

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
СТУДИСКА ПРОГРАМА ПО ФАРМАЦЕВТСКИ НАУКИ



ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Воведување на нова методологија за синтеза и контрола на
квалитет на радиофармацевтикот [^{18}F]Флуоромисонидазол

Introducing new methodology for synthesis and quality control of
[^{18}F]Fluoromisonidazole radiopharmaceutical

м-р Маја Чочевска

Штип, декември 2023 г.

Комисија за утврдување на подобноста на темата

Претседател: проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска,
редовен професор,
Факултет за медицински науки,
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Член: проф. д-р Бистра Ангеловска
редовен професор,
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Член: проф. д-р Биљана Ѓорѓеска,
редовен професор,
Факултет за медицински науки,
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Членови на Комисија за оценка и одбрана за докторска дисертација

Интерен ментор: проф. д-р Бистра Ангеловска,
редовен професор,
Факултет за медицински науки,
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Екстерен ментор: проф. д-р Ана Угринска,
вонреден професор,
Медицински факултет – Скопје,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Претседател: проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска,
редовен професор,
Факултет за медицински науки,
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Член: проф. д-р Валентин Мирчевски,
редовен професор, Институт за хемија,
Природно-математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје

Член: проф. д-р Биљана Ѓорѓеска,
редовен професор,
Факултет за медицински науки,
Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

Научно поле: Фармација
Научна област: Радиофармација

Датум на одбрана: 11.12.2023
Датум на промоција:

Благодарност

Изразувам благодарност до мојот интерен ментор, проф. д-р Бистра Ангеловска, за професионалната и безусловна поддршка, за огромната мотивација и достапноста во кое било време при изработката на трудот.

Благодарност до мојот екстерен ментор, проф. д-р Ана Угринска, за севкупната несебична помош и за стручните сугестии дадени во процесот на изработката на докторската дисертација. Особена благодарност упатувам за дадената можност за реализација на истражувачкиот дел од докторската дисертација во Универзитетскиот институт за позитронско-емисиона томографија.

Благодарност до проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска, за професионалната и академската поддршка, за нејзиното учество, советување и за насоките кои ми ги даваше во текот на реализацијата на оваа докторска дисертација и за нејзините сугестии и конструктивни критики.

Изразувам благодарност и до сите мои соработници од Одделот за производство на радиоизотопи и радиофармацевтски препарати од Универзитетскиот институт за позитронско-емисиона томографија, за покажаната и докажаната колегијалност и разбирање, за помошта и поддршката за спроведувањето на експериментите за потребите на трудот.

Огромна благодарност до мојот сопруг и целото семејство за разбирањето и поддршката за надминување на сите предизвици и остварување на посакуваната цел.

Овој докторски труд го посветувам на мојата сакана ќерка Софија.

Рецензирани и објавени трудови

Chochevska, M., Lazareva, M., Kolevska, K., Velichkovska, M., Kozirowski, J., Ivanovska, E., Angelovska, B. & Ugrinska, A. (2023). [18F]Fluoromisonidazole synthesis method: development and optimization by cartridge purification. *Radiochimica Acta*. <https://doi.org/10.1515/ract-2023-0169>

Chochevska M., Kolevska K., Atanasova Lazareva M., Velichkovska M., Jolevski F., Tripunovski T., Janevik Ivanovska E., Ugrinska A., Angelovska B. (2023). Optimization of reaction conditions for synthesis of [18F]FMISO using stable [19F]F⁻. *J.Res.Pharm.* 27(5): 2058- 2066. <http://dx.doi.org/10.29228/jrp.484>

Воведување на нова методологија за синтеза и контрола на квалитет на радиофармацевтикот [¹⁸F]Флуоромисонидазол

Краток извадок

Познати се голем број дијагностички методи со кои може да се испитаат различни хипоксични тумори, но позитронско-емисионата томографија (ПЕТ) покажува голем број на предности. За таа цел во ПЕТ се користат добро познатите нитроимидазолни деривати поврзани за ¹⁸F-флуор како позитронски радионуклид. Еден од најмногу користените е [¹⁸F]Флуоромисонидазол (1-[¹⁸F]fluoro-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ol, со кратенка [¹⁸F]FMISO). [¹⁸F]FMISO е високоспецифичен особено кај хипоксија на глиоми, хипоксија во белодробен рак, карциноми на глава и врат и други хипоксични тумори. Досега за производство на [¹⁸F]FMISO се развиени две методологии. Едниот метод е познат како стандарден и користи модул за синтеза поврзан со дополнителна единица за прочистување со високоефикасна течна хроматографија (HPLC единица за прочистување), а вториот метод е понов и користи модул за синтеза со прочистување од типот цврсто фазна екстракција со употреба на SPE кертриџи. SPE методот овозможува целосно автоматизирање на процесот, скратување на времето на синтеза, повисок принос, поедноставување на целокупниот процес за производство со поголема безбедност на операторот (од аспект на заштита од јонизирачко зрачење) и со пониска цена.

Целта на оваа докторска дисертација беше воведување на нова методологија за синтеза на радиофармацевтикот [¹⁸F]Флуоромисонидазол во којшто наместо стандардниот метод на производство се развие и оптимизира синтеза со SPE прочистување. За овој процес на развој на синтезата беше потребно дефинирање на голем број параметри коишто имаат големо влијание врз ефикасноста на синтезата. Најпрво беше креирана секвенца за автоматска синтеза на [¹⁸F]FMISO со SPE прочистување. Потоа беше направена оптимизација на синтезата и прочистувањето за: почетни услови во реакцијата пред радиофлуоринација (почетна активност на [¹⁸F]F⁻, тип на анјон-разменувачкиот кертриџ за задржување на ¹⁸F[F⁻], раствор за елуција на ¹⁸F[F⁻]); услови во реакција на радиофлуоринација (маса на прекурсор, температура на радиофлуоринација, времетраење на реакција на радиофлуоринација); услови

во реакција по радиофлуоринација (времетраење на евапорација на ацетонитрил, растворот за хидролиза, температура на хидролиза, времетраење на реакцијата на хидролиза); типови на SPE кертрици за прочистување (испитани се шест типа на реверзно-фазен кертриц, два типа на катјонизменувачки кертрици и два типа на алуминимум оксидни кертрици). За оваа цел беа направени околу 50 синтети и за секоја серија на производ беше направена контрола на квалитет.

Во оваа студија успешно беше развиена синтеза на [^{18}F]Флуоромисонидазол со SPE прочистување која може да се спроведе и под асептични услови, произведувајќи радиофармацевтик со квалитет што ги исполнува сите критериумите дефинирани во монографијата на Европската фармакопеја.

Клучни зборови: [^{18}F]FMISO, [^{18}F]F, синтеза, ПЕТ, оптимизација, контрола на квалитет

Introducing new methodology for synthesis and quality control of [¹⁸F]Fluoromisonidazole radiopharmaceutical

Abstract

There are a number of methods or techniques that can be used in a diagnostic procedure of various hypoxic tumors, but positron emission tomography (PET) has a number of advantages. For this purpose, nitroimidazole derivatives with ¹⁸F radioisotope extensively studied for imaging hypoxia. Among the PET radiopharmaceuticals that are selectively targeting hypoxic conditions is [¹⁸F]Fluoromisonidazole (1-[¹⁸F]fluoro-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ol, [¹⁸F]FMISO). [¹⁸F]FMISO is highly specific especially in hypoxia of gliomas, hypoxia in lung cancer, head and neck carcinomas and other hypoxic tumors. So far, two methodologies have been developed for the production of [¹⁸F]FMISO. One method is known as standard and use a synthesis module connected to HPLC purification unit and the second recent developed method use a synthesis module with solid-phase extraction (SPE) cartridges. SPE offers advantages such as simple and faster purification, usage of commercial cartridges, easily adaptable, practical, fast and low cost.

The goal of this work was to develop [¹⁸F]FMISO synthesis process with solid phase extraction (SPE) Sep-Pak purification cartridges. Defining a large number of parameters that have a great influence on the efficiency of the synthesis it was necessary for that purpose.

First, a sequence was created for the automated synthesis of [¹⁸F]FMISO with SPE purification. Synthesis and purification were then optimized for: initial conditions in the reaction before radiofluorination (initial [¹⁸F]F⁻ activity, type of anion-exchange cartridge for ¹⁸F[F⁻] retention, ¹⁸F[F⁻] elution solution); radiofluorination reaction conditions (mass of precursor, temperature, reaction time); conditions after radiofluorination reaction (evaporation time of acetonitrile, hydrolysis solution, temperature, reaction time); SPE purification cartridges types (six reverse-phase cartridge, two cation-exchange cartridges and two aluminum oxide cartridges). More than 40 syntheses were conducted for this purpose and quality control was done for each batch of product.

In this study, a synthesis of [¹⁸F]Fluoromisonidazole with SPE purification was successfully developed that can be carried out under aseptic conditions, producing a

radiopharmaceutical of quality that meets all the criteria defined in Ph. Eur. Monograph for Fluoromisonidazole (^{18}F) injection.

Key words: $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, $[^{18}\text{F}]\text{F-}$, *synthesis, PET, optimisation, quality control*

Кратенки

- РФП – радиофармацевтски препарат
- [¹⁸F]Fluoride - [¹⁸F]Флуорид
- [¹⁸F]FMISO - [¹⁸F]Флуороимидазол
- PET - ПЕТ – positron emission tomography / позитронско емисиона томографија
- QC – Quality control – контрола на квалитет
- HPLC – high performance liquid chromatography - високоперформансна течна хроматографија
- A – analyte – анализиран примерок
- AUC – area under curve – површина под пик
- Rt – retention time - ретенционо време
- St – standard solution – стандарден раствор
- T_{1/2} – half life - период на полураспаѓање
- TLC – thin layer chromatography - тенкослојна хроматографија
- Bq - becquerel – бекерел (GBq – гигабекерел, MBq – мегабекерел)
- EOB - end of bombardment - крај на озрачување
- EOS - end of synthesis - крај на синтеза
- d.c. - decay corrected - коригиран за радиоактивен распад
- QMA - quaternary methyl ammonium cartridge - кватернерен амониум анјон-изменувачки кертриџ
- SCX - strong cation exchange cartridge - силен катјон-изменувачки кертриџ
- HLB - hydrophilic-lipophilic balance cartridge – хидрофилно-липофилен кертриџ
- 0,9 % NaCl - saline solution – физиолошки раствор
- V-vial – конусно шише за појдовен раствор на [¹⁸F]Флуорид
- Waste vial - шише за отпаден раствор (шише на елуирани онечистувања)
- Waste filter – филтер поставен на шише за отпаден раствор
- Final filter – филтер за финална стерилизација поставен на шише за финален производ
- Rec.vial - шише за отпадната вода (анг. Recovery water vial)
- Reac.vial – реакционо шише (анг. Reaction vial)

Содржина

1. Вовед	1
2. Преглед на литература.....	3
2.1. Производство на ^{18}F -радиоизотоп	5
2.2. Синтеза на ^{18}F -радиофармацевтици	7
2.2.1. Нуклеофилна супституција	10
2.2.2. Електрофилна супституција.....	12
2.3. Методи за прочистување	13
2.3.1. HPLC прочистување	14
2.3.2. SPE прочистување.....	15
2.3.3. SEC прочистување	16
2.3.4. IEC прочистување.....	16
2.3.5. LLE прочистување	16
2.4. Делење на ^{18}F -радиофармацевтици.....	16
2.5. Контрола на квалитет на ^{18}F -радиофармацевтици.....	18
2.6. [^{18}F]Флуоромисонидазол.....	20
2.6.1. Хемиски карактеристики.....	20
2.6.2. Метаболизам на [^{18}F]FMISO.....	21
2.6.3. Клиничка примена.....	22
2.6.4. Токсиколошки ефекти.....	25
2.7. Други радиофармацевтици кои се користат за хипоксија	27
2.8. Производство на [^{18}F]Флуоромисонидазол	30
2.8.1. Прекурсори за синтеза на [^{18}F]FMISO	34
2.9. SPE прочистување на [^{18}F]FMISO	36
2.10. Контрола на квалитет на [^{18}F]Флуоромисонидазол	38
2.10.1. Потенцијални хемиски и радиохемиски онечистувања	39
2.11. [^{18}F]FMISO наспроти [^{18}F]FDG	41

3. Цел на трудот.....	43
4. Материјали и методи.....	45
4.1. Материјали.....	45
4.2. Методи.....	47
4.2.1. Производство на радиоизотоп [¹⁸ F]F ⁻	47
4.2.2. Синтеза на [¹⁸ F]FMISO.....	47
4.2.3. Креирање и оптимизација на секвенца за автоматска синтеза.....	52
4.2.4. Оптимизацијата на процесот за синтеза.....	52
4.2.5. Оптимизација на начинот на прочистување.....	56
4.2.5 Други параметри кои имаат влијание на приносот.....	59
4.2.6. Контрола на квалитет на [¹⁸ F]FMISO.....	61
4.2.7. Тест за стабилност на [¹⁸ F]FMISO.....	68
5. Резултати.....	70
5.1. Оптимизација на секвенца за автоматска синтеза.....	70
5.2. Оптимизација на процесот за синтеза.....	74
5.2.1. Влијание на почетни услови во реакциите пред радиофлуоринација.....	75
5.2.2. Влијание на условите во реакција на радиофлуоринација.....	77
5.2.3. Влијание на условите во реакцијата по радиофлуоринација.....	79
5.3. Оптимизација на начинот на прочистување.....	85
5.4. Други параметри кои имаат влијание на приносот.....	92
5.5. Контрола на квалитет на [¹⁸ F]FMISO.....	94
5.5.1. рН-вредност.....	94
5.5.2. Идентификација.....	95
5.5.3. Хемиска чистота.....	99
5.5.4. Радиохемиска чистота.....	101
5.5.5. Резидуалните растворувачи.....	105
5.5.6. Радионуклидна чистота.....	106

5.5.7. Бактериски ендотоксини.....	108
5.5.8. Тестирање на стерилност	109
5.5.9. Тестови за стабилност.....	113
6. Дискусија	114
6.1. Оптимизација на секвенца за автоматска синтеза	114
6.2. Оптимизација на процесот за синтеза.....	118
6.3. Оптимизација на начинот на прочистување.....	127
6.4. Други параметри кои имаат влијание на приносот	132
6.5. Контрола на квалитет на [¹⁸ F]FMISO	134
6. Заклучок.....	141
7. Користена литература	143

1. Вовед

Флуор-18 ($[^{18}\text{F}]\text{F}$ или ^{18}F -флуор) е позитронски радионуклид (радиоизотоп) со краток период на полураспаѓање од 109,8 минути и токму затоа се нарекува и краткоживеечки позитронски емитер (short-lived positron emitters). Во споредба со другите најчесто користени позитронски радионуклиди ($([^{11}\text{C}], T_{1/2} = 20 \text{ min}; [^{13}\text{N}], T_{1/2} = 10 \text{ min}; [^{15}\text{O}], T_{1/2} = 2 \text{ min})$) неговиот период на полураспаѓање овозможува производство на големи количини активност за голем број пациенти и дистрибуција до други нуклеарно-медицински центри. Се користи за производство на голем број ^{18}F -радиофармацевтски препарати (РФП, радиофармацевтици) кои се користат во нуклеарната медицина за визуализација со позитронско-емисионата томографија (ПЕТ). Радиоактивниот распад на ^{18}F -флуор е 97 % со позитронска емисија со прилично ниска позитронска енергија од 0,635 MeV и краток опсег (максимум 2,4 mm во ткиво), што пак обезбедува висока резолуција во ПЕТ скенот.

Како халоген радионуклид може да се произведе со циклотрон во две различни хемиски форми, како електрофилен ^{18}F -флуор во форма на гас ($[^{18}\text{F}]\text{F}_2$) или како нуклеофилен ^{18}F -флуорид во течна форма ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$). Во зависност од тоа понатамошната синтеза на РФП се одвива преку два различни механизми односно преку електрофилна и нуклеофилна супституција, соодветно.

^{18}F -радиофармацевтик широко применет за хипоксични тумори е $[^{18}\text{F}]$ флуоромисонидазол (1- $[^{18}\text{F}]$ fluoro-3-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ol, со кратенка $[^{18}\text{F}]$ FMISO). Овој радиофармацевтик е високоспецифичен за хипоксија на глиоми, хипоксија во белодробен канцер, карциноми на глава и врат и други хипоксични тумори. $[^{18}\text{F}]$ FMISO навлегува во клетката преку дифузија и доколку има намалено присуство на кислород, иреверзибилно се редуцира, а како таков ковалентно се врзува со клеточните молекули – макромолекули, при што останува заробен во клетката. Во присуство на кислород се реоксидира до нитроимидазол и излегува од клетката.

Стандардниот метод за синтеза на $[^{18}\text{F}]$ FMISO користи модул за синтеза поврзан со дополнителна опрема (модул) за прочистување на финалниот производ со колона за високоефикасна течна хроматографија (HPLC). Тој дополнителен модул во радиофармацијата е познат и како HPLC единица за прочистување и функционира на ист принцип како и хроматографските аналитички техники. Со овој метод е тешко да се постигне целосно

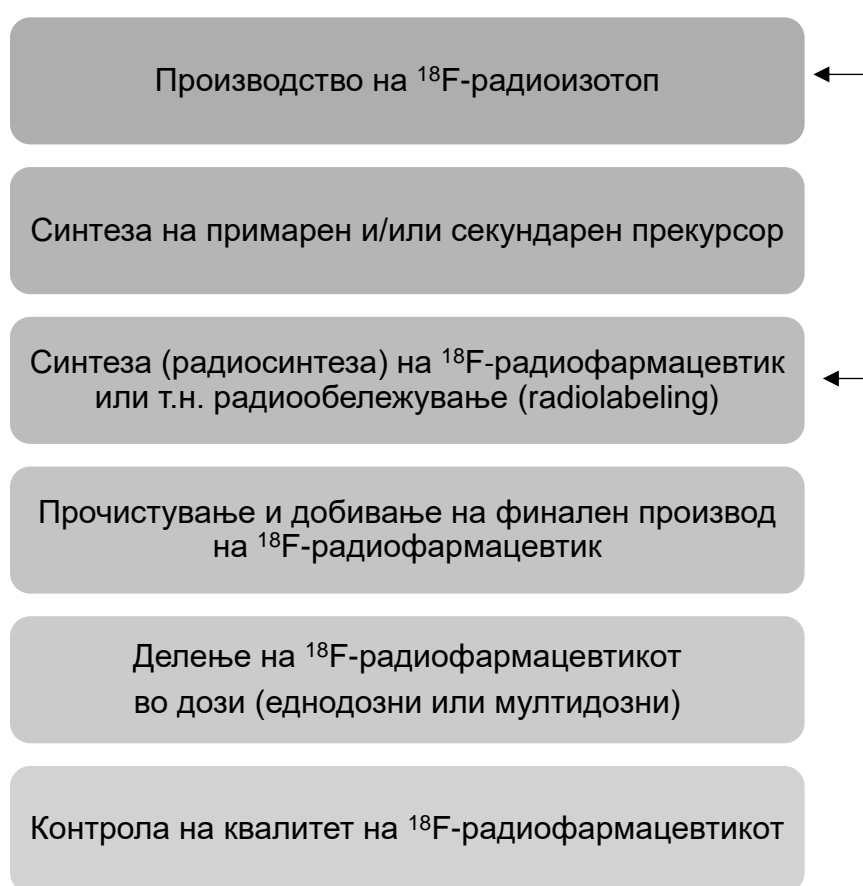
автоматизирање на производството заради потребата од мануелна интервенција за време на прочистувањето, доста е комплициран и одзема многу време за да се извршува рутински. Притоа, операторот е небезбеден од аспект на заштита од јонизирачко зрачење и постои опасност од потенцијална микробиолошка контаминација во текот на производството. Исто така, со овој метод се покажало дека се постигнува мал радиохемиски принос на финалниот производ, а синтезата е долга што не е многу соодветно за овие флуор-18 радиофармацевтици. Водејќи се по принципите за производство на флуор-18 радиофармацевтици коишто бараат посебно внимание поради природата на јонизирачкото зрачење, асептични услови при процесот на производство, едноставна и кратка синтеза со висок радиохемиски принос, целта на оваа докторска дисертација е да се развие соодветен метод за производство на [^{18}F]FMISO радиофармацевтик којшто ќе ги исполни сите овие услови. Со воведување на нов начин на прочистување на финалниот радиофармацевтик, HPLC прочистувањето да се замени со кертрици за цврсто-фазна екстракција, односно SPE прочистување (анг. Solid-Phase Extraction purification) и да се развие, оптимизира и валидира нова методологија со што ќе се овозможи целосно автоматизирање на процесот, скратување на времето на синтеза, повисок принос и поедноставување на целокупниот процес за производство. Овој начин на прочистување е често користен во производство на различни РФП заради бројните предности пред HPLC прочистувањето. Овој систем на прочистување е од типот на цврсто фазна екстракција со употреба на SPE кертрици што претставува едноставен тип на хроматографија со SPE кертрици како колони за еднократна употреба.

Во последната деценија, достапните литературни податоци го потврдуваат интересот на радиохемичарите и радиофармацевтите за промена на начинот на синтеза на [^{18}F]FMISO. Повеќе студии го опишуваат производството со SPE прочистување на различни модули за синтеза. Повеќе параметри влијаат врз ефикасноста на синтезата, како на пример модулот за синтеза и многу други параметри кои ги дефинираат реакциите во синтезата и прочистувањето. Затоа, потребно е сите тие да се оптимизираат за да се добие чист финален производ со висок радиохемиски принос. Освен оптимизацијата на овие параметри, како клучна и неопходна цел од оваа студија ќе биде и

воспоставување на методи за контролата на квалитет на овој радиофармацевтик.

2. Преглед на литература

За да се постави безбедно и рутинско производство на некој радиофармацевтик означен со кратко живеечки позитронски емитер, флуор-18, вообичаено се потребни неколку чекори прикажани на шемата во слика 1. Бидејќи овие ^{18}F -радиофармацевтици се администрираат интравенски, сите процедури за овие чекори мора да се постават следејќи ги упатствата за добра производствена пракса (ДПП, англ. GMP - Good Manufacturing Practice). За хумана употреба овие радиофармацевтски производи треба да бидат хемиски и радиохемиски чисти, стерилни и апириrogenи.

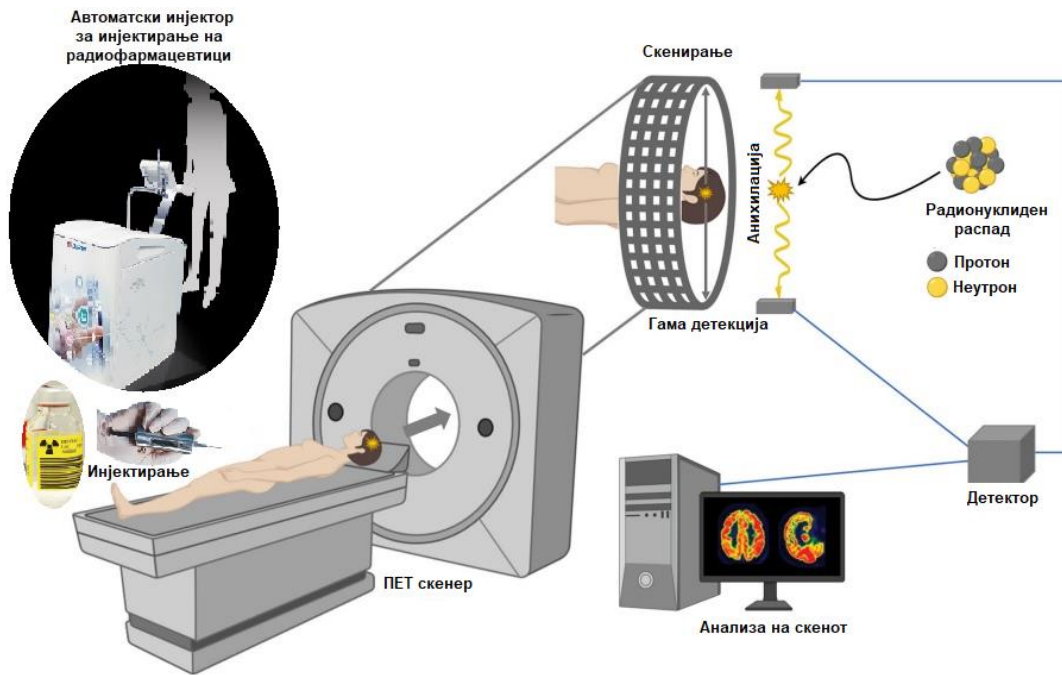


Слика 1. Главни чекори во производство на ^{18}F -радиофармацевтици
Figure 1. Main steps in preparation of ^{18}F -radiopharmaceuticals

Како што е прикажано на слика 1 потребни се 5 до 6 чекори во производство на ^{18}F -радиофармацевтици. Првиот чекор е производство на ^{18}F -радиоизотоп,

додека вториот чекор е синтеза на примарен и/или секундарен прекурсор, доколку не постои комерцијално достапен или пак кога се синтетизираат нови РФП за клинички испитувања. Производството и употребата на РФП се регулирани со бројни стандарди/прописи и правила. Доколку се работи за синтезата на ^{18}F -радиофармацевтик којшто е одобрен за употреба во Европска Унија и треба да ги исполни ДПП барањата, вообичаено за таквиот РФП е достапен комерцијален прекурсор и тогаш вториот чекор не се спроведува. Во овој случај, по првиот чекор, производство на ^{18}F -радиоизотоп, следува синтеза на ^{18}F -радиофармацевтик. Бидејќи се работи за синтеза во која се применува радиоизотоп во радиофармацијата, оваа синтеза се поистоветува со радиосинтеза. По реакциите потребни за синтезата многу важен чекор е прочистување на добиениот ^{18}F -радиофармацевтик. За да може да се примени тој радиофармацевтик потребни се уште дополнителни два чекори кои вообичаено се извршуваат паралелно, тоа се: делење на РФП во дози за инјектирање и контрола на квалитет на РФП (за ^{18}F -радиофармацевтиците не е пожелно да трае подолго од 30 минути). По извршување на контрола на квалитет доколку препаратот ги исполнува сите параметри согласно спецификацијата, ^{18}F -радиофармацевтикот може да се ослободи за инјектирање на пациенти и извршување на ПЕТ скен.

На слика 2 е претставен принципот на скенирање со позитронска емисиона томографија (ПЕТ), каде што прв чекор е интравенска администрација (инјектирање) на инјекциониот раствор од радиофармацевтикот. Инјектирањето може да се одвива со автоматски инјектор или со мануелно инјектирање. По инјектирањето следува период на мирување на пациентот и биодистрибуција на радиофармацевтикот, а потоа извршување на ПЕТ скен.



Слика 2. Принцип на скенирање со позитронска емисиона томографија
Figure 2. Principle of positron emission tomography (PET) imaging

Во онкологијата најмногу се користат хибридни ПЕТ/КТ скенери, коишто овозможуваат приказ на промените во ткивата и органите од пациентот на метаболно ниво во комбинација со компјутерска томографија која се користи за корекција на атенуација, а воедно обезбедува и точна анатомска локализација. Скенирањето се изведува за 15-50 минути во зависност од типот на ПЕТ/КТ скенерот, типот на радиофармацевтикот, како и од делот којшто треба да се скенира. При радионуклидниот распад емитираниот позитрон поминува одредено растојание (позитронски опсег), во зависност од неговата енергија, и се подложува на нееластични судири со електроните од околните молекули. Во тој случај кога позитронот ќе се судри со електронот настанува процес на аниhilација. При аниhilацијата двете честички исчезнуваат и се емитираат два гама кванти во спротивни насоки под приближно 180° секој со енергија од 511 KeV. Тие фотони се детектираат од редови на детектори кои се поставени во форма на прстен (гентри). По детекцијата и обработка на сигналите се формира морфолошкиот приказ на органите.

2.1. Производство на ^{18}F -радиоизотоп

За производство на ^{18}F -радиоизотопи се користи циклотрон, инсталиран во соодветна просторија - бункер, изолирана од останатите производствени

лаборатории. Како и во производствените лаборатории, така и во бункерот за циклотрон треба да бидат обезбедени соодветни услови за температура, влага и притисок, односно во оваа просторија треба да има најнегативен притисок во споредба со сите околни простории. Циклотронот претставува уред со повеќе составни делови и тоа: извор на јони, радиофреквентно поле, магнетно поле, систем за екстракција на јони, систем на мети, систем за ладење и вакуум систем. Принципот на работа на циклотронот е со забрзување на честички, со помош на две специјално конструирани електроди поврзани со извор на неизменичен висок напон и хомогено магнетно поле во кое наелектризираните честички се движат по кружни патеки. Наелектризираните честички се создаваат од гас водород под дејство на висок напон во изворот на јони, а се извлекуваат од изворот под дејство на радиофреквентното поле и потоа започнува нивното забрзување. Движењето на наелектризираните честички по оваа кружна траекторија се изведува под дејство на магнетно поле, а со помош на периодично променливо радиофреквентното поле се овозможува нивното забрзување. Откако честичките се забрзани до максимална енергија од 16,5 MeV, поминуваат низ тенка карбонска фолија (систем за екстракција) која ги задржува електроните од негативните јони, а поминуваат само позитивните јони. Како резултат на промена на полнежот на честичките, доаѓа до промена на траекторијата на движење на снопот и негово насочување кон метата. Метата за производство на ^{18}F -флуор може да биде во течна форма или во форма на гас. Најчесто употребувана мета е метата кај која медиумот за озрачување е во течна форма, односно вода збогатена со кислород-18, ($[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$). Со озрачување на овој медиум се добива радиоизотоп во форма на ^{18}F -флуорид ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$) којшто претставува нуклеофил во понатамошните реакции од синтезата. Нуклеарната реакција која се случува во овој процес е $^{18}\text{O}(\text{p},\alpha)^{18}\text{F}$. Мета во форма на гас поретко се користи заради повеќе ограничувања и карактеристиките на гасот, но сепак сè уште е употребуван метод за производство на ^{18}F -флуор. Како гас се користи најчесто $^{18}\text{O}_2$ или неон гас и во тој случај се добива гас $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ којшто претставува електрофил. Како клучна разлика помеѓу овие две форми е специфичната активност (анг. Specific activity, SA = активност/mol) на произведениот радиоизотоп. Нуклеофилната форма $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ може да се произведе со специфична активност во опсег од 100 GBq/ μmol , додека електрофилниот $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ има многу пониска специфична активност (100–600

MBq/ μmol), бидејќи се додава флуор-19 како носач за да се добие $^{18}\text{F}-\text{F}_2$. Максималната количина на активност на радиоизотопот која може да се произведе ќе зависи од: енергијата на снопот, јачината на струјата користена при озрачување, од времето на озрачување и од типот на метата. За време на озрачувањето се јавуваат јонски, органски и радионуклидни онечистувања чијашто концентрација исто така ќе зависи од споменатите параметри (Schlyer et al., 1993; Tewson et al., 1988; Hsieh et al., 2012; Gillies et al., 2006; Bowden et al., 2009; Avila-Rodriguez et al., 2008).

2.2. Синтеза на ^{18}F -радиофармацевтици

Синтеза на ^{18}F -радиофармацевтици се извршува со специјални модули за синтеза кои треба да бидат инсталирани во оловни кабинети за синтеза. Во овие кабинети се трансферира растворот на произведениот $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ од циклотронот до шишето наменето за тој раствор, преку специјални линии (капилари) инсталирани подземно и соодветно заштитени со оловни блокови.

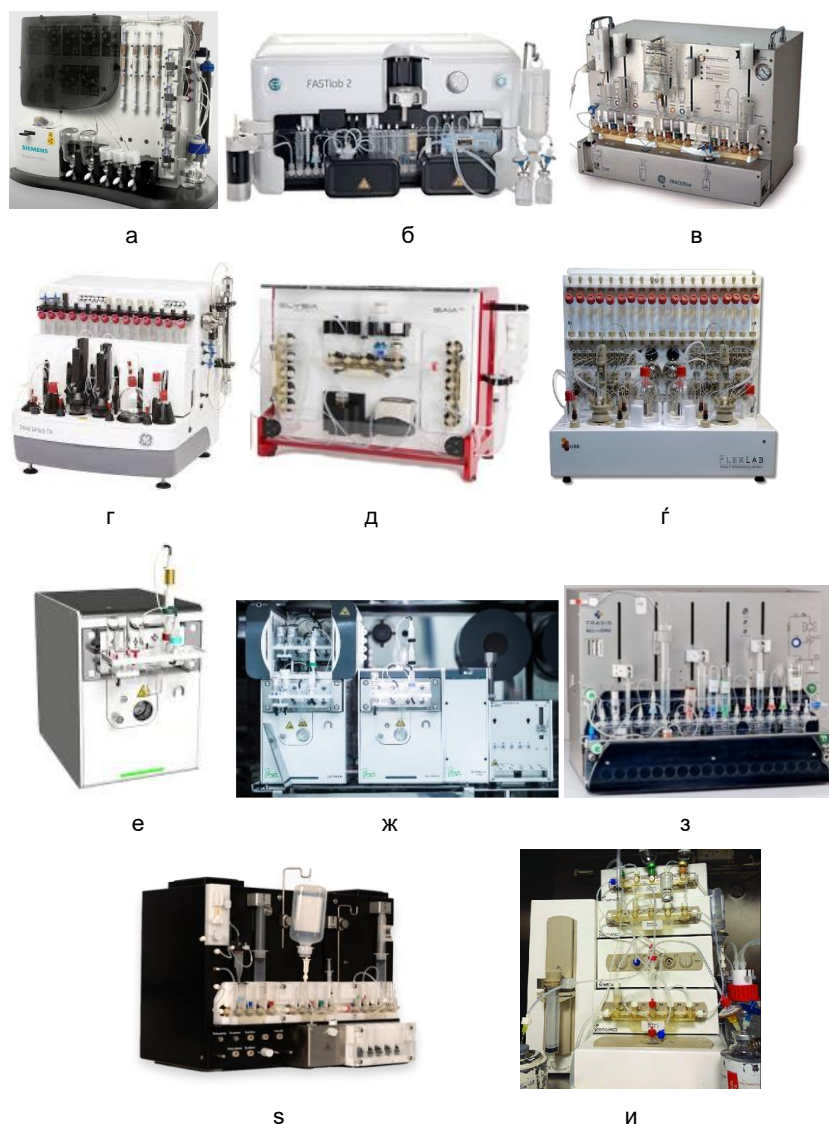
Модулот за синтеза е уред што претставува комбинација од напојување, сензори, актуатори, процесор, пумпа, уред за загревање, поврзани со мрежа на реактор, линии (капилари), реагенс шишиња и реакционо шише. Електронските делови се резистентни на високо ниво радијација. Модулот е способен да работи автоматски преку софтвер со помош на секвенца потребна за синтеза на радиофармацевтскиот препарат. Секвенца е листа на чекори/инструкции со кои софтверот ги извршува и контролира различните чекори за време на синтезата на радиофармацевтски препарат. Редоследот и бројот на чекори во секвенцата е специфичен за секој процес на синтеза. Автоматскиот модул за синтеза може да се подели на два дела: механички дел и хемиски дел. Механичкиот дел се состои од склоп на електрични и/или пневматски, линеарни и/или кружни вентили, електрични напојувачи, пумпи, грејачи, сензори за следење на различни параметри (температура, притисок, проток, активност) и сите останати делови коишто не се во директен контакт со хемиските реагенси. Хемискиот дел е меѓусебно поврзана мрежа на шишенца во кои гасовити, течни и/или цврсти реагенси и прекурсори може да се пренесуваат, мешаат и/или модифицираат за да се добие посакуваниот финален производ. Механичкиот и хемискиот дел се поврзани еден со друг, а контактот помеѓу нив може да биде постојан (уред за повеќекратна употреба) или привремен (уред за еднократна употреба - „касета“).

Контролниот систем го контролира автоматизираниот модул за синтеза и обезбедува кориснички интерфејс преку кој операторот комуницира со модулот. Софтверот управува со системот за контрола и е генерално специфичен за модулот, но не мора да е специфичен за процесот.

Касетата за синтеза или т.н. IFP - интегриран флуиден процесор (анг. Integrated Fluidic Processor) е специфична за конкретен модул за синтеза, а може да послужи за синтеза на различни РФП, во зависност од карактеристиките на модулот или РФП. Таа претставува сет од шишенца (и шприц/шприцеви), вентили, мрежа од линии поврзани со вентилите и шишенцата и се монтира во механичкиот дел од модулот за синтеза. Откако касета ќе се монтира на модулот заедно со реагенсите и останатите материјали, станува хемиски дел од модулот и како таква е подготвена за радиохемиска синтеза (Boschi et al., 2013; Aerts et al., 2014; Todde et al., 2017 и Bruton et al., 2021). Радиохемиската синтеза на ^{18}F -радиофармацевтици треба да биде кратка (вообичаено од 20 до 60 мин.) поради нивниот краток полуживот.

Во последната деценија се развиени поголем број на автоматски модули за синтеза со соодветни касети. На слика 3 се прикажани најчесто применуваните модули за синтеза на ^{18}F -радиофармацевтици со поставени касети (Krasikova., 2007 и Lebedev, 2013). Тоа се:

- Siemens Explora (a) од производителот Siemens Healthineers (Brasil);
- FASTlab™ synthesizers (б), GE TRACERlab® MX (в) и Tracerlab FXFN module (г) од производителот GE Medical Systems (Chicago, USA);
- Raytest SynChrom (д) од производителот Elysia-Raytest (Straubenhardt, Germany);
- FlexLab (f) од производителот iPHASE technologies (Rowville, Australia);
- Synthera V2 (e) и Synthera®+ (e) од производителот IBA (Louvain-la-Neuve, Belgium);
- AllinOne (ж) од производителот Trasis (Ans, Belgium);
- ORA Neptis® (s) од производителот ORA (Philippeville, Belgium);
- Scintomics GRP® (и) од производителот Scintomics Molecular, Applied Theranostics Technologies (SCI-att) (Lindach, Germany).



Слика 3. Автоматски модули за синтеза за ^{18}F -радиофармацевтици
Figure 3. Automated radiosynthesizers for ^{18}F -radiopharmaceuticals

Во литературата може да се сретнат и голем број на модули за синтеза или системи за синтеза со сопствен дизајн (анг. Home-built system for synthesis). Исто така се среќаваат и уреди за синтеза со употреба на електрохемиска ќелија и анодна депозиција (обложување) на ^{18}F -флуоридот (Hamacher & Coenen., 2006).

Без разлика на тоа каков уред ќе се користи за синтеза, во зависност од хемиската форма на произведениот ^{18}F -радиоизотоп, синтезата може да се одвива преку два механизми на реакција, и тоа: нуклеофилна и електрофилна супституција (Coenen., 2007; Cai et al., 2008; Hjelstuen et al., 2011; Jacobson et al., 2015; Patricia et al., 2019; Goud et al., 2020). Реакцијата на супституција е

всушност главната реакција од процесот на синтеза, во која радиоизотопот се врзува со хемискиот прекурсор во контролирани услови (пр. температура и притисок). За оваа реакција често во литературата се користи и терминот радиообележување (анг. radiolabeling) (Ph. Eur. 10.0, 0125 (07/2016)).

По радиосинтезата освен производот присутни се и различни хемиски и радиохемиски онечистувања коишто потекнуваат од изведените реакции. Поради тоа, по сите реакции од синтеза е потребно да се спроведе прочистување за да се добие чист финален производ. На таквиот финален производ се пресметува радиохемиски принос (анг. radiochemical yield, RCY, што претставува количина на активност на производот изразена како процент (%) од почетна активност што се користи во синтезата (Coenen et al., 2017; Ph. Eur. 10.0, 0125 (07/2016))).

Количината на двете активности се однесува на истиот радионуклид, а пресметката се прави со коригирање на распадат во текот на времето (за ^{18}F се зема 110 min.) од времето на завршување на озрачувањето (анг. end of bombardment, EOB) или започнувањето на синтезата (анг. start of synthesis, SOS) до времето на завршување на синтезата (анг. end of synthesis, EOS), според формулите за радиоактивен распад:

$$A_t = A_0(e)^{-\lambda t};$$
$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\lambda} \rightarrow A_t = A_0 \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{t}{T_{\frac{1}{2}}}}$$

каде што, A_t е активност во време t односно активноста во EOS; A_0 е активност во време $t = 0$ односно активноста во EOB; λ е константа за распад карактеристична за секој радионуклид; e е природен логаритам со основа e ; $T_{1/2}$ е период на полураспаѓање, а t е времето од EOB до EOS.

Активноста се изразува во SI единиците, бекерел Becquerel ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$, $1 \text{ Bq} = 2.7 \cdot 10^{-11} \text{ Ci}$).

2.2.1. Нуклеофилна супституција

Флуоридниот јон како нуклеофил му дава еден електронски пар на електрофилот-јаглерод и формира врска (C-F), а притоа заменува друга група

која се нарекува група што си заминува. За да се постигне нуклеофилната супституција, растворливоста и нуклеофилноста на флуоридниот јон треба да се зголеми и тоа се прави со додавање на катализатор за пренос на фаза (анг. Phase transfer catalyst, PTC), како на пример раствор на Kryptofix® 222 (4,7,13,16,21,24-Нехаоха-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosan) со сол на калиум или цезиум во вода и органски растворувач или пак со додавање на тетрабутиламониум катјон и органски растворувач. Бидејќи флуоридниот анјон е сиромашен нуклеофил, за ефикасна флуоринација преку реакција на нуклеофилна супституција потребна е целосна дехидратација на ^{18}F -флуоридниот анјон и спроведување на реакцијата во поларни апротични органски растворувач (како, на пример, диметил сулфоксид, DMSO; N,N-диметилформамид, DMF; N,N-диметилацетамид, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$ и ацетонитрил, CH_3CN).

Се разликуваат два пристапи на нуклеофилна супституција, односно нуклеофилна флуоринација, и тоа алифатична и ароматична.

- *Алифатичната нуклеофилна флуоринација* се одвива преку $\text{S}_{\text{N}}2$ супституција на $^{18}\text{F}\text{F}^-$ со прекурсорот којшто содржи група што заминува (анг. leaving group, на пример $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I} < \text{тосилат/месилат} < \text{носилат} < \text{трифлат}$). Најпознати примери за овој тип на супституција се: $^{18}\text{F}\text{FDG}$, $^{18}\text{F}\text{FLT}$ и $^{18}\text{F}\text{FET}$). Во последната деценија различни публикации опишуваат понови методи на нуклеофилна супституција. Со воведување на метални комплекси или органокатализа за асиметрична флуоринација, може да се надминат проблемите на региоселективност и енантиселективност кај молекулите (Buckingham & Gouverneur., 2016). Голем развој е достигнат и со употреба на арилсулфонат како нуклеофилен помагач на групата што заминува (анг. nucleophile assisting leaving groups, NALGs). (Lu et al., 2009).
- *Ароматична нуклеофилна флуоринација* ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) бара активирање на фенилен прстен, што може да се постигне со привлекување на електронска група(и) (како што се $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $+\text{N}(\text{CH}_3)_3$) во орто или пара позиција на групата што заминува (Preshlock et al., 2005; Dollé et al., 2007). Најпознати примери за овој тип на супституција се: $^{18}\text{F}\text{altanserin}$, $^{18}\text{F}\text{MPPF}$, $^{18}\text{F}\text{fluoroepibatidine}$, $^{18}\text{F}\text{fluoro-A-85380}$, $^{18}\text{F}\text{fubatidine}$ и ($^{18}\text{F}\text{nifene}$).

Во последната деценија сè повеќе се проучуваа овој тип на реакции особено за флуоринација на биомолекули, како што се пептиди, протеински фрагменти, протеини и олигонуклеотиди.

Неколку пристапи, вклучувајќи употреба на простетски групи означени со ^{18}F , други хемиски акцепторски пристапи со силициум, бор и алуминиум флуорид, како и „click“ хемија се развиени (Kumar et al., 2018).

Исто така, развиени се реакции на флуоринација, со употреба на соединенија на јодониум воведен во метоксиарилни или арилтиенилни прекурсори, како и употреба на меситиларилјодониум соли за Cu-посредувани флуоринации (анг. Cu-mediated nucleophilic radiofluorination) коишто пак овозможуваат директно воведување на $[^{18}\text{F}]$ флуоридот во арили богати со електрони и добивање висок радиохемиски принос. Најпознати примери за овој тип на флуоринации се $[^{18}\text{F}]$ fumazenil и $[^{18}\text{F}]$ UCB (Moon et al., 2014; Warnier et al., 2016).

2.2.2. Електрофилна супституција

Во случај на електрофилна супституција, како што е наведено во точка 2.1., се користи 18-флуор во форма на гас, па за да се постигне флуоринација $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ мора да се преведе во помалку реактивен и поселективен агенс, како на пример ацетилхипофлуорит ($^{18}\text{F}-\text{CH}_3\text{COOF}$) (Bergman et al., 1997; Teare et al., 2010). Механизмот на реакција се состои во воведување на атоми на флуор-18 на местото на двојната врска од супстратот, при што се добива дифлуородериват кој понатаму со други последователни реакции се хидролизира до посакуваниот продукт.

Електрофилниот $^{18}\text{F}-\text{F}_2$ и неговите деривати овозможуваат означување на електронски богати ароматични прстени и алкени, но поради малата региоселективност, се добива мешавина од флуороизомери што претставува предизвик во однос на прочистувањето (Murali et al., 2003; Furuya et al., 2010).

Ако се направи компарација на синтеза која се изведува со нуклеофилна супституција и синтеза преку електрофилна супституција, може да се истакнат неколку предности на нуклеофилната супституција.

Во табела 1 се прикажани предностите на нуклеофилна во споредба со електрофилна супституција.

Табела 1. Споредба на нуклеофилна и електрофилна супституција
Table 1. Nucleophilic vs electrophilic substitution

Нуклеофилна супституција	Електрофилна супституција
Флуор-18 во течна форма - помала можност за контаминација	Флуор-18 во форма на гас - можност за контаминација
Обезбедува висока моларна активност во опсег од 500-5500 GBq/ μ mol	Обезбедува моларна активност обично во опсег од 0,05-0,5 GBq/ μ mol
Радиокемиски принос (RCY) до 90 % како резултат на директно врзување со прекурсор молекулите	Радиокемиски принос (RCY) до 50 % поради присуството на нерадиоактивен атом [^{19}F]
Помала реактивната природа на флуор-18	Високореактивен гас на флуор-18
Бројни автоматизирани модули за синтеза (GMP)	Неколку автоматизирани модули за синтеза (GMP)

Иако нуклеофилната супституција се издвојува како подобар механизам, сепак и таа има недостатоци особено кога се работи со биомолекули. Во нуклеофилната супституција е потребна висока температура, па бројни биомолекули како протеините се нестабилни. Во последната деценија се развиени нови пристапи во радиосинтезите на ^{18}F -радиофармацевтици. Тоа се индиректни методи за врзување на флуор-18 преку простетична група (конјугација на реактивни прекурсори со кои претходно е врзан флуор-18 кои содржат простетични групи со протеини во благи услови - собна температура, водни растворувачи итн.). Како реактивни групи во прекурсор молекули се среќаваат различни амино, карбокси, сулфхидрил групи итн.

2.3. Методи за прочистување

Прочистувањето на ^{18}F -радиофармацевтици треба да се постигне брзо и вообичаено се изведува со користење на високоефикасна течна хроматографија (анг. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) и/или со кертрици за цврсто-фазна екстракција (SPE). Почистувањето секогаш е проследено со стерилна филтрација, со цел да се обезбеди производ којшто е стерилен, изотоничен и погоден за хумана употреба (Brooks et al., 2014).

За изборот на методот за прочистување треба да се земат предвид повеќе својства на молекулот, како: молекуларна тежина, липофилност, стабилност во мобилната фаза која ќе се примени за прочистување, полнеж на молекулот и, што е најважно, полуживот на радионуклидот. Главни параметри кои го

дефинираат ефикасното радиофармацевтско прочистување се: време, радиохемиска чистота и радиохемиски принос.

Најчесто користени техники се:

- HPLC прочистување;
- SPE прочистување;
- SEC прочистување (анг. Size-Exclusion Chromatography, SEC или гел-хроматографија или т.н. хроматографија со исклучување на големина);
- IEC прочистување (анг. Ion Exchange Chromatography, IEC, прочистување со јоно-разменувачка хроматографија);
- LLE прочистување (анг. Liquid-liquid extraction, LLE или прочистување со течно-течна екстракција).

2.3.1. HPLC прочистување

HPLC е ефикасна техника за одвојување, идентификација и квантификација на молекули со мала разлика во нивните својства. За HPLC прочистување во радиофармацијата, покрај модулот за синтеза потребно е да се инсталира дополнителен систем познат како HPLC единица. За прочистување се користи хроматографска колона и функционира на ист принцип како и хроматографските аналитички техники. Постојат различни видови на HPLC кои се применуваат, а изборот се прави врз основа на повеќе параметри, како што се: својствата на примерокот, својства на мобилната фаза (поларност, брзина на проток, pH и липофилност), тип на стационарна фаза и температура. Со овој метод на прочистување се обезбедува ефикасно одвојување и квалитетен продукт со висока чистота. Сепак, употребата на овој метод може да бара значително време, што не е повољно за РФП обележани со кратко живеечки позитронски емитер и тешко може да се постигне целосно автоматизирање на производството заради потребата од мануелна интервенција за време на прочистувањето. Притоа, операторот е небезбеден од аспект на заштита од јонизирачко зрачење, а постои опасност и од потенцијална микробиолошка контаминација. Исто така, со овој метод се покажало дека се постигнува мал радиохемиски принос на финалниот производ, а синтезата е долга што не е многу соодветно за ПЕТ радиофармацевтици, особено за оние со краток полуживот како што е флуор-18.

2.3.2. SPE прочистување

SPE е едноставен, брз и моќен процес на прочистување којшто се изведува со употреба на SPE кертриџи. Принципот на прочистување се заснова на разликата во афинитетот помеѓу молекулот на радиофармацевтикот и останатите молекули (онечистувања) во примерокот. Врз основа на карактеристиките на РФП и онечистувања (на пример, липофилност) и типот на SPE прочистување, РФП може да се задржи на стационарната фаза или да помине низ неа. Ако кертриџот го задржува производот, треба да се постигне висок процент на десорпција. Карактеристиките на кертриџот, како и концентрацијата на примерокот, брзината на проток на елуентот и липофилноста на молекулот се главните фактори коишто влијаат на ефикасноста на чекорот на прочистување.

Познати се: нормално-фазно SPE прочистување, реверзно-фазно SPE прочистување и SPE прочистување со јонска размена (анјонска или катјонска). Вообичаено се користат комбинација од кертриџи (минимум два до три), со што истовремено се применуваат сите овие начини на SPE прочистување. Таквото комбинирање на кертриџите е неопходно, бидејќи за ^{18}F -радиофармацевтикот како финален производ е потребен најчесто реверзно-фазен кертриџ, но покрај него потребен е и друг кертриџ за анјонска размена којшто ќе го задржи слободниот ^{18}F -флуор како анјон. Доколку се јавуваат и други онечистувања, како на пример катјони, тогаш се користи и кертриџ за катјонска размена. Процедурите за прочистување на ^{18}F -радиофармацевтици секогаш не се јасни и може да бидат потребни покомплицирани чекори за прочистување.

Пред употреба на SPE кертриџите за прочистување, потребна е соодветна претходна подготовка, односно нивно активирање што се изведува согласно со препораките на производителот или потребата. На пример, при реверзно-фазно SPE прочистување кертриџите обично треба да се активираат со промивање со органски растворувач (етанол) и вода, додека кај останатите типови тие може да се активираат само со вода. Се користат и други соединенија за активирање на кертриџите, но изборот зависи од карактеристиките на молекулот односно производот кој треба да се задржи и/или елуира.

2.3.3. SEC прочистување

Со SEC прочистување се постигнува раздвојување на РФП со онечистувањата врз основа на разликата на нивните моларни маси. Затоа овој тип на прочистување најчесто се употребува за РФП со голема моларна маса т.е. макромолекули, како што се антителата, протеините, пептидите, нуклеинските киселини, па дури и за РФП со наночестички. SEC колоната е наполнета со фини, порозни полимерни зрна со различна големина на пори.

2.3.4. IEC прочистување

ICE прочистувањето е техника на хроматографија која ги раздвојува јоните од поларните молекули. Познати се два главни типови на ICE прочистување: ICE прочистувањето со размена на анјони или AEC (анг. Anion Exchange Chromatography) со примена на анјон-изменувачки кертриџи и ICE прочистувањето со размена на катјони или CEC (анг. Cation Exchange Chromatography) со примена на катјон-изменувачки кертриџи. Кај анјон-изменувачките кертриџи стационарната фаза е позитивно наелектризирана и, според тоа, може да ги одвои анјоните од другите јони. Кај катјон-изменувачките кертриџи е негативно наелектризирана и може да ги оддели катјоните од другите јони.

2.3.5. LLE прочистување

Други техники, како што е LLE прочистувањето, може да се воспостават за прочистување на радиофармацевтски препарати. LLE е едноставен, брз и ефикасен метод на прочистување во којшто примерокот се распределува помеѓу две немешливи фази, органски растворувач и водена фаза. Врз основа на коефициентот на распределба на онечистувањата и радиофармацевтски препарати, секој ќе биде концентриран или во органска или во водена фаза.

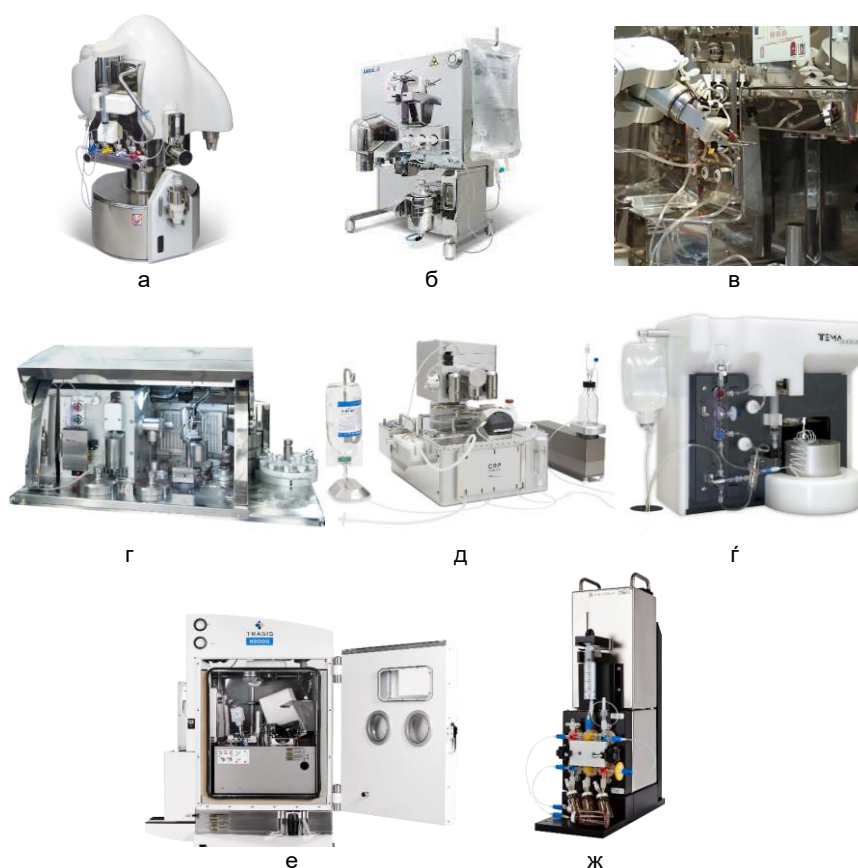
2.4. Делење на ^{18}F -радиофармацевтици

Поради големата активност при производството на ^{18}F -радиофармацевтици за рутинска примена делењето (т.н. диспензирање) на РФП се извршува автоматски со соодветен апарат за делење на дози инсталиран во оловен кабинет. Кабинетот мора да биде опремен со High Efficiency Particulate Air (HEPA) филтри, бројач на честички за да задоволи класа А. Апаратот за

делење се управува со далечински манипулативни клешти од страна на оператор или пак во кабинетот е инсталирана роботска рака. Дозите може да се поделат како монодозни или повеќедозни во шише или шприц.

Се среќаваат различни апарати за делење, но најчесто користените комерцијално достапни системи се претставени на слика 4:

- CLIO (а), ARGO (б) и THEODORICO Robotic Dispenser (в) од производителот Comecer (Castel Bolognese, Italy);
- NEXT(г), CRP Compact (д) и MorGaNА(ѓ) од производителот TEMA SINERGIE (Faenza, Italy);
- Unidose® dispenser (е) од производителот Trasis (Atlanta, USA);
- Modular Lab Automated Dispensing System (ж) од производителот Eckert & Ziegler Medical (Berlin, Germany).



Слика 4. Автоматски системи за делење на дози
Figure 4. Automated dose-dispensing system

Голем број на ПЕТ центри користат и апарати со сопствен дизајн (Jong et al., 2005; Jim et al., 2014; Ferretti et al., 2019).

2.5. Контрола на квалитет на ^{18}F -радиофармацевтици

Контролата на квалитет на ^{18}F -радиофармацевтиците треба да биде изведена во согласност со барањата од општата монографија за радиофармацевтски препарати, специфичните монографии од официјалните фармакопеи (доколку ги има) и националната регулатива. За разлика од конвенционалните фармацевтски производи, кај ^{18}F -радиофармацевтиците не мора да бидат завршени сите тестови пред одобрување на препаратот за употреба кај пациенти. Оваа разлика произлегува од активноста и краткиот период на полураспаѓање на ^{18}F -радиоизотопот (109,8 min) од една страна и времетраењето на некои од тестовите од друга страна. Во специфичните монографии е наведено кои тестови може да бидат завршени по одобрување на серијата.

Во општата монографија „Радиофармацевтски препарати“ Ph.Eur 10.0, 0125, (07/2016) се дефинирани следните тестови за испитување на квалитетот на РФП:

- ✓ Идентификација - се изведува преку одредување на период на полураспаѓање на ^{18}F -радиоизотопот. Може да се одреди и преку одредување на енергијата и природата на зрачење со примена на спектрометрија (Ph.Eur 10.0, 20266, (01/2014)).
- ✓ Радионуклидна чистота – зависно од начинот на производството на ^{18}F -радиоизотопот или од неговиот распад се јавуваат различни радионуклидни онечистувања. Затоа потребно е да се идентификува и квантифицира секој присутен радионуклид. Најчест метод за одредување на радионуклидната чистота кај радионуклиди кои се емитери на гама и X-зраци е гама спектрометријата. Радионуклидните онечистувања и нивниот дозволен процент се дефинирани во монографија за соодветниот ^{18}F -радиофармацевтик. Потенцијалните радионуклидни онечистувања се наведени во монографиите а нивните карактеристики се опишани во општото поглавје 5.7. Листа на физички карактеристики на радионуклиди споменати во Европска Фармакопеја.
- ✓ Радиохемиска чистота - онечистувања од радиоактивна природа, кои може да потекнуваат од процесот на производство на радиоизотопот, некомплетно прочистување. За одредување на радиохемиската чистота најчесто се применува тенкослојната хроматографија и HPLC (со радиодетектор).

Радиокемиската чистота е дефинирана во монографијата за соодветниот ^{18}F -радиофармацевтик.

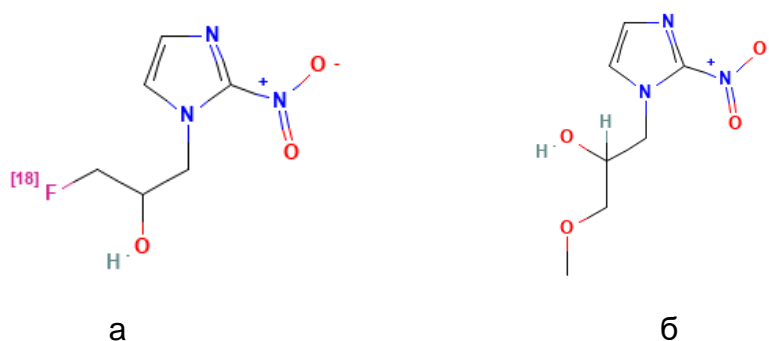
- ✓ Хемиска чистота - како онечистување освен радиоактивните молекули (јони) се јавуваат и нерадиоактивни кои претставуваат хемиски онечистувања. Дозволената концентрација на хемиски онечистувања е дефинирана во монографијата за соодветниот ^{18}F -радиофармацевтик. За одредување на хемиската чистота се користат разни методи, но најчесто за ^{18}F -радиофармацевтици се применува HPLC и/или други полуквантитативни тестови (пр. за криптофикс).
 - ✓ Резидуални растворувачи – границите на прифатливост се дефинирани во општата монографија 5.4. Резидуални растворувачи (Ph. Eur. 10.0, 50400 (01/2018)), а методите се дефинирани во 2.4.24 Идентификација и контрола на резидуални растворувачи (Ph. Eur. 10.0, 20424 (01/2017)) и дополнително доколку е потребно е дефинирана и во монографија за соодветниот ^{18}F -радиофармацевтик.
 - ✓ Специфична активност - специфичната активност се одредува земајќи ја предвид радиоактивната концентрација и концентрацијата на посакуваната хемиска форма.
 - ✓ Стерилност – бидејќи РФП се за парентерална администрација, тие мора да бидат стерилни. За време на производството потребно е да се спречи микробиолошка контаминација и да се обезбеди стерилност на финалниот производ. Тестот за стерилност се изведува како што е наведено во општата монографија за биолошки тестови, Стерилност (2.6.1) (Ph. Eur. 10.0, 20601 (04/2011)).
 - ✓ Бактериски ендотоксини-пирогени - задолжително испитување во финалниот производ е присуство на бактериски ендотоксини. Тестот за бактериски ендотоксини се изведува согласно со општата монографија 2.6.14 Бактериски ендотоксини. Критериумот на прифатливост е даден во индивидуалната монографија за испитуваниот радиофармацевтик или се пресметува според општата монографија 2.6.14 (Ph. Eur. 10.0, 20614 (01/2018)).

За време на изведувањето на тестовите кои е потребно да се извршат пред ослободување на производот за инјектирање, поради присутното јонизирачко зрачење, треба да се внимава на сите аспекти за заштита од радијација.

2.6. [¹⁸F]Флуоромисонидазол

2.6.1. Хемиски карактеристики

Органофлуорните соединенија се виртуелно отсутни како природни производи, но интересно е дека 20-25 % од производите во фармацијата или пак во радиофармацијата содржат барем еден атом на флуор (Purser et al., 2008). Такво соединение претставува РФП [¹⁸F]Флуоромисонидазол (анг. [¹⁸F]Fluoromisonidazole, [¹⁸F]FMISO), 1H-1-(3-[¹⁸F]-fluoro-2-hydroxy-propyl)-2-nitroimidazole (слика 5а). Во својот состав содржи мисонидазол (Misonidazole, MISO, (RS)-1-Methoxy-3-(2-nitroimidazol-1-yl)propan-2-ol) со Mr = 201.18 (слика 5б) поврзан со флуор-18. Често во литературата се среќава и како радиофлуориниран дериват на 2-нитроимидазол бидејќи содржи 2-нитроимидазол прстен во својата структура. 2-нитроимидазол е добро познато соединение во фармацијата како азомицин, што претставува природен антибиотик (од бактеријата *Nocardia* spp. и *Streptomyces eurocidicus*), додека синтетички добиените нитроимидазоли во фармацијата се користат за третман на инфекции (Müller, 1999).



Слика 5. Хемиска структура на а. [¹⁸F]Флуоромисонидазол и б. мисонидазол (извор: PubChem)

Figure 5. Chemical structure of a. [¹⁸F]Fluoromisonidazole and b. Misonidazole

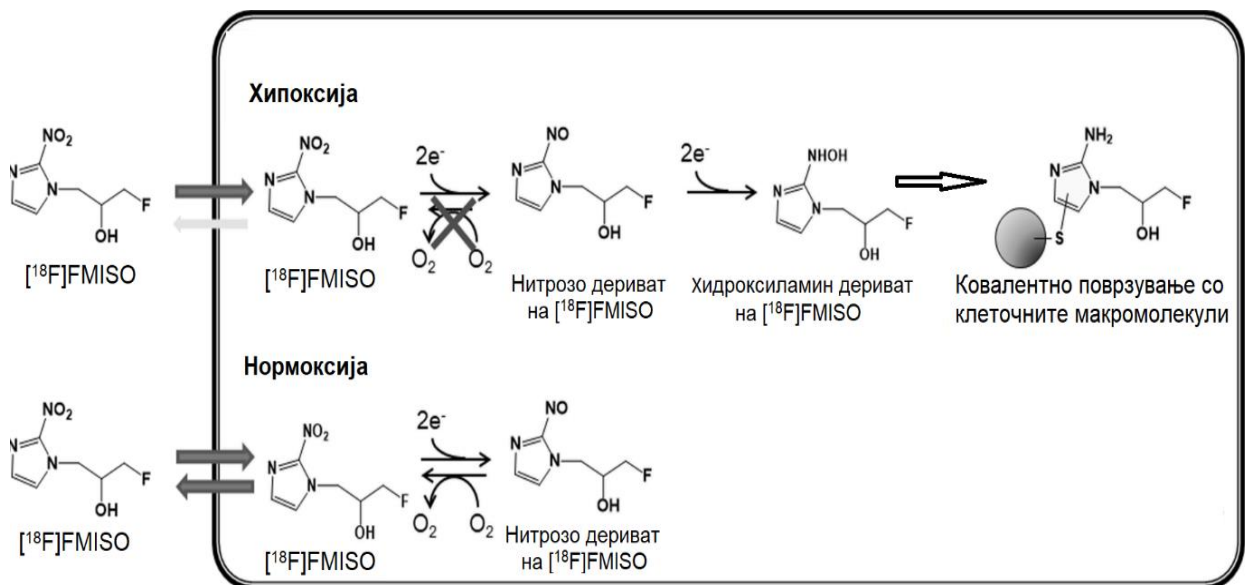
[¹⁸F]FMISO е липофилно соединение со Mr = 188.15 и коефициент на липидно-водена распределба (партиционен коефициент, октанол-вода (logP)) од 0.41. Молекулата содржи хирален центар на позиција C-2, па може да постои

во две форми наречени стереоизомери (S) - и (R) - Misonidazole). Се администрира како рацемска форма. Бидејќи ни е добро познато дека метаболизмот на хиралните ксенобиотици се случува стереоселективно и дека биолошката активност на рацематот може во голема мера да се разликува од секој енантиомер, од досега опишаните методологии на добивање на овој РФП произлегува дека треба да се практикува синтеза со прекурсор кој содржи тосилатна група, како група што заминува и тетрахидропиранилна група како заштитна група (Borzęcka et al., 2013). Таквиот начин на добивање е разработен во нашето истражување.

2.6.2. Метаболизам на [¹⁸F]FMISO

Според вредноста на партиционен коефициент [¹⁸F]FMISO може неспецифично да ги помине речиси сите клеточни мембрани со пасивна дифузија и како дериват на 2-нитроимидазол да се вклучи во различен интрацелуларен метаболизам во зависност од достапноста на кислород во ткивото. Нитроимидазолите можат интрацелуларно да се редуцираат во сите клетки, но при намалена концентрација на кислород тие подлежат на дополнителни реакции на редукција.

Слика 6 го претставува метаболизмот на [¹⁸F]FMISO, преку претпоставен механизам за редукција и акумулација во региони на хипоксично и нормоксично ткиво. Во услови на нормална кислородна средина (нормоксија) откако [¹⁸F]FMISO ќе навлезе во клетката се редуцира формирајќи нитрозо дериват на [¹⁸F]FMISO со посредство на интрацелуларните нитроредуктази, а притоа тие електрони брзо се пренесуваат до кислородот, па настанува брза повратна реакција на формирање на [¹⁸F]FMISO и негова дифузија надвор од клетката. За разлика од овој механизам кај хипоксичните ткива, по добивањето на нитрозо дериват на [¹⁸F]FMISO поради намалената концентрација на кислород (на пример кога нивото на кислород е приближно 10 mm Hg) повратната реакција не може да настане и продолжува редукцијата на нитрозо дериватот. Како продукт се добива хидроксиламин дериват на [¹⁸F]FMISO којшто може неповратно ковалентно да се врзе за клеточните макромолекули во хипоксичните клетки (може да се добие и релативно неактивен на амин дериват на [¹⁸F]FMISO). Ковалентното врзување се должи на биоредуктивната алкилација при редукцијата на молекулата преку серијата на чекори во отсуство на кислород.



Слика 6. Претпоставен механизам за редукција и акумулација на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ во региони на хипоксично и нормоксично ткиво

Figure 6. Proposed mechanism of reduction and accumulation of $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ in hypoxic and normoxic tissue

Поради липофилната природа на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ патот на елиминација е преку бубрезите. Мал дел може да се излучи преку бубрезите, како глукуронидиран конјугат.

Специфичен ензим одговорен за реакциите на редукција не е идентификуван туку постојат повеќеензимски системи. Ин-витро студиите покажале дека реакциите на редукција може да се катализираат со различни нитроредуктази, ксантин оксидаза, цинк, железо во HCl , и NADH1 . Ксантин оксидаза е ензим кој се наоѓа во многу клетки, па често се користи како тест систем за таквите лабораториски студии (Prekeges et al., 1991; Li & Li., 2018).

2.6.3. Клиничка примена

Поради недоволна дифузија кај цврсти тумори се развива хипоксија којашто може да биде хронична хипоксија или акутна хипоксија. Хроничната хипоксија е резултат на поголемото растојание на клетките на туморот од најблискиот крвен сад, додека акутната хипоксија е резултат на флукуирачки проток во крвните садови. И хроничната и акутната хипоксија може да бидат присутни дури кај малите тумори, со физиолошки последици кои треба да се земат во предвид при терапевтскиот пристап. Ова е динамичен процес наречен

„циклична хипоксија“. Туморските клетки во таквата хипоксична средина се поотпорни на радиотерапија отколку оние во нормалната кислородна средина, бидејќи чувствителноста на радиотерапијата зависи од концентрацијата на кислород во моментот на зрачење. Хипоксичните региони се исто така поврзани со малигнитет и пролиферација на туморот. Затоа, следењето на хипоксијата може да обезбеди корисни информации за планирање на радиотерапијата, а исто така може да биде и корисна дијагностичка алатка. Туморската хипоксија сè повеќе се препознава како главен штетен фактор во терапиите, бидејќи го компромитира третманот и поттикнува малигна прогресија (Challapalli et al., 2017; Gouel et al., 2023).

Улогата на хипоксијата во зголемувањето на радиоотпорноста е демонстрирана уште во почетокот на 20 век од страна на Schwartz (Schwartz et al., 1909; Mottram, 1936). Потоа во 1953 година, клучната улога на кислородот во одговорот на радиотерапијата беше целосно разјаснета од Gray (Gray et al., 1953), а во 2014 година McKeown се обидел да ги доразјасни овие феномени преку различни нивоа на кислород што се релевантни за овој проблем (McKeown et al., 2014). Тој покажал дека во експерименталните студии од клучно значење е истражувачите добро да ја контролираат оксигенацијата за да можат да ги симулираат истите услови на значително ниските нивоа на кислород пронајдени во повеќето хумани туморски клетки (од 0,1 до < 1 % кислород или 7,5 до < 0,75 mmHg. Исто така, повеќето антитуморни третмани директно или индиректно влијаат на крвните садови, предизвикувајќи уште подлабока хипоксија предизвикана од третманот. Многу од туморските клетки се добро приспособени да ја преживеат оваа хипоксија и за жал таквите тумори често се повторуваат по третманот. Па доколку не се најде ефикасен метод за дијагноза и терапија на хипоксични туморски клетки, мала е веројатноста да се постигне целосна контрола на многу цврсти тумори. Различни стратегии за антихипоксични третмани (на пр. хипербарична оксигенација, хипоксични клеточни сензибилизатори) се тестирани во клиничките испитувања за канцер на глава и врат во текот на изминатите 30 години и тие покажале скромни подобрувања во комбинација со радиотерапија во мета-анализите (Baumann et al., 2016).

[¹⁸F]FMISO е еден од неколкуте РФП којшто се користи за неинвазивна дијагностика на хипоксични тумори со позитронска емисиона томографија. За прв пат пак [¹⁸F]FMISO е предложен како ПЕТ-радиофармацевтик за

одредување на туморска хипоксија in-vivo во 1984 година. Оттогаш, тој стана најшироко користен дериват на нитроимидазол и во многубројни студии е покажано дека селективно се врзува за хипоксични клетки во in-vitro и in-vivo услови.

Се применува во онкологија, кардиологија и неврологија, и тоа за глиоми (Yamamoto et al., 2012; Hirata et al., 2019; Abdo et al., 2021), хипоксија во белодробен канцер (Bollineni et al., 2012; Inada et al., 2023; Bourigault et al., 2022), карциноми на глава и врат (Okamoto S et al., 2013; Carles et al., 2021; Dolezel et al., 2022), други хипоксични тумори (Sato et al., 2017; Yamane et al., 2019).

[¹⁸F]FMISO има способност слободно да дифузира низ крвно-мозочната бариера поради што тој е важен РФП за проценка на церебралната хипоксија по исхемичен мозочен удар (Lee et al., 2007). Исто така наоѓа голем примена и во кардиологијата за миокардна исхемија (Markus et al., 2004; Guadagno et al., 2004; Handley et al., 2011; Naya et al., 2019), за срцева саркоидоза (Manabe et al., 2017; Furuuya et al., 2019., Pacella, 2022).

Биодистрибуцијата на [¹⁸F]FMISO ќе зависи од диференцијалниот регионален проток во целните органи. [¹⁸F]FMISO покажува бавен клиренс од нормалното ткиво, што резултира со подолго време (≥3 часа) за да се постигне прифатлив тумор/заднина сооднос (анг. tumor/ background ratios) за оптимален скен (Krohn et al., 2008).

Од клиничка гледна точка, идеалниот РФП треба да биде лесен за синтетизирање и треба да овозможи точни, повторливи мерења со кратко време на аквизиција по инјектирање и добивање на слика со висок контраст. Иако во литературата досега се објавени разни РФП (наведени во точка 2.7.) коишто се употребуваат за хипоксични тумори ниту еден од тие не е идеален, секој има предности и недостатоци и секој може да се користи само во релативно ограничена област. Развојот на повеќе РФП специфични за туморската хипоксија сè уште е во тек, а исто така и MRI снимањето зазема ново поле на развој за оваа примена. И покрај ова, засега [¹⁸F]FMISO останува златен стандард за хипоксични тумори (Gouel et al., 2023).

Повеќе од 600 научни трудови - како што се индексирани од PubMed до јуни 2023 година го потенцираат влијанието на овој РФП во клиничката примена за хипоксични тумори.

2.6.4. Токсиколошки ефекти

Koziorowski со своите коавтори ги објаснува предизвиците и потребните студии кои треба да се спроведат во однос на токсиколошките студии на РФП, бидејќи во постоечкото упатство за токсиколошки студии кое е применливо и за РФП, “ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals” (CPMP/ICH/286/95) постои одреден простор за толкување и не е секогаш јасно кој вид на токсиколошка студија е потребна за различни РФП (Koziorowski et al., 2017). Врз основа на сите постоечки упатства, тие исто така даваат нов пристап за токсиколошка проценка и предложуваат три различни токсиколошки граници: 1) $<1,5 \mu\text{g}$, 2) $<100 \mu\text{g}$ и 3) $>100 \mu\text{g}$.

Исто така, несаканите ефекти од РФП се опишани и од страна на Здружението на нуклеарна медицина како ефекти кои се штетни и несакани клинички манифестации по администрација на РФП или негов нерадиоактивен еквивалент. Ефектот не е резултат од погрешна администрација на РФП, како на пример повисока доза од потребната и претходно пресметаната, паравенозна администрација, не е предизвикан од вазовагусен одговор и не е последица од радиотерапија.

РФП како специфична група на лекови се безбедни за разлика од контрастните средства, други радиографски препарати или лекови. Тоа се должи на фармацевтската доза на РФП содржана во инјекциониот раствор со одредена активност која се користи за администрација. Таа е многу мала и се движи во опсег на микрограми до милиграми. Тоа е така, бидејќи нивната намена (особено кај дијагностичките РФП) не е заради фармаколошкото дејство, туку заради специфичната локализација која се должи на физиолошките механизми. Ниската класа на преваленција на несакани ефекти кон РФП оневозможува нивно сеопфатно класифицирање, па главно се поделени на две класи: тип А реакции кои се дозно зависни и се јавуваат поради фармаколошкиот ефект; тип Б реакции кои се неочекувани и неповрзани со фармаколошкиот ефект на РФП и овој тип на реакции ги опишува најголемиот дел од несаканите ефекти. Реакциите од тип Б најчесто можат да бидат вазомоторни, анафилактички или пак реакции на пирогени (зголемена телесна температура, треска, главоболка), алергиски реакции.

Во литературата се објавени повеќе студии за токсиколошки ефекти на мисонидазоли (MISO) и флуоромисонидазоли (FMISO) спроведени согласно со ДЛП (21 CFR дел 58) од Агенцијата за храна и лекови (анг. Food and Drug Administration's (FDA) GLP regulations) за спроведување на неклинички студии. LD₅₀ кај возрасни машки глвци Balb/C за MISO и FMISO е 1,8 mg/g (1,3-2,6) и 0,9 mg/g, соодветно. Серумскиот полуживот на орално администрираниот MISO и FMISO кај глвци е 2,3 h (1,87-2,92) и 2,0 h (1,79-2,24), соодветно (Brown & Workman, 1980). Резултатите од други анимални студии не покажале ефекти врз моторната активност и не биле откриени микроскопски промени на периферни нерви, но била забележана појава на некроза и глиозата во малиот мозок и медулата. Некрозата кај животни од 400 mg/kg по третманот и глиозата во истите овие региони на мозокот во групите од 300 и 400 mg/kg еден месец по дозирањето. Овие резултати покажуваат дека интравенската администрација на MISO кај стаорци предизвикува токсичност на централниот нервен систем што ја ограничува дозата без ефекти врз периферното нервно ткиво (Graziano et al., 1996). Врз основа на резултатите, доза без штетен ефект, NOAEL (анг. Non Observed Adverse Effect Level) за 14 последователни дена за стаорци е поголема од 153 µg/kg/ден.

Клиничките студии пак за нитроимидазолите датираат од 70-тите години на минатиот век кога неколку деривати на нитроимидазол се тестирани како миметици на кислород за хумани испитувања кај кои се претпоставувало дека имаат хипоксични тумори. Целта била да се сензибилизираат до цитотоксично ниво со фотонско зрачење, при што се покажало дека тие ги задржале карактеристиките на нормоксичните ткива (Phillips & Fu., 1978; Urtasun et al., 1978). Знаењето за токсичните ефекти на [¹⁸F]FMISO кај луѓето главно се заснова на истражувањата спроведени со MISO, како најблизок аналог на FMISO. Не се пријавени штетни ефекти сè додека кумулативните дози не надминат неколку грама, што е приближно 5 до 6 степени повеќе од фармацевтската доза потребна за еден ПЕТ скен. Греј спроведувал прелиминарни фармакокинетски мерења со шест здрави волонтери, кои примиле единечни орални дози кои се движат од 1 g до 4 g. Максималното серумско ниво на 2 часа било 65 µg/mL, а серумскиот полуживот на лекот бил 13,1 ± 4,0 h. Помеѓу администрираната доза и серумското ниво постоела линеарна зависност (Gray et al., 1976). Исто како и во претклиничките

токсиколошки студии и во клиничките студии се покажало дека примарната токсичност на MISO е појава на периферна невропатија, која зависи од фреквенцијата и нивото на дозата. Нема докази што укажуваат на тоа дека претставува ризик за периферна невропатија кога се администрира како [¹⁸F]FMISO. Ризикот за периферна невропатија всушност се чини дека е минимизиран или отсутен дури и при терапевтски дози кои далеку ги надминуваат оние неопходни дози за ПЕТ скен (Wasserman et al., 1979; Wiltshire et al., 1978; Dische et al., 1979).

Студиите спроведени со [¹⁹F]FMISO се многу слични со студиите спроведени со MISO. LD₅₀ за MISO е 0.184 g/kg и 0.06-0.09 g/kg за [¹⁹F]FMISO, додека максималната доза пријавена во протоколите за снимање со [¹⁸F]FMISO е 1 mg/kg, што укажува на тоа дека [¹⁸F]FMISO нема несакани дејства врз пациентите.

Бидејќи полуживотот на флуор-18 е само 110 минути, спроведувања на токсиколошки студии со [¹⁸F]FMISO не се можни. Горенаведените податоци за токсични ефекти на MISO и [¹⁹F]FMISO треба да бидат основа за карактеризација и заклучоци за токсичност кај анималните модели и кај луѓе.

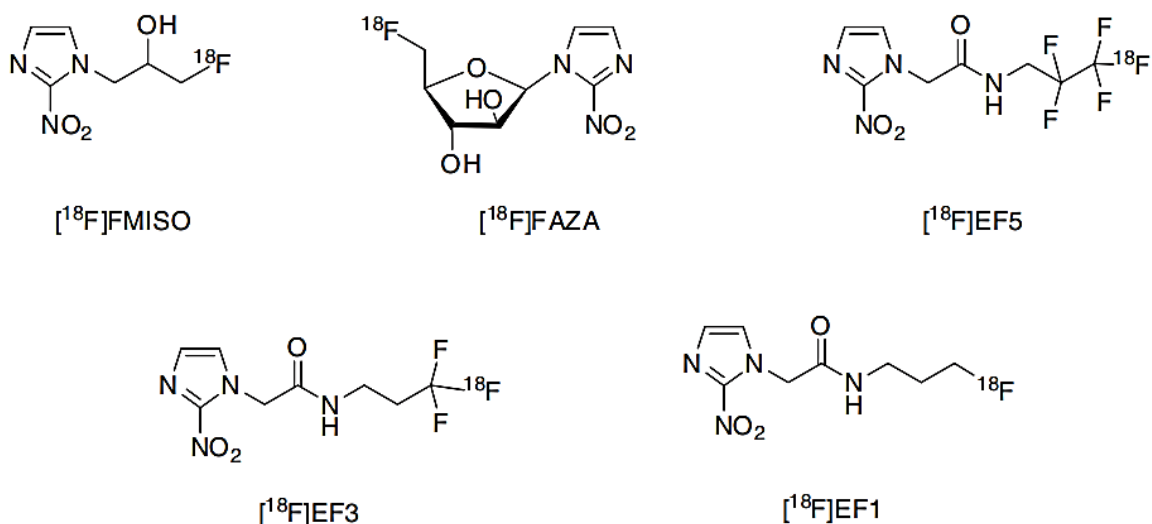
2.7. Други радиофармацевтици кои се користат за хипоксија

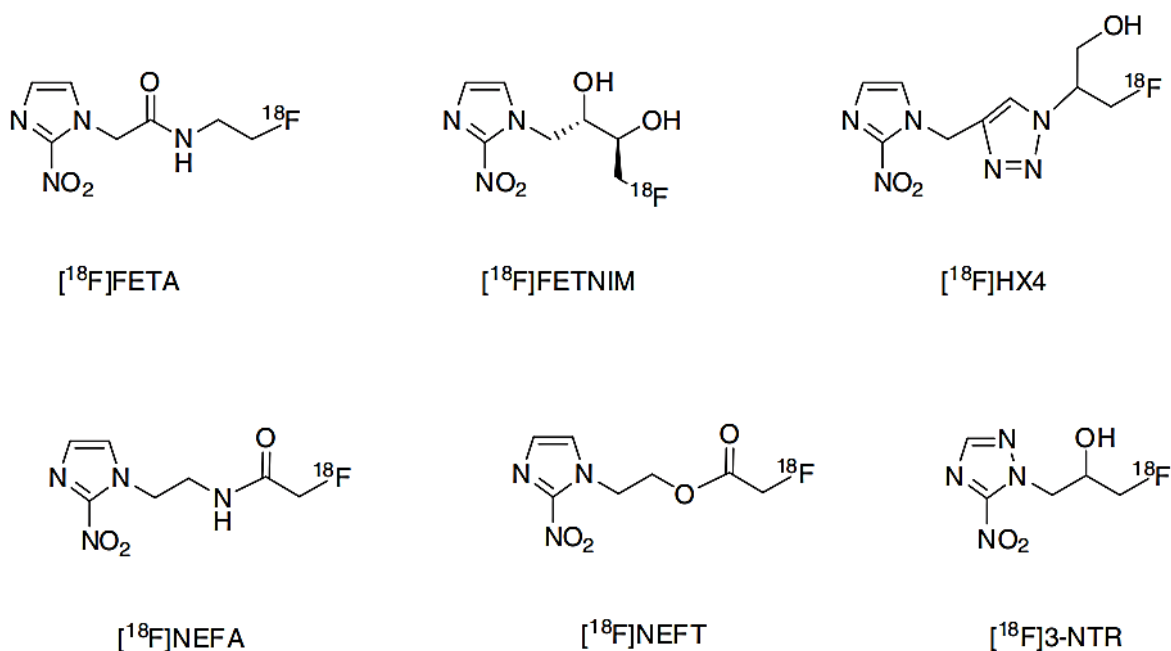
Мисонидазолите за прв пат се воведени во 1981 година за молекуларно снимање на туморската хипоксија од страна на Шарман и соработниците. Тие го студирале [¹⁴C]misonidazole (Chapman et al., 1981), а потоа за кратко време се појавиле и други ПЕТ РФП за хипоксија со нитроимидазолна структура.

Во 2013 година Melinda Wuest и Frank Wuest објавиле сеопфатен преглед каде што ги имаат опишано сите ПЕТ радиофармацевтици кои се користат за хипоксија до 2013 г., со посебен осврт на ¹⁸F-радиофармацевтици (Wuest & Wuest., 2013). Тие го истакнуваат [¹⁸F]FMISO како најчесто користен ¹⁸F-радиофармацевтик.

Како најсличен РФП кој има полипофилни својства, а по структура е нитроимидазолен ¹⁸F-радиофармацевтик и се користи за хипоксија претставува [¹⁸F]флуороазомицин-арабинофуранозид ([¹⁸F]fluoroazomycin-arabinofuranoside, [¹⁸F]FAZA). Во споредба пак со [¹⁸F]FMISO и [¹⁸F]FAZA, значително полипофилни нитроимидазолни ¹⁸F-радиофармацевтици се: 2-(2-нитро-1H-имидазол-1-ил)-N-(2,2,3,3,3-[¹⁸F]пентафлуоропропил)ацетамид (2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-N-

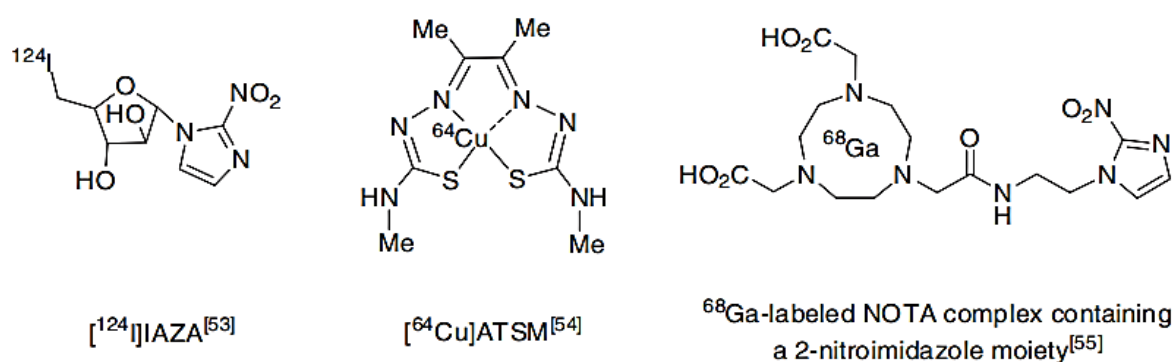
(2,2,3,3,3-[¹⁸F]pentafluoropropyl)-acetamide, [¹⁸F]EF5), 2-(2-нитроимидазол-1-ил)-N-3-[¹⁸F]флуоропропилацетамид (2-(2-nitroimidazol-1-yl)-N-3-[¹⁸F]fluoropropyl acetamide, [¹⁸F]EF1), 2-(2-нитроимидазол-1-ил)-N-(3,3,3-[¹⁸F]трифлуоропропил)ацетамид (2-(2-nitroimidazol-1-yl)-N-(3,3,3-[¹⁸F]trifluoropropyl)acetamide, [¹⁸F]EF3), [¹⁸F]флуороетанидазол, ([¹⁸F] fluoroetanidazole, [¹⁸F]FETA) и [¹⁸F]флуороеритронитроимидазол ([¹⁸F]fluoroerythronitroimidazole, [¹⁸F]FETNIM). Последните две соединенија покажале намалени метаболички стапки *in vivo* и помало задржување во црниот дроб во споредба со [¹⁸F]FMISO. Како понова генерација на ¹⁸F-радиофармацевтик претставува [¹⁸F]HX4 кој се добива по пат на „click“ хемија (Sanduleanu et al., 2020). Од поновите нитроимидазолни ¹⁸F-радиофармацевтици може да се издвојат 2-[¹⁸F]флуоро-N-(2-(2-нитро-1H-имидазол-1-ил)етил)ацетамид (2-[¹⁸F]fluoro-N-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl)acetamide, [¹⁸F]NEFA), 2-(2-нитро-1H-имидазол-1-ил)етил 2-[¹⁸F]флуороацетат (2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl 2-[¹⁸F]fluoroacetate [¹⁸F]NEFT) и [¹⁸F]3-NTR, аналог на 3-нитро-1,2,4-триазол на [¹⁸F]FMISO. Неодамна, различни сулфоксиди се предложени како нови молекули за развој на ¹⁸F-радиофармацевтци за хипоксија. Сите овие споменати РФП се претставени на слика 7.





Слика 7. ¹⁸F-радиофармацевтици со основа на 2-нитроимидазолни молекули
Figure 7. ¹⁸F-radiopharmaceuticals based on 2-nitroimidazole

Сепак, и покрај многуте ¹⁸F-радиофармацевтици за хипоксија, постојат и неколку алтернативни ПЕТ РФП со ¹²⁴I, ⁶⁴Cu, and ⁶⁸Ga, претставени на слика 8. Меѓу нив, [⁶⁴Cu]диацетил-бис (N4-метилтиосемикарбазон) ([⁶⁴Cu]diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone, ATSM) е често користен за хипоксија.



Слика 8. Алтернативни ПЕТ радиофармацевтици за хипоксични тумори
Figure 8. Alternative PET radiopharmaceuticals for hypoxic tumor

Алтернативните ПЕТ РФП на ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu и ¹²⁴I радиоизотоп во нивната студија се дискутирани само накратко, а истакнати се молекулите коишто во својот состав содржат 2-нитроимидазол, како први и најважни за хипоксија

(Hoigebazar & Jeong, 2013). Lu со соработниците во 2021 година вовеле нов дериват на нитроимидазол за хипоксични тумори, $Al_{18}F$ -NOTA-NI. За таквата синтеза тие произвеле 2-нитроимидазолен прекурсор, 2-[4-(carboxymethyl)-7-[2-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamido)ethyl]-1,4,7-triazanonan-1-yl]acetic acid (NOTA-NI) (Lu et al., 2021). Liew со соработниците во оваа година се обиделе да синтетизираат и нова класа на нитроимидазолни метил сулфонамиди (анг. nitroimidazole methyl sulfonamides) (Liew et al., 2023).

2.8. Производство на [^{18}F]Флуоромисонидазол

Во раните фази од својот развој на нитроимидазолните молекули, Jerabek и Welch во 1986 година прикажуваат различни мануелни начини за синтеза на голем број нитроимидазолни молекули кои може да бидат синтетизирани како потенцијални „биомаркери“ за хипоксични клетки, меѓу кои за првпат даваат осврт за синтезата на [^{18}F]FMISO (Jerabek et al., 1986). Оттогаш повеќе истражувачки групи дадоа преглед на методи за синтеза на [^{18}F]FMISO, а сите тие се претставени во табела 2, сè до јуни 2023 година. Во табелата е даден детален преглед на година на производство, начин на синтеза и модул за синтеза, употребен прекурсор, тип на прочистување, време на синтеза (min) и принос (во зависност од податокот кој е даден во соодветната литература, претставен е радиохемиски принос (анг. radiochemical yield RCY) или #AY=activity yield).

Табела 2. Преглед на методи за синтеза на [¹⁸F]FMISO
Table 2. An overview on [¹⁸F]FMISO synthesis methods

Година	Синтеза (модул за синтеза)	Прекурсор	Тип на прочистување	Време на синтеза (min)	Принос (%)*	Литература
1986	Мануелна	1-епоксипропил-2-нитроимидазол	HPLC	н.д.	1*	Jerabek et al., 1986
1989	Мануелна	[¹⁸ F]еписфлуорохидрин	HPLC	60	4*	Grierson et al., 1989
1989	Мануелна	Епоксипропил тосилат, 2-нитро-имидазол	HPLC	н.д.	7–12#	Hwang et al., 1989
1993	Мануелна	NITTP	SPE	45 -50	55-80*	Lim & Berridge., 1993
1993	Полуавтоматска	Епоксипропил тосилат, 2-нитро-имидазол	HPLC	70	40#	Mccarthy et al., 1993
1994	Мануелна	NIATP	SPE	60-70	12–18#	Cherif et al., 1994
1999	Мануелна	NITTP	HPLC	5-80	60–86#	Patt et al., 1999
2004	Мануелна	Епоксипропил тосилат, 2-нитро-имидазол	HPLC	180	13#	Kamarainen et al., 2004
2004	FDG synthesis module IBA	NITTP	SPE	50	21*	Kamarainen et al., 2004
2005	Tracerlab FXF–N	NITTP	SPE	40	51*	Tang et al., 2005
2005	Tracerlab FXF–N	NITTP	HPLC	60	60*	Tang et al., 2005
2005	Мануелна	NITTP	HPLC	80	30–40*	Adamsen et al., 2005
2005	TracerLab Mx FDG	NITTP	HPLC	60	54*	Oh et al., 2005
2007	Scanditronix Anatech RB	NIATP	SPE	65	30*	Chang et al., 2007
2009	FDG4 module	NITTP	SPE	50	55*	Wang et al., 2009
2009	N.A.	NITTP	semi-preparative HPLC	недефинирано	20–30*	Franck, et al., 2009
2010	Nuclear Interface Module	NITTP	SPE	40	38#	Nandy et al., 2010
2010	TracerLab Mx FDG	NITTP	не дефинирано	55	36*	Nieto et al., 2010
2012	P-IV prototype of Microfluidic system	NITTP	semi-preparative HPLC	60	58*	Yokell et al., 2012
2013	GE TRACERlab MX	NITTP	SPE	44	25#	Lee et al., 2013
2014	Synthera IBA	NITTP	SPE	35	50*	Blom & Kozirowski., 2014
2015	BG75 system	NITTP	HPLC и SPE	23	30-35*	Anzellotti, et al., 2015
2015	Microfluidic reactor Advion NanoTek unit	NITTP	HPLC	106	28.4#	Zheng et al., 2015
2016	BG75 system Biomarker Generator	NITTP	HPLC и SPE	недефинирано	недефинирано	Yuan et al., 2016
2016	N.A.	NITTP и др.прекурсори	HPLC	недефинирано	58*	Kwon et al., 2016
2018	TracerLAB Fx F-N	NITTP	SPE	недефинирано	недефинирано	Antuganov al., 2018
2018	Tracerlab FXFN module	NITTP	SPE	21	40*	Fernandez-Maza et al., 2018
2021	Multi-purpose synthesizer developed in-house	[¹⁸ F]еписфлуорохидрин	HPLC	75	26#	Ohkubo et al., 2021
2022	TracerLab FX-FDG module	NITTP	недефинирано	31	56*	Cucchi et al., 2022
2023	FASTlab1 radiosynthesizer	NITTP	недефинирано	48	49*	Kniess et al., 2023
2023	Synthera V2 IBA	NITTP	SPE	40	53*	Chochevska et al., 2023

* RCY, #AY (Coenen et al. 2017)

Радиосинтезата на [^{18}F]FMISO од страна на Jerabek и Welch била извршена преку реакцијата на отворање на епоксиден прстен од 1-(2',3'-епоксипропил-2-нитроимидазол 1-(2',3'-epoxypropyl)-2-nitroimidazole) со тетрабутиламониум [^{18}F]флуорид (ТВА[^{18}F]F) и го добиле саканиот производ по долга процедура само со 1 % радиохемиски принос. Сепак, оваа количина на активност била доволна за извршување на првите студии за биодистрибуција со охрабрувачки резултати. Во 1989 година тимот на истражувачи на истиот ментор Welch претставија подобрен метод на радиосинтеза, преку калиум [^{18}F]флуорид (во ацетонитрил) и епоксипропил тосилатен прекурсор формираа епи[^{18}F]флуорохидрин, а со понатамошна реакција на овој интермедиер со 2-нитроимидазол добија [^{18}F]FMISO со принос од 12 % преку HPLC прочистување (Hwang et al., 1989). Во 1993 г. Lim и Berridge и McCarthy објавиле метод на синтеза на [^{18}F]FMISO со епоксипропил тосилат и 2-нитро-имидазол преку два различни начини на прочистување, HPLC и SPE. Во студијата на Lim и Berridge тие за првпат вовеле SPE прочистување во нивната синтеза и дополнително се обиделе да спроведат синтеза со претходно синтетизиран прекурсор 1-(2'-нитро-1'-имидазол)-2-О-тетрахидропиранил-3-О-толуенсулфонилпропандиол (1-(2'-nitro-1'-imidazol)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluenesulfonylpropanediol, NITTP). Тие за првпат ја спровеле стратегијата за замена на [^{18}F]F⁻ со тосилатна група со последователно брзо отстранување на заштитните групи и брзо прочистување со добар принос (55-80 %) и оптимално време на синтеза (45-50 мин.). Единствената пречка е што синтезата се одвивала мануелно (Lim и Berridge et al., 1993). Во 1994 г. Cherif, исто така, мануелно синтетизирал [^{18}F]FMISO преку SPE прочистувањето, но примениле друг прекурсор, (2'-нитро-1'-имидазолил)-2-О-ацетил-О-тосилпропанол (2'-Nitro-1'-imidazolyl)-2-O-acetyl-O-tosylpropanol, NIATP) (Cherif et al., 1994).

Со понатамошна оптимизација (мануелна), NITTP прекурсорот е проучуван под различни услови на синтеза (време на реакција, температура и концентрација) од страна на Patt и соработниците (Patt et al., 1999). Во 2004 г. за првпат е направена автоматска синтеза на [^{18}F]FMISO од страна на Kamagainen и соработниците SPE прочистување и NITTP прекурсор за време на синтеза од 50 мин. и принос од 21 %. Автоматизирањето на синтезата е клучен чекор за операторот од аспект на заштита од јонизирачко зрачење и можност за употреба на поголема почетна активност, како и репродукцибилност на синтезата.

(Kamarainen et al., 2004). Следната година Tang со соработниците направил подобрување на методологијата за синтеза со целосно автоматизиран пристап и направија споредба на SPE и HPLC прочистувањето на [¹⁸F]FMISO (Tang et al., 2005). Во двата случаја, радиохемиската чистота на [¹⁸F]FMISO била поголема од 95 %, па оттука пристапот со SPE е фаворизиран бидејќи се скратило времето на синтеза (40 мин. наспроти 60 мин. кај HPLC), меѓутоа приносот бил малку понизок (51 % наспроти 60 % кај HPLC).

Во следните години, автоматизираната синтеза на [¹⁸F]FMISO е оптимизирана и подобрена од неколку групи кои употребиле само SPE прочистување, со цел поедноставување на процесот, скратување на времето на синтеза и поголема радиохемиска чистота (Chang et al., 2007; Wang et al., 2009; Nandy et al., 2010). Во истиот тој период повеќе групи спровеле оптимизација и подобрување на автоматизираната синтеза, но со HPLC прочистување Oh et al., 2005; Franck et al., 2009; Yokell et al., 2012). Слични резултати со автоматизирани синтези и SPE прочистување се објавени потоа. Целта во студиите за дополнително скратување на времето на синтеза била постигната, во коишто студии Blom и Kozirowski извршиле синтеза за време од 35 мин., Cucchi со соработниците за 31 мин. и Fernandez-Maza со соработниците за 21 мин. (Blom & Kozirowski., 2014; Fernandez-Maza et al., 2018; Cucchi et al., 2022).

Во сите овие студии спроведени со SPE прочистување биле употребени и оптимизирани различни типови кертриџи за да постигне добра хемиска и радиохемиска чистота. Приносот на финалниот производ во сите овие студии не бил поголем од 55 %. Бидејќи приносот е многу важен индикатор за ефикасноста на синтезата истражувањето и усовршувањето на методологиите за синтеза не престануваат. Така минатата година е објавена студија во која се употребени целосно различни типови на касети за прочистување и подобрување на радиохемискиот принос со помош на модулот Tracerlab FX FDG, од страна на Cucchi и соработниците. Тие за првпат вовеле полимерен реверзно-фазен сорбент STRATA-X и дополнителни кертриџи SPE PS-H+ и QMA за финално прочистување. Со тој пристап тие постигнаа највисок радиохемиски принос од 68 % (Cucchi, et al., 2022).

Друга истражувачка група во текот на оваа година се обиде да произведе [¹⁸F]FMISO но со свои подготвени касети со FASTlab. Тие постигнале принос од 39 % со употреба на Oasis HLB и Alumina N кертриџи (Kniess, et al., 2023).

Во рамките на истражувањето спроведено оваа година од страна на Chochevska со соработниците е направена студија на разјаснување на улогата на кертриците во SPE прочистувањето и е спроведена негова оптимизација со различни кертрици (Chochevska, et al., 2023).

Автоматската синтеза на [^{18}F]FMISO може да се спроведе на различни комерцијално достапни модули за синтеза, па за подобар преглед на досега користените модули тие се наведени во табела 2.

Дел од овие модули користат касети за синтеза коишто се пофлексибилни во однос на местата определени за број на реагенси и кертрици. Особено тоа е многу важно кога се спроведува синтеза на [^{18}F]FMISO со SPE прочистување, заради можноста да се дополни касетата со друг раствор за промивање на кертриците по задржувањето на [^{18}F]FMISO, а пред негова финална елуција.

2.8.1. Прекурсори за синтеза на [^{18}F]FMISO

Хемиските прекурсори за радиофармацевтско производство се нерадиоактивни супстанции добиени со хемиска синтеза и служат за поврзување со некој радионуклид. За рутинска употреба и производство на РФП најчесто се користат комерцијално достапни прекурсори со цел да се задоволат барањата на ДПП. Вообичаено тие се дел од сетот со реагенси потребен за соодветната синтеза на некој РФП. Прекурсорите може да бидат произведени и од страна на лабораториите („in house“) и за таквите прекурсори Европската фармакопеја има пропишано монографија со тестови кои се потребни да се изведат пред да бидат употребени за синтеза на РФП (Ph.Eur 10.0, 2902, (07/2016)).

Како што може да се види на слика 9, наведени се неколку прекурсори кои се употребувани за синтеза на [^{18}F]FMISO, тоа се:

- ✓ 1-епоксипропил-2-нитроимидазол
(1-(2,3-Ерохуpropyl)-2-nitroimidazole, $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$),
- ✓ 2-нитроимидазол
(2-nitroimidazole, $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2$),
- ✓ епоксипропил тосилат
(1,2-ерохуpropyl, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{S}$),
- ✓ NIATP
(1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-O-acetyl-3-O-tosylpropanol),

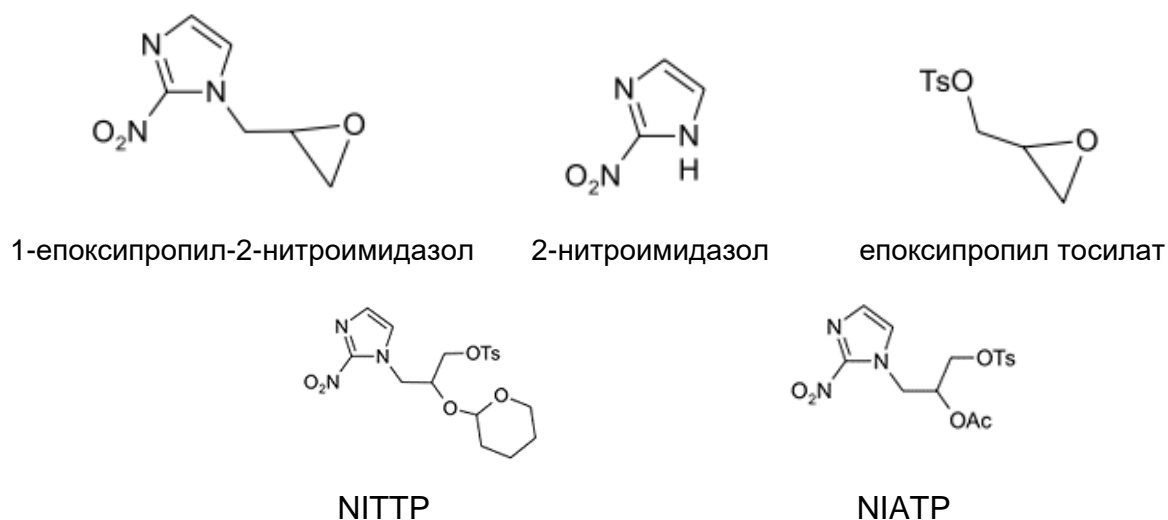
✓ NITTP

(1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluenesulfonyl-propanediol).

Првите четири прекурсори се употребувани на почетоците од развојот на синтезата на [¹⁸F]FMISO и тие биле синтетизирани „in house“. Lim & Berridge постигнале значителен напредок во синтезата [¹⁸F]FMISO со воведувањето на NITTP прекурсорот. Во текот на следните години многу истражувачки групи работеле на развој на метод на синтеза со овој прекурсор (Patt et al., 1999; Kamarainen et al., 2004; Tang et al., 2005; Tang et al., 2005; Adamsen et al., 2005; Oh et al., 2005). Со развојот на ДПП регулативата за производство на [¹⁸F]-радиофармацевтици, лабораторите се стремеле да ги исполнуваат барањата па се наметнала потребата од употреба на регистриран прекурсор којшто ги исполнува барањата на ДПП. Комерцијално достапен прекурсор за [¹⁸F]FMISO е достапен од 2004 г. од германската компанија ABX (ABX Advanced Biomedical Compounds, Radeberg, Germany), кога и за првпат бил употребен (како комерцијално достапен прекурсор) од страна на Tang со сораборниците во нивната студија (Tang et al., 2005).

Таквиот прекурсор е деклариран дека е за ДПП производство (NITTP (GMP) Precursor for [¹⁸F]FMISO ([¹⁸F]fluoromisonidazole). Неговиот CAS број е 150196-34-2 и има молекулска маса 425.46 g/mol. Според IUPAC номенклатурата, тоа е [3-(2-nitroimidazol-1-yl)-2-(oxan-2-yloxy)propyl] 4-methylbenzenesulfonate, а како синоними се користат: 1-(2'-Nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluenesulfonyl-propanediol, 3-(2-Nitroimidazol-1-yl)-2-O-tetrahydropyranyl-1-O-toluenesulfonylpropanediol, 1H-Imidazole-1-propanol, 2-nitro-beta-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-,4-methylbenzenesulfonate (ester).

Во својот состав содржи тосилатна група, како група што заминува и тетрахидропиранилна група, како заштитна група. Неговата структура е прикажана на слика 9. NITTP прекурсорот е цврста бела (или жолтеникава) прашкаста супстанца која не се раствора во вода, а добро се раствора во ацетонитрил.



Слика 9. Структура на прекурсори за синтеза на [^{18}F]FMISO
Figure 9. Structure of [^{18}F]FMISO precursors

2.9. SPE прочистување на [^{18}F]FMISO

Како класичен и конвенционален прифатен метод за прочистување на [^{18}F]FMISO е методот со HPLC прочистување. За овој метод на прочистување, освен модулот за синтеза, потребен е и дополнителен систем т.н. HPLC единица. Таквата единица може да се поврзе речиси за сите гореспоменати модули, како дополнителен апарат кој може да се управува автоматски или полуавтоматски. Производители кои нудат материјали за синтеза на РФП се ориентирани кон производство и продажба на материјали наменети за синтеза на [^{18}F]FMISO со класичниот метод на HPLC прочистување. Иако во гореспоменатите студии се покажало дека таквиот начин е доста комплициран и одзема многу време за да се врши рутински, сепак досега сè уште нема комерцијално достапен кит за синтеза на [^{18}F]FMISO со SPE прочистување. Во моментот тоа се надминува, со развој и валидација на in house методи за синтеза со SPE прочистување или пак со нарачка на сетови за синтеза специјално произведени според потребите на клиентот. Со тоа SPE прочистувањето може да се примени рутински и да го замени методот на синтеза со HPLC прочистување. Како што може да се види во табела 2, неколку истражувачки групи објавиле синтеза на [^{18}F]FMISO со SPE прочистување. SPE нуди бројни предности, како на пример едноставно и брзо прочистување со употреба на комерцијално достапни кертриџи кои се лесно адаптабилни на речиси сите касети за синтеза, практични се и што е многу важно SPE

прочистувањето е поекономично за разлика од HPLC прочистувањето. Со цел да се постигне соодветна радиохемиска и хемиска чистота на финалниот производ, исто како и кај класичното HPLC прочистување, многу се важни типовите на SPE кертриџи кои ќе бидат користени, како и понатамошната оптимизација на процесот (Colin, et al., 2003; Sajjad et al., 2019; Badawy, et al., 2022).

За SPE прочистување на [^{18}F]FMISO обично се користат повеќе од два кертриџи или комбинација од неколку кертриџи со различни стационарни фази т.н. сорбенти, различна количина на полнење, различна големина и форма на честички. Најчесто употребувани типови на кертриџи за SPE прочистување на [^{18}F]FMISO се:

- ✓ C18 кертриџи со стационарната фаза на C18 полнење: класично C18 полнење со различна маса на полнење (Sep-Pak C18 Cartridge), C18 полнење со висока хидрофобичност (Sep-Pak C18 Plus Long Cartridge), со јака хидрофобичност со трифункционална поврзаност на стационарната фаза (Sep-Pak tC18 Plus Short Cartridge и сл.);
- ✓ HLB кертриџи - хидрофилно-липофилен кертриџ со кополимер од дивинилбензен и полистирен (PS/DVB copolymer) или липофилен кополимер од дивинилбензен и винил пиролидинон (HLB Plus Light Cartridge 30 mg или HLB Plus Short Cartridge, 225 mg и сл.);
- ✓ ALU кертриџи со високоактивна базна површина од алуминимум оксид со карактеристика на луисовски киселини (ALU-B кертриџи), високоактивна неутрална површина од алуминимум оксид со карактеристика на луисовски киселини (ALU-N кертриџи);
- ✓ различни силно катјон изменувачки кертриџи – SCX кертриџи.

Како што е претставено во табела 2, Kämäräinen со соработниците во 2004 г. (со модул Synthesis module by IBA) и Tang со соработниците во 2005 г. (со модул Tracerlab FX F–N module) за првпат развиле синтеза на [^{18}F]FMISO со SPE прочистување, применувајќи C-18, ALU-B и SCX Sep-Pak кертриџи. Wang со соработниците во 2009 г. (со модул FDG4 module, Explora), исто така, примениле C-18 кертриџ, но за прв пат бил искористен ALU N кертриџот, наместо ALU-B. Nandy и Rajan во 2010 (со модул Nuclear Interface Module) употребиле само еден ALU-N кертриџ. Lee со соработниците (со модул GE TRACERlab MX module) и Blom и Koziorowski (со модул IBA Synthera) во 2013 г. примениле за првпат HLB

кертриц. Групата на Lee го комбинирале HLB кертрицот со мешан силно катјон-изменувачки кертриц, а Blom и Kozirowski го комбинирале HLB кертрицот со SCX со ALU-B. Fernandez-Maza со соработниците и Antuganov со соработниците во 2018 г. примениле поинакви кертрици во SPE прочистувањето. Fernandez-Maza со соработниците примениле tC18 кертриц во комбинација со SCX, додека Antuganov со соработниците примениле различни типови на кертрици во нивната студија, и тоа: Chromabond Set, ALU N со tC18, HLB со C18 Environmental кертрици.

Комплетно различни кертрици се применети од страна на Cucchi и соработниците во 2022 г., тие вовеле полимерно реверзно-фазен сорбент (polymeric reverse phased sorbent STRATA-X), во комбинација со катјон-изменувачки кертриц SPE PS-H⁺ и QMA кертриц за финално прочистување. Групата на Kniess, пак, во последната година се обиделе да применат комбинација на Oasis HLB кертриц со ALU-N. Во рамките на сите овие истражувања, добиените резултати ја разјаснуваат улогата на SPE прочистувањето и предизвиците за вклучување на SPE прочистување во рутина, наместо класичниот начин HPLC прочистување.

Принципот на прочистување кај сите овие студии речиси е ист, односно финалниот непрочистен раствор поминува низ кертриците, при што [¹⁸F]FMISO се задржува на реверзно-фазниот кертриц, додека пополярните молекули се елуираат, заедно со други онечистувања, слободниот (неврзан) анион ¹⁸F⁻ се задржува на ALU кертрицот, а катјонските онечистувања на SCX кертрицот.

По овој чекор на прочистување следува елуција на финалниот производ [¹⁸F]FMISO. Растворот за елуирање што најчесто се користи е 5 %, 10 % или 5-10 % етанолен раствор во вода, но може да се користат и други компатибилни раствори.

2.10. Контрола на квалитет на [¹⁸F]Флуоромисонидазол

[¹⁸F]Флуоромисонидазол како радиофармацевтски препарат подлежи на контрола на квалитетот пред да биде одобрен за употреба кај пациенти. Произведениот стерилен и апиноген раствор за инјектирање за интравенска употреба треба да ги исполнува барањата за квалитет дефинирани во EP monograph Fluoromisonidazole (18F) injection 01/2014:2459 (Ph.Eur 10.0, 2459, (01/2014)). Во монографијата се дефинирани следните параметри за

испитување на квалитетот: pH вредност, идентификација, радиохемиска чистота со TLC и HPLC, хемиска чистота (HPLC и GC) како тестови пред одобрување на серија и радионуклидна чистота, резидуални растворувачи, стерилност и бактериски ендотоксини-пирогени како тестови кои треба да се изведат по одобрување на серија.

2.10.1. Потенцијални хемиски и радиохемиски онечистувања

Добро познато е дека видот на хемиските и радиохемиските онечистувања кои потенцијално можат да бидат присутни во финалниот производ ќе зависат од составот на реагенсите (влезни материјали) кои се користат за синтезата и од начинот на синтезата. Во табела 3 се претставени сите радиохемиски и хемиски онечистувања кои можат да бидат присутни во непрочистен раствор од финалниот производ [^{18}F]FMISO (анг. unpurified [^{18}F]FMISO), а коишто може да се сретнат и по прочистувањето на радиофармацевтикот.

Како хемиски онечистувања коишто задолжително треба да се анализираат, се:

- ✓ Резидуални растворувачи ацетонитрил (MeCN) и етанол (EtOH). Тие се користат во процесот на синтеза: ацетонитрилот е присутен во растворот на криптанд и растворот на прекурсорот, а етанолот е присутен во растворот за елуција на [^{18}F]FMISO;
- ✓ Десметилмисонидазол/DMM – потекнува од прекурсорот NITTP т.е. DMM е основата на NITTP молекулот (слика 9), па затоа е очекувано онечистување во финалниот раствор. Максимален дозволен лимит е 10 ppm (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). За ова онечистување е достапен референтен стандард;
- ✓ Флуоромисонидазол/FMISO – во радиосинтезите на [^{18}F]радиофармацевтици потенцијално присутен анјон е флуоридниот анјон (^{19}F) којшто заради хемиските својства може да се натпреварува во врзувањето со [^{18}F]F⁻, па затоа се среќава како возможно онечистување за кое Eu.Ph. има пропишано максимален дозволен лимит од 10 ppm (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). За ова онечистување достапен е референтен стандард;

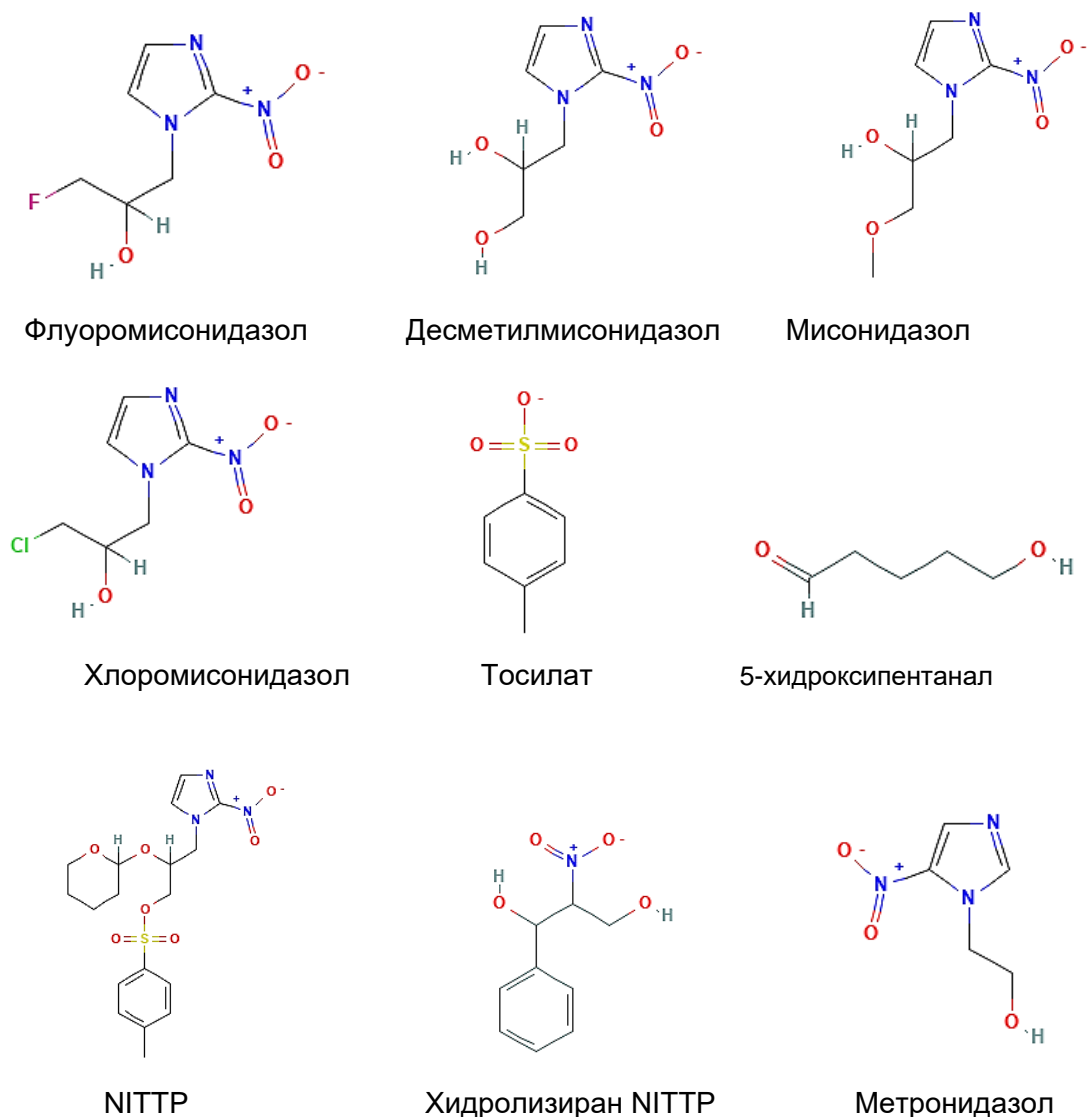
- ✓ Другите хемиски онечистувања кои може да бидат присутни во трагови се: мисонидазол/MISO, хлоромисонидазол/CIMISO, тосилат/TSo, 5-хидроксипентанал (хидролизирана форма на групата што заминува, 2-tetrahydropyranyl (THP)), хидролизиран NITTP, метронидазол и други не-карактеризирани поларни соединенија. За овие онечистувања не се достапни референтни стандарди, освен за NITTP. Eu.Ph. има пропишано максимален дозволен лимит за кое било друго хемиско онечистување (анг. Any other impurity), како и за вкупните онечистувања.

Табела 3. Потенцијални радиохемиски и хемиски онечистувања при синтеза на [¹⁸F]FMISO

Table 3. Potential radiochemical and chemical impurity after [¹⁸F]FMISO synthesys

Опис на онечистување (синоним/опис во објавената литература/стандардна кратенка)	Молекулска маса (g/mol)	IUPAC име
[¹⁸ F]Флуорид/[¹⁸ F-]	18.99	Fluoride
Нехидролизирани [¹⁸ F]FMISO интермедиери)	n.a.	[¹⁸ F]fluorinated intermediate
Флуоромисонидазол/FMISO	188.15	1-fluoro-3-(2-nitroimidazol-1-yl)propan-2-ol
Десметилмисонидазол/DMM	187.15	3-(2-nitroimidazol-1-yl)propane-1,2-diol
Мисонидазол/MISO	201.18	1-methoxy-3-(2-nitroimidazol-1-yl)propan-2-ol
Хлоромисонидазол/CIMISO	205.6	1-chloro-3-(2-nitroimidazol-1-yl)propan-2-ol
Тосилат/TSo	171.2	4-methylbenzenesulfonate
5-хидроксипентанал	102.13	5-hydroxypentanal
NITTP/[¹⁸ F]FMISO прекурсор	425.5	[3-(2-nitroimidazol-1-yl)-2-(oxan-2-yloxy)propyl] 4-methylbenzenesulfonate
Хидролизиран NITTP	197.19	2-nitro-1-phenylpropane-1,3-diol
Метронидазол	157.13	2-(5-nitroimidazol-1-yl)ethanol
Не-карактеризирани поларни соединенија	n.a.	Un-characterized labeled polar byproduct
Етанол/Етил алкохол/EtOH	46.08	Ethanol
Ацетонитрил/Метил цијанид/MeCN	41.05	Acetonitrile

На слика 10 се претставени структурите на некои онечистувања дадени во табела 3 (извор: PubChem).



Слика 10. Структура на молекулите на потенцијални онечистувања во $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ раствор (извор: PubChem)

Figure 10. $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ potential impurities structures (source: PubChem)

2.11. $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ наспроти $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

Најшироко употребуван ^{18}F -радиофармацевтик за различни типови на тумори е $[^{18}\text{F}]\text{флуородеоксиглукоза}$ ($2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-deoxy-D-glucose}$, со кратенка $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$), па токму поради тоа често се нарекува и „молекула на милениумот“ во ПЕТ. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ зазема главна клиничката примена во онкологијата и се

употребува не само за дијагноза, туку и за планирање на третман или одговор на терапија.

Од клиничка гледна точка, во некои студии [^{18}F]FDG е предложен како можен РФП за хипоксични тумори и е споредуван со [^{18}F]FMISO. Тоа се заснова на теоретските сознанија дека во услови кога нивото на кислород опаѓа, се зголемува навлегувањето на гликоза во клетката, а со тоа се зголемува и клеточниот метаболизам на оксидативна фосфорилација до гликолиза (Wang et al., 1995). Но и покрај оваа добро проучена и карактеризирана врска, објавени се спротивни резултати добиени со претклинички и клинички испитувања (Zimny et al., 2006; Dierckx et al., 2008; Nehme et al., 2021). Тие укажуваат на тоа дека [^{18}F]FDG не може да се смета како конзистентен РФП на хипоксија кај тумори, туку само може да се комбинира со [^{18}F]FMISO за подобро следење на терапијата.

Од аспект на производство, синтезата на [^{18}F]FMISO е слична со синтезата на [^{18}F]FDG и се одвива механизам на нуклеофилна супституција. Според тоа, за синтеза на [^{18}F]FMISO може да се користи ист модул кој се користи за синтеза на [^{18}F]FDG, а неговата секвенца за синтеза може да се модифицира согласно со условите и реакциите потребни за синтезата на [^{18}F]FMISO. Генерално, истите фактори кои имаат влијание врз ефикасноста на синтезата на [^{18}F]FDG се очекува да влијаат и на синтезата на [^{18}F]FMISO. Покрај тоа, за нашето истражување голема предност во проценката и изборот на параметри за анализа придонесе нашето претходно искуство и истражување за евалуација на фактори со потенцијално влијание на радиохемискиот принос на [^{18}F]FDG („Evaluation of factors with potential influence on [^{18}F]FDG radiochemical synthesis yield“), каде што дискутиравме неколку фактори кои доведуваат до нестабилност во приносот од синтеза (Chochevska et al., 2023).

3. Цел на трудот

Основна цел на ова истражување е да се развие целосно ефикасен едноставен автоматизиран метод за синтеза на [^{18}F]Флуоромисонидазол со модификација на стандардниот начин на прочистување на финалниот производ. Односно, наместо прочистување преку HPLC единица да се примени метод со SPE прочистување на постоечки модул за синтеза на [^{18}F]FDG. Преку овој метод на прочистување да се овозможи целосно автоматизирање на процесот на синтеза, скратување на времетраењето на синтезата, повисок принос на финалниот производ и да се избегне манипулација за време на процесот за синтеза што особено е важно во производството на ПЕТ радиофармацевтици, особено од аспект на радијациска заштита. За да се исполни оваа цел од докторската дисертација беше потребен развој на методологија за синтеза и контрола на квалитет на [^{18}F]Флуоромисонидазолот како финален производ.

Целта се реализираше преку:

- ✓ Креирање и оптимизација на секвенца за автоматска синтеза (избор, дизајн, функционирање и соодветно работење на сите одделни фази од зададена шема на командни активности);
- ✓ Оптимизацијата на процесот за синтеза на [^{18}F]FMISO во следните точки:
 - а) оптимизација на синтеза на [^{18}F]FMISO преку изведување на синтеза на [^{19}F]FMISO;
 - б) оптимизација на параметри пред реакција на радиофлуоринација, тоа се: влијание на почетна активност на [^{18}F]F⁻, типот на кертриџот за заробување на [^{18}F]F⁻, растворот на катализаторот за фазна трансформација во апротичен растворувач;
 - в) оптимизација на условите во реакцијата на радиофлуоринација, а тоа се: концентрација односно маса на прекурсор растворена во ацетонитрил, температура и времетраење на реакцијата на радиофлуоринација;
 - г) оптимизација на условите во реакцијата по радиофлуоринација, тоа се: времетраење на сушење за евапорација на ацетонитрилот, температура и времетраење на реакцијата на хидролиза, волумен на растворот за хидролиза;
 - д) други услови кои имаат влијание врз синтезата;

- ✓ Оптимизација на начинот на прочистување (влијание на разни типови на кертриџи во прочистувањето):
 - а) начинот на спроведување и механизмот на прочистувањето со SPE кертриџите;
 - в) типот и улогата на кертриџите кои ќе се применат за финалното прочистување на продуктот;
- ✓ Контрола на квалитет на [¹⁸F]FMISO, верификација на аналитичките методи и тест за стабилност.

4. Материјали и методи

4.1. Материјали

За синтеза: радиоизотоп $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ произведен со течен таргет на 99,8 % збогатена вода H_2^{18}O (NUKEM Isotopes, Germany). Касета за синтеза и прекурсор за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{Fluoromisonidazole}$ (1H-imidazole-1-propanol, 2-nitro- β -[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-, 4-methylbenzenesulfonate (ester)) со чистота $\geq 95\%$ се купени од ABX (Radeberg, Germany). Поради специфичноста на касетата за синтеза другите реагенси потребни за синтеза се пакувани во УИ ПЕТ во соодветни шишенца: стаклено шишенце, 11 mm Crimp Top Vial со капацитет 4 mL со 11 mm капачиња за затворање на шишенца (Thermo Fisher Scientific Scietific, Германија); стаклено шишенце, 13 mm Crimp Top Vial со капацитет 10 mL со 13 mm капачиња за затворање на шишенца (VWR, Австрија).

Од реагенси за синтеза беа користени: вода за инјекции (Алкалоид АД, Скопје), криптофикс 222, за синтеза со чистота $\geq 99,0\%$ (4,7,13,16,21,24-hexaоха-1,10-diazabicyclo [8.8.8]-hexacosan и калиум карбонат со чистота $\geq 99,0\%$ ACS од Sigma-Aldrich (Missouri, United States); 0,1 M хлороводородна киселина (Carlo Erba, France) и етанол апсолутен со чистота $\geq 99,8\%$ (V/V) (Алкалоид АД, Скопје).

Од анјон-изменувачки кертрици за задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ беа користени:

- ✓ QMA- Cl^- кватернерен амониум анјон-изменувачки кертриц со силикатен сорбент со полнење 130 mg и јон за изменување хлорид - Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light и QMA- CO_3^- анјон-изменувачки кертриц со силикатен сорбент со полнење 130 mg и јон за изменување карбонат - Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light (Waters, United States);
- ✓ PS- OH^- анјон-изменувачки кертриц со кополимер од дивинилбензен и полистирен, кертриц (PS/DVB) со силни анјон-изменувачки карактеристики со јон за изменување хидроксид - SPE cartridges, CHROMAFIX PS- OH^- (Macherey-Nagel, Germany).

За прочистување беа користени:

- ✓ SPE катјон-изменувачки кертриц со силикатен сорбент, со полнење 600 mg - Maxi-Clean SCX и SPE јоноизменувачки кертриц со сорбент на стирен дивинилбензен - Maxi-Clean IC- H^+ (S*Pure, Singapore);
- ✓ SPE кертриц со кополимер од полистирен и дивинилбензен (PS/DVB) со полнење 175 mg - CHROMAFIX PS-RP (Macherey-Nagel, Germany);

- ✓ SPE кертриџ со кополимер од дивинилбензен и винил пиролидинон, за реверзно-фазна кестрација, со полнење 225 mg - *Oasis HLB Plus LP*; SPE кертриџ со кополимер од дивинилбензен и винил пиролидинон за реверзно-фазна кестрација, со полнење 30 mg - *Oasis HLB Light*; SPE кертриџ со C18 полнење 400 mg - *Sep-Pak Plus Short tC18*; SPE кертриџ со C18 полнење 820 mg - *Sep-Pak Plus C18 Environmental* и SPE кертриџ со C18 полнење; (Waters, United States);
- ✓ SPE кертриџ со базна површина од алуминиум оксид со полнење 280 mg *Sep-Pak Alumina B Plus Light Cartridge* и SPE кертриџ со неутрална површина од алуминиум оксид со полнење 280 mg *Sep-Pak Alumina N Plus Light Cartridge* (Waters, United States).

Други материјали потребни во процесот на синтеза на [¹⁸F]FMISO:

- ✓ физиолошки раствор (0,9 % NaCl) (Алкалоид АД, Скопје),
- ✓ стерилен 0,22 µm филтер (Waters, United States),
- ✓ стерилно шише (BTC Medical Comecer, Italy),
- ✓ стерилен триделен шприц, 10 mL (BB Braun, Germany),
- ✓ хелиум гас (Messer, Macedonia).

За делење на дози користен е кит за делење на дози Clio (BTC Medical Comecer, Italy).

За контрола на квалитет на [¹⁸F]FMISO беа користени:

- ✓ Референтен стандард флуороимидазол (Fluoromisonidazole, FMISO) и референтен стандард десметилмисонидазол (Desmethylmisonidazole, DMM) со чистота ≥ 95,0 % од ABX (Radeberg, Germany);
- ✓ За метод HPLC се користени: ацетонитрил, 99.9+%, HPLC for gradient analysis, from Thermo Scientific (Geel, Belgium); вода тип 1 (Direct Q3, Millipore, United States); трифлуоро-оцетна киселина (TFA) за HPLC со чистота ≥ 99,5 % (Carlo Erba, France); колона за HPLC RP со C18 полнење базирано на хибридна технологија XTerra Shield RP18 Column, end-capped polar-embedded octadecylsilyl amorphous organosilica polymer, со должина 250 mm, дијаметар 4.6 mm, големина на честици 5 µm (Waters, USA);

- ✓ LAL кертиц (Charles River Laboratories, United States); LAL вода без пирогени (Lab Chem, Germany);
- ✓ за TLC методот: силика гел TLC плочи (Macherey-Nagel, Düren, Germany) и истите плочи (силика плоча 1.5 cm широчина 9 cm должина) за квалитативен тест со Kryptofix®222;
- ✓ pH ленти 4,5-10,0 (Merck, Darmstadt Germany).

4.2. Методи

4.2.1. Производство на радиоизотоп [^{18}F] F^-

Радиоизотопот во форма на флуорид [^{18}F] F^- беше произведен во Универзитетски институт за позитронско емисиона томографија - УИ ПЕТ, Скопје. За производство на [^{18}F] F^- беше користен циклотрон PET GeTrace 800 (GE Healthcare, United States). Метата беше наполнета со 3 mL течен таргет - вода збогатена со кислород-18 (H_2^{18}O) (NUKEM isotopes, Alzenau, Germany), што претставува течен медиум за озрачување. Озрачувањето се вршеше со јачина на струја од 40 mA, а времето на озрачување кое зависи од потребната појдовна количина на активност на [^{18}F] F^- се движеше во рамки од 15 до 30 минути. Количина на активност на [^{18}F] F^- која беше произведена и користена во оваа студија беше во опсег од 5 до 56 GBq.

4.2.2. Синтеза на [^{18}F] FMISO

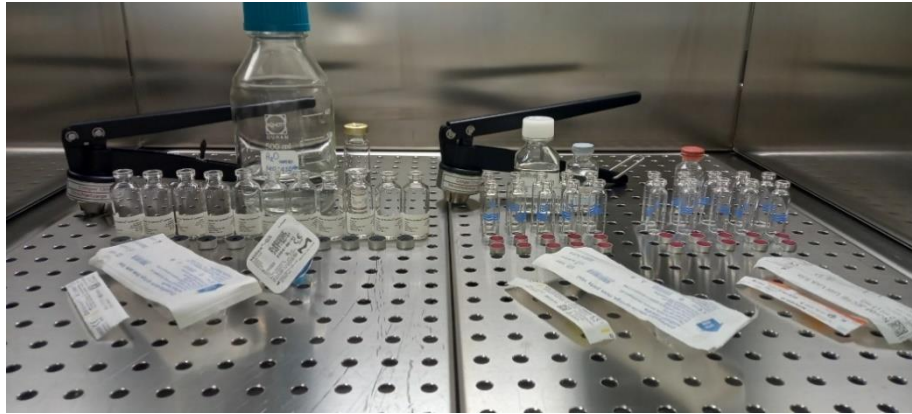
За производство на [^{18}F] FMISO беа користени: оловен кабинет за синтеза (Comeser, Italy) и модул за синтеза Synthera V2 (IBA, Belgium). За подготовка на реагенсите и китот за синтеза беше користена ламинарна комора FHR-SSC (Comeser, Italy). За мерење на почетната активност на [^{18}F] F^- беше користен дозен калибратор ViK 202 (Comeser, Italy) инсталиран во оловниот кабинет.

На слика 11 е претставен оловниот кабинет, модулот за синтеза (слика 11, бр. 2) и сите други составни делови потребни за синтеза (конусно шише за појдовен раствор од [^{18}F] F^- (анг. Collection V-vial) (слика 11, бр. 1); касета за синтеза монтирана на модулот (слика 11, бр. 3), оловен контејнер со шише за отпадната вода (Recovery water vial) (слика 11, бр. 4); оловен контејнер со шише за отпаден раствор т.е. раствор на елуирани онечистувања по заробување на [^{18}F] FMISO (Waste vial) (слика 11, бр. 5) и компјутер со софтвер за управување на модулот за синтеза (слика 11, бр. 6).



Слика 11. Оловен кабинет со сите составни делови потребни за синтеза
Figure 11. Synthesys hot cell with all parts for synthesys

Реагенсите потребни за синтеза беа подготвени во една од производните лаборатории во ЈЗУ УИ ПЕТ во ламинарна комора. По подготовката на растворите тие се спакувани во соодветните шишенца и се чувани на собна температура. На слика 12 се прикажани сите потребни материјали и тоа: растворите на реагенсите, шишенца, капачиња за затворање, затворачи за шишенцата, шприцеви, филтри за стерилизирање, игли.



Слика 12. Подготовка на реагенси за синтеза во ламинарна комора
Figure 12. Synthesis reagent preparation in laminar hood

Прекурсорот NITTP (во лиофилизирана форма) мора да се чува на контролирана температура од $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и се раствора непосредно пред почетокот на радиосинтезата, а на касетата за синтеза се прикачува заедно со останатите реагенси. Пред почетокот на синтезата кертриџот за заробување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^{-}$ и кертриците за прочистување беа соодветно подготвени (кондиционирани). Анјон-изменувачкиот кертриџ беше прикачен на првата позиција наменета на него, два од кертриците за прочистување беа прикачени на втората позиција (зад кертриџот за прочистување на радиоизотоп) наменета за нив, додека еден кертриџ за прочистување беше позициониран надвор од касетата, поставен на излез од трансфер линијата. На слика 13 е прикажана касетата за синтеза со прикачени реагенси и кертриџи.

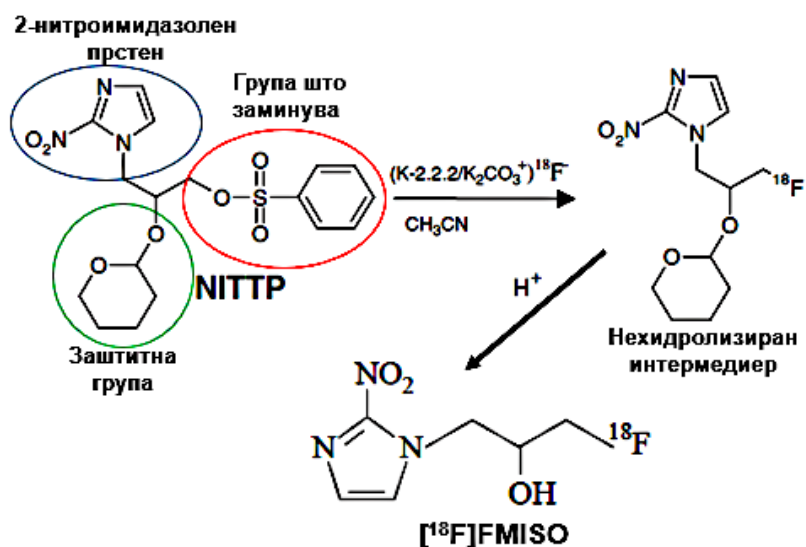


Слика 13. Монтирана касета со прикачени реагенси и кертриџи
Figure 13. IFP cassette with attached reagent and cartridge

Пред почеток на синтезата беа направени сите потребни тестови за верификација на исправноста на касетата и модулот препорачани од производителот.

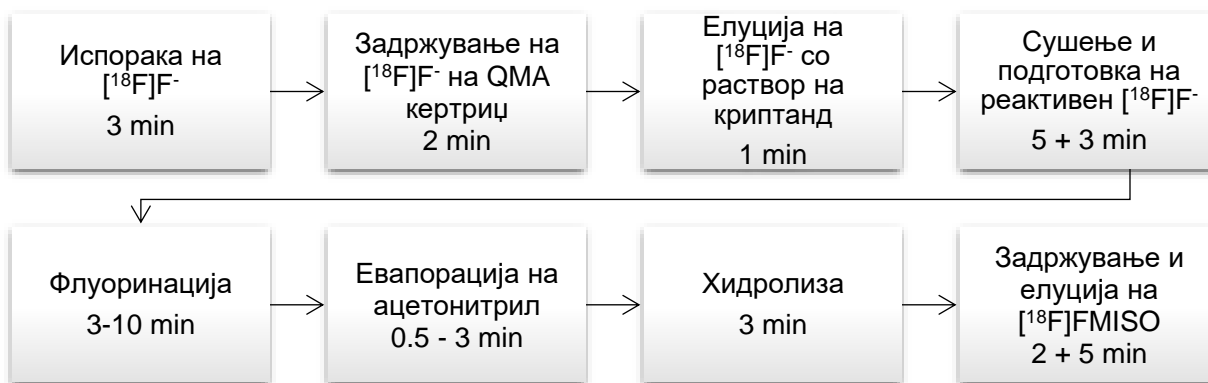
Откако сите овие подготовки беа завршени, следниот чекор беше трансферирање на произведениот раствор на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (3 mL) од циклотронот до конусното шише за појдовен раствор од $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Откако се испорача растворот беше започната синтезата преку автоматски режим на претходно одбраната секвенца за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. Првиот чекор од секвенцата е трансфер на целиот раствор од $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ преку анјон-изменувачки кертриџ до шишето за отпадна вода со цел задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ анјонот на анјон-изменувачкиот кертриџ, а со тоа и прочистување на растворот од сите хемиски и радионуклидни онечистувања кои потекнуваат за време на озрачувањето. Задржаните $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ анјони во следниот чекор беа елуирани во реакционото шише со раствор за елуција (раствор на криптанд и калиум карбонат во смеса од вода и ацетонитрил). Следниот чекор беше азеотропна дестилација односно сушење и подготовка на реактивен $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ под инертен гас на хелиум, на 110 °C. Подготвената безводна смеса на $[^{18}\text{F}]\text{флуорид}/\text{K}_2.2.2/\text{K}_2\text{CO}_3$ е главниот реактант во понатамошната радиофлуоринација преку $\text{S}_\text{N}2$ нуклеофилна супституција. По сите чекори од сушење, во реакционото шише беше додаден прекурсорот NITTP растворен во безводен ацетонитрил и беше започнато радиофлуорирањето со загревање на реакционата смеса во зададено време. Во оваа реакција реактивниот $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ја заменува тосилатната група од прекурсорот (група што заминува) и се формира интермедиерно нехидролизирано соединение. Пред да започне хидролизата, реакционата смеса накратко беше изладена, па испарена (евапорирана). Испарувањето беше извршено со загревање на смесата и евапорација на ацетонитрилот под инертен гас на хелиум. Потоа беше спроведена хидролизата со раствор на HCl. Во оваа реакција беше извршена хидролиза на заштитната група (тетрахидропиранилна група) од интермедиерно нехидролизирано соединение формирајќи финален производ на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ со примеси на повеќе онечистувања како последица на сите овие реакции. Затоа следниот чекор беше прочистување на смесата од формираните онечистувања и добивање на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ инјекционен раствор кој ги задоволува барањата на Eu.Ph. За таа цел смесата беше трансферирана низ кертриџите за

прочистување до шишето за отпаден раствор. [¹⁸F]FMISO беше задржан на реверзно-фазниот кертриџ, додека онечистувањата делумно се задржани на преостанатите кертриџи и/или се елуирани во отпадниот раствор. Хемиските реакции кои се одвиваат за време на овие чекори се претставени на слика 14.



Слика 14. Синтеза на [¹⁸F]FMISO
Figure 14. [¹⁸F]FMISO synthesis reaction

Последниот чекор беше елуирање на задржаниот производ ([¹⁸F]FMISO) од кертриџите со промивање на кертриџите со 5 % етанолен раствор во вода. Елуатот претставува финален раствор на [¹⁸F]FMISO којшто беше испорачан во стерилно шише во кои претходно имавме додадено физиолошки раствор. Активноста на произведениот [¹⁸F]FMISO беше измерена со VIK 202 калибратор за активност (Veenstra, Comeseg Холандија). Приносот беше пресметан врз основа на активноста на произведениот [¹⁸F]FMISO во GBq изразен како процент (%) од појдовната активност (EOB), коригирана за распад (d.c.). На слика 15 сите овие чекори се претставени шематски за полесна следливост на процесот на синтеза со времето кое е потребно за нивно извршување. Вкупното време за извршување на процесот на синтеза на оптимизираниот метод беше 40 минути.



Слика 15. Шематски приказ на процесот за $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ синтеза
Figure 15. Schematic representation of $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ synthesis process

4.2.3. Креирање и оптимизација на секвенца за автоматска синтеза

За да може да се изврши автоматската синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, потребно е задавање на командни активности од претходно креирана и верификувана секвенца за синтеза. Таквата секвенца е наменета само за синтеза на посакуваниот производ. Познавајќи ја потребата за реакциите врз основа на објавената литература беше направен избор на чекори потребни за синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ и беше дизајнирана секвенцата. Како што е наведено во точка 2.12. синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ се одвива на сличен начин како и $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, па затоа за поедноставување и скратување на времето за креирање на секвенцата како основа беше земена секвенцата од $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ и е направена модификација во потребните чекори.

По креирањето на новите чекори и/или промена на постојните, направена е промена и во дизајнот на интерфејсот кој треба да се појавува по избор на секвенцата за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.

За понатамошна употреба на ова секвенца беше направена повеќекратна проверка на функционирањето на секвенцата за соодветно работење на сите одделни фази од зададената шема на командни активности.

4.2.4. Оптимизацијата на процесот за синтеза

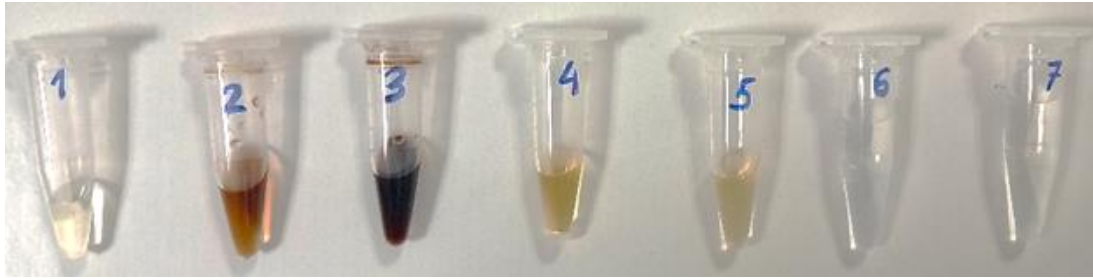
За да можеме да го потврдиме методот на синтеза и да го валидираме процесот на синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, потребно е оптимизирање на сите чекори од процесот за синтеза со цел да се најдат оптимални услови за постигнување на ефикасна синтеза и квалитетен производ.

Со цел да го проследиме процесот по реакции (чекори) во нашето истражување, освен синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ направена е и синтеза на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$. Кога работиме со јонизирачко зрачење, од клучно значење е безбедноста на операторот. Како резултат на тоа, процесот на синтеза за $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ се одвива со автоматизирани модули во затворени оловни кабинети. Според тоа за време на радиосинтезата е оневозможено земање на контролни примероци од реакционата смеса. За да можеме да ја анализираме синтезата по чекори и подобро да го разбереме процесот на синтеза ние сакавме да ги проследиме хемиските интермедиери со синтеза на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ којашто како појдовен раствор користи раствор на стабилен изотоп $[^{19}\text{F}]\text{F}^-$ наместо $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$.

Натриум флуорид беше употребен како почетен раствор со многу поголема концентрација (2 mg/ml) од онаа концентрација на флуориди во радиоактивниот раствор бидејќи при тест синтеза на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ спроведена со иста концентрација од 4 ppm на почетен раствор на флуориди како во почетниот раствор во синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, флуорирањето беше неуспешно.

Преку овој пристап синтезата се одвиваше со отворена врата, а со тоа беше овозможено земање на микропримероци од реакционото шише за време на автоматската синтеза. Слика 16 ги прикажува сите примероци вклучени во ова студија, а тие беа собрани во следните чекори:

- 1 – пред радиофлуоринација (по првата минута од трансферот на прекурсорот во реакционото шише),
- 2 – за време на радиофлуоринација (пет минути по започнувањето на реакцијата),
- 3 – на крај од радиофлуоринација (по 10 мин. од нехидролизирана реакциона смеса),
- 4 – по евапорација на ацетонитрилот (пред хидролиза),
- 5 – на крајот од хидролиза (хидролизирана и непочистена смеса),
- 6 – финален прочистен раствор на производот и
- 7 – примерок од шишето за отпад (раствор на елуирани онечистувања по заробување на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$).



Слика 16. Примероци земени за време на синтеза на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$
Figure 16. Samples included in the study with $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ synthesis

За целокупното истражување направени се повеќе од 40 синтети на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ и 3 синтети на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$.

Оптимизацијата на синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ ги опфати следните параметри:

- а) почетни услови во реакцијата пред радиофлуоринација, тоа се:
 - ✓ почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$;
 - ✓ типот на анјон-разменувачкиот кертриџ за заробување на $^{18}\text{F}[\text{F}^-]$;
 - ✓ растворот за елуција на $^{18}\text{F}[\text{F}^-]$;
- б) условите во реакцијата на радиофлуоринација, тоа се:
 - ✓ маса на прекурсор;
 - ✓ температура на радиофлуоринација;
 - ✓ времетраење на реакцијата на радиофлуоринација;
- в) условите во реакцијата по радиофлуоринација, тоа се:
 - ✓ времетраење на евапорација на ацетонитрил;
 - ✓ растворот за хидролиза;
 - ✓ температура на хидролиза;
 - ✓ времетраење на реакцијата на хидролиза;
- г) други услови кои имаат влијание врз синтезата.

4.2.4.1. Влијание на почетни услови во реакциите пред радиофлуоринација

Почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ со која најчесто беа изведени голем дел од синтезите беше $20 \text{ GBq} \pm 10 \%$. Направени се синтети со активност од $5 \text{ GBq} \pm 5 \%$ и со активност од $60 \text{ GBq} \pm 10 \%$.

Влијанието на анјон-разменувачкиот кертриџ врз задржувањето на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ беше испитано преку употреба на три различни кертриџи, и тоа:

- ✓ кватернерен амониум анјон-изменувачки кертриџ со јон за изменување

хлорид (QMA-Cl⁻);

- ✓ кватернерен амониум анјон-изменувачки кертриџ со јон за изменување карбонат (QMA-CO³⁻);
- ✓ анјон-изменувачки кертриџ со кополимер од дивинилбензен и полистирен (PS/DVB) со јон за изменување хидроксид (PS-OH⁻).

Анјон-изменувачките кертриџи беа кондиционирани на следниов начин:

QMA-Cl⁻ - со 5 mL NaHCO₃ и со 5 mL стерилна вода;

PS-OH⁻ - со 5 mL NaHCO₃ и со 5 mL стерилна вода;

QMA-CO³⁻ - со 5 mL вода за инјекции.

Јонот на изменување на сите три кертриџи по кондиционирањето е карбонат.

Влијанието на растворот за елуција на [¹⁸F]F⁻ е испитано преку промена на соодносот на ацетонитрил и вода во растворот на криптанд (22 mg Kryptofix 2.2.2. (58 μmol), 4.2 mg K₂CO₃ (30 μmol)) којшто претставува раствор за елуција на [¹⁸F]F⁻.

Подготвени беа три различни раствори и тоа:

- ✓ Раствор на криптанд 1 (Cryptand 222-1): ACN : H₂O = 1 : 1;
- ✓ Раствор на криптанд 2 (Cryptand 222-2): ACN : H₂O = 1 : 4;
- ✓ Раствор на криптанд 3 (Cryptand 222-3): ACN : H₂O = 1 : 8.

Оваа анализа е направена врз основа на мерења за резидуална активност на анјон-изменувачкиот кертриџ по 8-18 часа од завршувањето на синтезата како и врз основа на одредување на влијанието на овие три раствори врз приносот од реакцијата.

4.2.4.2. Влијание на условите во реакција на радиофлуоринација

Испитани беа трите клучни фактори кои влијаат на радиофлуоринацијата а со тоа и на ефикасноста на синтезата односно приносот на финалниот производ. Тоа се:

- ✓ концентрација односно маса на прекурсорот растворен во ацетонитрил (ACN): 2.5 mg во 2 mL ACN; 5 mg во 2 mLmL ACN; 5 mg во 1 mLmL ACN и 10 mg во 2 mLmL ACN;
- ✓ температура на радиофлуоринација: 100 °C, 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140°C;
- ✓ времетраење на реакцијата на радиофлуоринација: 3, 5, 7, 10 минути.

Направена е сеопфатна анализа на влијанието на овие три клучни параметри врз приносот од реакцијата.

4.2.4.3. Влијание на условите во реакцијата по радиофлуоринација

Влијанието на условите во реакцијата по радиофлуоринација, кои беа испитувани се:

- ✓ чекорот на сушење (испарување) на ацетонитрилот: без сушење и со сушење со промена на времетраење на евапорација на ацетонитрилот од минимум 60 секунди до максимум 180 секунди;
- ✓ температура за хидролиза: 90 °C, 100 °C, 110 °C, 120 °C;
- ✓ времетраење на реакцијата на хидролиза: 1, 2 и 3 минути;
- ✓ волумен и концентрација на растворот за хидролиза (HCl):
2 mL или 4 mL на 0,1 M HCl и 4 mL на 0,05 M HCl.

Влијанието на овие три клучни параметри врз генерирање на онечистувањата и текот на хидролизата беше испитано со анализа на финалните примероци по синтеза со HPLC и TLC метод. Исто така беше направен прекин на автоматската синтеза по хидролиза со цел да се направи подетална анализа на реакционата смеса во однос на напредокот на реакциите и генерирањето на онечистувањата.

4.2.5. Оптимизација на начинот на прочистување

Прочистувањето се одвиваше со примена на метод со SPE кертрици. Врз основа на повеќе автори кои работеле со тој начин на прочистување и нивните добиени резултати во кои е постигнато ефикасно прочистување со употреба на реверзно-фазни и јоно-изменувачки кертрици, во нашите истражувања исто така се искористени овие типови на кертрици.

На слика 17 е претставен шематскиот приказ на начинот на прочистувањето на [¹⁸F]FMISO со SPE кертрици.

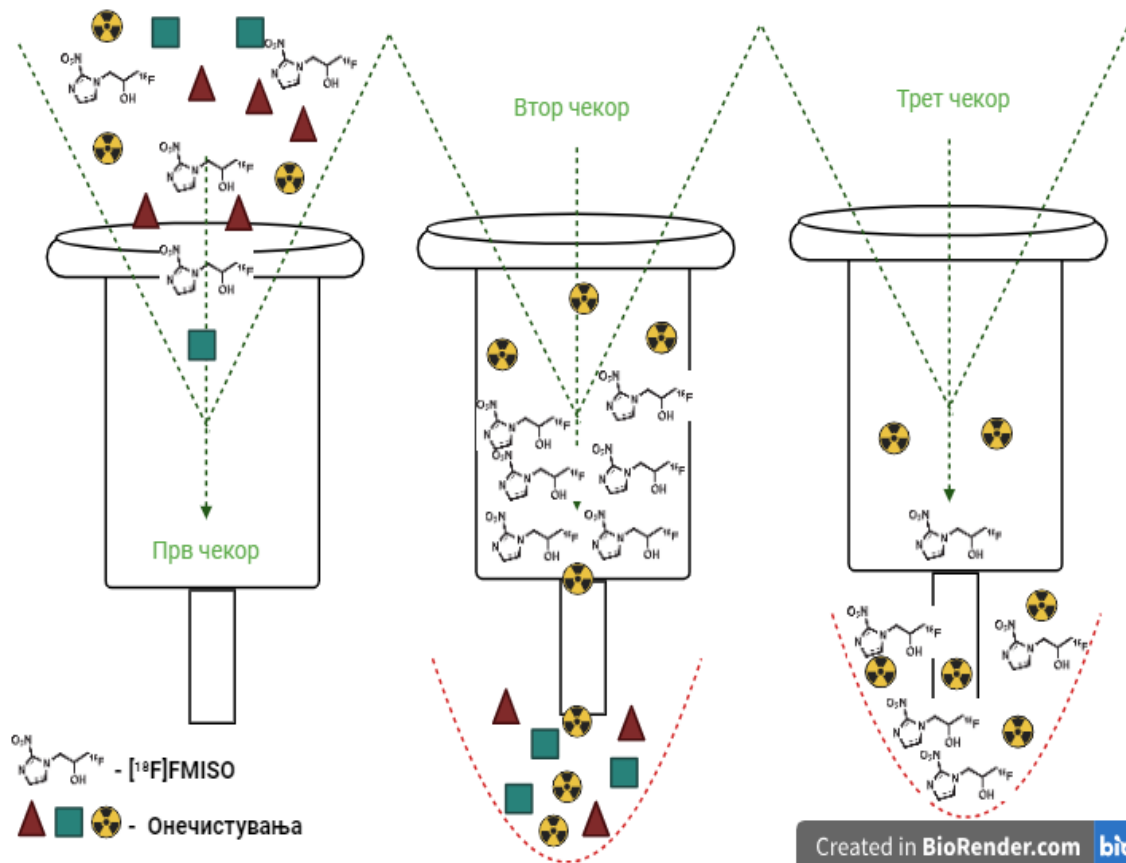
Во *првиот чекор* на прочистување (по реакциите на хидролиза) растворот на финалниот производ беше трансфериран преку силно-катјон изменувачки кертриц и реверзно-фазен кертриц во шише за отпаден раствор.

Во *вториот чекор* на реверзно-фазниот кертриц се задржува финалниот производ [¹⁸F]FMISO, а се елуираат што е можно повеќе хидрофилни молекули

(онечистувањата со поларни својства) особено десмисонидазолот како најзастепено онечистување. Дел од катјонски онечистувања се задржуваат на катјон изменувачкиот кертриџ кој се наоѓа пред реверзно-фазен кертриџ.

Третиот чекор е елуирањето на финалниот производ со раствор за елуција којшто претставува раствор на етанол во вода за инјекции. Испитано беше влијанието на овој раствор (со два различни удели на етанол, 5 % или 10 % раствор) врз процентот на елуција на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.

Елуираниот (прочистен) $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ дополнително поминува преку кертриџ со високоактивна база површина од алуминиум оксид со цел да се задржат неизреагираните анјони на флуорид а потоа преку 0,22 μm филтер за финална стерилизација.



Слика 17. Шематски приказ на начинот на прочистување на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ со SPE кертриџи

Figure 17. Schematic representation of the purification method of $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ with SPE cartridges

За оптимизација на овој начин на прочистување беа користени следните типови на кертриџи за прочистување:

Шест типа на реверзно-фазен кертриџ:

- ✓ Oasis HLB Plus LP (225 mg HLB);
- ✓ Oasis HLB Light (30 mg HLB light);
- ✓ Oasis HLB Light x 2 (30 mg HLB light x 2)
- ✓ CHROMAFIX PS-RP (175 mg PS-RP);
- ✓ Sep-Pak Plus Short tC18 (400 mg tC18);
- ✓ Sep-Pak Plus C18 Environmental (820 mg C18 Environmental).

Два типа на катјон-изменувачки кертриџи:

- ✓ Maxi-Clean SCX (SCX);
- ✓ Maxi-Clean IC-H⁺ (IC-H⁺)

Два типа на алуминиум-оксидни кертриџи:

- ✓ Alumina B Plus Light (ALU B);
- ✓ Alumina N Plus Light (ALU N)

За да се направи проценка на ефикасноста во прочистувањето и компатибилноста на кертриџот во прочистувањето, направени беа неколку дополнителни различни анализи, и тоа:

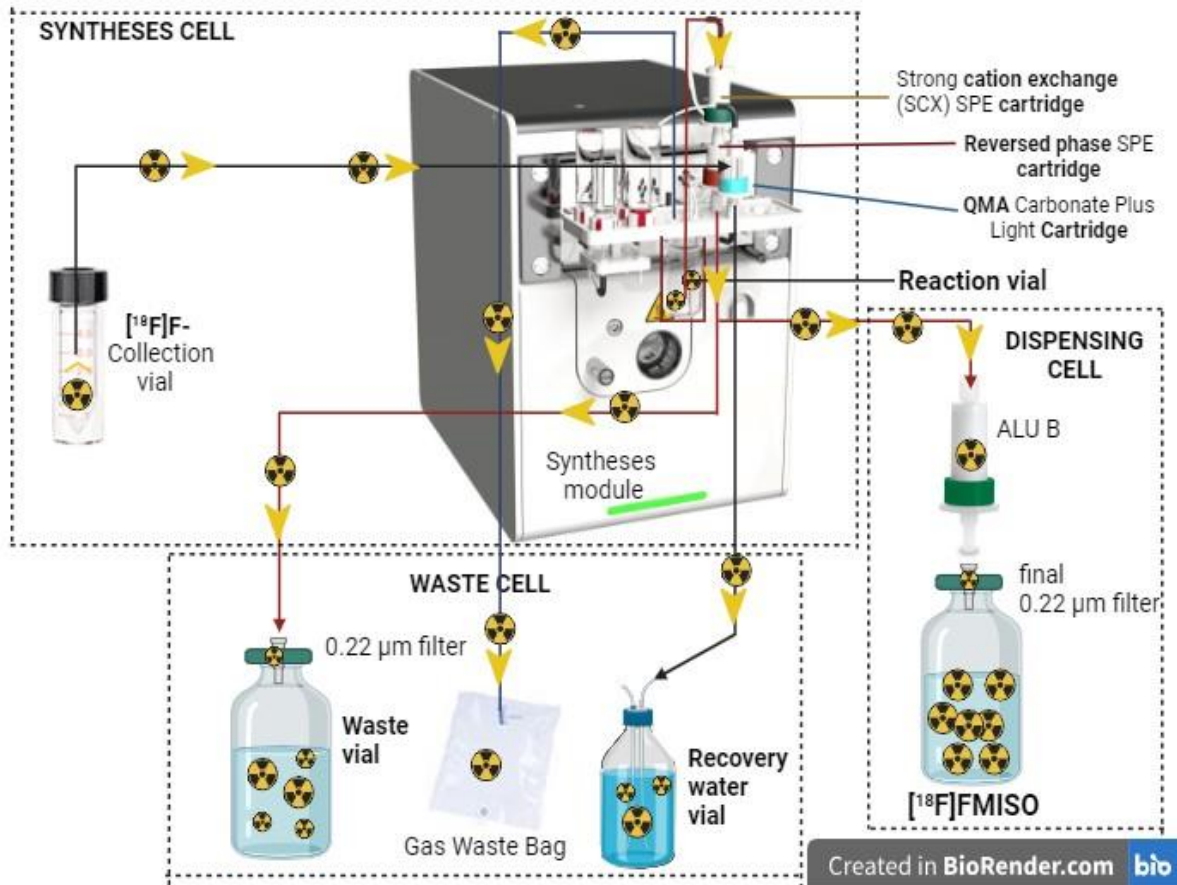
- ✓ Анализирани се примерокот од отпаден раствор со HPLC и TLC метод; Најпрвин е направено мерење за вкупна активност на тој отпаден раствор, а потоа е земен примерок за HPLC и TLC анализа. Од анализираниите примероци на HPLC е направена пресметка за незадржаната (елуираната) активност од [¹⁸F]FMISO производот на реверзно-фазниот кертриџ, како и анализа на елуирани онечистувања. Пресметана е концентрацијата на DMM онечистувањето што се елуира во отпадниот раствор наспрема концентрацијата во финалниот примерок. Со помош на TLC методот е испитано присуството на флуоридните јони и [¹⁸F]FMISO во отпадниот раствор.
- ✓ Измерени се резидуалните активности на сите кертриџи за прочистување по секоја синтеза. Резидуалната активност на сите кертриџи беше измерена 10-15 часа по завршувањето на синтезата (EOS) и коригирана со распаѓање во ЕОВ време. Резултатите се изразени како процент (%) од ЕОВ.
- ✓ Направена е елуција на кертриџите со различни раствори: вода, етанол, 5 % етанол и 10 % етанол. Промииени беа кертриџите по 3-5 часа од завршувањето на синтезата со волумен од 1 до 5 mL со некој од

растворите во зависност од тоа кој кертриџ треба да се испита и од неговата функција во прочистувањето. Оваа анализа е направена само за дел од реализираните синтези (≈ 10 синтези од вкупно 40), за да се намали изложеноста на операторот на јонизирачко зрачење, бидејќи за време на елуцијата на кертриците сè уште имаше радиоактивност.

4.2.5 Други параметри кои имаат влијание на приносот

Како што може да се види од слика 18 и како што е опишано во точка 4.2.2, за време за синтезата, активноста циркулира во три различни оловни кабинети. Од кабинет за синтеза (Synthesis cell) до кабинет за отпад (Waste cell) и до кабинет за делење на дози (Dispensing cell). Во сите тие кабинети активноста беше следена преку детектори за активност инсталирани во сите три кабинети. За време на синтезата течноста доаѓаше во контакт со различни линии, шишенца и кертриџи на коишто заостанува дел од активноста. Таа заостаната активност (резидуална активност) може да влијае на приносот на синтезата, затоа беше мониторирана. За да ја измериме резидуалната активност од почетокот кога активноста започнува да циркулира од конусно шише за појдовниот раствор (анг. [^{18}F]F- Collection V-vial) преку комплексниот систем кој е дел од процесот на синтеза, сè до финалниот производ ние се обидовме да направиме мерења за активноста која заостанува. Активноста беше измерени со дозен калибратор ViK 202 (Comeser, Italy). Измерени беа резидуалните активности од:

- Појдовното шише (V-vial) – тоа шише е сместено во дозен калибратор со цел да се измери активноста која пристигнува пред синтезата. Откако целата активност беше трансферирана преку QMA кертриџот до реакционото шише, беше евидентирана резидуалната активност во V-Vial;
- Шишето за отпаден раствор (Waste vial) со филтерот прикачен на него (0,22 μm filter) беа измерени 1-3 часа по завршувањето на синтезата;
- Шишето за отпадната вода (Recovery water vial), Reaction vial, IFP lines, сите кертриџи беа измерени 10-12 часа по завршувањето на синтезата. Сите измерени активности беа коригирани за распад од EOB времето и во проценти.



Слика 18. Шематски приказ за текот на активноста за време на синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$

Figure 18. Schematic representation of the flow of activity during the synthesis of $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$

4.2.6. Контрола на квалитет на [¹⁸F]FMISO

Контролата на квалитет беше изведена во согласност со монографијата за [¹⁸F]FMISO од Ph.Eur. 10.0 Ph.Eur 10.0, 2459, (01/2014). Во табела 4 е дадена спецификацијата на [¹⁸F]FMISO раствор за инјектирање, прикажана како листа од тестови, методи и критериуми на прифатливост.

Табела 4. Спецификација на [¹⁸F]FMISO раствор за инјектирање
Table 4. Specification of [¹⁸F]FMISO injection

ТЕСТОВИ ЗА ОДОБРУВАЊЕ НА СЕРИЈА ЗА ИНЈЕКТИРАЊЕ		
Тест	Метод	Дозволени гранични вредности
Изглед	Визуелна инспекција	Бистар, безбоен или слабо жолтеникав раствор
Приближна рН вредност	рН ленти	4,5 - 8,5
Идентификација		
Период на полураспаѓање	Радионуклидна чистота	1,75-1,92 часа
Разлика во ретенционо време на FMISO и [¹⁸ F]FMISO	HPLC	≤ 10 секунди
Хемиска чистота		
FMISO	HPLC	≤ 10 µg/mL
DMM	HPLC	≤ 10 µg/mL
Кое било друго онечистување	HPLC	Површината под најголемиот пик од кое било друго онечистување од хроматограмот на примерокот да не биде поголема од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (≤ 10 µg/mL)
Вкупни онечистувања	HPLC	Збирот од површините под сите пикови над границата на отфрлување (0,03 µg/mL) од хроматограмот на примерокот да не биде поголем од 5 x површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (≤ 50 µg/mL)
Криптофикс	TLC тест	Дамката од примерокот е помалку интензивна од референтната
Радиохемиска чистота		
[¹⁸ F]Fluoride	TLC	[¹⁸ F]F во форма на флуорид ≤ 5 % од вкупната активност
[¹⁸ F]FMISO	HPLC	≥ 95 % од вкупната активност
ТЕСТОВИ ЗА ФИНАЛНО ОДОБРУВАЊЕ НА СЕРИЈА		
Бактериски ендотоксини	LAL тест	< 17,5 IU/mL
Стерилност	Тест за стерилност	Стерилен примерок
Радионуклидна чистота	Гама спектрометрија	≤ 0,1 % од вкупната радиоактивност
Резидуални растворувачи		
Етанол	GC-HS	< 250 mg/mL
Ацетонитрил	GC-HS	< 410 µg/mL

Сите тестови, освен бактериски ендотоксини и стерилност, се извршени на сите серии. Бактериски ендотоксини и тест за стерилност се извршени само на три серии.

pH-вредност

Поради дозволеният широк опсег на pH-вредност (4,5 до 8,5 pH единици) вредноста беше одредена со примена на pH ленти со опсег од 4,5 до 10,0 и резолуција од 0,5 pH единици. Направена е споредба на pH вредноста и со употреба на pH метар и е добиена иста вредност. Од безбедносен аспект, одредувањето на pH-вредноста со pH ленти е многу пооправдана, бидејќи се користи максимум 30 μ l за анализа за разлика од волуменот кој е потребен со pH метар.

Идентификација

Идентификацијата беше направена со два теста, период на полураспаѓање за идентификација на [18 F]F и разлика во ретенционо време за идентификација на [18 F]FMISO.

Периодот на полураспад беше испитан на примерок со волумен од 10-100 μ l (во зависност од радиоактивната концентрација) со одбирање на три последователни автоматски мерења на активноста во тек на 30 минути во исти геометриски услови во BIODEx дозен калибратор, модел Atomlab 500.

Периодот на полураспаѓање на примерокот треба да биде во опсег од 105 - 115 минути, односно 1,75 – 1,92 часови, односно отстапувањето од оваа граница да не биде поголемо од 5 %. Скратувањето на периодот на полураспаѓање може да биде резултат на присуството на 13 N радиоизотоп (период на полураспаѓање 10 минути).

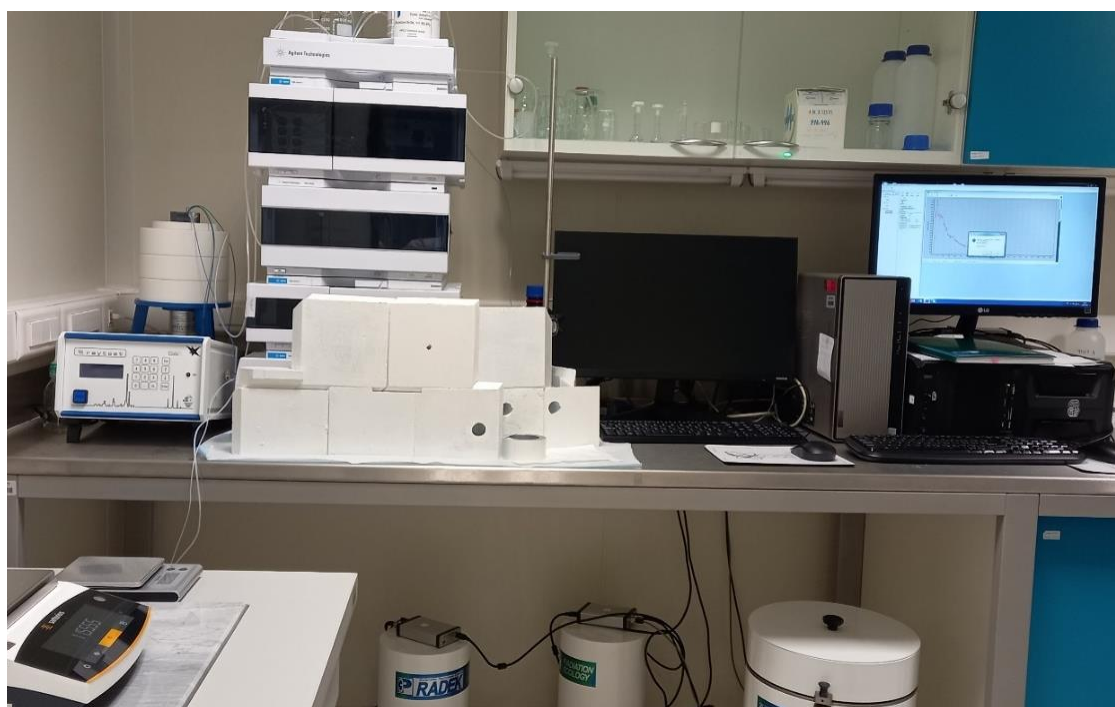
Разлика во ретенционото време беше направена врз основа на HPLC анализата, радиохроматограмот на примерокот и UV хроматограмот на стандардниот раствор. Споредено беше ретенционото време на главниот пик на радиохроматограмот на испитуваниот примерок со ретенционото време на FMISO од VWD хроматограмот на стандардниот раствор.

Хемиска и радиохемиска чистота

Хемиската и радиохемиската чистота беа испитани со HPLC метод. Користен беше Agilent liquid chromatography system (Agilent, Santa Clara, USA) опремен со:

- мануелен инјектор Agilent со Loop 20 μm ,
- кватернерна пумпа-Quaternary Pump (G7111B),
- термостатирана печка за колона (Column oven, G7116A),
- детектор: радиоактивен детектор (Raytest Gabi Star radioactivity detector) - компактен детектор со CsI (TI) сонда, поврзан со Carroll & Ramsey засилувач и VWD детектор (G7114A, Variable Wave Length Detector) сервиски поврзани и
- компјутер со софтвер Gina Software 10.4.

Инструментот што беше користен за нашите анализи е прикажан на слика 19 (лево).



Слика 19. HPLC инструмент - Agilent (лево) и Гама-спектрометар (десно)
Figure 19. Agilent liquid chromatography system (left) and Gamma spectrometry (right)

HPLC колоната беше одбрана согласно со спецификацијата дадена во монографија (end-capped polar-embedded octadecylsilyl amorphous organosilica polymer, со должина 250 mm, дијаметар 4.6 mm, големина на честици 5 μm) и беше користена XTerra Shield RP18 Column, 125 \AA , 5 μm , 4.6 mm x 250 mm.

За сите примероци е користен препорачаниот метод од монографија како во табела 5.

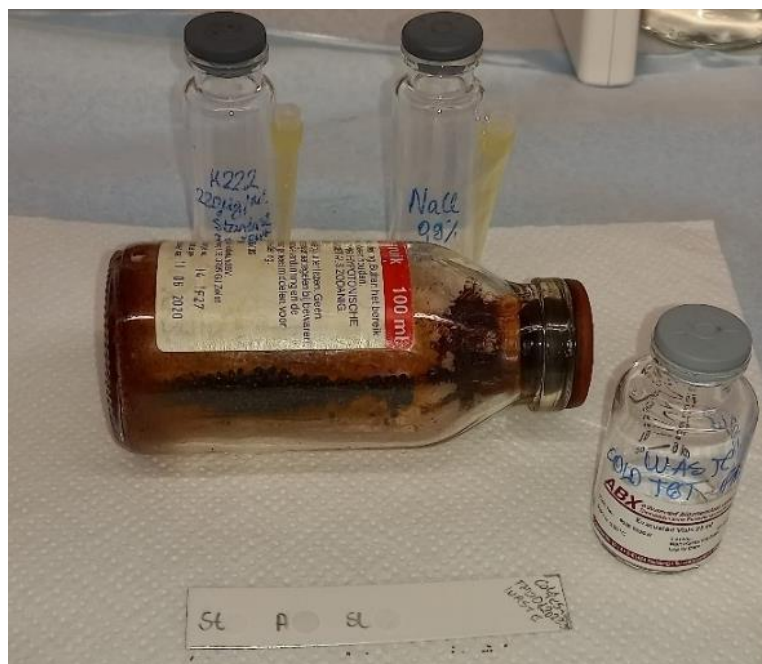
Табела 5. HPLC метод од монографија Ph.Eur. 10.0, 01/2014:2459
Table 5. HPLC method by monograph Ph.Eur. 10.0, 01/2014:2459

Волумен на инјектирање	20 μ L	
Брзина на проток	1 mL/min	
Време за анализа	30 min	
Температура на колона	25 °C	
Градиентен метод на мобилна фаза		
мобилна фаза А: вода; мобилна фаза В: ацетонитрил		
Време (min)	Мобилна фаза А (% V/V)	Мобилна фаза В (% V/V)
0-10	90	10
10-20	90 \rightarrow 5	10 \rightarrow 95
20-30	5	95
Детекција	со спектрофотометриски детектор на 320 nm врзан во серија со радиодетектор	

За испитување на хемиската чистота беше достапен референтен стандард за DMM и FMISO и тие беа испитани со квантитативно определување на концентрацијата на компонентите преку стандардна калибрациска крива или преку споредба на површината под пик на стандардниот раствор и површината под аналогниот пик на примерокот на хроматограмите добиени со VWD детектор. Стандардниот раствор беше анализиран пред секоја анализа на примерокот, како мешавина на FMISO и DMM со иста концентрација од 10 ppm (10 μ g/mL) што претставува максимално дозволена вредност. Според критериумите во монографија Ph.Eur. 10.0, 01/2014:2459, за хемиското онечистување од DMM површината под пикот (AUC) во хроматограмот од примерокот не треба да биде поголема од површината под пикот во хроматограмот од стандардниот раствор (најмногу 10 μ g/mL). За FMISO површината под пикот (AUC) во хроматограмот од примерокот не треба да биде поголема од површината под пикот во хроматограмот од стандардниот раствор (најмногу 10 μ g/mL). Освен за овие две онечистувања во монографијата се наведени и критериуми за прифатливост за останати онечистувања. Всушност, наведен е критериум за кое било друго онечистување (анг. any other impurity) површината под најголемиот пик од кое било друго онечистување од хроматограмот на примерокот да не биде поголема од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (\leq 10 μ g/mL). За вкупни онечистувања збирот од површините под сите пикови над граница на

отфрлување (0,03 $\mu\text{g/mL}$) од хроматограмот на примерокот да не биде поголем од 5 x површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор ($\leq 50 \mu\text{g/mL}$). За оваа пресметка во монографијата има ограничување за тоа кои пикови од хроматограмот на примерокот се сметаат за онечистување односно граница на отфрлување (анг. disregard limit). Граница на отфрлување е површината под пик помала од 0,3 пати од површината под пикот од хроматограмот на FMISO од стандардниот раствор. Тоа значи дека сите тие пикови се занемаруваат во пресметките за вкупни онечистувања.

Криптофиксот (Kryptofix®2.2.2.) е исто така хемиско онечистување кое беше полуквантитативно определено. Користени беа силика гел плочи на кои се аплицираат сите три примероци: стандарден раствор (St), примерок (A) и слепа проба (Sl). На слика 20 е прикажан сетот потребен за анализа: силика гел плоча (со аплицирани примероци), потребни примероци и стаклената комора со јодни кристали.

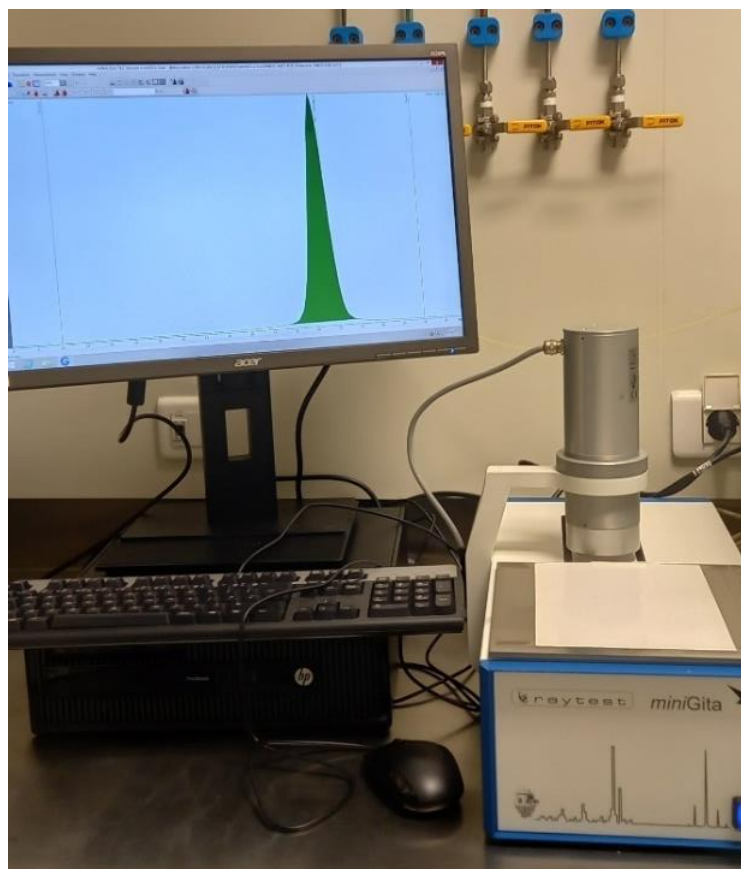


Слика 20. Сет за полуквантитативно определување на криптофикс
Figure 20. A semi-quantitative set for determination of Kryptofix analysis

Стандардниот раствор на криптофикс со концентрација од 0.022 mg/mL (дозволен граници за содржина на криптофикс: $< 22 \mu\text{g/mL}$) беше подготвен користејќи стандард криптофикс. За анализата беа употребени 4 μl од примерокот и по исто толкав волумен од стандардниот раствор и од слепата

проба (физиолошки раствор). По нанесувањето на трите примероци плочата беше поставена во стаклената комора со јодни кристали. Централниот дел на дамката на испитуваниот раствор треба да е помалку интензивен во однос на централниот дел на дамката на стандардниот раствор на криптофикс. Дозволен граници за содржина на криптофикс: $< 22 \mu\text{g/mL}$.

Радиохемиската чистота односно определувањето на процентот од $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ и на процентот од $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ во примерокот беше направено со HPLC и со тенкослојна хроматографија (TLC). За определување на радиохемиската чистота со TLC се користеше Raytest miniGita Star TLC инструмент (Raytest, Germany) со Gina Star TLC програма. Мобилна фаза: вода R : ацетонитрил R (5:95 V/V). Инструментот којшто беше користен за нашите анализи е прикажан на слика 21. За анализата беа употребени 2 μl од примерокот. Откако беше исушена дамката, силика гел TLC плочата беше развиена во мобилна фаза од вода : ацетонитрил (5 : 95 V/V).



Слика 21. TLC инструмент користен за анализа
Figure 21. TLC Raytest miniGita Star used for analysis

Одредување на резидуални растворувачи

За овој тест беше користен инструмент за гасна хроматографија SHIMADZU, модел GC 2010 Plus и Shimadzu автоматски инјектор со капиларно хроматографска колона. Анализата беше изведена согласно со методите дефинирани во 2.4.24 Идентификација и контрола на резидуални растворувачи (Ph. Eur. 10.0, 20424 (01/2017)). Критериумот на прифатливост на етанолот беше дефиниран во монографијата за [¹⁸F]Флуоромисонидазол (Ph. Eur. 10.0, 2459 (01/2014)), бидејќи етанолот е присутен како ексципиент. Концентрацијата на етанол треба да биде помала од 10 % V/V односно помала од 2.5 g на една администрирана доза (од 10 mL). За ацетонитрил границите се исти како што е дефинирано во монографијата за резидуални растворувачи (Ph. Eur. 10.0, 50400 (01/2018)) и концентрацијата треба да биде помала од 410 µg/ml.

Радионуклидна чистота

Радионуклидна чистота беше одредена со гама-спектрометрија со гама спектрометар МКGB-01 RADEK (STC Radek, Russia). Инструментот којшто беше користен за нашите анализи е прикажан на слика 19 (десно). Примерокот беше испитан по 72 часа од завршувањето на производството, бидејќи беше потребен целосен радионуклиден распад на позитронскиот емитер [¹⁸F]F⁻ за да се овозможи детекција на радионуклидните онечистувања. Тестот се изврши преку идентификација на енергијата на детектираниот пик во постоечка база на податоци од софтверот и преку квантификација на тие идентификувани пикови. Најмалку 99,9 % од гама зрачењето треба да потекнува од финалниот примерок на [¹⁸F]FMISO, односно радионуклидните онечистувања треба да бидат помалку од 0,1 % (10-1 %) од вкупната активност во референтно време.

Бактериски ендотоксини

Определувањето на ендотоксини се базираше на употреба на амебоцитен лизат од потковичест рак (*Limulus amoebocyte lysate* - LAL) со користење на апарат Endosafe PTS со колориметриски метод. Принципот на одредување на концентрацијата на бактериски ендотоксини е со хромоген кинетички метод, којшто го мери интензитетот на создадената боја што е пропорционален со концентрацијата на ендотоксини во испитуваниот примерок. Тестот применува касети коишто содржат точно одредена количина на сертифициран LAL реагенс, хромоген супстрат и стандардна концентрација на ендотоксини во контролните

места (бунарчиња) за примерокот. Дозволената концентрација е < 17,5 IU /mL (Ph.Eur. 10.0, 01/2018:20614, 2020).

Тестирање на стерилност

Примероците за стерилност беа доставени до надворешна сертифицирана лабораторија по целосно распаѓање на радиоактивноста. Стерилноста беше испитана според фармакопејската метода Ph.Eur 2.6.1 (Ph.Eur 10.0, 20601 (04/2011)). Тестот за стерилност вклучуваше инкубација на примерок во два различни медиуми за раст: соја дигестивен медиум соодветен за раст на фунги и аеробни бактерии и течен тиогликолатен медиум соодветен за раст на анаеробни бактерии. Медиумите беа инкубирани 14 дена. Критериум на прифатливост: испитуваниот примерок да биде стерилен.

4.2.7. Тест за стабилност на [¹⁸F]FMISO

Друго испитување што беше спроведено е тестот за стабилност на продуктот. Целта беше да докажеме дека [¹⁸F]FMISO ги задоволува барањата за квалитет и безбедност за време на дефинираниот рок на употреба, а рокот на употреба во нашиот случај зависи од времето на полураспаѓање ($T_{1/2}$ на радиоизотопот флуор-18). Исто така, целта ни беше да докажеме дека не настанала радиолиза и други хемиски промени во текот на овој период. Радиолизата може да настане како резултат на радијација, а хемиски промени како последица на интеракциите помеѓу компонентите на радиофармацевтикот со контејнерот во којшто се наоѓа или каква било друга хемиска контаминација. Всушност, со тестот за стабилност се докажува дека радиофармацевтикот ги задржал сите својства и карактеристики кои тој ги поседувал за време на неговото производство со можни варијации во дозволени гранични. Како единствен фактор од надворешната средина што може да има влијание беше температурата. Влажноста не беше земена предвид, бидејќи примероците се полнат во затворени шишенца, а светлината исто така беше исклучена поради тоа што затворените шишенца се чуваат во затворен оловен контејнер и примерокот е заштитен од светлина. Фреквенцијата на тестирање треба да биде доволна за да се утврди профилот на стабилност на радиофармацевтикот и беше дефинирана на секои два часа во рок од десет часа. Тестовите беа спроведени во шест точки: крај на синтеза (0 h), на два часа (2 h), на четири часа (4 h), на шест часа (6 h), на осум часа (8 h) и на десет часа (10 h).

Тестовите за бактериски ендотоксини, стерилност и радионуклидна чистота беа изведени во првата и последната дефинирана точка од студијата за стабилност, односно (0 h) и (10 h). Во сите точки беа испитани рН-вредноста, хемиската и радиохемиската чистота.

Методите за сите овие тестови се изведени на ист начин како што е наведено погоре за секој индивидуален тест.

5. Резултати

[¹⁸F]Флуоромисонидазол како ¹⁸F-радиофармацевтик наоѓа широка клиничка примена за хипоксични тумори. Поради големата клиничка значајност на овој радиофармацевтик развиени се повеќе методи на синтеза со користење на разни модели на модули за синтеза. Нашата цел беше развој и воведување на метод за синтеза на постоечки модул Synthera IBA во производствена лабораторија од УИ ПЕТ.

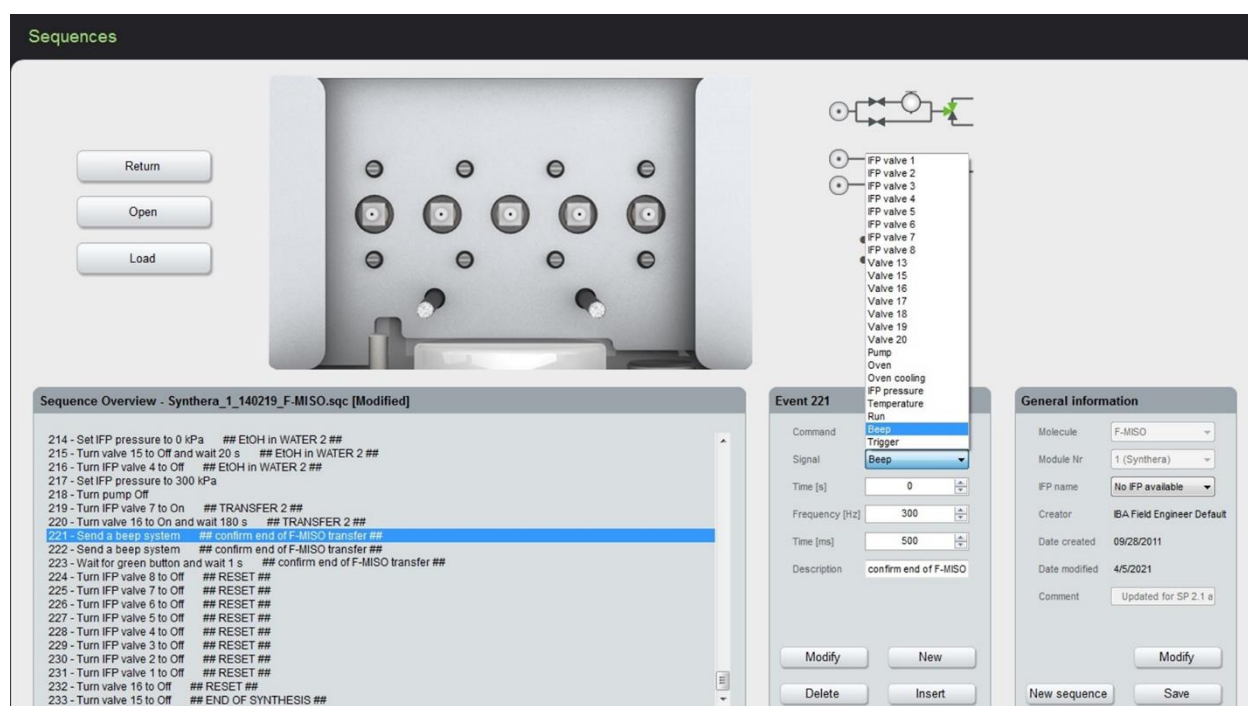
За таа цел, во оваа докторска дисертација беше направен развој и оптимизација преку анализа на влијанието на разни параметри врз финалниот принос и квалитетот на произведениот радиофармацевтик. За да се дефинираат најповолните параметри во процесот на синтезата беа спроведени околу 50 автоматски синтези. Финалниот производ [¹⁸F]FMISO од сите произведени серии беше анализиран за контрола на квалитет. Освен финалниот примерок паралелно беше испитуван и примерок од отпадниот раствор. Собраните резултати беа анализирани со основните статистички методи за аналитички цели. Како статистички параметар што најчесто се употребува за опишување на сите својства добиени од повеќе експериментални мерења беше користена средната вредност добиена од серија повторени мерења. Расејувањето пак на резултатите беше изразено преку стандардната девијација. Исто така беше користена математичка статистика со метода на најмали квадрати, односно регресиона анализа за конструирање на крива на калибрација.

5.1. Оптимизација на секвенца за автоматска синтеза

Како што е наведено погоре, за автоматска синтеза на радиофармацевтик е потребна секвенца. Вообичаена пракса е купување на комерцијална секвенца од истиот производител на модулот за синтеза. За синтеза на [¹⁸F]FMISO со примена на метод со SPE прочистување сè уште нема достапно комерцијална секвенца, па поради тоа беше неопходно креирање на секвенца.

За потребните реакции и операции со коишто треба да се одвива автоматската синтеза е направен дизајн на команди кои се важни за изработка на секвенцата за синтеза. Бидејќи, секвенцата за синтеза на [¹⁸F]FMISO е слична со секвенцата за синтеза на [¹⁸F]флуорордеоксиглукоза и за поедноставување на целиот процес, таквата секвенца е искористена како база за креирање на нова компатибилна секвенца. Направено е модифицирање на чекори, бришење на

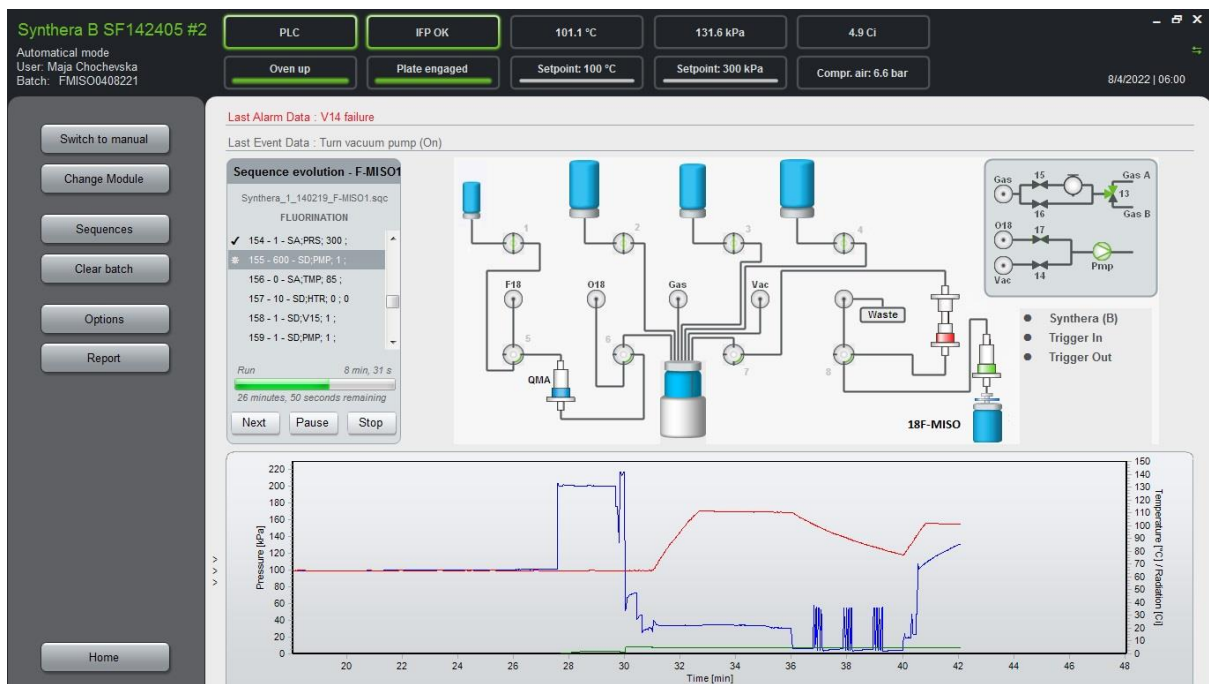
чекори и додавање на нови чекори. На слика 22 во отворениот прозорец може да се види работната површина за креирање/модифицирање на секвенца за синтеза. Во прозорецот на средина (Event) се задаваат командите за: отворање/затворање на вентили од модулот и вентили од IFP касетата, адаптирање на притисок и температура, за работата на пумпата. Од лева страна во прозорецот може да се следат веќе зададените чекори кои повторно може да се променат или пак помеѓу два чекори да се вметне нов чекор. Од десна страна пак се наоѓаат основните податоци за типот на секвенцата и нејзина промена.



Слика 22. Работна површина за креирање/модифицирање на секвенца за синтеза

Figure 22. Work window for creation/modification of synthesis sequence

На слика 23 е даден прозорецот преку којшто може да се следи и контролира синтезата.



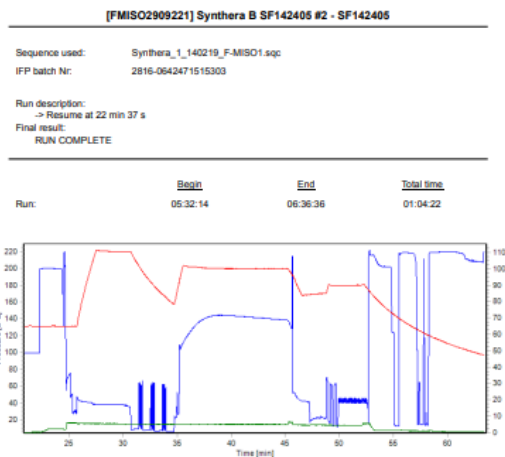
Слика 23. Прозорец за следење и контрола на синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$
Figure 23. Module main page for control and process following

Чекорите се следат преку:

- шемата во централен дел од прозорецот којашто ја отсликува касетата и преку неа се следи отворањето/затворањето на вентилите од IFP касетата за проток на реагенси и тек на реакции;
- во прозорецот Sequence evolution - FMISO од лева страна се следи листата на чекори зададени во секвенцата;
- во прозорецот од лева страна горе се следат вентилите во модулот за синтеза, отворање/затворање на вентили;
- во контролниот црн панел најгоре се следи моменталната (во прв ред) и зададената вредност (втор ред) на притисокот, температура и активност;
- графиконот како најважна алатка за следење на синтезата во којшто се отсликуваат сите реакции во текот на синтезата изразена во време, x-оска и преку линијата за притисок (сина боја) y-оска лево, за температура со црвена боја и активност со зелена боја y-оска десно.

На слика 24 е претставен извештајот од синтеза со сите потребни податоци и графикон кој покажува како треба да изгледа успешно спроведена синтеза.

FMISO2909221 Report	
Batch name:	FMISO2909221
Product:	F-MISO1
Operator:	Maja Chochevska
Module(s) used:	Synthera B SF142405 #2 - SF142405
Total batch log:	
Date:	29/09/2022
Begin:	05:32:14
End:	06:36:36
Software revision:	2.3.0.4
Comment:	-



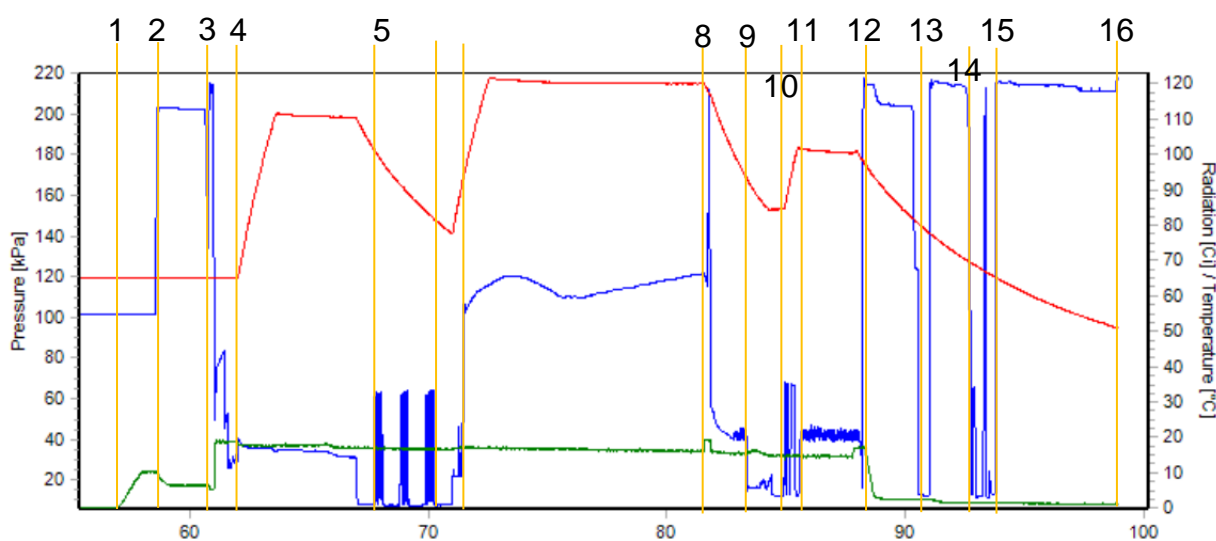
Слика 24. Извештај од синтеза на [^{18}F]FMISO
Figure 24. [^{18}F]FMISO synthesis report

Во моментот на тестирањето на секвенцата, симулираните синтези беа извршени со прикачени и наполнети шишиња со реагенси и кертриџи на касетата и следени беа следните параметри:

- правилно започнување и изведување на чекорите според зададената команда и редослед во секвенцата;
- затворање/отворање на вентилите од IFP касетата според сетираниите операции;
- регулација на вентили за гас и вакуум (V14, V15 и V16) и функција на пумпата (максималниот притисок треба да се движи во границите од 205 до 220 kPa, а за време на вакуум вредноста треба да е под 4 kPa);
- функционалноста на операциите при паузирање и продолжување на автоматската синтеза;
- проток на реагенсите до реакционото шише во зададено време и зададени услови;
- трансфер на финалниот производ од реакционото шише преку кертриџите до шишето за отпад;
- трансфер на финалниот раствор за елуирање на продуктот со двократен транспорт преку реакционото шише и кертриџите до шишето за финален производ.

5.2. Оптимизација на процесот за синтеза

При воведување на нова методологија за синтеза секогаш е потребна оптимизација на сите чекори од процесот. За ефикасна синтеза влијание имаат голем број на фактори. Кога автоматската синтеза се изведува со радиоизотоп, напредокот на реакциите се следи визуелно преку мало оловно стакло и преку графички приказ од софтверот. На слика 25 е прикажан целосен графикон од синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ во услови кога таа се извршува идеално (во однос на состојба на притисок, температура и активност). Преку овие параметри беа следени сите синтези.



Слика 25. Графикон од синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$
Figure 25. Synthesis graph of $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ synthesis

Во графиконот на у-оската од десна страна е прикажана температурата и активноста (детекторот за мерење на активност се наоѓа под реакционото шише), што на графиконот се обележани со црвена (температура) и зелена линија (активност). На левата страна на у-оската е прикажан притисокот во kPa, на графиконот е претставен со црвена линија.

За реализирање на сите овие реакции беа потребни вкупно 238 команди во секвенцата. Последните 10 команди од секвенцата, откако синтезата е завршена, беа:

```
228;0;SD;SND;300;500;confirm end of F-MISO transfer;  
229;0;SD;V08;0;0;RESET;  
230;0;SD;V07;0;0;RESET;  
231;0;SD;V06;0;0;RESET;
```

232;0;SD;V05;0;0;RESET;
 233;0;SD;V04;0;0;RESET;
 234;0;SD;V03;0;0;RESET;
 235;0;SD;V02;0;0;RESET;
 236;0;SD;V01;0;0;RESET;
 237;0;SD;V16;0;_;RESET;
 238;0;SD;V15;0;_;END OF SYNTHESIS;

5.2.1. Влијание на почетни услови во реакциите пред радиофлуоринација

Почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ со која беа изведени синтезите беше минимум 4,74 GBq и максимум 78,07 GBq. Селектирани се по неколку серии од синтези кои се изведени под исти услови во реакција на радиофлуоринација и прочистување, со цел да се покаже влијанието на почетната активност врз приносот на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. За сите овие серии се земени предвид и податоците за време на озрачување и јачина на струја. Резултатите се распределени во три групи и тоа: минимална активност ($5 \text{ GBq} \pm 5 \%$); средна активност ($20 \text{ GBq} \pm 10 \%$) и максимална активност ($60 \text{ GBq} \pm 10 \%$). Во табела 6 се прикажани резултатите за кои е пресметана средна вредност (\bar{X}) и стандардна девијација (SD) за секоја од трите групи на резултати.

Табела 6. Влијание на почетната активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ врз приносот
Table 6. Influence of $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ EOB activity on $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ yield

Серија	Почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (GBq)	Време на озрачување (sec)	Јачина на струја (mA)	Принос % (d.c)
FMISO2209221	4.74	151.80	40.00	45.27
FMISO2607222	5.20	180.00	43.00	46.06
$\bar{X} \pm \text{SD}$	4.97 ± 0.23	165.90 ± 14.10	41.50 ± 1.50	45.66 ± 0.40
FMISO2807221	19.17	452.40	49.00	41.26
FMISO1708221	18.50	549.00	41.00	40.70
FMISO1612221	20.35	490.80	49.00	43.95
FMISO1905231	19.20	436.80	48.00	51.44
$\bar{X} \pm \text{SD}$	19.30 ± 0.67	482.25 ± 43.26	46.75 ± 3.34	44.34 ± 4.28
FMISO2612221	56.46	1387.20	51.00	33.45
FMISO1302231	56.31	1387.20	50.00	29.28
FMISO1505231	78.07	2303.40	42.00	39.29
$\bar{X} \pm \text{SD}$	63.62 ± 10.22	1692.6 ± 431.9	47.67 ± 4.03	34.01 ± 4.10

Влијанието на типот на анјон-разменувачкиот кертриџ за задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ врз приносот на синтезата. Анализирани беа три различни кертриџи: QMA- Cl^- ; QMA- CO_3^{3-} и PS- OH^- во селектирани серии на синтеза со слични услови на радиофлуоринација и кертриџи за прочистување, а како раствор за елуција во овие анализирани примероци беше Cryptand 222-3.

Анализирани се три серии со QMA- Cl^- , осум серии со QMA- CO_3^{3-} и само две серии се направени со PS- OH^- . Во табела 7 е прикажана резидуална активност изразена во проценти (%) на анјон-разменувачкиот кертриџ и приносот на финалниот производ $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ на тие анализирани серии.

Табела 7. Резидуална активност d.c. ($\bar{X} \pm \text{SD} \%$) на QMA- Cl^- ; QMA- CO_3^{3-} и PS- OH^-
Table 7. Residual activity d.c. (mean \pm SD %) on the cartridges of QMA- Cl^- ; QMA- CO_3^{3-} and PS- OH^-

Тип на анјон-разменувачки кертриџ	Принос (d.c) %	Резидуална активност на анјон-разменувачки кертриџ (d.c) %
QMA- Cl^- .1	41.30	0.333
QMA- Cl^- .2	43.95	0.643
QMA- Cl^- .3	38.55	0.708
$\bar{X} \pm \text{SD}$	41.27 \pm 2.21	0.56 \pm 0.16
QMA- CO_3^{3-} .1	41.26	0.7674
QMA- CO_3^{3-} .2	38.12	0.4136
QMA- CO_3^{3-} .3	40.70	0.6543
QMA- CO_3^{3-} .4	45.27	0.6752
QMA- CO_3^{3-} .5	39.88	0.2372
QMA- CO_3^{3-} .6	40.14	0.6233
QMA- CO_3^{3-} .7	51.24	0.5820
QMA- CO_3^{3-} .8	64.25	0.3941
$\bar{X} \pm \text{SD}$	45.11 \pm 8.21	0.54 \pm 0.17
PS- OH^- .1	23.28	45.69
PS- OH^- .2	33.21	28.65
$\bar{X} \pm \text{SD}$	28.25 \pm 4.96%	37.17 \pm 8 .52

Резултатите од влијанието на растворот за елуција на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ врз приносот на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ се претставени во табела 8. Направено е испитување на влијанието на три различни раствори и тоа: Cryptand 222-1; Cryptand 222-2 и Cryptand 222-3 во услови на синтеза кога е користен QMA- CO_3^{3-} како анјон-разменувачкиот кертриџ, исти услови на радиофлуоринација и кертриџи за прочистување. Анализирани се по две серии со Cryptand 222-1 и Cryptand 222-2, а со Cryptand 222-3 се направени три серии. Дополнително се направени и

мерења за задржана активност на QMA-CO³⁻ кои исто така се прикажани во табела 8.

Табела 8. Влијание на растворот за елуција на [¹⁸F]F⁻ врз принос на [¹⁸F]FMISO

Table 8. Influence of [¹⁸F]F⁻ elution solution on [¹⁸F]FMISO yield

Раствор за елуција на [¹⁸ F]F ⁻	Принос (d.c.) %	Резидуална активност на QMA-CO ³⁻ (d.c) %
Cryptand 222-1	14.40	1.007
Cryptand 222-1	29.96	0.785
$\bar{X} \pm SD$	22.18 ± 7.78	0.896 ± 0.111
Cryptand 222-2	39.88	0.723
Cryptand 222-2	32.40	0.823
$\bar{X} \pm SD$	36.14 ± 3.74	0.773 ± 0.050
Cryptand 222-3	41.26	0.767
Cryptand 222-3	45.27	0.675
Cryptand 222-3	40.70	0.654
$\bar{X} \pm SD$	42.41 ± 2.04	0.699 ± 0.049

5.2.2. Влијание на условите во реакција на радиофлуоринација

Клучни параметри кои имаат влијание врз приносот се условите во реакција на радиофлуоринација. Направени беа промени во секвенцата за температура на радиофлуоринација, времетраењето на реакцијата на радиофлуоринација, додека сите останати услови дефинирани во секвенцата останаа непроменети.

Според истиот принцип направено е и испитување на влијанието на масата на прекурсорот NITTP. Во табела 9 е прикажан приносот коригиран за распад (RCY d.c.) и претставен како средна вредност изразена во проценти ± SD, во зависност од промена на температурата во опсег од 100°C до 140°C и времетраење од 3-10 мин. во реакција на радиофлуоринација.

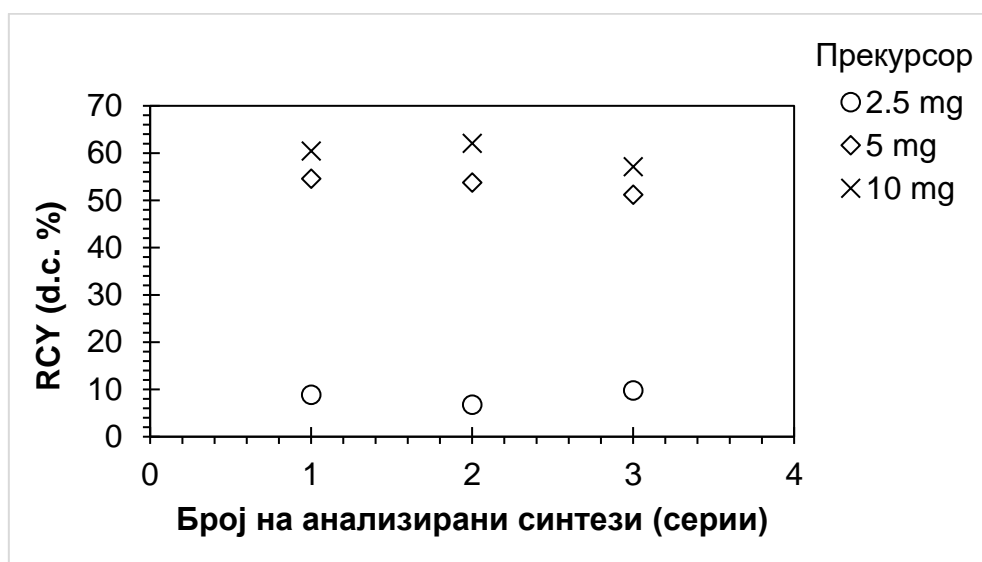
Табела 9. Принос на [¹⁸F]FMISO ($\bar{X} \pm SD$ %) во зависност од температурата од 100°C до 140°C и времетраење од 3-10 мин. во реакција на радиоифлуоринација

Table 9. [¹⁸F]FMISO Radiochemical yield, decay corrected (mean \pm SD %) of the product in relation with the fluorination reaction parameters

Времетраење (min)	Температура (°C)	Принос (d.c.) ($\bar{X} \pm SD$ %)
3	100	5.32 \pm 0.56
5	100	14.45 \pm 1.14
7	100	32.33 \pm 2.46
10	100	37.61 \pm 2.46
10	110	42.79 \pm 1.99
7	120	37.93 \pm 1.59
10	120	46.77 \pm 3.19
10	130	53.18 \pm 3.44
7	140	30.07 \pm 1.24

* Сите синтези (серии) беа изведени по три пати.

Влијанието на масата на прекурсорот врз радиохемискиот принос е претставено на слика 26.

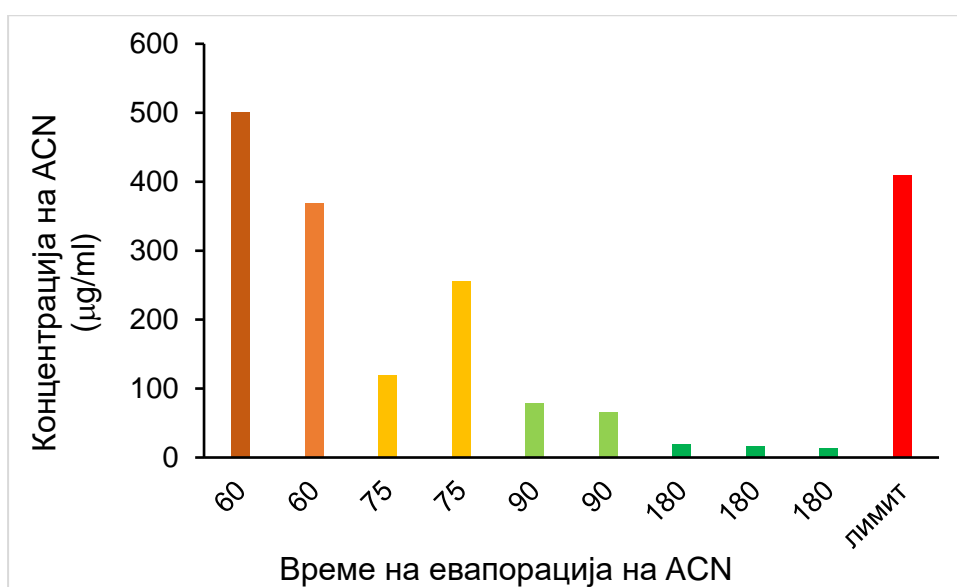


Слика 26. Влијание на маса на прекурсор (mg) врз принос на [¹⁸F]FMISO (RCY, d.c. %)

Figure 26. Effect of precursor amount (mg) on the yield of [¹⁸F]FMISO (RCY, d.c. %)

5.2.3. Влијание на условите во реакцијата по радиофлуоринација

Првиот пристап за оптимизација на овој чекор беше испитување на влијанието на времето на евапорација на ацетонитрил врз концентрацијата на ацетонитрил во финален производ. Минимално време кое беше испитано е 60 секунди (три чекори по 30, 20 и 10 секунди), како средно време беше испитано 75 секунди (три чекори по 30, 30 и 15 секунди) и 90 секунди (три чекори по 30, 30 и 30 секунди) и максимално време од 180 секунди (три чекори по 90, 60 и 30 секунди). На слика 27 е претставено влијанието на време на евапорација на ацетонитрил врз концентрација на ацетонитрил во финален примерок.



Слика 27. Влијание на време на евапорација на ацетонитрил врз концентрација на ацетонитрил во финален примерок

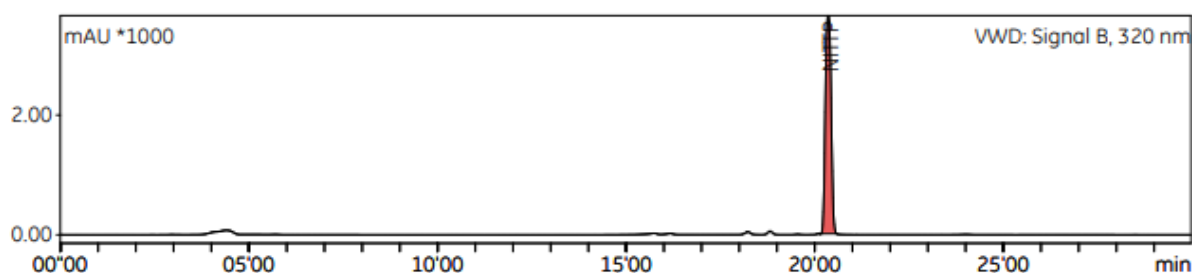
Figure 27. Effect of acetonitrile evaporation time on acetonitrile concentration in the final sample

Како идеално време од овие анализи е 180 s. Според тоа, вториот пристап за оптимизација беше испитување на влијанието на времето на сушењето (180 s) врз евентуална радиолитза на нехидролизирани [^{18}F]FMISO интермедиери и генерирање на непосакувани онечистувања, особено десметимисонидазол (DMM) во реакциите по радиофлуоринација.

Ова испитување беше изведено преку спроведување на дополнителни синтеси на [^{19}F]FMISO користејќи стабилен изотоп [^{19}F]F $^-$.

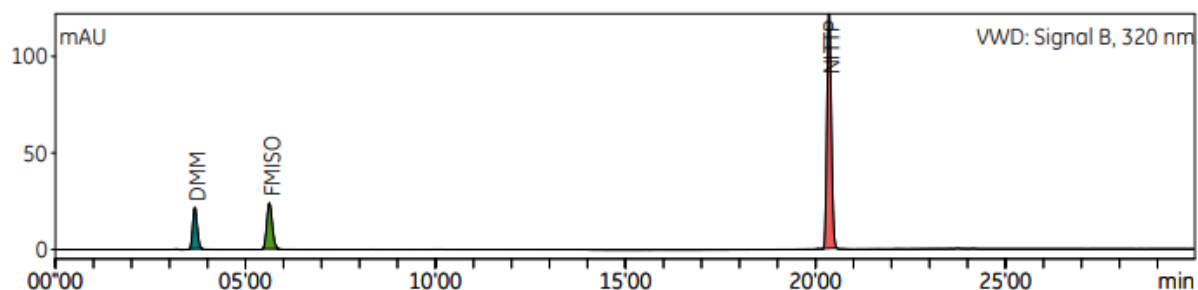
Со земање на примерок (примерок 1) е започнато веднаш штом е додаден прекурсорот (NITTP) во реакционото шише, односно по првата минута од

започнувањето на флуоринација. Хроматограмот од HPLC анализата на примерок 1 е прикажан на слика 28.



Слика 28. UV Хроматограм на примерок 1
Figure 28. UV chromatogram of sample 1

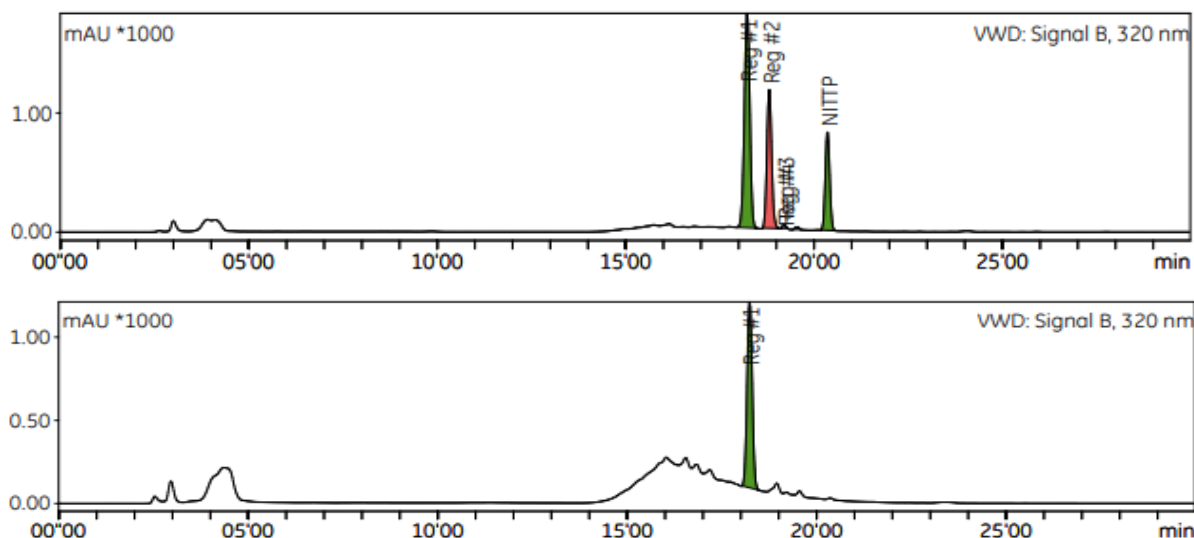
УВ-хроматограмот на слика 28 се потврдува високо присуство на соединението NITTP во реакционата смеса. За споредба на ретенционите времиња и површините под пиковите, направена е дополнителна анализа пред започнување на овој експеримент. Анализираниа е мешавина од раствор којшто содржи 5 $\mu\text{g/mL}$ (5 ppm) NITTP, DMM I FMISO. На слика 29 е даден UV хроматограм од HPLC анализа на таквата мешавина.



Слика 29. UV хроматограм на мешавина на раствор од 5 $\mu\text{g/mL}$ (5 ppm) NITTP, DMM I FMISO

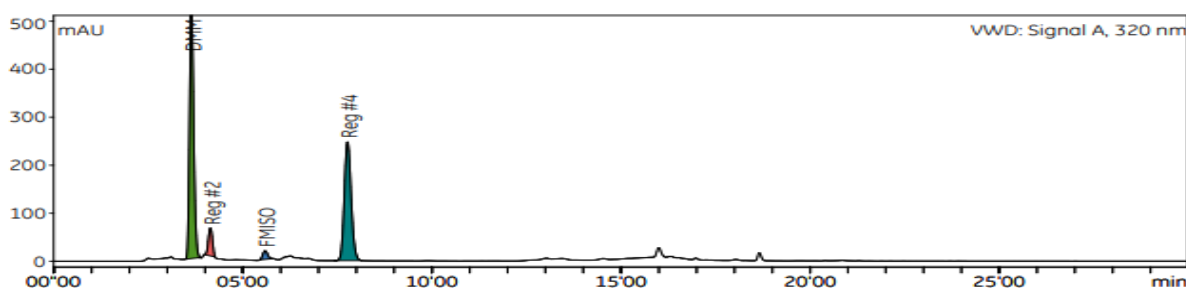
Figure 29. UV chromatogram of mixture solution of 5 $\mu\text{g/mL}$ (5 ppm) NITTP, DMM I FMISO

За време на реакцијата на флуоринација (во тек на 10 мин.) беа земени два примероци, примерок 2 беше земен за време на флуоринација односно во петтата минута по започнувањето на реакцијата, а другиот примерок 3 беше земен на крајот од реакцијата на флуоринација, во десетта минута. И двата примероци се анализирани, а UV хроматограмите се прикажани на слика 30.



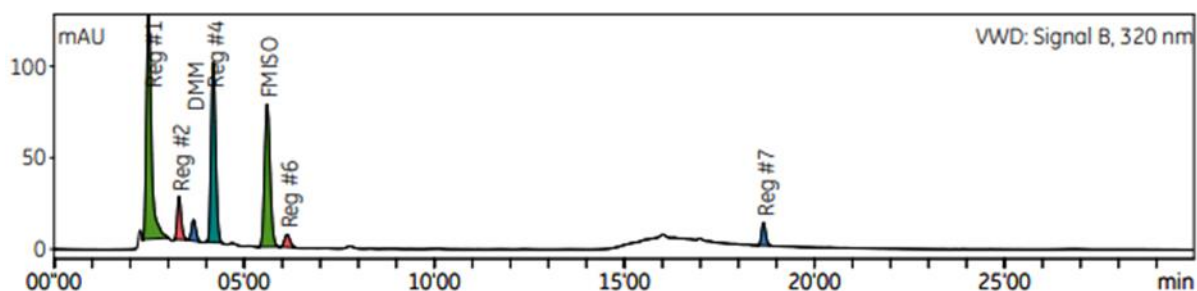
Слика 30. UV Хроматограм на примерок 2 (горе) и примерок 3 (долу)
Figure 30. UV chromatogram of sample 2 (top) and sample 3 (bottom)

Понатаму, реакционата смеса беше кратко време надвор од печката за загревање, со цел да се излади реакционото шише спонтано без внатрешен систем за ладење, пред да продолжи следниот чекор на евапорација. Евапорација на ацетонитрилот беше изведена со загревање на реакционата смеса на 85 °C во тек на 180 s. Примерокот 4 беше земен на крајот од евапорацијата за да се провери дали главниот несакан производ - онечистување дезметилмисонидазол (DMM) се генерира за време на овој чекор. На слика 31 е прикажан UV Хроматограм на примерок 4 по евапорација на ацетонитрилот (пред хидролиза).



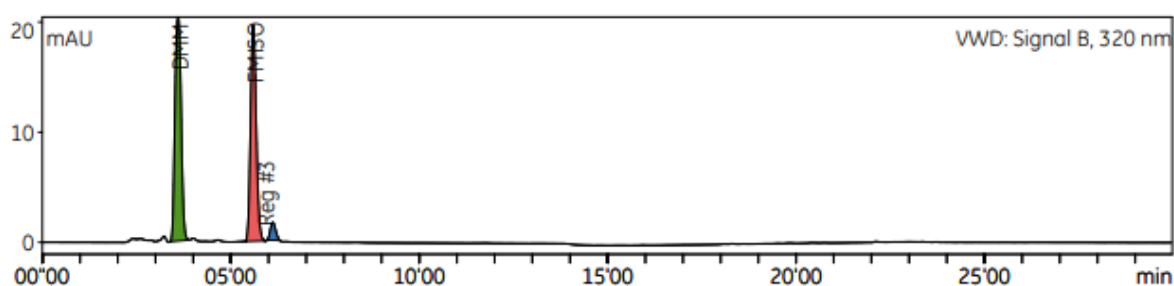
Слика 31. UV Хроматограм на примерок 4
Figure 31. UV chromatogram of sample 4

На крајот од хидролизата беше земен примерок 5, којшто е смеса на хидролизиран и непрочистен производ. UV хроматограмот на примерок 5 е даден на слика 32.



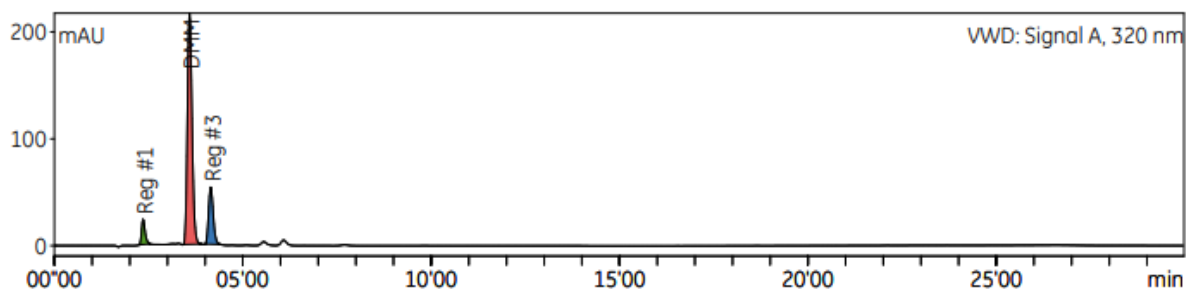
Слика 32. UV Хроматограм на примерок 5
Figure 32. UV chromatogram of sample 5

UV хроматограмот на финален прочистен раствор на производот односно примерок 6 е даден на слика 33.



Слика 33. UV Хроматограм на примерок 6
Figure 33. UV chromatogram of sample 6

Елуираниот отпад, исто така, беше испитан со HPLC анализа и беше земен примерок 7 од шишето за отпад. Овој раствор е раствор на елуирани онечистувања по заробување на [¹⁹F]FMISO. UV хроматограмот на примерок 7 е даден на слика 34.



Слика 34. UV Хроматограм на примерок 7
Figure 34. UV chromatogram of sample 7

Ако се вратиме на синтезата на [¹⁸F]FMISO, како дел од оптимизацијата на параметрите кои имаат влијание на реакцијата по радиофлуоринација се параметрите од хидролиза. Испитани беа волумен и концентрација на растворот

за хидролиза, температура на хидролиза и времетраење на хидролиза. Сите овие параметри може да влијаат на квалитетот на финален производ од [¹⁸F]FMISO. Ако се зборува за квалитетот на финален производ од [¹⁸F]FMISO големо влијание исто имаат и кертриците за прочистување и радиофлуоринацијата, затоа во контекст на оваа анализа се спроведени синтези само со два типа на реверзно-фазни кертрици (30 mg HLB и C18 Environmental) кои се покажаа како најдобри во однос на прочистувањето (резултатите се претставени во следната точка).

Влијанието на температурата и времетраење на хидролизата врз хемиската и радио хемиската чистота на финален производ од [¹⁸F]FMISO беше испитано во оптимален опсег на загревање на реакционото шише од 90°C до 120°C во времетраење од 2 до 4 мин. со комбинација на SCX + 30 mg HLB или IC-H⁺ + 30 mg HLB и IC-H⁺ + C18 Environmental или SCX + C18 Environmental.

Условите во синтезата спроведени за ова студија и употребените кертрици се дадени во табела 10.

Табела 10. Услови под кои се спроведени различни синтези
Table 10. Conditions under which different syntheses were carried out

	Радиофлуоринација	Хидролиза	Кертрици
C-1	120°C 10 min	4 mL 0,05 M HCl; 90°C 2 min	SCX + 30 mg HLB
C-2	120°C 10 min	2 mL 0,1 M HCl; 90°C 2 min	SCX + 30 mg HLB
C-3	120°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 90°C 2 min	SCX + 30 mg HLB
C-4	120°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 100°C 2 min	SCX + 30 mg HLB
C-5	120°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 110°C 2 min	SCX + 30 mg HLB
C-6	120°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 110°C 4 min	IC-H ⁺ + 30 mg HLB
C-7	120°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 120°C 3 min	IC-H ⁺ + C18 Environmental
C-8	130°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 120°C 3 min	IC-H ⁺ + C18 Environmental
C-9	130°C 10 min	4 mL 0,1 M HCl; 120°C 3 min	SCX + C18 Environmental

Испитувањата беа направени преку споредба на хроматограмите добиени од HPLC анализите на финалниот производ од [¹⁸F]FMISO.

Идентификуваните пикови од добиените хроматограми од примерокот заедно со резултатите од анализираните стандардни раствори (непосредно пред анализите на примерокот) се прикажани во табела 11. Направена е споредба на ретенционото време и површината под пик на пикот од стандардот и аналогниот пик во примерокот.

Дополнително се прикажани и податоците за пиковите од други хемиски онечистувања.

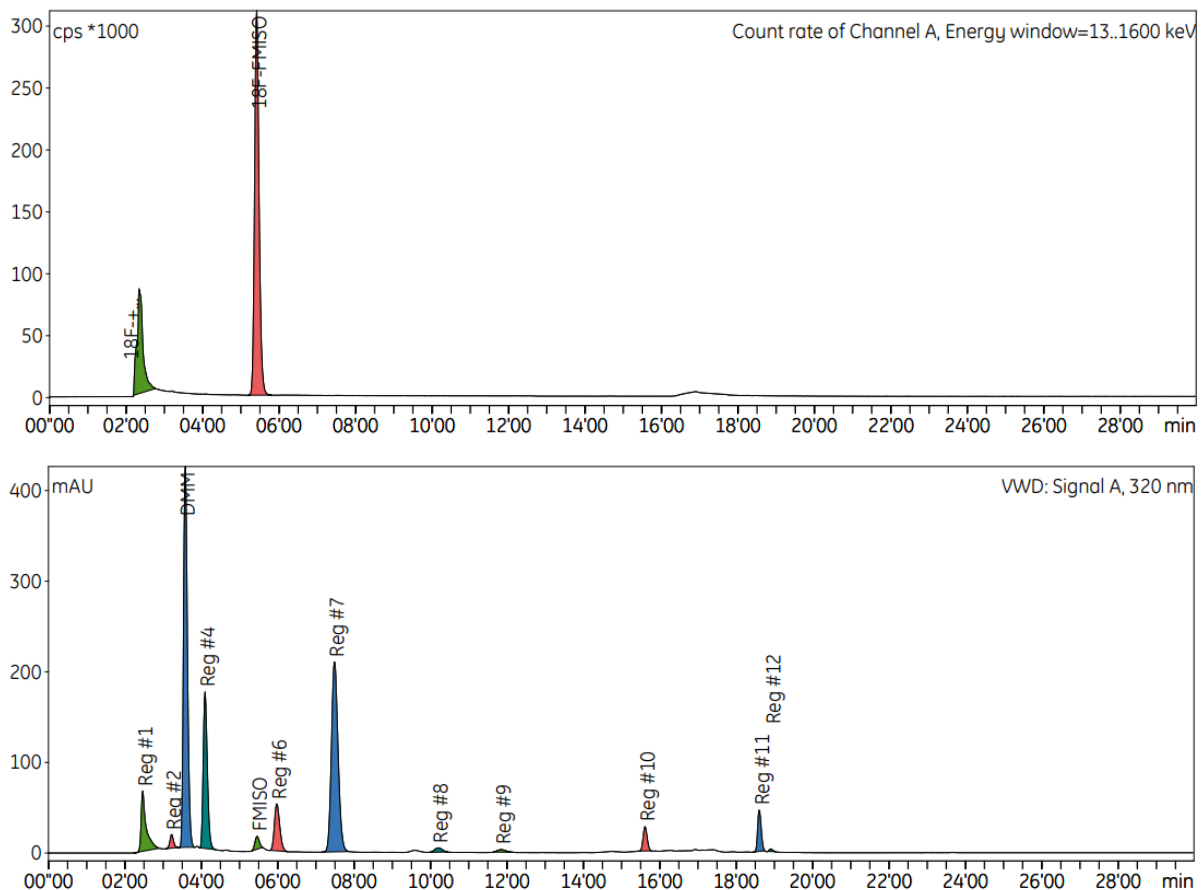
Табела 11. Резултати од HPLC анализи на примероците од спроведените синтези C1-C9

Table 11. Results of HPLC analyses of samples from conducted syntheses C1-C9

Пик	C-1 R/T (s) Area (mAU*s)	C-2 R/T (s) Area (mAU*s)	C-3 R/T (s) Area (mAU*s)	C-4 R/T (s) Area (mAU*s)	C-5 R/T (s) Area (mAU*s)	C-6 R/T (s) Area (mAU*s)	C-7 R/T (s) Area (mAU*s)	C-8 R/T (s) Area (mAU*s)	C-9 R/T (s) Area (mAU*s)
Резултати од стандарден раствор									
DMM (10 µg/mL)	03,38 272,6	03,35 309,8	03,40 344,96	03,36 334,8	03,37 323,9	03,38 344,6	03,40 305,6	03,36 333,9	03,39 348,4
FMISO (10 µg/mL)	05,32 356,3	05,27 400,2	05,36 443,63	05,28 433,2	05,30 444,3	05,33 444,6	05,36 397,7	05,39 392,5	05,36 451,66
Резултати од примероците анализирани со радиодетектор									
[¹⁸F]FMISO*	05,29 100%	05,29 100%	05,31 100%	05,29 100%	05,27 100%	05,27 100%	05,34 100%	05,40 100%	05,34 100%
Резултати од примероците анализирани со UV детектор									
Пик 1 DMM	03,38 475,1	03,36 336,1	03,36 198,6	03,40 269,70	03,37 155,1	03,37 118,1	03,40 150,1	03,40 164,1	03,44 462,1
Пик 2	04,08 81,75	04,27 416,2	03,57 300,5	04,40 108,1	04,13 149,8	04,05 154,2	04,00 220,2	04,15 231,2	/
Пик 3 FMISO	05,32 10,71	05,32 50,8	05,34 44,6	05,46 8,35	05,30 12,3	05,29 22,2	05,36 23,8	05,39 50,8	05,37 24,8
Пик 4	06,03 183,7	06,03 119,0	06,06 113,0	06,04 181,0	06,00 57,2	06,01 81,2	06,07 90,0	06,03 41,0	/
Пик 5	07,39 83,8	07,39 21,1	07,44 67,3	07,41 152,1	07,33 4,28	07,29 87,2	07,47 34,1	07,39 21,1	
Пик 6	09,43 24,2	09,44 33,3	09,52 10,52	09,46 4,5	09,39 6,3	09,35 12,3	09,55 4,6	09,56 9,0	/

Со цел да можеме да ги идентификуваме сите потенцијални онечистувања во непрочистен раствор една синтеза беше прекината по хидролиза. Условите во синтезата беа исти како во синтеза C-5 дадени во табела 10.

На слика 35 се прикажани радиохроматограмот и UV хроматограмот од таквиот непрочистен примерок.



Слика 35. Радиохроматограм и UV хроматограм од непрочистен примерок
Figure 35. Radiochromatogram and UV chromatogram of an unpurified sample

5.3. Оптимизација на начинот на прочистување

За да се дефинира најповолен тип на кертриџ за производство беа користени шест типа на реверзно-фазен кертриџ: 225 mg HLB, 30 mg HLB light, 30 mg HLB light x 2, 175 mg PS-RP, 400 mg tC18, 820 mg C18 Environmental; два типа на катјон-изменувачки кертриџи: SCX и IC-H⁺; и два типа на алуминиум оксидни кертриџи: ALU B и ALU N. Алуминиум оксиден кертриџ со базна основа беше употребен за задржување на слободниот анјон на [¹⁸F]F⁻.

При испитување на ефикасноста во прочистувањето и компатибилноста на кертриџите во прочистувањето, направени се неколку паралелни анализи.

Во табела 12 се прикажани резултатите од анализираните примероци на финалниот прочистен раствор преку пресметка за:

- Незадржаната активност од [¹⁸F]FMISO производот на реверзно-фазниот кертриџ (RP кертриџ) и елуирана во отпаден раствор.

Активноста е изразена во процент од средната вредност и стандардна девијација.

- Неелуиран процент на [¹⁸F]FMISO односно задржаната активност од [¹⁸F]FMISO производот на реверзно-фазниот кертриџ (RP кертриџ) по трансфер на раствор за елуција. Резултатите се изразени како процент (% d.c.) од ЕОВ. Активноста е изразена во процент од средната вредност и стандардна девијација.
- Концентрацијата на DMM онечистувањето што се елуирало во отпадниот раствор. Изразена во µg/mL од средната вредност и стандардна девијација.
- Концентрацијата на DMM онечистувањето што се елуирало во финален примерок. Изразена во µg/mL од средната вредност и стандардна девијација.

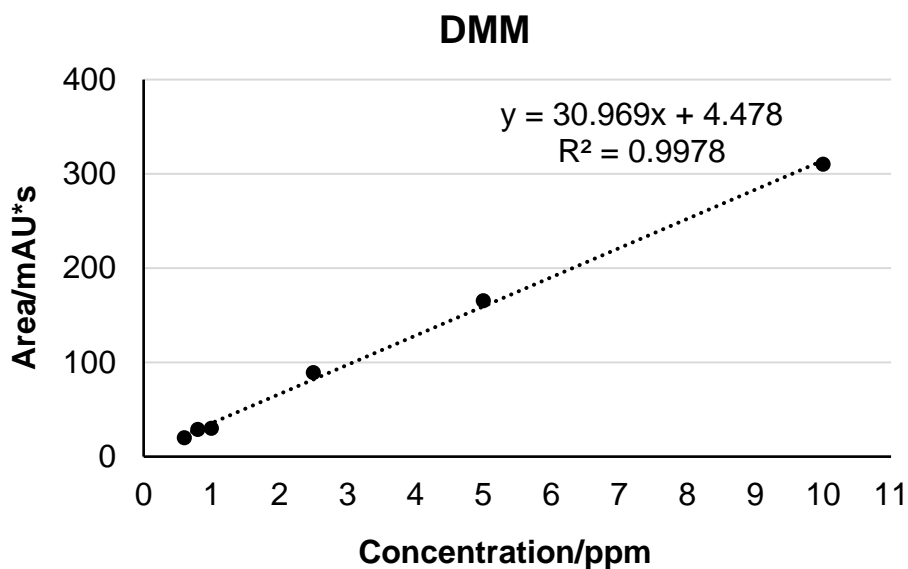
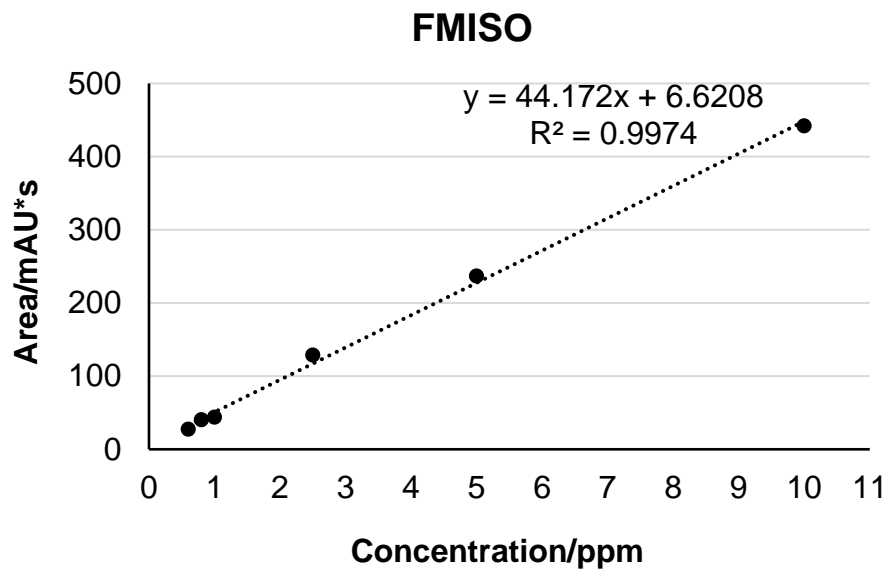
Табела 12. Задржување и елуирање на [¹⁸F]FMISO и DMM на различен RP кертриџ

Table 12. Trapping and elution of [¹⁸F]FMISO and by-product DMM with different reversed-phase (RP) cartridges

RP кертриџ # (маса на сорбент и тип)	[¹⁸ F]FMISO елуиран во отпаден р-р d.c ($\bar{X} \pm SD$ %)	[¹⁸ F]FMISO не-елуиран во финален р-р d.c ($\bar{X} \pm SD$ %)	DMM елуиран во отпаден р-р µg/mL ($\bar{X} \pm SD$)	DMM елуиран во финален р-р µg/mL ($\bar{X} \pm SD$)
30 mg HLB light	14.44 ± 3.88	0.48 ± 0.15	40.19 ± 7.83	6.26 ± 0.82
175 mg PS-RP	34.42 ± 4.58	0.89 ± 0.20	37.12 ± 6.66	9.2 ± 0.85
225 mg HLB plus	0	29.95 ± 4.67	3.80 ± 1.33	16.24 ± 4,9
820 mg C18 Environmental	1.65 ± 0.48	1.71 ± 0.61	1.60 ± 0.31	6.70 ± 0.55
400 mg tC18	20.78 ± 2.31	12.02 ± 1.34	32.34 ± 5.71	8.27 ± 0.67
(30 mg HLB light) x 2	0	10.23 ± 2.50	17.50 ± 2.23	6.50 ± 0.56

Концентрацијата на DMM онечистувањето беше пресметана преку стандардна калибрациска крива и стандардна пресметка преку регресиона равенка.

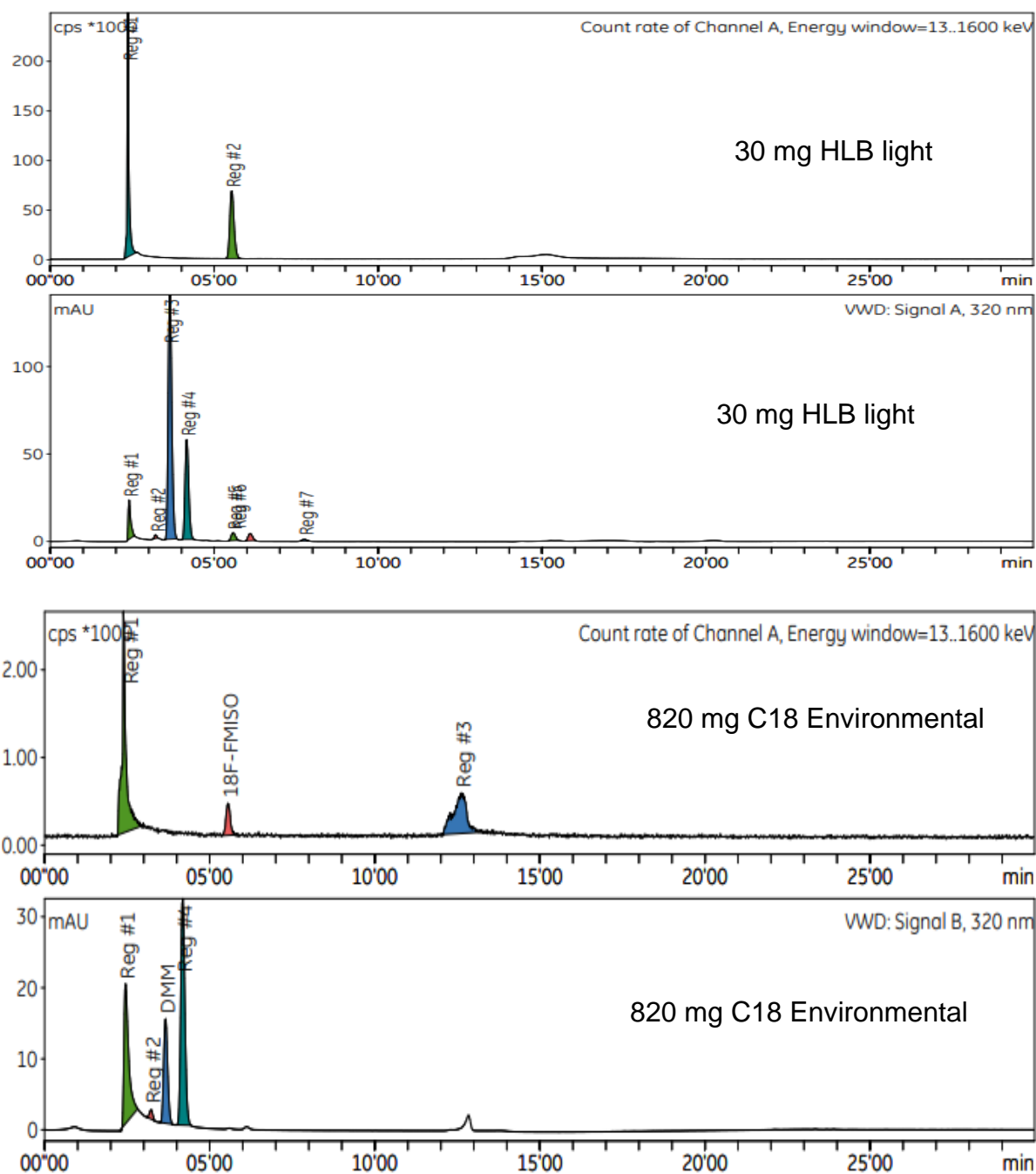
Стандардната калибрациска крива за двата примерока добиена во опсег од 0,6 до 10 ppm (0,6 – 10 µg/mL) е претставена на слика 36.



Слика 36.Стандардна калибрациска крива за FMISO (горе) и DMM (долу) во опсег од 0,6 до 10 ppm

Figure 36. Calibration curve of FMISO (top) and DMM (bottom) from 0.6 to 10 ppm

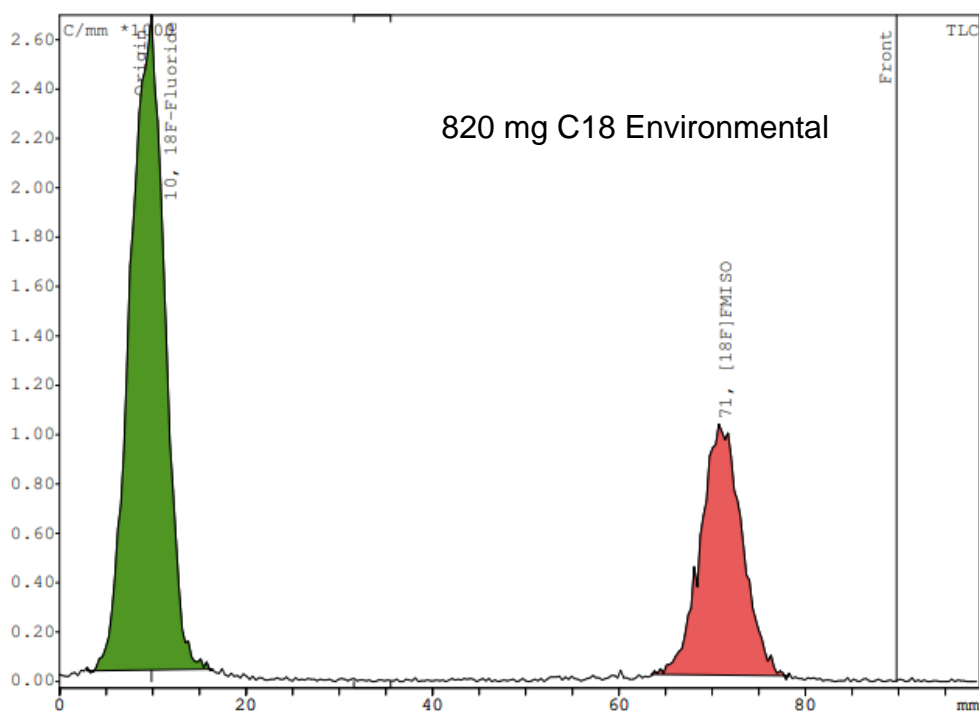
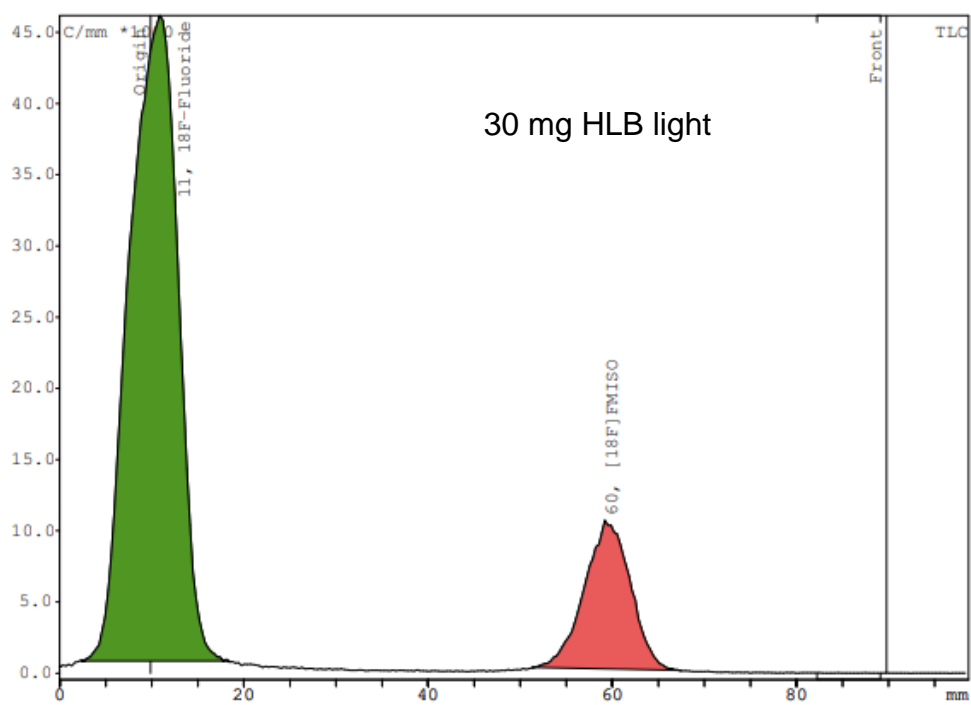
На слика 37 е прикажан еден радиохроматограм и UV хроматограм од HPLC анализата на отпадниот раствор од синтеза со користење на 30 mg HLB light и 820 mg C18 Environmental за прочистување.



Слика 37. Радиохроматограм и UV хроматограм од отпаден раствор од синтеза со користење на 30 mg HLB light (горе) и 820 mg C18 Environmental (долу) за прочистување

Figure 37. Radiochromatogram and UV chromatogram of waste sample used 30 mg HLB light и 820 mg C18 Environmental for purification

На слика 38 е прикажан TLC хроматограмот од истите тие примероци на отпаден раствор.



Слика 38. TLC хроматограм од отпаден раствор од синтеза со користење на 30 mg HLB light (горе) и 820 mg C18 Environmental (долу) за прочистување
Figure 38. TLC chromatogram of waste sample used 30 mg HLB light and 820 mg C18 Environmental for purification

Дополнително беше испитано влијанието на растворот за елуција на $[^{18}\text{F}]$ FMISO врз ефикасноста на елуирање на $[^{18}\text{F}]$ FMISO преку мерења на резидуалната активност на реверзно-фазниот кертриџ. Кертриџот беше елуиран

мануелно со дополнителен волумен на етанолен раствор по мерењето на активноста.

Во табела 13 се прикажани резултатите од анализата каде што резултатите се изразени како процент (%) на резидуалната активност коригирана за распад од ЕОВ времето.

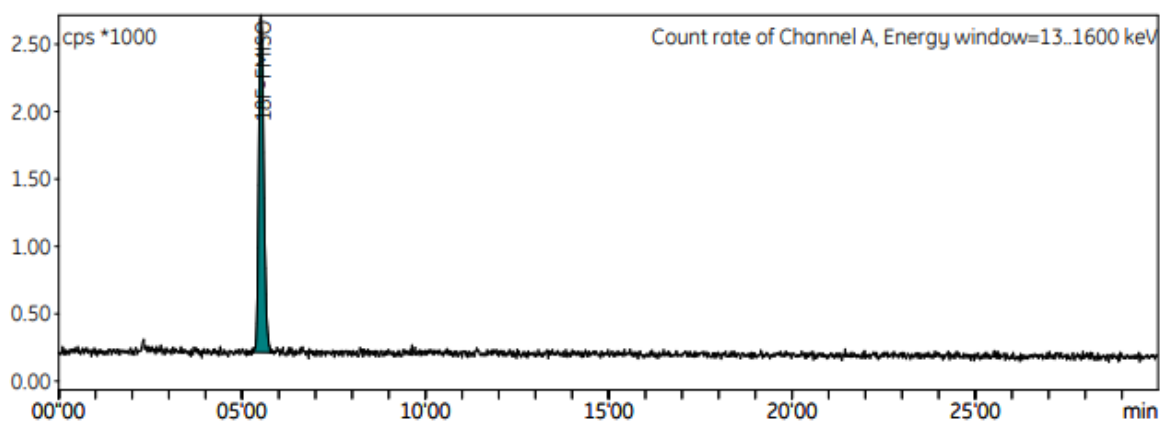
Табела 13. Влијание на елуциониот раствор на [¹⁸F]FMISO врз ефикасноста на елуирање на [¹⁸F]FMISO

Table 13. Influence of the elution solution of [¹⁸F]FMISO on the elution efficiency of [¹⁸F]FMISO

Раствор за елуција	Принос (d.c) %	Реверзно-фазна колона	Резидуална активност на реверзно-фазна колона (d.c) %
5% EtOH	41.26	30 mg HLB	0.4186
5% EtOH	40.70	30 mg HLB	0.7137
5% EtOH	45.27	30 mg HLB	0.6146
5% EtOH	51.24	30 mg HLB	0.5971
$\bar{X} \pm SD$	44.62 ± 4.86	$\bar{X} \pm SD$	0.586 ± 0.123
10% EtOH	40.14	30 mg HLB	0.4839
10% EtOH	43.95	30 mg HLB	0.7253
10% EtOH	51.44	30 mg HLB	0.5626
$\bar{X} \pm SD$	45.18 ± 5.75	$\bar{X} \pm SD$	0.590 ± 0.123

Дополнително беше направена студија со елуирање на кертриците. По мерењето на резидуалната активност на реверзно-фазниот кертриц, тој беше мануелно промиен со дополнителен волумен од 5 mL на 10 % етанолен раствор. Целта беше да се провери дали во елуциона фракција од промивање заостанатата активност потекнува само од молекулите на [¹⁸F]FMISO.

На слика 39 е прикажан еден радиохроматограм од HPLC анализата на елуционата фракција од реверзно-фазниот кертриц (30 mg HLB).

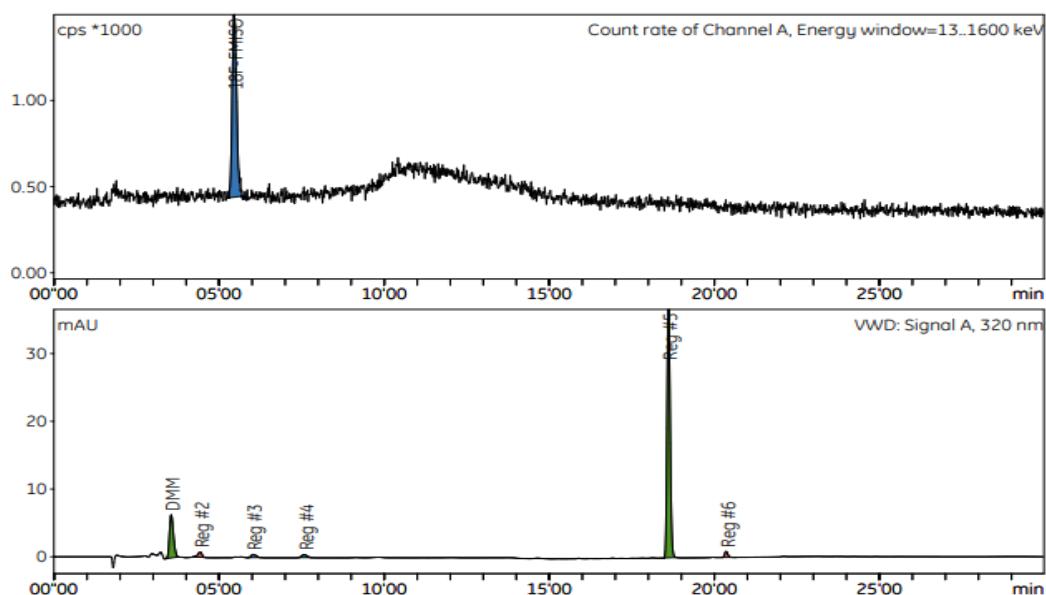


Слика 39. Радиохроматограм од HPLC анализата на елуциона фракција од реверзно-фазниот кертриџ (30 mg HLB).

Figure 39. Radiochromatogram from the HPLC analysis of an elution fraction from the reverse phase cartridge (30 mg HLB).

Исто така беше направено мануелно промивање и на SCX кертриџот којшто се користеше во комбинација со реверзно-фазниот кертриџ (30 mg HLB). Целта беше да се провери дали и на тој кертриџ заостанува $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, а истовремено да се провери дали заостанува DMM и други хемиски онечистувања. За промивање беа користени 5 mL вода.

На слика 40 е прикажан радиохроматограм и UV хроматограм од една HPLC анализа на елуционите фракции на SCX кертриџите (по случаен избор).



Слика 40. Радиохроматограм и UV хроматограм од HPLC анализата на елуциона фракција од SCX кертриџ

Figure 40. Radiochromatogram and UV chromatogram from the HPLC analysis of an elution fraction from SCX cartridge

5.4. Други параметри кои имаат влијание на приносот

Спроведено беше мониторирање на резидуална активност по синтеза. За да може да се направи анализа од резидуалната активност на кертриците во оваа студија земени се предвид ист тип на кертрици и тоа: QMA-CO³⁻, SCX, 30 mg HLB и ALU В кертриц. Заради ограниченоста на просторот во табелата употребени се кратенки. Во табела 14 се прикажани резидуалните активности за кертриците и резидуалните активности од V-vial, Waste vial, Waste filter, Final filter, Recovery water vial (Rec.vial), Reaction vial (Reac.vial). Сите мерења, освен во Waste vial и V-vial, беа измерени 10-12 часа по завршувањето на синтеза. Резултатите се изразени како средна вредност од процентот (%) на резидуалната активност коригирана за распаѓање од ЕОВ времето. За да се направи споредбена анализа резултатите се групирани во пет групи во зависност од добиениот принос (0-10 %, 10-20 %, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 % и >50 %).

Табела 14. Резултати од резидуални активности во процесот на синтеза на [¹⁸F]FMISO изразени како % од средна вредност и стандардна девијација (\bar{X} . \pm SD %)
 Table 14. Results of residual activities in the synthesis process of [¹⁸F]FMISO expressed as % of mean and standard deviation (Mean \pm SD %)

Rec.Vial	Waste filter	Waste vial	Reac.vial	Final filter	ALU B	30 mg HLB	SCX	QMA-CO ₃	V-vial	Принос % (d.c)
0.07 \pm 0.01%	2.55 \pm 0.41%	31.39 \pm 1.64%	0.86 \pm 0.82%	0.16 \pm 0.21%	16.02 \pm 7.91%	0.22 \pm 0.12%	3.65 \pm 2.67%	0.36 \pm 0.12%	2.84 \pm 0.95%	8.04 \pm 2.38 %
0.08 \pm 0.02%	4.24 \pm 4.11%	32.91 \pm 11.74%	1.15 \pm 0.43%	0.33 \pm 0.32%	12.02 \pm 1.88%	0.44 \pm 0.29%	3.61 \pm 1.20%	0.61 \pm 0.48%	4.23 \pm 0.91%	17.51 \pm 2.03 %
0.05 \pm 0.01%	3.24 \pm 1.94%	29.44 \pm 13.56%	1.26 \pm 0.63%	1.34 \pm 0.84%	10.58 \pm 2.38%	0.55 \pm 0.02%	4.53 \pm 0.92%	0.84 \pm 0.25%	2.83 \pm 0.83%	25.93 \pm 3.14 %
0.05 \pm 0.01%	2.30 \pm 0.94%	25.80 \pm 4.36%	1.10 \pm 0.36%	1.54 \pm \pm 1.20%	11.26 \pm 5.34%	0.39 \pm 0.08%	5.46 \pm 1.19%	0.32 \pm 0.08%	3.06 \pm 0.91%	36.75 \pm 3.07 %
0.06 \pm 0.01%	3.48 \pm 0.38%	27.30 \pm 8.41%	1.93 \pm 1.15%	0.55 \pm \pm 0.15%	5.16 \pm 0.70%	0.62 \pm 0.17%	4.01 \pm 0.95%	0.71 \pm 0.08 %	3.46 \pm 0.70%	42.49 \pm 1.78 %
0.07 \pm 0.01%	2.52 \pm 1.02%	13.62 \pm 0.78%	0.91 \pm 0.86%	0.63 \pm \pm 0.09%	4.48 \pm 1.61%	0.80 \pm 0.20%	6.92 \pm 0.66%	0.48 \pm 0.09%	3.46 \pm 0.30%	53.24 \pm 2.01 %

5.5. Контрола на квалитет на [¹⁸F]FMISO

5.5.1. pH-вредност

Приближната pH-вредност беше одредена со pH ленти во опсег од 0 до 14 pH единици. Во табела 15 се прикажани измерените приближни pH-вредности за сите примероци од серији на синтеза со различен волумен и концентрација на растворот за хидролиза (HCl), 2 mL или 4mL на 0,1 M HCl и 4mL на 0,05 M HCl.

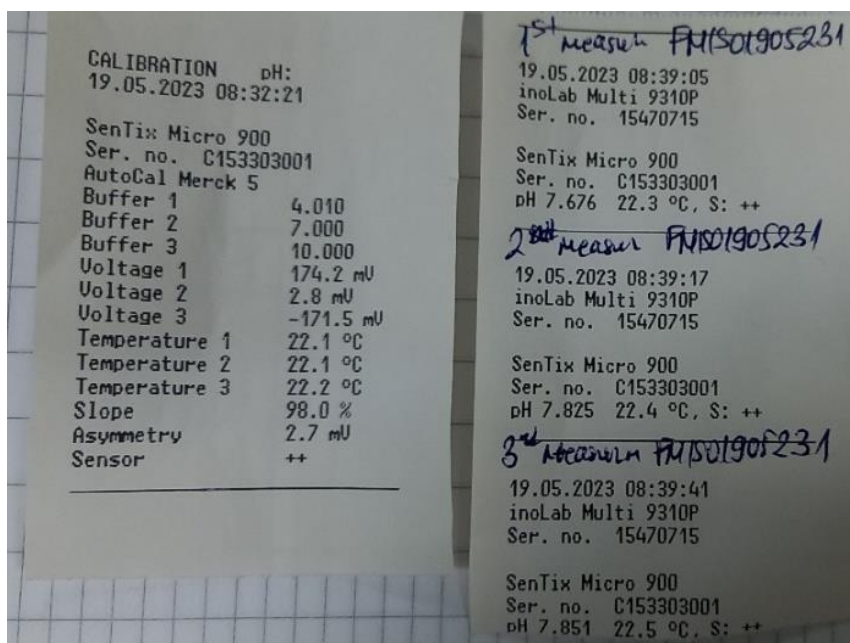
Табела 15. Приближна pH-вредност на [¹⁸F]FMISO примероци
Table 15. Approximate pH value of [¹⁸F]FMISO samples

Серија	Приближна pH вредност
FMISO2312221*	8.5
FMISO2911221#	7-7.5
FMISO0912221#	7-7.5
FMISO1012221#	7-7.5
FMISO1904221	7.5-8
FMISO0106221	7.5
FMISO2607221	7.5
FMISO2807221	7.5-8
FMISO0408221	7.5
FMISO0508221	7-7.5
FMISO0908221	7-7.5
FMISO1008221	8
FMISO1108221	7.5
FMISO1708221	8
FMISO1808221	7.5
FMISO2308221	7-7.5
FMISO2408221	7-7.5
FMISO0709221	7.5
FMISO2909221	7-7.5
FMISO1010221	7-7.5
FMISO2110221	8
FMISO1811221	7.5-8
FMISO2211221	7-7.5
FMISO1512221	8
FMISO1612221	7.5-8
FMISO2212221	7-7.5
FMISO2612221	7.5-8
FMISO1302231	7
FMISO2803231	7.5
FMISO0905232	7
FMISO1505231	7
FMISO1905231	7.5-8
FMISO2306231	7.5

* 4 mL на 0,05 M HCl; #2 mL 0,1 M HCl;
во останатите серији се користеше 4 mL 0,1 M HCl

За споредба и верификација дополнително е направена проверка на pH- вредноста на дел од примероците со pH метар.

На слика 41 е претставен еден од тие тестови како потврда (случаен избор).



Слика 41. Извештај од pH мерења со pH метар inoLab Multi на еден примерок од [¹⁸F]FMISO
Figure 41. pH report by inoLab Multi pH meter for one [¹⁸F]FMISO sample

5.5.2. Идентификација

Добиените резултати од мерење на полуживот на распад се прикажани во табела 16.

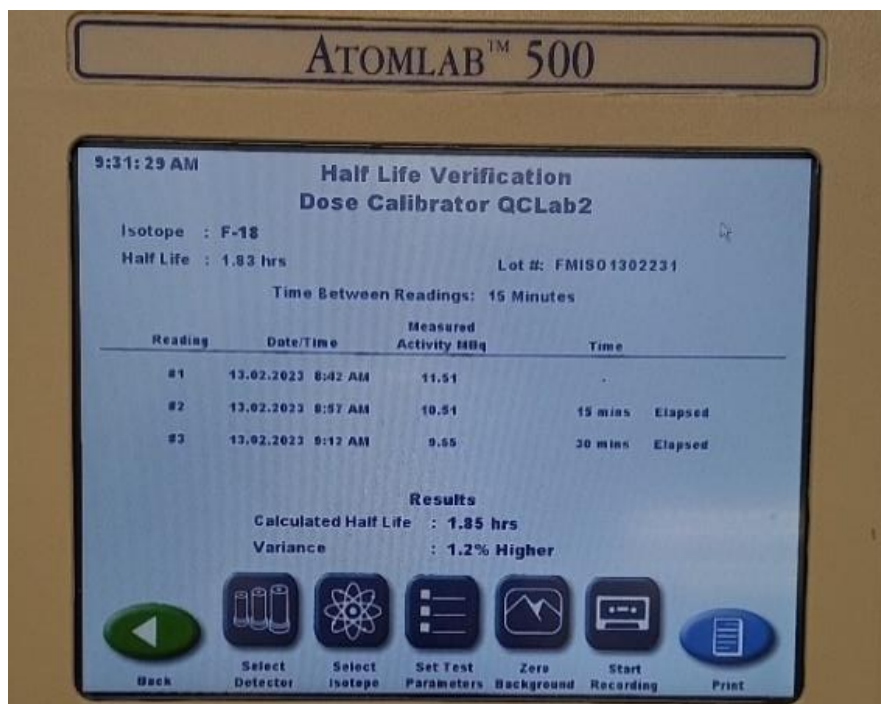
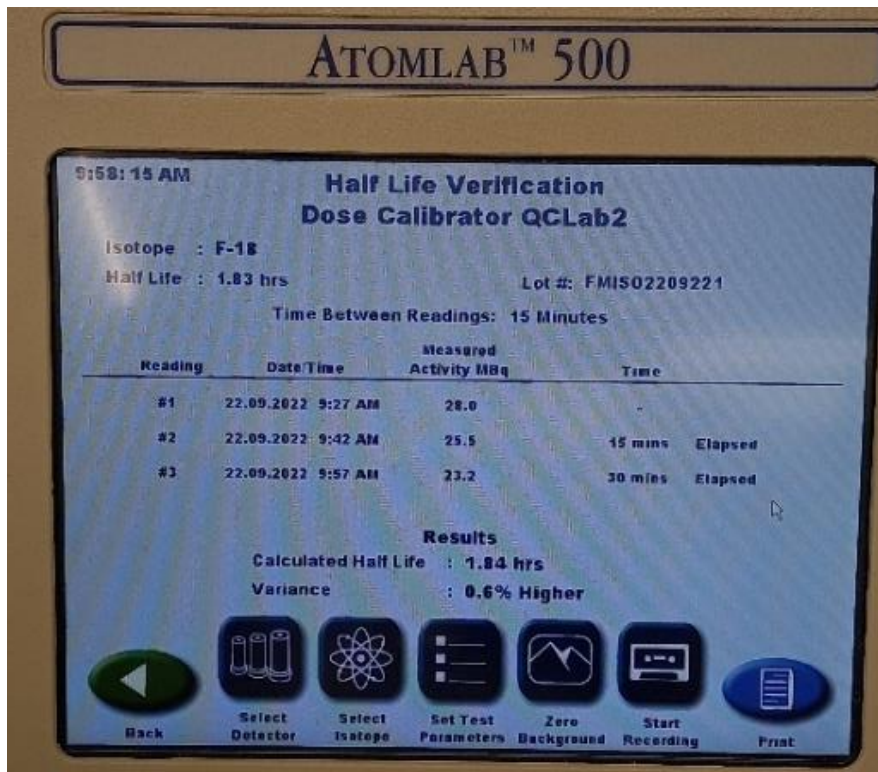
Резултатите добиени со одредување на полуживот на радиоизотопот со три последователни мерења на примерокот во ист дозен калибратор го идентификуваа [¹⁸F]F⁻ радиоизотопот.

Табела 16. Идентификација - период на полураспаѓање на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ радиоизотоп

Table 16. Identification - half-life of $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ radioisotope

Серија	Период на полураспаѓање (час) (1,75-1,92)
FMISO1904221	1.81
FMISO0106221	1.78
FMISO2607221	1.82
FMISO2707221	1.86
FMISO2807221	1.81
FMISO0408221	1.78
FMISO0508221	1.82
FMISO0908221	1.86
FMISO1008221	1.86
FMISO1108221	1.83
FMISO1708221	1.82
FMISO1808221	1.87
FMISO2308221	1.82
FMISO2408221	1.89
FMISO0709221	1.90
FMISO0909221	1.78
FMISO2209221	1.84
FMISO2309221	1.79
FMISO2909221	1.84
FMISO1010221	1.83
FMISO2110221	1.83
FMISO2612221	1.84
FMISO1611221	1.82
FMISO1811221	1.86
FMISO2911221	1.90
FMISO0912221	1.82
FMISO1012221	1.84
FMISO1512221	1.84
FMISO1612221	1.82
FMISO2212221	1.86
FMISO2312221	1.84
FMISO2612221	1.86
FMISO1302231	1.85
FMISO2803231	1.92
FMISO0905232	1.83
FMISO1505231	1.83
FMISO1905231	1.83
FMISO2306231	1.86

На слика 42 се прикажани два извештаи (по случаен избор) од мерењата направени за период на полураспаѓање на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ радиоизотопот.



Слика 42. Извештај од период на полураспаѓање
Figure 42. Half Life verification report

Во табела 17 се прикажани резултатите од идентификација на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ која се потврдува преку разликата во ретенционите времиња на главниот пик на радиохроматограмот на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ примероците и ретенционото време на

FMISO пикот од VWD хроматограмот на стандардниот раствор на радиоизотопот.

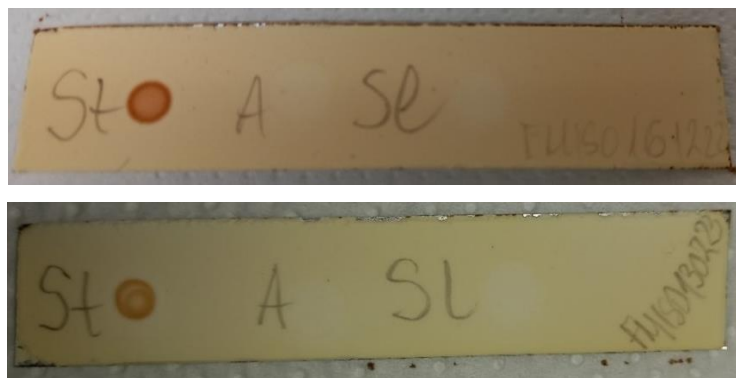
Табела 17. Идентификација - разлика во ретенционо време на [¹⁸F]FMISO примероци

Table 17. Identification - difference in retention times of [¹⁸F]FMISO samples

Серија	Rt FMISO (минути)	Rt [¹⁸ F]FMISO (минути)	Разлика во Rt (≤ 10 секунди)
FMISO2807221	5,32	5,30	1,20
FMISO0408221	5,33	5,32	0,60
FMISO0508221	5,33	5,32	0,60
FMISO0908221	5,36	5,30	3,60
FMISO1008221	5,30	5,27	1,80
FMISO1108221	5,31	5,28	1,80
FMISO1708221	5,32	5,28	2,40
FMISO1808221	5,34	5,32	1,20
FMISO2308221	5,33	5,32	0,60
FMISO2408221	5,33	5,32	0,60
FMISO0709221	5,32	5,31	0,60
FMISO0909221	5,31	5,30	0,60
FMISO2209221	5,35	5,31	2,40
FMISO2309221	5,35	5,30	3,00
FMISO2909221	5,34	5,31	1,80
FMISO1010221	5,34	5,32	1,20
FMISO2110221	5,34	5,30	2,40
FMISO1611221	5,33	5,31	1,20
FMISO1811221	5,27	5,27	0,00
FMISO2211221	5,36	5,31	3,00
FMISO2911221	5,28	5,25	1,80
FMISO0912221	5,33	5,29	2,40
FMISO0912221	5,33	5,31	1,20
FMISO1012221	5,33	5,31	1,20
FMISO1512221	5,34	5,31	1,80
FMISO1612221	5,33	5,31	1,20
FMISO2212221	5,32	5,30	1,20
FMISO2312221	5,33	5,31	1,20
FMISO2612221	5,31	5,30	0,60
FMISO1302231	5,34	5,30	2,40
FMISO1505231	5,36	5,34	1,20
FMISO1905231	5,37	5,33	2,40
FMISO2306231	5,33	5,27	3,60

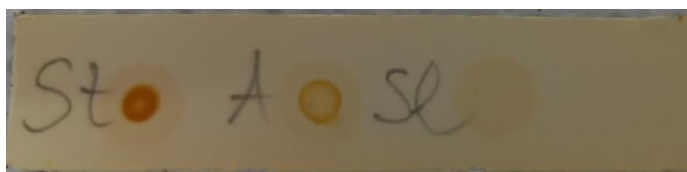
5.5.3. Хемиска чистота

Криптофиксот (K2.2.2) како хемиско онечистување беше полуквантитативно определен со TLC обоен тест и дажката од примерокот беше помалку интензивна од референтната кај сите примероци од сериите со употреба на катјон-изменувачки кертриџ. На слика 43 се прикажани две плочи како потврда на овие резултати (по случаен избор).



Слика 43. Резултати од TLC обоен тест за K 2.2.2 во два примерока
Figure 43. TLC color spot test K 2.2.2 results in two samples

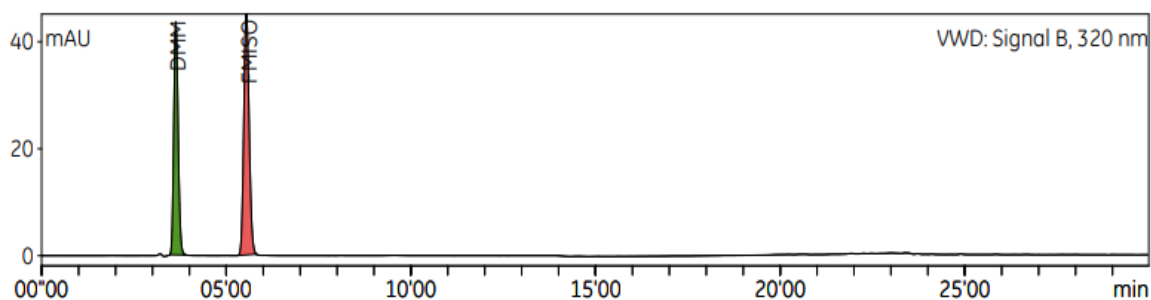
Направена е тест серија во која е отстранет катјон-изменувачкиот кертриџ (SCX) претпоставувајќи дека целата непрочистена реакциона смеса се елуира во отпад и не се очекува појава на криптофикс во финалниот примерок. Добиениот резултат од тест лентата е прикажан на слика 44.



Слика 44. Резултат од TLC обоен тест за K2.2.2 во тест серија без SCX
Figure 44. TLC color spot test K2.2.2 result in test batch without SCX

Бидејќи хемиската чистота беше предмет на оптимизација во оваа студија и дел од резултатите за хемиска чистота се претставени во претходните точки на оптимизација, во овој дел се прикажани само анализите од хемиска чистота на неколку серии во кои услови беа веќе оптимизирани.

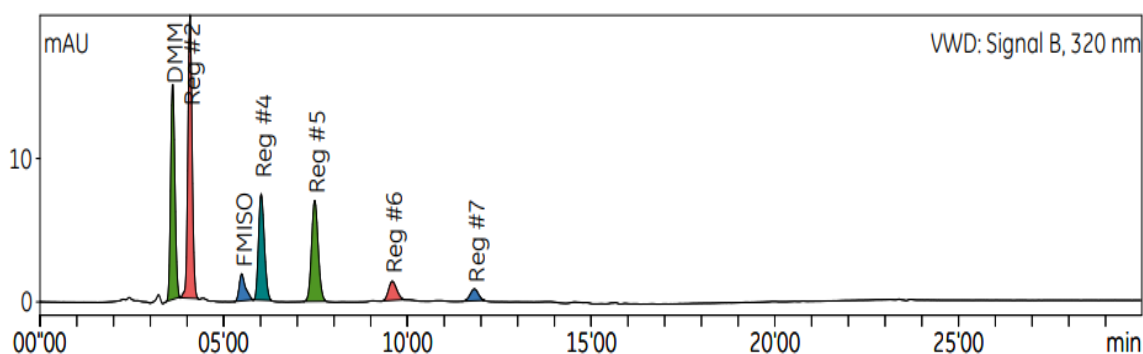
На слика 45 е прикажан еден хроматограм од стандардниот раствор (мешавина на 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMM и FMISO), а на слика 46 е претставен UV хроматограм на прочистен примерок [^{18}F]FMISO.



Integration VWD: Signal B, 320 nm

Substance	R/T s	Type	Area mAU*s	%Area %	Res
DMM	03:38	BB(M)	344.6520	43.66	-
FMISO	05:33	BB(M)	444.6998	56.34	8.10
Sum in ROI	-	-	789.3518	100.00	-

Слика 45. UV хроматограм на стандарден раствор на DMM и FMISO (10 µg/mL)
 Figure 45. UV chromatogram of DMM and FMISO reference solutions (10 µg/mL each)



Integration VWD: Signal B, 320 nm

Substance	R/T s	Type	Area mAU*s	%Area %	Res
DMM	03:37	BB(M)	118.9321	23.92	-
Reg #2	04:05	BB(M)	154.8550	31.14	2.22
FMISO	05:29	BB(M)	22.0460	4.43	5.63
Reg #4	06:01	BB(M)	81.3342	16.36	1.82
Reg #5	07:29	BB(M)	87.2042	17.54	4.72
Reg #6	09:35	BB(M)	20.3434	4.09	5.65
Reg #7	11:49	BB(M)	12.5745	2.53	5.35
Sum in ROI	-	-	497.2894	100.00	-

Integration Count rate of Channel A, Energy window=13..1600 keV

Substance	R/T s	Type	Area Counts	%Area %	Res
18F-FMISO	05:27	BB(M)	725229.5	100.00	-
Sum in ROI	-	-	725229.5	100.00	-

Слика 46. UV хроматограм на прочистен примерок [¹⁸F]FMISO
 Figure 46. UV chromatograms of the purified [¹⁸F]FMISO

5.5.4. Радиохемиска чистота

Радиохемиската чистота односно определувањето на процентот од [^{18}F]F⁻ во примерокот беше направено со анализа на радиохроматограмот од HPLC и анализа на тенкослојна хроматографија (TLC). Во табела 18 се прикажани резултатите од испитување на параметарот радиохемиска чистота со HPLC и TLC анализи на сите примероци од [^{18}F]FMISO синтетизирани со користење на комбинација на три кертриџи за прочистување.

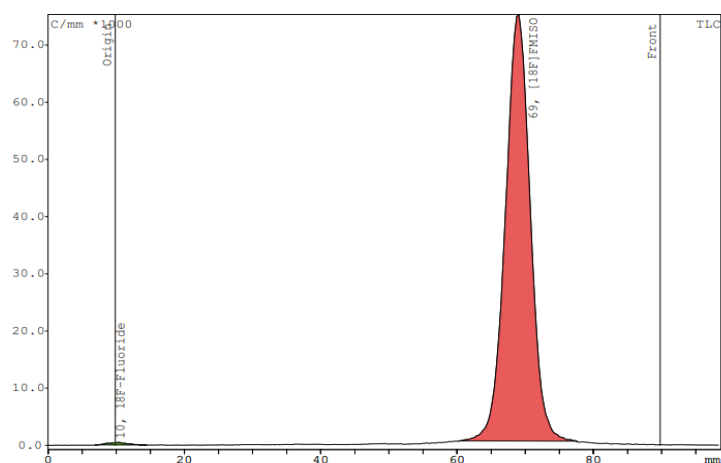
Табела 18. Радиохемиска чистота (RCP) на [^{18}F]FMISO примероци

Table 18. Radiochemical purity (RCP) of [^{18}F]FMISO samples

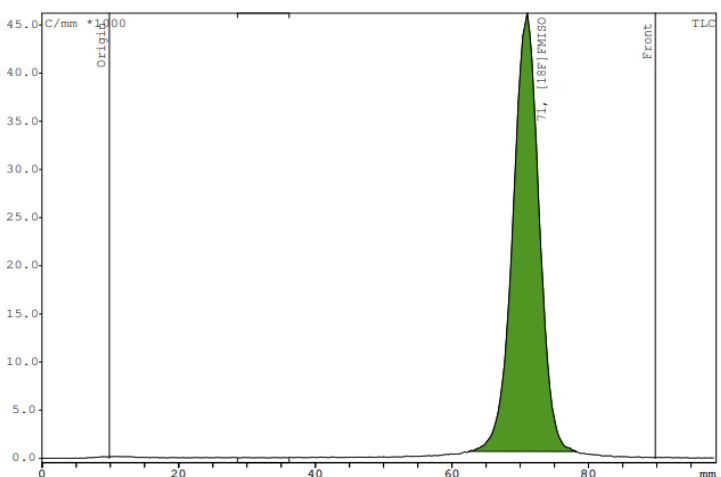
Серија	RCP [^{18}F]F ⁻ (%) HPLC	RCP [^{18}F]FMISO (%) HPLC	RCP [^{18}F]F ⁻ (%) TLC	RCP [^{18}F]FMISO (%) TLC
FMISO0106221	0	100	0	100
FMISO2607221	0	100	0	100
FMISO2807221	0	100	0	100
FMISO0408221	0	100	0	100
FMISO0508221	0	100	0	100
FMISO0908221	0	100	1.31	98.69
FMISO1008221	0	100	0.31	99.69
FMISO1108221	0	100	0	100
FMISO1708221	0	100	0	100
FMISO1808221	0	100	0	100
FMISO2408221	0	100	0	100
FMISO0709221	0	100	0	100
FMISO2209221	0	100	0	100
FMISO2309222	0	100	0.33	99.67
FMISO2909221	0	100	0	100
FMISO1010221	0	100	0	100
FMISO2110221	0	100	0	100
FMISO1611221	0	100	0	100
FMISO1811221	0	100	0	100
FMISO2211221	0	100	0	100
FMISO2911221	0	100	0	100
FMISO0912221	0	100	0	100
FMISO1012221	0	100	1.03	98.97
FMISO1512221	0	100	0	100
FMISO1612221	0	100	0	100
FMISO2212221	0	100	0.52	99.48
FMISO2312221	0	100	0	100
FMISO2612221	0	100	0.47	99.53
FMISO1302231	0	100	0.47	99.53
FMISO0905232	0	100	0	100
FMISO1505231	0	100	0.45	99.55
FMISO1905231	0	100	0	100
FMISO2306231	0	100	0	100

Со HPLC анализа беше определен $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (според спецификација во табела 4, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO} \geq 95\%$ од вкупната активност) и со TLC анализа. Исто така, со TLC беше одредено присуството на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ($[^{18}\text{F}]\text{F}$ во форма на флуорид според спецификација во табела 4, $[^{18}\text{F}]\text{F}^- \leq 5\%$ од вкупната активност), а воедно и присуството на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.

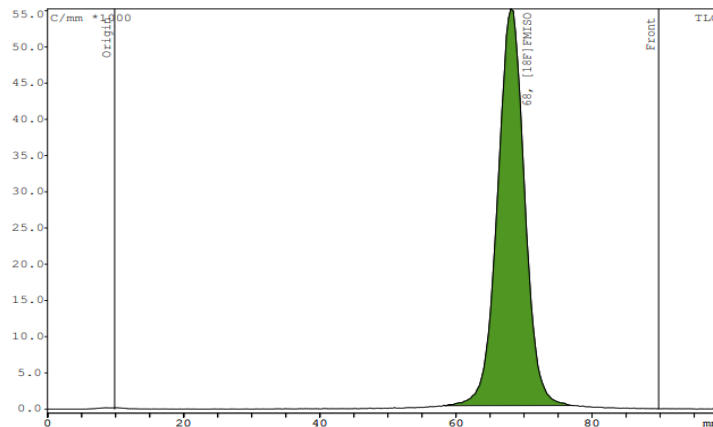
На слика 47 се прикажани три TLC хроматограми од финалните примероци (по случаен избор).



FMISO1505231



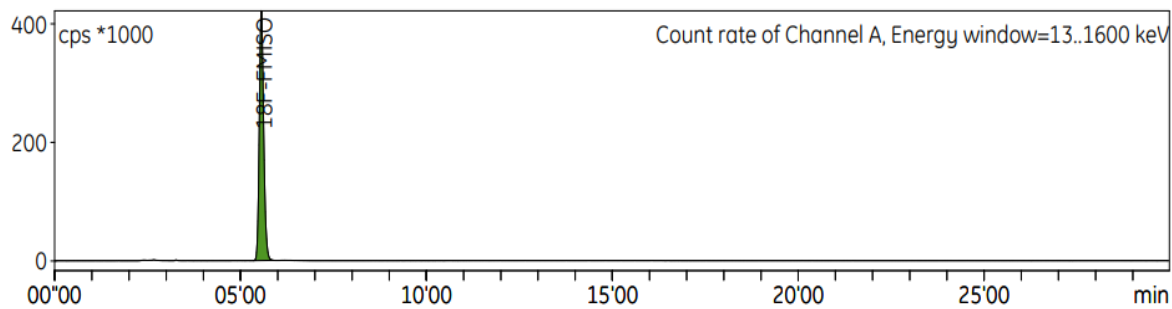
FMISO1612221



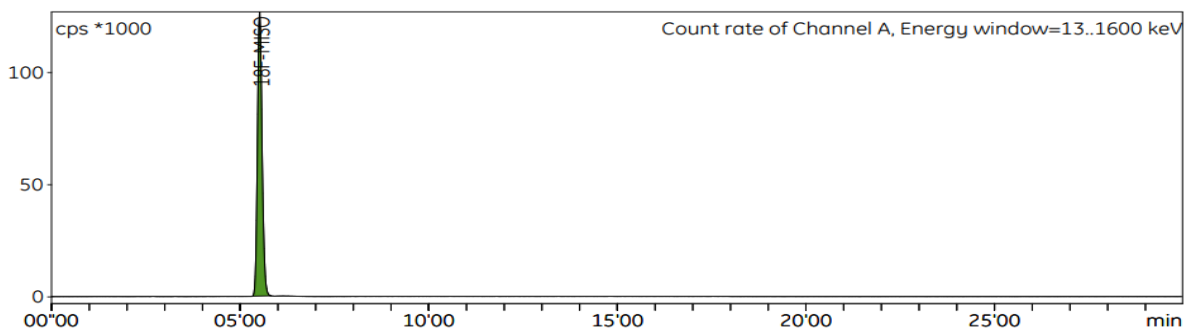
FMISO2909221

Слика 47. TLC хроматограми на прочистен $[^{18}\text{F}]$ FMISO примерок
Figure 47. Radio-TLC chromatograms of the purified $[^{18}\text{F}]$ FMISO sample

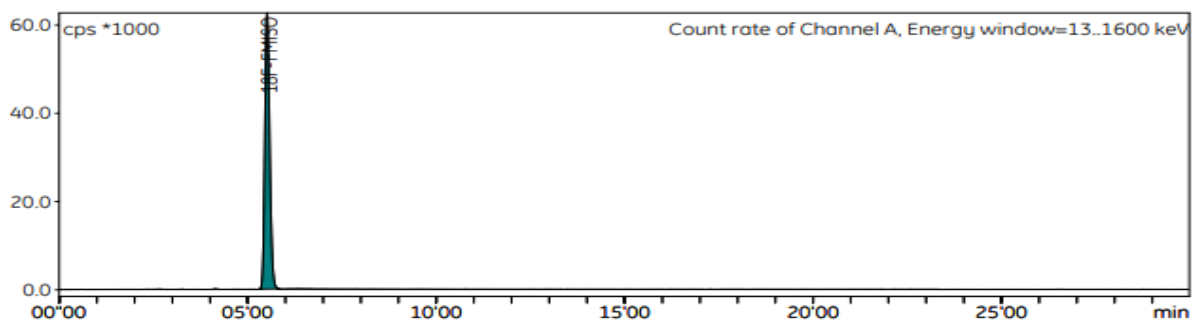
На слика 48 се прикажани три HPLC радиохроматограми (по случаен избор).



FMISO1505231



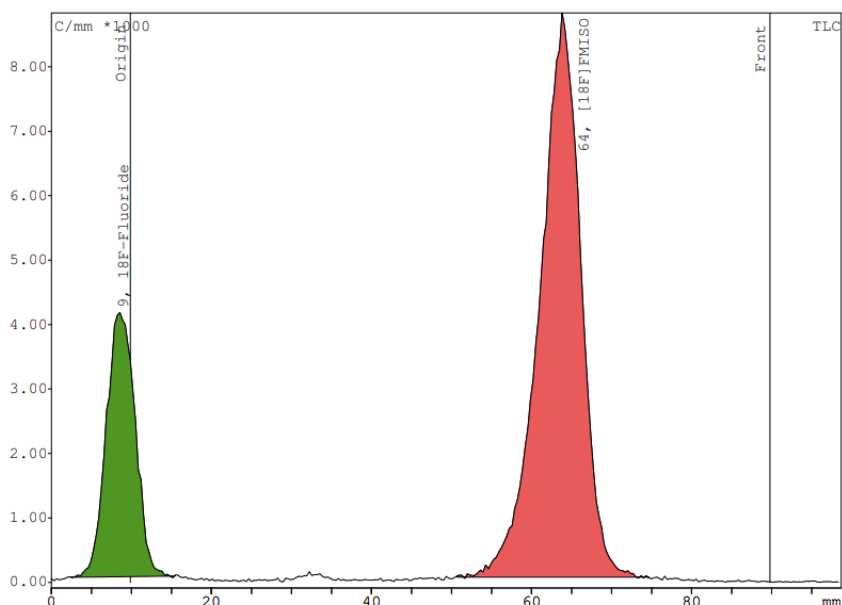
FMISO1612221



FMISO2909221

Слика 48. HPLC радиохроматограм на прочистен $[^{18}\text{F}]$ FMISO примерок
Figure 48. HPLC radio chromatograms of the purified $[^{18}\text{F}]$ FMISO

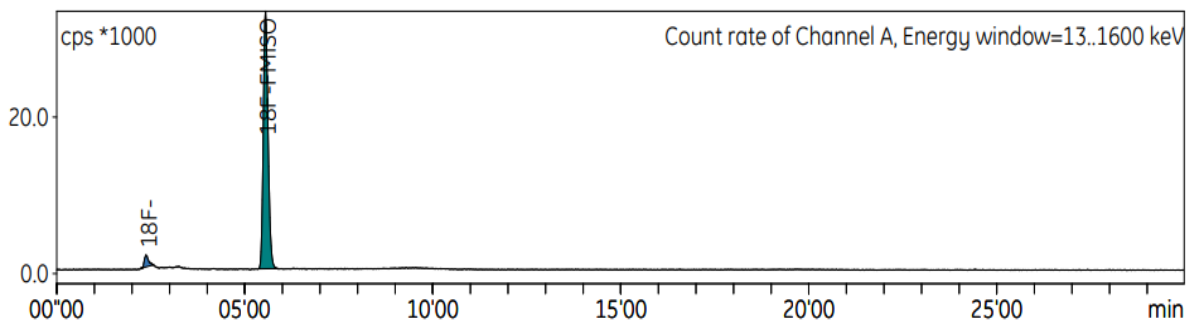
Дополнително е направена тест серија во која е отстранет ALU B кертриџот претпоставувајќи дека целата непрочистена реакциона смеса се елуира во отпад и не се очекува појава на слободен $[^{18}\text{F}]$ F⁻ во финалниот примерок. Добиениот TLC хроматограм е прикажан на слика 49, а добиениот HPLC радиохроматограм за истиот примерок е прикажан на слика 50.



Integration TLC

Substance	R/F	%	Counts	%Area %	Type	%Total %
18F-Fluoride	-0.016	24.89	17304.57	24.89	BB	23.01
$[^{18}\text{F}]$ FMISO	0.675	75.11	52228.07	75.11	BB	69.45
Sum in ROI			69532.64	100.00		
Total area			75204.00			
Area (total) RF			61751.00			

Слика 49. TLC хроматограм на прочистен $[^{18}\text{F}]$ FMISO примерок без ALU B кертриџ за прочистување
Figure 49. Radio-TLC of the purified $[^{18}\text{F}]$ FMISO solution without ALU B cartridge



Integration Count rate of Channel A, Energy window=13..1600 keV

Substance	R/T s	Type	Area Counts	%Area %
18F-	02'23	BB(M)	11091.0	3.77
18F-FMISO	05'33	BB(M)	282850.0	96.23
Sum in ROI	-	-	293941.0	100.00

Слика 50. HPLC радиохромограм на прочистен [^{18}F]FMISO примерок без ALU B кертриџ за прочистување

Figure 50. HPLC radio chromatograms of the purified [^{18}F]FMISO without ALU B cartridge

5.5.5. Резидуалните растворувачи

Анализата беше изведена согласно со методите дефинирани во 2.4.24 Идентификација и контрола на резидуални растворувачи (Ph. Eur. 10.0, 20424 (01/2017)). Концентрацијата на етанол треба да биде помала од 10 % V/V односно помала од 2.5 g на една администрирана доза (од 10 mL) или 250 mg/mL. Концентрацијата на ацетонитрил треба да биде помала од 410 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Во табела 19 се прикажани резултатите од концентрација на резидуалните растворувачи (етанол и ацетонитрил) во [^{18}F]FMISO примероци.

Табела 19. Концентрација на резидуалните растворувачи (етанол и ацетонитрил) во [¹⁸F]FMISO примероци

Table 19. Concentration of residual solvents (ethanol and acetonitrile) in [¹⁸F]FMISO samples

Елуција со 5 % етанолен раствор во вода	Етанол (mg/mL)	Ацетонитрил (µg/ml)
FMISO1708221	17.719	19.769
FMISO1808221	18.614	15.233
FMISO0909221	16.569	20.871
FMISO2209221	29.022	32.043
FMISO2309221	16.480	13.705
FMISO1310221	20.791	15.668
FMISO1611221	17.742	25.106
FMISO2911221	25.818	23.865
FMISO0912221	15.351	25.592
FMISO1012221	13.174	40.104
FMISO2612221	18.442	19.009
FMISO1302231	11.980	17.385
FMISO1010221	18.097	24.368
FMISO0709221	18.394	78.878
FMISO2803231	12.435	66.607
Елуција со 10 % етанолен раствор во вода	Етанол (mg/mL)	Ацетонитрил (µg/ml)
FMISO2402231	37.513	13.737
FMISO2909221	19.415	29.669
FMISO1010221	18.097	24.368
FMISO2211221	29.933	24.018
FMISO1512221	29.830	32.548
FMISO1612221	24.431	12.711
FMISO2212221	31.468	32.035

5.5.6. Радионуклидна чистота

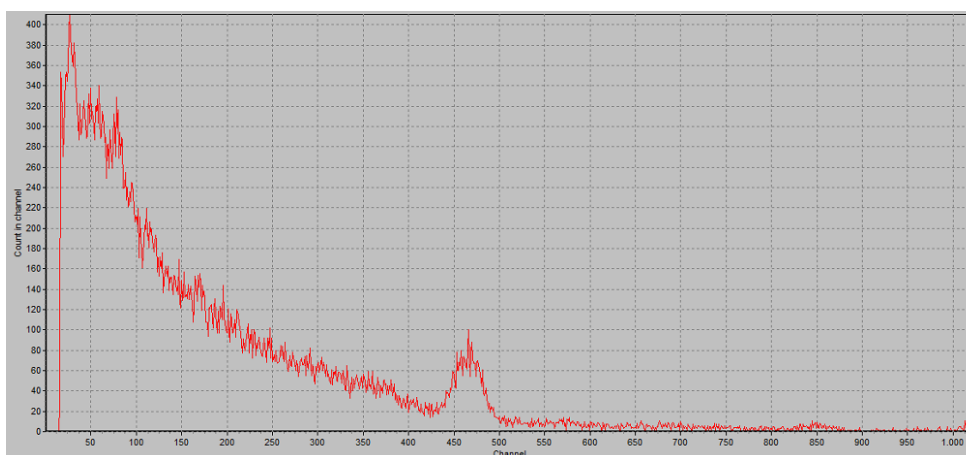
Радионуклидната чистота беше одредена на дел од финалните примероци од [¹⁸F]FMISO.

Во табела 20 се прикажани добиените резултати од вкупни радионуклидни онечистувања на финалните примероци изразени во проценти.

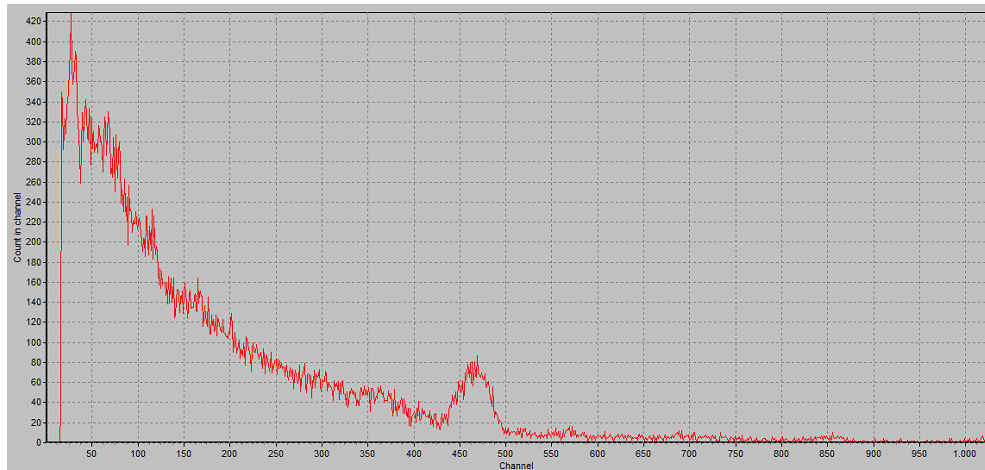
Табела 20. Радионуклидна чистота на [¹⁸F]FMISO примероци
Table 20. Radionuclidic purity of [¹⁸F]FMISO samples

Серија	Вкупни радионуклидни онечистувања (%)
FMISO0709221	3.21×10^{-06}
FMISO0909221	1.88×10^{-06}
FMISO1010221	1.79×10^{-06}
FMISO1505231	2.99×10^{-06}
FMISO1611221	1.48×10^{-06}
FMISO1612221	5.46×10^{-07}
FMISO1708221	1.51×10^{-05}
FMISO1808221	2.66×10^{-05}
FMISO1811221	1.33×10^{-06}
FMISO1905231	9.62×10^{-07}
FMISO2110221	6.55×10^{-07}
FMISO2209221	2.06×10^{-06}
FMISO2211221	1.18×10^{-06}
FMISO2308221	4.77×10^{-05}
FMISO2309221	1.49×10^{-06}
FMISO2408221	5.03×10^{-06}
FMISO2612221	2.88×10^{-06}
FMISO2908221	7.48×10^{-07}
FMISO2911221	9.70×10^{-07}
FMISO1512221	6.06×10^{-07}

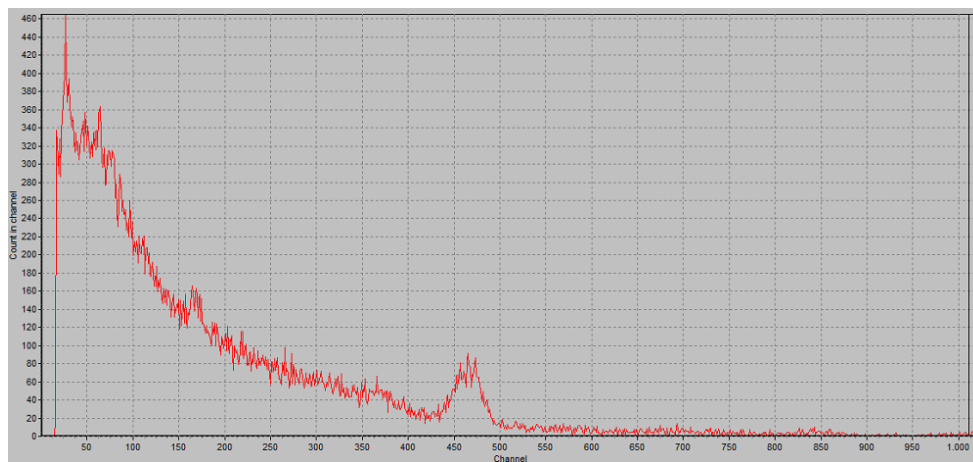
На слика 51 се прикажани три спектри од радионуклидните онечистувања на финалните примероци (по случаен избор).



FMISO1905221



FMISO1612221



FMISO2309221

Слика 51. Гама спектри на [^{18}F]FMISO примероци
Figure 51. Gamma spectrums of [^{18}F]FMISO samples

5.5.7. Бактериски ендотоксини

Вкупно три серии беа изведени во асептични услови. Делењето беше изведено со апарат за делење Clío. Првата доза беше примерок за контрола на квалитет и беше наполнет волумен од 1 mL во стерилно шише. На овој примерок беше испитана концентрацијата на бактериски ендотоксини (LAL-тест). Откако беа поделени сите дози беше изведен тест за интегритет на филтер (анг. Bubble Point Integrity Testing, со кратенка BPT) за да се докаже ефикасноста на користениот филтер за стерилизација.

На слика 52 се прикажани извештаите од бактериски ендотоксини на овие серии.


```

***** ENDOSAFE Test Record *****
      V712F 3/26/2015
DateTime: ..... 26-12-22 @ 08:35:05
Device: ..... 8714
OperatorID: ..... MAJACH
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 1861157
Cartridge Cal Code: ..... 512132753680
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 121-727
Onset Times: ..... >727 256 >727 290
Slope: -0.389 ..... Intercept: +2.355
Dilution: ..... 100
Sample Lot: ..... FMS02612221
Sample ID: ..... 18FFMISO
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.569 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 8.8% Pass
Spike Recovery: ..... 102% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample Value: ..... <5.00 EU/mL

***** ENDOSAFE Test Record *****
      V712F 3/26/2015
DateTime: ..... 09-05-23 @ 06:37:13
Device: ..... 7577
OperatorID: ..... MAJAV
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 2769126
Cartridge Cal Code: ..... 513933583359
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 139-735
Onset Times: ..... >735 314 >735 336
Slope: -0.362 ..... Intercept: +2.396
Dilution: ..... 100
Sample Lot: ..... FMS00905231
Sample ID: ..... 18FFMISO
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.427 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 4.8% Pass
Spike Recovery: ..... 81% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample Value: ..... <5.00 EU/mL

***** ENDOSAFE Test Record *****
      V712J 3/17/2022
DateTime: ..... 15-05-23 @ 07:40:26
Device: ..... 7577
OperatorID: ..... MAJACH
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 2769126
Cartridge Cal Code: ..... 513933583359
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 139-735
Onset Times: ..... >735 312 >735 322
Slope: -0.362 ..... Intercept: +2.396
Dilutions: ..... 100
Sample Lot: ..... FMS01505231
Sample ID: ..... 18FFMISO
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.462 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 2.2% Pass
Spike Recovery: ..... 87% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample Value: ..... <5.00 EU/mL

```

Слика 52. Извештаи од LAL-тест за бактериски ендотоксини

Figure 52. LAL test reports for bacterial endotoxins

5.5.8. Тестирање на стерилност

За истите серии произведени во асептични услови како што е наведено во претходната точка е направен и тест за стерилност. Критериум на прифатливост е испитуваниот примерокот да биде стерилен. На слика 53, 54 и 55 се прикажани извештаите од тестот за стерилност.



ЈЗУ ИНСТИТУТ ЗА ЈАВНО ЗДРАВЈЕ НА РСМАКЕДОНИЈА
Оддел за микробиологија
-Одделение за микробиолошка контрола на храна и лекови-
ул. 50 Дивизија бр.6 1000 Скопје, Тел.: +389 2 3125 044, Факс: 389 2 3223-354
Пошт.факс 5779 Трезорска сметка - 10000000066005 - Народна банка
Сметка на Буџетски корисник: 6602500053-531-56
Приходна шифра: 723819, ЕДБ:4030982108064
www.jph.mk

Лабораториски број: 384/1338/22

Дата на прием: 28.12.2022 год.

Страна: 1/1

**ИЗВЕШТАЈ ОД ТЕСТИРАЊЕ НА МИКРОБИОЛОШКИ КВАЛИТЕТ
НА СТЕРИЛЕН ФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТ**

Примерок за тестирање: **FMISO2612221_Hot test**
Серија: FMISO2612221 Количество: -
Произведено: - Рок на употреба: -
Производител: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Доставено од: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Со писмо бр.: 05-2/256 од 26.12.2022 година
Со цел: стерилност
Барање/Метода: Ph.Eur. / 04/2011:20601

Параметар	Спецификација	Резултат
Стерилност	Стерилен раствор	Одговара

ЗАКЛУЧОК: Согласно микробиолошкиот наод, доставениот примерок за тестирање **ОДГОВАРА** на прописите на Ph.Eur монографија 04/2011:2060 "Sterility".

Дата: 11.01.2023 година
Скопје

Изработил,

Раководител на
Одделение за микробиолошка
контрола на храна и лекови

РАКОВОДИТЕЛ на
Оддел за микробиологија

Д-р Татјана Цуцуловска,
специјалист микробиолог

Прим.д-р Елизабета Цонева,
специјалист микробиолог

Д-р Дугагин Османи,
специјалист микробиолог.

Резултатите од извештајот за тестирање се однесуваат само на доставениот примерок.

0101 ОБ 7.8.3 201 Верзија 1

Слика 53. Извештај од тестирање на стерилност за серија FMISO2612221
Figure 53. Sterility test report for batch FMISO2612221



ЈЗУ ИНСТИТУТ ЗА ЈАВНО ЗДРАВЈЕ НА РСМАКЕДОНИЈА
Оддел за микробиологија
-Одделение за микробиолошка контрола на храна и лекови-
ул. 50 Дивизија бр.6 1000 Скопје; Тел.: +389 2 3125 044, Факс: 389 2 3223-354
Пошт.факс 577* Трезорска сметка - 10000000066005 - Народна банка
Сметка на Буџетски корисник: 6602500053-531-56
Приходна шифра: 723819; ЕДБ:4030982108064
www.iph.mk

Лабораториски број: 172/067/23

Дата на прием: 16.05.2023 год.

Страна: 1/1

**ИЗВЕШТАЈ ОД ТЕСТИРАЊЕ НА МИКРОБИОЛОШКИ КВАЛИТЕТ
НА СТЕРИЛЕН ФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТ**

Примерок за тестирање: **FMISO0905231**
Серија: FMISO0905231 Количество: -
Произведено: - Рок на употреба: -
Производител: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Доставено од: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Со писмо бр.: 05-1/95 од 15.05.2023 година
Со цел: стерилност
Барање/Метода: Ph.Eur. / 04/2011:20601

Параметар	Спецификација	Резултат
Стерилност	Стерилен / отсуство на раст	Одговара

ЗАКЛУЧОК: Согласно микробиолошкиот наод, доставениот примерок за тестирање **ОДГОВАРА** на прописите на Ph.Eur монографија 04/2011:20601 “Sterility”.

Дата: 08.06.2023 година
Скопје

Изработил,

Д-р Татјана Цуцуловска,
специјалист микробиолог

Раководител на
Одделение за микробиолошка
контрола на храна и лекови

Прим.д-р Елизабета Цонева,
специјалист микробиолог

РАКОВОДИТЕЛ на
Оддел за микробиологија

Д-р Дугагин Османи,
специјалист микробиолог



Резултатите од извештајот за тестирање се однесуваат само на доставениот примерок.

0101 ОБ 7.8.3 201 Верзија 2

Слика 54. Извештај од тестирање на стерилност за серија FMISO0905231
Figure 54. Sterility test report for batch FMISO0905231



ЈЗУ ИНСТИТУТ ЗА ЈАВНО ЗДРАВЈЕ НА РСМАКЕДОНИЈА
Оддел за микробиологија
-Одделение за микробиолошка контрола на храна и лекови-
ул. 50 Дивизија бр. 6 1000 Скопје; Тел.: +389 2 3 125 044, Факс: 389 2 3223-354
Пошт.факс 577* Трезорска сметка - 100000000066005 - Народна банка
Сметка на Буџетски корисник: 6602500053-531-56
Приходна шифра: 723819; ЕДБ:4030982108064
www.iph.mk

Лабораториски број: 177/0666/23

Дата на прием: 25.05.2023 год.

Страна: 1/1

**ИЗВЕШТАЈ ОД ТЕСТИРАЊЕ НА МИКРОБИОЛОШКИ КВАЛИТЕТ
НА СТЕРИЛЕН ФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТ**

Примерок за тестирање: **FMISO1505231**
Серија: FMISO1505231 Количество: -
Произведено: - Рок на употреба: -
Производител: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Доставено од: Јавна здравствена установа - Универзитетски институт за позитронско – емисиона томографија на РС Македонија, Скопје
Со писмо бр.: 05-1/100 од 22.05.2023 година
Со цел: стерилност
Барање/Метода: Ph.Eur. / 04/2011:20601

Параметар	Спецификација	Резултат
Стерилност	Стерилен / отсуство на раст	Одговара

ЗАКЛУЧОК: Согласно микробиолошкиот наод, доставениот примерок за тестирање **ОДГОВАРА** на прописите на Ph.Eur монографија 04/2011:20601 "Sterility".

Дата: 08.06.2023 година
Скопје

Изработил,

Раководител на
Одделение за микробиолошка
контрола на храна и лекови

РАКОВОДИТЕЛ на
Оддел за микробиологија

Д-р Татјана Цуцуловска,
специјалист микробиолог

Прим.д-р Елизабета Цонева,
специјалист микробиолог

Д-р Дугагин Османи,
специјалист микробиолог



Резултатите од извештајот за тестирање се однесуваат само на доставениот примерок.

0101 ОБ 7.8.3 201 Верзија 2

Слика 55. Извештај од тестирање на стерилност за серија FMISO1505231
Figure 55. Sterility test report for batch FMISO1505231

5.5.9. Тестови за стабилност

Фреквенцијата на тестирање треба да биде доволна за да се утврди профилот на стабилност на радиофармацевтикот и беше дефинирана на секои два часа во рок од десет часа. Тестовите беа спроведени во шест точки: крај на синтеза (0 h), на два часа (2 h), на четири часа (4 h), на шест часа (6 h), на осум часа (8 h) и на десет часа (10 h). Тестовите за бактериски ендотоксини, стерилност, резидуални растворувачи и радионуклидна чистота беа изведени во првата и последната дефинирана точка, односно (0 h) и (10 h). Период на полураспаѓање и разлика во ретенционо време беа определени во првата и претпоследната и последната дефинирана точка, односно (0 h), (8 h) и (10 h). Сите резултати се прикажани во табела 21.

Табела 21. Резултати од тест за стабилност
Table 21. Data from the stability testing

Тест	Дозволен гранични вредности	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
Изглед	Бистар, безбоен или слабо жолтеникав раствор	да	/	/	/	да	да
Приближна рН вредност	4,5 - 8,5	6,5 - 7	7	7	7	7-7,5	7-7,5
Идентификација							
Период на полураспаѓање	1,75-1,92 часа	1,83	/	/	/	1,82	1,82
Разлика во ретенционо време	≤ 10 секунди	1.20	/	/	/	1.20	1.20
Хемиска чистота							
FMISO	≤ 10 mg/mL	0,36	0,36	0,35	0,34	0,33	0,33
DMM	≤ 10 mg/mL	4,48	4,63	4,45	4,35	3,51	3,28
Кое било друго онечистување*	< AUC _{St.FMISO} *	<AUC _{St.FMISO}	<AUC _{St.FMISO}	<AUC _{St.FMISO}	<AUC _{St.FMISO}	<AUC _{St.FMISO}	<AUC _{St.FMISO}
Вкупни онечистувања**	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO} **	ΣAUC < 5x AUC _{St.FMISO}	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO}	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO}	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO}	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO}	ΣAUC < 5 x AUC _{St.FMISO}
Криптофикс	Дамката од примерокот е помалку интензивна од референтната	Нема обојување	/	/	/	Нема обојување	Нема обојување
Радиохемика чистота							
[¹⁸ F]Fluoride	[¹⁸ F]F ≤ 5% од вкупната активност	0,45 %	0,38 %	0,40%	0,35 %	0,32 %	0,30 %
[¹⁸ F]FMISO	≥ 95 % од вкупната активност	99,6%	99,5%	99,5%	99,4%	99,4%	99,3%
Бактериски ендотоксини	< 17,5 IU/mL	<5 IU/mL	/	/	/	< 5IU/mL	< 5IU/mL
Стерилност	Стерилен примерок	/	/	/	/	/	Стерилен
Радионуклидна чистота	≤ 0,1 % од вкупната радиоактивност	/	/	/	/	/	3.45x10 ⁻⁰⁶
Резидуални растворувачи							
Етанол	< 250 mg/mL	/	/	/	/	/	31,468
Ацетонитрил	< 410 µg/mL	/	/	/	/	/	32,035

*Површината под најголемиот пик од кое било друго онечистување од хроматограмот на примерокот да не биде поголема од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (≤ 10 µg/mL) ** Збирот од површините под сите пикови над границата на отфрлување (0,03 µg/mL) од хроматограмот на примерокот да не биде поголем од 5 x површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (≤ 50 µg/mL).

6. Дискусија

Различни цврсти тумори покажуваат недостаток на кислород како резултат на брз раст или недоволна туморска ангиогенеза, а таквата хипоксија ја забрзува малигната прогресија и метастатичкиот потенцијал на примарните малигноми и доведува до отпорност кон антиканцерогените лекови и намален одговор на радиотерапија (Challapalli et al., 2017; Gouel et al., 2023). Како инвазивната техника за мерење на хипоксични фракции во тумори се користи стандардната техника со компјутеризирани поларографски електроди осетливи на кислород. Меѓутоа, како неинвазивен пристап за откривање на туморска хипоксија се смета позитронско-емисионата томографија со употреба на 2-нитроимидазолни радиофармацевтски препарати.

Во текот на последната деценија, различни деривати на 2-нитроимидазол се истражувани за хипоксија, но како најшироко користен ПЕТ РФП за туморска хипоксија е [^{18}F]FMISO. Од неговото воведување пред повеќе од 30 години, радиофармацевтските хемичари прават постојан напор за поедноставување на синтезата на [^{18}F]FMISO. До денес се користат голем број на автоматизирани методи, коишто користат касети за синтеза усогласени со барањата на ДПП. Со оглед на тоа дека интересот за [^{18}F]FMISO е сè уште голем, главната цел на ова истражување беше да се развие едноставен и ефикасен метод за синтеза на [^{18}F]FMISO со SPE прочистување. Земајќи ги предвид сите досегашни објавени методи за синтеза на [^{18}F]FMISO и прочистување, во текот на ова истражување беа тестирани повеќе параметри, со цел да се идентификуваат оптимални услови за синтеза и прочистување и да се добие финален производ на [^{18}F]FMISO со висок квалитет и принос. Како основна и прва цел за воведување на синтеза на [^{18}F]FMISO ни беше потребно креирање на секвенца за автоматска синтеза.

6.1. Оптимизација на секвенца за автоматска синтеза

Почетните експерименти од овој труд беа креирање, модифицирање и симулација на синтеза. Сè до воспоставување на оптимални услови и целосна оптимизација на секвенцата за автоматска синтеза сите експерименти беа направени без активност. За поедноставување и скратување на времето за изработка на секвенцата, како основа за секвенца беше преземена секвенцата

која се користи за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Како што е опишано во дел 2.11, начинот на синтеза е сличен за овие два РФП односно чекорите сè до радиофлуоринација се исти. Според тоа, за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ се модифицирани сите чекори по радиофлуоринацијата, а се додадени и нови чекори кои беа потребни за соодветно прочистување на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$.

Клучен аспект е изборот на команда и стратегијата за дизајнирање на таа команда. На слика 22 е прикажана работната површина за креирање, модифицирање и додавање нови чекори во секвенцата за синтеза. Од лева страна може да ја прегледуваме секвенцата, а од десна страна да ги променуваме или додаваме командите. Откако се наместени сите чекори согласно со потребите за синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, направени се пробни тестови со симулација на синтеза со соодветни реагенси и кертриџи за да се провери функционалноста на секој зададен чекор. Преку прикажаниот прозорец (интерфејс) на слика 23 можеме да ги следиме (или контролираме во мануелен режим) сите зададени команди и операциите кои притоа се извршуваат. За да го следиме процесот и преку шематски приказ креираваме соодветна шема (централен дел во сликата) којашто ја отсликува касетата за синтезата на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. Преку оваа шема можеме да го следиме отворањето и затворањето на вентилите за проток на реагенсите од соодветните шишенца, како и сите останати вентили кои се наоѓаат на IFP касетата. Дополнително можеме да ги следиме притисокот, температурата и нивото на активност во реакционото шише (калибраторот за мерење на активност се наоѓа под печката за реакционото шише). Освен како реална вредност овие параметри можеме да ги следиме и преку графичкиот приказ од почетокот до крајот на синтезата. Графичкиот приказ имаше важна улога во следењето и визуализацијата на напредокот на синтезата во реално време.

Пред тестирање на секвенцата беа извршени сите потребни проверки за започнување со синтезата: визуелната проверка на IFP касетата, адаптирање на правилна насока на вентилите и правилна позицијата на реагенсите, поврзувањето на правилна линија на кертиците, како и самотеститање на модулот за синтеза и на касетата. По повикувањето (одбирањето) на секвенцата и започнувањето на синтезата ги следевме сите зададени активности во секој чекор од секвенцата.

Спроведените тестови без радиоактивност покажаа дека соодветно се воведуваат сите чекори според зададениот редослед во секвенцата, дека вентилите од IFP касетата соодветно се отвораат и затвораат според сетираниите операции, дека вентилите за гас и вакуум (V14, V15 и V16) соодветно се регулираат и дека пумпата соодветно функционира. Правилниот проток на растворот од шишето со реагенс до реакционото шише беше предизвик за време на тестот за имплементација на секвенца. За време на оптимизацијата на секвенцата на синтезата беше забележано дека има случаи на истекување или нецелосно пренесување на растворот во реакционото шише. Откриено беше дека проблемот со нецелосно пренесување зависи од командата во секвенца која се однесува на времето и начинот на трансферот на целосниот волумен. Тие чекори беа модифицирани и тој проблем беше надминат. Во случајот на протекување на растворот надвор од шишето во моментот кога треба да се трансферира растворот во реакционото шише, проблемот не се однесуваше на секвенцата туку се потврди дека зависи од типот на септата која е дел на алуминиумското капаче на шишето. Се потврди дека септата треба да биде со доволно широк напречен пресек и да биде многу добро затворена со затвораот, но од друга страна треба да биде лесна за пробивање за да може да навлезе иглата. Беше променет материјалот на септата и потоа успешно беше решен и тој проблем. Исто така, се потврди дека има правилен пренос на финалниот производ од реакционото шише преку кертриците за прочистување до шишето за отпаден раствор, правилен пренос на финалниот производ со растворот за елуирање од реакционото шише преку кертриците за прочистување до шишето за финален производ. Правилно спроведената синтеза освен визуелно се потврдува и со графиконот којшто е составен дел од извештајот прикажан на слика 24. Графиконот од синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ прикажан на слика 25, каде што на у-оската од десна страна е прикажан притисокот (kPa) што на графиконот е обележан со сина линија, а од лева страна е прикажана температурата ($^{\circ}\text{C}$) на графиконот обележана со црвена линија и активноста (Ci) на графиконот обележана со зелена линија. На x-оската е прикажано времето во минути.

Дополнително вметнатите жолти линии со број го означуваат почетокот/крајот на чекорот.

Описот за сите чекори од графиконот е следниот:

- ✓ од 1 до 2: испорака на производениот раствор на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$;
- ✓ од 2 до 3: трансфер на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ преку анјон-изменувачкиот кертриц и задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ на кертрицот;
- ✓ од 3 до 4: трансфер на раствор на криптанд (шише 1) во реакционо шише и елуција на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ од анјон-изменувачкиот кертриц;
- ✓ од 4 до 5: започнато сушење на температура од 110 °C сè до означената линија 5;
- ✓ од 5 до 6: сушењето продолжува со проток на хелиум до реакционото шише и под дејство на вакуум до отпад во неколкукратни интервали наизменично (flush and dry) распределени во 3 чекори;
- ✓ од 6 до 7: трансфер на прекурсорот (шише 2) во реакционото шише;
- ✓ од 7 до 8: реакција на флуоринација;
- ✓ од 8 до 9: ладење на реакционата смеса;
- ✓ од 9 до 10: сушење на реакционата смеса под вакуум;
- ✓ од 10 до 11: проток на хелиум низ линиите и реакционото шише до отпад (flush);
- ✓ од 11 до 12: трансфер на раствор за хидролиза (шише 3) и реакција на хидролиза;
- ✓ од 12 до 13: трансфер на реакционата смеса низ кертриците за прочистување до шишето за отпаден раствор. Во овој чекор $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ е задржан на реверзно-фазниот кертриц, додека онечистувањата се насочени кон отпадното шише. Дел од онечистувањата беа задржани на SCX кертрицот;
- ✓ од 13 до 14: трансфер на $\frac{1}{4}$ од растворот за елуција на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (шише 4) во реакционото шише и прва елуција на финалниот производ со поминување на растворот низ кертриците за прочистување (трансфер 1) и собирање на финалниот производ;
- ✓ од 14 до 15: трансфер на остатокот од растворот за елуција во реакционото шише;
- ✓ од 15 до 16: втора елуција и собирање на финалниот производ (трансфер 2).

За ефикасна синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ беше потребно исполнување на голем број на фактори, а сите тие имаат одредено влијание врз целокупниот процес.

Најпрво беа оптимизирани почетните услови во реакциите пред радиофлуоринација, па потоа во реакција на радиофлуоринација, во условите во реакцијата по радиофлуоринација и во начинот на прочистување. Иако овде можеме да се повикаме на многубројните разработени студии за стандардниот процес за синтеза (со HPLC прочистување), сепак мора да се истакне дека во оваа студија беше применета SPE технологија како нов пристап на прочистување при синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$. Механизмите на раздвојување за двете техники се исти, но динамиката на секоја техника е многу различна. Со HPLC единицата сепарацијата односно прочистувањето се одвива во систем на мобилна фаза кој постојано тече. Додека пак SPE прочистувањето се изведува во серија на еден или повеќе чекори кои треба добро да бидат дефинирани однапред за да може успешно да се изведе прочистувањето. Постапката зависи од тоа дали финалниот производ треба да помине преку цврстата фаза, додека онечистувањата да се задржат на кертриците или пак финалниот производ да се задржи, а онечистувањата да поминат преку цврстата фаза, што е проследено со понатамошна елуција на продуктот со соодветен растворувач. Типот на кертрицот, природата на цврстата фаза, како и начинот и механизмите на одвојување имаат големо влијание врз ефикасноста на прочистувањето.

6.2. Оптимизација на процесот за синтеза

Влијанието на почетните услови во реакциите пред радиофлуоринација беше потврдено преку почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, типот на анјон-разменувачкиот кертриц за задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ и растворот за елуција на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Од резултатите во табела 6 може да се забележи дека во испитуваниот опсег од минимум 4.74 до максимум 19.20 GBq почетната активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$, незначително влијае на приносот. За минимална активност ($5 \text{ GBq} \pm 5 \%$) од $4.97 \pm 0.23 \text{ GBq}$ приносот беше $45.66 \pm 0.40\%$ (d.c.), за средна активност ($20 \text{ GBq} \pm 10 \%$) од $19.30 \pm 0.67 \text{ GBq}$ приносот беше $44.34 \pm 4.28\%$ (d.c.). Во услови на максимална активност ($60 \text{ GBq} \pm 10 \%$) со почетна активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ од $63.62 \pm 10.22 \text{ GBq}$ се добива принос од $34.01 \pm 4.10\%$ (d.c.). Ако земеме предвид дека сите синтези беа спроведени под исти услови, овој негативен тренд на приносот може да се должи на почетната активност на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Како што е наведено во дел 2.1 за време на озрачувањето се јавуваат хемиски и радионуклидни онечистувања коишто и покрај нивното трансферирање во отпадната вода при

чекорот на задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ анјон-разменувачкиот кертриџ сепак дел заостануваат на кертриџот и се елуираат заедно со $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ во реакционата смеса. Таквите хемиски онечистувања можат да имаат влијание во реакцијата на радиофлуоринација. Во секој случај потребно е понатамошно следење на ова влијание со цел да се потврди дали трендот на опаѓање е помал од овој случај, бидејќи вообичаено таквиот тренд се среќава во студиите од литературните податоци, но со помала разлика во приносот помеѓу групите од почетната активност (Avila-Rodriguez et al., 2008; Bowden et al., 2009; Köhler et al., 2013; Kambali et al., 2017).

Влијанието на типот на анјон-разменувачкиот кертриџ за задржување на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ врз приносот на синтезата беше испитан преку мерења за задржана активност на анјон-разменувачки кертриџ односно активност која заостанала на кертриџот и не се елуирала во реакционата смеса во услови кога е употребен ист раствор за елуција. Во табела 7 освен резултатите за резидуална активност се прикажани и резултатите од приносот добиен од синтезите во коишто е користен испитуваниот кертриџ. Тие покажуваат дека нема разлика во процентот на резидуална активност кај QMA-Cl⁻ и QMA-CO³⁻ ($0.56 \pm 0.16\%$ и $0.54 \pm 0.17\%$, соодветно), но голем процент на резидуална активност се јавува на PS-OH⁻, дури $37.17 \pm 8.52\%$ а со тоа има влијание врз приносот на синтезата. Приносот на синтезата беше најмал ($28.25 \pm 4.96\%$) кога се користеше PS-OH⁻ анјон-разменувачкиот кертриџ, додека во услови кога се употребени другите два кертриџи приносот беше над 40 % за QMA-Cl⁻ односно 45 % QMA-CO³⁻ што не претставува значајна разлика кога е во прашање радиосинтеза. Сличен тренд на резидуална активност во услови на синтеза со $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ е објаснет во неколку студии.

Како последен параметар од оваа група на испитувања за влијание на почетните услови во реакциите пред радиофлуоринација е ефикасноста на растворот за елуција на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ врз приносот на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ кога е користен исклучиво QMA-CO³⁻. Како што е познато, растворот за елуција значително влијае на ефикасноста на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ елуцијата, како и на радиофлуоринацијата (Cai et al., 2008; Krasikova., 2022). Затоа за да се испита влијанието беа направени мерења за резидуалната активност на QMA-CO³⁻, па заедно со резултатите од приносот во синтезите се претставени во табела 8.

Најголем процент на резидуалната активност од $0.896 \pm 0.111\%$ се забележува кога е употребен Cryptand 222-1 и во тој случај се добива најмал принос од $22.18 \pm 7.78\%$ (d.c.). Во синтеза со Cryptand 222-2 приносот е $36.14 \pm 3.74\%$ (d.c.) со помал процент на резидуална активност од претходно, $0.773 \pm 0.050\%$, а како најголем принос од $42.41 \pm 2.04\%$ (d.c.), а најмал процент на резидуална активност измерена на QMA-CO₃⁻ ($0.699 \pm 0.049\%$) се добива во услови на синтеза кога се употребува Cryptand 222-3 раствор за елуција. Ако ја земеме предвид разликата помеѓу овие три раствори (за Cryptand 222-1: ACN : H₂O = 1 : 1; Cryptand 222-2: ACN : H₂O = 1 : 4 и Cryptand 222-3: ACN : H₂O = 1 : 8), а и хемиските својства на [¹⁸F]F⁻ со овие резултати потврдуваме дека успешната нуклеофилна флуоринација зависи од реактивноста на [¹⁸F]F⁻ јоните, како и од групата што заминува. Затоа оваа реакција е подобра во услови кога е користен поголем процент на поларен апротичен растворувач, како што е ацетонитрилот.

Како втора група на параметри кои беа испитани се условите во реакцијата на радиофлуоринација. Влијанието на овие параметри е евалуирано преку изведување на различни синтеси во кои се применети различно времетраење на реакцијата на радиофлуоринација, различна температура на радиофлуоринација, како и различна маса на прекурсорот NITTP. Во голем број студии е потврдено дека овие параметри имаат најголем ефект врз ефикасност на приносот на синтезата како резултат на успешноста на радиофлуоринација.

Влијанието на температурата и времетраењето на реакцијата врз приносот беше испитано во оптимален опсег на загревање на реакционото шише од 100°C до 140°C во времетраење од 3-10 мин. Влијанието на температурата и времето на радиофлуоринацијата е сумирано во табела 9. Сите експерименти се изведени со 5 mg NITTP. Резултатите од приносот коригиран за распад (d.c.) изразени преку средна вредност изразена во проценти и стандардната девијација (средна вредност \pm SD %) се претставени во табела 09. Приносот на [¹⁸F]FMISO се зголемуваше со зголемувањето на времето на флуорирање од 3 до 10 мин. на температура на флуорирање на 100°C (од $5,32 \pm 0,56\%$ на 3 мин. до $37,61 \pm 2,46\%$ на 10 мин.). Кога времетраење на радиофлуоринацијата беше 10 мин., со зголемување на температурата од 100 °C на 110 °C и 120 °C, RCY се зголемува. На температура на флуорирање од 120°C, со намалувањето на времето на флуорирање од 10 до 7 минути, приносот се намали на $37,93 \pm$

1,59%. Највисокиот принос од $53,18 \pm 3,44\%$ беше постигнат со зголемување на температурата на $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ за време на 10 минути радиофлуорирање. Се обидовме да ја зголемиме температурата на $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, а да го намалиме времето од 10 на 7 мин., но приносот се намали на $30,07 \pm 1,24\%$ што укажува на евентуална термичка нестабилност на ^{18}F -флуорираниот меѓупроизвод. Со овие резултати се истакнува и потврдува ефектот на температурата и времето на радиофлуоринацијата врз приносот од синтезата. Во нашиот случај, оптималните резултати на радиофлуорирање на $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ во текот на 10 минути беа избрани како најпогодни за оваа синтеза. Условите кои беа оптимизирани се слични на објавените податоци за радиофлуорирање изведени со истиот комерцијален прекурсор, а различен модул за синтеза (Nandy et al., 2010; Kwon et al., 2016; Fernandez-Maza et al., 2018; Antuganov et al., 2018).

Применувајќи ги овие оптимални услови, извршена е понатамошна оптимизација за ефектот на масата на прекурсорот NITTP (mg) врз приносот. Резултатите се претставени графички на слика 26. Беше забележано дека со зголемување на масата на прекурсорот NITTP, приносот се зголемува. Со употреба на 2,5 mg беше добиен многу низок принос од $8,48 \pm 1,26\%$. Забележително зголемување на приносот се доби со 5 mg прекурсор ($53,18 \pm 3,44\%$), но највисокиот принос на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ од $59,88 \pm 2,05\%$ беше добиен со 10 mg прекурсор. За да ја избереме оптималната маса на прекурсорот, неопходно е да се мониторира и присуството на главното онечистување од DMM, бидејќи тоа потекнува примарно од прекурсорот (исто како онечистувањето од глюкоза при синтеза на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$). Поради баланс на концентрацијата на DMM во синтезите изведени со маса на прекурсор од 5 mg и 10 mg и приносот како оптимална маса на NITTP е 5 mg. Како што е објавено во литературата, неколку автори користеле поголема маса на прекурсорот од 5 mg, но тие примениле малку поинаков метод при прочистувањето. По вториот чекор на задржување на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ на кертриците тие направиле промивање на кертриците со вода со цел да се елуира заостанатиот DMM во кертриците и да се постигне висока чистота на финалниот производ (Wang et al., 2009; Nandy et al., 2009; Antuganov et al., 2018). IFP касетата што се користеше во нашата студија има само четири позиции за шишенца во кои се внесени потребните реагенси (шише1: раствор за еуција на $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$; шише 2: раствор на прекурсор; шише 3: раствор за хидролиза;

шише 4: раствор за елуција на финален производ), па поради ова ограничување, дополнително промивање на кертриците беше невозможно. Тоа беше дополнителна причина да се земе 5 mg прекурсор како оптимална маса.

По реакција на радиофлуоринација во реакционото шише се добива смеса на нехидролизирани [^{18}F]FMISO интермедиери и други онечистувања. Во таа смеса главниот растворувач е ацетонитрил, па затоа следен чекор кој треба да се оптимизира е сушење (евапорација) на ацетонитрилот. Испарувањето на ацетонитрил се одвиваше со загревање на реакционата смеса на $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ во три чекори од по неколку секунди (вкупно 60 секунди или три чекори по 30, 20 и 10 секунди; вкупно 75 секунди или три чекори по 30, 30 и 15 секунди, вкупно 90 секунди или три чекори по 30, 30 и 30 секунди и вкупно 180 секунди или три чекори по 90, 60 и 30 секунди). Направена е промена само на времето, а температурата на евапорација беше избрана како највисока точка на вриење на ацетонитрил, со цел да се постигне максимална евапорација. Влијанието на времето на евапорација на ацетонитрил врз концентрацијата на ацетонитрил во финален примерок е претставено на слика 27. Доколку како лимит ја земеме вредноста на дозволена гранична вредност, концентрацијата на ацетонитрил во примерокот да е помала од $410\text{ }\mu\text{g/mL}$ и ги анализираме добиените резултати, ќе забележиме дека кога времето на евапорација е 60 секунди присутниот ацетонитрил во примерокот е околу граничната вредност ($500,59\text{ }\mu\text{g/mL}$ и $369,39\text{ }\mu\text{g/mL}$) што покажува дека тоа време на евапорација не е прифатливо во нашиот случај. Кога се примени време од 75 секунди концентрацијата на ацетонитрил беше пониска односно $111,68\text{ }\mu\text{g/mL}$ и $256,08\text{ }\mu\text{g/mL}$. Прифатлива концентрација на ацетонитрилот беше во услови кога беше применето време на евапорација од 90 секунди, бидејќи тогаш концентрацијата на ацетонитрил беше $78,87\text{ }\mu\text{g/mL}$ и $66,61\text{ }\mu\text{g/mL}$. Минималната концентрација на ацетонитрил во примерокот беше во услови кога времето на евапорација беше 180 секунди ($19,00\text{ }\mu\text{g/mL}$, $17,38\text{ }\mu\text{g/mL}$ и $13,73\text{ }\mu\text{g/mL}$), па според тоа можеме да кажеме дека идеално време од овие анализи е 180 s. Но, земајќи предвид дека колку е подолго времето толку е поголема веројатност за настанување радиолиза на нехидролизирани [^{18}F]FMISO интермедиери добиени претходно, а со тоа да се зголеми концентрацијата на главното онечистување DMM, направени се дополнителни експерименти со цел да се провери дали во тој период е возможна таквата

реакција. Исто така, целта ни беше преку овој пристап да можеме да го одбереме оптималното време за евапорација на ацетонитрил.

Стабилен изотоп беше употребен со цел да се направи симулација на синтезата, а воедно да се земат примероци, бидејќи таквиот начин на мониторирање на реакционата смеса во различни чекори е невозможен кога се работи со активност заради изложеност на јонизирачко зрачење. Направена е HPLC анализа на сите земени примероци директно од реакционото шише.

Во хроматограмот од HPLC анализата на слика 28 од примерок 1 земен во првата минута од флуоринацијата јасно се гледа дека единствениот присутен аналит во тој примерок се јавува на R_t од 20,22 минути со површина под пик од 37173.66 mAU*s. Пикот треба да потекнува од прекурсорот NITTP, па беше идентификуван преку споредба на ретенционите времиња од стандарден раствор на мешавина од раствор којшто содржи 5 $\mu\text{g/mL}$ (5 ppm) NITTP, DMM и FMISO. На слика 29 е прикажан хроматограмот од анализата на таквиот стандарден раствор, каде што се потврдува дека R_t на пикот на NITTP во стандардниот раствор беше исто така 20,22 минути со површина под пик 941.5756 mAU*s. За да се направи детален мониторинг и евалуација на напредокот на реакцијата во текот на флуоринација беа земени уште два примерока (примерок 2 и примерок 3 - слика 29). Примерок 2 беше земен во петтата минута по започнувањето на реакцијата, а примерок 3 беше земен на крајот од реакцијата на флуоринација, по 10 мин. Од хроматограмот на примерок 2 на слика 30 (горе) се забележува дека прекурсорот NITTP е сè уште присутен во петтата минута што укажува на тоа дека 5 минути не се доволни за целосна реакција на флуоринација, додека на хроматограмот од примерок 3 (слика 30 долу) се забележува дека главниот пик потекнува само од интермедиерите. Ако се споредат и примероците на слика 16, земени за време на синтеза на [^{19}F]FMISO, може да се види дека бојата на примерокот 2 е светлокафеава, додека во примерок 3 е темнокафеава, што ја потврдува целосната реакција.

Понатаму, од оваа интермедиерна смеса потребно беше да се евапорира ацетонитрилот (објаснето и погоре), па евапорацијата на ацетонитрилот во овој експеримент беше спроведена со загревање на 85 °C во тек на 180 секунди во присуство на гас хелиум. Примерокот 4 е земен на крајот од чекорот за да се провери дали главното онечистување дезметилмисонидазол (DMM) било

генерирано за време на сушењето. Како што е илустрирано на слика 31, беше детектиран висок пик од DMM. Во овој хроматограм се забележува и мал пик од $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$, бидејќи за време на земањето на примерокот, првата порција од растворот за хидролиза (HCl) беше додадена во реакционото шише. По овој чекор, 4 mL од 0,1 M хлороводородна киселина беше префрлена во реакционата смеса за хидролиза на нехидролизираните $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ интермедиери и производство на финалниот производ $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$. На слика 32 е прикажан хроматограмот на примерок 5 којшто претставува смеса на хидролизиран и непочистен производ. Со резултатите од овој хроматограм го покажавме регионот во кој може да се јават хемиските онечистувања на хидролизираната и непочистената смеса. Во оваа смеса потенцијално присутни може да бидат 1-хлоро-3-(2-нитро-имидазол-1-ил)-пропан-2-ол (хлоромисонидазол), 5-хидроксипентанал; 4-метилбензенсулфонат, 2-нитро-1-фенилпропан-1,3-диол или 2-(5-нитроимидазол-1-ил)етанол. По оваа реакција, главниот предизвик е ефективно прочистување на финалниот производ. Почистувањето на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ беше изведено на ист принцип како прочистувањето на $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ опишано во точка 4.2.5. За таа цел беше направен трансфер на реакционата смеса низ кертриците за прочистување до шишето за отпаден раствор со истовремено задржување на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ на реверзно-фазниот кертриц, а елуција на онечистувања или задржување на дел од онечистувањата на кертриците. На слика 33 во хроматограмот добиен со анализа на финален прочистен раствор на производот односно примерок 6 се идентификува пикот од $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$, како и пикот од онечистувањето. Според добиениот пик на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ и пресметката процентуалниот хемиски принос (врз основа на произведената концентрација добиена според калибрациската крива прикажана на слика 36) во овој случај приносот на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ е многу мал. Нискиот принос најверојатно се должи на нецелосни реакции, несакани реакции или нецелосно елуирање на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ од RP кертриц. Површината на DMM не беше поголема од површината на соодветниот пик во хроматограмот добиени со стандардниот раствор (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Од хроматограмот на слика 34 добиен со анализа на елуираниот отпад односно примерок 7 земен од шишето за отпад, се гледа големо количество на DMM во отпадниот раствор што укажува на несакана реакција која наместо кон добивање на $[^{19}\text{F}]\text{FMISO}$ доведува со добивање на DMM. Од друга страна пак, ова покажува

дека DMM онечистувањето како пополарен продукт успешно поминува низ 30 mg HLB кертриц, што исто така е многу важен податок во нашиот начин на прочистување. Бидејќи во нашиот експеримент [¹⁹F]FMISO приносот не беше предмет на испитување не беа спроведени дополнителни експерименти за негова оптимизацијата, а со тоа и добивање на повисок принос.

Сите следни експерименти беа насочени само кон оптимизација на синтезата на [¹⁸F]FMISO и присуството на онечистувања во финалниот примерок.

Како дел од оптимизацијата на параметрите кои имаат влијание на реакцијата по евапорација се параметрите од хидролиза, односно волумен и концентрација на растворот за хидролиза, температура на хидролиза и времетраење на хидролиза. Но освен овие параметри коишто може да влијаат на квалитетот на финален производ од [¹⁸F]FMISO, исто толкаво влијание имаат и кертриците за прочистување и радиофлуоринацијата. Затоа во ова испитување, како што може да се види од табела 10, параметрите за време на радиофлуоринација од 10 минути при температура од 120°C/130°C не се менуваат, а како кертрици се користени само 30 mg HLB и C18 Environmental коишто се покажаа како најдобри во однос на прочистувањето. Параметрите од хидролиза беа променливи, па за поедноставување во претставувањето на резултатите беа употребени кратенките од C-1 до C-9. Резултатите од HPLC анализите на финалниот производ од [¹⁸F]FMISO анализирани со радиодетектор и UV детектор, како и резултатите од анализа на стандардниот раствор (мешавина на 10 µg/mL DMM и 10 µg/mL FMISO), се прикажани во табела 11. Од податоците за ретенционото време може да ги идентификуваме детектираните пикови за DMM и FMISO, како онечистувања кои задолжително треба да се определат согласно со монографијата за [¹⁸F]FMISO (Ph. Eur. 10.0, 2459 (01/2014)). Освен овие податоци за овие две онечистувања, во табелата се дадени и резултатите за ретенционо време и површината под пик на сите други детектирани пикови во примерокот. Примарната цел беше да се испита дали во сите тие услови на хидролиза имаме постигнато целосна хидролиза, а истовремено да испитаме дали со промената на параметрите во хидролиза се променува количеството на хемиските онечистувања. Од идентификуваните пикови од добиените радиохроматограми од примерокот во табела 11 се

забележува дека се постигнува целосна хидролиза во сите синтези, бидејќи не се јавува пик од нехидролизирани [^{18}F]FMISO интермедиери). Поинаква е сликата од резултатите од примероците анализирани со UV детектор. Вообичаено на хроматограмот се јавуваат шест различни пикови од кои само пик 1 и пик 3 ги потврдиме со споредба на ретенционите времиња од стандардниот раствор. Покрај пик 1 на DMM се детектира уште еден пик кој можеби е мисонидазол/MISO, но не сме потврдиле (види табела 3 за потенцијални радиохемиски и хемиски онечистувања при синтеза на [^{18}F]FMISO и негова структура на слика 3). По пик 3 од FMISO се јавува пик 4 кој можеби е од хлоромисонидазол, но исто така не сме потврдиле. Хлоромисонидазол може да се јави како онечистување како резултат на кисела хидролиза со хлороводородна киселина. Притоа, хлоридните јони може да го заземат истото место на флуоридот во интермедиерните нецелосно изреагирани молекули од прекурсорот. Пик 5 и пик 6 се исто така неидентификувани пикови. Како што се гледа од резултатите за површината под пик на пиковите детектирани со UV детекторот во споредба со површината под пик на стандардниот раствор во синтезите C-1, C-2, C-3, C-4, C-7, C-8 и C-9 условите од хидролиза не се погодни, бидејќи се генерира онечистување од DMM со површина под пик блиска до површината под пик на DMM од стандардниот раствор или пак со поголема површина под пик. Освен тоа, се генерираат и други непосакувани хемиски онечистувања, кои исто така кај дел од синтезите се над критериумот за прифатливост (според монографијата површината под пикот на кое било друго онечистување од хроматограмот на примерокот да не биде поголема од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (најмногу 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)). Ако го пресметаме збирот на површините под пиковите на сите онечистувања од хроматограмот на примерокот којшто не треба да биде поголем од 5 пати од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор, вкупните онечистувања се во границите на прифатливост во сите синтези (помала од 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Условите во C-5 и C-6 се најоптимални во однос на другите добиени резултати, особено C-6 каде што концентрацијата на DMM е најмала. Со овие резултати покажавме дека генерирањето на хемиските онечистувања многу зависи од условите во хидролиза и како оптимални услови за хидролиза беа 4 mL 0,1 M HCl; 110°C 4 min.

За увид во сите потенцијални радиохемиски и хемиски онечистувања направено е прекинување на синтезата пред чекорот на прочистување и примерокот од реакционата смеса беше анализиран. На слика 35 се прикажани радиохроматограмот и UV хроматограмот од анализата на непрочистен примерок. На радиохроматограмот освен главниот пик од [^{18}F]FMISO се забележува и друг нераздвоен пик од [^{18}F]F⁻ со други радиохемиски онечистувања. На UV хроматограмот се забележува високо ниво на DMM, пик 7 со Rt = 07,29 минути, како и многу други онечистувања. Претпоставуваме дека пик 4 може да биде од мисонидазол, пик 6 од хлоромисонидазол, а останатите пикови може да потекнуваат од тосилат, 5-хидроксипентанал, хидролизиран НИТТР, метронидазол или други не-карактеризирани поларни соединенија (види Табела 3 за потенцијални радиохемиски и хемиски онечистувања при синтеза на [^{18}F]FMISO).

6.3. Оптимизација на начинот на прочистување

Присуството на радиохемиски или хемиски онечистувања во радиофармацевтските препарати влијае на квалитетот на радиофармацевтот. Затоа, чекорот на прочистување е неизбежен. Од литературните достапни податоци прочистувањето со SPE кертриџи резултира со хемиски и радиохемиски чист производ, па затоа и ние се обидовме да го воведеме овој начин на прочистување. Врз основа на разликата во својствата и афинитетот помеѓу молекулот на [^{18}F]FMISO и останатите онечистувања во примерокот, за прочистување потребно беше комбинирање на минимум три кертриџи. Реверзно-фазниот кертриџ беше неопходен и неговата функција во овој случај беше да го задржи во што поголема количина [^{18}F]FMISO, а да ги пропушти сите полипофилните и пополарните молекули, како на пример DMM, којшто се генерира како главно онечистување. Катјон-изменувачки кертриџ беше употребен во комбинација со реверзно-фазниот кертриџ за да задржат други катјонски онечистувања, како на пример криптофиксот како катјонска форма, хидрониум јон, калиум и др. катјони кои се генерираат за време на реакциите во синтезата. Алуминиум оксиден кертриџ со базна основа беше употребен за задржување на неизреагираниот слободен радиоизотоп во форма на [^{18}F]F⁻. Според принципот на прочистувањето (прв чекор на задржување и втор на

елуирање) овој кертриџ беше одвоен од реверзно-фазниот и катјон-изменувачкиот кертриџ и позициониран на излез од трансфер линијата со цел да го задржи само оној [^{18}F]F- кој не се елуирал во отпад и заостанал во финалниот елуиран прочистен раствор. Доколку се постави на касетата во комбинација со реверзно-фазниот и катјон-изменувачкиот кертриџ при поминување на растворот за елуција може да се ослободи дел од задржаниот [^{18}F]F- во финалниот раствор. Во нашата студија, реверзно-фазниот кертриџ треба да го задржи најголемиот дел од производот, додека повеќето онечистувања да поминат низ кертриџите и се собираат во шишето за отпад. Општо земено, поларноста на молекулите од онечистувањата и финалниот производ, типот на кертриџот, големината на честичките и количината на сорбент, може да влијаат на ефикасноста на прочистувањето. Испитани беа шест различни комерцијално достапни реверзно-фазни кертриџи: 30 mg HLB light; 175 mg PS-RP; 225 mg HLB plus; 820 mg C18 Environmental; 400 mg tC18 и (30 mg HLB light) x 2. Во анализираните синтези, како раствор за елуција на финалниот производ [^{18}F]FMISO беше користен 5% раствор на етанол. За да се оптимизира овој чекор, беше следена активноста на отпадниот раствор, финалниот производ и резидуалната активност на RP кертриџите. Дополнително, HPLC анализа на примерокот на отпад беше извршена со HPLC за да се одреди содржината на [^{18}F]FMISO и DMM.

Резултатите прикажани во табела 12 ни даваат јасна слика за однесувањето на различните RP кертриџ кон задржување и елуирање на [^{18}F]FMISO и DMM од анализираните примероци на финалниот прочистен раствор. Резултатите од незадржаната активност од [^{18}F]FMISO производот на реверзно-фазниот кертриџ (RP кертриџ) и елуирана активност во отпаден раствор покажуваат дека со примена на 225 mg HLB plus и 30 mg HLB light x 2 [^{18}F]FMISO целосно се задржува на кертриџите, а исто така и со 820 mg C18 Environmental се задржува речиси целосно. Со примена на останатите кертриџи 175 mg PS-RP, 400 mg tC18 и 30 mg HLB light дел од [^{18}F]FMISO се елуира во отпад односно не се задржува на тие кертриџи (резултатите од средната вредност изразена во % d.c. \pm SD беа 34.42 ± 4.58 %, 20.78 ± 2.31 % и 14.44 ± 3.88 %, соодветно). Таквиот афинитет на стационарната фаза од кертриџите не е поволен, но ако пак од друга страна ги разгледаме резултатите добиени од [^{18}F]FMISO неелуиран во финален раствор преку мерењата направени за

резидуална активност на кертриците ќе забележиме дека кертриците што покажаа целосно задржување на [¹⁸F]FMISO (225 mg HLB plus и 30 mg HLB light x 2) нецелосно го ослободуваат [¹⁸F]FMISO при трансферот на растворот за елуција на [¹⁸F]FMISO. Со примена на 400 mg tC18 освен што се елуира голем процент на [¹⁸F]FMISO во отпад голем процент ($12.02 \pm 1.34 \%$) и заостанува на кертрицот неелуиран, со што се потврдува дека овој кертиц не е соодветен за прочистување на [¹⁸F]FMISO. Кај останатите кертрици 30 mg HLB light, 175 mg PS-RP и 820 mg C18 Environmental настанува речиси целосно елуирање на [¹⁸F]FMISO во финалниот раствор.

Имајќи предвид дека висока хемиска чистота е клучен параметар за ефективно прочистување, концентрацијата на DMM во отпадниот раствор беше споредена со концентрацијата на DMM во финалниот раствор. Резултатите се изразени преку концентрацијата на DMM во $\mu\text{g/mL}$ од средната вредност и стандардна девијација. Концентрацијата на DMM онечистувањето беше пресметана преку стандардна калибрациска крива прикажана на слика 36. Како што е прикажано во табела 12, забележано е дека речиси целата содржина на DMM се елуира во отпадниот раствор со примена на 30 mg HLB 175 mg PS-RP, (30 mg HLB light) x 2 и 400 mg tC18. Неповолен кертриц во однос на DMM онечистувањето е 225 mg HLB plus, бидејќи DMM не се елуира во отпад, туку се задржува на кертрицот и се елуира во финалниот раствор. Па според тоа можеме да ги одвоиме неповолните кертрици за прочистување на [¹⁸F]FMISO, а тоа се 225 mg HLB и 400 mg tC18. Во однос на останатите кертрици, имајќи ги предвид сите овие резултати за однесувањето на задржувањето и елуцијата на [¹⁸F]FMISO и DMM, можеме да истакнеме дека високата ефикасност на прочистување е постигната со 30 mg HLB со $6,26 \pm 0,82 \text{ mg/mL}$ во финален раствор, но исто така покажа $14,44 \pm 3,88\%$ поминување на [¹⁸F]FMISO во отпадот како незадржан производ. [¹⁸F]FMISO беше речиси целосно задржан на C18 Environmental со висока ефикасност на прочистување ($6,70 \pm 0,55 \text{ mg/mL}$ DMM во финалниот производ). Карактеристично за овој кертриц е неговото однесување кон DMM, бидејќи тој е задржан на кертрицот, но само делумно беше елуиран во финалниот производ. Последователно, заостанатиот DMM беше потврден со HPLC анализа на елуатот со промивање на кертрицот со вода по синтезата.

Врз основа на овие резултати, можеме да го избереме кертриџот C18 Environmental за понатамошна употреба, во комбинација со катјон разменувачкиот кертриџ, но од друга страна кога е во прашање квалитетот на производот кертриџот 30 mg HLB light, исто така, покажа добри перформанси за прочистување во контекст на хемиска чистота и затоа имаше голема применливост во оваа студија и е одбран како најповолен кертриџ за прочистување и покрај тоа што може да придонесе до помал радиохемиски принос. Според објавените податоци, Antuganov и соработниците извршиле успешно SPE прочистување со кертриџот C18 Environmental, применувајќи последователно промивање на кертриџот со вода, со цел отстранување на поларните нечистотии, како што е DMM. За разлика од тие автори, ефективно прочистување без промивање на кертриџот со вода беше постигнато од Bloom и соработниците со користење на 30 mg HLB light (Blom & Kozirowski, 2014; Antuganov et al., 2018).

За да се направи проценката за концентрацијата на елуиран DMM во отпаден раствор, како и елуирани други онечистувања, анализиран беше примерокот од отпаден раствор со HPLC и TLC метод. Од анализираните примероци на HPLC е направена пресметка за незадржаната (елуираната) активност од [¹⁸F]FMISO производот на реверзно-фазниот кертриџ, како и анализа на елуирани онечистувања. Пресметана е концентрацијата на DMM онечистувањето која се елуира во отпадниот раствор во однос на концентрацијата во финалниот примерок. Со помош на TLC методот е испитано присуството на флуоридните јони и [¹⁸F]FMISO во отпадниот раствор. На слика 37 (горе) е прикажан радиохроматограм и UV хроматограм од HPLC анализата на отпадниот раствор од синтеза со користење на 30 mg HLB light и 820 mg C18 Environmental за прочистување. Од добиените хроматограми за отпадниот раствор од синтезата спроведена со 30 mg HLB light кертриџ може да се потврдат податоците претставени во табела 11. На радиохроматограмот освен [¹⁸F]F- (пик 1) се забележува и друг пик 2 од [¹⁸F]FMISO, додека на UV хроматограмот се забележува висок пик од елуиран DMM и нормално други помали пикови од други онечистувања. Ова укажува на истиот феномен објаснет погоре дека со користење на 30 mg HLB light се постигнува висока хемиска чистота на финалниот производ, бидејќи DMM успешно се елуира во отпад, но

од друга страна приносот на [¹⁸F]FMISO може да се намали, бидејќи кертриџот нема доволен капацитет да го задржи целосниот производ или пак протокот на примерокот низ кертриџите е поголем. Протокот на примерокот може да се регулира преку притисокот кој е зададен во таа команда, затоа е направена една синтеза во која притисокот на трансфер на примерокот низ кертриџите беше намален. Но исто така добивме нецелосно задржување на [¹⁸F]FMISO на 30 mg HLB light. Бидејќи, квалитетот на производот има приоритет во однос на приносот, можеме да истакнеме дека овој кертриџ е соодветен за прочистување.

Ако ги разгледаме и хроматограмите на слика 37 (долу) од отпадниот раствор од синтеза во која се користеше 820 mg C18 Environmental кертриџ, се забележува дека има само минорен пик од [¹⁸F]FMISO на радиохроматограмот, што значи дека [¹⁸F]FMISO целосно е задржан на кертриџот. Исто така, детектиран беше многу мал пик од DMM што укажува на тоа дека кертриџот го задржува и тоа онечистување кое не се елуира во финалниот раствор со 5% етанолен раствор, туку заостанува на кертриџот. Присуството на [¹⁸F]⁻ и [¹⁸F]FMISO во отпадниот раствор е потврдено и со TLC анализа. На слика 38 се прикажани TLC хроматограмите од отпаден раствор од синтеза со користење на 30 mg HLB light (горе) и 820 mg C18 Environmental (долу).

Бидејќи на ефикасноста на прочистувањето може да влијае и растворот за елуција на [¹⁸F]FMISO, беше направена споредбена анализа на добиениот принос и резидуалната активност на реверзно-фазната колона за двата користени раствори 5 % и 10 % етанолен раствор. Резултатите во табела 13 покажуваат дека средната вредност за приносот беше 44.62 ± 4.86 % (d.c) за 5 % етанолен раствор и 45.18 ± 5.75 % (d.c) за 10 % етанолен раствор, а резидуална активност на реверзно-фазна колона е 0.586 ± 0.123 % (d.c) за 5 % етанолен раствор и 0.590 ± 0.123 % (d.c) за 10 % етанолен раствор. Овие резултати покажуваат дека нема разлика во приносот или пак во резидуална активност во двата случаи, па затоа како оптимален раствор може да се користи 5 % EtOH, што е далеку помала веројатноста да се јави етанол над дозволените граници од 10 %.

За да испитаеме дали резидуалната активност на реверзно-фазниот кертриџ потекнува само од молекулите на [¹⁸F]FMISO беше направена елуција

по мерењето на резидуалната активност кертриџот. Кертриџот беше мануелно промиен со дополнителен волумен од 5 mL на 10 % етанолен раствор. Хроматограмот од анализата на таквата елуциона фракција е прикажан на слика 39. Според ретенционото време пикот во хроматограмот од елуционата фракција на кертриџот потекнува од [¹⁸F]FMISO, со што беше потврдено дека резидуалната активност (дискутирана во погорните експерименти) е само од заостанатиот односно неелуираниот [¹⁸F]FMISO. Во рамките на овој експеримент беа направени и елуции на користениот SCX кертриџ. Како што се гледа од хроматограмите на слика 40, активноста на SCX кертриџот исто така потекнува од [¹⁸F]FMISO, но интересно е што во оваа елуциона фракција се детектирале и DMM што укажува на тоа дека тоа онечистување веројатно се задржува на овој кертриџ и при елуцијата на [¹⁸F]FMISO преминува во финалниот раствор, што не е баш посакуван момент. Поради оваа причина, во една синтеза направивме и отстранување на катјон-разменувачкиот кертриџ со цел да провериме дали ќе се намали концентрацијата на DMM, а истовремено би добиле добар резултат за онечистувањето од криптофиксот (претпоставувајќи дека тоа онечистување може да се елуира во отпаден раствор). Тие резултати се прикажани во делот од контрола на квалитет на хемиски онечистувања и ќе бидат дискутирани во тој дел.

6.4. Други параметри кои имаат влијание на приносот

Загубата на активноста за време на синтезата поради која било причина влијае на приносот на синтезата. Затоа беше спроведено мониторирање преку детекторите во оловните кабинети, а исто така и преку мерења на резидуална активност по синтезата. За да може да се направи анализа од резидуалната активност на кертриџите во оваа студија, земени се предвид ист тип на кертриџи и тоа: QMA-CO₃-, SCX, 30 mg HLB и ALU B кертриџ и за сите нив, како и за V-vial, Waste vial, Waste filter, Final filter, Recovery water vial (Rec.vial), Reaction vial (Reac.vial) се направени мерења за резидуалните активности по секоја синтеза, а резултатите се прикажани во табела 14. Резултатите од резидуалната активност се групирани во шест групи во зависност од добиениот принос и тоа: 0-10 % односно средна вредност од 8.04 ± 2.38 %, 10-20 % односно 17.51 ± 2.03 %, 20-30 % односно 25.93 ± 3.14 %, 30-40 %, односно 36.75 ± 3.07 %, 40-50 %

односно $42.49 \pm 1.78 \%$ и >50 односно $53.24 \pm 2.01 \%$. Од резултатите може да се види дека најмала резидуална активност има во шишето за отпадна вода (Reac.vial) што потврдува дека кога се работи со иста почетна активност (500 mCi) заостанува минимум $0.05 \pm 0.01 \%$ до максимум $0.08 \pm 0.02 \%$. Нема значителна разлика во резидуалната активност кај синтезите со различен принос кај V-vial, односно појдовното шише (минимум $2.83 \pm 0.83 \%$ до максимум $4.23 \pm 0.91 \%$), QMA-CO³⁻ (минимум $0.32 \pm 0.08 \%$ до максимум $0.71 \pm 0.08 \%$), 30 mg HLB (минимум $0.22 \pm 0.12 \%$ до максимум $0.22 \pm 0.12 \%$), финалниот филтер (минимум $0.16 \pm 0.21 \%$ до максимум $1.54 \pm 1.20 \%$) кој беше поставен по ALU B кертриџот (Final filter), реакционото шише (Reac.vial) (минимум $0.86 \pm 0.82 \%$ до максимум $1.93 \pm 1.15 \%$), филтерот поставен на влез од отпадното шише (Waste filter) (минимум $2.30 \pm 0.94 \%$ до максимум $4.24 \pm 4.11 \%$). Со ова потврдуваме дека приносот не зависи од резидуалната активност која заостанува на V-vial, QMA-CO³⁻, 30 mg HLB, Reac.vial, Final filter и Waste filter. Резидуалната активност на SCX покажува благ позитивен тренд на заостанување на активноста, кај синтезите со принос помал од 10 % заостанала $3.65 \pm 2.67 \%$, додека кај синтезите со принос над 50 % заостанала $6.92 \pm 0.66 \%$. Со ова се потврдува дека колку повеќе се генерирал [¹⁸F]FMISO толку повеќе заостанал на овој кертриџ. Погоре во дискусијата е покажано дека на овој кертриџ заостанува во најголем процент [¹⁸F]FMISO.

Доколку се направи евалуација на резидуалната активност кај ALU B и Waste vial се забележува дека колку што е помал приносот толку има поголема заостаната активност. За принос помал од 10 % кај ALU B има $16.02 \pm 7.91 \%$ резидуална активност, додека за принос над 50 % има $4.48 \pm 1.61 \%$. За принос помал од 10 % кај Waste vial има $31.39 \pm 1.64 \%$ елуирана активност, додека за принос над 50 % има $13.62 \pm 0.78 \%$. Со ова потврдуваме дека резидуалната активност односно елуираната активност во отпад има големо влијание врз приносот од синтезата, а голем процент од таа активност е резултат на неизреагиран флуорид, што пак е показател за неоптимални услови во реакција на радиофлуоринација.

Ако направиме пресметка за загуба на активноста во текот на синтезата кога имаме принос над 50 % и ги собереме сите резултати од резидуална активност во измерените точки, тогаш следува дека вкупната резидуална активност за принос од 53,24 % е 33,9 %, што покажува дека 18,27 % е активност која

недостига до 100 % од вкупната почетна активност. Кога зборуваме за резидуална активност мораме да нагласиме дека освен на сите овие контактни материјали, дел од активноста заостанува и во линиите за трансфер од V-vial до реакционото шише, во сите линии кои се дел од модулот за синтеза или пак IFR касетата за синтеза, во линијата за трансфер на финалниот производ од реакционо шише до шишето за финален раствор, но сите овие делови се исклучени од студијата за резидуална активност.

6.5. Контрола на квалитет на [¹⁸F]FMISO

Финалниот производ треба да ги исполнува барањата за квалитет коишто се дефинирани во монографијата за [¹⁸F]флуоромисонидазол Ph. Eur. 10.0, 2459 (01/2014)). По секоја синтеза беа спроведени потребните тестови од контрола на квалитет на произведениот [¹⁸F]FMISO радиофармацевтик. Направени се тестови за: рН, идентификација, радиохемиска чистота, хемиска чистота, резидуални растворувачи и радионуклидна чистота, додека за бактериски ендотоксини-пирогени и стерилност не се направени тестови за сите серии, бидејќи за време на оптимизацијата на синтезата не беа задоволени условите за асептично производство. Овие тестови беа спроведени само на три серии кога сите услови за асептично производство беа исполнети. Растворот од финалниот производ пред анализите беше разреден со 10 ml физиолошки раствор, односно 1:1 = [¹⁸F]FMISO примерок : 0,9% NaCl. Според тоа, радиоактивната концентрација беше различна и зависеше од добиениот принос.

рН-вредноста беше одредена како приближна вредност со рН ленти во опсег од 0 до 14 рН единици. рН-вредноста може најмногу да зависи од волуменот и концентрација на растворот за хидролиза, а и од растворот за елуција. Во табела 15 се прикажани резултатите од сите целосно спроведени и реализирани синтези во кои се користеше HCl раствор за хидролиза со различен волумен од 2 mL или 4mL на 0,1 M HCl и 4mL на 0,05 M HCl. Во услови на хидролиза со 4 mL на 0,05 M HCl рН-вредноста беше 8.5, со 2 mL 0,1 M HCl раствор беше минимум 7 максимум 7.5 и во сите останати синтези каде што хидролизата се одвивање со 4 mL 0,1 M HCl рН-вредноста беше минимум 7 и максимум 8. Со овие резултати се потврдува дека малата варијација на волуменот или

концентрацијата не влијаеше на рН-вредноста и дека сите вредности беа во граници на прифатливост од 4,5 до 8,5. За да направиме споредба и верификација на овие мерења и покрај тоа што методот за мерење на рН-вредност со рН ленти беше валидиран, ние дополнително направивме проверка на рН-вредноста на дел од примероците со рН метар. Во сите мерења добивме вредност која е во истиот опсег добиена со рН ленти. На слика 41 може да се види еден извештај од рН метарот за мерења извршени за серија FMISO1905231. Добиената приближна вредност за тој примерок е 7.5-8, додека со рН метарот измерената средна вредност беше 7,784, што ни потврдува дека вредноста е во измерениот опсег.

Тестот на идентификација е исто така изведен на сите серии, освен на оние што беа прекинати т.е. не се целосно завршени. Идентификацијата на радиоизотопот беше потврдена со мерење на периодот на полураспаѓање и со споредба на ретенционите времиња на главниот пик на радиохроматограмот на испитуваниот примерок и ретенционото време на FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор. Промената на условите во реакциите од синтезата не треба да влијае на периодот на полураспаѓање, па затоа во табела 16 се прикажани сите резултати од синтезите коишто се изведени под различни услови. Резултатите добиени со одредување на полуживот на радиоизотопот со три последователни мерења на примерокот во ист дозен калибратор го идентификуваа $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ радиоизотопот и минимална вредност, која беше измерена е 1,78 h, а максимална беше 1.92 h. Ако земеме предвид дека дозволени гранични вредности се од 1,75 до 1,92 h можеме да заклучиме дека сите вредности беа во овој критериум на прифатливост. Извештаите од овој тест за две серии од прикажаните во табелата се претставени на слика 42 на која се гледа дека се направени три последователни мерења на почеток од започнувањето на тестот, по 15 минути и на крај односно во триесеттата минута.

Преку HPLC анализата направивме и споредба на ретенционите времиња на главниот пик на радиохроматограмот на испитуваниот примерок со ретенционото време на FMISO од UV хроматограмот на стандардниот раствор. Резултатите се претставени во табела 17, каде што се гледа дека максималната разлика во ретенционото време е 3,60 секунди. Сите резултати беа во

согласност со критериумот на прифатливост, односно разликата во ретенционото време беше помала од 10 секунди.

Хемиската чистота на финалниот производ [^{18}F]FMISO раствор беше тестирана со помош на TLC обоен тест и беа добиени полуквантитативни резултати за присуство на криптофиксот (K2.2.2), како хемиско онечистување и со HPLC метод за сите останати хемиски онечистувања. И за двете методи беа подготвени стандардни раствори за идентификација на криптофиксот, односно FMISO и DMM како главни онечистувања. За останатите хемиски онечистувања не беа достапни референтни стандарди и затоа се класифицирани како кое било друго онечистување или како вкупни онечистувања.

На слика 43 се прикажани две TLC плочи по спроведен тест за K 2.2.2. И во двата теста лесно се воочува дека дамката за примерокот (*A* - аналит) нема обојување исто како дамката од слепата проба (*SI* - 0,9% NaCl). А контролната дамка од стандардниот раствор е силно обоена со јасен темнокафав прстен. Овие резултати, како и резултатите за сите други останати примероци што не се претставени овде, беа во критериумот на прифатливост - дамката од примерокот е помалку интензивна од референтната.

Поради начинот на кој се вршеше прочистување на финалниот производ [^{18}F]FMISO, нашата претпоставка беше дека целата содржина на криптофикс можеби ќе може да се елуира во шишето за отпадниот раствор доколку не се користи SCX кертриџ. Спроведена е синтеза во која за прочистување е искористен само реверзно-фазен кертриџ и анализата за криптофикс е спроведена во финалниот прочистен примерок. Резултатот од TLC обоениот тест за K 2.2.2 во тест серијата без SCX е прикажан на слика 44. За дамката *A* се гледа дека има обојување кое не е толку интензивно како референтната дамка од стандардниот раствор. Покрај овој резултат, потврдивме дека не е возможно целата содржина од катјонското онечистување на криптофикс да се елуира во отпадниот раствор и затоа е неопходно прочистување со комбинација на катјон-изменувачкиот кертриџ SCX со RF кертриџ.

Хемиската чистота беше предмет на оптимизација во оваа студија и зависеше од промената на параметрите за време на оптимизацијата на синтезата. Голем дел од резултатите за хемиска чистота беа претставени и дискутирани во претходните точки на оптимизација.

За одредување на хемиските онечистувања во финален прочистен примерок од [¹⁸F]FMISO беше користен UV детектор. На слика 45 е прикажан UV хроматограм на стандардниот раствор што содржи смеса од 10 µg/mL на DMM и исто толку FMISO. Пред да ја направиме оваа мешавина на раствор, беа анализирани двата раствори одделно за да го идентификуваме ретенционото време. Во прикажаниот хроматограм се идентификуваат двата пика, првиот пик е DMM со површина под пик 344,65 mAU*s и Rt 3,38 минути и вториот од FMISO со површина под пик 444,69 mAU*s и Rt 5,33 минути. За одредување на концентрацијата на хемиските онечистувања за време на траењето на експериментите повеќекратно беа направени калибрациски криви за двата стандардни раствори, од кои по една за двата анализи се прикажани претходно. Хроматограмот од еден [¹⁸F]FMISO примерок е прикажан на слика 46. Според ретенционото време беа идентификувани DMM (3,38 минути) и FMISO (5,29 минути). Според површината под пик во споредба со хроматограмот на слика 45 се потврдува дека концентрацијата и за DMM (118,93 mAU*s) и за FMISO (22,04 mAU*s) онечистувањата е значително помала од површината под пик на референтните стандарди (максимум 10 µg/mL) што значи дека се во критериум за прифатливост. Исто така, за пик 2 беше земен критериумот за кое било друго онечистување наведен во монографијата. Површината под пикот на тоа онечистување беше помала од површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор, што значи дека е во критериум на прифатливост (154,85 mAU*s < 444,69 mAU*s). За вкупните онечистувања (со пиковите од Reg 4-7) збирот на површините под сите пикови на тие онечистувања беше многу помала од дефинираната во монографија (да 5 пати површината под пикот за FMISO од хроматограмот на стандардниот раствор (најмногу ≤ 50 µg/mL) што е во согласност со критериумот на прифатливост.

Радиохемиската чистота (RCP) на финалниот производ [¹⁸F]FMISO беше тестирана со помош на HPLC и TLC методот согласно со методите од монографијата. Беше одредено присуството на [¹⁸F]F⁻ ([¹⁸F]F во форма на флуорид [¹⁸F]F⁻), што треба да биде помало од 5 % од вкупната активност, односно [¹⁸F]FMISO да биде присутен повеќе од 95 % од вкупната активност. Во табела 18 се прикажани резултатите за процентуалната застапеност на [¹⁸F]F⁻ и

[¹⁸F]FMISO анализирани со двата метода. Од резултатите добиени со HPLC анализа може да се потврди 100 % присуство на [¹⁸F]FMISO. Резултатите добиени од TLC анализата се исто така во критериумот на прифатливост, од кои [¹⁸F]F⁻ пик е детектиран во неколку примероци со минимум 0,33% и максимум 1,31 %, што јасно укажува дека присуството е помало од 5 % од вкупната активност. Радиохемиска чистота (RCP) на [¹⁸F]FMISO примероци е исто така прикажана преку радиохроматограмите добиени со HPLC и TLC анализа. На слика 47 се прикажани три различни TLC хроматограми со кои се потврдуваат резултатите за прикажаните серии, каде што пиковите од [¹⁸F]FMISO се јасно дефинирани. При анализирање на радиохроматограмите добиени од HPLC анализата, дадени на слика 48, освен пикот од [¹⁸F]FMISO не беше детектиран друг пик. Радиохемиската чистота на тестираните примероци беше 100 %, што е во согласност со критериумот на прифатливост повеќе од 95 % од вкупната активност да потекнува од флуорид [¹⁸F]F⁻.

Слично на горедискутираниот дел за дополнителниот експеримент во однос на хемиската чистота и отстранување на SCX кертриџот и овде е направена дополнителна тест серија на [¹⁸F]FMISO со изведување на синтеза без ALU B кертриџ за прочистување. Целта беше да се провери дали без тој кертриџ ќе бидат исполнети критериумите на прифатливост претпоставувајќи дека речиси целото онечистување од [¹⁸F]F⁻ можеби се елуира во отпадниот раствор. Добиениот TLC хроматограм е прикажан на слика 49, а добиениот HPLC радиохроматограм за истиот примерок е прикажан на слика 50. Од TLC резултатите се гледа дека 24,89 % од вкупната активност припаѓа на [¹⁸F]F⁻ а [¹⁸F]FMISO е присутен 75,11 % од вкупната активност. Со помала осетливост во детекцијата во HPLC анализата се забележува дека 3,77 % од вкупната активност припаѓа на [¹⁸F]F⁻ а 96,23 % на [¹⁸F]FMISO. Со овие резултати јасно се гледа потребата од TLC анализата во која осетливоста на TLC детекторот е далеку поголема од онаа на HPLC детекторот. Со тоа, од TLC анализата можеме да заклучиме дека добиените резултати не се во согласност со критериумот на прифатливост и употребата на ALU B кертриџот за прочистување е неопходна.

Резидуалните растворувачи, етанол и ацетонитрил, беа исто така анализирани во голем дел од примероците. Поради начинот на прочистување и

елуција на [¹⁸F]FMISO со етанолен раствор критериумот на прифатливост на етанолот беше дефиниран во монографијата за [¹⁸F]Флуоромисонидазол (Ph. Eur. 10.0, 2459 (01/2014)). Во табела 19 се прикажани добиените резултати од анализа на резидуалните растворувачи поделени во две групи. Во едната група на [¹⁸F]FMISO примероци, финалната елуција е направена со 5 % етанолен раствор во вода, а во втората група на [¹⁸F]FMISO примероци елуција е направена со 10 % етанолен раствор во вода. Во случај на елуција со 5 % етанолен раствор во вода концентрацијата на етанол се движеше од минимум 11.980 mg/mL до максимум 29.022 mg/mL. Во случај на елуција со 10 % етанолен раствор во вода концентрацијата на етанол се движеше од минимум 19.415 mg/mL до максимум 37.513 mg/mL. Концентрацијата на етанол треба да биде помала од 10 % V/V, односно помала од 2.5 g на една администрирана доза (од 10 mL) или 250 mg/mL, па со овие резултати потврдуваме дека се исполнети критериумите за прифатливост и со користење на двата различни етанолни раствори. Определена беше и концентрацијата на ацетонитрил, резултатите се дадени во табела 20. И во двете групи на резултати времето на евапорација на ацетонитрил не беше помало од 75 секунди. Од резултатите се потврдува дека во сите анализирани серии концентрацијата на ацетонитролот е значително помала од дозволената вредност од 410 µg/ml (минималната концентрација беше 12.711 µg/ml, а максималната 40.104 µg/ml).

Резултатите од вкупни радионуклидни онечистувања се дадени во табела 20. Како минимален процент на вкупни радионуклидни онечистувања е 0,000000970 %, додека максимално добиена вредност за вкупни радионуклидни онечистувања е 0,0000477 %. Ако земеме предвид дека критериумот на прифатливост е $\leq 0,1$ % од вкупната радиоактивност во референтно време преку овие резултати потврдуваме дека прочистувањето од радионуклидни онечистувања е успешно извршено односно произведениот [¹⁸F]F⁻ (со користење на сет од мета од ниобиум со Navar фолија) е со многу висока радионуклидна чистота. На слика 51 се прикажани три различни спектри од радионуклидната чистота добиени од финалните примероци. На x-оската од спектарот се означени каналите кои се калибрирани во единица на енергија во keV, а на y-оската се прикажани детектираните импулси во соодветниот канал. Се гледа типичен гама спектар на радионуклидни онечистувања добиени од анализа на

[¹⁸F]FMISO финалниот примерок. Од спектарот може да се види дека има одредени пикови од радионуклидни онечистувања за кои по извршените пресметки врз основа на нивната измерена активност во однос на активноста од примерокот се добиени многу помали вредности од максимално дозволената вредност ($\leq 0,1$ % од вкупната радиоактивност). Како заклучок може да кажеме дека радионуклидните онечистувања во тестираните примероци од финалниот производ беа присутни во многу низок процент.

Од вкупно три тестирани серии за LAL-тест за бактериски ендотоксини со извештаи прикажани на слика 52 сите беа во рамките на критериумот на прифатливост (помалку од 5,00 IU/mL). Резултатите од тестот за интегритет на филтер за трите серии, ја потврдија ефикасноста на филтерот за финална стерилизација. Исто така, сите три тестирани серии беа стерилни, резултатите од стерилност се прикажани на слика 53-55. Од добиените резултати се потврди дека подготвените „in-house“ реагенси, користени за синтеза со модул Synthera V2, се произведува [¹⁸F]FMISO со квалитет дефиниран во Европска фармакопеја.

Во табела 21 се прикажани резултатите од тест за стабилност за сите тестирани параметри дефинирани во спецификацијата (табела 4). Параметрите за одредување на стабилност беа тестирани според дефинираната фреквенција на тестирање. Изгледот, идентификацијата на радиоизотопот и [¹⁸F]FMISO како и онечистувањето за криптофикс и бактериски ендотоксини беа изведени во првата и последните две дефинирани точки. pH, хемиска чистота и радиохемиска чистота беа изведени во сите дефинирани точки, а тестовите кои се изведуваат по одобрување на серија (стерилност, радионуклидна чистота, резидуални растворувачи), односно по распаѓот на радиоизотопот беа тестирани само еднаш. Сите тестирани параметри беа во рамките на критериумот на прифатливост. Врз основа на овие тестирање рокот на траење беше утврден на 10 часа, кога се чува на контролирана собна температура од 18 до 22 °C. Резултатите потврдија дека [¹⁸F]FMISO раствор за инјектирање е стабилен и не е забележана декомпозиција во текот на дефинираниот временски рок на употреба.

6. Заклучок

Во оваа докторската дисертација успешно беше реализирана целта да се воведат нова методологија за синтеза и контрола на квалитет на радиофармацевтикот $[^{18}\text{F}]$ Флуоромисонидазол. Успешно беа развиени соодветни услови за реакциите во синтезата на $[^{18}\text{F}]$ FMISO со SPE прочистување со користење на постоечки модул за синтеза Synthera V2 во ЈЗУ УИ ПЕТ.

Од досегашните спроведени истражувања врз основа на добиените резултати можеме да заклучиме дека:

- успешно беше креирана и оптимизирана секвенца за автоматска синтеза;
- преку изведување на синтези со стабилен изотоп $[^{19}\text{F}]$ F⁻ го олеснивме развојот на радиосинтезата;
- критичните параметри кои влијаат на синтезата и квалитетот на готовиот производ беа успешно оптимизирани.

Во текот на оптимизацијата на радиосинтезата беа опфатени сите критични параметри кои влијаат на приносот и квалитетот на $[^{18}\text{F}]$ FMISO и тоа:

- параметри од реакциите пред радиофлуоринација;
- параметри од реакцијата на радиофлуоринација;
- параметри од реакциите после радиофлуоринација;
- начин на спроведување и механизмот на прочистувањето со SPE кертрици.

Како најповолни и оптимални услови во сите овие реакции можеме да ги издвоиме следните услови:

- употреба на QMA-CO³⁻ како анјон-разменувачкиот кертриц за задржување на $[^{18}\text{F}]$ F⁻ со криптант раствор за елуција во којшто односот на ACN : H₂O е 1 : 8;
- оптимална маса на прекурсорот NITTP 5 mg, температура во радиофлуоринација 120-130 °C и времетраење од 10 минути;
- клучни параметри пак кои имаат влијание врз очистувањата се условите во реакција на хидролиза и начинот на прочистување, според тоа оптимален волумен за растворот на хидролиза беше услови 4 mL на 0,1 M HCl; со температура во хидролиза 110°C и времетраење од 3/4 минути.

- Како најефикасни кертрици за прочистување беа: реверзно-фазен кертриц Oasis HLB Light (30 mg HLB light); катјонизменувачки кертриц Maxi-Clean SCX (SCX); алуминимум оксиден кертриц Alumina B Plus Light (ALU B);

Со овие оптимални услови производот беше успешно синтетизиран, со принос од $53,18 \pm 3,44$ %.

Анализата за контрола на квалитетот на растворот на финалниот производ покажа дека нема радиохемиски онечистувања, а многу ниски нивоа на хемиски онечистувања. Резултатите од тестирањето на радиохемиската и хемиската чистота беа во согласност со критериумите дефинирани во спецификацијата за квалитет на [^{18}F]FMISO. Останатите параметри дефинирани во спецификацијата: изглед, pH, идентификација, бактериски ендотоксини, стерилност, радионуклидна чистота и резидуални растворувачи, исто така беа во критериум на прифатливост.

Од добиените резултати од тестовите на стабилност се потврди дека [^{18}F]FMISO ги задоволува критериумите на прифатливост за квалитет дефинирани во спецификацијата и по 10 часа од крај на синтеза, како дефиниран рок на употреба.

Понатамошните испитувања ќе бидат насочени кон изведување на процес на валидација на постапката за чистење, асептична валидација на процес на производство и воведување на радиофармацевтскиот препарат [^{18}F]FMISO за парентерална интравенска администрација кај пациенти во Универзитетски институт за позитронско-емисиона томографија – Скопје.

7. Користена литература

Abdo R.A., Lamare F., Fernandez P., Bentourkia M. (2021) Quantification of Hypoxia in Human Glioblastoma using PET with 18F-FMISO. *Nucl Med Mol Imaging*. 55(3):107-115.

Adamsen T.C.H., Grierson J.R., Krohn K.A. (2005). A new synthesis of the labeling precursor for [F-18]-fluoromisonidazole. *J Label Compd Radiopharm*. 48(12):923-7.

Antuganov D.O., Ryzhkova D.V., Zykova T.A., Timofeev V. V., Antuganova Yu. O., Timofeeva K. Yu., Samburov O. P. & Zykov M. P. (2018). Modification of Automatic Synthesis of [18F]Fluoromisonidazole on a GE TracerLAB Fx F-N Synthesis Module. *Radiochemistry*. 60:45–50.

Anzellotti A., Bailey J., Ferguson D., McFarland A., Bochev P., Andreev G., Awasthi V., Brown-Proctor C. (2015). Automated production and quality testing of [18F]labeled radiotracers using the BG75 system. *J Radioanal Nucl Chem* 305:387–401.

Avila-Rodriguez M.A., Wilson J.S., McQuarrie S.A., (2008) A quantitative and comparative study of radionuclidic and chemical impurities in water samples irradiated in a niobium target with Havar vs. niobium-sputtered Havar as entrance foils, *Appl. Radiat. Isot.* 66: 1775–1780.

Badawy M.E.I., El-Nouby M.A.M., Kimani P.K., Lee W. L., Entsar I.R. (2022). A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*. 38:1457–1487.

Baumann R, Depping R, Delaperriere M, Dunst J. (2016). Targeting hypoxia to overcome radiation resistance in head & neck cancers: real challenge or clinical fairytale? *Expert Rev Anticancer Ther*. 16(7):751-8.

Bergman, J., and Solin, O. (1997) Fluorine-18-labeled fluorine gas for synthesis of tracer molecules. *Nucl. Med. Biol.* 24, 677–683 (59).

Blom E, Kozirowski J. (2014). Automated synthesis of [F-18]FMISO on IBA synthera. *J Radioanal Nucl Chem*. 299(1):265–270.

Bollineni V.R, Wiegman E.M, Pruij J., Groen H.J, Langendijk J.A. (2012). Hypoxia imaging using Positron Emission Tomography in non-small cell lung cancer: implications for radiotherapy. *Cancer Treat Rev*. 38(8):1027-32.

- Borzęcka W., Lavandera I., Gotor V. (2013). Biocatalyzed synthesis of both enantiopure fluoromisonidazole antipodes. *Tetrahedron Letters*. 54(37):5022-5025.
- Bourigault P., Skwarski M., Macpherson R.E., Higgins G.S., McGowan D.R. (2022). Timing of hypoxia PET/CT imaging after ¹⁸F-fluoromisonidazole injection in non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep*. 16;12(1):21746.
- Brooks A.F, Topczewski J.J, Ichiishi N., Sanford M.S, Scott P.J. (2014) Late-stage [¹⁸F]Fluorination: New Solutions to Old Problems. *Chem Sci*. 5(12):4545-4553.
- Brown J.M, Workman P. (1980) Partition coefficient as a guide to the development of radiosensitizers which are less toxic than misonidazole. *Radiat Res*. 82:171-190.
- Buckingham F., Gouverneur V. (2016) Asymmetric ¹⁸F-fluorination for applications in positron emission tomography. *Chem Sci* 7:1645–1652.
- Bowden L., Vintró L.L., Mitchell P.I., O'Donnell R.G., Seymour A.M., Duffy G.J.. (2009) Radionuclide impurities in proton-irradiated [¹⁸O]H₂O for the production of ¹⁸F: activities and distribution in the [¹⁸F]FDG synthesis process. *Appl. Radiat. Isot.* 67:248–255.
- Cai L., Lu S., Pike V.W.. (2008). Chemistry with [¹⁸F]Fluoride Ion, *Eur. J. Org. Chem.* 17 2853–2873.
- Carles M., Fechter T., Grosu AL, Sörensen A, Thomann B, Stoian RG, Wiedenmann N, Rühle A, Zamboglou C, Ruf J, Martí-Bonmatí L, Baltas D, Mix M, Nicolay NH. (2021). ¹⁸F-FMISO-PET Hypoxia Monitoring for Head-and-Neck Cancer Patients: Radiomics Analyses Predict the Outcome of Chemo-Radiotherapy. *Cancers (Basel)*. 9;13(14):3449.
- Challapalli A., Carroll L., Aboagye E.O. (2017) Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clin Transl Imaging*. 5(3):225-253.
- Chang C.W, Chou T.K, Liu R.S, Wang S.J, Lin W.J, Chen C.H (2007). A robotic synthesis of [¹⁸F]fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO) *Appl Radiat Isot.*;65(6):682–686.
- Chapman J.D, Franko A.J, Sharplin J. (1981). A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *Br J Cancer*. 43(4):546-50.

Cherif A, Yang DJ, Tansey W, Kim EE, Wallace S. (1994) Rapid synthesis of 3-[¹⁸F]fluoro-1-(2'-nitro-1'-imidazolyl)-2-propanol ([¹⁸F]fluoromisonidazole). *Pharm Res.*11(3):466-9.

Chochevska M., Kolevska K., Atanasova Lazareva M., Velichkovska M., Jolevski F., Tripunovski T., Janevik Ivanovska E., Ugrinska A., Angelovska B. (2023). Optimization of reaction conditions for synthesis of [¹⁸F]FMISO using stable [¹⁹F]F-. *J.Res.Pharm.* 27(5): 2058- 2066.

Chochevska M., Lazareva M., Kolevska K., Velichkovska M., Kozirowski J., Ivanovska E., Angelovska B. & Ugrinska A. (2023). [¹⁸F]Fluoromisonidazole synthesis method: development and optimization by cartridge purification. *Radiochimica Acta.*

Chochevska M., Velichkovska M., Atanasova Lazareva M., Kolevska K., Jolevski F., Razmoska J., Filipovski Z., Nikolovski S., Zdraveska Kocovska M., & Ugrinska A. (2023). Evaluation of factors with potential influence on [¹⁸F]FDG radiochemical synthesis yield. *Applied radiation and isotopes* 199:110900.

Coenen HH, Gee AD, Adam M, Antoni G, Cutler CS, Fujibayashi Y, Jeong JM, Mach RH, Mindt TL, Pike VW, Windhorst AD. (2017) Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry - Setting the record straight. *Nucl Med Biol.* 55:v-xi.

Coenen H. H. (2007) Fluorine-18 labeling methods: features and possibilities of basic reactions. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 15–50.

Coenen H.H.; Ermert J. (2018). ¹⁸F-labelling innovations and their potential for clinical application. *Clinical and Translational Imaging.* 6(3):169 – 193.

Colin F.P.: (2003).New trends in solid-phase extraction, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22, 6, pp. 362-373.

Cucchi C., Bogni A., Casanova C., Seregni E, Pascali C. (2022). An improved one-pot preparation of [F-18]FMISO based on solid phase extraction purification: Pitfalls on the analytical method reported in the PhEur.'s monograph. *J Label Compd Radiopharm.* 65(1):6–12.

Dierckx R.A & Van de Wiele C. (2008). FDG uptake, a surrogate of tumour hypoxia? *Eur J Nucl Med Mol Imaging;* 35:1544-1549.

Dische S., Saunders M.I., Flockhart I.R, Lee M.E., Anderson P. (1979). Misonidazole- a drug for trial in radiotherapy and oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 5:851-860.

Dolezel M., Slavik M., Blazek T., Kazda T., Koranda P., Veverkova L., Burkon P., Cvek J. (2022). FMISO-Based Adaptive Radiotherapy in Head and Neck Cancer. *J Pers Med.* 12(8):1245.

Dollé F. (2007) [¹⁸F]Fluoropyridines: From conventional radiotracers to the labeling of macromolecules such as proteins and oligonucleotides In: Schubiger P A, Lehmann L, Friebe M (ed) PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging. Ernst Schering Research Foundation Workshop 62 pp 113–157.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Radiopharmaceutical Preparations (07/2016:0125), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Detection and measurement of radioactivity (01/2014:20266), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Residual solvents (07/2018:50400), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2017), Identification and control of residual solvents (01/2017: 20424), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Biological tests -2.6.1 Sterility (04/2011:20601), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Bacterial endotoxins (01/2018:20614), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0, 2014, Fluoromisonidazole (¹⁸F) injection (01/2014: 2459), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.8 th ed., (2022), Chemical precursors for radiopharmaceutical preparation (01/2022: 2902), Strasbourg: Council of Europe.

European Pharmacopoeia 10.0 th ed., (2020). General monographs, Parenteral preparations (04/2015:0520), Strasbourg: Council of Europe.

Fernandez-Maza L., Egea-Guerrero J.J, Balcerzyk M., Civantos-Jubera G., Gordillo-Escobar E., Vilches-Arenas A. (2018). Rapid and simplified synthesis of [F-

¹⁸F]Fluoromisonidazole and its use in PET imaging in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Appl Radiat Isot.* 132:79–84.

Ferretti A., Massaro A., Gusella S., Rampin L., Maffione A. M. Chondrogiannis S. Marzola M. C., Grassetto, G., Delgado-Bolton R., Rubello D., Gava M (2019). A new mobile self-dispensing and administering system for ¹⁸F-FDG: evaluation of operator dose reduction. *Journal of Radiological Protection.* 40(1):243-252.

Franck D., Nann H., Davi P., Schubiger P.A., Ametamey S.M. (2009) Faster analysis of radiopharmaceuticals using ultra performance liquid chromatography (UPLC) in combination with low volume radio flow cell. *Appl Radiat Isot.* 67(6):1068-70.

Furuya S., Naya M., Manabe O., Hirata K., Ohira H., Aikawa T., Koyanagawa K., Magota K., Tsujino I., Anzai T., Kuge Y., Oyama-Manabe N., Kudo K., Shiga T., & Tamaki N. (2021). ¹⁸F-FMISO PET/CT detects hypoxic lesions of cardiac and extra-cardiac involvement in patients with sarcoidosis. *Journal of nuclear cardiology.* 28(5), 2141–2148.

Furuya T., Klein J. E. and Ritter T. (2010) C–F Bond Formation for the Synthesis of Aryl Fluorides. *Synthesis.* 1804–1821.

Gillies J.M., Najim N., Zweit J. (2006) Analysis of metal radioisotope impurities generated in [¹⁸O]H₂O during the cyclotron production of fluorine-18. *Appl. Radiat. Isot.* 64:431–434.

Goud N.S., Joshi R.K., Bharath R.D., Kumar P. (2020). Fluorine-18: A radionuclide with diverse range of radiochemistry and synthesis strategies for target based PET diagnosis. *Eur J Med Chem.* 187:111979.

Gouel P., Decazes P., Vera P., Gardin I., Thureau S., Bohn P. (2023) Advances in PET and MRI imaging of tumor hypoxia. *Front Med (Lausanne).* 10:1055062.

Gray A.J., Dische S., Adams G.E., Flockhart I.R., Foster J.L. (1976). Clinical testing of the radiosensitiser Ro-07-0582. I. Dose tolerance, serum and tumour concentrations. *Clin Radiol.* 27:151-157.

Gray L., Conger A., Ebert M., Hornsey S., Scott O. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol.* 26:638–48.

- Graziano M.J, Henck J.W, Meierhenry E.F and Gough A.W. (1996). Neurotoxicity of misonidazole in rats following intravenous administration. *Pharmacol Res.* 33(6): 307-318.
- Grierson J.R., Link J.M., Mathis C.A., Rasey J.S., Krohn K.A. (1989). A Radiosynthesis of F-18 Fluoromisonidazole. *J Nucl Med.* 30(3):343–50.
- Guadagno J.V., Donnan G.A., Markus R., Gillard J.H., Baron J.C. (2004). Imaging the ischaemic penumbra. *Curr Opin Neurol.*;17(1):61–7.
- Hamacher K., Coenen H.H. (2006). No-carrier-added nucleophilic 18F-labelling in an electrochemical cell exemplified by the routine production of [¹⁸F]altanserin. *Appl Rad Isot* 64:989–994
- Handley M.G., Medina R.A., Nagel E., Blower P.J., Southworth R.. (2011). PET imaging of cardiac hypoxia: Opportunities and challenges. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 51(5): 640-650.
- Hirata K., Yamaguchi S., Shiga T., Kuge Y., Tamaki N. (2019). The Roles of Hypoxia Imaging Using 18F-Fluoromisonidazole Positron Emission Tomography in Glioma Treatment. *J Clin Med.* 8(8):1088.
- Hjelstuen O.K, Svadberg A., Olberg D.E., Rosser M. (2011) Standardization of fluorine-18 manufacturing processes: new scientific challenges for PET. *Eur J Pharm Biopharm.* 78(3):307-13.
- Hoigebazar L., Jeong J.M. (2013). Hypoxia imaging agents labeled with positron emitters. *Recent Results Cancer Res.*;194:285-99.
- Hsieh C.-H. (Ed.). (2012). Positron Emission Tomography - Current Clinical and Research Aspects. *InTech.*
- Hwang D.R, Dence C.S, Bonasera TA, Welch M.J. (1989). No-carrier-added synthesis of 3-[F-18]Fluoro-1-(2-Nitro-1-Imidazolyl)-2-propanol—a potential pet agent for detecting hypoxic but viable tissues. *Appl Radiat Isot.*;40(2):117–126.
- Inada M., Nishimura Y., Hanaoka K., Nakamatsu K., Doi H., Uehara T., Komanishi M., Ishii K., Kaida H., Hosono M. (2023). Visualization of tumor hypoxia and re-

oxygenation after stereotactic body radiation therapy in early peripheral lung cancer: A prospective study. *Radiother Oncol.* 180:109491.

Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. (2015) Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem.* 26(1):1-18.

Jerabek P.A, Patrick T.B, Kilbourn M.R, Dischino D.D, Welch M.J. (1986) Synthesis and biodistribution of F-18 labeled fluoronitroimidazoles—potential in vivo markers of hypoxic tissue. *Appl Radiat Isot.* 37(7):599–605.

Jim O., Elaine W., Lorenzo M., , Jane M. (2014). Validation of an automated dose-dispensing system for ^{18}F -FDG administrations and associated reduction in operator extremity dose. *Nuclear Medicine Communications.* 35(2):151–159.

Jing L., Chi Z., Xi Y., Xi-Juan Y., Qun Z., Xin-Chen S. (2021). Synthesis and Preliminary Evaluation of a Novel ^{18}F -Labeled 2-Nitroimidazole Derivative for Hypoxia. *Imaging Front. Oncol.* 10:2020.

Jong O P., Hyuk L., Young S. S., Yong H. S., Kwang H.J., Yearn S. C., Byung-Tae K., (2005). Simple devices for dispensing [^{18}F]FDG. *Appl Radiat Isot.* 62(4): 605–607.

Kamarainen E.L, Kyllonen T., Nihtila O., Bjork H., Solin O. (2004). Preparation of fluorine-18-labelled fluoromisonidazole using two different synthesis methods. *J Label Compd Radiopharm.* 47(1):37–45.

Kambali I., Suryanto P., Huda H., Listiawadi N., Astarina F.D., Ismuha H., Kardinah R.R., (2017). Dependence of ^{18}F Production Yield and Radioactive Impurities on Proton Irradiation Dose. *Physics Research International* 2017:1–5.

Kniess, T., Zessin, J., Mäding, P., Kuchar, M., Kiss, O., Kopka, K. (2023). Synthesis of [^{18}F]FMISO, a hypoxia-specific imaging probe for PET, an overview from a radiochemist's perspective. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 10, 8(1):5.

Köhler M., Degering D., Zessin J., Füchtner F., Konheiser J. (2013). Radionuclide impurities in [^{18}F]F- and [^{18}F]FDG for positron emission tomography. *Appl. Radiat. Isot.* 81: 268–271.

Koziorowski, J., Behe, M., Decristoforo, C. (2017). Position paper on requirements for toxicological studies in the specific case of radiopharmaceuticals. *EJNMMI radiopharm. chem.* 1:1.

Krasikova R. (2007) Synthesis modules and automation in F-18 labeling. *Ernst Schering Res Found Workshop*. (62):289-316.

Krasikova R.N.; Orlovskaya, V.V., (2022). Phase Transfer Catalysts and Role of Reaction Environment in Nucleophilic Radiofluorinations in Automated Synthesizers. *Appl. Sci.* 12:321.

Krohn K.A, Link J.M, Mason R.P. (2008) Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med*. 49(2):129S-48S.

Kumar K., Ghosh A. (2018) ¹⁸F-AIF Labeled Peptide and Protein Conjugates as Positron Emission Tomography Imaging Pharmaceuticals. *Bioconjug Chem*. Apr 18;29(4):953-975.

Kwon Y.D., Jung Y., Lim S.T., Sohn M. H., Kim H. K. (2016). Facile and Efficient Synthesis of [¹⁸F]Fluoromisonidazole Using Novel 2-Nitroimidazole Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 27(7):S1-S8.

Lebedev A.Y. (2013) Microfluidic Devices for Biomedical Applications., Microfluidic devices for radio chemical synthesis. *Woodhead Publishing*. 594-633

Lee S.T, Scott A.M. (2007). Hypoxia positron emission tomography imaging with ¹⁸F-fluoromisonidazole. *Semin Nucl Med*. 37(6):451-61.

Li Y. & Li A. (2018). A study of the brain protective effects and mechanism of stroke rats with allopurinol by ¹⁸F- FMISO PET imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 59:1.

Liew L.P, Shome A., Wong W.W, Hong C.R, Hicks K.O, Jamieson S.M.F, Hay M.P. (2023). Design, Synthesis and Anticancer Evaluation of Nitroimidazole Radiosensitisers. *Molecules*. 31;28(11):4457.

Lim J.L., Berridge M.S. (1993). An efficient radiosynthesis of [¹⁸F] fluoromisonidazole. *Appl Radiat Isot*. 44(8):1085–91.

Lu S., Lepore S.D, Song Y.L, Mondal D., Cohn P.C, Bhunia A.K, Pike V.W (2009) Nucleophile assisting leaving groups: a strategy for aliphatic ¹⁸F-fluorination. *J Org Chem*. 74:5290–5296.

Manabe O., Hirata K., Shozo O., Shiga T., Uchiyama Y., Kobayashi K., Watanabe S., Toyonaga T, Kikuchi H., Oyama-Manabe N., Tamaki N. (2017). ¹⁸F-

fluoromisonidazole (FMISO) PET may have the potential to detect cardiac sarcoidosis. *J Nucl Cardiol.* 24(1):329-331.

Markus R., Reutens D.C., Kazui S., Read S., Wright P., Pearce D.C., Tochon-Danguy H.J., Sachinidis J.I., Donnan G.A. (2004). Hypoxic tissue in ischaemic stroke: persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain.* 127:1427–36.

Mccarthy T.J., Dence C.S., Welch M.J. (1993). Application of microwave-heating to the synthesis of [F-18] fluoromisonidazole. *Appl Radiat Isot.* 44(8):1129–32.

McKeown S.R. (2014) Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol.* 87(1035):20130676.

Moon B., Park J., Lee H, Lee B., Kim S. (2014) Routine production of [18F]fumazenil from idonium tosylate using a sample pretreatment method: a 2.5-year production report. *Mol Imaging Biol* 16:619–625

Mottram J. (1935) Variations in the sensitivity of the cell to radiation in relation to mitosis. *Br J Radiol.* 8:643–51.

Mottram J.C. (1936) A Factor of importance in the radio sensitivity of tumours. *Br J Radiol.* 9:606–14.

Müller, C.E. (1999). Basic Chemistry of 2-Nitroimidazoles (Azomycin Derivatives). In: Machulla, HJ. (eds) *Imaging of Hypoxia. Developments in Nuclear Medicine*, 33. Springer, Dordrecht.

Murali D., Flores L. G., Roberts A. D., Nickles R. J., & DeJesus O. T. (2003) Aromatic L-amino acid decarboxylase (AAAD)inhibitors as carcinoid tumor-imaging agents: synthesis of 18F-labeled alpha-fluoromethyl-6-fluoro-m-tyrosine (FM-6-FmT). *Appl. Radiat. Isot.* 59, 237–243.

Nandy S., Rajan M.G.R, Korde A., Krishnamurthy N.V., (2010). The possibility of a fully automated procedure for radiosynthesis of fluorine-18-labeled fluoromisonidazole using a simplified single, neutral alumina column purification procedure. *Appl Radiat Isot.*;68(10):1937–1943.

Nieto E., Alajarín R., Álvarez-Builla J., Larrañag, I., Gorospe E., Pozo M. (2010). A New and Improved Synthesis of the Precursor of the Hypoxia Marker [18F]-FMISO. *Synthesis*, 2010(21).

- Oh S.J., Chi D.Y., Mosdzianowski C., Kim J.Y., Gil H.S., Kang S.H. (2005). Fully automated synthesis of [^{18}F]fluoromisonidazole using a conventional [^{18}F]FDG module. *Nucl Med Biol.* 32(8):899–905.
- Ohkubo T., Kurihara Y., Ogawa M. (2021). Automated radiosynthesis of two ^{18}F -labeled tracers containing 3-fluoro-2-hydroxypropyl moiety, [^{18}F]FMISO and [^{18}F]PM-PBB3, via [^{18}F]epifluorohydrin. *EJNMMI radiopharm. chem.* 6, 23.
- Okamoto S., Shiga T., Yasuda K., Ito Y.M., Magota K, Kasai K., Kuge Y, Shirato H., Tamaki N. (2013).. High reproducibility of tumor hypoxia evaluated by ^{18}F -fluoromisonidazole PET for head and neck cancer. *J Nucl Med.* 54(2):201-7.
- Pacella S., (2022). ^{18}F -FMISO PET/CT: a new promising radiotracer for cardiac sarcoidosis and extracardiac involvement. *J Nucl Cardiol.* 29(5):2738.
- Patricia E., Edem E., Johanna L., Andreas Kjær S., Matthias M. H. (2019). Fluorine-18 Radiolabeling Strategies Advantages and Disadvantages of Currently Applied Labeling Methods Chapter 2, Elsevier.
- Patt M., Kuntzsch M., Machulla H.J. (1999). Preparation of [^{18}F]fluoromisonidazole by nucleophilic substitution on THP-protected precursor: Yield dependence on reaction parameters. *J Radioanal Nucl Chem.* 240(3):925-7.
- Phillips T.L, Fu K.K. (1978). The interaction of drug and radiation effects on normal tissues. *IntJ Radiat Oncol Biol Phys.* 4:59-64.
- Prekeges J.L., Rasey J.S., Grunbaum Z., Krohn K.H. (1991). Reduction of fluoromisonidazole, a new imaging agent for hypoxia. *Biochem Pharmacol.* 42(12):2387-95.
- Preshlock S., Tredwell M., Gouverneur V. (2016) ^{18}F -labeling of arenes and heteroarenes for applications in positron emission tomography. *Chem Rev* 116:719–766, Dollé F (2005) Fluorine-18-labelled fuoropyridines: advances in radiopharmaceutical design. *Curr Pharm Des* 11:3221–3235121.
- Purser S., Moore P.R., Swallowb S. & Gouverneura V. (2008). Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews.* 37:320-330.
- Sajjad M., Tolmachev V., Hosseinimehr S.J. (2019). Basic and practical concepts of radiopharmaceutical purification methods. *Drug Discovery Today.* 24(1):315-324

Sanduleanu S., Wiel A., Lieveise R., Marcus D., Ibrahim A., Primakov S., Wu G, Theys J., Yaromina A., Dubois L.J., Lambin P. (2020). Hypoxia PET Imaging with [18F]-HX4-A Promising Next-Generation Tracer. *Cancers (Basel)*. 12(5):1322.

Sato J., Kitagawa Y., Watanabe S., Asaka T., Ohga N., Hirata K., Okamoto S., Shiga T., Shindoh M., Kuge Y., Tamaki N. (2017) ¹⁸F-Fluoromisonidazole positron emission tomography (FMISO-PET) may reflect hypoxia and cell proliferation activity in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 124(3):261-270.

Schlyer D.J., Firouzbakhta M.L., Wolfa A.P., (1993) Impurities in the [18O] water target and their effect on the yield of an aromatic displacement reaction with [18F]Fluoride, *Appl. Radiat. Isot.* 44 1459–1465.

Schwartz G. (1909) Über desensibilisierung gegen röntgen- und radiumstrahlen. *Munch Med Wochenschr*. 56:1217–8.

Tang G.H, Wang M.F, Tang X.L, Gan M.Q, Luo L. (2005). Fully automated one-pot synthesis of [F-18]fluoromisonidazole. *Nucl Med Biol*.;32(5):553–558.

Teare H., Robins E. G., Kirjavainen A., Forsback S., Sandford G., Solin O., Luthra S. K., and Gouverneur V. (2010) Radiosynthesis and evaluation of [¹⁸F]Selectfluor bis(triflate). *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 49, 6821–6824.

Tewson T.J., Berridge M.S., Bolomey L., Gould K.L., (1988) Routine production of reactive Fluorine-18 Fluoride salts from an oxygen-18 water target, *Int. J. Rad. Appl. Instrum.* 15:499–504.

Urtasun R.C, Chapman J.D, Feldstein M.L, Band R.P, Rabin H.R, Wilson A.F, Marynowski B., Starreveld E., Shnitka T. (1978) Peripheral neuropathy related to misonidazole: incidence and pathology. *Br J Cancer Suppl*. 3:271-5.

Wang G.L, Jiang B.H, Rue E.A and Semenza GL. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loophelix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:5510-5514.

Wang M., Zhang Y., Zhang Y., Yuan H. (2009). Automated synthesis of hypoxia imaging agent [18F]FMISO based upon a modified Explora FDG4 module. *J Radioanal Nucl Chem.*;280(1):149–155.

Warnier C., Lemaire C., Becker G., Zaragoza G., Giacomelli F, Aerts J., Otabashi M., Bahri M.A, Mercier J., Plenevaux A, Luxen A. (2016). Enabling efficient positron emission tomography (PET) imaging of synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) with a robust and one-step radiosynthesis of a highly potent ¹⁸F-labeled ligand ([¹⁸F]UCB-H). *J Med Chem* 59:8955–8966.

Wasserman T.H, Phillips T.L, Johnson R.J. (1979). Initial united states clinical and pharmacologic evaluation of misonidazole (Ro-07-0582), an hypoxic cell radiosensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 5:775-786.

Wiltshire C.R, Workman P., Watson J.V and Bleehen N.M. (1980). Clinical studies with misonidazole. *Br J Cancer.*; 37(Suppl III):286-9.

Wuest M., Wuest F. (2013). Positron emission tomography radiotracers for imaging hypoxia. *J Labelled Comp Radiopharm.*56(3-4):244-50.

Yamamoto Y., Maeda Y., Kawai N., Kudomi N., Aga F., Ono Y., Nishiyama Y. (2012). Hypoxia assessed by ¹⁸F-fluoromisonidazole positron emission tomography in newly diagnosed gliomas. *Nucl Med Commun.* 33(6):621-5.

Yamane T., Aikawa M., Yasuda M., Fukushima K., Seto A., Okamoto K., Koyama I., Kuji I. (2019). [¹⁸F]FMISO PET/CT as a preoperative prognostic factor in patients with pancreatic cancer. *EJNMMI Res.* May 9;9(1):39.

Yokell D.L, Leece A.K, Lebedev A., Miraghaie R., Ball C.E., Zhang J.Z. (2012). Microfluidic single vessel production of hypoxia tracer 1H-1-(3-[F-18]-fluoro-2-hydroxy-propyl)-2-nitro-imidazole ([F-18]-FMISO) *Appl Radiat Isot.* 70(10):2313–2316.

Yuan H., Frank J. E., Merrill J. R., Hillesheim D. A., Khachaturian M. H., & Anzellotti, A. I. (2016). Automated PET Radiotracer Manufacture on the BG75 System and Imaging Validation Studies of [¹⁸F]fluoromisonidazole ([¹⁸F]FMISO). *Current radiopharmaceuticals.* 9(3), 235–243.

Zimny M., Gagel B., DiMartino E., Hamacher K., Coenen H.H., Westhofen M., Eble M., Buell U. and Reinartz P. (2006). FDG--a marker of tumour hypoxia? A comparison with [¹⁸F]fluoromisonidazole and pO₂-polarography in metastatic head and neck cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 33: 1426-1431