cross-section falls beyond about 15 MeV [12, 13].

The reaction takes place in the gaseous target of the IBA Cyclone 18/9 cyclotron with a fixed energy of 18 MeV for protons and 9 MeV for deuterons.

A gas target consists of three main parts: collimator, a window holder that holds two foils: titanium and aluminium, and the target body (Fig. 1).

The thickness of the aluminium window is selected to achieve 16 MeV of an effective beam energy on target. The target body is made out of aluminium to reduce activation and radiochemical contamination, and to assure proper cooling.

The radioisotope is produced by irradiation of a gaseous N₂/O₂ mixture (the nitrogen target gas containing 0.5% oxygen) with 16 MeV protons. The target mixture fills an irradiation chamber of approximately 50 cm³.

The filling pressure was 17 bar. The reduction from 20 to 17 bar as compared to the previous technology [6] made it possible to increase the saturation yield from 3.11 to 3.96 GBq/µA (27% increase). Lowering of the filling pressure allows also the target current to be increased to the maximum level provided by the manufacturer, i.e. 40 µA. The optimisation of these parameters leads to an increase of the in-target activity of [¹⁴C]-CO₂ from 68 GBq [6] to 77 GBq at the same time.

The calculation of the saturation yield takes into account the correction factor accounting for the radionuclide decay during counting and is done according to the equation [14]:

$$Y = \frac{A}{I(1 - \exp(-\frac{t_{irr}}{t_{1/2}}))}$$

- Y – saturation yield
A – EOB (end of beam) activity
I – integrated target current
t_{1/2} – half life of the produced radioisotope
t – beam time



Fig. 1. Gas target main parts: collimator, window holder that holds two foils: titanium and aluminium, and the target body

The saturation yields were calculated for the activity values obtained at the beam time equal to twice the half-life time of the radionuclide (40 minutes in case of carbon-11).

Synthesis of [¹¹C]-methyl iodide

Conversion of the cyclotron-produced [¹¹C]-CO₂ to [¹¹C]-methyl iodide ([¹¹C]-MeI) and subsequent radiolabelling were performed using an automated Bioscan synthesis module. It consists of a Mel-PLUS™ unit, adapted for the synthesis of [¹¹C]-methyl iodide, and a Reform-PLUS™ unit, where the [¹¹C]-MeI precursor's synthesis, isolation, purification, and the final product collection take place. The units are installed in the hot cells to decrease the operator's exposure to ionising radiation.

In the first stage of the process, [¹¹C]-CO₂ is trapped on the molecular sieves of the synthesis module (after its conditioning). A molecular sieve is a material that adsorbs carbon dioxide at room temperatures and releases it when heated to high temperatures. Its conditioning involves removing stable CO₂, which is critical for specific activity, and moisture from the filling volume by heating it to 250°C and simultaneous purging with nitrogen gas at flow of 15 ml/min.

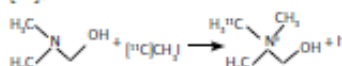
The radiolabelling and preparation of [¹¹C]-choline is done in the Bioscan synthesis module. Because carbon-11 is produced in the form of a gaseous [¹¹C]-carbon dioxide, the chamber is adapted to collect potentially radioactive air from inside of the chambers.

The release of [¹¹C]-CO₂ into the reaction vial is performed in the same way as the conditioning and lasts for 90 seconds. Using a vial, [¹¹C]-CO₂ is reduced to [¹¹C]-methanol ([¹¹C]-MeOH) with lithium aluminium hydride (LiAlH₄)

in a tetrahydrofuran (THF) environment. After the evaporation of THF from the reaction mixture, a 57% solution of hydroiodic acid is added to the reaction vial, which reacts with [¹¹C]-MeOH and forms [¹¹C]-MeI [15]. The changes of radioactivity and oven temperature taking place during the subsequent stages of the [¹¹C]-MeI synthesis are shown in Figure 2.

[¹¹C]-CH₃I distillation and its reaction with the precursor

The reaction of [¹¹C]-MeI with DMAE takes place instantaneously at room temperature according to the formula [16]:



Competitive reactions with water, saline, or ethanol may take place because methyl iodide is highly reactive. Such reactions are possible, if the mentioned reagents infiltrate the ReFORM PLUS™ tubing assembly. To prevent the competitive reactions, it is important to set up the ReFORM PLUS™ kit carefully, making sure that the valves are closed. The reagents can be loaded after a double check of the valves.

In a previous study [6] [¹¹C]-methyl iodide distilled from the Mel PLUS™ unit was transported by a constant flow of nitrogen (10 ml/min) into the vial (a part of the ReFORM PLUS™ kit) containing the precursor, DMAE, dissolved in DMF in the ratio of 10 µl DMAE : 200 µl DMF. This method allowed [¹¹C]-choline to be obtained with a yield of 20%.

In the green chemistry approach, in order to eliminate DMF from the procedure, ethanol was applied as a DMAE solvent. According to ICH and European Pharmacopoeia,

A	Begin CO ₂ Trapping
B	Sieve Oven On
C	Begin CO ₂ Release
D	Sieve Oven Off
E	Begin THF
F	MeI Output Opened
G	Begin MeI Distillation
H	End MeI Distillation
I	Start Wash 1
J	Start Wash 2
K	Start Wash 3
L	Start N ₂ Drying

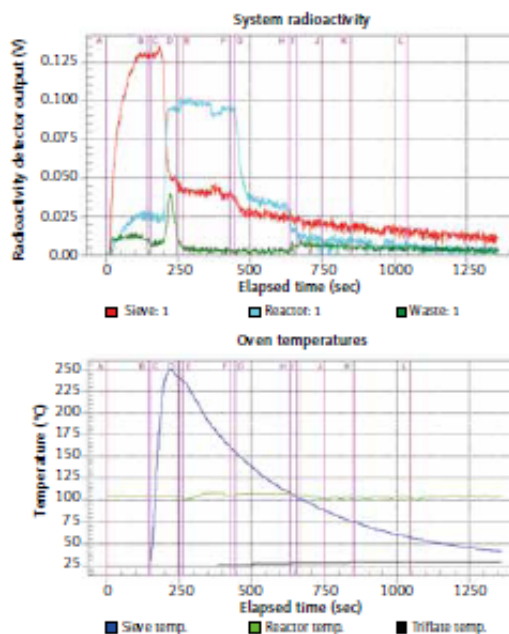


Fig. 2. System radioactivity (upper) and oven temperatures (lower) at the subsequent stages of the [¹¹C]-MeI synthesis

ethanol is a Class 3 solvent. Class 3 solvents are less toxic than Class 2 ones (which should be, however, limited in pharmaceutical products because of their inherent toxicity), and their risk to human health is low when used at levels normally accepted in pharmaceuticals [17]. Ethanol is considered as a green solvent – one of the green solvents group derived from renewable resources and biodegradable to innocuous, often a naturally occurring product [18]. DMAE was dissolved in ethanol in the same ratio as in the case of the method using DMF (10 µl DMAE : 200 µl EtOH) [10].

In the second method of synthesis the methylation environment was transferred to the solid phase using the method proposed by Pascal *et al.* [19]. The experience with [¹⁴F]-fluorocholine (FCH) production with the use of an IBA Synthera® synthesis module [20] proved to be helpful in carrying out this experiment. Thus, the reaction vial was not replaced by a C18 Sep-Pak Light cartridge, but instead an Oasis HLB plus (Waters) SPE cartridge [20]. In order to maximise the reformulation process, the script according to which the module runs the process was modified. The modifications involved changing the valve work sequence so that the paths would lead through the cartridges as well as the optimisation of the times of each step of the script. It resulted in shortening of the production process from 17 to 12 minutes.

The HLB cartridge was connected in series with the Sep-Pak Accell Plus CM (Waters) cartridge preceding it. 0.5 ml of DMAE was added on the HLB cartridge and it was flushed with 30 ml of air in three portions of 10 ml each to remove the excess.

Isolation and purification of [¹⁴C]-choline

In both methods that use a reaction vial, the isolation and purification process is a four step-procedure conducted by the ReFORM PLUS™ unit. First, 1 ml of ethanol was added to the reaction vial to homogenise the mixture. Afterward, the whole mixture was extracted to the solid phase on a cation exchange resin (Sep-Pak Accell Plus CM; Waters [6]). As the ionic compound, [¹⁴C]-choline was captured by the SPE column, while the remaining components of the reaction mixture had been removed. To confirm the proper purification of the product, especially from the substances that were insoluble in organic solvents, the SPE column was washed twice with 5 ml of water. The final product was released from the SPE column using 0.9%

saline solution and collected in a sterile, pyrogen-free vial with septum enclosure after the previous filtration on a 0.22-µm membrane sterile filter.

In the case of methylation of DMAE on a solid phase ethanol runs directly through the HLB cartridge removing unreacted DMAE and [¹⁴C]-choline from it. While [¹⁴C]-choline is trapped on the Accel Plus cartridge, DMAE goes to a waste container. In the next step, the product is back-flushed from the cartridge with water and released to a product vial using 10 ml of 0.9% saline in the same way as for both other, DMF based and “green chemistry”, methods. The radioactivity changes during the reformulation performed using the SPE method are shown in Figure 3.

Results

The main adjustments of the parameters of both tested methods (green chemistry and solid phase ones) of the [¹⁴C]-choline production resulting in the highest possible yields and insuring reliability and reproducibility are shown in Table 1 together with the results of the previously used DMF based synthesis, for the sake of comparison.

The continuous detection of radioactivity allows monitoring of the production process on each step (Fig. 2 and 3). In a properly running process an increase of radioactivity is seen on the molecular sieves (trapping of [¹⁴C]-CO₂ in the module). If the molecular sieves are conditioned well and the module works correctly, it is accompanied by the simultaneous decrease of radioactivity on the sieves and an increase on the reactor. During [¹⁴C]-MeI distillation, radioactivity leaves the module, and this fact should be observed in the graph. In turn, the waste bottle detector of the MeI+ module should not indicate any significant increase of the background radioactivity from the sieves and reactor (Fig. 2).

The reformulation monitoring in the SPE method is presented in Figure 3. During the whole process a slight decrease of radioactivity may appear due to decay and removal of unreacted [¹⁴C]-MeI during purification. A rapid radioactivity decrease is observed when [¹⁴C]-choline is released to the vial (Fig. 3). Loss of radioactivity on purification or even [¹⁴C]-MeI transfer step may be caused by contamination on the ReFORM Plus™ tubing or its leaks.

The differences between the “wet” synthesis with the precursor dissolved in DMF and EtOH, and the “dry” synthesis with the precursor embedded on the HLB cartridge are

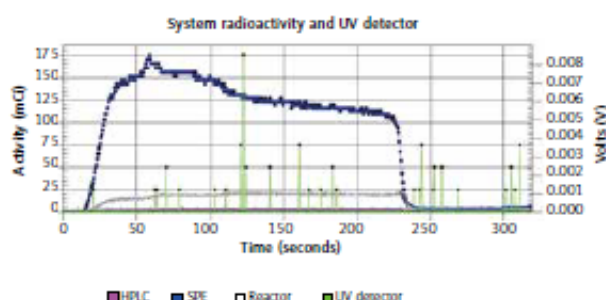


Fig. 3. Online radioactivity detection in the solid phase extraction (SPE) method

Table 1. The optimal parameters for [¹⁴C]-choline production

Parameter	Green chemistry EtOH method	Solid phase method	DMF method [6]
Target filling pressure	17 bar	17 bar	20 bar
Target current	40 μA	40 μA	30 μA
Saturation yield	3.96 GBq/μA	3.96 GBq/μA	3.11 GBq/μA
Amount of DMF	Not used	Not used	200 μl per run
Amount of DMAE	10 μl (dissolved in EtOH)	Up to 500 μl (embedded on HLB cartridge)	10 μl (dissolved in DMF)
Time of reformulation	17 min	12 min	17 min

DMF – dimethylformamide; DMAE – dimethylaminoethanol

Table 2. Comparison of yield values, unreacted precursor, and residual solvent concentrations in [¹⁴C]-choline obtained by each method

Parameter	DMF method	Ethanol method	Solid-phase method
Yield (total)	23%	9%	68%
DMAE	36.1 μg/ml	20.2 μg/ml	70.1 μg/ml
Ethanol	2.93 mg/ml	2.24 mg/ml	0.58 mg/ml
DMF	0.74 mg/ml	–	–

DMF – dimethylformamide; DMAE – dimethylaminoethanol

shown in Table 2. Besides the synthesis yields, they involve also the chemical purity (a lack of DMF) and the changes in the DMAE and ethanol concentrations. A significant difference in ethanol concentration between “wet” and “dry” synthesis is observed, which is due to changes in script. The time of ethanol delivery was extended from 50 seconds to 75 seconds, which enabled its more accurate removal. Extension of the “ethanol step” with parallel shortening of the script duration was possible thanks to shortening the time of the other steps, such as rinsing the cartridge with two portions of 5 ml of water in place of one portion of 10 ml. Two portions of lower volume result in lower backpressure on the tubing, which gives a faster flow.

Each test batch was controlled with the use of the quality-control procedures described herein [6]. The radiochemical purity (radio-HPLC), radionuclide purity (half-life measurement, gamma-ray identification, and HPGc spectroscopy), and microbiological purity (endotoxin and sterility test) were repeatable and similar between the methods [6].

Discussion

The main aim of this work was to optimise the [¹⁴C]-choline synthesis process, in relation to the process described in [6], by increasing the final synthesis yield while minimising or even completely eliminating DMF.

Two approaches to the [¹⁴C]-choline synthesis: the method using a green solvent, ethanol, and a dry synthesis, where DMAE is embedded on the Oasis HLB plus, were applied and the results were compared. They were also compared with results of the synthesis based on the DMAE precursor dissolved in DMF, which were presented in [6]. The solid phase synthesis proved to be the most effective in total elimination of DMF; its final release was the highest, and the synthesis time was the shortest (Table 2). Unfortunately, the content of DMAE precursor in the final product is still high, although it is a non-toxic compound

and its concentration remains below the requirements of the European Pharmacopoeia [21].

Using DMF was a pioneering way for the [¹⁴C]-choline synthesis. However, in spite of a reasonable radiotracer yield, the high solvent concentration makes this method unacceptable. Solvent replacement for ethanol makes the product safer for patients, but the radiochemical yield may appear insufficient for manufacturers due to the cost-benefit ratio. Thus, the transfer of a reaction environment to a solid phase appears to be most effective way to increase the number of radiotracer doses per batch, simultaneously making it safer for the patient without serious loss of diagnostic properties. An important novelty is a publication of Pharmacopoeia monography describing [¹⁸F]-fluorocholine and its impurities assay. Not all of the featured tests are appropriate for use in the [¹⁴C]-choline QC, but DMEA, present in both radiotracers, [¹⁸F]-fluorocholine, and [¹⁴C]-choline can be assigned according to the procedure described in this Pharmacopoeia monograph [21]. Until the mentioned monograph appeared, the upper limit of DMEA in the final product remained unspecified. Now, it has been determined as 1.0 mg per dose. Thus, when taking into account that a final product vial (FPV) is, in fact, a multidose vial, having at its disposal the maximum possible radioactivity of at least 10 doses, then, after a 10-fold dilution of the FPV the DMAE content in the patient syringe would be not higher than 0.7 mg per dose. Although DMEA is non-toxic and used as a nutrition additive, it may compete with the uptake of [¹⁴C]-choline into the cell [22]. Shao *et al.* [23] rejected the use of silica-based hydrophobic SPE cartridge (e.g. C18 and HLB plus) proceeding synthesis on a single cation-exchange cartridge (Sep-Pak CM-Light) explaining it with a lower back-pressure. However, a lower back-pressure could shorten the synthesis time increasing the end of synthesis (EOS) yields, and use of two cartridges in serial should give a higher purification level due to a different sorption mechanism

resulting, presumably, in a higher chemical and radiochemical purity. Such an idea will be tested in our further studies on [¹¹C]-choline and [¹⁸F]-fluorocholine synthesis.

Conclusions

The results presented above demonstrate that through simple modifications of the synthesis conditions it was possible to produce clinical doses of [¹¹C]-choline. The solid phase synthesis proved to be the most effective in total elimination of DMF; its final release was the highest, and the synthesis time was the shortest. The synthesis is fully automated and the radiopharmaceutical doses for clinical use meet and exceed established quality control criteria.

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ruth TJ. The uses of radiotracers in the life sciences. *Rep Prog Phys* 2009; 72: 1-23.
- Shields AE, Graham MM, Kazawa SM, et al. Contribution of labeled carbon dioxide to PET imaging of carbon-11-labeled compounds. *J Nucl Med* 1992; 33: 581-584.
- Yamaguchi T, Lee J, Uemura H, et al. Prostate cancer: a comparative study of 11C-choline PET and MR imaging combined with proton MR spectroscopy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32: 742-748.
- Hara T, Kosaka N, Shinoura N, Kondo T. PET imaging of brain tumor with [methyl-¹¹C]choline. *J Nucl Med* 1997; 38: 842-847.
- de Jong IL, Pruim J, Elsinga PH, Vaalburg W, Mensink HJ. Preoperative Staging of Pelvic Lymph Nodes in Prostate Cancer by 11C-Choline PET. *J Nucl Med* 2003; 44: 331-335.
- Szydio M, Jadwiński M, Chmura A, Gołczewski K, Sokół M. Synthesis, isolation and purification of [¹¹C]-choline, a PET tracer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2016; 20: 229-236.
- Guidelines on Current Good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the Preparation of Radiopharmaceuticals. EANM Radiopharmacy Committee, version 2; March 2007.
- European Pharmacopoeia. 8th edition; chapter 2.4.24. Identification and control of residual solvents.
- Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6). ICH Harmonised Guideline. Current Step 4 version dated October 20, 2016.
- Shao X, Fawaz MV, Jang K, Scott PJ. Ethanol as a Solvent for Carbon-11 Radiochemistry. In: *Radiochemical Syntheses Vol. 2: Further Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography and New Strategies for Their Production*, Scott PJ, Kilbourne MR (eds.). John Wiley & Sons, 2015; 207-232.
- Hockley BG, Henderson B, Shao X. Synthesis of [¹¹C]Choline Chloride ([¹¹C]CHL). In: *Radiochemical Syntheses Vol. 1: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*, Scott PJ, Hockley BG (eds.). John Wiley & Sons, 2012; 169-177.
- Hara T, Yuasa M. Automated synthesis of [¹¹C]choline, a positron-emitting tracer for tumor imaging. *Appl Radiat Isot* 1999; 50: 531-533.
- Recommended cross sections for ¹⁴N(p,n)¹¹C reaction: <https://www-nds.iaea.org/medical/n4pl1c0.html>
- Hoehr C, Oehlke E, Bernat E, et al. ¹¹Sc production using a water target on a 13 MeV cyclotron. *Nucl Med Biol* 2014; 41: 401-406.
- Marazano C, Maziere M, Berger G, Comar D. Synthesis of methyl iodide-¹¹C and formaldehyde-¹¹C. In: *Radiopharmaceuticals and Other Compound Labelled with Short-Lived Radionuclides*, Welch MJ (ed.). Pergamon Press, 1977; 49-52.
- Rosen MA, Jones RM, Yano Y, Budinger TF. Carbon-11 Choline: Synthesis, Purification, and Brain Uptake Inhibition by 2-Dimethylaminoethanol. *J Nucl Med* 1985; 26: 1424-1428.
- Grodowska K, Parczewski A. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Pol Pharm* 2010; 67: 3-12.
- Sheeman J, Chin B, Huijbers PDT, Garcia-Valls R, Hatton TA. Solvent Replacement for Green Processing. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 253-271.
- Pascali C, Bogni A, Itawa R, Cambiè M, Bombardieri E. [¹¹C]Methylation on a C₁₈ Sep-Pak cartridge: a convenient way to produce [N-methyl-¹¹C]choline. *J Labelled Comp Radiopharm* 2000; 43: 195-203.
- Slaets Q, De Bruyne S, Dumolyn C, Moerman L, Mertens K, De Vos F. Reduced Dimethylaminoethanol in [¹⁸F]Fluoromethylcholine: an important step towards enhanced tumor visualization. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: 2136-2145.
- European Pharmacopoeia. 8th edition; supplement 8; monograph 2793. Fluorocholine (¹⁸F) Injection.
- Reischl G, Bieg C, Schmiedl Q, Solbach C, Machulla HJ. Highly efficient automated synthesis of [¹¹C]choline for multi dose utilization. *Appl Radiat Isot* 2004; 60: 835-838.
- Shao X, Hockley BG, Hoareau R, Schnau PL, Scott PJH. Fully automated preparation of [¹¹C]choline and [¹⁸F]fluoromethylcholine using TraceLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC. *Appl Radiat Isot* 2011; 69: 403-409.

Address for correspondence

Marcin Szydio
PET Diagnostic Department
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre
Institute of Oncology
Branch in Gliwice
15 Wybrzeże Armii Krajowej St.
44-101 Gliwice, Poland
e-mail: Marcin.Szydio@ig.gliwice.pl

Submitted: 19.10.2018

Accepted: 30.11.2018

Marcin Szydło, Dawid Pogoda, Tomasz Kowalski, Mateusz Pocięgiel, Michał Jadwiński, Andrea Amico. *Synthesis and Quality Control of [⁶⁸Ga]-PSMA, PET/CT Tracer used in Prostate Cancer Imaging and Comparison with [¹⁸F]-Fluorocholine as a Reference Point.* J Pharm Sci Emerg Drugs 2018;6(1). doi:10.4172/2380-9477.1000126

Szydło et al., J Pharm Sci Emerg Drugs 2018, 6:1
DOI: 10.4172/2380-9477.1000126



Journal of
Pharmaceutical Sciences
& Emerging Drugs

A SCITECHNOL JOURNAL

Research Article

Synthesis and Quality Control of ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT Tracer used in Prostate Cancer Imaging and Comparison with ¹⁸F-Fluorocholine as a Reference Point

Marcin Szydło*, Dawid Pogoda, Tomasz Kowalski, Mateusz Pocięgiel, Michał Jadwiński and Andrea d'Amico

Abstract

The clinical usefulness of choline-based PET/CT tracers (¹¹C-Choline and ¹⁸F-Fluorocholine) in prostate cancer recurrence imaging is well established. However, choline uptake is not increased in a considerable number of patients. In 2012 was proposed the new prostate-specific PET radio ligand PSMA ⁶⁸Ga-labeled, with superior sensibility and specificity than choline-based tracers. This work has as aim to describe the procedures for labeling PSMA ligands and its quality control procedures as a medicinal product and its comparison with ¹⁸F-fluorocholine synthesis and quality control procedures. Both the manual and automated synthesis methods for ⁶⁸Ga-PSMA were taken into account and set of a quality control methods based mainly on chromatographic and spectrometric methods used to determine chemical, radiochemical and radionuclide purity. PSMA synthesis time, dose of radiation to operators and quality control protocols were compared to choline. Finally, some images of PET performed with ¹⁸F-Fluorocholine and ⁶⁸Ga-PSMA in the same patients were showed.

Keywords

Radlpharmacy; Choline; PSMA; PET/CT; Prostate; Cancer; Synthesis; Quality

Introduction

Prostate cancer is one of the more frequent malignancies in developed countries, with high rates of morbidity and mortality [1]. After radical treatment, the rise of serum prostate-specific antigen (PSA) is the most important marker of recurrence. Imaging of recurrence is traditionally based on bone scan, ultrasonography and computed tomography.

In the last years, positron emission imaging (PET) with choline radiolabeled with carbon-11 or fluorine-18 was demonstrated to be able to localize recurrence site in patients with PSA level higher than 2 ng/ml [2]. Recently, a new PET radiopharmaceutical was proposed

for early localization of prostate cancer relapses: prostate-specific membrane antigen ligand ⁶⁸Ga-HBED-CC-PSMA (⁶⁸Ga-PSMA), with diagnostic performance markedly superior to ¹⁸F-fluorocholine PET [3].

Uptake of ⁶⁸Ga-PSMA reflects increased density of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate peptidase 1 (NAALAD1) [4]. For this reason an increasing number of PET laboratories are switching from choline to PSMA imaging for clinical purposes.

This work has as aim to describe the procedure for labeling PSMA ligands and its quality control as a medicinal product and then to compare results of ⁶⁸Ga-PSMA and ¹⁸F-fluorocholine.

Finally, a pictorially essay of some compared ¹⁸F-fluorocholine and ⁶⁸Ga-PSMA PET images in a series of patients from our site was given.

Materials and Methods

The production of PSMA peptide labeled with ⁶⁸Ga gallium is done with the use of the Eckert-Ziegler pharmacy approved ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga generator with and hydrochloric acid 0.1 M as an eluent. The labeling kit contains 30 µg PSMA peptide, 45 mg sodium acetate, 25mg ascorbic acid, ethanol (99,8% and 50%), water for injection, sterile filter 0,22 µm (Millipore), 0,9% NaCl and C18 SPE cartridge (Waters). The Scintomics GRP automated synthesis module is used for automated synthesis and the manual preparation is carried in a shielded hot cell. All radioactivity measurements are proceeding with use of dose calibrator. All materials and methods used during quality control are described in Quality control methods section.

Manual synthesis of ⁶⁸Ga-PSMA

A 10 ml vial containing PSMA peptide, sodium acetate and ascorbic acid (buffer pH like in Eder et al [6]) is heated in a heating block at 80°C. ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator, connected directly to the synthesis vial, is eluted with 5 ml 0,1M HCl. Heating is continued for at least 10 min. After synthesis, the reaction mixture is pushed through the C18 cartridge (preconditioned with sequence of 2 ml of 99,8% ethanol, 10 ml of water and dried with 10 ml of air) to trap labeled peptide. After trapping of synthesis final product the C18 cartridge is connected to the waste vial and rinsed with 5 ml of water for injection. The final product is eluted from C18 cartridge with 0,5 ml 50% ethanol and 10 ml 0,9% saline to a 30 ml sterile vial through the sterile filter 0,22 µm. At the end of synthesis the activity product, waste vial and C18 cartridge is measured in dose calibrator (Table 1).

Automated synthesis of ⁶⁸Ga-PSMA

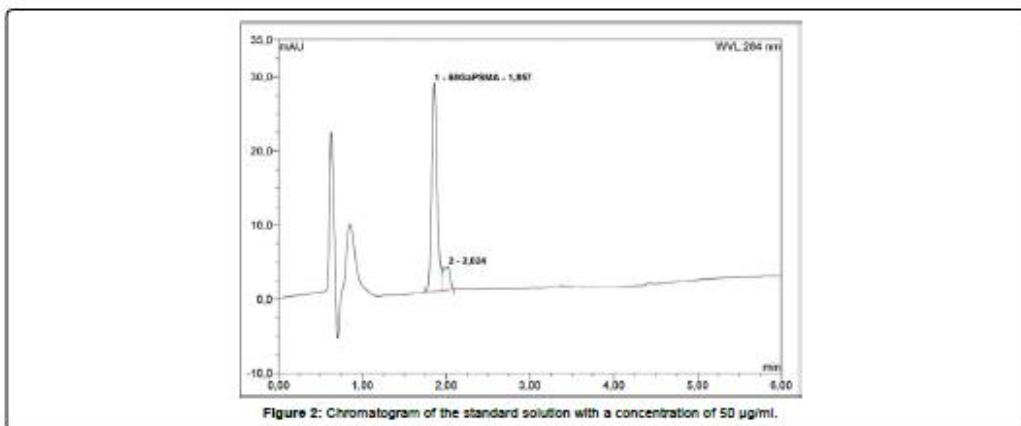
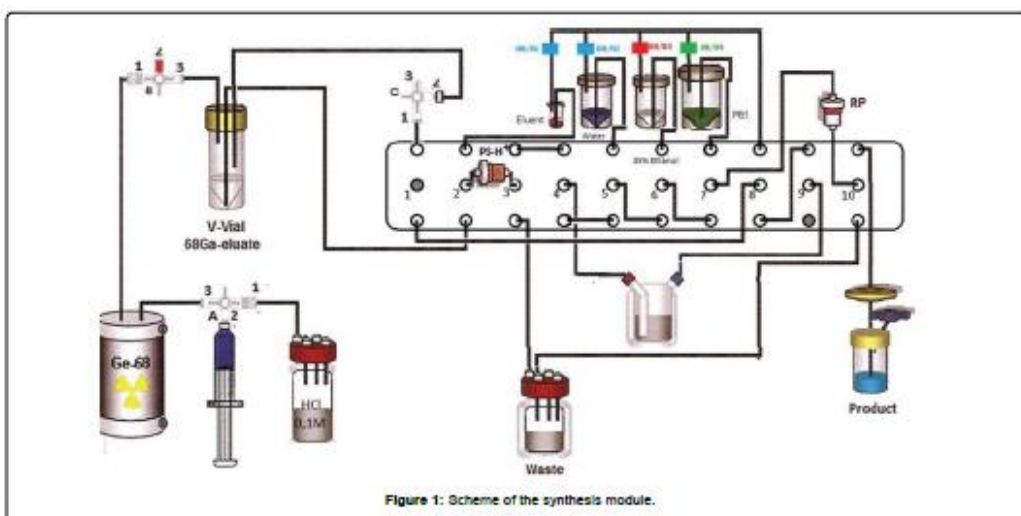
The preparation of the synthesis module is done by preparing and connecting the reagents to the appropriate tubing's and by filling the reactor with the 20 µl of PSMA peptide solution in water at the concentration of 1 mg/ml and 2 ml of 1,5 M HEPES buffer solution as it is shown on Figure 1. After the initial check of the Scintomics GRP module software the preparations are complete.

The production process progress in two steps similarly to René Martin et al. [5]. Firstly the ⁶⁸Ga gallium is eluted from the generator with the use of 4ml 0,1M HCl to the V-vial. The second step comes

*Corresponding author: Marcin Szydło, Department of PET Diagnostic, Faculty of Diagnostic, Maria Skłodowska Curie Memorial Cancer Center, Institute of Oncology, 44-101 Gliwice, Poland, Tel: +48-32-278-9912; Fax: +48-32-278-8543; E-mail: Marcin.Szydlo@jo.gliwice.pl

Received: February 16, 2018 Accepted: March 08, 2018 Published: March 15, 2018





after the elution, when the operator of the synthesis module starts the labeling process. The whole script runs for approximately 20 minutes and the temperature of heating block is set to 125°C to ensure that the labeling runs in around 100°C. After the start of labeling the ^{68}Ga gallium chloride is transferred to the PSH+ cartridge to remove the excess of the hydrochloric acid and then eluted to the reactor with 2 ml of acidified 5,0 M NaCl. The labeling process takes around 10 minutes and then the purification part of the script begins. First the reaction mixture is sent through the C18 cartridge to the waste bottle. C18 cartridge is preconditioned with 2 ml of 99,8% ethanol and 10 ml of water and dried with air at the end. The ^{68}Ga gallium labeled PSMA peptide is adsorbed by the cartridge and the eluent and HEPES buffer (2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethane sulfonic acid) present in the reaction mixture are removed. Then the C18 cartridge is flushed with water to ensure removal of HEPES buffer and other water soluble impurities. When the purification step is complete the

product is removed from the C18 cartridge by flushing it with 2 ml of 35% ethanol solution and transferred through the 0,22 µm Cathivex-Gv (Millipore) filter to the product vial. After the removal of the ^{68}Ga gallium labeled PSMA, the C18 cartridge is further flushed with 20 ml of phosphate buffered saline solution (PBS) to ensure the proper concentration and a pH level of the obtained product.

Quality control methods

Quality control methods are in most based on European Pharmacopoeia (PhEur) monograph describing Gallium (^{68}Ga) Edotreotide for Injection [6], despite liquid chromatography method, which is based on Eder and colleagues [7].

Gamma ray spectroscopy: This examination is about measurement of the energy of the detected gamma quantum. The gamma ray spectroscopy is proceed with use of multichannel analyzer

with 3" x 3" NaI detector. All of the positron emitting isotopes are characterized by energy of the photon, which is emitted during positron annihilation with electron, and it is expected to be 511 keV [8]. This test is one of the nuclide identification tests.

Half-life determination: Determination of the half-life is the second test that the purpose is to define the isotope. Half-life is obtained with use of dose calibrator for the activity measurements. Each activity measurement lasts 20 minutes and is repeated every minute. The expected half-life of Gallium-68 is 67.6 minutes [9] and can be calculated using following equation [10]:

$$T_{1/2} = -\ln 2 \left(\frac{dt}{\ln(A_1/A_0)} \right)$$

Where: dt-time difference

A₁-ending activity

A₀-starting activity

These two tests mentioned above uniquely identify the nuclide as Gallium-68.

Determination of residual HEPES buffer: According to PhEur monograph [6] HEPES content is determined by thin-layer chromatography (TLC). It is needed to prepare reference solution of HEPES at concentration of 20 µg/ml. Applicant 5 µl of each, reference and test solution (the test solution is the [⁶⁸Ga]-PSMA final product sample), on TLC silica gel F254 plate with an aluminium backing (3 cm x 8 cm) as a two separate spots and develop on a path over 2/3 of the plate with use of water: acetonitrile (25: 75 V/V) solution as a mobile phase. Expose to iodine vapor for four minutes after drying. Spot corresponding to the test solution should be not more intense than the spot corresponding to the reference solution (less than 20µg/ml of HEPES in test solution).

Residual solvents: The only organic solvent used during [⁶⁸Ga]-PSMA labeling is an ethanol. In Pharmacopoeia there are three methods described to determine the amount of ethanol in a pharmaceutical product: distillation with a vertical condenser (A) and gas chromatography (GC) with a head-space (B) or without head-space (C) [11]. In this study gas chromatography (C) is used in accord with the pharmacopoeial method [12]. Any calibrated analytical GC method adapted to the method mentioned above should be suitable for this analysis. In our apparatus are used the same settings as for FDG analysis i.e. volume of sample injection is 1,0 µl; split ratio 5,0:1 at a total flow of 16,2 ml/min with helium as a carrier gas. Used column is HP-Inn wax (30 m x 0,32 mm; film: polyethylene glycol 0,50 µm) in column heater settled up to 50°C. Detection is carried out on an FID detector (Flame Ionization Detector).

Bacterial endotoxin purity: The bacterial endotoxin test is performed using Endosafe®-PTS™ (Charles River) apparatus and the kinetic chromogenic LAL-test method applied, the same as during [11C]-choline quality control [13].

Radionuclide purity: Gamma spectroscopy of the final product sample also is carried out in the same way as in paper mentioned above [13-18] in a Canberra-Packard gamma spectrometer equipped with a high-purity germanium (HPGe) detector. The spectra acquisition is performed two days after synthesis. Acquisition is proceeded for 180 minutes to obtain high a signal-to-noise ratio. The sample volume should be at least 1 ml. Spectrum is analyzed using Genie 2000 software.

Liquid chromatography: To determine radiochemical and chemical purity of ⁶⁸Ga-PSMA a reversed-Phase HPLC with

Chromolith Performance RP-18e column; 100 x 4.6 mm (Merck) is used. The HPLC system is Thermo Fisher Dionex Ultimate 3000 equipped with on-line degasser, UV and radiometric (Bioscan B-FC-1000) detectors. Measurement is carried out in linear A-B gradient (0 % B to 100 % B) at flow rate 4 ml/min. Solvent A consist of 0,1 % aqueous trifluoroacetic acid (TFA) and solvent B is 0,1 % TFA in acetonitrile [19]. UV absorbance is measured at wavelength 254,0 nm and 284,0 nm. The injection volume is 50 µl. All of obtained chromatograms were compared with natGaPSMA standard solution. To find the best concentration of the standard solution, 1 mg of natGaPSMA-11 (ABX, Radeberg, Germany) was dissolved in 1 ml (1:1 v/v CH₃CN/H₂O) and from this stock the solutions with following concentrations were prepared: 50 µg/ml, 100 µg/ml and 200 µg/ml. Three standard solutions with concentrations of 50 µg/ml (Figure 2); 100 µg/ml (Figure 3) and 200 µg/ml (Figure 4) were analyzed during the study with an UV detector at 284 nm. As it is seen on the recorded chromatograms, the best results were given from solution containing 200 µg/ml of natGaPSMA. Therefore, it was decided to record one more chromatogram with use of the 200 µg/ml standard solution at 254 nm (Figure 5) [7]. The better results were obtained during the measurements at a wavelength of 284 nm and that is why it was decided to measure the ⁶⁸Ga-labeled PSMA-11 peptide at this wavelength.

⁶⁸Ga-labeled PSMA peptide is analyzed with an UV detector at 284 nm and a radiometric detector. During the tests it was found that the concentration of ⁶⁸Ga-PSMA in the sample diluted with a saline is below the detection limit of radiometric detector (synthesis product is diluted with saline to provide isotonicity). Therefore, for the further analysis the undiluted product is used. There are two signals that can be observed in the obtained chromatograms in a ratio of approximately 82%/12%. The more intense signal comes from ⁶⁸Ga-PSMA-11, the second signal comes from its less thermodynamically stable diastereomer and does not affect the test result (Figure 6). These signals can be observed both on the UV detector and the radiometric detector. However, the concentration of ⁶⁸Ga-PSMA-11 in the test sample is too low to obtain a reliable result on the UV detector (Figure 7).

To confirm the identity of the compound, the mixture of 50% of the product sample and 50% of a standard solution of 200 µg/ml were measured (Figure 8).

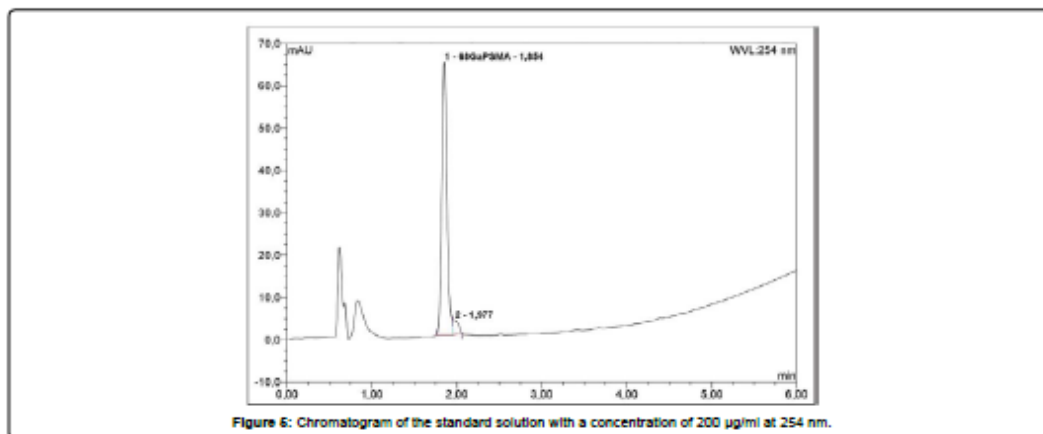
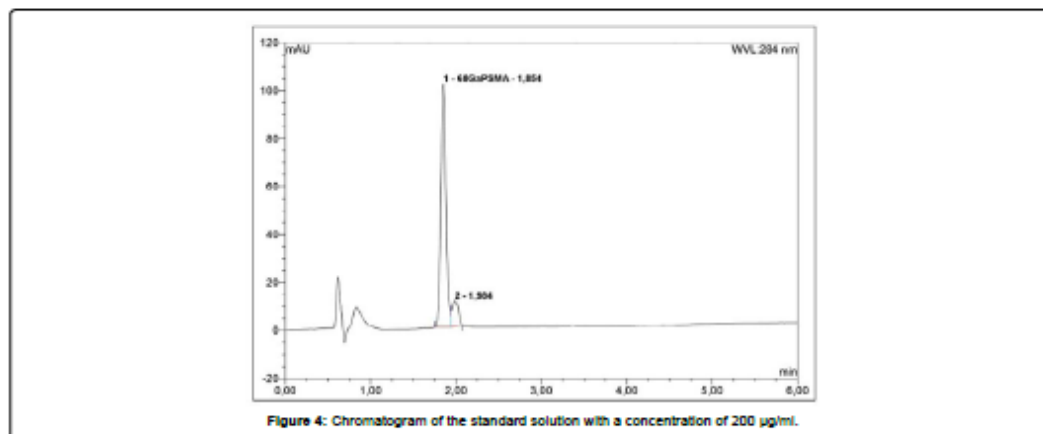
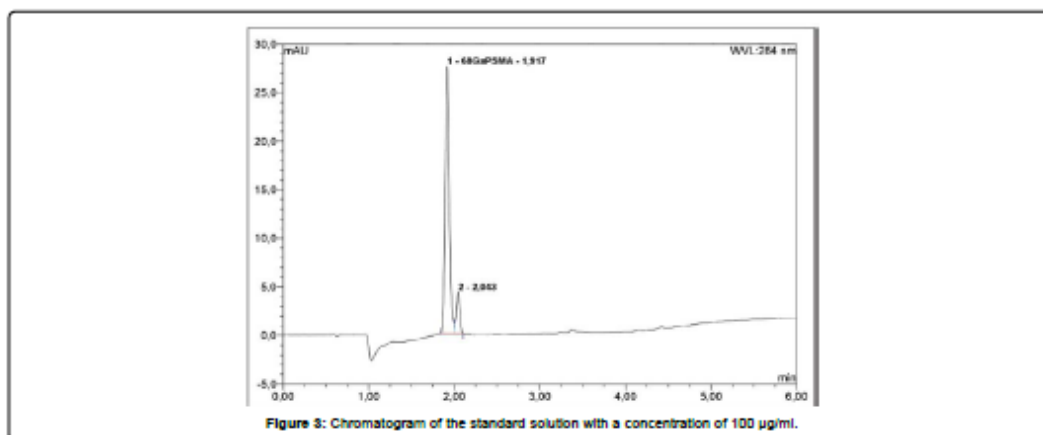
Results

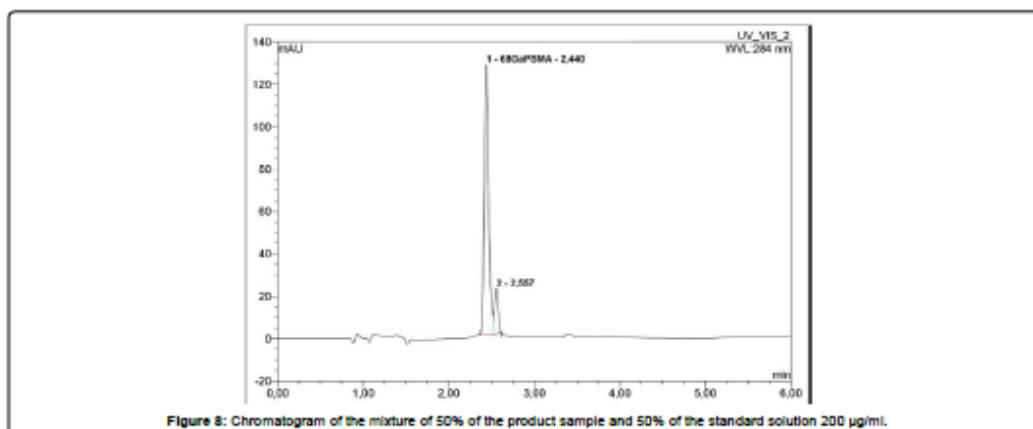
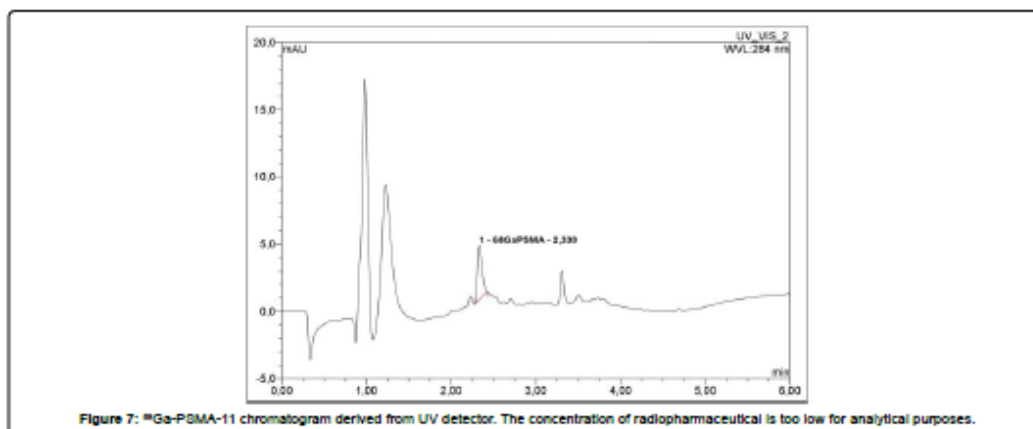
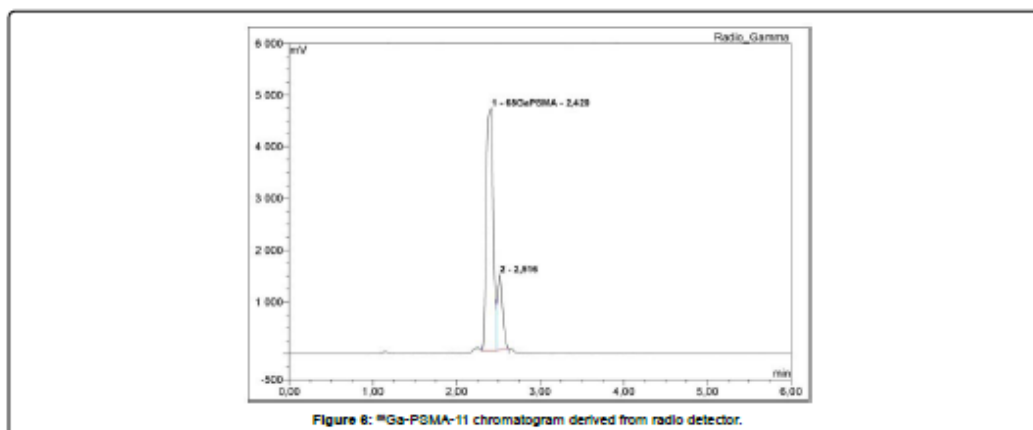
The activity of the ⁶⁸Ga gallium labeled PSMA peptide depends on the activity eluted from the ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga generator. For the 40 mCi of eluate the Scintomics GRP automated synthesis module can produce around 23 - 25 mCi of product.

The activity of the product obtained by automated method of labeling is a little lower than analogical product obtained with the use of manual method because of the more complicated purification (necessity of complete removal of the HEPES buffer). But otherwise it is still comparable to the manual method. On the other hand because of the automatization of the process the human error factor is minimized and the dosages of radiation received by synthesis operators are lower, which means the process is safer.

Short pictorial essay

Patient LJ, 60 yo, prostate cancer treated with prostatectomy in 2013. Biochemical relapse, PET with ¹⁸F-choline on 30th September 2016 with serum PSA 0.79 ng/ml with no pathologic uptake (Figure





9). Second PET with ^{68}Ga -PSMA on 26th October 2017 with seric PSA 1,56 ng/ml showed pelvic lymph node with strongly increased PSMA uptake (Figure 10).

Patient KW, 68 yo, prostate cancer treated with radiotherapy in 2014, biochemical relapse during suppressive therapy with PSA 0,94 ng/ml on 29th December 2016. First PET scan 21th April 2017 positive at pelvic lymph node, with no bone uptake (Figures 11 and 12). Due to rising seric PSA to 31, 88 ng/ml a second PET with ^{68}Ga -PSMA was carried out on 15 September, with confirmation of lymph node metastasis and multiple pathologic bone foci not present at choline imaging (Figures 13 and 14).

Conclusion

Synthesis of radiopharmaceuticals: ^{68}Ga -PSMA and ^{18}F -fluorocholine (^{18}F -FCH) used in prostate cancer diagnostic procedures are completely different. In case of ^{18}F -fluorocholine synthesis run in numerous steps with many chemicals compounds such as dibromomethane (DBM) or dimethylaminoethanol (DMAE) which are quite toxic and tough chemical during laboratory work. Some of ^{18}F -FCH synthesis by-products are in gas phase [14], this triggers the need to use radioactive gases anti-contamination systems. The Fluorine-18 used in the ^{18}F -FCH synthesis is

produced in a liquid target of cyclotron [15]. The construction and use of such an accelerator is quite expensive, however the amount of Fluorine-18 isotope produced for a single synthesis, it allows producing a radiolabelled compounds for impressive number of patients (up to 15, using IBA Synthera modules). Such a connection high activity final product and long half-life of Fluorine-18 (110 minutes) allows the ^{18}F -FCH could be transported to the PET diagnostic departments, distant from the place of production [16]. In case of second radiopharmaceutical ^{68}Ga -PSMA, which are used to diagnostic prostate cancer, isotope of Gallium-68 has shorter half-life (68 minutes). This isotope is obtained from $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator during column elution to receive Gallium-68 chloride. Synthesis of ^{68}Ga -PSMA is a simple process with no complicated steps resulting from reaction mechanism [17]. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator can be used for several months, which could be eluted even two hundred times. Short half-life of Gallium-68 allows frequently elution of the generator on the same day, but compare to ^{18}F -FCH, single synthesis of ^{68}Ga -PSMA provide to PET diagnosed at most 3 patients. Compounds which are used during ^{68}Ga -labeled PSMA ligand are easy to operate, and do not require special conditions. Labeling process is characterized by high yield. Finally, product of radiopharmaceutical PSMA is stable and in form of injectable formulation. An important parameter to both radiolabeled compound is time of synthesis.

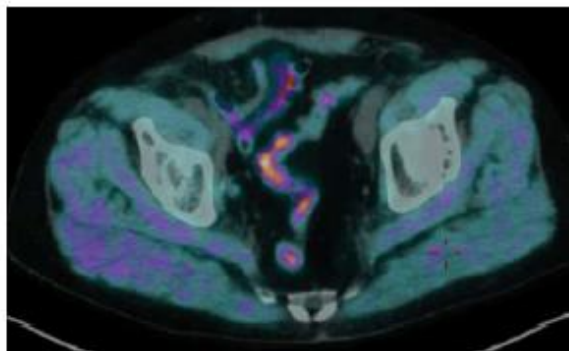


Figure 9: Patient LJ, 60 yo, PET imaging with ^{18}F -choline.

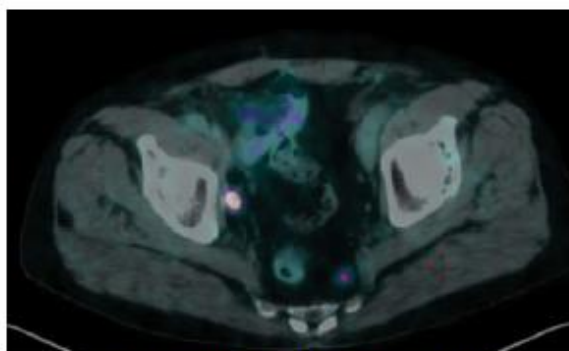


Figure 10: Patient LJ, 60 yo, PET imaging with ^{68}Ga -PSMA-11.

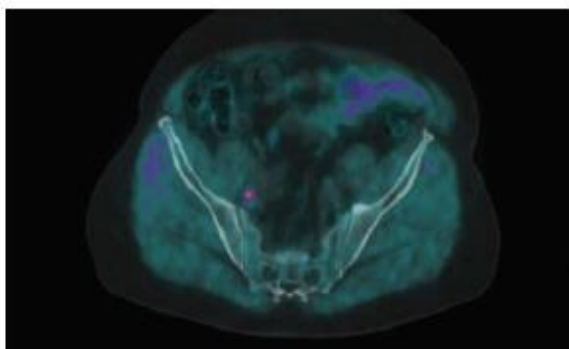


Figure 11: Patient KW, 68 yo, PET imaging with ^{18}F -choline.

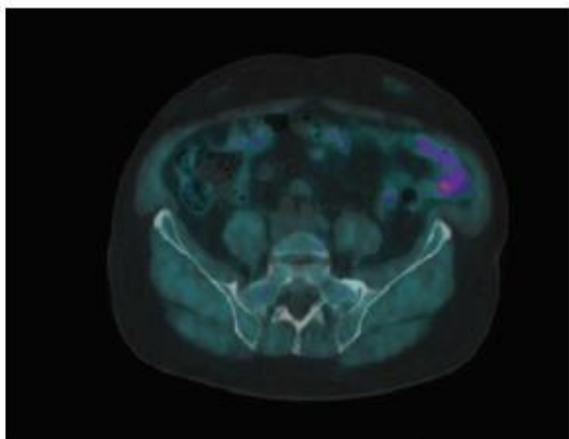


Figure 12: Patient KW, 68 yo, PET imaging with ^{18}F -choline.

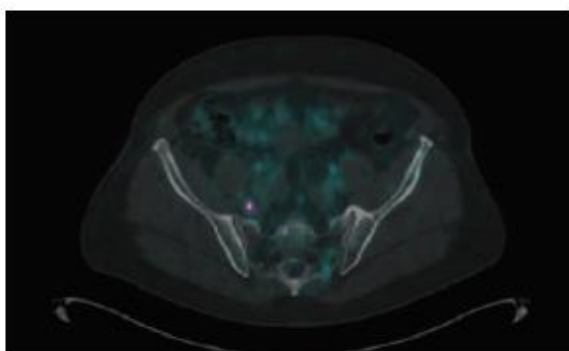


Figure 13: Patient KW, 68 yo, PET imaging with ^{68}Ga -PSMA-11.

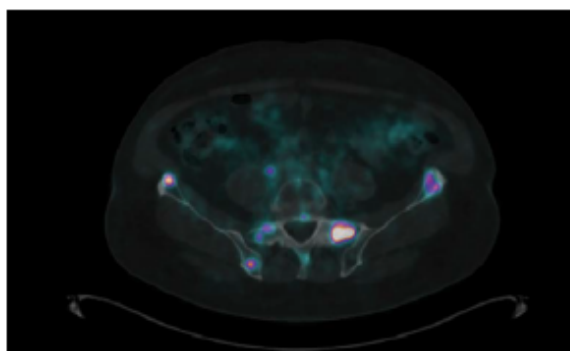


Figure 14: Patient KW, 68 yo, PET imaging with ^{68}Ga -PSMA-11.

Synthesis of ^{18}F -FCH run approximately 90 minutes, compared to ^{68}Ga -PSMA only 15 minutes. Moreover, it is difficult not to mention in view of radiological protection about lower activity of ^{68}Ga -PSMA than ^{18}F -FCH during patient injection [18].

References

1. Danyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, et al. (2014) Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev* 15: 9575-9578.
2. von Eyben FE, Kairemo K (2014) Meta-analysis of (11)C-choline and (18) F-choline PET/CT for management of patients with prostate cancer. *Nucl Med Commun* 35: 221-230.
3. Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Eder M, Eisenhut M, Zechmann CM (2012) [^{68}Ga] Gallium-labelled PSMA ligand as superior PET tracer for the diagnosis of prostate cancer: comparison with ^{18}F -FECH. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39: 1085-1086.
4. Mease RC, Foss CA, Pomper MG (2013) PET imaging in prostate cancer: focus on prostate-specific membrane antigen. *Curr Top Med Chem* 13: 951-962.
5. Martin R, Jüttler S, Müller M, Wester HJ (2014) Cationic eluate pretreatment for automated synthesis of [^{68}Ga]PCRP4.2. *Nucl Med Biol* 41: 84-89.
6. Gallium (^{68}Ga) Edotretotide (monograph 2482) In: European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines 1: 1062-1064.
7. Eder M, Neels O, Müller M, Bauder-Wüst U, Remde Y, et al. (2014) Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* 7: 779-796.
8. Hine GJ (1967) Sodium Iodine. Academic Press Inc. 1: 95-119.
9. Table of physical characteristic of radionuclides mentioned in the European Pharmacopoeia. In: European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines 1: 665-673.
10. Serway RA, Jewett JW (2008) Physics for scientists and engineers with modern physics, Chapters 39-46 (7th edn) Nuclear Structure. Cengage Learning.
11. Ethanol content (monograph 20910) In: European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines 1: 301-303.
12. Gas chromatography (monograph 20228) In: European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines 1: 43-45.
13. Szydło M, Jadwiński M, Chmura A, Gorczewski K, Bokół M (2016) Synthesis, isolation and purification of [(11)C]-choline. *Contemp Oncol (Pozn)* 20: 229-236.
14. Krasikova R (2007) Synthesis modules and automation in F-18 labeling. *Ernst Schering Res Found Workshop* 62: 289-316.

15. Clark JC, Silvester DJ (1966) A cyclotron method for the production of fluorine-18. *Int J Appl Radiat Isot* 17: 151-154.
16. DeGrado TR, Baldwin SW, Wang S, Orr MD, Liao RP, et al. (2001) Synthesis and evaluation of (^{18}F)-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. *J Nucl Med* 42: 1805-1814.
17. Nanabala R, Anees MK, Sasikumar A, Joy A, Pillai MR, et al. (2016) Preparation of [^{68}Ga]PSMA-11 for PET-CT imaging using a manual synthesis module and organic matrix based $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator. *Nucl Med Biol* 43: 463-469.
18. Giesel FL, Hadaschik B, Cardinale J, Radtke J, Vinsensia M, et al. (2017) F-18 labeled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44: 678-688.
19. Eppard E, Homann T, de la Fuente A, Essler M, Rösch F, et al. (2017) Optimization of labeling PSMAHBED with ethanol-post-processed ^{68}Ga and its quality control systems. *J Nucl Med* 58: 432-437.

Author Affiliation

Department of PET Diagnostic, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center, Institute of Oncology, Gliwice, Poland

Top

Submit your next manuscript and get advantages of SciTechnol submissions

- 80 Journals
- 21 Day rapid review process
- 3000 Editorial team
- 5 Million readers
- More than 5000 [testimonials](#)
- Quality and quick review processing through Editorial Manager System

Submit your next manuscript at • www.scitechnol.com/submission

Załączniki

Spis załączników:

Załącznik 1 – Certyfikat analizy dimetyloaminoetanolu.....	145
Załącznik 2 – Certyfikat analizy dibromometanu.	146
Załącznik 3 – Certyfikat analizy mrówczanu sodu.	147
Załącznik 4 – Certyfikat analizy glinowowodorku litu roztwór w tetrahydrofuranie.	148
Załącznik 5 – Certyfikat analizy kwasu jodowodorowego.....	149
Załącznik 6 – Certyfikat analizy kartridża HLB.....	150
Załącznik 7 – Specyfikacja kartridża Accell Plus CM.	151
Załącznik 8 – Świadectwo kontroli jakości etanolu o czystości Ph Eur.	152
Załącznik 9 – Certyfikat analizy wody do iniekcji.....	153
Załącznik 10 – Charakterystyka produktu Natrium Chloratum 0,9%.	154
Załącznik 11 – Certyfikat jakości filtra wentylowanego.	160
Załącznik 12 - Certyfikat jakości filtra niewentylowanego.	161
Załącznik 13 – Specyfikacja kolumny chromatograficznej Acclaim Trinity P1.....	162
Załącznik 14 – Certyfikat analizy kaset Endosafe [®] - PTS [™]	163
Załącznik 15 – Specyfikacja kolumny chromatograficznej HP Innowax.	164
Załącznik 16 – Raport z analizy zanieczyszczeń radionuklidowych.	165
Załącznik 17 – Certyfikat badań mikrobiologicznych.	166

ABX advanced biochemical compounds

Certificate of Analysis

Dimethylaminoethanol – Bulk

Prod. No.: 843
 Lot No.: DMAE-B-141215004-1

Dimethylaminoethanol		
Parameter	Specification	Result
Appearance	colourless liquid	conforms
Identity		
IR spectrum	conforms to reference spectrum	conforms
Assay		
Assay (GC)	≥ 99.50 %	100.00 %
Purity		
Water	≤ 0.2 %	0.02 %
Each single unknown impurity (GC)	≤ 0.10 %	< 0.01 % (< LOQ)
Sum of unknown impurities (GC)	≤ 0.50 %	< 0.01 % (< LOQ)

Analytical data as specified on the suppliers certificate

Constituent	2-Dimethylaminoethanol	Lot No. SHBD1480V
Parameter	Specification	Result
Appearance (Color)	colorless	colorless
Appearance (Form)	liquid	liquid
Infrared spectrum	conforms to structure	conforms
Purity (GC)	≥ 99.50 %	100.00 %

Date: Quality Control Date: Quality Assurance

ABX advanced biochemical compounds**Certificate of Analysis****Dibromomethane – Bulk**

Prod. No.: 842
 Lot No.: DBM-B-140804001-1

Dibromomethane - Bulk		
Parameter	Specification	Result
Appearance	colourless liquid	conforms
Identity		
IR spectrum	conforms to reference spectrum	conforms
Assay		
Assay (GC)	≥ 99.50 %	99.93 %
Purity		
Water	≤ 0.1 %	0.01 %
Bromo chloro methane (GC)	≤ 0.20 % (m/m)	0.07 % (m/m)
Each single unknown impurity (GC)	≤ 0.10 %	< 0.01 % (< LOQ)
Sum of all unknown impurities (GC)	≤ 0.50 %	< 0.01 % (< LOQ)

Analytical data as specified on the suppliers certificate

Constituent	Dibromomethane	Lot No. MKBN5462V
Parameter	Specification	Result
Appearance (Colour)	colourless	colourless
Appearance (Form)	liquid	liquid
Infrared spectrometry	conforms to structure	conforms
GC (area %)	≥ 98.5 %	99.9 %

Date: Quality Control Date: Quality Assurance

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

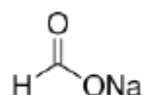
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

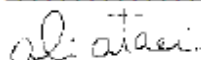
Product Name:

Sodium formate - ACS reagent, ≥99.0%

Product Number: 247596
Batch Number: MKBT6395V
Brand: SIAL
CAS Number: 141-53-7
MDL Number: MFCD00013101
Formula: CHNaO2
Formula Weight: 68.01 g/mol
Quality Release Date: 22 JAN 2015
Recommended Retest Date: DEC 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder or Crystals	Powder
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Titration by Na2S2O3	> 99.0 %	99.2 %
Insoluble Matter	≤ 0.005 %	0.003 %
c = 10%; Water		
Calcium (Ca)	< 0.005 %	< 0.005 %
Chloride Content	≤ 0.001 %	< 0.001 %
Iron (Fe)	≤ 5 ppm	< 5 ppm
Heavy Metals	≤ 5 ppm	< 5 ppm
as Lead		
Sulfate (SO4)	< 0.001 %	< 0.001 %
Meets ACS Requirements	Current ACS Specification	Conforms
10th Edition		
Recommended Retest Period	_____	_____
3 Years		



Ali Ataei, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ABX advanced biochemical compounds

Lithium Aluminum Hydride (solution in THF)

With controlled total background ¹²C

Product No. 801, 802, 803, 804, 832

Chemical Product

For use by qualified personnel only. Manufactured according to In-house Standards.

ABX Product Release

Prod. No.: 832.0005

Lot No.: LAH-120822010-2

Manufacturing Date: Aug. 2012

Expiry Date: Aug. 2013

Product information: 10.08.2010 / Version 2, included to each package

Certificate of analysis

Criteria	Specification	Result
Total background ¹² C	Methanol (as methyl acetate): ≤ 50 ppm	< 10 ppm
	Carbonate (as CO ₂): ≤ 5 ppm	< 5 ppm

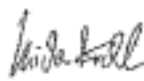
Analytical data as specified on the suppliers certificate

Constituent 1	Specification	Result
Lithium Aluminium Hydride purum	Lot No. STB86497	
Parameter	Specification	Result
Assay (Gasvolumetr.)	97.0 – 100.0 %	99.5 %

Constituent 2	Specification	Result
Tetrahydrofuran, absolute	Lot No. STBC4553V	
Parameter	Specification	Result
Appearance (Colour)	colourless	colourless
Appearance (Form)	liquid	liquid
Purity (GC area %)	≥ 99.5 %	99.62 %
GC stabilizer	contains ca. 250 ppm BHT as inhibitor	232 ppm
Refractive Index N _{20/D}	1.405 – 1.408	1.407
Water (coulometr.)	≤ 0.005 %	< 0.001 %
Infrared spectrum	conforms to structure	conforms
Traces peroxide (as H ₂ O ₂)	≤ 50 MG/KG	< 1 MG/KG

We certify the identity of the analytical results to the source documents in accordance with the ABX specification.

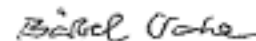
Date: Quality Control



20-Sep-2012 Micha Krahl

We certify that the product is manufactured, tested and released according to the ABX In-house standards.

Date: Quality Assurance



25-Sep-2012 Barbel Wanke

ABX advanced biochemical compounds

Hydriodic Acid Redistilled

Product No. 830.XXXX.X

Chemical Grade Quality

For use by qualified personnel only. Manufactured according to In-house Standards.

ABX Product Release

Lot No: HI-121029005-2

Prod.No: 830.0003.5

Manufacturing Date: Oct. 2012

Expiry Date: Oct. 2013

Product information: 23.07.2010 / Version 1, included for each package

Certificate of analysis

Product No.: 830.0003.5		Lot No.: HI-121029005-2
Parameter	Specification	Result
Appearance	clear, colourless to light yellow solution	conforms
Iodide, qualitative	identification positive	conforms
Concentration	≥ 55 %	56 %

We certify the identity of the analytical results to the source documents in accordance with the ABX specification.

Date: Quality Control



05-Nov-2012 Dr. Micha P. Krahl

We certify that the product is manufactured, tested and released according to the ABX In-house standards.

Date: Quality Assurance



05-Nov-2012 Bärbel Wanke



Certificate of Analysis

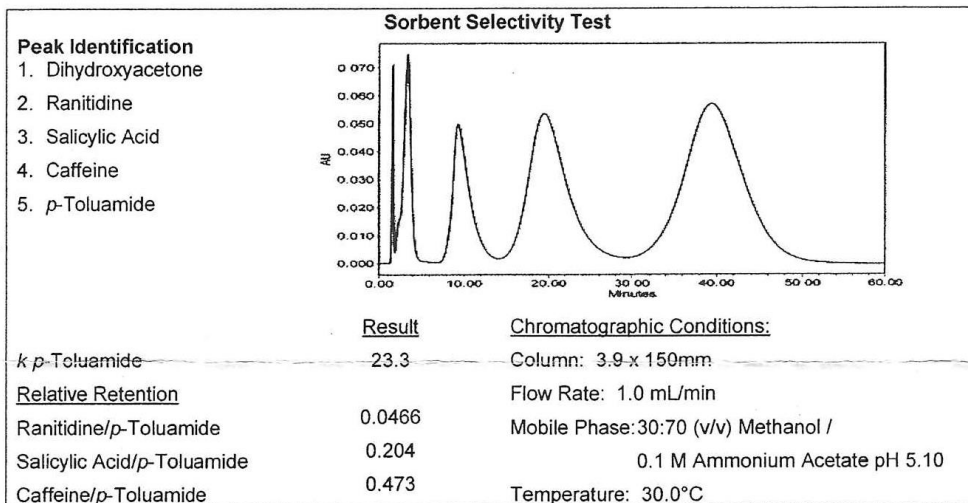
Oasis® HLB Extraction Cartridge

Sorbent: Oasis® HLB, 30µm
 Sorbent Batch #: 122A

Cartridge Type: 1cc/30mg
 Cartridge Lot #: 122A33337A
 Part Number: WAT094225

Sorbent Test Results (See reverse for description of tests)

	Specification	Result	Solid Phase Extraction Recovery Test		
Specific Surface Area (m ² /g)	727 - 889	752	Compound	Avg. Recovery % (n=6)	Rel. Std. Deviation % (n=6)
Average Pore Diameter (Å)	73 - 89	82	Procainamide	98	0.3
Total Pore Volume (cm ³ /g)	1.18 - 1.44	1.19	Ranitidine	98	0.2
Avg. Particle Diameter (µm)	25.0 - 35.0	35.0	Acetaminophen	100	0.4
Fines Content	≤ 1.0%	0.2			
Cleanliness Test	Proprietary	Pass			



Cartridge Lot Test Results

Average Sorbent Weight (g) 0.0302 Sorbent Weight Std. Deviation (g) 0.0002
 Average Air Flow Rate (L/min) 1.5

Quality Approved: [Signature] Date: 15 August 2013



THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™

Form WAT094287 Cartridge, Rev. B
 Page 1 of 2

WAT058813 Rev 9

Załącznik 7 – Specyfikacja kartridża Accell Plus CM.

Sep-Pak Accell Plus CM Plus Light Cartridge, 130 mg Sorbent per Cartridge, 37-55 µm Particle Size, 50/pk [WAT023531]

To see prices, ...

Sep-Pak Accell Plus CM Plus Light Cartridge is a cation-exchange cartridge designed for the extraction of large molecules. Its large particle size makes it ideal for applications in which you need to have a distinct separation between an interstitial and a sample. This design allows you to separate and reduce sample loss. Sample recoveries are limited only by the amount of sample.

Product Number: WAT023531

Availability: In Stock

List Price: --

Qty:

+ Add to Shopping Cart

Specifications

Brand	Sep-Pak
Chemistry	Accell Plus CM
Format/Type	Plus Light Cartridge
Ion Exch. Capacity	370 µeq/gram
Mass Spec Compatibility	Mass Spec Compatible
Mode	Ion-exchange
Particle Size	37-55 µm
Pore Size	300Å
Sorbent Substrate	Silica
Sorbent Weight	130 mg
Units In Package	50/pkg
Water Wettable	Not Water Wettable
pH Range	2 - 8 pH

hydrophilic weak cation exchange resin. Ideal for the extraction of large pore molecules. These cartridges are designed to provide high recovery results in a single cartridge. Sample recoveries are limited only by the amount of sample.





Gliwice, dn. 01.02.2017

ŚWIADECTWO KONTROLI JAKOŚCI

396480111 Etylowy alkohol bezwodny 99,8% CZDA,
ODCZ. FP

Gatunek: CZDA, ODCZ. FP

Dokument normatywny: SJ-850/VI

Nr serii: 1004/02/17

Parametr	Jednostka	Wymagania	Wynik
Wygląd zewnętrzny		bezbarwna, klarowna ciecz	odpowiada
Zawartość alkoholu etylowego	%	min. 99,8	99,9
Barwa	j.Hz	max. 10	< 10
Gęstość (20°C)	g/ml	min. 0,789 max. 0,791	0,79
Wbda	%	max. 0,2	0,03
Kwasy (j. CH ₃ COOH)	%	max. 0,001	< 0,001
Zasady (j. NH ₃)	%	max. 0,0003	< 0,0003
Aldehydy (j. CH ₃ CHO)	%	max. 0,001	< 0,001
Alkohole wyższe (j. alkohol amylowy)	%	max. 0,015	< 0,015
Czas odbarwienia roztworu KMnO ₄	min	min. 10	> 10
Metanol	%	max. 0,01	< 0,01
Pozostałość po odparowaniu	%	max. 0,001	< 0,001
Próba z H ₂ SO ₄		wg przepisu	odpowiada
Związki karbonylowe (j. CO)	%	max. 0,003	< 0,003
Metale ciężkie (j. Pb)	%	max. 0,0001	< 0,0001

Orzeczenie: ODPOWIADA WYMAGANIOM

Okres ważności: Luty 2019

Zatwierdził:

SPECJALISTA ANALITYK
Dział Kontroli Jakości

Antoni Hefrod-Jaswiński

Załącznik 9 – Certyfikat analizy wody do iniekcji.



polpharma
DEPARTAMENT KONTROLI JAKOŚCI

Data wystawienia: 08-LIP-2018
Data wydruku: 10-LIP-2018
Strona: 1 / 1

Certyfikat analizy PM nr: 451 11224

Produkt: AQUA PRO INJ. POLPHARMA 5 ML X 100
Indeks: AQPR-0600-003
Nr serii: 1170618
Wielkość serii: 7658 op

Data ważności: 30-CZE-2021
Data wytworzenia: 17-CZE-2018

WYNIKI ANALIZY

Rodzaj oznaczenia	Wymagania	Wynik badania
Wygląd	Bezbarwna, przezroczysta ciecz, bez smaku i zapachu	odpowiada wymaganiom
Jałowość	Preparat jałowy	jałowy
Endotoksyny bakteryjne	Poniżej 0,25 IU/ml	< 0,25 IU/ml
Zawartość roztworu w ampułce	Nie mniej niż 5,0 ml	5,2 ml
Nierozpuszczalne zanieczyszczenia	Zgodnie z wymaganiami Ph. Eur. (2.9.19)	odpowiada wymaganiom
Kwasowość lub zasadowość	Zgodnie z testem wg Ph. Eur.	odpowiada wymaganiom
Przewodność uS/cm	Nie większa niż 25 uS/cm w 25°C	1,6 uS/cm
Substancje utleniające	Zgodnie z testem wg Ph. Eur.	odpowiada wymaganiom
Chlorki	Nie więcej niż 0,5 ppm	odpowiada wymaganiom
Pozostałość po odparowaniu 1 [%]	Nie więcej niż 0,004%	0,0010 %
Azotany	Nie więcej niż 0,2 ppm	odpowiada wymaganiom
Siarczany	Zgodnie z testem wg Ph. Eur.	odpowiada wymaganiom
Sole amonowe	Nie więcej niż 0,6 ppm	odpowiada wymaganiom
Wapń i magnez	Zgodnie z testem wg Ph. Eur.	odpowiada wymaganiom
Wymagania pojemnika PE	Zgodne ze specyfikacją	odpowiada wymaganiom
Opakowanie i oznakowanie	Zgodne	odpowiada wymaganiom

Badanie przeprowadzono wg: S/4-0083,01 wyd.02

Ocena: **odpowiada wymaganiom**

Sprawdził Dorota Peitler	Zatwierdził Kierownik Laboratorium Wyrobu Gotowego Departament Kontroli Jakości <i>Ł. Hlewecka</i> Miroslawa Ramińska-Wajewoda 10.07.2018
-----------------------------	--

Zakłady Farmaceutyczne POLPHARMA SA
ul. Pełczyńska 19, 83-200 Starogard Gdański

tel. +48 58/ 563 16 00
fax. +48 58/ 562 23 53

e-mail: sekretariat@polpharma.com
http://www.polpharma.pl

CHARAKTERYSTYKA PRODUKTU LECZNICZEGO

1. NAZWA PRODUKTU LECZNICZEGO

NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS, 9 mg/ml, roztwór do infuzji

2. SKŁAD JAKOŚCIOWY I ILOŚCIOWY

1000 ml roztworu zawiera 9 g sodu chlorku.

Osmolarność roztworu wynosi 308 mOsmol/l, pH: 4,5 – 7,0.

Pełny wykaz substancji pomocniczych, patrz punkt 6.1.

3. POSTAĆ FARMACEUTYCZNA

Roztwór do infuzji

4. SZCZEGÓŁOWE DANE KLINICZNE

4.1 Wskazania do stosowania

- Pozajelitowe uzupełnianie płynów i elektrolitów (sód, chlorki).
- Rozcieńczanie i rozpuszczanie koncentratów elektrolitów i produktów leczniczych.
- Objętość 1000 ml może być stosowana jako roztwór do przepłukiwania w postępowaniu chirurgicznym lub jako roztwór sprawdzający aparaturę do dializy.

4.2 Dawkowanie i sposób podawania

Dawkowanie ustala lekarz indywidualnie każdemu pacjentowi w zależności od wieku, masy ciała i stanu klinicznego pacjenta.

W stanach ciężkiego niedoboru sodu można podać od 2 do 3 litrów produktu leczniczego NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS w ciągu 2 - 3 godzin i następnie podawać z mniejszą szybkością.

4.3 Przeciwwskazania

Nie należy stosować tego produktu leczniczego w następujących przypadkach:

- nadwrażliwość na otrzymywaną substancję rozpuszczaną lub rozcieńczaną w produkcie leczniczym NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS;
- przewodnienie.

Stosowanie produktu leczniczego może być niewskazane również w następujących sytuacjach:

- hipernatremia;
- hipokaliemia;
- hiperchloremia;
- kwasica;
- stany wymagające ograniczeń w przyjmowaniu sodu (np. niewydolność serca, uogólnione obrzęki, obrzęk płuc, nadciśnienie, zawał, ciężka niewydolność nerek);
- u noworodków w celu uzupełniania niedoboru wody (stosować wyłącznie do wyrównania zaburzeń jonowych).

4.4 Specjalne ostrzeżenia i środki ostrożności dotyczące stosowania

Produkt leczniczy należy stosować ostrożnie u pacjentów:

- z zastoinową niewydolnością serca;
- z ciężką niewydolnością nerek; u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek produkt leczniczy może spowodować zatrzymanie sodu w organizmie;
- z obrzękami z retencją sodu;
- leczonych kortykosteroidami lub kortykotropiną.

Nadmierne podanie roztworów niezawierających potasu może wywołać znaczną hipokaliemię.

Dożylnie podanie tych roztworów może spowodować przeciążenie płynami i zmniejszenie stężenia

niektórych elektrolitów w osoczu, przewodnienie, objawy zastoinowe w krążeniu lub obrzęk płuc.

Ryzyko przeciążenia płynami powodujące objawy zastoinowe w krążeniu jest wprost proporcjonalne do stężenia elektrolitów w tych roztworach.

Podczas długotrwałego podawania produktu leczniczego niezbędna jest ocena stanu klinicznego i okresowe badania parametrów laboratoryjnych w celu monitorowania zmian w równowadze płynów, stężeniach elektrolitów i równowadze kwasowo-zasadowej.

4.5 Interakcje z innymi produktami leczniczymi i inne rodzaje interakcji

Tak jak w przypadku wszystkich produktów leczniczych podawanych pozajelitowo, należy sprawdzić zgodność innych produktów leczniczych dodawanych do produktu leczniczego NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS.

Jednoczesne podawanie produktów leczniczych zatrzymujących sód, takich jak niesteroidowe leki przeciwzapalne, karbenoksolon, kortykosteroidy, kortykotropina może zwiększyć ryzyko wystąpienia nadmiaru sodu.

W przypadku dodawania do produktu leczniczego NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS innych produktów leczniczych powstały roztwór należy natychmiast podać.

Należy zwrócić uwagę na możliwe zmiany zabarwienia.

4.6 Wpływ na płodność, ciążę i laktację

NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS może być podawany kobietom w okresie ciąży i podczas karmienia piersią.

4.7 Wpływ na zdolność prowadzenia pojazdów i obsługiwanie maszyn

Nie dotyczy.

4.8 Działania niepożądane

Częstość występowania działań niepożądanych określono następująco:

bardzo często ($\geq 1/10$), często ($\geq 1/100$ do $< 1/10$), niezbyt często ($\geq 1/1000$ do $< 1/100$), rzadko ($\geq 1/10\ 000$ do $< 1/1000$), bardzo rzadko ($< 1/10\ 000$), częstość nieznana (częstość nie może być określona na podstawie dostępnych danych).

Podanie zbyt dużej objętości produktu leczniczego NATRIUM CHLORATUM 0,9% FRESENIUS może spowodować:

Zaburzenia metabolizmu i odżywiania

Częstość nieznana:

Hipernatremia, hiperchloremia, kwasica.

Zaburzenia serca

Częstość nieznana:

Nasilenie objawów niewydolności serca, zwłaszcza u pacjentów z chorobami układu krążenia.

Zaburzenia układu oddechowego, klatki piersiowej i śródpiersia

Częstość nieznana:

Obrzęk płuc, zwłaszcza u pacjentów z chorobami układu krążenia.

Zaburzenia ogólne i stany w miejscu podania

Częstość nieznana:

Podrażnienie żyły, zakrzepowe zapalenie żyły.

Zgłaszanie podejrzewanych działań niepożądanych

Po dopuszczeniu produktu leczniczego do obrotu istotne jest zgłaszanie podejrzewanych działań niepożądanych. Umożliwia to nieprzerwane monitorowanie stosunku korzyści do ryzyka stosowania produktu leczniczego. Osoby należące do fachowego personelu medycznego powinny zgłaszać wszelkie podejrzewane działania niepożądane za pośrednictwem Departamentu Monitorowania Niepożądanych Działań Produktów Leczniczych Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych

Al. Jerozolimskie 181C

02-222 Warszawa

tel.: + 48 22 49 21 301

faks: + 48 22 49 21 309

e-mail: ndl@urpl.gov.pl

Działania niepożądane można zgłaszać również podmiotowi odpowiedzialnemu.

4.9 Przedawkowanie

W przypadku przewodnienia lub przeciążenia substancjami rozpuszczonymi, należy dokonać oceny stanu klinicznego pacjenta i podjąć właściwe leczenie.

5. WŁAŚCIWOŚCI FARMAKOLOGICZNE

5.1 Właściwości farmakodynamiczne

Grupa farmakoterapeutyczna: płyny infuzyjne wpływające na równowagę elektrolitową, elektrolity, kod ATC: B05BB01.

Podany dożylnie produkt leczniczy stanowi źródło wody i elektrolitów.

U dorosłych przeciętne zapotrzebowanie na wodę wynosi od 2 do 3 litrów na dobę.

Sód jest głównym kationem płynu pozakomórkowego. W organizmie całkowita zawartość sodu wynosi około 70 mmol/kg, z czego około 97% znajduje się w płynie pozakomórkowym i około 3% w wewnątrzkomórkowym. Utrzymanie prawidłowego bilansu sodu jest niezbędne dla zachowania właściwej objętości krwi i rozmieszczenia wody. Mechanizmy regulujące równowagę wodną w organizmie są bezpośrednio związane z sodem. Jakikolwiek odchylenie od fizjologicznych stężeń sodu w osoczu powoduje zaburzenia homeostazy wodnej.

Sód uczestniczy we wszystkich procesach bioelektrycznych organizmu i jest niezbędny do funkcjonowania różnych enzymów systemowych.

Chlor jest dominującym anionem w płynie pozakomórkowym i stanowi około 70% anionów w przestrzeni pozakomórkowej. Chlor jest związany z metabolizmem sodu i potasu. Jony chlorkowe ulegają wymianie na dwuwęglany w kanalikach nerkowych i dlatego biorą udział w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej.

Jony chlorkowe i sodowe utrzymują osmolarność w płynie pozakomórkowym, są odpowiedzialne za około 80% ciśnienia osmotycznego płynu pozakomórkowego.

5.2 Właściwości farmakokinetyczne

Sód jest wydalany głównie przez nerki w ilości około 100 - 180 mmol na dobę. Gdy jest to niezbędne, wydalanie przez nerki może obniżyć się do 10 mmol na dobę.

Ponadto sód jest wydalany z potem (około 50 mmol/l), z sokiem żołądkowym (około 60 mmol/l) i z sokami jelitowymi (około 110 mmol/l).

Chlor jest głównie wydalany przez nerki (około 150 mmol/dobę). Gdy jest to konieczne, wydalanie przez nerki może wzrosnąć do 400 mmol na dobę. Chlor jest również wydalany z potem (około 50 mmol/l) i z wydzielinami jelitowymi (około 100 mmol/l).

5.3 Przedkliniczne dane o bezpieczeństwie

Stężenia sodu i chloru w izotonicznym roztworze chlorku sodu są podobne do ich naturalnych stężeń we krwi. Zatem nie należy spodziewać się toksycznego działania, jeśli dawkowanie mieści się w granicach fizjologicznych zdolności regulacyjnych organizmu.

Nie obserwowano wpływu izotonicznego roztworu chlorku sodu na rozrodczość, rozwój płodu, mutagenność lub karcynogenezę. Izotoniczny roztwór chlorku sodu stosowano w wielu grupach kontrolnych w badaniach toksykologicznych, włączając leczenie przewlekłe. Izotoniczny roztwór chlorku sodu minimalnie wpływa na metabolizm badanych zwierząt doświadczalnych, gdy jest podawany z szybkością i w dawkach będących w zakresie fizjologicznych zdolności regulacyjnych organizmu dotyczących wody, sodu i chloru.

6. DANE FARMACEUTYCZNE

6.1 Wykaz substancji pomocniczych

Woda do wstrzykiwań
Sodu wodorotlenek 2% (do ustalenia pH)
Kwas solny (do ustalenia pH)

6.2 Niezgodności farmaceutyczne

Należy sprawdzić zgodność innych produktów leczniczych dodawanych do roztworu produktu leczniczego Natrium Chloratum 0,9% Fresenius.

6.3 Okres ważności

3 lata:

- produkt leczniczy w pojemnikach polietylenowych KabiPac z kapslem,
- produkt leczniczy w pojemnikach polipropylenowych KabiClear z kapslem,
- produkt leczniczy w workach polipropylenowych typu „freeflex[®]” lub „freeflex[®]+” (250 ml, 500 ml, 1000 ml),
- produkt leczniczy w butelkach szklanych.

2 lata:

- produkt leczniczy w workach polipropylenowych typu „freeflex[®]” lub „freeflex[®]+” (50 ml, 100 ml).

6.4 Specjalne środki ostrożności podczas przechowywania

Pojemnik polietylenowy KabiPac z kapslem:
Nie zamrażać.

Pojemnik polipropylenowy KabiClear z kapslem, worek polipropylenowy typu „freeflex[®]” lub „freeflex[®]+”,
butelka szklana;

Przechowywać w temperaturze poniżej 25°C. Nie zamrażać.

Opakowanie po otwarciu nie może być przechowywane i stosowane powtórnie.

Z mikrobiologicznego punktu widzenia produkt leczniczy należy zużyć natychmiast. W przeciwnym razie odpowiedzialność za warunki i czas przechowywania pozostałego w opakowaniu produktu leczniczego ponosi użytkownik.

6.5 Rodzaj i zawartość opakowania

Pojemnik polietylenowy KabiPac z kapslem – 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

Pojemnik polipropylenowy KabiClear z kapslem – 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

Worek polipropylenowy typu „freeflex[®]” lub „freeflex[®]+” (z portem bezigłowym) – 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

Butelka szklana – 250 ml, 500 ml.

Nie wszystkie wielkości opakowań muszą znajdować się w obrocie.

6.6. Szczególne środki ostrożności dotyczące usuwania i przygotowania produktu leczniczego do stosowania

Stosować tylko przezroczysty roztwór.

Niezużyta pozostałość produktu leczniczego nie nadaje się do dalszego stosowania.

Nie należy stosować produktu leczniczego w przypadku wystąpienia zanieczyszczeń, zmiany zabarwienia lub gdy opakowanie jest uszkodzone.

Postępować zgodnie z zasadami aseptyki.

Wszelkie niewykorzystane resztki produktu leczniczego lub jego odpady należy usunąć zgodnie z lokalnymi przepisami.

Instrukcja użycia worka polipropylenowego typu „freeflex[®]” i „freeflex[®]+”:

1. Przed użyciem należy sprawdzić wygląd worka oraz roztworu – roztwór powinien być klarowny bez zanieczyszczeń (nie używać worków uszkodzonych i (lub) wcześniej używanych).
2. Przygotowanie infuzji:
 - a) Wyjąć worek z opakowania zewnętrznego.
 - b) Usunąć plastikową osłonkę/zatyczkę z większego ciemnoniebieskiego portu (portu do infuzji) ze strzałką skierowaną na zewnątrz opakowania.
 - c) Podłączyć zestaw do infuzji.
3. Dodanie leku do opakowania:
 - a) Wyjąć worek z opakowania zewnętrznego
 - b) Usunąć plastikową osłonkę/zatyczkę z mniejszego portu do dostrzyknięć (białego w przypadku worka typu „freeflex[®]”, jasnoniebieskiego w przypadku worka typu „freeflex[®]+”) ze strzałką skierowaną do wewnątrz opakowania, a następnie dodać produkt leczniczy:
 - Do worka „freeflex[®]” za pośrednictwem strzykawki z igłą.
 - Do worka „freeflex[®]+” za pośrednictwem strzykawki typu luer lock dokręcając ją bezpośrednio do portu do dostrzyknięć lub za pośrednictwem standardowej strzykawki z igłą.
 - Stosując urządzenie freeflex+ transfer adapter przeznaczone do bezpośredniego dodawania leku z fiolki do opakowania.

Uwaga: Porty są jałowe, nie wymagają dezynfekcji przed pierwszym użyciem.

Wyroby medyczne przeznaczone do podaży i dodawania leku należy stosować zgodnie z ich instrukcją użycia. Roztwór powstały po dodaniu leku należy starannie zmieszać i upewnić się, że nie nastąpiło wytrącenie osadów z roztworu.

Instrukcja użycia pojemnika typu KabiPac i KabiClear:

1. Przed użyciem należy sprawdzić wygląd pojemnika oraz roztworu – roztwór powinien być klarowny bez zanieczyszczeń (nie używać pojemników uszkodzonych i (lub) wcześniej używanych).
2. Przygotowanie infuzji:
 - a) Postawić pojemnik KabiPac/KabiClear na stabilnej i równej powierzchni.
Usunąć plastikową osłonkę/zatyczkę z większego portu (portu do infuzji) ze strzałką skierowaną na zewnątrz opakowania.
 - b) Wprowadzić kolec zestawu do infuzji pionowo w port do infuzji, lekko obracając zestaw dłońią, drugą ręką trzymając szyjkę pojemnika.
3. Dodanie leku do opakowania:
 - a) Postawić pojemnik KabiPac/KabiClear na równej stabilnej powierzchni.
 - b) Usunąć plastikową osłonkę/zatyczkę z mniejszego portu (portu do dostrzyknięć) ze strzałką skierowaną do wewnątrz opakowania, a następnie wprowadzić igłę w środek portu do dostrzyknięć i dodać produkt leczniczy do pojemnika KabiPac/KabiClear.

Uwaga: Porty są jałowe, nie wymagają dezynfekcji przed pierwszym użyciem.

Wyroby medyczne przeznaczone do podaży i dodawania leku należy stosować zgodnie z ich instrukcją użycia. Roztwór powstały po dodaniu leku należy starannie zmieszać i upewnić się, że nie nastąpiło wytrącenie osadów z roztworu.

7. PODMIOT ODPOWIEDZIALNY POSIADAJĄCY POZWOLENIE NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU

Fresenius Kabi Polska Sp. z o.o.
Al. Jerozolimskie 134
02-305 Warszawa

8. NUMER POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU

Pozwolenie nr R/2510

9. DATA WYDANIA PIERWSZEGO POZWOLENIA NA DOPUSZCZENIE DO OBROTU I DATA PRZEDŁUŻENIA POZWOLENIA

Data wydania pierwszego pozwolenia na dopuszczenie do obrotu: 01.03.1990 r.
Data ostatniego przedłużenia pozwolenia: 17.03.2015 r.

10. DATA ZATWIERDZENIA LUB CZĘŚCIOWEJ ZMIANY TEKSTU CHARAKTERYSTYKI PRODUKTU LECZNICZEGO

19.10.2018 r.

ZATWIERDZONE

zgodnie z Decyzją

UR.DZL.ZLN.4020.04335.2018

z dn. 2018.10.19

Dyrektor Rejestracji,
Bezpieczeństwa Farmakoterapii i Jakości
Fresenius Kabi Polska Sp. z o.o.

Małgorzata Czeklerda-Kürczab



Sterile Millex® Filter Unit

Pore Size Rating:	0.22 µm
Catalogue Number:	SLGSV255F
Lot Number:	R6EA38631
Expiry Date:	2019 05
Sterilization Date:	2016 05
Membrane Type:	MF-Milipore™ (Mixed Cellulose Esters)

Good Manufacturing Practice

This product was manufactured in a Merck Millipore Facility that meets FDA Device Good Manufacturing Practice Standards under the Quality System Regulation and ISO® 13485 Standard for Medical Device production.

CE Marking

Product is CE marked in accordance with EC directive 93/42/EEC.

ISO® 9001 Quality Standard

This product was manufactured in a Merck Millipore facility whose Quality Management System is approved by an accredited registering body to the ISO® 9001 Quality Systems Standard.

Component Materials Toxicity

Component materials were tested for biocompatibility and meet the requirements for ISO® 10993 (External communicating devices, blood path indirect, less than or equal to 24 hour contact duration) and the current USP Class VI Biological Test for Plastics.

Millex is a registered trademark of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
MF-Milipore is a trademark of Merck KGaA.
ISO is a trademark of the International Standards Organisation.

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released by Quality Assurance to the following specification:

Integrity

Each unit is air tested during the manufacturing process to ensure both membrane and housing integrity. Prior to release, samples are tested to meet a water bubble point specification of ≥ 50 psi and particle challenge tested by a method that correlates to the *Brevundimonas diminuta* ASTM bacterial challenge test.

Housing Burst

Samples meet a minimum housing burst of 75 psi.

Water Flow Rate

Samples exhibit a water flow rate greater than or equal to 30 ml per minute at 10 psi with 0.22µm filtered RO water at 25°C.

Sterility

This product has been sterilized by Ethylene Oxide (EO) in a validated sterilization cycle according to ISO 11135 standard. Spore strips (*Bacillus atrophaeus* 10⁶ minimum spore count) incorporated in the lot have been shown to be sterile.

EO Residuals

Maximum EO residue limits meet the U.S. Federal guideline for devices contacting blood (ex vivo) and ISO® 10983-7.

Quality Assurance Audit Criteria

This product was designed and manufactured to meet the following characteristics that are confirmed by testing on an audit basis:

Bacterial Endotoxins

An aqueous extraction from the unit contains less than or equal to 2.15 EU/Unit as determined using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test.

Toxicity

Non-toxic as per the current USP Mouse Safety Test.

Downstream Particles

Samples show no more than 50 particles >10 µm per unit.

Bioburden

Samples show no more than 50 microorganisms per unit prior to sterilization.

Joe Bergin

Site QA Manager - Merck Millipore Ltd
Tullagreen
Carrigtwohill
Co. Cork
Ireland

Rev 03/13

Sterile Millex® Filter Unit

Pore Size Rating:	0.22 µm
Catalogue Number:	SLGV033RB
Lot Number:	R5NA68816
Expiry Date:	2018 10
Sterilization Date:	2015 10
Membrane Type:	Durapore® (PVDF)

Good Manufacturing Practice

This product was manufactured in a Merck Millipore Facility that meets the ISO® 13485 Standard for Medical Device production.

CE Marking

Product is CE marked in accordance with EC directive 93/42/EEC

ISO® 9001 Quality Standard

This product was manufactured in a Merck Millipore facility whose Quality Management System is approved by an accredited registering body to the ISO® 9001 Quality Systems Standard.

Component Materials Toxicity

Component materials were tested for biocompatibility and meet the requirements for ISO® 10993 (External communicating devices, blood path indirect, less than or equal to 24 hour contact duration) and the current USP Class VI Biological Test for Plastics.

Millex and Durapore are registered trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
ISO is a trademark of the International Standards Organisation.

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released by Quality Assurance to the following specification:

Integrity

Each unit is tested during the manufacturing process to ensure defect free membrane. Prior to release, samples are tested to meet a water bubble point specification of \geq 50 psi (3.45 bar) and particle challenge tested by a method that statistically correlates to the *Brevundimonas diminuta* ASTM bacterial challenge test.

Housing Burst

Samples meet a minimum housing burst of 150 psi (10.34 bar)

Water Flow Rate

Samples exhibit a water flow rate greater than or equal to 40 ml per minute at 30 psi (2.07bar) with 0.22µm filtered RO water at 25°C

Sterility

This product has been sterilized by GAMMA irradiation in a validated sterilization cycle and meets an established dose as per AAMI validation guidelines.

Rev 03/13

Quality Assurance Audit Criteria

This product was designed and manufactured to meet the following characteristics that are confirmed by testing on an audit basis.

Toxicity

Non-toxic as per the current USP Mouse Safety Test.

Downstream Particles

Samples show no more than 50 particles >10 µm per unit.

Bioburden

Samples show no more than 50 microorganisms per unit prior to sterilization.

Bacterial Endotoxins

An aqueous extraction from the unit contains less than or equal to 2.15 EU/Unit as determined using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test.

Joe Bergin




Site QA Manager - Merck Millipore Ltd
Tullagreen
Carrigrohilly
Co. Cork
Ireland



SPECIFICATIONS	
<i>Column Chemistry:</i> SCX, WAX, and RP Mixed-Mode	<i>Operating flow rate range (recommended):</i> 0.30–1.60 (0.4 to 1.0) mL/min for 3.0 mm i.d. formats
<i>Operating Pressure Limit:</i> 4500 psi	0.15–0.80 (0.2 to 0.5) mL/min for 2.1 mm i.d. formats
<i>Operating pH range (recommended):</i> 2.5–7.0 (3.0 to 6.0)	



Endosafe® - PTS™ Cartridges Certificate of Analysis

Reorder Code: PTS201F Cartridge Lot #:  8792138 Expiration Date: Oct 2020

Calibration Code:  612025392035 RSE/CSE Ratio: 12 EU/ng RSE Lot #: H0K354

Archived Standard Curve Range: 10-0.1 EU/mL Standard Curve Linearity: -0.999

Standard Curve Mean Reaction Times: 10.0 EU/mL 120 seconds
1.0 EU/mL 300 seconds
0.1 EU/mL 653 seconds

Archived Spike Concentration: 0.80 EU/mL Negative Control: Pass

This lot of PTS Cartridges has been tested and meets Quality Control testing requirements for an archived curve, negative controls, and positive product control results.

Store cartridges at 2-25°C. Allow the unopened foil pouch to reach room temperature prior to opening. Cartridges should be used immediately once the foil pouch seal has been opened. Cartridges are for single-test use only.

CAUTION: DO NOT FREEZE THE CARTRIDGES

Qualified Analyst *Jessica Pelite* Date 26 Oct 2018
Reviewed By *A. Hudson* Date 26 Oct 2018

Charles River Laboratories, Inc.
1023 Wappoo Road, Suite 43-B
Charleston, SC 29407 USA

CA-PTS20F-04

Załącznik 15 – Specyfikacja kolumny chromatograficznej HP Innowax.

Configuration choices for improved Agilent J&W HP-INNOWax

Capillary	
ID (mm)	0.18 – 0.32 mm
Length (m)	20 – 60 m
Film (µm)	1.00 – 1.80 µm
Temperature Limits (°C)	-20 – 260 °C

Megabore	
ID (mm)	0.53 mm
Length (m)	30 – 75 m
Film (µm)	3.00 µm
Temperature Limits (°C)	-20 – 260 °C

Applications:

Alcohols, Free Acids, Aromatics, Essential Oils, Solvents

**RAPORT Z ANALIZY ZANIECZYSZCZEŃ RADIONUKLIDOWYCH
DLA SERII CHL150722A
SAMODZIELNA PRACOWNIA CYKLOTRONU I PRODUKCJI RADIOIZOTOPÓW**

PODSTAWOWE DANE RAPORTU

Ścieżka dostępu wyniku analizy	C:\Users\hpge_agnieszka\Desktop\CHL\CHL150722A.CNF
Data opracowania raportu	2016-08-19 14:37:20
Nazwa próbki/Seria	CHL150722A
Opis próbki	(11-C) CHL
Aktywność próbki	1017 MBq
Objętość próbki	2.00 ml
Data wyprodukowana próbki	2015-07-22 15:11:00
Data rozpoczęcia pomiaru	2016-08-16 04:41:26
Rzeczywisty czas pomiaru	3610.1 sekund
Ustawiony czas pomiaru	3600.0 sekund

ZIDENTYFIKOWANE RADIONUKLIDY

Nazwa radionuklidu	Poziom ufności dla radionuklidu	Aktywność (Bq /ml)	Błąd pomiarowy (Bq /ml)
CR-51	0.370	8.436252E+005	8.291744E+004
MN-54	0.992	5.696136E+000	9.503709E-001
CO-56	0.797	1.252415E+003	4.690640E+001
CO-57	0.964	7.073371E+001	2.164444E+000
CO-58	0.854	1.175337E+004	2.067812E+002
ZN-65	0.986	1.813183E+000	2.175769E+000
SR-85	0.808	1.327841E+003	3.070877E+002

Wartość sumaryczna stężenia aktywności: 858037.03 Bq/ml

NIEZIDENTYFIKOWANE PIKI

Numer kolejny piku	Energia (keV)	Liczba zliczeń na sekundę	Błąd liczby zliczeń na sekundę
2	127.25	3.4534E-001	11.70
5	509.59	1.2501E+000	25.79
6	510.79	5.2398E+000	5.87
8	744.19	1.0355E+000	4.08
11	846.83	2.3413E+000	2.36
13	935.68	8.8067E-001	4.16
17	1246.71	4.2220E-002	20.50
18	1322.15	2.5495E-001	8.98
21	1378.21	2.3059E-001	9.21
22	1434.71	6.2583E-001	4.71
23	1577.41	1.2708E-002	73.87
24	1680.54	8.4277E-002	22.48
25	1750.31	1.9043E-002	34.13
26	1758.70	1.4002E-002	43.22
28	1920.88	3.6119E-002	28.96
31	2086.83	6.8718E-002	16.49
32	2180.15	2.1847E-002	39.91

PODSUMOWANIE RAPORTU

Całkowita radioaktywność zanieczyszczeń radionuklidami nie jest większa niż 0,1 %

Załącznik 17 – Certyfikat badań mikrobiologicznych.

Badanie mikrobiologiczne:

Lp.	Nr serii	Rodzaj badania	Wynik badania	Wymagania wg FP IX 2011
1.	CHL130311A	Badanie jalowości w warunkach tlenowych	jalowy	jalowość
		Badanie jalowości w warunkach beztlenowych	jalowy	jalowość
2.	CHL130311B	Badanie jalowości w warunkach tlenowych	jalowy	jalowość
		Badanie jalowości w warunkach beztlenowych	jalowy	jalowość
3.	CHL130311C	Badanie jalowości w warunkach tlenowych	jalowy	jalowość
		Badanie jalowości w warunkach beztlenowych	jalowy	jalowość
4.	CHL130312A	Badanie jalowości w warunkach tlenowych	jalowy	jalowość
		Badanie jalowości w warunkach beztlenowych	jalowy	jalowość
5.	CHL130312B	Badanie jalowości w warunkach tlenowych	jalowy	jalowość
		Badanie jalowości w warunkach beztlenowych	jalowy	jalowość

Orzeczenie: Badane próbki preparatu ¹¹C-CHL, w przeprowadzonym zakresie badań, odpowiadają wymaganiom farmakopealnym.

Data zakończenia badań: 2.04.2013 r.

Data sporządzenia protokołu: 3.04.2013 r.

<p>_____</p> <p>(podpis osoby odpowiedzialnej wykonanie badań fizykochemia)</p>	<p>KIEROWNIK LABORATORIUM</p> <p><i>[Podpis]</i></p> <p>mgr Ewa Kocielińska-Kocurek (podpis osoby odpowiedzialnej za wykonanie badań mikrobiologia)</p>	<p>STARSZY ASYSTENT LABORATORIUM</p> <p><i>[Podpis]</i></p> <p>mgr Joanna Chamiola (podpis osoby odpowiedzialnej za treść orzeczenia)</p>	<p>KIEROWNIK LABORATORIUM</p> <p><i>[Podpis]</i></p> <p>mgr Ewa Kocielińska-Kocurek (podpis kierownika jednostki badającej wydającej orzeczenie)</p>
---	---	---	--

Sporządzono w 2. egzemplarzach.

Otrzymuje:

1. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach
2. a/a

Orzeczenie zawiera 10 wyników badań i bez pisemnej zgody Laboratorium nie może być powielane inaczej, jak tylko w całości.

Protokół badań nr: 76.2013

F-07/PO-17; wyd.2; akt.2; obowiązuje od: 16.01.12; str./str: 1/1