

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2022

Joel Hietaranta

[¹⁸F]PEG-FOLAATIN
ANALYYSIMENETELMÄN
KEHITYS JA VALIDOINTI

Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2022 | 37 sivua, 20 liitesivua

Joel Hietaranta

[¹⁸F]PEG-folaatin analyysimenetelmän kehitys ja validointi

Positroniemissiotomografia on kajoamaton kuvantamismenetelmä, jossa hyödynnetään lyhytikäisiä radioaktiivisia nuklideja, kuten fluori-18. ¹⁸F-leimattua PEG-folaattia voidaan hyödyntää esimerkiksi folaattireseptoriposiitivisten syöpäkasvainten PET-kuvantamisen merkkiaineena. Opinnäytetyössä kehitettiin [¹⁸F]PEG-folaatille analyysimenetelmä ja suoritettiin menetelmälle alustava harjoitusvalidointi. Harjoitusvalidoinnin tarkoituksena oli todentaa analyysimenetelmän sopivuus tarkoitukseensa ja laatia validointisuunnitelma ja –raportti, joiden pohjalta voidaan suorittaa virallinen validointi. Harjoitusvalidoinnissa määritettävät parametrit olivat spesifisyys ja toteamisraja.

Analyysimenetelmän kehityksessä käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistoa, jolle luotiin sopiva analyysimetodi. [¹⁸F]PEG-folaatti kyettiin tunnistamaan luotettavasti kromatogrammista. Validoitavat parametrit eli spesifisyys ja toteamisraja saatiin määritettyä suunnitellusti. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että menetelmä on tämän hetken tarpeisiin riittävä.

Opinnäytetyön tuloksia käytetään apuna suunniteltaessa lopullista analyysimenetelmien validointia ja dokumentointia. Validointisuunnitelma ja -raportti valmistuivat tutkimustulosten pohjalta osana opinnäytetyötä.

Asiasanat:

PET-kuvantaminen, radiomerkkiaineet, kromatografia, validointi, GMP

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Chemical and Materials Engineering

2022 | 37 pages, 20 appendices

Joel Hietaranta

Development and validation of analysis method for [18F]PEG-folate

Positron emission tomography is non-invasive imaging technique that utilizes short-lived radionuclides such as fluorine-18. ^{18}F -labeled PEG folate can be utilized as a marker for PET imaging, e.g. for folate receptor positive tumours. The aim of the thesis was to develop a method for the analysis of [^{18}F]PEG-folate and to perform preliminary training validation for the method.

The analytical method was developed utilizing high-performance liquid chromatography equipment. The aim of the preliminary validation was to prove the suitability of the analytical method developed and to select the appropriate validation parameters. Additionally, preliminary validation plan and report were written. In preliminary validation, the parameters for specificity and limit of detection were determined. [^{18}F]PEG-folate could be reliably identified using a reference standard.

The parameters to be validated were determined as planned. Based on the results, it was concluded that the method is sufficient for the analysis of [^{18}F]PEG-folate. The results of the preliminary validation are used to help plan the final validation of analytical methods. The validation report and plan were completed on the basis of the research results as part of the thesis.

Keywords:

PET imaging, radiotracers, chromatography, validation, GMP

Sisältö

Käytetyt lyhenteet tai sanasto	7
1 Johdanto	8
2 Merkkiaineet PET-kuvantamisessa	9
2.1 Positroniemissiotomografia (PET)	9
2.2 Radiomerkkiaineet	10
3 Kromatografia	12
3.1 Kromatografiat yleisesti	12
3.2 Nestekromatografia	13
4 [¹⁸F]PEG-folaatti	17
5 Laatu ja laadunvalvonta	19
5.1 Radiolääkkeiden laadunvalvonta	19
5.2 Hyvät tuotantotavat ja säteilyturvallisuus	20
6 Kromatografisten menetelmien validointi	22
6.1 Yleistä validoinnista	22
6.2 Validoinnin parametrit	23
7 Analyysimenetelmän validointi	25
7.1 Työn tarkoitukset	25
7.2 Materiaalit ja laitteet	25
7.3 Analyysireagenssien valmistus	27
8 Tutkimustulokset	29
8.1 Tuotteen identifioinnin tulokset	29
8.2 Spesifisyyden tulokset	29
8.3 Toteamisrajan tulokset	30
9 Johtopäätökset	31
10 Yhteenveto	32

11 Kiitokset	33
Lähteet	34

Liitteet

- Liite 1. Validointisuunnitelma.
- Liite 2. Validointiraportti.
- Liite 3. [¹⁸F]PEG-Folaatin analyysitulokset.
- Liite 4. Referenssin välilaimennoksen analyysitulokset.
- Liite 5. Standardilaimennoksen (1µg/ml) analyysitulokset.
- Liite 6. Referenssin laimennosten standardisuora.

Kaavat

Kaava 1. Resoluutiotekijän laskukaava.	30
Kaava 2. Toteamisrajan laskukaava.	30

Kuvat

Kuva 1. Follikulaarisen sekasoluisen lyfooman tutkimus FDG:lla.	10
Kuva 2. HPLC:an yksinkertaistettu toimintaperiaate.	14
Kuva 3. Radioaktiivisuusdetektorilla mitattu kromatogrammi [¹⁸ F]PEG-folaatista.	16
Kuva 4. Folaatin rakennekaava.	17
Kuva 5. [¹⁸ F]PEG-folaatin rakennekaava.	18

Taulukot

Taulukko 1. Käytetyt laitteet.	25
Taulukko 2. Käytetyt reagenssit.	26
Taulukko 3. HPLC-menetelmän ajo-olosuhteet.	26
Taulukko 4. Menetelmän gradientti.	26
Taulukko 5. Työssä käytetyt ajo- ja pesuliuokset.	27
Taulukko 6. Referenssin standardilaimennokset.	28
Taulukko 7. Tuotteen identifiointi.	29
Taulukko 8. Tuotteen spesifisyys.	30
Taulukko 9. Toteamisrajan tulokset.	30

Käytetyt lyhenteet tai sanasto

ACN	Acetonitrile (asetonitrili)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetyylisulfoksidi)
FDG	[¹⁸ F]Fluorodeoxyglucose ([¹⁸ F]fluorideoksiglukoosi)
GMP	Good manufacturing practices (hyvät tuotantotavat)
HPLC	High-performance liquid chromatography (korkean erotuskyvyn nestekromatografia)
LOD	Limit of detection (toteamisraja)
PEG	Polyethylene glycol (polyetyleeniglykoli)
PET	Positron emission tomography (positroniemissiotomografia)
RA	Radioaktiivinen
S/N	Signal-to-noise ratio (signaali-tausta-suhde)
STUK	Säteilyturvakeskus
TFA	Trifluoroacetic acid (trifluoretikkahappo)
TYKS	Turun yliopistollinen keskussairaala
USP	United States Pharmacopeia (Yhdysvaltojen farmakopea)
UV	Ultraviolet (ultraviolettisäteily)
Vis	Visible light (näkyvän valon alue)

1 Johdanto

Opinnäytetyöni toimeksiantajaksi valikoitui Turun Valtakunnallisen PET-keskuksen radiokemian laboratorio. Valtakunnallinen PET-keskus on perustettu 1974, ja se on Turun yliopiston, Åbo Akademin ja Turun yliopistollisen keskussairaalan (TYKS) yhteistyössä ylläpitämä tutkimuskeskus. PET-keskuksessa on Suomen johtava radiokemian laboratorio. PET on leikekuvausmenetelmä, joka antaa tietoa kudosten toiminnasta, elimistön aineenvaihdunnasta ja lääkeaineiden käyttäytymisestä kudoksissa. PET-kuvaukset on hyödyllinen, kun tutkitaan esimerkiksi syövän levinneisyyttä, aivoja tai sydäntä sekä tulehduspesäkkeitä etsittäessä.

PET-tutkimuksessa lääkeaine leimataan halutulla radionuklidilla ja näin syntynyt merkkiaine injisoidaan potilaaseen. Radiolääke kulkeutuu tutkittavaan kohteeseen, jota kuvataan säteilyä vastaanottavalla kameralla. PET-tutkimus yhdistää radioisotooppitutkimuksen tietokonetomografiakuvaukseen, ja tämän avulla pyritään saamaan tarkkaa tietoa sekä aineenvaihdunnasta että kudosten rakenteellisista muutoksista. (TYKS 2022.)

[¹⁸F]PEG-folaatti on kiinnostava tutkimuskohde, koska se voisi toimia potentiaalisena PET-radiolääkkeenä. Nivelreumapotilaille tehdyissä tutkimuksissa [¹⁸F]PEG-folaatti imeytyi erityisen hyvin tulehtuneisiin niveliin ja merkkiaineen aktiivisuus mm. lihaksissa ja luissa voi mahdollistaa sen käytön matala-asteisten tulehdusten kuvaamiseen muissa kehon osissa ja niveltulehduksen koko kehon alueella. ¹⁸F-leimattua PEG-folaattia voidaan myös hyödyntää esimerkiksi folaattireseptoriposiitivisten syöpäkasvainten PET-kuvantamiseen. (Verweij ym. 2020.)

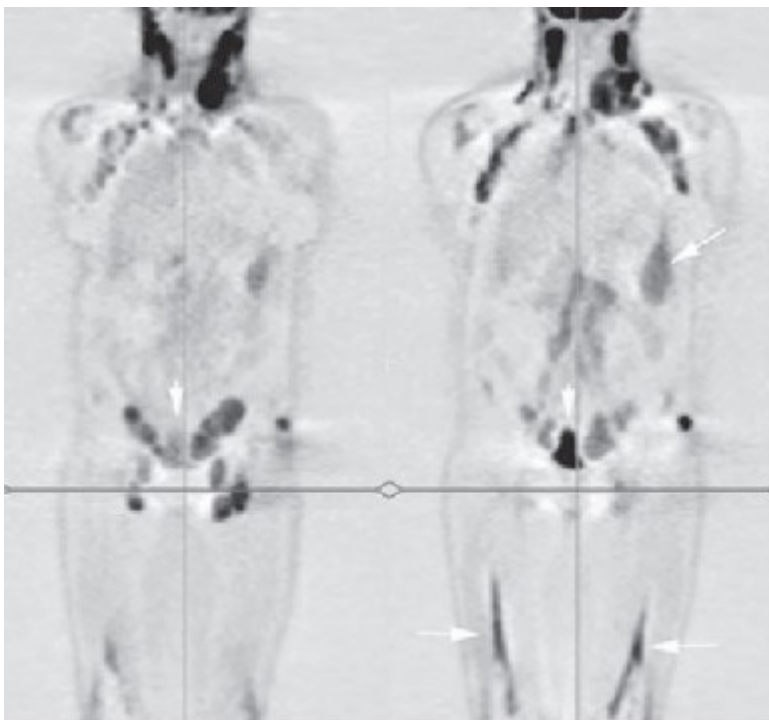
Opinnäytetyössä kehitettiin [¹⁸F]PEG-folaatin analyysimenetelmää ja suoritettiin menetelmälle alustava harjoitusvalidointi. Opinnäytetyön yhteydessä tehtiin myös epävirallinen validointisuunnitelma ja -raportti. Harjoitusvalidoinnissa määritettävät parametrit olivat spesifisyys ja toteamisraja. Opinnäytetyön tuloksia käytetään apuna suunniteltaessa lopullista analyysimenetelmien validointia ja dokumentointia.

2 Merkkiaineet PET-kuvantamisessa

2.1 Positroniemissiotomografia (PET)

Nuklideilla eli alkuaineen ytimillä on useita massaluvultaan poikkeavia muotoja, joita kutsutaan isotoopeiksi. Radionuklideiksi kutsutaan epävakaita nuklideja, jotka voivat hajota toisiksi alkuaineiksi. Kyseinen hajoaminen tunnetaan radioaktiivisuutena. Puoliintumisajalla tarkoitetaan nuklidin lähtöaktiivisuuden puolittumiseen kuluva aika. (Koskinen & Savolainen 2003, s. 24–25.) Positronit ovat elektronien antihyökkäisiä, jotka vapautuvat radioaktiivisen nuklidin hajoessa. Kyseessä on β^+ -hajo. Positronit törmäävät aineen elektroneihin, jolloin muodostuneiden parien molemmat hiukkaset annihiloituvat ja tästä vapautuva energia emittoituu kahtena vastakkaisiin suuntiin etenevinä gammakvantteina, jotka omaavat saman energian (511 keV). (Ruotsalainen 2003, s. 49; Janatuinen & Kempainen 2020.)

Positroniemissiotomografia (PET) on isotooppilääketieteessä yleisesti käytetty kajoamaton kuvantamismenetelmä, jossa suonensisäisesti annosteltu merkkiaine hakeutuu tutkittaviin kohteisiin. PET-kuvantaminen perustuu radiolääkkeisiin, joihin on liitetty positroneja emittoiva radionuklidi. PET-kameran detektorirengas havaitsee positronien vapautumisesta syntyneet säteilykvantit. Tämän perusteella saadaan rakennettua kolmiulotteinen kuva merkkiaineen jakautumisesta kohdekudoksessaan. Sen avulla on mahdollista kerätä tarkkaa informaatiota ihmisten ja eläinten elimistöistä, esimerkiksi fysiologisista ja biologisista toiminnoista. Kuvassa 1 on esimerkki PET-kuvasta. Enemmistö kliinisistä PET-kuvauksista liittyy syöpätautien tiedonkeruuseen ja hoitoon. Muita käyttökohteita ovat esimerkiksi infektioiden ja inflammaation aiheuttamien seurauksien selvittäminen sekä neurologiset ja kardiologiset aiheet. (Korpela 2003; Janatuinen & Kempainen 2020; Lameka ym. 2016.)



Kuva 1. Follikulaarisen sekasoluisen lymfooman tutkimus FDG:lla. (kuvakaappaus: Korpela, H. 2003. Isotooppilääketiede. Saatavissa https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja3_3.pdf/5a5eba88-7559-41a4-b0b8-ebef3cad5724. Viitattu 2.4.2022.)

2.2 Radiomerkkiaineet

PET-radiomerkkiaineet koostuvat positroneja emittoivan radionuklidin lisäksi orgaanisesta osasta. Stabiilin yhteyden saavuttamiseksi osien välillä voidaan käyttää linkkeriä. Merkkiaineen orgaaninen osa määrittelee biologiset ominaisuudet ja on vastuussa biokemiallisista sekä kemiallisista reaktioista elävän organismin suhteen. Orgaanisen osan on oltava spesifinen ja selektiivinen halutulle kohteelle ja tällaisia kohteita voivat esimerkiksi olla erilaiset reseptorisysteemit, antigeenit ja entsyymit. Patofysiologisessa tilassa orgaanisen osan vuorovaikutus kudosten kanssa voi olla huomattavasti muuttunut, jonka vuoksi orgaaninen osa ei tarjoa riittävästi informaatiota ulkoisen diagnoosin suorittamiseen. Tästä syystä radionuklidien liittäminen on tarpeellista. (Wadsak & Mitterhauser 2010.)

Yleisimpiä PET-kuvauksissa käytettäviä positronisäteileviä radionuklideja ovat hiukkaskiihdyttimellä tuotetut hiili-11, happi-15, fluori-18 sekä generaattorilla useimmin tuotettu gallium-68. Näiden puoliintumisajat ovat verrattain lyhyitä vaihdellen kymmenestä minuutista lähes kahteen tuntiin. (Korpela 2003.) Nuklidin valintaan vaikuttavat saatavuus, fysikaaliset ominaisuudet sekä radiokemialliset että radiofarmakologiset ongelmat. Puoliintumisajan tulee olla riittävän pitkä onnistuneen radioleimauksen ja kuvantamisen suorittamisen kannalta. (Wadsak & Mitterhauser 2010.)

3 Kromatografia

3.1 Kromatografiat yleisesti

Kromatografisia menetelmiä käytetään erilaisten yhdisteiden erottamiseen, puhdistamiseen, tunnistamiseen ja pitoisuuden määrittämiseen (Coskun 2016). Kromatografia perustuu yhdisteiden erilaisiin ominaisuuksiin, esimerkiksi sähkövarauksiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin, kuten molekyylien kokoon ja liukoisuuteen. (Harris 1999, s. 543.) Komponenttien jakautuminen tapahtuu kahden vuorovaikutuksessa olevan faasin, stationäärifaasin ja liikkuvan faasin välillä (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 140).

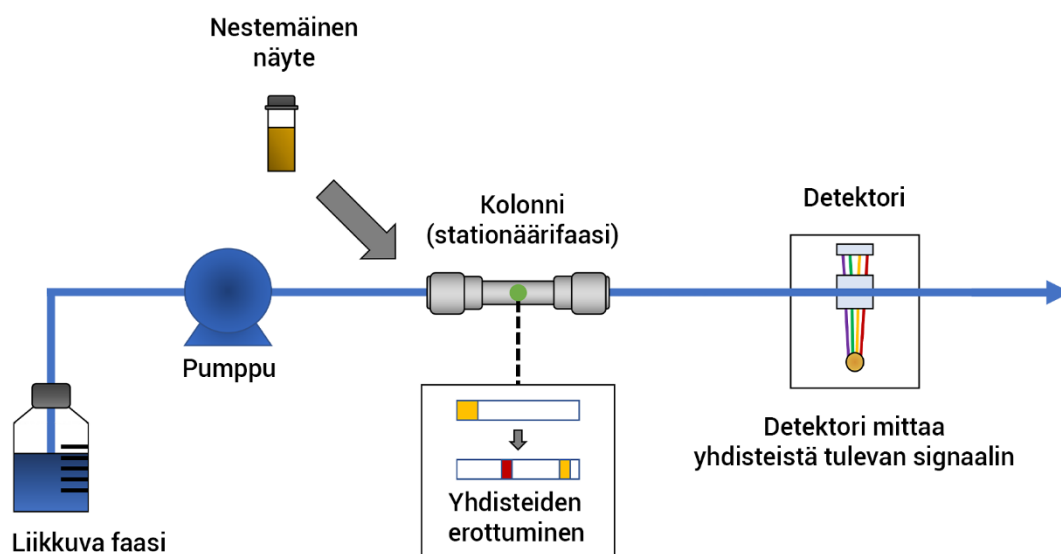
Kromatografisia tekniikoita on lukuisia eri tyyppisiä. Liikkuvan faasin olomuoto on yleensä neste tai kaasu. Stationäärifaasi on puolestaan kiinteä tai nestemäinen ja pysyy nimensä mukaisesti paikoillaan, eikä kulkeudu liikkuvan faasin mukana. Kromatografisten menetelmien jako tapahtuu yleensä liikkuvan faasin olomuodon mukaan. Nämä ovat esimerkiksi kaasu- tai nestekromatografia. (Jaarinen & Niiranen, s. 141.)

Erotus tapahtuu, kun näytteen molekyylit tarttuvat paikallaan olevaan faasiin lopulta taas irrotten siitä takaisin liikkuvaan faasiin. Komponenttien tarttuminen stationäärifaasiin vaikuttaa etenemisnopeuteen. Voimakkaasti sitoutuvat komponentit etenevät hitaammin liikkuvan faasin mukana. Heikosti sitoutuvat komponentit puolestaan etenevät nopeammin. Nesteen kulkeutumista laitteistossa sijaitsevan kolonnin läpi kutsutaan eluutioksi ja kuljettavaa nestettä eluentiksi (Harris 1999, s. 542). Eri yhdisteiden dynaamisten tasapainojen ero faasien välillä toimii perustana niiden erilaiseen kulkeutumiseen. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 140–141.)

3.2 Nestekromatografia

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) on orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden analysointiin käytetty menetelmä. HPLC:an käytön edellytys on saada tutkittava näyte liuotettua liuottimeen. HPLC:ssa on mahdollista käyttää useita eri erotustapoja, kuten esimerkiksi adsorptiota tai ioninvaihtoa. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 153; Braithwaite & Smith 1999, s. 260–264.)

Yksinkertaistetusti HPLC-laitteistoon kuuluvat eluenttisäiliöt, injektor, kolonni, yksi tai useampi pumppu, detektor, kaasunpoistaja ja datan käsittelyohjelmisto (Kazakevich & LoBrutto 2007). Näyte syötetään injektorilla laitteeseen. Eluentti kuljettaa näytteen kolonniin, joka on täytetty stationäärifaasilla. Paikallaan olevan faasin sisällä on pienikokoisia partikkeleita, joiden koko määrää yhdisteiden erottumistehokkuuden. Mitä pienempiä nämä stationäärifaasin partikkelit ovat, sitä tehokkaampaa erottuminen on. Tällöin aktiivisen alueen pinta-ala on laajempi, sillä suuremmat partikkelit veisivät enemmän tilaa. Laitteiston pumpun on kyettävä pumppaamaan eluenttia sykkeettömänä painetta vastaan virtauksen tasaisena pitämiseksi. Tutkittavan näyteyhdisteen komponenttien erottuminen tapahtuu sen kulkiessa kolonnin läpi. Yhdisteet saapuvat detektorille sitä myöhemmin, mitä voimakkaammin ne kiinnittyvät stationäärifaasiin. Detektor mittaa yhdisteistä tulevan signaalin ajan funktiona. Laitteisto ja sen ohjelmisto muodostaa kuvaajan signaalin perusteella näytölle. Tätä kuvaajaa kutsutaan kromatogrammiksi. (Jaarinen & Niiranen 2008, s.154; Braithwaite & Smith 1999, s. 399–424.) Kuvassa 2 on esitelty HPLC:n toiminta yksinkertaistettuna.



Kuva 2. HPLC:an yksinkertaistettu toimintaperiaate. ((alkuperäistä mukailtu: Shimadzu. What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? Saatavissa https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html. Viitattu 21.4.2022.))

Virtausnopeus määräytyy kolonnin mittojen, stationäärifaasin rakenteellisten ominaisuuksien ja eluentin viskositeetin mukaan. Analyttisissä HPLC:ssa käytetään vain harvoin suuria virtausnopeuksia. Suuremmat virtausnopeudet nopeuttavat aineiden eluoitumista, lyhentäen analyysiaikaa. Pumppujen materiaali tulee valita tarkoin, jotta ne kestävät orgaanisia liuottimia ja nestemäisiä puskureita, joita eluentit yleensä ovat. Pumppujen materiaalin on siis oltava inerttejä käytettyjä eluenteja kohtaan. Pumpun tiivisteiden on myös kyettävä kestämään suurienkin vastapaineiden käyttöä. Sen sisään syntyneet ilmakuplat lisäävät vastapaineen sekä virtauksen vaihtelua. Tämän vuoksi pumpusta ja siihen liitetyistä kapillaareista on poistettava ilma silloin kun kolonnia tai eluenttia vaihdetaan ja laite on ollut ilman virtausta. Paineenvaihteluiden syynä voivat olla myös tukkeutuneet suodattimet. Pumppuja on käytettävä aina

eluentin kanssa. Näytteen injektointi voidaan tehdä käsin ruiskun avulla tai laitteeseen rakennetulla automaatti-injektorilla. Automaatti-injektori mahdollistaa erisuuruisten tilavuuksien käytön, kun taas manuaali-injektioissa useiden eri injektio-tilavuuksien käyttö on työläämpää. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 163–165; Braithwaite & Smith 1999, s. 268.)

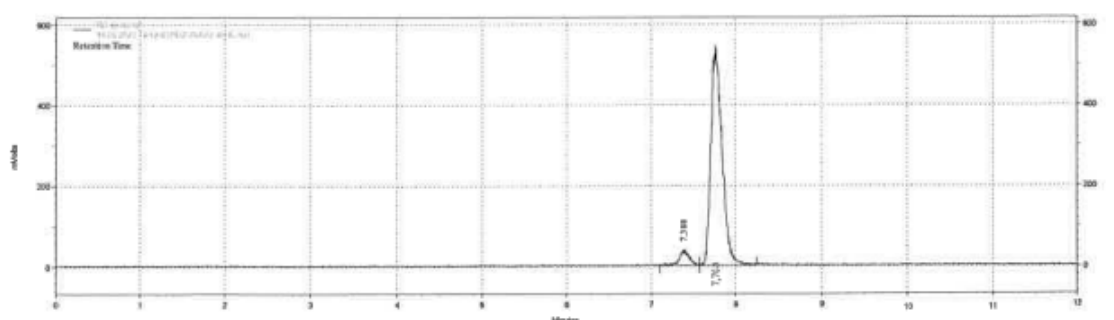
Analyttisissä HPLC:ssä käytettävät kolonnit ovat yleensä valmistettu ruostumattomasta teräksestä. Niiden pituus vaihtelee 3–30 cm välillä sisähalkaisijan ollessa noin 2–10 mm. Preparatiivisessa HPLC:ssä, jossa erotellaan suurempia näytetilavuuksia, käytetään halkaisijaltaan tyypillisesti suurempia, 10–25 mm kolonneja. Stationäärifaasi on pakattu kolonnin sisään ja sen materiaali on useimmiten hienojakoinen, pyöreäpartikkelinen silika. Partikkelikoko vaihtelee 3–10 µm analyttisissä kolonneissa. Preparatiivisissa kolonneissa partikkelikoko on yleensä 5–50 µm välillä. Pidemmässä kolonneissa partikkelit ovat usein suurempia. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 155, Agilent Technologies 2016.)

Nestekromatografian voi jakaa faasin perusteella normaali- ja käänteisfaasikromatografiaan sekä ioninvaihtokromatografiaan. Voimakas poolisuus on normaalifaasien pääominaisuus. Pooliset näytemolekyylit tarttuvat poolisiin faaseihin, jolloin ne viipyvät kauemmin kolonnissa. Valittavat eluentit ovat vastaavasti poolittomia ja vedettömiä. Käänteisfaasikromatografiassa puolestaan stationäärifaasi on pooliton ja eluentti poolinen. Ioninvaihtokromatografia perustuu nimensä mukaisesti ioninvaihtoon, jossa stationäärifaasissa olevat ioniset ryhmät tarttuvat vastakkaisesti varautuneihin ioneihin. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 155–158.)

Eluenttien tulisi olla spektroskopisesti puhtaita, partikkelivapaita, kaasupuhdistettuja ja filteröityjä. Mahdolliset partikkelit ovat haitallisia kolonnille ja ne esimerkiksi tukkivat sen. Yleisimmät käytetyt virtausnopeudet analyttisissä menetelmissä ovat alle 1 ml/min. Gradienttijaossa eluentin koostumusta muutetaan ajon aikana. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 161; Braithwaite & Smith 1999, s. 269; Harris 1999, s. 605; Kazakevich & LoBrutto 2007.)

Detektoreita on erilaisia. Detektori muuntaa kemiallisen tai fyysisen ominaisuuden havaittavaksi signaaliksi (Swartz 2010). Esimerkkinä on UV-Vis-detektori, jota käytetään, kun näytteillä on absorptio näkyvän valon tai UV-säteilyn alueella. Analysoitavien näytteiden ominaisuudet ja vaadittu mittausherkkyyys ohjaavat detektorin valintaa. Tutkittavan aineen rakenne määrä, mitä aallonpituutta on kannattavinta käyttää detektointiin. Detektorin mittaaman signaalin suuruus on suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon ja injektoituun määrään. (Jaarinen & Niiranen 2008, s. 166–167; Braihwaite & Smith, s. 269 ja 289.)

Radiolääkkeiden valmistuksen vuoksi radiokemian laboratoriossa on käytössä radioaktiivisuuden havaitsemiseen suunnitellut menetelmät HPLC-analyysijä varten. HPLC-laitteisiin on integroitu radioaktiivisuusdetektorit, jotka havaitsevat gammasäteilyä. Esimerkki radioaktiivisen HPLC-analyysin tuloksesta on esitelty kuvassa 3.



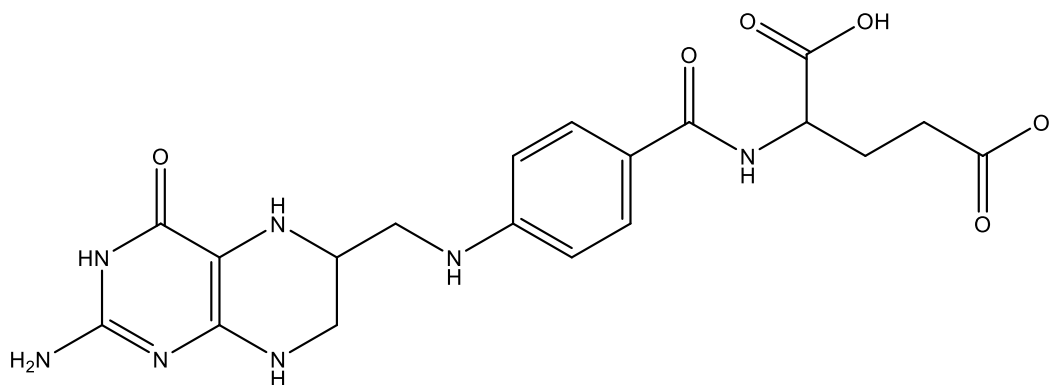
Kuva 3. Radioaktiivisuusdetektorilla mitattu kromatogrammi [^{18}F]PEG-folaatista.

Kuvassa y-akselin yksikkö on millivolti (mV) ja x-akselin minuutti (min). Ensimmäinen pienempi piikki kuvaa erottunutta epäpuhtautta. Toinen korkeampi piikki on tuote eli [^{18}F]PEG-folaatti.

4 [¹⁸F]PEG-folaatti

[¹⁸F]PEG-folaatti on viimeaikoina herättänyt huomiota mahdollisena uutena vaihtoehtona folaattipohjaiseksi PET-radiomerkkiaineeksi (esimerkiksi Gent ym. 2013). Folaatti on luonnossa esiintyvä vesiliukoinen vitamiini ja se tunnetaan myös B9-vitamiinina (Eerola 2022). Folaattien kemiallinen rakenne koostuu pteridiinirenkaasta, *p*-aminobentsoehaposta ja yhdestä tai useammasta glutamaattijäämästä. Folaatin rakennekaava on esitelty kuvassa 4. Usein luonnossa esiintyvät folaatit ovat pelkistyneessä muodossa. Foolihappo on folaatin synteettinen muoto, jota käytetään ravintolisänä tai lisättynä elintarvikkeisiin. (Ebara 2017.)

Folaatti on välttämätön solujen jakautumiselle ja verisolujen muodostumiselle. Ihmisen elimistö ei kykene tuottamaan folaattia luonnollisesti, jonka vuoksi se on saatava osana ravintoa tai ravintolisän muodossa. (Eerola 2022.) Folaatin puutos voi aiheuttaa kroonisia sairauksia ja kehityshäiriöitä, esimerkiksi hermostoputken sulkeutumishäiriöitä (Saini ym. 2016).

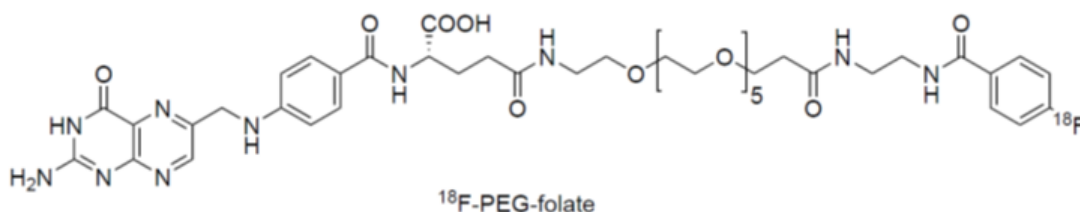


Kuva 4. Folaatin rakennekaava.

Fluori-18 on laajasti käytetty radionuklidi. 109,7 minuutin puoliintumisaika mahdollistaa pidemmät synteesiajat ja kuljettamisen kauemmaksi tuotantopaikalta. Fluoria luonnostaan sisältämättömissä molekyyliissä fluoriatomin lisääminen ei aiheuta voimakkaita steerisiä muutoksia, vaikka fysiokemialliset ominaisuudet voivat muuttaa leimatun yhdisteen biologista

käyttäytymistä. Fluori-18 omaa alhaisen positronin maksimienergian, joka mahdollistaa PET-kuvan korkeamman resoluution. (Varagnolo ym. 2000.) Suotuisista ominaisuuksista johtuen on kehitetty useita radiosynteettisiä menetelmiä sen sisällyttämiseksi biologisesti tärkeisiin ja merkittäviin molekyyliin, esimerkiksi vasta-aineisiin ja oligonukleotideihin (Jacobson & Kiesewetter & Chen 2015).

Nivelreumapotilailla tehdyillä tutkimuksilla on todettu, että [¹⁸F]PEG-folaatilla oli suotuisa biojakauma, sillä se metaboloitui nopeasti verenkierrosta ja sen aiheuttaman taustan kertymä oli pieni tärkeimmissä elimissä. Aine imeytyi erityisen hyvin tulehtuneisiin niveliin. Alhainen aktiivisuus mm. lihaksissa ja luissa tekee [¹⁸F]PEG-folaatista mahdollisesti soveltuvan matala-asteisten tulehdusten kuvaamisen muissa kehon osissa ja niveltulehduksen koko kehon alueella. (Verweij ym. 2020.) [¹⁸F]PEG-folaatin rakennekaava on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. [¹⁸F]PEG-folaatin rakennekaava.

5 Laatu ja laadunvalvonta

Käsitteellä laatu tarkoitetaan yleensä halutun asian mitattavia ominaisuuksia, joiden on täytyttävä vaatimusten mukaisesti. Määritelmät voivat perustua moniin eri lähteisiin, joita voivat esimerkiksi olla tuote-, tuotanto- ja reaalitaloudelliset arvoperusteiset menetelmät. (Anttila & Jussila 2016.) Laadun takaamiseksi organisaatiot käyttävät apunaan eri laatujärjestelmiä (SFS, ISO 9001 laadunhallinta).

5.1 Radiolääkkeiden laadunvalvonta

Lääkevalmistuksessa laadunvalvonta on oleellinen osa prosessia, jotta voidaan varmistaa tuotteen riittävä ja jatkuva laatu sekä lähtövaatimukset. Laadun seurannalla ylläpidetään potilasturvallisuutta. Ideaalitulanteessa radiolääkkeessä tulisi olla ainoastaan haluttua radioaktiivista nuklidia ja ei-toivottujen nuklidien aiheuttamaa kontaminaatiota olisi vältettävä tai pidettävä se mahdollisimman pienenä. Lääkkeen tulisi olla stabiili sekä kemiallisesti puhdas sisältäen vain haluttua kemiallista yhdistettä. Lisäksi merkkiaine ei saa olla kontaminoitunut mikrobien seurauksena tai sisältää kuumetta aiheuttavia aineita eli pyrogeenejä. (Korpela 2003; Bergström & Någren 2003, s. 33.) Valmistukseen käytettävien raaka-aineiden on täytettävä asetetut laatuvaatimukset ja laatu on tarkastettava ennen käyttöönottoa (Fimea 2011).

Radiolääkkeiden tuotantoprosessiin käytettävien laitteiden ja välineiden sekä menetelmien on oltava käyttötarkoitukseensa soveltuvia. Niiden on täytettävä tarkat laatuvaatimukset ja soveltuvuus käyttöön osoitetaan validoinneilla. Viollisen tai sellaiseksi epäillyn laitteen käyttö valmistuksessa ja laadunvalvonnassa on kiellettyä. Niiden ja tuotteen mahdolliset muutokset vaativat uudelleenvalidointia. (Huber 2007, s. 125-140; Fimea 2011.)

5.2 Hyvät tuotantotavat ja säteilyturvallisuus

PET-keskuksen radiolääketuotantoon sovelletaan sairaala-apteekkien lääkevalmistuksen menettelytapoja, jotka poikkeavat jonkin verran muusta lääketeollisuudesta ja niihin käytettävistä ohjeistuksista. Apteekkien valmistamat lääkkeet eivät myöskään kuulu saman ennakkovalvonnan alle. Valmistettavien radiolääkkeiden on oltava turvallisia, jonka varmistamiseksi radiolääketuotannossa noudatetaan hyviä tuotantotapoja (GMP). (Fimea 2011.)

GMP-laatu järjestelmän avulla varmistetaan tuotannon yhdenmukaisuus ja valvonta laatustandardien mukaisesti. GMP-ohjeistus on suunniteltu minimoimaan lääketuotantoon liittyvät riskit, joita ei voida poistaa lopputuotetta testaamalla. Suurimmiksi riskeiksi luokitellaan terveyshaittoja aiheuttava odottamaton kontaminaatio tuotteissa ja pakkausten virheelliset merkinnät, joista voi aiheutua monia haitallisia seurauksia, kuten yliannostuksia. GMP kattaa kaikki tuotannon osa-alueet aina lähtömateriaaleista, laitteista, tiloista työntekijöiden koulutukseen ja riittävään hygienia- ja turvallisuustasoon tuotannossa, jotta tuote on riittävän turvallinen potilaskäyttöön. Yksityiskohtaiset kirjalliset menettelyt vaaditaan kaikille prosesseille, jotka voivat vaikuttaa lopputuotteen laatuun. Aina tuotetta valmistettaessa on oltava dokumentoitu todiste siitä, että oikeita menettelyjä noudatetaan johdonmukaisella tavalla jokaisessa valmistusprosessin vaiheessa. (WHO, GMP Questions and Answers 2015.)

GMP-säädökset käsittelevät muun muassa kirjanpitoa, henkilöstön pätevyyttä, laitteiden todennusta, prosessien validointia ja valitusten käsittelyä. Valtaosa GMP-vaatimuksista on avoimesti ja yleisesti saatavilla. Määräykset suojaavat kuluttajaa ostamasta viallisia tai tehottomia tuotteita. (ISPE, What is GMP?) GMP-säädösten noudattamatta jättämisellä voi olla yrityksille vakavia seurauksia. Lääketurvallisuus- ja kehittämiskeskus (Fimea) voi esimerkiksi peruuttaa lääkkeiden tuottamisen luvan määräajaksi tai kokonaan. (Finlex 2020.)

Radioaktiivisuudesta aiheutuvien vaatimusten vuoksi PET-radiomerkkiaineisiin sovelletaan yleisten GMP-ohjeiden lisäksi spesifisesti radiolääkkeille suunnattuja ohjeita. Tuotantotilojen on sovittava käyttötarkoitukseensa, esimerkiksi säteilyltä suojautumisen suhteen. Säteilyturvallisuuden toteutus perustuu voimassa oleviin säteilylakeihin ja asetuksiin sekä Säteilyturvakeskuksen (STUK) määräyksiin ja dokumentteihin. Henkilöstöllä tulee olla riittävä koulutus ja pätevyys säteilytyöskentelyyn. Nämä spesifiset ohjeet kattavat tuotannon, laadunvalvonnan ja merkkiaineiden vapautuksen parissa toimivan henkilöstön. Henkilöstön ja tuotteiden tulee olla suojattuja kontaminaatioiden estämiseksi, joka asettaa laadunvarmistusjärjestelmälle vaatimuksia. (Euroopan komissio 2008.) Tavoitteiden saavuttamiseksi PET-keskuksen henkilöstön osaamista tulee kehittää jatkuvasti, esimerkiksi vuosittaisilla koulutuksilla. PET-keskuksen työntekijät noudattavat tarkkaan määriteltäviä toimintaohjeita (SOP, Standard Operating Procedure) ja menetelmäohjeita (MET). Laatu- ja dokumentaatiojärjestelmää ohjaa PET-keskuksen oma Site Master File (SMF) (Euroopan komissio 2010).

Euroopan farmakopea on Euroopan neuvoston julkaisema kokoelma sitovista laatuvaatimuksista lääkeaineille, apuaineille ja lääkevalmisteille. Farmakopea määrittää myös radiomerkkiaineilla, kuten [^{18}F]PEG-folaatilla, tehtävien analyysien hyväksymisrajat. Fimea on farmakopean aseman vahvistava viranomaistaho, joka valvoo sen normien toteutumista. (Salo & Sinivuo 2013.)

6 Kromatografisten menetelmien validointi

6.1 Yleistä validoinnista

Validoituja menetelmiä voidaan pitää perustavana edellytyksenä laatujärjestelmän toimivuudelle (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 1). Radiokemian analytiikassa laadunvarmistamiseen liittyvien toimenpiteiden päämääränä on taata analyysitulokset oikeellisiksi ja todistusvoimaisiksi. Validoinnilla varmistetaan menetelmien soveltuminen käyttötarkoituksiinsa, niiden antamien tulosten riittävä luotettavuus ja tulosten epävarmuuksien tunteminen. Kriteerit, joilla menetelmä on mahdollista hyväksyä, voivat tulla monelta eri taholta. Ne voivat olla esimerkiksi mahdollisilta asiakkailta, viranomaisilta tai laboratorioilta itseltään. (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 1.)

Edellytys validoinnin onnistumiselle on tiettyjen validointiparametrien tunteminen. Näitä ovat esimerkiksi lineaarisuus, mittausalue, spesifisyys, selektiivisyys, tarkkuus, toistettavuus, toteamis- ja määrittäysraja sekä herkkyys. Validointisuunnitelmaa tehtäessä tulee miettiä tarkoin validoinnin laajuutta validoitavan menetelmän kohdalla. Menetelmää kehitetään saatujen tulosten pohjalta, jotta päästään haluttuihin arvoihin. On hyvä huomioida, että validoinnin terminologia on monikäsitteinen ja edellä mainittujen parametrienkin määritelmässä esiintyy eroja eri lähteiden välillä. (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 1; Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 11–20; Huber 2007, s. 140.)

Validointitavat voidaan jaotella sen mukaan, missä vaiheessa tuotantoprosessia validointityö tehdään. Validointi voidaan tehdä prospektiivisesti (ennen) tai retrospektiivisesti (jälkikäteen analyysimenetelmän prosessitietoja hyödyntäen). (Euroopan komissio 2015.) PET-keskuksessa validoinnit suoritetaan pääasiassa prospektiivisesti. PET-keskuksen validointitoimintaa ohjaa validoinnin runkosuunnitelma (VMP, Validation Master Plan), joka määrittää toiminnan laajuuden ja periaatteet.

Käyttökelpoisessa menetelmässä erilaisten systemaattisten ja satunnaisten virheiden on oltava hallinnassa. Mittausepävarmuuteen ja -tarkkuuteen vaikuttavat useat eri tekijät, joista menetelmän käyttäjän tulee olla tietoinen. Validoinnissa dokumentointi on olennaisessa osassa, joten sen on oltava riittävää ja asianmukaista. Sillä pyritään osaltaan varmentamaan tulosten todistuskyky. Validointiraportti on osa dokumentointia, jossa kerrotaan tavoite, toteutus, näytteet, parametrit, tulokset ja tulosten pohjalta saadut johtopäätökset. Validoinnin jälkeen validoidun menetelmän toimivuutta tulee seurata. Tämän suorittamiseen käytetään erilaisia laadunvarmistustoimenpiteitä. Sopivia keinoja ovat esimerkiksi mahdolliset omat referenssimateriaalit, standardinlisäykkeet ja vertailumittaukset eli pätevyyskokeet. (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 22; Hiltunen ym. 2011, s. 67.)

6.2 Validoinnin parametrit

Kromatografisen menetelmän validoinnissa käydään läpi samat parametrit kuin muidenkin menetelmien kohdalla. Laitteiston ja detektorin toiminta tarkastetaan tutkimalla selektiivisyys, spesifisyys, lineaarisuus, injektion toistettavuus, mittausalue, toteamis- ja määritysrajat sekä herkkyys. Näytteenkäsittelyn toimivuuden varmistamiseksi tarkastetaan puolestaan tarkkuus, täsmällisyys ja häiriöalttius. (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, liite 1.)

Spesifisyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä tuottaa vaste tutkittavalle yhdisteelle eli kuinka hyvin se pystyy mittaamaan juuri tietyn komponentin määrää (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 1–2). Menetelmä voidaan luokitella spesifiseksi, jos se on kokonaan selektiivinen analysoitavalle yhdisteelle (Hiltunen ym. 2011, s. 11).

Toteamisraja (LOD, limit of detection) tarkoittaa sitä pitoisuutta, jonka avulla voidaan luotettavasti todeta, onko näytteessä haluttua yhdistettä vai ei. Siinä analysoitavalle aineelle määritetyn vasteen tai pitoisuuden on oltava niin suuri, että se ei voi aiheutua taustan luomasta satunnaisvaihtelusta. Sen määrittäminen perustuu usein hyvin usein taustassa tapahtuvan hajonnan tutkimuksiin. (Elintarvikevirasto, Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje 1997, s. 6; Hiltunen ym. 2011, s. 13.)

7 Analyysimenetelmän validointi

Tässä osiossa kuvataan tutkimuksen suorittamiseen liittyvät vaiheet ja menetelmät.

7.1 Työn tarkoitukset

Työ toimi alustavana harjoitusvalidointina kehitteillä olevan [¹⁸F]PEG-folaatti-radiomerkkiaineen analyysimenetelmälle. Harjoitusvalidoinnin tarkoituksena oli todentaa analyysimenetelmän sopivuus tarkoitukseensa. Tavoitteena oli tunnistaa radioaktiivinen tuote, määrittää tuotteen, lähtöaineen ja epäpuhtauksien pitoisuudet, tuotteen kemiallinen puhtaus sekä laatia validointisuunnitelma että -raportti. Määritettävät validointiparametrit olivat spesifisyys ja toteamisraja. Työn tulosten pohjalta PET-keskus voi suorittaa lopullisten analyysimenetelmien validoinnin ja siihen liittyvän dokumentoinnin.

7.2 Materiaalit ja laitteet

Työssä käytetyt materiaalit ja laitteet valittiin aikaisempien [¹⁸F]PEG-folaatin tutkimuksissa käytettyjen materiaalien ja laitteiden perusteella. Käytettävien laitteiden kokoonpanot ja parametrit olivat soveltuvia, täyttivät PET-keskuksen vaatimukset ja asetetut laatuvaatimukset. Työn suorittamiseen käytetyt laitteet löytyvät taulukosta 1 ja reagenssit taulukosta 2.

Taulukko 1. Käytetyt laitteet.

HPLC-laitteisto	Shimadzu Nexera SCL-40
Kolonni	Jupiter 4u Proteo 90A, 4,6 x 250 mm
Ultraviolettidetektor	Shimadzu SPD-40
Radioaktiivisuusdetektor	Canberra Ratemer 2081, Tennelec TC 948 High voltage supply, Tennelec TC 246 AMP/SCA Coarse gain ja Tennelec TC 909 Power supply

Taulukko 2. Käytetyt reagenssit.

Lähtöaine	Valmistaja
Ultrapuhdas vesi	-
Natriumkloridi (9 mg/ml)	B.Braun
DMSO	Sigma-Aldrich
PEG-folaatin lähtöaine (2 mg/ml)	ABX
PEG-folaatin referenssi	ABX

Käytetyt HPLC:an ajo-olosuhteet esitetään taulukossa 3 ja gradientti taulukossa 4. Ajo-olosuhteet valittiin aikaisempien [¹⁸F]PEG-folaatin tutkimusten perusteella. Ajo-olosuhteet pysyivät muuttumattomina. Ajoaikaa lyhennettiin 22 minuutista 13 minuuttiin.

Taulukko 3. HPLC-menetelmän ajo-olosuhteet.

Kolonnin lämpötila	Huoneenlämpö
Virtausnopeus	1 mL/min
Eluentti A	0,1 % TFA/H ₂ O
Eluentti B	0,1 % TFA/ACN
Injektioilavuus	20 µl
Aallonpituus	254 nm
Pesu	70/30 ACN/H ₂ O

Taulukko 4. Menetelmän gradientti.

Aika (min)	Virtausnopeus ml/min	Eluentti A (%)	Eluentti B (%)
0.00	1.0	77.0	23.0
11.00	1.0	55.0	45.0
11.40	1.0	77.0	23.0
13.00	1.0	77.0	23.0

7.3 Analyysireagenssien valmistus

Analysoidut näytteet olivat [¹⁸F]PEG-folaatti, referenssin laimennokset, lähtöaineen laimennos sekä laimennetun referenssin ja laimennetun lähtöaineen seos. Reagenssien valmistus koostui neljästä työvaiheesta, jotka on kuvattu alla olevassa tekstissä.

Kaikkien analyysimenetelmän validoinnissa käytettyjen liuosten valmistusohjeet ja työvaiheet on esitelty liitteessä 1 sivulla 3. Kaikkien analyyseissä käytettyjen liuosten valmistuksessa noudatettiin PET-keskuksen standardoituja valmistusohjeita.

PET-keskuksen radiokemian laboratoriossa valmistettiin analyyseja varten ajo- ja pesuliuokset eluentti A ja eluentti B sekä pesuliuos. Ajo- ja pesuliuosten koostumus esitellään taulukossa 5 ja valmistuksen vaiheet liitteessä 1 sivulla 3.

Taulukko 5. Työssä käytetyt ajo- ja pesuliuokset.

Liuos	Koostumus	Valmistus
A	0,1 % TFA/H ₂ O	1 ml TFA, 1000 ml H ₂ O
B	0,1 % TFA/ACN	1 ml TFA, 1000 ml ACN
Pesuliuos	70/30 ACN/H ₂ O	700 ml ACN, 300 ml H ₂ O

Tiivistetysti voidaan todeta, että referenssin kantaliuos valmistettiin liuottamalla 1 mg PEG-folaatin referenssiä 1 ml:aan DMSO:ia, jolloin konsentraatioksi saatiin 1 mg/ml. Tästä kantaliuksesta tehtiin referenssin välilaimennos, jossa 100 µl referenssin kantaliuosta sekoitettiin 900 µl:aan natriumkloridia. Referenssin välilaimennoksen konsentraatioksi saatiin 100 µg/ml. Referenssin kantaliuoksen ja referenssin välilaimennoksen valmistusohjeet on esitetty liitteessä 1 sivulla 3.

Referenssin välilaimennoksesta tehtiin myös kolme muuta laimennosta standardisuoraa varten. Laimennokset valmistettiin natriumkloridiin ja niiden pitoisuudet on esitelty liitteessä 1 sivulla 3 ja taulukossa 6.

Taulukko 6. Referenssin standardilaimennokset.

Näyte	Referenssin laimennos (µl)	NaCl (µl)	Tilavuus (µl)	Laimennoksen vahvuus (µg/ml)
Standardi 1	100	900	1000	10
Standardi 2	50	950	1000	5
Standardi 3	10	990	1000	1

Lähtöaineen kantaliuos valmistettiin liuottamalla 2 mg lähtöainetta 1 ml:aan DMSO:ia, jonka konsentraatioksi saatiin 2 mg/ml. Kantaliuksesta valmistettiin 100 µg/ml-välilaimennos sekoittamalla 50 µl kantaliuosta 950 µl:aan natriumkloridia.

Lopuksi sekä referenssin että lähtöaineen kantaliuoksia sekoitettiin keskenään 500 µl (1:1). Lähtöaineen kantaliuoksen, lähtöaineen välilaimennoksen sekä referenssin ja lähtöaineen välilaimennosoksen valmistus on esitetty liitteessä 1 sivulla 3.

8 Tutkimustulokset

Tekstissä edellä kuvatulla tavalla valmistettuja ajo-, pesu- ja analyysiliuoksia sekä synteetin jälkeistä [¹⁸F]PEG-folaattia käytettiin tutkimuksen suorittamiseen HPLC:lla. Tutkimuksessa tunnistettiin tuote ja määritettiin halutut validointiparametrit eli spesifisyys ja toteamisraja. Tulokset on esitetty laajemmin liitteessä 2 sivuilla 5 ja 6.

8.1 Tuotteen identifioinnin tulokset

Tuotteen identifiointi eli tunnistus suoritettiin vertaamalla radioaktiivisuusdetektorin pääpiikin retentioaikaa (t_2) referenssiliuoksen UV-kromatogrammin retentioaikaan (t_1) Tulosta verrattiin hyväksymisrajaan ja koska hyväksymisehto täyttyi, todettiin tulos hyväksytyksi. Retentioajat, hyväksymisraja ja tulos on esitelty taulukossa 7.

Taulukko 7. Tuotteen identifiointi.

t_1 (min)	6.23
t_2 (min)	6.18
Hyväksymisraja (min)	$t_2 = t_1 \pm 0.3$
Tulos (min)	0.05

8.2 Spesifisyyden tulokset

Spesifisyyden määrittäminen tapahtui tässä opinnäytetyössä laskemalla tuotteelle resoluutiotekijä R_s . Laskemisen suorittamiseen käytettävä ohjelma oli LabSolutions™ Software. Ohjelma laski resoluution käyttämällä kaavaa 1, missä t_R on retentioaika ja w on piikin leveys (USP).

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 - w_2}$$

Kaava 1. Resoluutiotekijän laskukaava.

Resoluutiolla kuvataan piikkien erottumista toisistaan ja sen riittävyys on kromatografiassa keskeinen vaatimus (Jaarinen, 147). Spesifisyys määritettiin tuotteelle laskemalla resoluutiotekijä (R_s) UV-detektorin (R_{s1}) ja RA-detektorin (R_{s2}) kromatogrammeista. Tulokset ylittivät hyväksymisrajan ja ovat esitelty taulukossa 8.

Taulukko 8. Tuotteen spesifisyys.

	Tulos ($[^{18}\text{F}]$ PEG-folaatti)
R_{s1} (min)	2.26
R_{s2} (min)	10.12
Hyväksymisraja (min)	> 1.5

8.3 Toteamisrajan tulokset

Toteamisrajan laskemisessa käytettiin kaavaa 2, missä S/N on signaali-taustasuhte ja c on konsentraatio.

$$LOD = \frac{\text{Hyväksymisraja}}{S/N} \times c$$

Kaava 2. Toteamisrajan laskukaava.

Tässä opinnäytetyössä hyväksymisrajana käytettiin PET-keskuksen yleistä hyväksymisrajaa. Referenssin toteamisraja määritettiin pitoisuudeltaan pienimmästä standardilaimennoksesta. Tulokset on esitelty taulukossa 9.

Taulukko 9. Toteamisrajan tulokset.

Näyte	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
Standardi 3	0,07

9 Johtopäätökset

Analyyseistä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että menetelmä on tämänhetkisiin tarpeisiin nähden soveltuva. Tuotteen tunnistaminen onnistui ja validoitavat parametrit eli spesifisyys sekä toteamisraja saatiin määritettyä. Tulokset noudattivat PET-keskuksen yleisiä hyväksymisrajoja. HPLC:an ajo-olosuhteita muokattiin alkuperäisiä käytännöllisemmiksi lyhentämällä analyysin metodin ajoaikaa.

On huomioitava, että työssä käytetty HPLC-laitteisto ei ollut tuotantokäytössä. [^{18}F]PEG-folaatin siirtyessä tuotantoon validointi on suoritettava uudestaan pätevän henkilön suorittamana. Merkkiaineen kehityksen varhainen tilanne ja validoinnin epävirallisuus johtivat validoinnin laajuuden rajallisuuteen tässä tutkimuksessa.

Kokonaisvaltaisempien tulosten saamiseksi parametrit tulee määrittää uudelleen tilanteeseen sopivalla tavalla. On hyvin mahdollista, että virallisessa validoinnissa tullaan määrittämään enemmän parametreja, joita voivat esimerkiksi olla toistettavuus, lineaarisuus ja mittausalue. Esimerkinomaisesti voidaan todeta, että laajempien sekä luotettavampien tulosten saamiseksi olisi kannattavaa analysoida enemmän näytteitä. Aktiivista tuotetta ajettiin vain yksi näyte ja vertailun vuoksi olisi ollut hyvä tehdä rinnakkaisia analyyseja. Tuotteesta ei tehty laimennoksia, joiden pitoisuudet olisivat vastanneet referenssistä tehtyjä laimennoksia.

10 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää [¹⁸F]PEG-folaatin analyysimenetelmä ja suorittaa menetelmälle alustava harjoitusvalidointi. Analyysimenetelmä optimoitiin ja se vastaa tulevaa tarkoitustaan. Harjoitusvalidointi suoritettiin onnistuneesti halutuille parametreille, jotka olivat spesifisyys ja toteamisraja.

[¹⁸F]PEG-folaatti havaittiin kromatogrammista luotettavasti ja selvästi. Parametreille määritetyt arvot täyttivät PET-keskuksen hyväksymiskriteerit. Validointisuunnitelma ja -raportti valmistuivat tutkimustulosten pohjalta osana opinnäytetyötä.

Opinnäytetyötä varten tehtyjä tuloksia käytetään apuna suunniteltaessa lopullista validointia ja dokumentointia.

11 Kiitokset

Haluan antaa kiitoksen PET-keskuksen osalta opinnäytetyön vastuuohjaajalleni Anna Kirjavaiselle sekä avustaville ohjaajille Krista Heikkilälle ja Melina Väkiparralle tuen antamisesta prosessin aikana. Kiitän myös kaikkia niitä PET-keskuksen työntekijöitä, jotka auttoivat työn saattamisessa loppuun.

Lisäksi haluan kiittää Turun ammattikorkeakoululta ohjaajaani Piritta Saipaa ja opinnäytetyökoordinaattori Jani Pelkosta neuvojen antamisesta. Kiitän lisäksi opponenttiani Elmeri Vainio-Ketolaa sekä kaikkia muita neuvoja antaneita henkilöitä.

Lähteet

- Agilent Technologies 2016. The LC Handbook. Viitattu 31.7.2022. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>.
- Anttila, J. & Jussila, K. 2016. Mitä laatu on? Viitattu 12.4.2022. <https://sfs.fi/mita-laatu-on>.
- Bergström, K. & Någren, K. 2003. Radiolääkkeet. Teoksessa Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Toim. A. Sovijärvi ym. Duodecim. Helsinki, s. 33.
- Braithwaite, A. & Smith F.J. 1999. Chromatographic methods. Kluwer Academic Publishers. 5. painos. The Netherlands, s. 260-442.
- Coskun, O. 2016. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. Viitattu 8.5.2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206469/>.
- Ebara, S. 2017. Nutritional role of folate. Viitattu 10.5.2022. <https://doi.org/10.1111/cga.12233>.
- Eerola, H. 2022. Folaatti, seerumista, fS-Folaat. Viitattu 25.4.2022. <https://www.terveyskirjasto.fi/snk99008>.
- Ehder, T. 2005. Kemian metrologian opas. Viitattu 11.4.2022. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>.
- Elintarvikevirasto 1997. Kemiallisten analyysimenetelmien validointiohje. Helsinki.
- Euroopan komissio 2008. Annex 3 Manufacture of Radiopharmaceuticals. Viitattu 26.4.2022. [Microsoft Word - 2008_09 Annex 3 final public.doc \(europa.eu\)](https://ec.europa.eu/health/files/2008_09_annex_3_final_public.doc).
- Euroopan komissio 2015. Annex 15 Qualification and Validation. Viitattu 25.7.2022. https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/2015-10_annex15_0.pdf.
- Euroopan komissio 2016. Explanatory Notes on the preparation of a Site Master File. Viitattu 25.7.2022. https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/2011_site_master_file_en_0.pdf
- Finlex 2020. Lääkelaki 10.4.1987/395. Viitattu 16.5.2022. [https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395?search\[type\]=pika&search\[pika\]=l%C3%A4%C3%A4kelaki#V34](https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395?search[type]=pika&search[pika]=l%C3%A4%C3%A4kelaki#V34).

Fimea 2011. Apteekkien lääkevalmistus. Viitattu 18.4.2022. https://www.fimea.fi/documents/160140/764653/20675_FINAL_Apteekkien_laakevalmistus_maarays_SUOMI_2011-12-16.pdf.

Gent, Yoony YJ ym. 2013. Evaluation of the novel folate receptor ligand [¹⁸F]fluoro-PEG-folate for macrophage targeting in a rat model of arthritis. Viitattu 27.4.2022. <https://arthritis-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/ar4191.pdf>.

Harris, Daniel C. 1999. Quantitative Chemical Analysis, 8th Edition. Viitattu 13.4.2022. https://www.academia.edu/32454429/Harris_Quantitative_Chemical_Analysis_8th_edition.

Hiltunen, E. ym. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Metrologian neuvottelukunta. MIKES. Espoo, s. 11–67.

Huber, L. § 2007. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. CRC Press. 2nd edition. s. 125-140.

ISPE. What is GMP? Viitattu 18.4.2022. <https://ispe.org/initiatives/regulatory-resources/gmp/what-is-gmp#>.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysiteknikka. Edita. 6. painos. Helsinki, s. 140–167

Jacobson, O. & Kiesewetter, Dale O. & Chen, Xiaoyuan 2015. Fluorine- 18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. Viitattu 25.4.2022. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bc500475e>.

Janatuinen, T. & Kemppainen, J. 2020. PET-kuvantamismenetelmät yleistajuisesti. Viitattu 11.4.2022. <https://www.duodecimlehti.fi/duo15553>.

Kazakevich, Y. & LoBrutto, R. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Viitattu 25.4.2022. https://books.google.fi/books?hl=en&lr=&id=csAk-MpeTocC&oi=fnd&pg=PR5&dq=hplc+for+pharmaceutical+scientists&ots=Do5ZYoYENm&sig=Xar-R5OchcrbUqnfV7q1WRNNjE0&redir_esc=y#v=onepage&q=hplc%20for%20pharmaceutical%20scientists&f=false.

Korpela, H. 2003. Isotooppilääketiede Viitattu 2.4.2022. https://www.stuk.fi/documents/12547/494524/kirja3_3.pdf/5a5eba88-7559-41a4-b0b8-ebef3cad5724.

Koskinen, M. & Savolainen, S. 2003. Radioaktiivinen hajoaminen, säteilyn ja aineen vuorovaikutus sekä käytetyt radionuklidit. Teoksessa Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Toim. A. Sovijärvi ym. Duodecim. Helsinki, s. 24–25.

Lameka, K. & Farwell, M.D. & Masanouri, I. 2016. Chapter 11 – Positron Emission Tomography. Viitattu 10.5.2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53485-9.00011-8>.

Ruotsalainen, U. 2003. PET-tutkimukset. Teoksessa Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Toim. A. Sovijärvi ym. Duodecim. Helsinki, s. 49–55.

Saini, R.K. & Nile, S.H. & Keum, Y. 2016. Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. Viitattu 12.5.2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.013>.

Salo, P. & Sinivuo, K. 2013. Euroopan farmakopea - vireä viisikymppinen. Sic! Numero 3/2013. Viitattu 25.4.2022. https://sic.fimea.fi/3_2013/euroopan_farmakopea_virea_viisikymppinen.

SFS. ISO 9001 Laadunhallinta. Viitattu 25.4.2022. <https://sfs.fi/standardeista/tutustu-standardeihin/suosittu-standardit/iso-9001-laadunhallinta/>.

Sherma, J. & Fried, B. 2004. Handbook of Thin-Layer Chromatography. Viitattu 26.4.2022. https://books.google.fi/books?hl=en&lr=&id=Qc79DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=handbook+of+thin+layer+chromatography&ots=67DK3FB1nw&sig=eWpZCHduEOPbyJd15BIBIBWWnt0&redir_esc=y#v=onepage&q=handbook%20of%20thin%20layer%20chromatography&f=false.

Shimadzu. What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? Viitattu 21.4.2022. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html.

Swartz, M. 2010. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. Viitattu 10.5.2022. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.

TYKS 2022. PET-keskus. Viitattu 16.10.2022. <https://www.vsshp.fi/fi/toimipaikat/tyks/osastot-ja-poliklinikat/Sivut/pet-keskus.aspx#horisontaali3>.

Varagnolo, L. ym. 2000. ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals for PET in oncology, excluding FDG. Viitattu 20.4.2022.

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969805199001092?casa_token=UFXhkWwVoTsAAAAA:bUHPmyDPyFFP-PgZRz-iyNdp8bZ9Hawu1DvABuaPYKwZX8ehfXv7dzhIOWRE8noL5dUYIW89wQ.

Verweij, Nicki J.F. ym. 2020. First in man study of [¹⁸F]fluoro-PEG-folate PET: a novel macrophage imaging technique to visualize rheumatoid arthritis. Viitattu 27.4.2022. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57841-x.pdf>.

Wadsak, W. & Mitterhauser, M. 2010. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. Viitattu 25.4.2022. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X09006913?casa_token=r2vFNXt1onIAAAAA:KklvtBcM-rv1rswjuQTgMTH_4ki_uP5E97cR6M2A7INCz_ZjO_ijZE9BkSEOn6ljUpXHV2WjLw.

WHO 2015. GMP Questions and Answers. Viitattu 18.4.2022. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/medicines-good-manufacturing-processes>.

Validointisuunnitelma

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS

1(8)

VALIDOINTISUUNNITELMA

[¹⁸F]PEG-FOLAATIN TOTEAMISESSA SEKA PITOISUUDEN JA
RADIOKEMIAALLISEN PUHTAUDEN MÄÄRITTÄMISESSÄ KÄYTETTÄVÄN
RADIOHPLC-MENETELMÄN VALIDOINTI

Laatija	_____	_____
	Joel Hietaranta	pvm
Tarkastaja	_____	_____
	Sarita Forsback	pvm
Hyväksyjä	_____	_____
	Riikka Kivelä	pvm

1. TYÖN TARKOITUS

Työn tarkoituksena on osoittaa dokumentoidusti, että [¹⁸F]PEG-folaatin laatukontrollissa lopputuotteen toteamiseen sekä pitoisuuden että radiokemiallisen puhtauden määrittämiseen käytettävä radioHPLC-analyysimenetelmä tuottaa jatkuvasti suurella varmuudella oikeita ja tarkkoja tuloksia. Analyysimenetelmän validointi suoritetaan Valtakunnallisen PET-keskuksen Validation Master Plan:ia (VMP, version 11) sekä Analyysimenetelmien validointi -ohjetta (SOP7406, version 4) noudattaen. Validointisuunnitelman laatii menetelmän asiantuntija / kehittäjä, tarkastaa laboratoriopäällikkö ja hyväksyy QA. Validoinnin suorittaa henkilö, jonka toimenkuvaan [¹⁸F]PEG-folaatin laatukontrollianalyysit kuuluvat. Raportin laativat validoinnin suorittaja ja suunnitelman laatija yhdessä, sen tarkastaa laboratoriopäällikkö ja hyväksyy QA.

2. VALIDOITAVAT PARAMETRIT

[¹⁸F]PEG-folaatin laatukontrollissa radioHPLC-menetelmällä todetaan oikean lopputuotteen läsnäolo ja määritetään lopputuotteen, prekursorin ja epäpuhtauksien pitoisuus sekä lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus. Validoitavat parametrit ovat spesifisyys ja toteamisraja. Tuotteen toteaminen tapahtuu samalla menetelmällä referenssin ja tuotteen retentioaikoja vertaamalla, joten sille voidaan käyttää edellä määriteltyjä parametreja.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT**3.1. Laitteisto**

HPLC laitteisto: HPLC system 12 (tai vastaava IQ/OQ HPLC -laitteisto)
Kolonne: Phenomenex Jupiter® 4 µm Proteo Å, LC Column 250 x 4.6, product code: 00G-4396-E0

Ultraviolettidetektor (UV-detektor): HPLC-laitteistokohtainen
Radioaktiivisuusdetektor (RA-detektor): HPLC-laitteistokohtainen

3.2. Käytettävät kemikaalit

H ₂ O	ionivaihdettu ultrapuhdas vesi
Asetonitrili	HPLC laatu
NaCl (fys. 0.9 % w/v)	Ph. Eur. i.v.
Trifluorietikkahappo (TFA)	Spektroskopia laatu
Dimetyylisulfoksidi (DMSO)	GMP laatu
Prekursori (folaatti prekursori)	GMP laatu
Referenssistandardi (folaatti)	HPLC laatu
[¹⁸ F]PEG-folaatti	Analyyisinäyte

Hyväksyjä _____

3.3. Liuokset**Ajoliuos A / 0.1 % TFA, H₂O:**

Kaada hieman ultrapuhdasta vettä 1 l:n mittapullon pohjalle ja mittaa sekaan 1 ml trifluorietikkahappoa (TFA). Täytä merkkiin asti ultrapuhdalla vedellä, sekoita ja siirrä säilöpulloon. Käytä ajoliuos 15 minuutin ajan ultraäänihauteessa.

Ajoliuos B / 0.1 % TFA, ACN:

Kaada hieman asetonitriiliä (HPLC grade) 1 l:n mittapullon pohjalle ja mittaa sekaan 1 ml trifluorietikkahappoa (TFA). Täytä merkkiin asti asetonitriilillä, sekoita ja siirrä säilöpulloon. Käytä ajoliuos 15 minuutin ajan ultraäänihauteessa.

Pesuliuos 70/30 Asetonitriili - H₂O

Mittaa mittalaseilla 700 ml asetonitriiliä ja 300 ml ultrapuhdasta vettä. Lisää ne mittapulloon, sekoita ja kaada säilöpulloon. Käytä 15 minuutin ajan ultraäänihauteessa.

Referenssin kantaliuos

Liuota 1 mg PEG-folaatin referenssiä 1 ml:aan DMSO:ta, jolloin c(PEG-folaatin referenssi) = 1 mg/ml.

Referenssin välilaimennos

Pipetoi 100 µl PEG-folaatin referenssiluosta (1 mg/ml DMSO:ssa) 900 µl:aan NaCl:aan, jolloin c(PEG-folaatin ref.laim) = 100 µg/ml

Prekursorin kantaliuos:

Liuota 2 mg PEG-folaatin prekursoria 1 ml:aan DMSO:ta, jolloin c(PEG-folaatin prekursori) = 2 mg/ml.

Prekursorin välilaimennos:

Pipetoi 50 µl:aa PEG-folaatin:n prekursorin kantaliuosta 950 µl:aan natriumkloridiin (NaCl), jolloin c(PEG-folaatin prekursorin välilaimennos) = 100 µg/ml.

Laimennokset L1, L2 ja L3:

Tee tuotteen ja prekursorin validointireferenssit seoksen kantaliuoksesta käyttäen kantaliuosta ja vettä taulukon 1 mukaisesti.]

Referenssin välilaimennos/prekursorin välilaimennos 50/50

Pipetoidaan 500 µl referenssin välilaimennosta 500 µl:aan prekursorin välilaimennosta.

Taulukko 1. Validointireferenssien valmistus

Liuos	Referenssin välilaimennos(PEG-folaatti) [µl]	Puskuri [µl]	Valmiin liuoksen tilavuus [µl]	Laimennoksen vahvuus [µg/ml]
L1	100	900	1000	10
L2	50	950	1000	5
L3	10	990	1000	1

Hyväksyjä _____

3.4. Menetelmä

Validoinnissa käytetään [¹⁸F]PEG-folaatin radioHPLC-analyysimenetelmää pitoisuusmäärityksille, radioaktiivisen puhtauden määrittämiseen ja oikean lopputuotteen toteamiseen. RA-detektorin parametrit ovat säädetty etukäteen ja ne löytyvät RA-detektorin laitekansiosista.

Virtausnopeus: 1.0 ml/min

Aallonpituus: 254 nm

Ajoliuokset: A: 0.1 % TFA / H₂O ja B: 0.1 % TFA / ACN

Metodi: C:\Lab Solutions\Data\Folate\Method

Gradientti:	0 min	77 % A	23 % B
	11.00 min	55 % A	45 % B
	11.40 min	77 % A	23 % B
	13.00 min	77 % A	23 % B

4. TYÖN SUORITUS

Työn yksityiskohtainen suoritus, kuten synteessin eräkoodi, referenssiluosten valmistus, työssä käytetyt laitteet ja materiaalit sekä analyysiolosuhteet kirjataan "Analyysimenetelmien validointi 1" -laboratoriopäiväkirjaan. Kromatogrammit tallennetaan "C:\LabSolutions\Data\Folate\Results -kansioon yksiselitteisesti nimettyihin kansioihin (esim. 22FFO009TC). Kromatogrammit tulostetaan ja niihin merkitään näytteen kemiallinen koostumus, pitoisuus, analyysin suorittajan nimikirjaimet ja niissä olevat signaalit nimetään yksiselitteisesti (päivämäärä, kellonaika, systeemin nimi ja analyysin tiedostonimi tulostuvat automaattisesti). RadioHPLC-menetelmän validoinnissa voidaan käyttää myös testivaiheessa tuotettuja kromatogrammeja.

Validointiraporttiin kirjataan työn suoritus sekä saadut tulokset ja niiden tarkastelu. Kromatogrammit liitetään validointiraporttiin.

4.1. Toteaminen (UV- ja RA-detektori)

Oikean lopputuotteen läsnäolo todetaan vertaamalla PEG-folaatin referenssin UV piikin retentioaikaa [¹⁸F]PEG-folaatin analyysinäytteen radioaktiivisen pääpiikin retentioaikaan.

Vaatus: $t_2(\text{RA}) = t_1(\text{UV}) \pm 0.3 \text{ min}$

4.2. Spesifisyys (UV-detektori)

UV-detektorilla spesifisyys määritetään tuotteelle (PEG-folaatti) ja prekursorille (PEG-folaatti prekursori) lähimpien signaalien suhteen kohdassa 3.4 kuvatulla HPLC-menetelmällä reaktioseoksesta otetusta näytteestä.

LabSolutions ohjelma laskee resoluutiotekijät kaavasta 1. Resoluutiotekijät esitetään validointiraportissa.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

Hyväksyjä _____

t_R = retentioaika tai matka signaalin huipun kohdalta pohjaviivaa pitkin injektiokohtaan ($t_{R2} > t_{R1}$).
 w = piikin pohjaleveys (USP width).

Vaatus: $R_s > 1,5$

4.3. Toteamisraja (UV-detektori)

Menetelmän toteamisraja (LOD) määritetään ajamalla taulukon 1 referenssit L1, L2 ja L3. Tulokset esitetään validointiraportissa.

Vaatus: Signal-to-noise (S/N) > 3

4.4. Spesifisyys (RA-detektori)

RA-detektorilla määritetään spesifisyys tuotteelle [¹⁸F]PEG-folaatin kohdassa 3.4 kuvatulla radioHPLC-menetelmällä reaktioseoksesta otetusta näytteestä. LabSolutions- ohjelma laskee kaavan (1) mukaisesti resoluutiokijät (R_s) tuotteelle lähimpien epäpuhtauksien suhteen. Resoluutiokijät esitetään validointiraportissa.

Vaatus: $R_s > 1,5$

4.5. Toteamisraja (RA-detektori)

Radioaktiivisuusdetektorin toteamisraja on määritetty detektorin lineaarisen vasteen mittauksen yhteydessä. Validoinnissa käytettävien näytteiden radioaktiivisuuksien pitää olla toteamisrajaa korkeammat ja laitteiston lineaarisen vasteen alueella. Radioaktiivisuusdetektorin toteamisraja ja lineaarinen vaste löytyvät kyseisen HPLC-laitteiston laitekansiosta.

5. POIKKEAMAT

Jos validoitaville parametreille asetetut vaatimukset eivät täyty, poikkeaman vaikutus analyysimenetelmän toimivuuteen ja oikeellisuuteen määritetään validointiraportissa.

6. RAPORTOINTI

Tämän validointisuunnitelman mukaan toteutettu työ ja sen tulokset tarkasteluineen kirjataan validointiraporttiin.

7. VERSIOHISTORIA

Versio 1, uusi dokumentti.

Hyväksyjä _____

Validointiraportti

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS

1(8)

VALIDOINTIRAPORTTI

[¹⁸F]PEG-FOLAATIN TOTEAMISESSA SEKÄ PITOISUUDEN JA
RADIOKEMIALLISEN PUHTAUDEN MÄÄRITTÄMISESSÄ KÄYTETTÄVÄN
RADIOHPLC-MENETELMÄN VALIDOINTI

Hyväksyjä _____

SISÄLLYSLUETTELO

1.	RAPORTIN TARKOITUS	2
2.	TYÖN SUORITUS	2
3.	KÄYTETYT LAITTEET, MATERIAALIT, KEMIKAALIT JA METODIT	2
4.	TULOSTEN KÄSITTELY	4
5.	HYVÄKSYMISKRITEERIT	4
6.	VALIDOINNIN TULOKSET	5
7.	VALIDOINTIIN LIITTYVÄT DOKUMENTIT, LYHENTEET JA LIITTEET	7
8.	TULOSTEN TARKASTELU, JOHTOPÄÄTÖKSET JA SUOSITUKSET	8
9.	RAPORTIN HYVÄKSYNTÄ	8
10.	VERSIOHISTORIA	8

1. RAPORTIN TARKOITUS

Raportin tarkoitus on esittää ja koota yhteen valtakunnallisessa PET keskuksessa radiokemian laboratoriossa PET-TYKS-laitosrakennuksessa (RK2) [¹⁸F]PEG-folaatin laatukontrollissa käytettävän radioHPLC-menetelmän validoinnista saadut tulokset ja johtopäätökset. Validoinnin tarkoituksena oli osoittaa dokumentoidusti, että [¹⁸F]PEG-folaatin laatuanalyysi on vakaa ja tuottaa luotettavasti tuloksia, jotka soveltuvat [¹⁸F]PEG-folaatin identifiointiin ja lopputuotteen ja prekursorin pitoisuuden ja radiokemiallisen puhtauden määrittämiseen. Työ tehtiin validointisuunnitelman mukaisesti.

2. TYÖN SUORITUS

[¹⁸F]PEG-folaatin laatukontrollissa radioHPLC-menetelmällä todetaan oikean lopputuotteen läsnäolo ja määritetään lopputuotteen, prekursorin ja epäpuhtauksien pitoisuus sekä lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus. Validoitavat parametrit ovat spesifisyys ja toteamisraja. Tuotteen toteaminen tapahtuu samalla menetelmällä vertaamalla [¹⁸F]PEG-folaatin ja PEG-folaatin retentioaikoja, joten sille voidaan käyttää edellä määriteltyjä parametreja.

- HPLC-menetelmän spesifisyys määritettiin reaktioliuksesta tuotteelle (PEG-folaatti) ja prekursorille (PEG-folaatti prekursori) käyttäen UV-detektoria.
- Menetelmän toteamisraja määritettiin PEG-folaatille referenssilaimennossarjalla.
- Radioaktiivisuusdetektorin lineaarinen vaste ja toteamisraja on määritetty erillisellä mittauksella aiemmin. Tulokset ja raportti löytyvät HPLC 2 laitekansiosta.
- HPLC menetelmän spesifisyys [¹⁸F]PEG-folaatin ja reaktiossa syntyvien epäpuhtauksien suhteen määritettiin radioaktiivisuusdetektorilla reaktioliuksesta.

3. KÄYTETYT LAITTEET, MATERIAALIT, KEMIKAALIT JA METODIT**3.1. Laitteet**

Työssä käytettiin HPLC 12 laitteistoa.

3.2. Materiaalit

HPLC kolonni: Phenomenex Jupiter® 4 µm Proteo 90 Å 250*4.6 mm
Part No. 00G-4396-E0, Eränumero: 5398-0036

Hyväksyjä _____

3.3. Kemikaalit**3.3.1. Lähtöaineet**

Lähtöaine	Laatu	Toimittaja / Tuotenumero	Eränumero	Viimeinen käyttöpäivä
Vesi	ultrapuhdas	Radiokemian lab.	-	-
Asetonitrili	HPLC-laatu	Honeywell / 34851-2.5L	L2420S	20.8.2023
Natriumkloridi (9 mg/ml)	i.v.	B.Braun / -	180868131	07.2024
PEG-folaatti prekursori	GMP-laatu	ABX / 7713.0002	FolPEG-03-20072801-01	31.7.2022
PEG-folaatti	GMP-laatu	ABX / 7713.0002	20180701	31.3.2020
DMSO	Anhydrous, $\geq 99.9\%$	Sigma-Aldrich / 276855-250ML	STBK2952	15.2.2024
PEG-folaatti referenssi	GMP-laatu	ABX/7715.0100	20200701	31.7.2021

3.3.2. Liuokset ja näytteet

Liuokset valmistettiin validointisuunnitelman mukaisesti.

	Liuos/näyte	c(PEG-folaatti prekursori) [µg/ml]	c(PEG-folaatti) [µg/ml]	Valmistuspäivä
2	Prekursorin kantaliuos	2000	-	20.4.2022
3	Prekursorin laimennos	100	100	20.4.2022
4	Referenssin laimennos L1	-	10	11.4.2022
5	Referenssin laimennos L2	-	5	11.4.2022
6	Referenssin laimennos L3	-	1	11.4.2022
7	Referenssin kantaliuos	-	1000	24.2.2022
8	Referenssin laimennos	-	100	8.4.2022
9	[¹⁸ F]PEG-folaatti (20FFO010TC)	-	-	8.4.2022
10	Referenssin ja prekursorin seos	100	100	20.4.2022

3.4. Metodi

HPLC-menetelmän validoinnissa käytettiin validointisuunnitelmassa kuvattua metodia. Havainnointi tapahtui sarjaan kytkettyjen UV- ja radioaktiivisuusdetektorin avulla.

Hyväksyjä _____

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS
VR_I1C1P1_MET5545_v1

4(9)

Ajoliuokset: A) 0,1 % TFA, H₂O ja B) 0,1 % TFA, H₂O
Virtausnopeus: 1.0 mL/min
Aallonpituus: 254 nm
Gradientti:

0 min	77 % A	23 % B
11 min	55 % A	45 % B
11.40 min	77 % A	23 % B
13.00 min	77 % A	23 % B

4. TULOSTEN KÄSITTELY

4.1. Yleistä

Tähän validointiin liittyvät yksityiskohtaiset työvaiheet kuten liuosten valmistus, laimennokset ja käytetyt laitteet on kirjattu laboriopiiväkirjaan (Joel Hietaranta).

4.2. Elektronisen tiedon ja raakadatan käsittely

Kunin HPLC-ajon elektroninen data tallennettiin käytettävän HPLC-systeemin tietokoneen muistiin yksilöidyllä tiedostonimellä. Tiedostonimi, analysointipäivämäärä ja kellonaika tulostuivat automaattisesti.

4.3. Tulosten käsittely

Tässä validoinnissa saadut ensisijaiset tulokset on kerätty tämän raportin validoinnin tulokset osioon (kappale 6). Tulosten tarkastelu ja pohdinta on kirjattu kappaleeseen 8.

5. HYVÄKSYMISKRITEERIT

Menetelmälle on asetettu seuraavat hyväksymiskriteerit validointisuunnitelmassa:

- Identifikaatio (UV- ja RA-detektor): $t_2(RA) = t_1(UV) \pm 0.3 \text{ min}$
- Spesifisyys (UV- ja RA-detektor): Resoluutiokijä (R_s) > 1.5
- Toteamisraja (UV-detektor): Signal-to-noise > 3

6. VALIDOINNIN TULOKSET

6.1. Tuotteen identifiointi (t_R) radioaktiivisuus- ja UV-detektoreilla

Tuote identifioitiin vertaamalla RA-detektorin kromatogrammin pääpiikin retentioaikaa referenssi-liuoksen (referenssin laimennos, liuos 12, kappale 3.3.2.) retentioaikaan UV-kromatogrammissa. Identifioinnissa käytettiin kromatogrammeja synteesisistä "22FF0010TC".

Hyväksyjä _____

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS
VR_I1C1P1_MET5545_v1

5(9)

	PEG-folaatti referenssiuusi	[¹⁸ F]PEG-folaatti
t_R [min]	6.23	6.18
Hyväksymisraja:	N/A	$t_2([\text{18F}] \text{PEG-folaatti}) = t_1(\text{PEG-folaatti}) \pm 0.3 \text{ min}$
Tulos	N/A	Hyväksytty
Liite / sivut	1 / 1 - 4	
Huomioita: -		

6.2. Spesifisyys (UV-detektori)

Spesifisyys määritettiin prekursorille ja tuotteelle synteessin "22FFO010TC" reaktioliuoksen UV-kromatogrammista ja lisäksi validointisuunnitelmaan myös tuotteelle synteessin "22FFO010TC" puhdistetun lopputuotteen UV-kromatogrammista laskemalla resoluutiotekijä (R_s) kaavalla:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

t_R = retentioaika tai matka signaalin huipun kohdalta pohjaviivaa pitkin injektiokohtaan ($t_{R2} > t_{R1}$).
 w = piikin pohjaleveys (USP width).

LabSoluutions-ohjelma laskee R_s arvot yllä olevan kaavan mukaan.

Spesifisyys prekursorille reaktioliuoksesta (22FFO010TC):

	Edeltävä piikki	PEG-folaatti prekursori	Seuraava piikki
t_R [min]	2.65	3.64	11.77
R_s	0.5	-	4.1
Hyväksymisraja	N/A	>1.5	>1.5
Tulos	N/A	Hyväksytty	Hyväksytty
Liite / sivut	2 / 1		
Huomioita: -			

Spesifisyys tuotteelle reaktioliuoksesta (22FFO010TC):

Hyväksyjä _____

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS
VR_I1C1P1_MET5545_v1

6(9)

	Edeltävä piikki	PEG-folaatti	Seuraava piikki
t_{R} [min]	5.72	6.13	7.75
R_s	-	2.26	5.78
Hyväksymisraja	N/A	>1.5	>1.5
Tulos	N/A	Hyväksytty	Hyväksytty*
Liite / sivut	2 / 1		
Huomioita:			

6.3. Toteamisraja (UV-detektori)

Menetelmän LOD määritettiin PEG-folaatin referenssille käyttäen laimennosliuoksia L1 – L3.

Toteamisraja referenssille:

	L1	L2	L3
Konsentraatio	10 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml
S/N	1.17	1.81	9.47
Hyväksymisraja	> 3	> 3	> 3
Tulos	Hyväksytty	Hyväksytty	Hyväksytty
Liite / sivut	3 / 1, 4, 7		
Huomioita: Toteamisraja määritettiin 1 µg/ml - laimennokselle. Tulokseksi tuli 0,07µg/ml			

6.4. Spesifisyys (RA-detektori)

Spesifisyys määritettiin tuotteelle synteisin "22FFO1010TC" reaktioliuoksen RA-kromatogramista laskemalla resoluutiotehtävä (Rs) kaavalla:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

t_R = retentioaika tai matka signaalin huipun kohdalta pohjaviivaa pitkin injektiokohtaan ($t_{R2} > t_{R1}$).
 w = piikin pohjaleveys (USP width).

LabSolutions-ohjelma laskee R_s arvot yllä olevan kaavan mukaan

Spesifisyys tuotteelle:

	Edeltävä piikki	[¹⁸ F]PEG-folaatti	Seuraava piikki
t_{R} [min]	3.02	6.18	6.59
R_s	6.3	10.12	2.05
Hyväksymisraja	N/A	>1.5	>1.5
Tulos	N/A	Hyväksytty	Hyväksytty
Liite / sivu	2 / 2		
Huomioita: -			

Hyväksyjä _____

6.5. Toteamisraja (RA-detektori)

Tutkittujen näytteiden radioaktiivisuudet olivat radioaktiivisuusdetektorin toteamisrajaa korkeampia ja laitteiston lineaarisen vasteen alueella.

7. VALIDOINTIIN LIITTYVÄT DOKUMENTIT, LYHENTEET JA LIITTEET**7.1. Dokumentit**

- VMP, Validation Master Plan, version 11
- SOP7466, Analyysimenetelmien validointi, versio 4
- Validointisuunnitelma, [¹⁸F]PEG-folaatin toteamisessa sekä pitoisuuden ja radiokemiallisen puhtauden määrittämisessä käytettävän radioHPLC-menetelmän validointi
- HPLC kromatogrammit erästä 22FFO010TC ja erillisistä validointireferenssijaista

7.2. Lyhenteet

LabSolutions = Nestekromatografialaitteiston kontrolli- ja laskuohjelma
 HPLC = Korkean erotuskyvyn nestekromatografia
 LOD = Limit of Detection, toteamisraja
 RA-detektori = Radioaktiivisuusdetektori
 R_s = Resoluutiotekijä
 SOP = standard operation procedure
 UV-detektori = Ultraviolettidetektori
 VMP = Validation master plan

7.3. Liitteet

- Liite 1: Identifikaation HPLC-kromatogrammit, 2 sivua
- Liite 2: Spesifisyyden HPLC-kromatogrammit (22FFO010TC), 1 sivu
- Liite 3: Toteamisrajan HPLC-kromatogrammit (L1-L3 validointireferenssit), 1 sivu

8. TULOSTEN TARKASTELU, JOHTOPÄÄTÖKSET JA SUOSITUKSET

Validoitu [¹⁸ F]PEG-folaatin analyysimenetelmä soveltuu sille suunniteltuun käyttötarkoitukseen.		
Raportin laatija:	Allekirjoitus	Päivämäärä
Joel Hietaranta		
Tarkastaja:	Allekirjoitus	Päivämäärä
Sarita Forsback		

9. RAPORTIN HYVÄKSYNTÄ

Tähän validointiraporttiin kootut tulokset osoittavat menetelmän olevan sopiva sille aiottuun käyttötarkoitukseen kohdan 8 päätelmät huomioiden.

Hyväksyjä _____

VALTAKUNNALLINEN PET-KESKUS
VR_I1C1P1_MET5545_v1

8(9)

Hyväksyjä:	Allekirjoitus:	Päivämäärä:
Riikka Kivelä GMP QA, TYKS, sairaala-apteekki		

10. VERSIOHISTORIA

Versio 1, uusi dokumentti

Hyväksyjä _____

[¹⁸F]PEG-folaatin analyysitulokset

4/27/2022 3:34:24 PM Page 1 / 2

HPLC Analysis Report

Acquired by: _____ Date: _____

Sample Name : sample
 Sample ID : 22FFO010TC
 Data Filename : sample_22FFO010TC_001.lcd
 Method Filename : PEG-folate.lcm
 Batch Filename : folate.lcb
 Vial # : 1-2
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 08/04/2022 12:55:09
 Date Processed : 27/04/2022 15:04:22

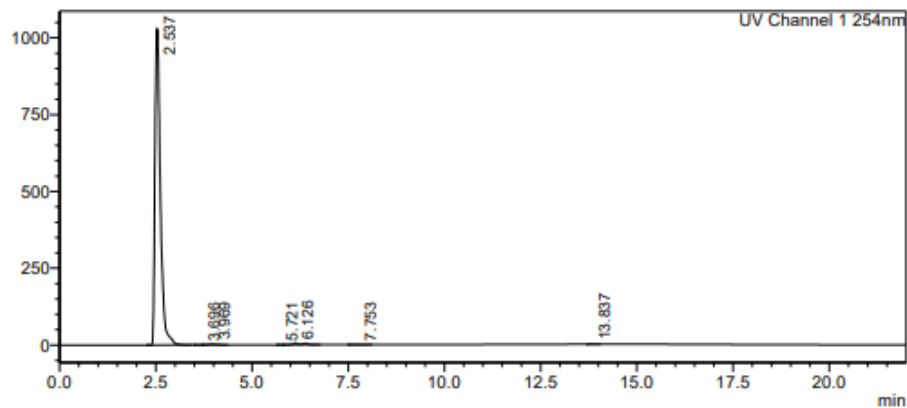
Sample Type : Unknown
 Level : 1
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Instrument Name : HPLC system 12 System Configuration

<<Column>>
 Column Name : Jupiter 4u Proteo 90A
 Column ID : 00G-4396-E0

UV chromatogram

mV



UV Peak Table

UV Channel 1 254nm

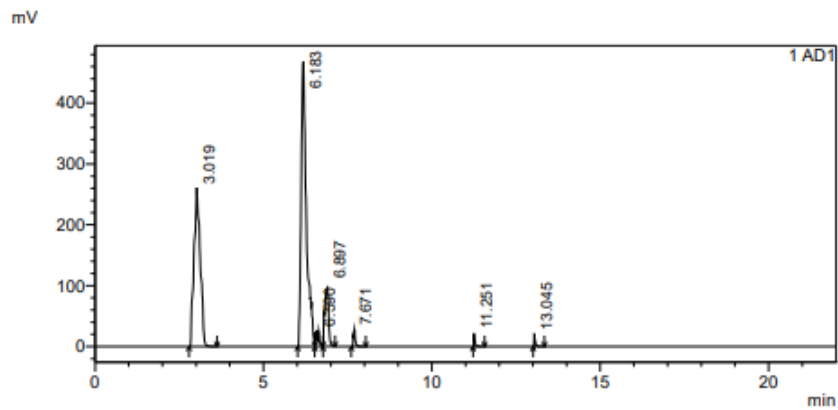
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height
1		2.537	10171865	1029333
2	PEG-Folate precursor	3.696	3196	312
3		3.969	36993	2114
4		5.721	2041	413
5	PEG-Folate	6.126	92361	4941
6		7.753	7726	573
7		13.837	3352	402
Total			10317534	1038089

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\22FFO010TC\Synthesis data\sample_22FFO010TC_001.lcd

UV Channel 1 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Resolution(USP)	USP Width	S/N	Detection Limit
1		2.537	--	0.251	15702.22	--
2	PEG-Folate precursor	3.696	--	--	4.76	0.00
3		3.969	--	0.405	32.24	--
4		5.721	6.399	0.143	6.30	--
5	PEG-Folate	6.126	2.266	0.214	75.38	0.00
6		7.753	5.775	0.349	8.75	--
7		13.837	20.921	0.232	6.13	--
Total						

RA chromatogram



RA Peak Table

AD1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height
1		3.019	3351426	260728
2	[18F]Folate	6.183	5019834	468097
3		6.590	151601	26299
4		6.897	781226	96340
5		7.671	96847	19512
6		11.251	48410	21807
7		13.045	48419	20110
Total			9497762	912892

AD1

Peak#	Name	Ret. Time	Resolution(USP)	USP Width	S/N	Detection Limit
1		3.019	--	0.364	66424.74	--
2	[18F]Folate	6.183	10.120	0.261	119255.53	0.00
3		6.590	2.048	0.137	6700.20	--
4		6.897	1.613	0.243	24544.25	--
5		7.671	4.387	0.110	4970.89	--
6		11.251	42.893	0.057	5555.59	--
7		13.045	28.929	0.067	5123.47	--
Total						

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\22FFO010TC\Synthesis data\sample_22FFO010TC_001.lcd

Referenssin välilaimennoksen analyysitulokset

4/27/2022 3:37:58 PM Page 1 / 2

HPLC Analysis Report

Acquired by: _____ Date: _____

Sample Name : ref
 Sample ID : 22FFO010TC
 Data Filename : ref_22FFO010TC_001.lcd
 Method Filename : PEG-folate.lcm
 Batch Filename : folate.lcb
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 08/04/2022 10:58:43
 Date Processed : 08/04/2022 14:47:33
 Sample Type : Standard
 Level : 1
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

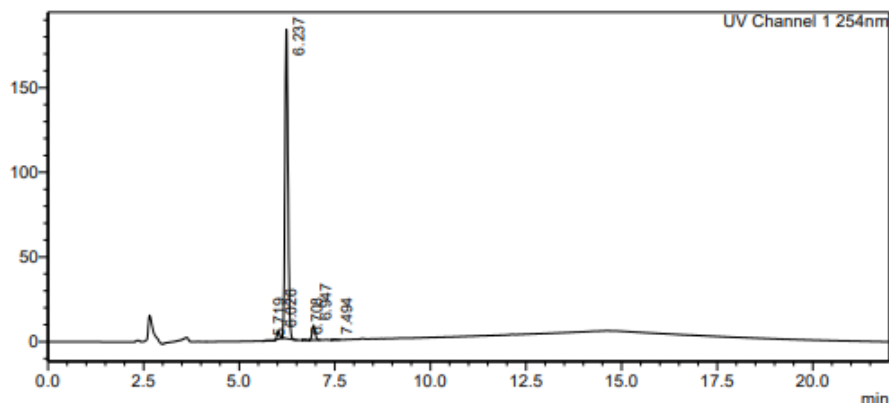
System Configuration

Instrument Name : HPLC system 12

<<Column>>
 Column Name : Jupiter 4u Proteo 90A
 Column ID : 00G-4396-E0

UV chromatogram

mV



UV Peak Table

UV Channel 1 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height
1		5.719	2316	321
2		6.026	21301	4469
3	PEG-Folate	6.237	1003026	182360
4		6.708	1886	390
5		6.947	48299	8657
6		7.494	1801	310
Total			1078629	196506

UV Channel 1 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Resolution(USP)	USP Width	S/N	Detection Limit
1		5.719	--	0.193	0.57	--
2		6.026	1.826	0.143	8.02	--
3	PEG-Folate	6.237	1.407	0.158	327.09	0.00

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\22FFO010TC\Reference data\ref_22FFO010TC_001.lcd

Peak#	Name	Ret. Time	Resolution(USP)	USP Width	S/N	Detection Limit
4		6.708	3.109	0.145	0.70	--
5		6.947	1.558	0.162	15.53	--
6		7.494	3.334	0.167	0.56	--
Total						

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\22FFO010TC\Reference data\ref_22FFO010TC_001.lcd

Standardilaimennoksen (1 µg/ml) analyysitulokset

4/27/2022 3:49:18 PM Page 1 / 3

HPLC Analysis Report

Acquired by: _____ Date: _____

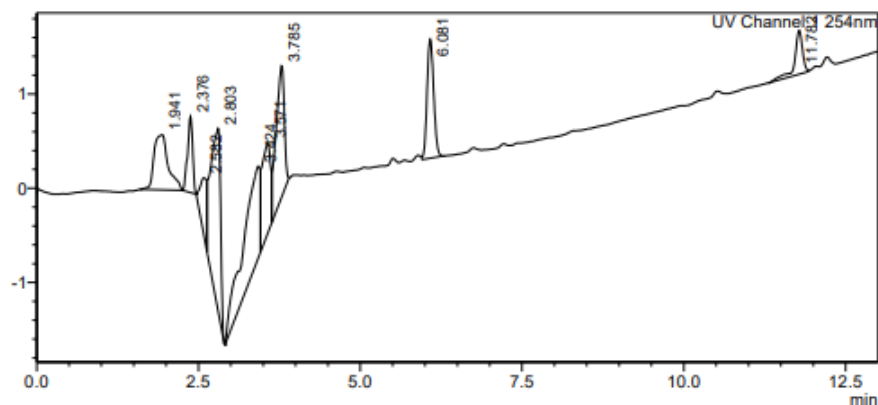
Sample Name : ref 1 ug/ml
 Sample ID : Ref laim
 Data Filename : ref 1 ug\$ml_Ref laim_001.lcd
 Method Filename : PEG-folate.Tcm
 Batch Filename : folate.lcb
 Vial # : 1-4
 Injection Volume : 20 uL
 Date Acquired : 11/04/2022 14:10:47
 Date Processed : 27/04/2022 15:47:40
 Sample Type : Standard
 Level : 1
 Acquired by : System Administrator
 Processed by : System Administrator

Instrument Name : HPLC system 12 System Configuration

<<Column>>
 Column Name : Jupiter 4u Proteo 90A
 Column ID : 00G-4396-E0

UV chromatogram

mV



UV Peak Table

UV Channel 1 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Resolution(USP)
1		1.941	8959	584	0.000		--
2		2.376	4372	804	0.000		1.783
3		2.582	4187	599	0.000		--
4		2.803	18659	1935	0.000		--
5		3.424	19581	973	0.000		1.229
6	PEG-Folate preci	3.571	9017	961	-2.596	µg/mL	0.187
7		3.785	12727	1393	0.000		0.365
8	PEG-Folate	6.081	8993	1261	1.034	µg/mL	9.469
9		11.782	3924	463	0.000		28.584
Total			90419	8973			

UV Channel 2 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Resolution(USP)
1		1.939	8946	586	0.000		--

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\Folate laimennokset\11.4.22 laimennosten tulokset\ref 1 ug\$ml_Ref laim_001.lcd

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Resolution(USP)
2		2.375	4373	806	0.000		1.787
3		2.582	4170	591	0.000		-
4		2.802	18292	1914	0.000		-
5		3.423	19654	972	0.000		1.233
6		3.570	9015	963	0.000		0.186
7		3.784	12719	1396	0.000		0.365
8		6.080	9039	1260	0.000		9.454
9		11.782	4001	463	0.000		28.492
Total			90208	8951			

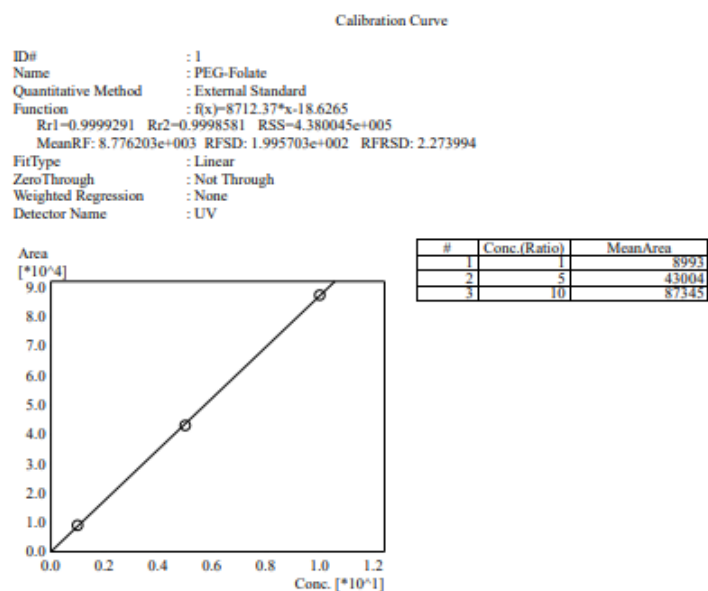
AD1

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Resolution(USP)
Total							

C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\Folate laimennokset\11.4.22 laimennosten tulokset\ref 1 ug\$ml_Ref laim_001.lcd

Referenssin laimennosten standardisuora

4/27/2022 3:49:18 PM Page 3 / 3



C:\LabSolutions\Data\Folate\Results\Folate laimennokset\11.4.22 laimennosten tulokset\ref 1 ug/ml_Ref laim_001.lcd

