

2022-2023

Thèse
pour le
Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**Le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 un traceur TEP
prometteur pour l'imagerie des maladies
inflammatoires et fibrosantes : Production au
sein de la radiopharmacie de Brest**

--

**The [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46, a promising PET tracer
for imaging inflammatory and fibrotic
diseases: Production at the Brest
radiopharmacy**

Grassal Adèle

Née le 29 Mars 1995 à BREST (29)

Sous la direction de Mme Blanc-Béguin Frédérique

Membres du jury

| | |
|--|--------------|
| Monsieur le Professeur Frédéric Lagarce | Président |
| Madame le Docteur Frédérique Blanc-Béguin | Directeur |
| Monsieur le Professeur Franck Lacoeuille | Co-Directeur |
| Monsieur le Professeur Pierre-Yves Le Roux | Membre |
| Madame le Docteur Aurore Rauscher | Membre |



Soutenue publiquement le :
Jeudi 12 octobre 2023



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Sébastien Faure

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

| | | |
|-----------------------------|--|-----------|
| ABRAHAM Pierre | PHYSIOLOGIE | Médecine |
| ANGOULVANT Cécile | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| ANNWEILER Cédric | GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT | Médecine |
| ASFAR Pierre | REANIMATION | Médecine |
| AUBE Christophe | RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE | Médecine |
| AUGUSTO Jean-François | NEPHROLOGIE | Médecine |
| BAUFRETTON Christophe | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE | Médecine |
| BELLANGER William | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| BENOIT Jean-Pierre | PHARMACOTECHNIE | Pharmacie |
| BIERE Loïc | CARDIOLOGIE | Médecine |
| BIGOT Pierre | UROLOGIE | Médecine |
| BONNEAU Dominique | GENETIQUE | Médecine |
| BOUCHARA Jean-Philippe | PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE | Médecine |
| BOUET Pierre-Emmanuel | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE | Médecine |
| BOUVARD Béatrice | RHUMATOLOGIE | Médecine |
| BOURSIER Jérôme | GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE | Médecine |
| BRIET Marie | PHARMACOLOGIE | Médecine |
| CALES Paul | GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE | Médecine |
| CAMPONE Mario | CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE | Médecine |
| CAROLI-BOSC François-Xavier | GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE | Médecine |
| CASSEREAU Julien | NEUROLOGIE | Médecine |
| CONNAN Laurent | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| COPIN Marie-Christine | ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES | Médecine |
| COUTANT Régis | PEDIATRIE | Médecine |
| CUSTAUD Marc-Antoine | PHYSIOLOGIE | Médecine |
| CRAUSTE-MANCIET Sylvie | PHARMACOTECHNIE HOSPITALIERE | Pharmacie |
| DE CASABIANCA Catherine | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| DESCAMPS Philippe | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE | Médecine |
| D'ESCATHA Alexis | MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL | Médecine |
| DINOMAIS Mickaël | MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION | Médecine |
| DUBEE Vincent | MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES | Médecine |
| DUCANCELLLE Alexandra | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE | Médecine |
| DUVAL Olivier | CHIMIE THERAPEUTIQUE | Pharmacie |
| DUVERGER Philippe | PEDOPSYCHIATRIE | Médecine |
| EVEILLARD Mathieu | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE | Pharmacie |
| FAURE Sébastien | PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE | Pharmacie |
| FOURNIER Henri-Dominique | ANATOMIE | Médecine |
| FOUQUET Olivier | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE | Médecine |
| FURBER Alain | CARDIOLOGIE | Médecine |
| GAGNADOUX Frédéric | PNEUMOLOGIE | Médecine |
| GOHIER Bénédicte | PSYCHIATRIE D'ADULTES | Médecine |
| GUARDIOLA Philippe | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |
| GUILET David | CHIMIE ANALYTIQUE | Pharmacie |
| HAMY Antoine | CHIRURGIE GENERALE | Médecine |
| HENNI Samir | MEDECINE VASCULAIRE | Médecine |
| HUNAUT-BERGER Mathilde | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |

Mise à jour 25/10/22

| | | |
|------------------------------|---|-----------|
| IFRAH Norbert | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |
| JEANNIN Pascale | IMMUNOLOGIE | Médecine |
| KEMPF Marie | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE | Médecine |
| KUN-DARBOIS Daniel | CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE | Médecine |
| LACOEUILLE FRANCK | RADIOPHARMACIE | Pharmacie |
| LACCOURREYE Laurent | OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE | Médecine |
| LAGARCE Frédéric | BIOPHARMACIE | Pharmacie |
| LARCHER Gérald | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRES | Pharmacie |
| LASOCKI Sigismond | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION | Médecine |
| LEBDAI Souhil | UROLOGIE | Médecine |
| LEGENDRE Guillaume | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE | Médecine |
| LEGRAND Erick | RHUMATOLOGIE | Médecine |
| LERMITE Emilie | CHIRURGIE GENERALE | Médecine |
| LEROLLE Nicolas | REANIMATION | Médecine |
| LUNEL-FABIANI Françoise | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE | Médecine |
| MARCHAIS Véronique | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE | Pharmacie |
| MARTIN Ludovic | DERMATO-VENEREOLOGIE | Médecine |
| MAY-PANLOUP Pascale | BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION | Médecine |
| MENEI Philippe | NEUROCHIRURGIE | Médecine |
| MERCAT Alain | REANIMATION | Médecine |
| PAPON Nicolas | PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE | Pharmacie |
| PASSIRANI Catherine | CHIMIE GENERALE | Pharmacie |
| PELLIER Isabelle | PEDIATRIE | Médecine |
| PETIT Audrey | MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL | Médecine |
| PICQUET Jean | CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE | Médecine |
| PODEVIN Guillaume | CHIRURGIE INFANTILE | Médecine |
| PROCACCIO Vincent | GENETIQUE | Médecine |
| PRUNIER Delphine | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE | Médecine |
| PRUNIER Fabrice | CARDIOLOGIE | Médecine |
| RAMOND-ROQUIN Aline | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| REYNIER Pascal | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE | Médecine |
| RICHARD Isabelle | MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION | Médecine |
| RICHOMME Pascal | PHARMACOGNOSIE | Pharmacie |
| RODIEN Patrice | ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES | Médecine |
| ROQUELAURE Yves | MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL | Médecine |
| ROUGE-MAILLART Clotilde | MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE | Médecine |
| ROUSSEAU Audrey | ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES | Médecine |
| ROUSSEAU Pascal | CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE | Médecine |
| ROUSSELET Marie-Christine | ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES | Médecine |
| ROY Pierre-Marie | MEDECINE D'URGENCE | Médecine |
| SAULNIER Patrick | BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES | Pharmacie |
| SERAPHIN Denis | CHIMIE ORGANIQUE | Pharmacie |
| SCHMIDT Aline | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |
| TESSIER-CAZENEUVE Christine | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| TRZEPIZUR Wojciech | PNEUMOLOGIE | Médecine |
| UGO Valérie | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |
| URBAN Thierry | PNEUMOLOGIE | Médecine |
| VAN BOGAERT Patrick | PEDIATRIE | Médecine |
| VENARA Aurélien | CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE | Médecine |
| VENIER-JULIENNE Marie-Claire | PHARMACOTECHNIE | Pharmacie |
| VERNY Christophe | NEUROLOGIE | Médecine |
| WILLOTEAUX Serge | RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE | Médecine |

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|------------------------------|--|-----------|
| BAGLIN Isabelle | CHIMIE THERAPEUTIQUE | Pharmacie |
| BASTIAT Guillaume | BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES | Pharmacie |
| BEAUVILLAIN Céline | IMMUNOLOGIE | Médecine |
| BEGUE Cyril | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| BELIZNA Cristina | MEDECINE INTERNE | Médecine |
| BELONCLE François | REANIMATION | Médecine |
| BENOIT Jacqueline | PHARMACOLOGIE | Pharmacie |
| BESSAGUET Flavien | PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE | Pharmacie |
| BLANCHET Odile | HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION | Médecine |
| BOISARD Séverine | CHIMIE ANALYTIQUE | Pharmacie |
| BRIET Claire | ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES | Médecine |
| BRIS Céline | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE | Pharmacie |
| CAPITAIN Olivier | CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE | Médecine |
| CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE | Médecine |
| CHEVALIER Sylvie | BIOLOGIE CELLULAIRE | Médecine |
| CLERE Nicolas | PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE | Pharmacie |
| COLIN Estelle | GENETIQUE | Médecine |
| DERBRE Séverine | PHARMACOGNOSIE | Pharmacie |
| DESHAYES Caroline | BACTERIOLOGIE VIROLOGIE | Pharmacie |
| DOUILLET Delphine | MEDECINE D'URGENCE | Médecine |
| FERRE Marc | BIOLOGIE MOLECULAIRE | Médecine |
| FORTRAT Jacques-Olivier | PHYSIOLOGIE | Médecine |
| GUELFF Jessica | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| HAMEL Jean-François | BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE | Médicale |
| HELESBEUX Jean-Jacques | CHIMIE ORGANIQUE | Pharmacie |
| HERIVIAUX Anaïs | BIOTECHNOLOGIE | Pharmacie |
| HINDRE François | BIOPHYSIQUE | Médecine |
| JOUSSET-THULLIER Nathalie | MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE | Médecine |
| JUDALET-ILLAND Ghislaine | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| KHIATI Salim | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE | Médecine |
| LANDREAU Anne | BOTANIQUE/ MYCOLOGIE | Pharmacie |
| LEGEAY Samuel | PHARMACOCINETIQUE | Pharmacie |
| LEMEE Jean-Michel | NEUROCHIRURGIE | Médecine |
| LE RAY-RICHOMME Anne-Marie | PHARMACOGNOSIE | Pharmacie |
| LEPELTIER Elise | CHIMIE GENERALE | Pharmacie |
| LETOURNEL Franck | BIOLOGIE CELLULAIRE | Médecine |
| LIBOUBAN Hélène | HISTOLOGIE | Médecine |
| LUQUE PAZ Damien | HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE | Médecine |
| MABILLEAU Guillaume | HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE | Médecine |
| MALLET Sabine | CHIMIE ANALYTIQUE | Pharmacie |
| MAROT Agnès | PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE | Pharmacie |
| MESLIER Nicole | PHYSIOLOGIE | Médecine |
| MIOT Charline | IMMUNOLOGIE | Médecine |
| MOUILLIE Jean-Marc | PHILOSOPHIE | Médecine |
| NAIL BILLAUD Sandrine | IMMUNOLOGIE | Pharmacie |
| PAILHORIES Hélène | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE | Médecine |
| PAPON Xavier | ANATOMIE | Médecine |
| PASCO-PAPON Anne | RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE | Médecine |
| PECH Brigitte | PHARMACOTECHNIQUE | Pharmacie |
| PENCHAUD Anne-Laurence | SOCIOLOGIE | Médecine |
| PIHET Marc | PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE | Médecine |
| POIROUX Laurent | SCIENCES INFIRMIERES | Médecine |
| PY Thibaut | MEDECINE GENERALE | Médecine |
| RINEAU Emmanuel | ANESTHESIOLOGIE REANIMATION | Médecine |

| | | |
|---------------------------|---|-----------|
| RIOU Jérémie | BIOSTATISTIQUES | Pharmacie |
| RIQUIN Elise | PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE | Médecine |
| RONY Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE | Médecine |
| ROGER Emilie | PHARMACOTECHNIE | Pharmacie |
| SAVARY Camille | PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE | Pharmacie |
| SCHMITT Françoise | CHIRURGIE INFANTILE | Médecine |
| SCHINKOWITZ Andréas | PHARMACOGNOSIE | Pharmacie |
| SPIESSER-ROBELET Laurence | PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION | Pharmacie |
| TEXIER-LEGENDRE Gaëlle | THERAPEUTIQUE | Médecine |
| VIAULT Guillaume | MEDECINE GENERALE | Pharmacie |
| | CHIMIE ORGANIQUE | |

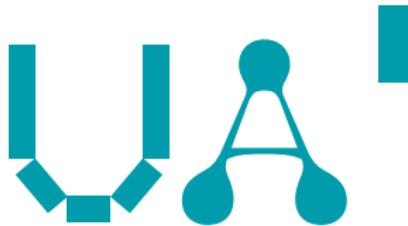
AUTRES ENSEIGNANTS

| | | |
|----------------------------|--------------------------------|-----------|
| ATER | | |
| ELHAJ MAHMOUD Dorra | IMMUNOLOGIE | Pharmacie |
| PRCE | | |
| AUTRET Erwan | ANGLAIS | Santé |
| BARBEROUSSE Michel | INFORMATIQUE | Santé |
| FISBACH Martine | ANGLAIS | Santé |
| O'SULLIVAN Kayleigh | ANGLAIS | Santé |
| RIVEAU Hélène | ANGLAIS | |
| PAST | | |
| CAVAILLON Pascal | PHARMACIE INDUSTRIELLE | Pharmacie |
| DILÉ Nathalie | OFFICINE | Pharmacie |
| GUILLET Anne-Françoise | PHARMACIE DEUST PREPARATEUR | Pharmacie |
| MOAL Frédéric | PHARMACIE CLINIQUE | Pharmacie |
| PAPIN-PUREN Claire | OFFICINE | Pharmacie |
| KAASSIS Mehdi | GASTRO-ENTEROLOGIE | Médecine |
| GUITTON Christophe | MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION | Médecine |
| SAVARY Dominique | MEDECINE D'URGENCE | Médecine |
| POMMIER Pascal | CANCEROLOGIE-RADIOTHERAPIE | Médecine |
| PICCOLI Giorgia | NEPHROLOGIE | Médecine |
| PLP | | |
| CHIKH Yamina | ECONOMIE-GESTION | Médecine |

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) GRASSAL Adèle
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **01/09/2023**



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

"La Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation."

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Frédéric Lagarce, je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse. Merci de m'avoir soutenu dans mes projets de formation durant mon internat. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le Docteur Frédérique Blanc-Béguin, Frédérique, merci infiniment d'avoir accepté de m'encadrer sur cette thèse. J'ai eu de la chance de travailler sur ce sujet avec toi. Merci de m'avoir transmis ta rigueur, m'avoir fait confiance et merci pour tes précieux conseils tout au long de ce semestre brestois! Je les emporte avec moi.

A Monsieur le Docteur Franck Lacoeuille, je te remercie d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Je te remercie aussi pour ta confiance lors de mon premier semestre en médecine nucléaire qui m'a donné envie de devenir radiopharmacien, ce n'est pas rien.

A Monsieur le Professeur Pierre-Yves Le Roux, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Brest-Angers ce n'est pas tout près, surtout si tu viens en courant. Ton déplacement me fait honneur.

A Madame le Docteur Aurore Rauscher, je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail (dont tu entends parler depuis déjà quelques temps). Merci aussi pour cette année à l'ICO durant laquelle j'ai beaucoup appris, merci pour tes conseils et explications personnalisées. J'ai adoré travailler avec toi.

A mes parents, merci pour tout l'amour que vous transmettez, merci pour votre écoute, merci pour tes petits plats réconfortants Maman, merci pour ton bricolage de professionnel Papa, merci pour vos bras à chaque déménagement (et c'est pas fini...). Merci de votre soutien sans faille depuis que la vie nous a réunie. Je ne serai pas ici sans vous. Je vous aime si fort.

A ma famille, vous êtes trop nombreux pour tous vous citer mais merci à tous et toutes pour ces merveilleux moments familiaux, ils sont précieux et donnent une énergie de dingue. Merci Apo, sans toi les vacances n'auraient pas été si drôles. Merci Cécile, Antoine et Matine pour votre accueil parisien sans condition et toujours chaleureux. Vivement la prochaine cousinade, Adrien nous pensons et penserons tout le temps à toi.

A ma sœur, merci pour ton soutien et ton amour de grand sœur quoi qu'il se passe. Je t'aime.

A Tata, merci pour ton soutien infini sans lequel je n'aurai pas autant profité de mes années étudiantes, sans lequel je n'aurai pas fait autant de kilomètres. Tu m'as transmis la force de croquer la vie en toutes circonstances.

A Annie, merci pour ta présence de près ou de loin depuis toujours. J'ai une douce pensée pour Laurent également.

A mes amies de toujours et pour toujours : Léah, Cam, Elise, Millou, Marinou, Marinette, Soso, Jul's, Tif, Ele, Man', Juju, Randouille. J'allais commencer par dire « en gros », mais vous savez que c'est dangereux, ça risque de me coûter cher en impression...Donc je vais me limiter à vous écrire un immense MERCI pour tout ce que vous m'apportez, vous savez à quel point notre amitié est indispensable. Je suis si fière de vous toutes, je vous aime pour toute la vie.

Une pensée particulière pour toi ma Cam, après le brevet, le bac, le 3x500m, la PACES, le concours d'internat, c'est la thèse que l'on passe (presque) ensemble ! Merci pour ton soutien depuis toutes ces années. Maintenant, GO tirer bords côté à côté à Kerambibi ?

REMERCIEMENTS

Merci aussi ma Jul's, dans la même galère au même moment, pas toujours simple mais avec une bonne dose de fous rires au compteur, merci pour ça ! « Y'a aucune galère finalement ! »

A ma Camille Mocky, tu es la preuve vivante que le coup de foudre amical existe. Merci pour ta sagesse d'esprit, pour ta folie équilibrée, pour tes précieux conseils, merci pour ta présence dans les moments de joie et de tristesse, pour ta philosophie de vie que j'admire tant. Tu es un vrai modèle pour moi. Notre semestre angevin de confinement avec les autres loustiques est gravé à jamais dans nos mémoires : vive les doudounes Aigle et les apéros à l'internat !

Aux Ripolins, Romain, Thibault, Chloé, Léa, Clem, Dup', Marie, Nathan, Julie, Jules et Nico : Merci pour tous ces beaux moments nantais, bretons, bruxellois ! Merci pour votre folie et vos projets improvisés qui sont les meilleurs. Vivement la suite !

A la bande des Thonland, Marion, Marie, Camille, Julie, Vio, Eno : Tout simplement merci les filles. Nos années rennaises resteront gravées à jamais : notre premier cours de Zumba, la BU Rennes 1 ou Rennes 2 ? les TP de pharmacognosie, la reproduction des champignons (on s'en fiche non ?) le 11h30 au self, les gouters d'hiver, le Délicat le jeudi... J'ai hâte de vous retrouver.

A Dup', merci pour ton amitié si précieuse en toute circonstance, je ne serai clairement pas ici sans toi. Je pense que j'ai doublé mon espérance de vie avec tes bêtises.

A Vio, un p'tit bout d'femme à Marseille mais toujours dans mon cœur. Ma partenaire de BU, de fous rires, de footing rennais ! Mise à part l'impossibilité d'échanger nos vêtements « rapport au fait » que tu fais 1m50, tout est incroyable. Mazette !

Merci à mes ami(e)s de fac, pharma et médecine, merci à Juliette, Laulau, Alex (rider pref de la côte ouest), Raph et la team Péroubol. Merci pour tous ces beaux moments passés et à venir !

A toutes les Zoulettes, merci pour votre soutien et merci de rendre la vie nantaise encore plus folle !

Merci mon Polo, même nounou, même bled, « frère et sœur de lait » diraient nos mères ! Ton amitié est précieuse.

Merci à tous mes co-internes pharma ou médecines, les copains et les coloc' angevins, nantais ou brestois : 4 années enrichies de belles rencontres! Une pensée particulière pour Laura avec qui les séjours à Saclay étaient animés. Merci Axel, tu m'auras bien fait rire durant ces 6 mois à l'ICO.

Je tiens aussi à remercier **toutes les équipes des différents services que j'ai côtoyées** et sans lesquelles mon internat n'aurait pas été si riche et joyeux :

Merci à **Violaine et Claire** qui m'ont initié à la pharmacie hospitalière, je me rappellerai toujours de mon premier semestre Choletais,

Merci **Alain** pour ton aide et ton implication dans mes démarches tout au long de mon cursus,

Merci **Ouassim et Aurélie** de m'avoir guidé lors de mes premiers pas en radiopharmacie.

Merci **Pierre** pour cette année à l'ICO, merci pour tes « file, il est l'heure d'aller faire du sport là »

Merci à **Valérie**, ton aide, ton calme et ton soutien ont été très précieux durant ces 6 mois,

Merci aux **PPH de l'Hôtel Dieu et du service de médecine nucléaire angevin. Merci aux manips' nantais et brestois** : Merci pour vos conseils et votre confiance. On aura aussi bien rigolé, et travailler dans la bonne humeur n'a jamais été contre-productif !

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | 11 |
| INTRODUCTION | 13 |
| PARTIE 1 : | 14 |
| 1. La Tomographie par émissions de positons | 14 |
| 2. La réglementation pharmaceutique | 16 |
| 2.1. Cadre réglementaire de la radiopharmacie et des médicaments radiopharmaceutiques | 16 |
| 2.2. Préparation et contrôles des médicaments radiopharmaceutiques (MRP) | 18 |
| 3. La législation des essais cliniques | 22 |
| 3.1. Autorisations et mise en place d'un essai clinique..... | 22 |
| 3.2. Le dossier du médicament expérimental..... | 24 |
| 4. Le gallium 68 (⁶⁸Ga) | 25 |
| 4.1. Propriétés physicochimiques | 25 |
| 4.2. Production : le générateur de ⁶⁸ Ge (germanium 68)/ ⁶⁸ Ga..... | 25 |
| 4.3. Radiochimie du ⁶⁸ Ga..... | 26 |
| 5. Le FAPI-46 « Fibroblast activation protein inhibitor »..... | 29 |
| 5.1. Les fibroblastes et myofibroblastes | 29 |
| 5.2. La FAP « Fibroblast Activation protein » ou protéine activatrice des fibroblastes | 30 |
| 5.3. Les FAPI et le de [⁶⁸ Ga]Ga-FAPI-46 | 30 |
| 6. Les applications diagnostiques du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI..... | 33 |
| 6.1. En oncologie..... | 33 |
| 6.2. Maladies inflammatoires et fibrosantes..... | 34 |
| PARTIE 2 : PRODUCTION DU [⁶⁸GA]GA-FAPI-46 AU SEIN DE LA RADIOPHARMACIE DE BREST | 36 |
| 1. Contexte et objectifs..... | 36 |
| 2. Matériels et méthodes | 37 |
| 2.1. Locaux et isolateurs de haute énergie | 37 |
| 2.2. Réactifs | 38 |
| 2.3. Synthèse..... | 38 |
| 2.4. Filtration stérilisante..... | 40 |
| 2.5. Validation du procédé de synthèse..... | 41 |
| 2.6. Contrôles qualité..... | 42 |
| 3. Résultats..... | 46 |
| 3.1. Mise au point de la synthèse (avec le filtre Millex®-GS 0,22µm, Millipore, Merck) | 46 |
| 3.2. Optimisation de l'étape de filtration stérilisante | 47 |
| 3.3. Validation du procédé de synthèse avec filtration stérilisante optimisée | 48 |
| 3.4. Mise au point de la méthode CCM | 48 |
| 3.5. Mise au point et validation de la méthode HPLC | 49 |
| 3.6. Contrôles qualités des 3 lots de validation | 52 |
| DISCUSSION | 55 |
| CONCLUSION..... | 63 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 64 |
| TABLE DES MATIERES | 67 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 69 |
| TABLE DES TABLEAUX | 70 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------|---|
| AMM | Autorisation de Mise sur le Marché |
| ANSM | Agence Nationale de Sécurité du Médicament |
| ARS | Agence Régionale de Santé |
| ASN | Autorité de Sureté Nucléaire |
| AUC | « Area Under the Curve » Aire sous la Courbe |
| BDF | Bruit De Fond |
| BPP | Bonnes Pratiques de Préparation |
| BPPH | Bonnes Pratiques de Préparation Hospitalière |
| CAF | « Cancer associated fibroblast » Fibroblastes associés aux cancers |
| CCM | Chromatographie sur Couche Mince |
| CPG | Chromatographie en Phase Gazeuse |
| CSP | Code de Santé Publique |
| CTIS | « Clinical Trial information System » |
| CV | Coefficient de Variation |
| DME | Dossier du Médicament Expérimental |
| DOTA | Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique |
| FAP | « Fibroblast Activation Protein » Protéine d'Activatrice des Fibroblastes |
| FAPI | « Fibroblast Activation Protein Inhibitor » Inhibiteur de la Protéine Activatrice des Fibroblastes |
| FDG | Fluoro-Deoxy-Glucose |
| HEPES | acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| HPLC | Chromatographie Liquide Haute Performance |
| ICH | International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for Human use |
| IMP | Investigational Medical Product |
| LD | Ligne directrice |
| LDL | Limite De Détection |
| LDQ | Limite de Quantification |
| MEC | Matrice Extra Cellulaire |
| MRP | Médicament Radiopharmaceutique |
| NaCl | Chlorure de Sodium |
| PES | Polyéthersulfone |
| PRC | Pureté Radiochimique |
| PUI | Pharmacie à Usage Intérieur |
| PVDF | Polyfluorure de vinylidène |
| RCP | Résumé des Caractéristiques du Produit |
| RIPH | Recherches Impliquant la Personne Humaine |
| TEP | Tomographie par Emission de Positons |
| TDM | Tomodensitométrie |

| | |
|------------|-----------------------------|
| TFA | Acide Trifluoroacétique |
| Tr | Temps de rétention |
| UV | Ultra-Violets |
| ZAC | Zone à Atmosphère Contrôlée |

INTRODUCTION

Le domaine de la médecine nucléaire, en particulier la tomographie par émissions de positons (TEP), est en pleine mutation, largement favorisée par l'émergence de nouveaux radiotraceurs. Bien que le Fluor 18 (¹⁸F) demeure le radionucléide prédominant en imagerie TEP, l'intérêt pour le gallium 68 (⁶⁸Ga) est en constante augmentation. Ces dernières années, plusieurs médicaments radiopharmaceutiques (MRP) à base de gallium 68 ont été développés pour cibler des processus biologiques.

La protéine d'activation des fibroblastes, la FAP « *Fibroblast Activation Protein* » en anglais, représente l'une des nouvelles cibles d'intérêt. Cette protéine est hautement exprimée dans les tissus anormaux tels que le microenvironnement tumoral ou les zones inflammatoires, tandis qu'elle présente une très faible expression dans les tissus sains. La FAP peut être ciblée par le biais d'inhibiteurs spécifiques, parmi lesquels se trouve le FAPI-46 (FAPI pour « *Fibroblast Activation Protein Inhibitor* » ou Inhibiteur de la Protéine Activatrice des Fibroblastes)

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un essai clinique basé sur l'utilisation du FAPI-46 marqué au ⁶⁸Ga en tant que marqueur TEP dans l'imagerie des maladies inflammatoires et fibrosantes.

Le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est un MRP expérimental sans autorisation de mise sur le marché (AMM). Sa fabrication à des fins médicales par la radiopharmacie de Brest nécessite une approbation via un dossier de demande d'autorisation, le Dossier du Médicament Expérimental (DME), auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM). Ce dossier vise à démontrer la capacité de la radiopharmacie de Brest à produire un tel médicament dans le respect des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) et à réaliser les divers contrôles attestant de la qualité du produit final destiné à être administré chez l'homme.

La première partie, bibliographique, abordera le fonctionnement des caméras TEP, le cadre réglementaire qui régit l'utilisation d'un médicament expérimental, la chimie du gallium 68, le FAPI-46, ainsi que les applications du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46.

La deuxième partie, expérimentale, traitera de la mise au point du processus de synthèse et sa validation ainsi que des contrôles du produit fini. Ces données devront permettre la rédaction du dossier du médicament expérimental qui sera soumis à l'ANSM.

PARTIE 1 :

1. La Tomographie par émissions de positons

La Tomographie par émissions de positons (TEP) est un examen d'imagerie médicale réalisé dans les services de médecine nucléaire. La TEP est utilisée dans le diagnostic, dans l'évaluation pronostique ainsi que dans le suivi de nombreuses pathologies notamment en cancérologie. Le principe repose sur l'injection intraveineuse d'un médicament radioactif ou MRP, émetteur β^+ .

Le MRP est :

Soit composé uniquement de l'isotope radioactif, c'est le cas par exemple de l'iode 131 (^{131}I) et du Krypton 81m ($^{81\text{m}}\text{Kr}$) en scintigraphie (autre méthode d'imagerie en médecine nucléaire utilisant les isotopes émetteurs de rayonnements gamma (γ)).

Soit, d'une molécule vectrice non radioactive (= froide) marquée par un isotope radioactif, cas le plus fréquent en TEP pour laquelle l'isotope est un émetteur β^+ .

Les émetteurs β^+ sont produits en cyclotron, qui sont des accélérateurs de particules chargées ou grâce à des générateurs comme c'est le cas pour le gallium 68 (^{68}Ga).

La désintégration de type β^+ survient lorsque le noyau père présente un excès de protons. Un des protons du noyau est alors converti en neutron et s'accompagne de l'émission d'un positon, appelé particule β^+ , et d'un neutrino. (Figure 1)

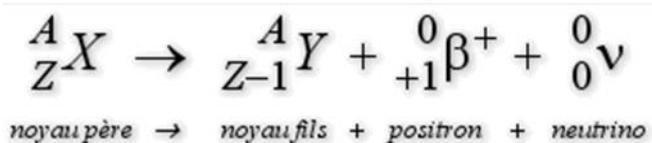


Figure 1 : Formule générale de la désintégration β^+

Après administration, le MRP se fixe de façon temporaire au niveau des tissus cibles ou s'intègre dans des voies métaboliques. L'isotope radioactif émetteur β^+ contenu dans le MRP TEP subit une désintégration entraînant l'émission d'un positon qui est émis du noyau avec une certaine énergie cinétique. Après un court parcours (3,1 mm pour le ^{68}Ga et 0,6 mm pour le ^{18}F) dans les tissus environnants, le positon rencontre un électron entraînant l'annihilation des deux particules et l'émission simultanée de deux photons gamma de 511 kev (photons de haute énergie) à 180° l'un de l'autre. C'est une émission en coïncidence sur laquelle est basé le principe de détection de la TEP. (Figure 2). La caméra TEP est composée d'une couronne de détecteurs comprenant un cristal scintillant et un photomultiplicateur permettant de détecter les photons incidents et donc de localiser le lieu de l'annihilation. La caméra est équipée d'un système informatique capable d'analyser ces signaux photoniques et de donner des images tridimensionnelles de la répartition du MRP dans le corps humain. (Figure 2)

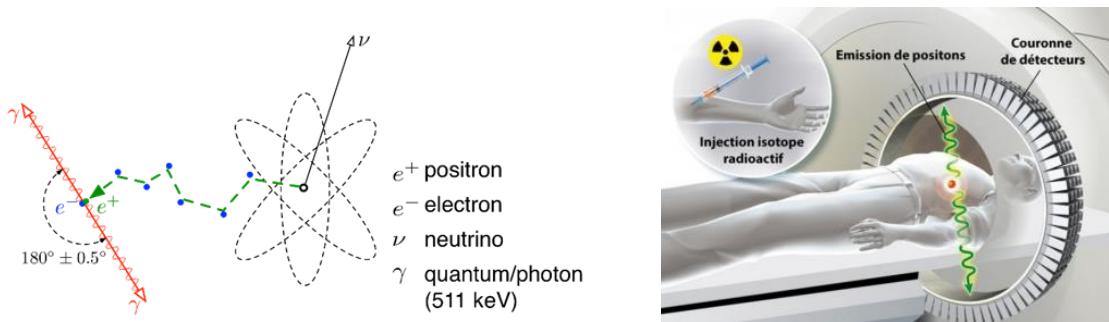


Figure 2 : Principe physique de la TEP

La TEP est une technique permettant d'étudier la fonctionnalité des organes, des tissus ou des cellules à la différence du scanner ou de la radiologie qui donnent une image anatomique du corps humain. Toutefois, les caméras TEP sont maintenant, pour la grande majorité, couplées à de la tomodensitométrie (scanner/TDM) permettant de mieux localiser anatomiquement les anomalies fonctionnelles : On parle de TEP-Scanner ou de TEP/TDM.

Pour être candidat à l'imagerie TEP, plusieurs critères sont à prendre en compte pour le radionucléide :

- L'énergie cinétique maximale ($E\beta_{max}$) : Plus cette énergie est importante, plus le libre parcours moyen dans les tissus sera important et donc la résolution de l'image diminuée. En effet, la TEP permet la localisation du lieu d'annihilation entre le positon et l'électron et non du lieu de désintégration du radionucléide. L'énergie maximale β^+ du radionucléide va influencer de façon inverse la sensibilité de détection.
- La demi-vie radioactive (appelée aussi la période radioactive) notée $T_{1/2}$ est également importante. Elle correspond au temps nécessaire pour que la moitié des atomes se désintègrent naturellement. Elle doit être suffisamment longue pour être compatible avec le temps de transport ou de préparation du médicament radiopharmaceutique (MRP) ainsi qu'avec le temps requis pour l'examen (pharmacocinétique du traceur, durée du phénomène biologique observé, temps d'acquisition). En revanche, elle doit être suffisamment courte pour minimiser la radio exposition du patient et de son environnement.
- Son moyen de production est également un facteur important car il peut conditionner la pureté radionucléidique de celui-ci. En effet l'isotope d'intérêt peut se trouver après production dans un mélange contenant d'autres radionucléides qui peuvent entrer en compétition dans le processus de marquage du traceur.
- Les caractéristiques physico-chimiques sont à prendre en compte dans les conditions de radiomarquage (cf partie sur le gallium-68 page 24).

Par conséquent, ces exigences limitent le nombre de radionucléides utilisables en TEP. (cf.Tableau 1).

| Isotope | Emissions β^+ | | Parcours moyens | Période radioactive | Noyau fils | Mode de production |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|
| | E_{\max} (keV) | Intensité d'émission (%) | Max (eau) (mm) | $T_{1/2}$ | | |
| Fluor 18 | 635 | 97 | 2,4 | 109,8 min | Oxygène 18 | cyclotron |
| Gallium 68 | 1900 | 88 | 8,2 | 68,3 min | Zinc 68 | cyclotron/générateur |
| Cuivre 64 | 656 | 19 | | 12,8h | Zinc 64 | cyclotron |
| Zirconium 89 | 900 | 22 | | 78,4 h | Yttrium89 | cyclotron |
| Oxygène 15 | 1700 | 100 | 7,3 | 2min | Azote 15 | cyclotron |
| Azote 13 | 1190 | 100 | 5,1 | 9,9 min | Carbone 13 | cyclotron |
| Carbone 11 | 960 | 99 | 4,1 | 20,4 | Bore 11 | cyclotron |
| Iode 124 | 2130 | 25 | | 4,2j | Cuivre 62 | cyclotron |

Tableau 1 : Isotopes émetteurs de positons pour l'imagerie TEP

2. La réglementation pharmaceutique

2.1. Cadre réglementaire de la radiopharmacie et des médicaments radiopharmaceutiques

La radiopharmacie est une activité de la pharmacie à usage intérieur (PUI) soumise à autorisation. Elle est donc sous la responsabilité du gérant de la pharmacie. En revanche, dans le but de faciliter et d'optimiser la gestion du MRP ainsi que pour des raisons réglementaires liées à l'utilisation des radionucléides, les locaux de la radiopharmacie se trouvent à l'intérieur ou à proximité du service de médecine nucléaire. Le pharmacien qualifié en radiopharmacie est le seul à pouvoir être responsable de la gestion, de l'approvisionnement, de la détention, de la préparation, du contrôle qualité et de la dispensation du radiopharmaceutique sur délégation du gérant de la PUI.

Les médicaments radiopharmaceutiques (MRP) sont définis comme « tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales » (Article L.5121-1 du Code de Santé Publique -CSP). Ils sont utilisés conformément aux dispositions relatives aux médicaments à usage humain qui sont définies dans le code de la santé publique.

Depuis la loi de 1992, les médicaments radiopharmaceutiques appartiennent au monopole pharmaceutique. Néanmoins, seul le médecin nucléaire responsable du service est titulaire de l'autorisation de détention et d'utilisation des radioéléments (Article R 5234 du CSP). En pratique, le radiopharmacien possède une délégation du médecin responsable pour l'achat des produits radiopharmaceutiques.

De par leur nature, les MRP doivent respecter les législations des médicaments et des produits radioactifs dont les autorités compétentes sont respectivement : l'ANSM (Agence National de Sécurité du Médicament) et L'ASN (Agence de Sureté Nucléaire).

Il existe deux types de médicaments radiopharmaceutiques : les médicaments prêts à l'emploi et les préparations radiopharmaceutiques.

- Les spécialités pharmaceutiques prêtes à l'emploi sont fabriquées industriellement et disposent d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par l'ANSM (ex : le [¹⁸F]F-FDG).
- Les préparations radiopharmaceutiques sont préparées au moment de l'emploi à l'aide des produits disposant d'une AMM :
 - une trousse : Toute préparation qui doit être reconstituée ou combinée avec des radionucléides dans le produit radiopharmaceutique final.
 - un précurseur : Solution de radionucléide prêt à l'emploi utilisée pour le marquage d'un vecteur.
 - ou un générateur : Tout système contenant un radionucléide parent déterminé servant à la production d'un radionucléide de filiation obtenu par élution et utilisé dans un MRP.

La préparation des médicaments radiopharmaceutiques est une mission soumise à autorisation délivrée par l'Agence Régional de Santé (ARS) après avis de l'Ordre national des pharmaciens pour une durée de 5 ou 7 ans (Article R 5126-27 du CSP). Cette autorisation prouve que la PUI dispose de moyens en locaux, personnel, équipements et systèmes d'information nécessaires à cette pratique.

Quant aux médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux (« un médicament expérimenté ou utilisé comme référence, y compris comme placebo, lors d'un essai clinique ») leur préparation au sein d'une PUI n'est possible qu'après obtention d'une autorisation spécifique délivrée par l'ARS.

La PUI doit travailler conformément aux Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière (BPPH) (R.5126-23 du CSP) et toute préparation dont celle des médicaments radiopharmaceutiques doit également être réalisée conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation (BPP). Les BPP sont des textes de référence opposables qui ont pour objectifs principaux de définir les modalités de réalisation des préparations y compris radiopharmaceutiques, de garantir la qualité des préparations réalisées et de souligner les différentes mesures permettant concrètement d'améliorer la sécurité et la traçabilité à toutes les étapes de la chaîne de préparation.

Depuis août 2023, la dernière édition du guide des BPP est disponible. Ces nouvelles règles sont applicables depuis le 20 septembre 2023 en remplacement de celles de 2007. Les MRP injectables suivent les chapitres généraux, la ligne directrice n°1 (LD1) relative à la préparation des médicaments stériles, la ligne directrice n°2 (LD2) relative à la préparations de médicaments contenant des substances pouvant présenter un risque pour la santé et l'environnement ainsi que la ligne directrice n°4 (LD4) relative à la préparation des médicaments radiopharmaceutiques prenant en compte les

nouveaux équipements et les nouveaux modes de préparation (automates de radiosynthèse, automate de préparation de doses).

Dans le cadre d'un médicament expérimental, la ligne directrice n°3 (LD3) relative aux préparations rendues nécessaires par les recherches impliquant la personne humaine y compris la préparation de médicaments expérimentaux, s'applique aussi.

2.2. Préparation et contrôles des médicaments radiopharmaceutiques (MRP)

2.2.1. Environnement et locaux de préparations des MRP

Les locaux de préparation des MRP sont des Zones à Atmosphère Contrôlée (ZAC) dont l'objectif est de maîtriser les risques de contamination microbiologique et particulière liés aux flux de personnel, de matériel et de produits. Il existe une classification en quatre classes (A, B, C, D) dépendant de la zone à laquelle on fait référence : la zone de préparation ou de son environnement immédiat. Elles se définissent notamment par un nombre maximal de particules autorisé au repos par unité de volume dans la zone (les normes ISO 14644-2 et 3 informent sur les tests de surveillance à réaliser pour répondre aux exigences de propreté de la classification voulue).

Les locaux sont équipés d'un sas d'accès assurant :

D'une part, la cascade de pressions nécessaire à obtenir la classe désirée dans la zone de préparation : La salle de préparation est en surpression par rapport au sas qui est lui-même en surpression par rapport à l'environnement extérieur. Cette différence de pression doit être d'au moins 10 Pascals et doit être vérifiée avant chaque début de production.

D'autre part, ce sas permet au personnel de vêtir la tenue appropriée à la classification de la ZAC. (1)

2.2.2. Les contrôles de l'environnement et des équipements

Afin de vérifier le bon fonctionnement dans le respect de la réglementation et par conséquent garantir la qualité des produits préparés, plusieurs contrôles de l'ensemble des locaux et équipements composants la ZAC doivent être réalisés.

a) L'environnement

L'ensemble des équipements, locaux et zones composant la ZAC sont qualifiés à leur installation et requalifiés au moins une fois par an. La LD4 des BPP donne la liste des tests à réaliser ainsi que des recommandations sur leur fréquence de réalisation. (1) Parmi eux, la réalisation du contrôle particulaire de l'air est recommandé une fois par an et doit être conforme à la classe de la ZAC désirée. Les BPP se basent sur les normes ISO 14644-2 et 3 pour informer sur les essais à réaliser. En cas de non-conformité, des mesures correctives doivent être mis en place (limiter les flux de personnels et

matériels, asservissement des sas...). De plus, la cascade de pression entre la zone de préparation et la zone extérieure est à vérifier systématiquement avant chaque début de production.

Une attention particulière est portée sur les contrôles microbiologiques dont les fréquences de réalisation conseillées ont augmentées dans les nouvelles BPP. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous :

| Prélèvements | Environnement de classe A | Environnement immédiat à la classe A (B, C ou D) |
|--|--|---|
| Air : Gélose de sédimentation (une gélose par session de 4h maximum) | Quotidien | A surveiller en fonction de la classe d'empoussièvement et du procédé utilisé |
| Gants manipulateur : Par gélose contact | Quotidien en fin de session de travail | A surveiller en fonction de la classe d'empoussièvement et du procédé utilisé |
| Programme de prélèvement par contact à l'intérieur des zones classées | Hebdomadaire | Mensuel |
| Prélèvements de toutes les zones classées par aérobiolecteur | Mensuel | B : mensuel C : trimestriel D : semestriel |

Tableau 2 : Recommandations BPP 2023 sur les contrôles microbiologiques de la ZAC.

b) Les équipements

Le bon fonctionnement du matériel doit aussi être vérifié :

- Vérification de la dépression de l'enceinte blindée
- Etat des gants de manipulation dans l'enceinte
- Le bloc chauffant le cas échéant
- L'activimètre : L'activimètre est un outil indispensable en radiopharmacie permettant la mesure de l'activité des produits radiopharmaceutiques contenant des radionucléides. Placé sous la supervision du physicien médical, il fait l'objet de contrôles qualité quotidiens visant à détecter toute divergence par rapport aux spécifications prévues (écart dans la mesure de source de constance, modifications inattendues des valeurs du bruit de fond) avant le début de la production. Les sources de constance utilisées le plus fréquemment sont des sources scellées de Baryum-133 ou de Césium-137 présentant une demi-vie très longue.

De plus, l'activimètre est calibré pour chaque radionucléide utilisé et dans une géométrie de comptage spécifique. La bonne sélection de ces éléments sur l'activimètre doit être impérativement vérifiée avant chaque nouvelle mesure d'activité.

2.2.3. Le personnel

Le radiopharmacien est techniquement responsable de la réalisation et du contrôle des préparations radiopharmaceutiques. En revanche, ces taches peuvent être réalisées par d'autres catégories de

personnels qualifiés (Préparateurs en pharmacie, manipulateur en électroradiologie, techniciens de laboratoire) sur délégation après avoir reçu une formation initiale notamment en hygiène et en radioprotection. D'après les BPP 2023, toute personne préparant un MRP à destination de patients doit être habilitée par le radiopharmacien par une évaluation comprenant un test de remplissage aseptique. La mise à jour des connaissances doit rentrer dans un plan de formation continue. (1)

2.2.4. La préparation des MRP injectables

Le terme "préparation de MRP" englobe l'ensemble des actions liées à la préparation (synthèse, marquage, reconstitution) ainsi qu'au conditionnement, incluant également le conditionnement en doses unitaires en vue de l'administration du médicament au patient.

Dans ce travail sera développée la préparation des MRP destinés à être administré par voie injectable. Ces MRP sont des préparations aseptiques réalisées en système clos et qui doivent être effectuées conformément aux recommandations existantes du fabricant et/ou selon les procédures validées par le radiopharmacien tout en respectant les indications de la Pharmacopée Européenne et les BPP.

Selon la LD4 des BPP, la préparation doit être conduite dans une enceinte blindée de classe A ventilée en dépression et équipée d'un sas de préférence asservi. L'environnement dans lequel se trouve l'enceinte blindée doit être au minimum de classe C.

Depuis 2014, la dépression des enceintes blindées est suffisante pour confiner la radioactivité (BPP 2023). La réglementation n'exige plus la dépression des locaux par rapport à l'environnement extérieur. (2)

La ventilation des enceintes et des locaux sont indépendantes et le recyclage de l'air des enceintes blindées est interdit.

Actuellement la préparation des MRP est de plus en plus réalisée à l'aide d'un automate de radiosynthèse, placé dans une enceinte blindée. Ces automates se définissent par « *Automate effectuant, de manière automatisée ou semi-automatisée à l'aide d'un logiciel, une séquence d'opérations nécessaires pour le radiomarquage, la purification et/ou la formulation d'une préparation radiopharmaceutique, et pour certains le contrôle de sa qualité*

Certains d'entre eux fonctionnent avec des cassettes de radiosynthèse qui sont des dispositifs à usage unique prêts à l'emploi ou à assembler au moment de la synthèse, pouvant être pré-remplis ou non avec les réactifs nécessaires.

En utilisant un logiciel de pilotage installé sur un ordinateur situé à l'extérieur de l'enceinte, il devient possible, au moyen de divers capteurs, de surveiller les paramètres des étapes critiques de la préparation : la pression (une pression excessive dans le dispositif peut entraîner des dysfonctionnements), la température du milieu réactionnel qui influe sur la cinétique du radiomarquage

et sur le rendement de synthèse, ainsi que le suivi de la quantité et surtout du positionnement de la radioactivité tout au long de la synthèse.

L'automatisation des radiosynthèses est surtout utile pour les préparations incluant des isotopes de haute énergie comme le gallium 68, en effet, le pilotage de la synthèse depuis l'extérieur de l'enceinte permet de protéger le personnel des rayonnements ionisants. De plus ces dispositifs améliorent la reproductibilité des procédés de synthèse. (3)

2.2.5. Les contrôles qualité des MRP injectables

Avant d'être administré à un patient, chaque préparation doit être contrôlée pour s'assurer que le produit fini correspond à celui attendu. Les contrôles réalisés sont ceux décrits dans la Pharmacopée Européenne pour ce type de préparation.

- Caractères organoleptiques : ils tiennent compte de la couleur et de l'aspect de la solution. Ils doivent être conformes à l'aspect attendu décrit dans les spécifications (Résumé des Caractéristiques du Produit, RCP)
- La pureté radiochimique (la PRC) : La pureté radiochimique est définie comme le rapport, exprimé en pourcentage, de la radioactivité du radionucléide considéré qui se trouve présent dans la source sous la forme chimique indiquée, à la radioactivité totale de ce même radionucléide présent dans la source. Selon le MRP contrôlé, un pourcentage minimal est attendu. Pour les MRP ayant une AMM, ce pourcentage est indiqué dans le RCP. La détermination de la PRC nécessite une méthode analytique (méthodes chromatographiques) permettant de séparer les différentes espèces radiochimiques pouvant être présentes. La méthode la plus utilisée est la chromatographie sur couche mince (CCM).
- L'identification et la pureté radionucléidique : La pureté radionucléidique se définit par le rapport exprimé en pourcentage (%) de l'activité du radionucléide considéré à l'activité totale de la source. Selon le radionucléide manipulé, il existe différentes méthodes de détermination de ce paramètre : Une consiste à calculer la demi-vie du radionucléide en question, tandis que l'autre méthode repose sur la mesure de la radioactivité à l'aide d'un spectromètre équipé d'une sonde de détection, permettant ainsi d'obtenir le spectre énergétique spécifique des radioéléments.
- Le contrôle du pH du produit fini qui doit être compatible à une administration à l'homme (pH sanguin 7,35-7,45). Le pouvoir tampon du sang permet de tolérer des pH entre 3 et 8 environ.

Ces contrôles sont dits « libératoires », c'est-à-dire qu'une fois validés comme étant conformes aux spécifications, la préparation peut être libérée et être administrée à l'homme.

Il existe aussi des contrôles effectués après libération du produit et administration aux patients, c'est le cas par exemple du contrôle de stérilité de la préparation qui est réalisé à posteriori. D'une part pour

des soucis de radioprotection, le contrôle est effectué après décroissance de l'échantillon et d'autre part, ce contrôle nécessite des temps d'incubation sur des milieux de cultures spécifiques qui sont incompatibles avec une libération avant l'injection.

Dans le cadre des préparations radiopharmaceutiques injectables relevant des médicaments expérimentaux, d'autres contrôles sont à réalisés comme par exemple la vérification du taux d'endotoxines qui doit être conforme à la limite fixée par la Pharmacopée Européenne.

Les contrôles qualités du MRP doivent être réalisés dans un local dédié, situé à proximité du lieu de préparation. L'idéal est l'existence d'un sas transmural entre les 2 locaux. La personne réalisant le contrôle qualité doit être habilitée et différente de celle ayant préparé le produit.

Les contrôles sont effectués en suivant les procédures validées par le radiopharmacien, lesquelles sont élaborées en conformité avec les recommandations du fabricant, les monographies de la Pharmacopée Européenne et les Résumés des Caractéristiques des Produits (RCP) s'ils existent (texte opposable).

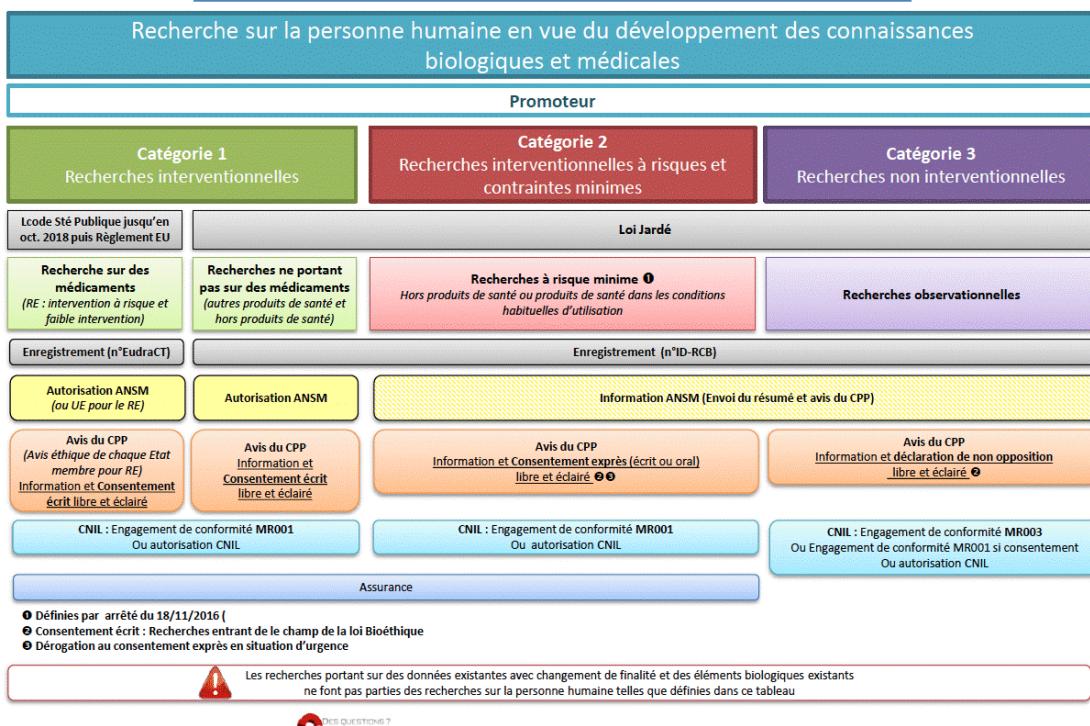
Toutes ces informations essentielles concernant la préparation et le contrôle du MRP sont consignées dans un dossier de lot qui garantit la traçabilité des précurseurs, des trousse, des générateurs et des réactifs utilisés, ainsi que l'identification du radiopharmacien responsable de la libération de la préparation. Cette traçabilité est généralement gérée de manière informatique à l'aide d'un logiciel métier. (1)

3. La législation des essais cliniques

3.1. Autorisations et mise en place d'un essai clinique

Du fait de son intérêt pour le corps humain, la recherche médicale appelée « Recherche Impliquant la Personne Humaine (RIPH) » est encadrée par des lois éthiques et déontologiques. L'une d'elles, la loi "Jardé" fait référence à la loi française n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine. Elle a remplacée l'ancienne loi française n° 88-1138 du 20 décembre 1988 dite "loi Huriet-Sérusclat" qui régissait les recherches impliquant la personne humaine. La nouvelle loi vise à moderniser et à simplifier le cadre réglementaire des recherches cliniques tout en renforçant les garanties éthiques pour les participants. Cette loi établit une distinction entre les recherches interventionnelles (catégories 1 et 2) (essais cliniques, études expérimentales) et les recherches non interventionnelles (catégorie 3) (observationnelles) pour lesquelles les procédures d'autorisation et d'évaluation éthique diffèrent. (Figure 3)

DÉMARCHES RÉGLEMENTAIRES EN FONCTION DU PROJET



⚠️ Les recherches portent sur des données existantes avec changement de finalité et des éléments biologiques existants ne font pas parties des recherches sur la personne humaine telles que définies dans ce tableau



Contact utile : promoteur.inserm@inserm.fr

Figure 3 : Catégories de recherches et démarches réglementaires (INSERM)

Pour les essais cliniques nécessitant une autorisation de l'ANSM (catégorie 1), depuis le 31 janvier 2022, le nouveau règlement européen n° 536/2014 a remplacé la directive 2001/20/CE. Ce règlement a introduit le portail CTIS (Clinical Trial Information System) comme plateforme unique pour soumettre les demandes et obtenir les autorisations pour les essais cliniques menés dans l'Union européenne en permettant une évaluation centralisée de la partie scientifique du dossier. Cette centralisation a surtout simplifié les procédures pour les essais cliniques menés dans plusieurs pays européens.

Concernant le Comité de Protection des Personnes (le CPP), il examine la partie éthique (partie II) du protocole de recherche, les consentements éclairés, les risques et les avantages potentiels pour les participants ainsi que les mesures prises pour assurer la confidentialité des données et la sécurité des sujets.

Dans le cadre d'un essai clinique mononational (français), l'ANSM examine et rend un avis sur la partie scientifique du dossier (partie I) regroupant l'évaluation de la sécurité de l'essai vis-à-vis de la qualité des produits et des méthodes utilisés. Le dossier à envoyer à l'ANSM comporte :

- Le dossier administratif avec un formulaire de demande (commun au CPP) ainsi qu'une soumission électronique via le portail européen EudraCT. Le numéro EudraCT et un numéro d'enregistrement permettant d'identifier chaque recherche.
- Le dossier de l'essai clinique
- Le Dossier du Médicament Expérimental (DME)

Il faut compter 60 jours pour l'évaluation des deux parties. Si les avis sont favorables, l'essai est autorisé.

3.2. Le dossier du médicament expérimental

Le DME est à constituer dans le cadre d'un médicament radiopharmaceutique expérimental afin de garantir la qualité pharmaceutique pour des MRP sans AMM préparés au sein des radiopharmacies. En revanche, dans le cas où le médicament expérimental dispose déjà d'une AMM, le DME n'est pas nécessaire.

Le DME a pour but de démontrer que la radiopharmacie est capable de préparer et de contrôler, avec les moyens nécessaires qu'elle maîtrise, le médicament radiopharmaceutique en respectant les textes régissant son activité (BPP, Pharmacopée Européenne...) pour assurer la qualité pharmaceutique du produit fini ainsi que sa sécurité d'utilisation. Pour cela, le DME est composé de 3 grandes parties :

La partie I regroupe des données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique des matières premières utilisées et du produit fini (formulation finale du MRP). Cette partie décrit la substance active en précisant sa structure, sa nomenclature et ses propriétés physicochimiques.

En radiopharmacie, les molécules froides (vecteur) avant radiomarquage (trousse) ainsi que les isotopes radioactifs (père et fils) d'un générateur sont considérés comme des substances actives. L'ensemble du processus de fabrication, les procédés de contrôle qualité du produit fini et la validation des procédures analytiques doivent être détaillées en précisant les spécifications attendues pour chaque contrôle.

Concernant les matières premières, le fournisseur doit être, soit un établissement pharmaceutique validé soit conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) et validé par l'ANSM pour fabriquer les matières premières à usage pharmaceutiques (MPUP).

La partie II concerne les données non cliniques avec les études pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques. Dans le cadre des Médicaments Radiopharmaceutiques Expérimentaux (MRPE), les études de génotoxicité et de carcinogénicité ne sont pas demandées car les MRP sont injectés à des quantités de l'ordre de la microdose (<100µg et à 1/100 de la dose sans effet toxique observable). Cette partie doit inclure des données dosimétriques préalablement mesurées et calculées. L'essai clinique doit être approuvé par l'ASN qui est l'autorité nationale compétente en matière de radioprotection. (3)

La partie III regroupe les données cliniques dans le cas où un essai a déjà été mené chez l'homme.

4. Le gallium 68 (^{68}Ga)

4.1. Propriétés physicochimiques

4.1.1. Propriétés chimiques

Le gallium 68 (^{68}Ga) est un élément chimique appartenant à la famille des métaux pauvres appelés également métaux de post-transition. Sa masse molaire est de 69,72 g.mol⁻¹ et sa température de fusion de 29,8°C.

Le gallium est une espèce amphotère, selon le pH du milieu dans lequel il se trouve il se comportera soit comme un acide soit comme une base. En solution aqueuse acide, il est présent sous forme ionique Ga³⁺ (degré d'oxydation +III) et aura tendance à réagir avec des bases dures de Lewis donneuses d'électrons tels que les atomes d'oxygène (O) ou d'Azote (N) selon les lois de chimie de complexation. L'ion Ga³⁺ n'est stable qu'à un pH < 3. En effet, pour un pH compris entre 3 et 7, le gallium précipite sous forme d'hydroxyde de gallium de formule Ga(OH)₃. Dans un milieu encore plus basique (pH > 7), c'est l'ion gallate Ga(OH)⁴⁻, incomplexe, qui se forme.(4) Ces propriétés chimiques sont importantes à prendre en compte pour le radiomarquage de molécules d'intérêt.

4.1.2. Propriétés physiques

Le gallium possède plusieurs isotopes dont certains sont stables. C'est le cas du gallium 69 et du gallium 71. Les autres sont radioactifs. Le gallium 67 et le gallium 68 sont les 2 isotopes utilisés en médecine nucléaire. L'utilisation du gallium-67 a progressivement diminué au profit de la tomographie par émission de positons (TEP) avec le [¹⁸F]F-FDG (Fluoro-deoxy-glucose). Le gallium 68 est devenu l'isotope prédominant dans le domaine de la médecine nucléaire. Sa période physique est de 67,71 minutes. Il est issu de la désintégration du germanium 68 par capture électronique et décroît en zinc 68 (⁶⁸Zn) à 89% par émission de positons (émissions β^+) et à 11% par capture électronique. L'énergie maximale de la particule β^+ émise est de 1900 keV. (4)

4.2. Production : le générateur de ^{68}Ge (germanium 68)/ ^{68}Ga

La production du gallium 68 est possible soit par cyclotron soit par l'utilisation d'un générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Cette dernière option est la plus compatible avec une utilisation en routine clinique, malgré son coût élevé.

En effet, le générateur permet d'avoir à disposition du ^{68}Ga indépendamment des contraintes industrielles (distance par rapport au lieu de production, commande régulières, calendrier de production...).

Le principe du générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ repose sur l'équilibre séculaire entre le noyau père, le germanium 68 et le noyau fils, le gallium 68. A l'intérieur du générateur, le germanium 68 est adsorbé sur une colonne en dioxyde de titane (TiO₂) et décroît selon une demi-vie de 271 jours en gallium 68. Ce dernier

est récupéré par l'élution de la colonne avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L permettant d'obtenir un éluat de $^{68}\text{GaCl}_3$ (chlorure de gallium 68). L'activité de la solution de chlorure de gallium pouvant être éluée pour le radiomarquage dépend de l'activité du germanium présente, du volume d'HCl utilisé et du temps écoulé depuis la dernière élution. L'équilibre séculaire entre le ^{68}Ge et le ^{68}Ga permet l'élution du générateur plusieurs fois par jour (deux à trois au maximum en général) et l'obtention d'un éluat avec une activité volumique suffisante pour le radiomarquage. Le générateur GalliaPharm® commercialisé par Eckert et Ziegler possède une AMM et les Résumés des Caractéristiques du produit (RCP) mentionnent que si les radionucléides père et fils sont à l'équilibre, plus de 60% du gallium accroché peut être élué et une élution réalisée 4h après la précédente permet de récupérer théoriquement 91% de l'activité maximale.

4.3. Radiochimie du ^{68}Ga

4.3.1. Principe de radiomarquage

Le principe de radiomarquage repose sur la fixation d'un isotope radioactif sur une molécule vectrice non radioactive (« froide »). Deux approches de marquages sont possibles :

- Soit par liaison covalente entre le vecteur et la molécule vectrice.
- Soit par la formation d'un complexe, on parle de chimie de coordination ou de chimie de complexation.

La radiomarquage de biovecteurs par le gallium 68 repose sur cette chimie de complexation.

La plupart des vecteurs d'intérêt clinique (Anticorps, peptides, nanoparticules) n'ont pas la structure chimique adéquate pour se lier directement au radionucléide par complexation. Pour cette raison, le radiomarquage au gallium de ces vecteurs fait intervenir, dans la plupart des cas, un chélateur bifonctionnel qui permet d'établir une liaison covalente avec le vecteur non radioactif d'une part et de complexer le cation métallique d'autre part. L'ensemble molécule vectrice-chélateur-radionucléide forme le médicament radiopharmaceutique.

En solution aqueuse, seule la forme Ga^{3+} est stable, le cation Ga^{3+} est un métal et acide fort de Lewis qui peut par conséquent se chélater aux bases fortes de Lewis. Du fait de son petit rayon cationique (0,62 Angstrom), le cation peut établir de 4 à 6 liaisons de coordination, quand elles sont de 6, on parle d'hexaèdre. Le gallium 68 préfère les configurations octaédriques, soit 6 liaisons avec le chélateur et deux autres liaisons avec un autre atome, qui est de l'oxygène en général. (4)

Il existe deux approches de marquage radioactif utilisant un chélateur bifonctionnel : la première implique d'abord la formation d'un complexe avec le radionucléide, suivi, dans un second temps de la liaison au vecteur. La seconde méthode consiste à attacher le chélateur au vecteur dans un premier temps, puis à procéder au radiomarquage dans un second temps. La période radioactive du ^{68}Ga est

trop brève pour permettre l'application de la première approche. Par conséquent, dans la routine radiopharmaceutique, la formation du complexe entre le chélateur et le vecteur est effectuée en préalable au processus de radiomarquage.

La stabilité d'un complexe repose sur plusieurs paramètres :

- La constante de dissociation du complexe, notée Kd avec $Kd = ([M]x[ligand]/[complexe])$
- La constante de formation du complexe, notée Kf avec $Kf = 1/Kd$
- Le pKa qui traduit la capacité du ligand (les bases fortes) à se protoner en solution aqueuse
- L'hydrolyse des ions métalliques

Pour assurer la stabilité du marquage, le chélateur doit avoir une cinétique de complexation rapide (Kf élevée) et à l'inverse une cinétique de dissociation lente (Kd faible).

Le gallium 68 et le Fer présentent des similitudes physico-chimiques. Le fer est transporté dans la circulation sanguine par une protéine, la transferrine. Afin d'éviter le phénomène de transchélation, c'est-à-dire la chélation du gallium par la transferrine après administration, il est essentiel que le gallium présente une affinité supérieure envers le chélateur, par rapport à celle envers la transferrine après administration. De plus, lors des opérations de radiomarquage, il faut limiter tout risque de contamination métallique (à travers les aiguilles par exemple) et préférer l'usage d'aiguille en téflon lors des étapes de manipulation précédent le marquage) pour éviter les phénomènes de compétition entre les potentielles impuretés métalliques (Fe^{3+} par exemple) et le ^{68}Ga , en effet, celles-ci pourraient être chélatées à la place du ^{68}Ga et donc aboutir à la production d'un complexe non désiré et faire diminuer le rendement de marquage.

Le chélateur bifonctionnel doit donc idéalement répondre aux caractéristiques suivantes :

- Permettre une complexation rapide du cation Ga^{3+} dans des conditions douces (pH et température du milieu réactionnel n'altérant pas les biovecteurs, temps de complexation compatible avec une production en routine clinique)
- Avoir une cinétique de complexation compatible avec le gallium 68. La demi-vie courte du gallium exige une complexation rapide.
- Ne pas altérer les fonctions biologiques du vecteur après conjugaison. En effet, la taille et la charge des chélates peut modifier l'affinité du traceur pour son récepteur
- Le complexe doit présenter une stabilité *in vivo*, à pH physiologique, vis-à-vis des autres métaux potentiellement présents dans la circulation sanguine (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) afin d'éviter la démétallation.
- Etre pharmacodynamiquement inerte *in vivo*.

4.3.2. Les chélateurs : Cas du DOTA

Les chélateurs formant des complexes les plus stables avec le gallium 68 sont ceux qui séquestrent le cation Ga^{3+} avec 6 liaisons de coordinations, ce sont donc des chélateurs qui sont hexadentés.

Il existe deux grandes familles de chélateur : les agents cycliques et les agents non-cycliques. Les 2 chélateurs les plus utilisés avec le gallium sont : l'HBED (acide N,N'-bis[hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]éthylénediamine-N,N'-Diacétique) un chélateur non-cyclique et le DOTA, un chélateur cyclique.

Dans le cas du marquage du FAPI-46 avec du ^{68}Ga , le chélateur utilisé est le DOTA, l'acide 1, 4, 7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7,10-tétraacétique. Le DOTA fait partie des chélateurs macrocycliques largement utilisés pour le radiomarquage de vecteurs avec le Ga^{3+} . (5)

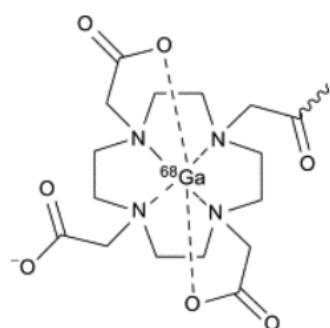


Figure 4 : Complexe ^{68}Ga -DOTA (6)

Le DOTA présente quatre groupements carboxyliques, pour la chélation du gallium 68, seulement deux de ces groupements sont utilisés. La conjugaison au vecteur se fait souvent par le biais d'un des bras carboxyliques resté libre. Ceci a pour conséquence la diminution de la stabilité du complexe (4). Afin de permettre la bonne incorporation du Ga^{3+} dans le DOTA et la stabilité du complexe, les conditions de radiomarquage suivantes sont nécessaires : une température du milieu réactionnel élevée avec un temps d'incubation de plusieurs minutes (réaction de complexation lente et courte demi-vie du Gallium 68) ainsi qu'un pH précis. En effet, comme précisé précédemment, le pH du milieu réactionnel conditionne la disponibilité de l'ion Ga^{3+} qui est la seule forme chimique du gallium 68 stable et pouvant être complexée. La phénomène d'hydrolyse et la formation d'hydroxyde de gallium peuvent être évités en utilisant des ligands faibles et stabilisants comme le citrate, l'acétate, l'oxalate et le HEPES (acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)pipérazin-1-yl]éthanesulfonique) (4). Toutefois, parmi ces ligands, seul l'acétate est actuellement reconnu comme une substance pharmaceutique autorisée pour une utilisation chez l'homme. (7)

De plus, la nécessité de chauffage du milieu réactionnel à des températures élevées limite l'utilisation du DOTA pour le radiomarquage des vecteurs thermosensibles comme les protéines (risque de dénaturation) et certains peptides.

En conclusion, les caractéristiques physicochimiques font du gallium 68 un radiolélément de choix pour l'imagerie TEP. Malgré sa demi-vie courte, le gallium 68 a un avantage majeur par rapport au Fluor 18 qui est d'avoir une chimie de marquage plus simple, via le chélateur « DOTA » notamment.

5. Le FAPI-46 « Fibroblast activation protein inhibitor »

5.1. Les fibroblastes et myofibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses présentes dans les tissus conjonctifs de nombreux organes et tissus du corps. Ils jouent un rôle crucial dans la régulation de la structure, de la fonction et de la réparation des tissus. Ils sont responsables de la synthèse et du maintien de la matrice extracellulaire (MEC) jouant un rôle essentiel dans la régulation de la force mécanique des tissus, de la migration cellulaire, dans la régulation de la croissance cellulaire et de la modulation des signaux de signalisation.

Lors de signaux inflammatoires, de blessures ou lors de conditions pathologiques, les fibroblastes peuvent subir une transformation pour donner des fibroblastes activés appelés myofibroblastes. Ils ont une forme modifiée par rapport aux fibroblastes normaux et sont dotés de contractilité comme les cellules musculaires. (Figure 5)

Bien que les fibroblastes activés jouent un rôle crucial dans la réparation tissulaire, une activation excessive ou prolongée peut entraîner des dysfonctionnements tels que la fibrose. Dans certaines conditions pathologiques, les fibroblastes activés peuvent continuer à proliférer et à synthétiser une quantité excessive de tissu cicatriciel, entraînant une fibrose excessive et une altération de la fonction tissulaire normale (8).

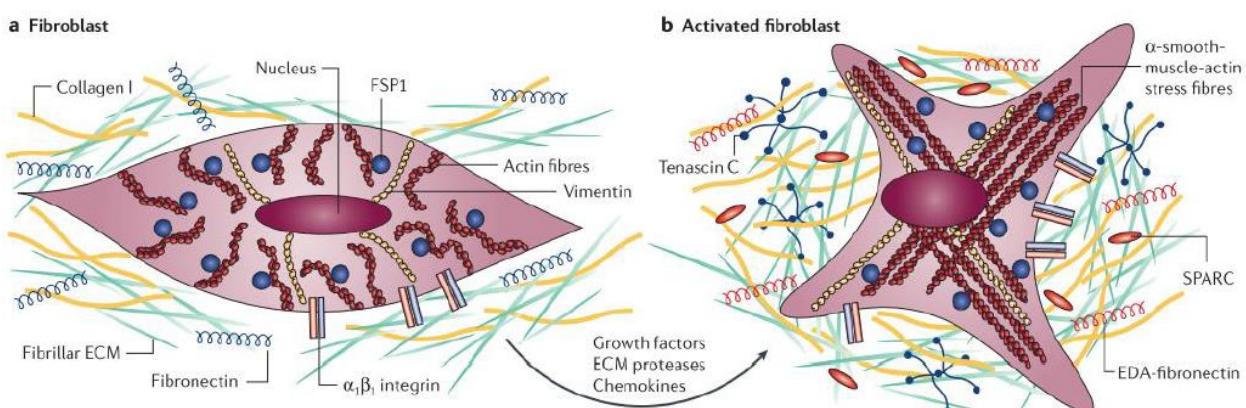


Figure 5 : a/ Fibroblast normal ; b/ Fibroblast activé (CAF) (Kalluri Nature Rev Cancer 2006)

Dans le cadre de cancers, la fonction physiologique des fibroblastes est détournée par les cellules cancéreuses au profit de la croissance tumorale. Les fibroblastes activés associés au cancer sont

appelés « Cancer Associated Fibroblast », les CAF. Ils favorisent la constitution d'une matrice extracellulaire (MEC) protumorale.

5.2. La FAP « *Fibroblast Activation protein* » ou protéine activatrice des fibroblastes

En 1986, le chimiste allemand Wolfgang Rettig a été le premier à décrire la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) en tant qu'antigène de surface cellulaire. (8)

La FAP est une sérine protéase transmembranaire de type II 97 kDa, elle appartient à la famille des propylpeptidases comme notamment la dipeptidyl peptidase IV (DPP4) (9) et qui a une structure très voisine de la FAP. Ces deux protéines ont une activité enzymatique de dipeptidyl peptidase mais « *seule la FAP a une activité enzymatique d'endopeptidase qui est à la base des méthodes de détection spécifiques de la FAP* » et des molécules inhibitrices spécifiques de la FAP, les FAPI. (8)

Il a été démontré qu'elle était presque exclusivement exprimée dans des conditions pathologiques telles que la fibrose, l'arthrite et le cancer (8). Effectivement, même si la FAP a déjà été détectée dans le plasma de personnes non malade et que son rôle physiologique dans le processus de cicatrisation est largement reconnu, il s'agit néanmoins d'une expression à des niveaux basaux très faibles dans ces situations (8). Plusieurs études ont démontré la surexpression de cette protéine dans le microenvironnement tumoral de nombreux cancers et dans des contextes inflammatoires comme un remodelage tissulaire après un infarctus du myocarde par exemple ou lors de pathologies rhumatologiques. (10) (11) (12)

En oncologie, son rôle physio-pathologique dans la progression tumorale est controversée. Néanmoins, même si les raisons biologiques ne sont pas encore clairement identifiées(1) , une méta analyse récente (2019) montre qu'une surexpression de la FAP était associée à des résultats cliniques défavorables et à une progression rapide de la maladie (13) (14) (18). Elle a notamment un rôle dans l'augmentation de la migration des cellules cancéreuses, un rôle immunosuppresseur, elle favorise l'angiogenèse, et peut conférer une résistance aux traitements anticancéreux comme la chimiothérapie et l'immunothérapie (15). Ainsi, la FAP devient un marqueur caractéristique des fibroblastes associés au cancer (CAF) (13) (16).

Pour ces raisons, La protéine FAP se révèle une cible structurale prometteuse pour la conception de nouveaux radiotraceurs.

5.3. Les FAPI et le de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46

Les FAPI « *Fibroblast Activation Protein Inhibitor* » sont des inhibiteurs de la protéine d'activation des fibroblastes, FAP. Les premiers inhibiteurs de la FAP explorés étaient des dérivés de l'acide pyrrolidine-

2 boronique qui avaient une affinité pour les protéines de la famille des dipeptidyl peptidases à laquelle appartient la FAP. Les FAPI basés sur une structure à base de quinoléine ont été plus particulièrement explorés par les équipes de Jiaang et Van Der Veken entre 2010 et 2012 (17). Il a ainsi été démontré que la FAP est ciblée plus sélectivement par les FAPI ayant une structure à base de quinoléine. (N-(4-quinolinoyl) glycyl-(2-cyanopyrrolidine) (18) (Figure 6)

Plusieurs variétés de FAPI à base de quinoléine ont été développées dans le but d'être marquées avec différents radio-isotopes (^{68}Ga , ^{18}F , ^{177}Lu) en vue de leur utilisation clinique (19) (3) (20). Quelques exemples de ces structures sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 7)

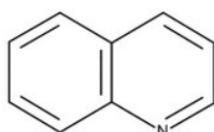


Figure 6 : Structure chimique de quinoléine

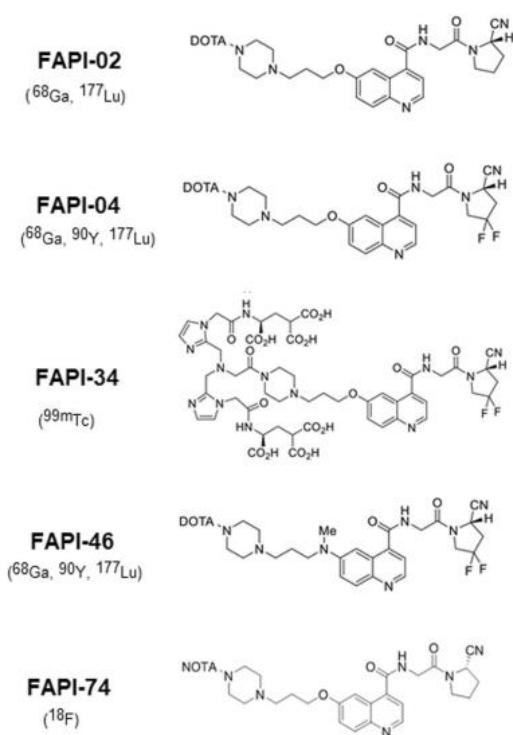


Figure 7 : Structures chimiques des précurseurs de FAPI utilisés dans l'application clinique.

Uwe Haberkorn et al. se sont particulièrement investis dans le développement de FAPI à base de quinoléine destinés au marquage par des isotopes radioactifs (19) (21). Ainsi, à partir de structures initiales, à savoir le FAPI-02 et le FAPI-04 plusieurs modulations de chimie organiques ont été effectuées, donnant naissance à plusieurs dérivés quinoléiques de FAPI pour lesquels la relation structure activité a été optimisée par rapport au FAPI-04. Parmi ceux-là, il a été montré que le FAPI-21 et le FAPI-46 avaient des rapports de captation tumeur/sang, foie, muscle et intestin meilleurs que les autres

structures avec une captation intra tumorale rapide (10 minutes) après l'administration. Cependant, le FAPI-21 présentait une captation plus élevée dans la muqueuse buccale, les glandes salivaires et la thyroïde. (22) (Figure 8)

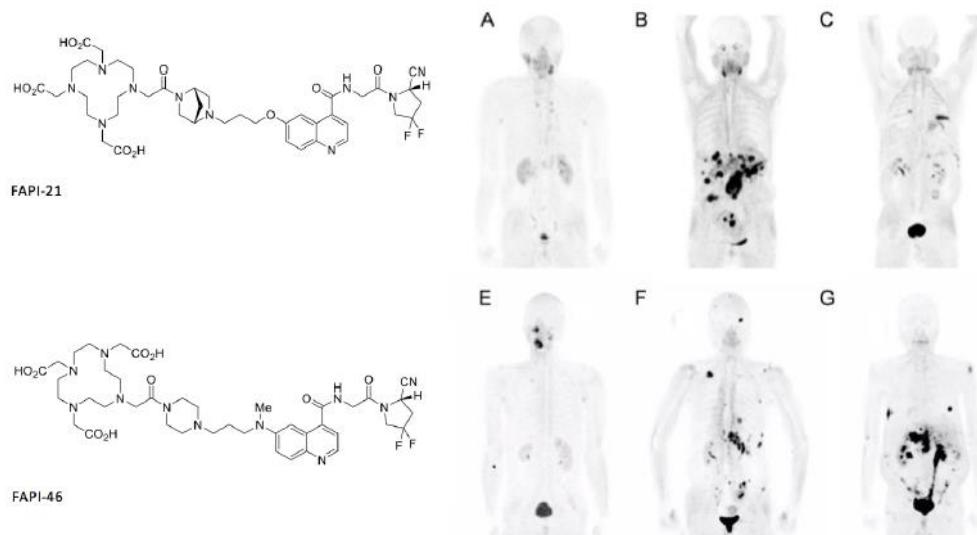


Figure 8 : Images TEP corps entier de tumeurs de patients (A à G) 1h après injection de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -FAPI-21 (A à C) et $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -FAPI-46 (E à G)

Ainsi, les résultats démontrent que parmi les différentes structures illustrées dans la Figure 7, le FAPI-46 se distingue comme la molécule la plus prometteuse, surtout pour une utilisation théranostique. En effet, des examens par TEP/TDM ont déjà permis d'identifier plusieurs cancers avec une captation intra-tumorale significativement élevée du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -FAPI-46, générant ainsi des images à contraste élevé et une accumulation minimale du traceur en dehors de la cible spécifique (23) (24). Le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -FAPI-46 est une structure à base de quinoléine portant le DOTA (chélateur cyclique) de poids moléculaire de 950,9 g/mol. (Figure 9)

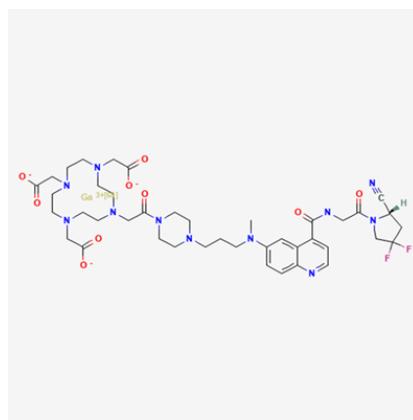


Figure 9 : Structure du FAPI-46 marqué au gallium-68

En 2021, Sharma et al. ont démontré à l'aide d'images en TEP une forte corrélation entre l'expression de la FAP et la captation de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -FAPI-46, ce qui renforce l'intérêt du développement de ce traceur

pour des applications diagnostiques en dehors de l'oncologie, dans des pathologies présentant une surexpression de la FAP (11).

6. Les applications diagnostiques du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI

6.1. En oncologie

Alors qu'elle est faiblement indétectable dans les tissus normaux, la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) est abondamment surexprimée dans de nombreuses tumeurs, incluant jusqu'à 90% des carcinomes (cancers solides).

Cette surexpression de la FAP est particulièrement observée dans le stroma des cancers du sein, du côlon, du pancréas, du poumon, de la vessie, de l'ovaire (1). Le stroma peut constituer jusqu'à 90 % de la masse totale de la tumeur. Par conséquent l'utilisation de l'imagerie TEP ciblant spécifiquement le stroma pourrait potentiellement offrir une sensibilité accrue par rapport à l'imagerie du métabolisme du glucose (^{[18]F}F-FDG) pour la détection de certaines tumeurs (15)(22). La corrélation entre la biosdistribution du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 et l'expression de la FAP mesurée par immunohistochimie dans des échantillons de tumeurs solides (tumeur colororectale, du pancréas, du sein, de l'estomac, de l'œsophage, de l'utérus (21)) a confirmé que le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est un biomarqueur efficace (22).

A titre d'exemple, la Figure 10 montre l'obtention d'images en TEP avec des résultats comparables ou meilleurs avec le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI qu'avec le ^{[18]F}F-FDG dans différents types histologiques de cancers solides (21).

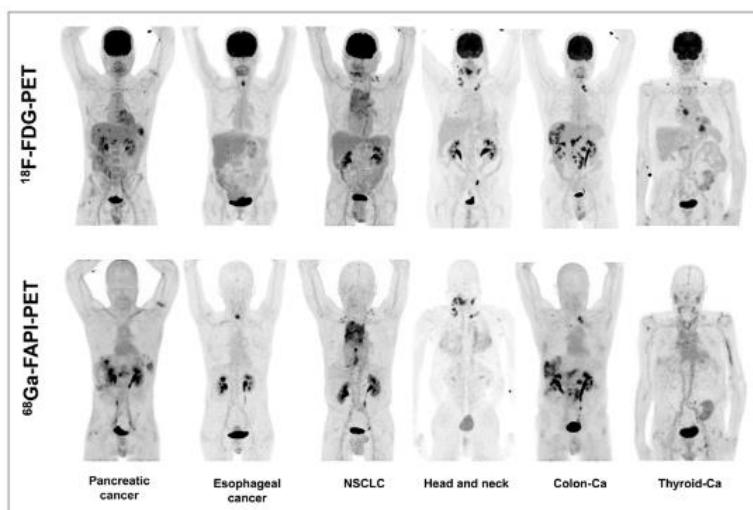


Figure 10 : Comparaison intra-individuelle d'imagerie TEP 1h post-injection de patients injectés en ^{[18]F}F-FDG ou en [⁶⁸Ga]Ga-FAPI (25)

L'imagerie par TEP au [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 par rapport à la TEP au ^{[18]F}F-FDG présente plusieurs avantages non négligeables en routine clinique : En effet, l'imagerie peut être réalisée entre dix minutes et une heure après l'injection avec des contrastes tumeur/bruit de fond égaux voire meilleurs qu'avec

le [¹⁸F]F-FDG. L'examen ne nécessite ni de temps de repos, ni d'être à jeun du fait de son indépendance avec le métabolisme glucidique. De plus, les images obtenues montrent un faible bruit de fond (BDF) dans le foie (23), la muqueuse buccale et le cerveau, ce qui rend l'évaluation tumorale plus précise dans ces territoires. (25)

En outre, à la différence du [¹⁸F]F-FDG, la structure moléculaire du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 intègre le chélateur DOTA, un agent chélateur universel, qui permet le marquage avec des isotopes thérapeutiques tels que le Lutétium 177 (¹⁷⁷Lu) ou l'Yttrium 90 (⁹⁰Y), offrant ainsi une perspective de traitement pour les cancers exprimant la FAP (25).

6.2. Maladies inflammatoires et fibrosantes

D'autres champs d'application du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI ont rapidement été envisagés découlant d'une implication des fibroblastes activés dans les processus de remodelage de la MEC et dans la réparation tissulaire, en dehors des pathologies oncologiques.

Les maladies inflammatoires et fibrosantes regroupent un certain nombre de pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde, Spondyloarthrites, l'entérocolopathies inflammatoires, la pseudopolyarthrite rhizomélique (PPR), le rhumatisme psoriasique, les pneumopathies interstitielles fibrosantes, le lupus systémique, les myopathies inflammatoires, la sarcopathie systémique, la fibrose hépatique, la myélofibrose primitive ou secondaire ect.

Pour beaucoup de ces pathologies, les besoins médicaux sont non satisfaits par les techniques actuelles pour plusieurs raisons :

- Absence d'outil diagnostique validé
- Caractère invasif de certaines techniques : évaluations endoscopiques dans les entérocolopathies, les biopsies ostéo-médullaires dans la myélofibrose.
- Accès limité à des méthodes d'imagerie comme l'IRM (myopathies inflammatoires)
- Limites de performances du TEP scanner au [¹⁸F]F-FDG (sensibilité, spécificité) pour le diagnostic et le suivi de pathologies comme la sarcopathie systémique ou la PPR.

Plusieurs études ont été réalisées et rendent des résultats encourageants concernant l'apport du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 dans l'évaluation de nombreuses pathologies.

L'imagerie au [⁶⁸Ga]Ga-FAPI aurait un intérêt dans certaines maladies fibrosantes pour lesquelles les moyens d'investigations actuels ne permettent pas de correctement différencier les

différentes atteintes tissulaires (fibrotique/inflammatoire) qui peuvent coexister et donc influencer la stratégie thérapeutique.

Par exemple, la maladie à IgG4 est un trouble auto-immun caractérisé par une infiltration par les lymphocytes IgG4 de certains tissus responsables de lésions inflammatoires et la fibrose des organes touchés. Il existe trois phénotypes de cette maladie : inflammatoire, mixte et fibrotique. Une étude a montré que les phénotypes inflammatoires et mixtes étaient associés à une hyperfixation en TEP/TDM au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ alors qu'aucune hyperfixation n'était observée avec le phénotype fibrotique. En revanche, ce dernier était positif en TEP/TDM au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-04}$. Dans cette même étude, il a été montré que la réponse aux traitements anti-inflammatoires n'était que partielle pour les lésions fibrotiques alors qu'elle était importante pour les lésions de type inflammatoires. (26). L'imagerie au FAPI a donc permis de visualiser d'autres types de lésions et donc d'étudier la réponse au traitement.

Dans la fibrose pulmonaire, l'activation prolongée des fibroblastes pulmonaires et le développement de la matrice extracellulaire est néfaste. L'imagerie TEP avec du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-04}$ a montré des résultats intéressants dans la détection de la FAP et donc dans l'évaluation de l'activité pro-fibrotique facilitant le diagnostic précoce des maladies pulmonaires interstitielles. (27) (23)

Le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-04}$ a aussi montré son intérêt pour la surveillance de l'activité des fibroblastes cardiaques dans le cadre de fibrose myocardique qui est un facteur de mauvais pronostique dans la sclérose systémique (28).

L'imagerie TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ présente aussi des intérêts dans les maladies inflammatoires. Elle peut permettre l'étude de la progression d'une maladie et l'évaluation d'une réponse à un traitement. Par exemple, le rhumatisme psoriasique est une des pathologies pour laquelle des données concernant le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ ont été communiquées : ces résultats montrent une corrélation entre l'accumulation du radiotraceur, les marqueurs d'activité et la progression de la pathologie.

Une autre étude démontre une perspective prometteuse de l'utilisation de la TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ dans l'évaluation de la maladie de Crohn dont les résultats corrélaien avec les biomarqueurs endoscopiques et la clinique de cette maladie (29).

Pour finir, d'autres études sur l'imagerie en TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ ont permis de décrire le modèle d'expression spécifique de la FAP , ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. C'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde réfractaire où il a été mis en évidence une forte expression de la FAP par les synoviocytes de types fibroblastiques établissant ainsi un lien avec la destruction massive de l'os des articulations atteintes. Cette expression spécifique de la FAP dans ces tissus offre une perspective thérapeutique en ciblant les synoviocytes de type fibroblastiques responsables, en partie, de la destruction de l'os (30).

PARTIE 2 : Production du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 au sein de la radiopharmacie de Brest

1. Contexte et objectifs

Ce travail a été initié dans le cadre de la mise en place d'une étude pilote monocentrique, descriptive et analytique dont l'objectif général est de déterminer l'intérêt préliminaire de la TEP au [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 dans différentes maladies inflammatoires chroniques et/ou fibrosantes.

Dans ce contexte, le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 constitue un médicament expérimental nécessitant la rédaction d'un DME.

Pour des raisons de radioprotection et de reproductibilité, nous avons fait le choix de produire le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 expérimental via un procédé automatisé.

Plusieurs mises au point de synthèses automatisées ont été décrites dans la littérature:

Le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 a été synthétisé pour la première fois de manière automatisée par l'équipe de Spreckelmeyer en 2020 sur les modules Modular Lab Pharm Tracer et Modular Lab eazy (14). En 2021, l'étude de Chiara Da Pieve et al. présente la production automatisée sur la plateforme de synthèse à cassette, Trasis AllinOne (AiO) (31). En 2022, Alfteimi et al. ont validé la production automatisée de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 sans pré-purification de l'éluat de gallium préalable sur trois modules de synthèses : Easy One de Trasis; GaSy de chez Synthra; GallElut de chez Scintomics et deux générateurs différents : GalliaPharm® (Eckert et Ziegler) et un générateur iTemba®(3).

Les différents paramètres de synthèse décrits dans la littérature sont résumés dans le Tableau 3.

L'objectif principal de ce travail était la mise au point de la synthèse automatisée du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 conformément aux BPP au sein de la radiopharmacie du service de médecine nucléaire brestois ainsi que la mise au point et la validation des méthodes de contrôles qualité du produit fini. Ce développement a été basé sur le procédé décrit par Trasis®.

Par ailleurs, afin de garantir un rendement de synthèse optimal, une attention particulière a été portée à l'étape de filtration stérilisante qui s'est révélée être un point clé.

| | Spreckelmeyer et al. 2020 | Da Pieve al. 2022 | Alfteimi et al. 2022 | Nader et al. 2022 | Phlak et al. 2023 |
|-------------------------------------|--|--------------------------|---|---------------------|---------------------------|
| Générateur | GalliaPharm® | Galliad® | GalliaPharm® IThemba® | GalliaPhar ® | Galliad ® |
| Modules | Lab Pharm Tracer Lab eazy | All in One (AiO, Trasis) | Easyone (Trasis) Gasymodule (Synthra) GallElut (Scintomics) | Easyone (Trasis) | GRP module (Scintomics) |
| Pré- purification | Oui | Oui | Non | Non | Oui |
| Purification du produit | | Oasis HLB + SepPak QMA | Oasis HLB+ | Oasis HLB | Sep Pak C18 |
| Tampon | Acétate de sodium | Acétate de sodium | Acétate (Trasis) ou HEPES | | HEPES |
| Milieu réactionnel | 0,3 mg ascorbate de sodium Pas d'EtOH | 1mg ascorbate de sodium | 0,3 mg ascorbate de sodium | Ascorbate de sodium | |
| T°C et tps de marquage | 95°C 10min (Pharm Tracer) 98°C 10min (Lab eazy) | 95°C 10 min | 90°C 4 min | 95°C 20min | 125°C 6min |
| Rdt% | 96 | 66 ±7,6 | 92,8 ±0,5 | 81 ± 5 | 72,6±4,9 |
| PRC% | CCM : 99,9 HPLC : 99,7 | >98 | 99,5 (92,5 sans acide ascorbique) | >99 | CCM : 99,8 HPLC : 97,6 |
| Tps de synthèse approximatif | NA | 35 min | NA | 35min | 38 min |

Tableau 3 : Exemples de synthèses de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 décrites dans la littérature.

2. Matériels et méthodes

2.1. Locaux et isolateurs de haute énergie

Les synthèses du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 sont réalisées dans un isolateur haute énergie en dépression (-150 Pascal) (Lemer Pax Pb 50) situé dans le laboratoire chaud qualifié microbiologiquement en classe D. L'isolateur est qualifié microbiologiquement en classe A et est équipé d'un sas de transfert qualifié en classe B.

Les contrôles des activités sont effectués à l'aide de l'activimètre CRC 55t étalonné pour le ⁶⁸Ga. Les contrôles qualités sur le produit fini sont réalisés dans le laboratoire de contrôle distinct mais situé à proximité du laboratoire de préparation.

2.2. Réactifs

La seringue d'acétate de sodium 0,7M, le flacon de 10 ml d'éthanol absolu, la NaCl 0,9% (flasque de 50 ml) et l'ascorbat de sodium sont fournis prêts à être utilisés par Trasis (Ans, Belgique). Les flacons à usage unique contenant 50 µg du peptide FAPI-46 ainsi que la référence standard [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 sont fournis par SOFIE Bioscience (Dulles, VA, USA).

L'éluat de ⁶⁸GaCl₃ utilisé pour la préparation est obtenu par élution d'un générateur GalliaPharm® de 1850 MBq à calibration (AMM n°34009 550 052 4 7) (fabriqué par Eckert & Ziegler(Allemagne)) et commercialisé en France par le laboratoire Cyclopharma (Curium). Le ⁶⁸Ga est élué avec 5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) stérile ultrapur 0,1 mol/L Eckert & Ziegler.

2.3. Synthèse

Le processus de production du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est entièrement automatisé de l'élution jusqu'à l'obtention du produit final après une filtration stérilisante. Cette automatisation est rendue possible grâce à l'utilisation du synthétiseur MiniAIO® (All in One) fabriqué par Trasis (Belgique) (cf.Figure 11)



Figure 11 : Module de synthèse MiniAIO® (Trasis, Belgique)

Les cassettes à usage unique (Trasis, Ans, Belgique) sont pré-montées lors de la réception et comprennent deux rampes avec six robinets trois voies, un flacon de réaction, une seringue de 10 ml, des emplacements permettant l'adaptation de flacons ainsi qu'une cartouche d'extraction en phase solide (Figure 12). Une nouvelle cassette est mise en place à chaque synthèse et un test vérifiant sa bonne installation (absence de fuite entre autre) est effectué avant l'ajout des réactifs.

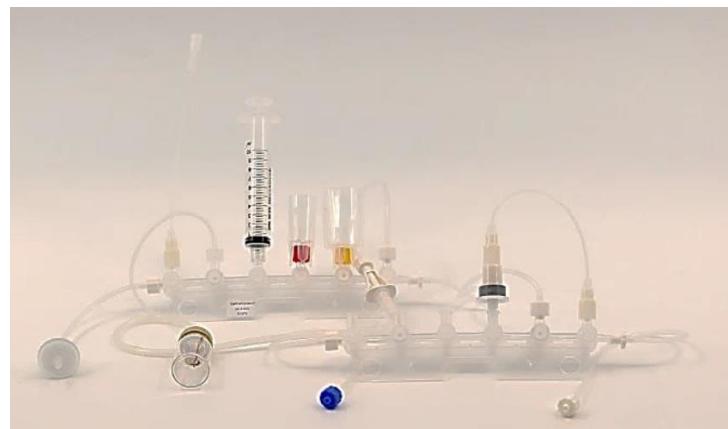


Figure 12 : Cassette à usage unique pour la synthèse du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 (Trasis, Belgique)

Le MiniAio est piloté par le logiciel TRASIS Supervision.

Avant de commencer le processus de radiomarquage, l'automate procède à la vérification de plusieurs paramètres attestant de son bon fonctionnement. Les points vérifiés sont : la pompe à vide, le système de re-pressurisation du vide, le circuit d'air de la bouteille à déchets, l'état des vannes rotatives, des actionneurs de la seringue, des capteurs de radioactivité et celui des radiateurs.

Avant de débuter la synthèse, l'ascorbat de sodium est solubilisé dans la poche de NaCl 0,9% (Figure 13)

Le flacon de FAPI-46 préalablement reconstitué avec 1 ml de la solution d'acétate de sodium est placé en position 4 (A) de la cassette (Figure 14). Le flacon d'éthanol est positionné en 5 (B) et la poche contenant la solution d'ascorbat de sodium en 6 (C) (Figure 14).

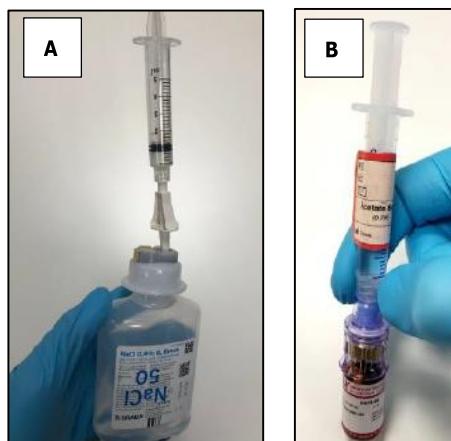


Figure 13 : Reconstitutions préalables **A/** Ascorbate de sodium avec NaCl 0,9% **B/** FAPI-46 et acétate de sodium.

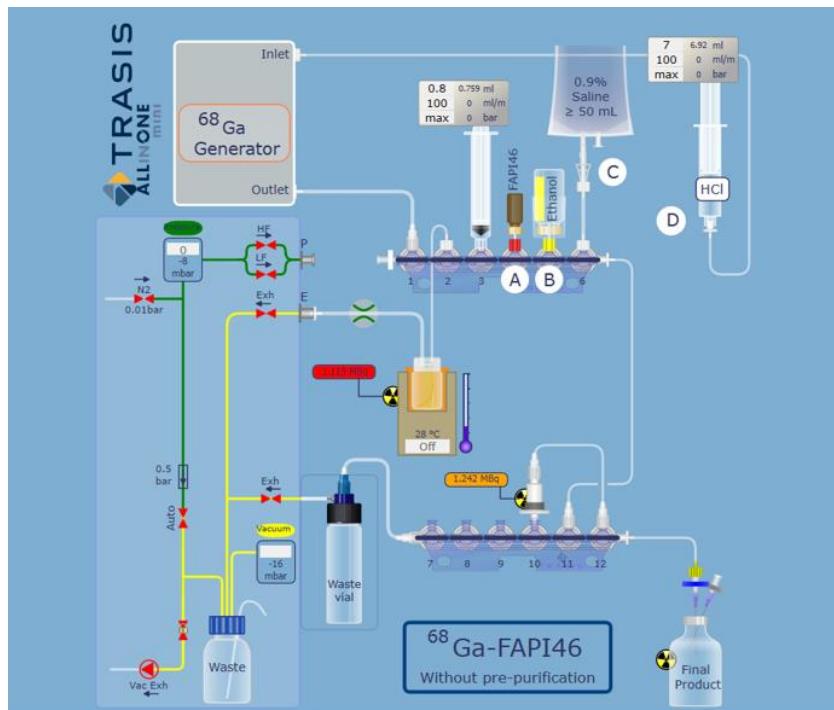


Figure 14 : Schéma du montage de synthèse du $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 avec le module MiniAiO (TRASIS)

Une fois les contrôles préliminaires à la synthèse réalisés, le FAPI-46 reconstitué est transféré dans le flacon réacteur et dilué avec 0,6 ml de la solution d'ascorbat de sodium. Le générateur de $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ est alors élué avec 5 ml d'HCl 0,1 mol/L directement dans le flacon réacteur. Le milieu réactionnel de 6,6 ml est ensuite chauffé à 95°C pendant 10 min.

Ensuite le contenu du réacteur est transféré sur la cartouche d'extraction en phase solide. Le flacon réacteur est rincé par 5 mL du mélange ascorbate de sodium/NaCl également transféré sur la cartouche de purification qui est ensuite rinçée par le passage de 3 ml de NaCl/ascorbat de sodium. Le produit est décroché de la cartouche par 0,8 ml d'éthanol et est délivré, après filtration stérilisante grâce à un filtre (Filtre Millex®-GS 0,22 µm, Millipore, Merck), dans le flacon de produit fini. La formulation finale est obtenue après l'ajout de 10 ml de solution d'acide ascorbique/NaCl. Le volume du produit fini est de 10 ± 1 ml.

2.4. Filtration stérilisante

Pour l'étape de filtration stérilisante, deux filtres présentant des caractéristiques différentes de celui utilisé initialement ont été testés: Le nom et les caractéristiques des filtres sont résumés dans le tableau 4 ci-dessous :

| Filtres | Référence | Caractéristiques de la membrane |
|---------|---|---|
| 1 | Filtre Millex®-GS 0,22µm (Millipore, Merck) | Hydrophile, esters de cellulose |
| 2 | Filtre à seringue 0,22 µm (PALL Medical) | Hydrophile, Polyéthersulfone |
| 3 | Filtre Millex®-GV 0,22µm (Millipore, Merck) | Hydrophile, Polyfluorure de vinylidène (PVDF) |

Tableau 4 : Références et caractéristiques des filtres stérilisants testés.

A la fin de chaque synthèse et avant le rinçage de la cassette, le filtre est retiré du montage et placé dans l'activimètre afin de connaître l'activité (en MBq) retenue sur la membrane. Les activités mesurées sur les filtres sont corrigés de la décroissance en prenant l'heure de mesure du produit fini comme référence. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage d'activité retenue sur le filtre par rapport à l'activité disponible pour la synthèse (=activité de l'éluat).

2.5. Validation du procédé de synthèse

La validation de la procédure de synthèse a été réalisée en évaluant la fiabilité et la reproductibilité du procédé, suivie de contrôles qualité sur le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 (développé dans la partie 2.6)

Pour évaluer la fiabilité et la reproductibilité, la synthèse automatisée du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 a été réalisée trois fois en suivant le procédé décrit en 2.3.

Pour les 3 lots, les paramètres évalués sont :

- L'activité du produit fini (MBq)
- Le rendement de synthèse
- Les résultats des contrôles qualités

Le calcul du rendement de synthèse est basé sur le rapport entre la quantité de radioactivité présente dans le produit fini et celle présente dans l'éluat de gallium au début de la synthèse. L'heure de référence choisie est celle de mesure du produit fini (PF)

$$R \text{ synthèse } (\%) = [A \text{ (MBq) PF} / A \text{ (MBq) Eluat}] \times 100$$

Afin d'évaluer l'interaction des différents composants de la cassette avec le procédé de synthèse, le flacon à déchets, le filtre stérilisant, le filtrat et la cartouche de purification sont mesurés avec l'activimètre de l'enceinte gallium à la fin de chaque synthèse, et avant le rinçage de la cassette. Le flacon à déchets est aussi mesuré après le rinçage de la cassette. De la même façon que précédemment, les activités (MBq) de ces composants sont corrigées de la décroissance en prenant l'heure de mesure du produit fini comme heure de référence.

Ces contrôles ont été réalisés sur 3 synthèses effectuées avec le filtre Millex-GS pour l'étape de filtration stérilisante puis sur 3 synthèses réalisées avec le filtre donnant les meilleurs rendements de synthèse.

Lors d'une des synthèses de mise au point, une vérification expérimentale du pH du milieu réactionnel a été effectuée par prélèvement de celui-ci. La mesure du pH est effectuée à l'aide de bandelettes indicatrices de pH (pH de 1 à 10, papier universel, Merck®).

2.6. Contrôles qualité

2.6.1. Intégrité du filtre

Le test d'intégrité du filtre est intégré dans la séquence de synthèse et est exécutée à la fin de chaque production, après la filtration stérilisante du produit.

5 ml du mélange NaCl/ascorbat de sodium sont passés à travers le filtre puis une pression de 2,5 bars d'air est appliquée sur le filtre à l'aide d'un des pousses seringues du module de synthèse.

Si l'air ne passe pas, le filtre est considéré comme intègre. Un message de succès ou non-succès du test apparaît sur le logiciel MiniAiO Supervision.

2.6.2. Activité du produit fini

L'activité finale présente dans le flacon du produit fini est déterminée à l'aide d'un activimètre Capintec CRC 55t étalonné pour le gallium 68.

L'activité doit être comprise entre 3,7 et 1850 MBq/ml (Spécifications TRASIS)

2.6.3. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques sont contrôlés par évaluation visuelle de la solution. Elle doit être limpide et incolore ou légèrement jaunâtre.

2.6.4. pH

Le contrôle du pH a été réalisé en déposant 7 µl de produit fini sur des bandelettes indicatrices de pH (pH de 1 à 10, papier universel, Merck®). Le pH attendu est compris entre 4 et 7 (Spécifications TRASIS).

2.6.5. Identification radionucléidique

a) Par spectrométrie

L'identification radionucléidique est réalisée sur les trois lots de validation par spectrométrie gamma conformément à la Pharmacopée Européenne en utilisant un spectromètre gamma équipé d'une sonde NaI(Tl) 3 pouces (Canberra®).

Les pics attendus sur le spectre correspondent aux photons principaux à 511 keV.

b) Par détermination de la demi-vie

Pour calculer la demi-vie, environ 0,1 ml du produit fini sont introduits dans un flacon en verre pour HPLC et l'échantillon est mesuré trois fois à l'activimètre à des intervalles d'au moins 15 minutes. La demi-vie est calculée à partir des trois valeurs d'activités obtenues.

La demi-vie doit se situer entre 62 et 74 minutes (Monographie 2464 de la Monographie Européenne)

2.6.6. Pureté radiochimique par Chromatographie sur couche mince (CCM)

Le contrôle de la pureté radiochimique (PRC) sur couche mince est réalisé sur des bandes gel de silice (ITLC-SG) avec comme phase mobile un mélange d'acétate d'ammonium 1M et de méthanol (50:50 v/v). Le dépôt de 7 μ l de la solution finale de [^{68}Ga]Ga-FAPI-46 migre sur 9 cm. La lecture des bandes chromatographiques est ensuite effectuée grâce à un radiochromatographe (MiniGITA®) relié au logiciel Raytest® permettant l'intégration des radiochromatogrammes obtenus après 1 minute d'acquisition. Le pourcentage de chaque fraction est déterminé par rapport à l'activité totale présente sur le radiochromatogramme :

- ^{68}Ga libre
- ^{68}Ga Colloïdal : Pour obtenir des colloïdes, quelques microlitres de soude (solution basique) ont été ajoutés à un échantillon d'éluât de ^{68}Ga (pH acide) jusqu'à l'obtention d'une solution de pH = 7
- [^{68}Ga]Ga-FAPI-46

Le R_f est défini par le rapport entre la distance parcourue par le composant (D_c) à analyser et la distance parcourue par le solvant (D_s) depuis le point de dépôt.

$$R_f = D_c/D_s$$

La pureté radiochimique doit être >93% avec moins de 7% d'impuretés radioactives (Spécifications TRASIS).

2.6.7. Pureté radiochimique et identification par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Les analyses en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été réalisées sur une chaîne HPLC Alliance 2695 (Waters®) couplée à un détecteur UV/Visible 2489 (Waters®) et à un détecteur de radioactivité LB500 fLumo (Berthold®). La phase stationnaire est une colonne en phase inverse C18 4,6 x 50 mm, de diamètre 3,5 μm (Waters Bridge®). La phase mobile utilisée est un gradient des solvants A (H_2O contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique) et B (Acetonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique). Le flux est de 0,1 ml/min et la température de la colonne de 30°C.

L'équipement est relié au logiciel Empower® permettant l'analyse des spectres obtenus.

La mise au point et la validation de la méthode ont été réalisées à partir des échantillons suivants:

- 10 µL d'éluat de $^{68}\text{GaCl}_3$
- 20 µL de la référence froide [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]Ga-FAPI-46 diluée dans du NaCl (100 µg/ ml)
- 5 µl de matrice composée de NaCl 0,9%, acide ascorbique, éthanol
- 20 µl de NaCl

La validation de la méthode a été effectuée en évaluant les paramètres suivants d'après les recommandations du Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH) :

- **La spécificité**

La spécificité a été déterminée suite à 7 injections répétées de la référence non radioactive [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]Ga-FAPI-46. Une moyenne des temps de rétention (Tr_{moy}) a été calculée à partir des valeurs des tr obtenues. Une marge de tolérance de $\pm 5\%$ est calculée. Le coefficient de variation (CV%) est déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$CV(\%) = s/m \times 100.$$

avec s = l'écart type et m = la moyenne des tr

- **La précision**

La précision a été évaluée en prenant en compte la répétabilité et la précision interne de la méthode.

Pour la répétabilité, 3 lots différents de [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]Ga-FAPI-46 à la concentration cible de 5µg/ ml ont été analysés en HPLC, sur 3 jours différents. Pour chaque lot, 6 mesures de l'échantillon sont effectuées. Le coefficient de variation (CV%) est déterminé à partir des aires des pics chromatographiques.

Pour la précision interne, trois séries de cinq échantillons de [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]Ga-FAPI-46 de même concentration (5µg/ ml) sont analysées sur 3 jours différents. Une analyse de la variance (ANOVA) est utilisée pour déterminer la valeur de Fischer (F).

- **La linéarité**

Pour cela, une gamme étalon de sept concentrations de [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]Ga-FAPI-46 allant de 4 µg/ ml à 7µg/ ml est réalisée correspondant à des valeurs allant de 80 à 130% de la concentration analysée (5µg/ ml).

Ces sept échantillons sont préparés et analysés sur 3 jours différents.

| Pourcentage de la concentration cible (%) | Concentration de la solution de FAPI-46 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|---|---|
| 80 | 4 |
| 90 | 4.5 |
| 100 | 5 |
| 110 | 5.5 |
| 120 | 6 |
| 130 | 6.5 |
| 140 | 7 |

Tableau 5 : Gamme étalon de [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 pour la linéarité.

Chaque échantillon est injecté 3 fois en HPLC et une moyenne des aires sous les courbes des pics chromatographiques obtenus pour chacun des points de gamme est calculée.

La méthode statistique utilisée est la régression des moindres carrés.

L'équation de la droite de type $y = ax + b$ est déterminée où :

a = la pente de la droite

b = l'ordonnée à l'origine

y = l'aire sous la courbe en mAU.s

x = la concentration en [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 $\mu\text{g}/\text{ml}$

De là, le coefficient de corrélation (R^2) est calculé, il doit être supérieur ou égal à 0,99.

Limite de détection (LDD) et de quantification (LDQ)

Les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) sont calculées à partir de la droite d'étalonnage obtenue pour la validation de la linéarité de la méthode.

- Pour la LDD, la formule suivante est appliquée : $LDD = (3,3 \times S) / a$
- Pour la LDQ, la formule appliquée est : $LDQ = (10 \times S) / a$

où a = pente de la droite de régression

et S = écart type

2.6.8. Endotoxines

Le dosage des endotoxines bactériennes est réalisé par méthode de colorimétrie cinétique grâce à l'appareil Endosafe®-MCS, Charles River's® dans lequel est inséré une cartouche Charles River's® pré-remplie en pro-enzyme et substrat synthétique. Les cartouches sont à usage unique et contiennent chacune 4 trous dont 2 surchargés en endotoxines (témoins positifs).

La solution de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est diluée au 1/100^{ème} avec du NaCl 0,9%. Puis 25 μL de la solution diluée sont introduits dans chaque trou de la cartouche.

Le taux d'endotoxines a été calculé à partir de la limite imposée dans la monographie 2614 de la Pharmacopée Européenne qui est de 175/V (UI/ ml) (V est le volume dispensé qui est au maximum de 10,1 ml (Volume produit fini)) avec un maximum par administration de 2,5g.

2.6.9. Stérilité

Le contrôle de stérilité du produit fini est sous-traité au service d'hygiène hospitalière du CHU de Brest. Le contrôle est effectué selon la monographie 20601 de la Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition. La stérilité de la solution de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est testée en inoculant 1 ml de la solution de produit fini dans 10 ml de bouillon thioglycolate d'une part et dans 10 ml de bouillon trypticase soja d'autre part, respectivement incubés 14j à 30°C et 14j à 22°C. Les échantillons sont stériles si aucune croissance microbienne n'est observée après les 14 jours d'incubation.

2.6.10. Teneur finale en éthanol

La mesure de la teneur finale en éthanol des produits finis de 3 lots de validation est réalisée par le laboratoire de biochimie du CHU de Brest. La technique utilisée est la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Elle doit être inférieure à 10% (v/v) pour que le produit fini puisse être injecté à l'homme (Monographie 2482 de la Pharmacopée Européenne).

2.6.11. Stabilité

Du fait de la faible demi-vie du ⁶⁸Ga (67,71min), la stabilité du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 n'a été étudiée que jusqu'à 3 heures après la production. Pour la valider, les contrôles de pH et de PRC en CCM et HPLC ont été réalisés aux temps T0 et T+3h sur les 3 lots de validation. Entre les contrôles, les solutions sont conservées à 25°C.

3. Résultats

3.1. Mise au point de la synthèse (avec le filtre Millex®-GS 0,22µm, Millipore, Merck)

Trois synthèses ont été effectuées avec le filtre Millex®-GS 0,22 µm (n°1). Le temps de synthèse était de 23 minutes (test d'intégrité non compris).

Les résultats obtenus sont résumés ci-après (Tableau 6)

| N° de synthèse de mise au point | Rendement de synthèse (%) | % activité restée sur le filtre/ Eluat | PRC (%) | |
|------------------------------------|------------------------------|---|-------------|-------------|
| | | | HPLC | CCM |
| 1 | 67,2 | 20,7 | 99,7 | 96,6 |
| 2 | 64,9 | 20,4 | 99,6 | 97,4 |
| 3 | 63,4 | 18,3 | 99,5 | 96,5 |
| Moyenne | 65,2 | 19,8 | 99,7 | 97,0 |

Tableau 6 : Résultats de synthèse avec le filtre Millex®-GS 0,22 µm (n°1)

Le rendement moyen obtenu est de 65,2% avec en moyenne 19,8% d'activité retenue sur le filtre. Les puretés radiochimiques moyennes obtenues par HPLC et CCM sont respectivement de 99,7% et 97,0%.

Concernant le contrôle du pH du milieu réactionnel en cours de synthèse: le pH obtenu est de 4,5.

3.2. Optimisation de l'étape de filtration stérilisante

Les résultats des synthèses obtenus avec le filtre n°1 et les deux nouveaux filtres testés (n°2 et 3) sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

| Filtre testé | N°1 : Millex-GS 0,22µm | N°2 : Pall Medical 0,22µm/25 mm | N°3 : Millex-GV 0,22µm/33mm |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---|
| Caractéristiques de la membrane | Hydrophile, esters de cellulose | Hydrophile, polyéthersulfone | Hydrophile, polyfluorure de vinylidène (PVDF) |
| N° lot générateur | GPGE30 | GPGE30 | AQGE28 |
| Activité eluat (MBq)* | 488,8 | 387,2 | 622,4 |
| Activité du produit fini (MBq) | 310 | 334 | 531 |
| Rendement de synthèse (%) | 63,4 | 86,3 | 85,3 |
| %A(MBq) filtre/Eluat | 18,3 | 2,9 | 1,0 |
| Référence fournisseur | SLGSV255F | 6764192 | SLGV033RS |
| Prix unitaire | | 2,26 € | 1,775 € (UGAP) |

*toutes les activités sont ramenées à l'heure de référence qui est l'heure de mesure du produit fini

Tableau 7 : Résultats des synthèses test des filtres stérilisants.

Les rendements de synthèse montrent une nette amélioration avec les filtres Pall Medical et Millex-GV par rapport au filtre Millex-GS (86,3 et 85,3% avec les filtres 2 et 3 versus 63,4%). Les résultats obtenus avec les 2 nouveaux filtres étant sensiblement identiques, le critère de choix s'est porté sur le coût et la disponibilité du filtre. Le filtre n°3 a ainsi été retenu pour le procédé de synthèse.

3.3. Validation du procédé de synthèse avec filtration stérilisante optimisée

Après l'optimisation de la filtration stérilisante, la moyenne des rendements de synthèse corrigée de la décroissance est de $86,9 \pm 0,8\%$ (Tableau 8). La moyenne du pourcentage d'activité retenue sur le filtre est de $1,2 \pm 0,5\%$ (Tableau 9).

| N° de synthèse | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------|------|------|------|
| Activité du produit fini (MBq) | 439 | 452 | 526 |
| Rendement synthèse (%) | 87,0 | 86,0 | 87,7 |

Tableau 8 : Résultats des 3 synthèses de validation avec le filtre Millex-GV 0,22 µm (n°3)

Les résultats des mesures de la radioactivité restante sur les différents éléments de la cassette et le flacon déchet sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

| N° de synthèse | % radioactivité restant | | |
|----------------------------------|-------------------------------|-----|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Flacon déchets | Avant rinçage cassette | 6,8 | 8,4 |
| | Après rinçage cassette | 9,2 | 10,7 |
| Filtrat | 0 | 0 | 0 |
| Cartouche de purification | 3,4 | 3,3 | 3,1 |
| Filtre stérilisant | 1,2 | 1,6 | 0,6 |

Tableau 9 : Radioactivité restante (%) à la fin de la synthèse.

3.4. Mise au point de la méthode CCM

Les impuretés possiblement présentes dans le $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ sont le gallium-68 colloïdal et le gallium 68 libre. D'après les résultats obtenus, ces impuretés ne migrent pas dans le mélange d'acétate d'ammonium 1M / méthanol (50:50 v/v) sur un support ITLC et restent au point de dépôt avec des Rf compris entre 0,1-0,4/0,5.

Les radiochromatogrammes obtenus avec le ^{68}Ga libre et le ^{68}Ga colloïdal sont respectivement représentés sur les figures 15 et 16.

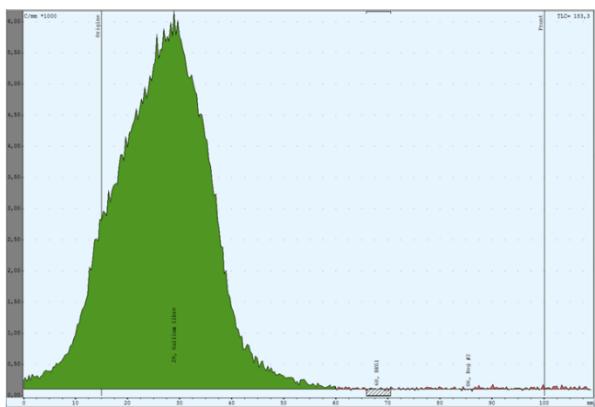


Figure 15 : CCM du ^{68}Ga libre. La région verte est la radioactivité relative au ^{68}Ga libre

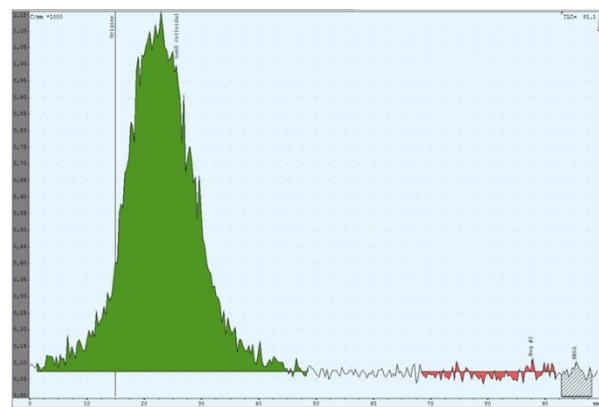


Figure 16 : CCM du ^{68}Ga Colloïdal. La région verte est la radioactivité relative au ^{68}Ga -colloidal

Le $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 migre dans le mélange d'acétate d'ammonium 1M et de méthanol (50:50 v/v) et les rapports frontaux obtenus sont compris entre 0,4-1. (figure 17)

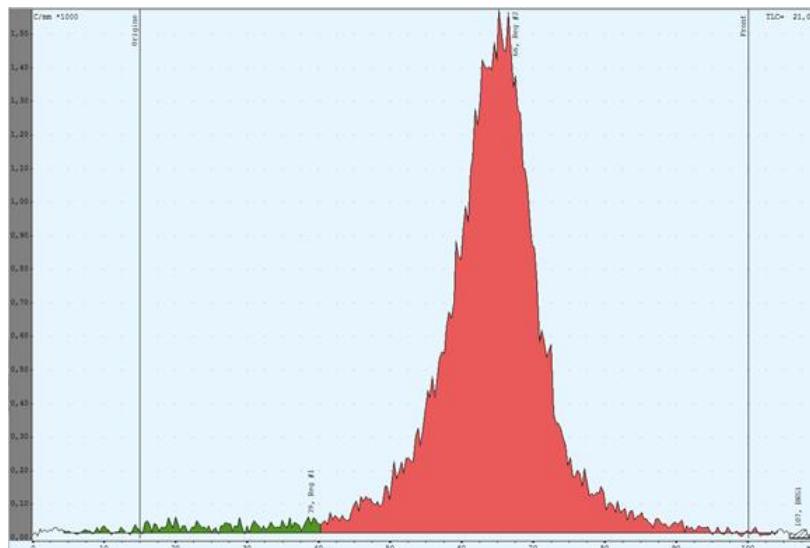


Figure 17 : CCM du $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46.

3.5. Mise au point et validation de la méthode HPLC

Le gradient des solvants A et B pour l'analyse HPLC est décrit dans le tableau 10. La durée de la séquence d'analyse est de 12 minutes.

| Programmed Flow | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------|----------|-------|-------------------------|-----|-----|-------|
| Accelerate to 10.0 mL/min in: | | | | | | | |
| | Pump Mode | Gradient | 1.00 | min (10.00 mL/min/min) | | | |
| # | Time | Flow | %A | %B | %C | %D | Curve |
| 1 | | 1.00 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | |
| 2 | 8.00 | 1.00 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 3 | 9.00 | 1.00 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 4 | 12.00 | 1.00 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |

Tableau 10 : Gradient d'analyse avec % des solvants A ($\text{H}_2\text{O}+\text{TFA}$) et B (Acétonitrile + TFA)

Le radiochromatogramme figure 18 montre que le tr du gallium libre est de 0,824 minute.

En détection UV, Le chromatogramme représenté figure 19 révèle un pic d'ascorbate de sodium à un tr≈1minute. Et la figure 20 montre que le tr du $[^{nat}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 est de 3,06 minutes.

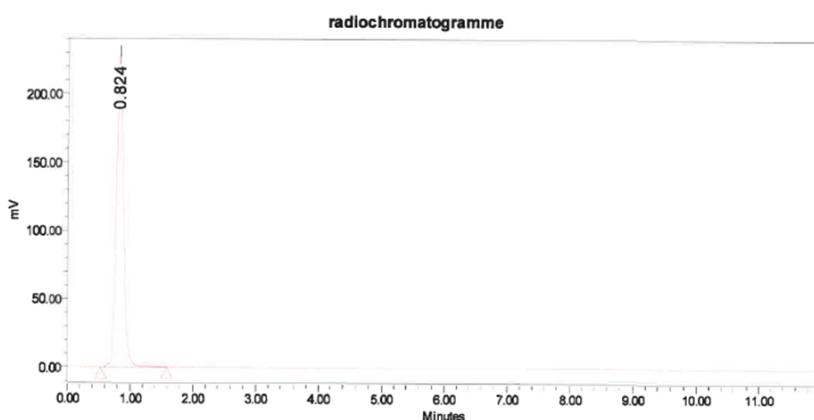


Figure 18 : Profil radiochromatographique du ^{68}Ga libre en HPLC.

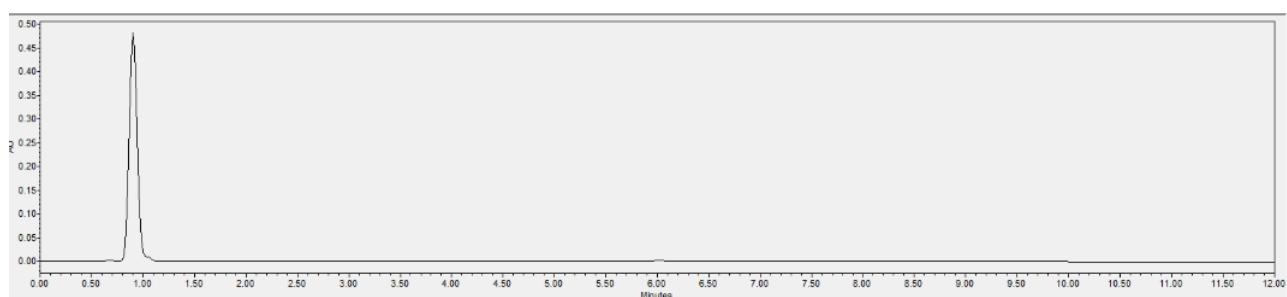


Figure 19 : Chromatogramme UV en HPLC / injection de 5 μL de matrice.

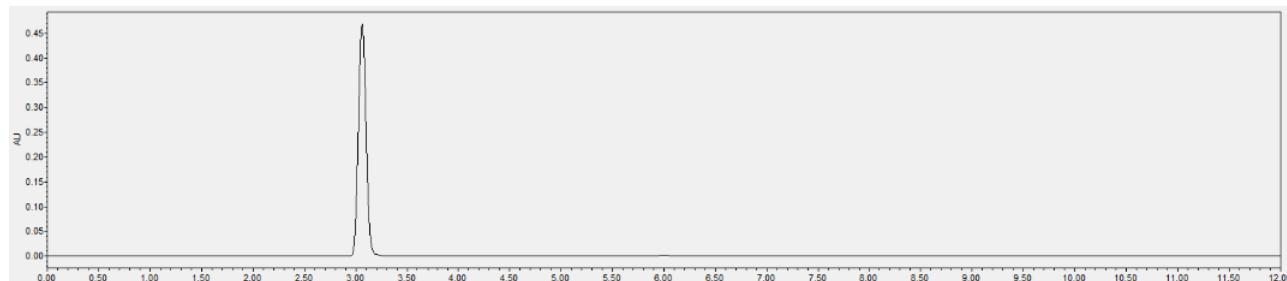


Figure 20 : Chromatogramme UV en HPLC / injection 20 μL de $[^{nat}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

• Spécificité

Le Tr moyen de la référence froide $[^{nat}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 est de 3,091 min avec un coefficient de variation de 0,6%.

Avec une marge de tolérance de 5%, le temps de rétention du ^{68}Ga Ga-FAPI-46 est de $3,091 \pm 0,15$ min.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 11)

| Tr moyen (min) du [^{nat} Ga]Ga-FAPI-46 | Coefficient de variation (CV%) | Intervalle +/-5% |
|--|--------------------------------|----------------------|
| 3,091 min | 0,6% | [2,937min -3,246min] |

Tableau 11 : Résultats de spécificité de la méthode HPLC.

• Précision

Répétabilité

Le tableau 12 regroupe les valeurs des aires des pics chromatographiques obtenues avec la référence froide [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46. Le coefficient de variation obtenu à partir de ces valeurs est de 1,4%.

| Jour d'analyse | N°1 | N°2 | N°3 |
|----------------|--------|--------|--------|
| AUC (mAU.s) | 162985 | 171426 | 171029 |
| | 173356 | 171843 | 171248 |
| | 172719 | 172672 | 171150 |
| | 172935 | 170798 | 170547 |
| | 172593 | 170628 | 170413 |
| | 166854 | 170539 | 169830 |

Tableau 12 : Valeurs des AUC (mAU.s) du [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 pour la répétabilité.

Précision interne

Les résultats de l'analyse de variance ANOVA sont les suivants : Le F calculé noté F_{calc} est de 0,27 et le F_{Table} est de 3,68. On obtient un $F_{\text{calc}} < F_{\text{Table}}$.

Les résultats obtenus ne sont donc pas significativement différents au risque $\alpha=5\%$

• Linéarité

Pour les trois jours d'analyse, les valeurs des aires des pics obtenus (AUC en *mAU.s*) sont résumées dans le (Tableau 13)

| Concentration [^{nat} Ga]-FAPI-46 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 30/03/2023 | 04/04/2024 | 06/04/2023 | Moyenne des AUC (mAU.s) |
|--|------------|------------|------------|----------------------------|
| 4 | 132898 | 135391 | 139418 | 135902 |
| 4,5 | 154943 | 153606 | 159456 | 156002 |
| 5 | 170924 | 170714 | 176613 | 172750 |
| 5,5 | 188613 | 187268 | 191756 | 189212 |
| 6 | 204703 | 202784 | 208790 | 205426 |
| 6,5 | 219682 | 220466 | 230044 | 223397 |
| 7 | 234788 | 234557 | 243542 | 237629 |

Tableau 13 : AUC (mAU.s) du [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 pour la linéarité.

L'équation linéaire de régression qui en résulte est :

$$y = 33761x + 2933,8 \text{ avec } R^2=0,999$$

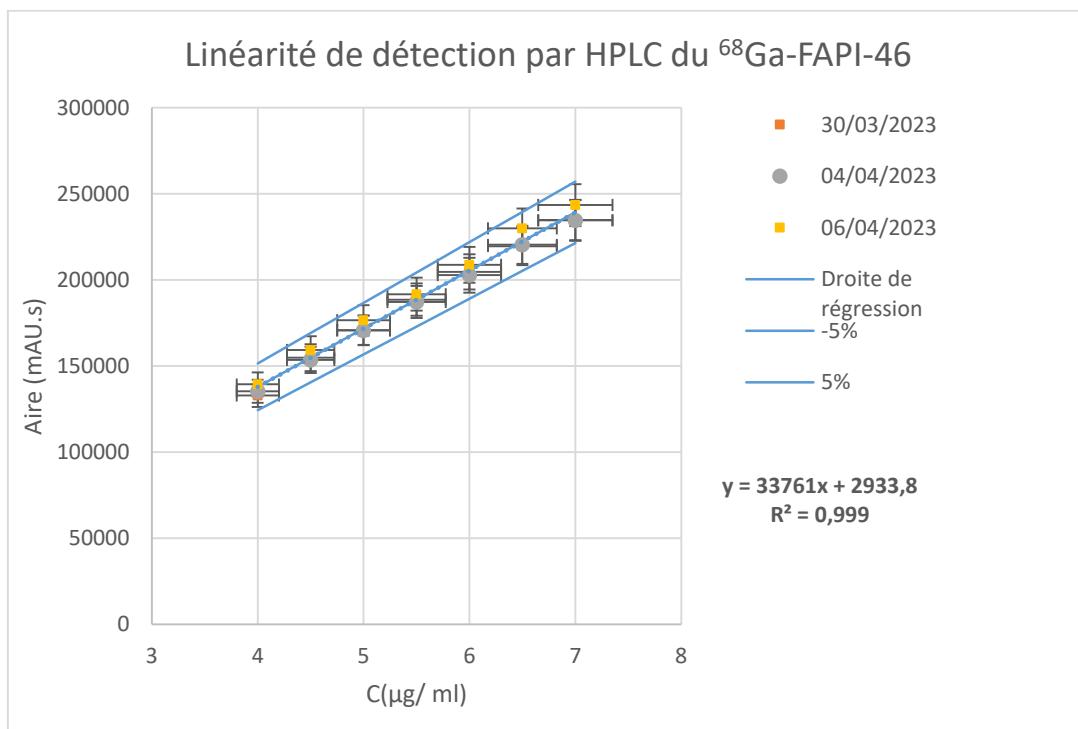


Figure 21 : Droite de régression linéaire des AUC moyennes (mAU.s) en fonction de la concentration du $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46.

Un calcul de la valeur de Fischer a été effectué pour la pente avec degré de liberté (ddl) égal à 1.

$$F_{\text{calc}} = 3731,2$$

$$F_{\text{table}} = 2,226 \times 10^{-8}$$

$F_{\text{calc}} > F_{\text{table}}$ donc la pente existe significativement avec $\alpha=5\%$

Après calcul, la limite de détection LDD= 0,30 µg/ ml et la limite de quantification LDQ= 0,91 µg/ ml.

3.6 Contrôles qualités des 3 lots de validation

Les résultats des contrôles qualité réalisés sur les trois synthèses de validation sont résumés dans le tableau 14.

Les PRC moyennes obtenues après contrôles en CCM et HPLC sont respectivement de $98,0 \pm 0,3\%$ et de $99,7 \pm 0,04\%$. Le pH des 3 solutions testées était de 5. Les trois produits finis de $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 étaient stériles et le taux d'endotoxines était inférieur à <5 UI/ ml (le taux doit être <17,3 UI/ ml après calcul). Le taux d'éthanol était <10 % pour les trois préparations (soit après calcul, <79g/L).

| N° de synthèse | Intégrité du filtre stérilisant | Identification radionucléidique ⁶⁸ Ga | | Identification ⁶⁸ [Ga]Ga-FAPI46 | | PRC(%) | | pH | Stérilité | Taux d'endotoxines (UI/ml) | Taux d'éthanol (g/L) | Stabilité à T+3heures | | | |
|----------------|---------------------------------|--|-------------|--|------|--------|----------------|---------|-----------|----------------------------|----------------------|-----------------------|--|-------|--|
| | | Spectre | ½ vie (min) | Tr (min) HPLC | CCM | HPLC | PRC CCM (%) | | | | | pH | ⁶⁸ [Ga]Ga-FAPI46 Tr (min) HPLC | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | Conforme | Conforme | 67,2 | Radio : 3,116 UV : 3,121 | 98,1 | 99,7 | 5 | Stérile | <5 | 65,5 | 96,8 | 99,3 | 5 | 3,092 | |
| 2 | Conforme | Conforme | 67,3 | Radio : 3,119 UV : 3,110 | 97, | 99,7 | 5 | Stérile | <5 | 66,8 | 98,0 | 99,4 | 5 | 3,083 | |
| 3 | Conforme | Conforme | 65,4 | Radio : 3,134 UV : 3,122 | 98,1 | 99,8 | 5 | Stérile | <5 | 65,7 | 97,7 | 99,5 | 5 | 3,104 | |
| Moyenne | | | | Radio : 3,123 UV : 3,118 | 98,0 | 99,7 | | | | | 97,5 | 99,4 | 5 | 3,093 | |

Tableau 14 : Résultats des contrôles qualité des 3 lots de validation.

Le temps de rétention moyen du $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 en radioactivité est de $3,123 \pm 0,010$ min et en UV $3,118 \pm 0,007$ min. Les radiochromatogrammes et chromatogrammes obtenus sont montrés ci-dessous (Figure 22).

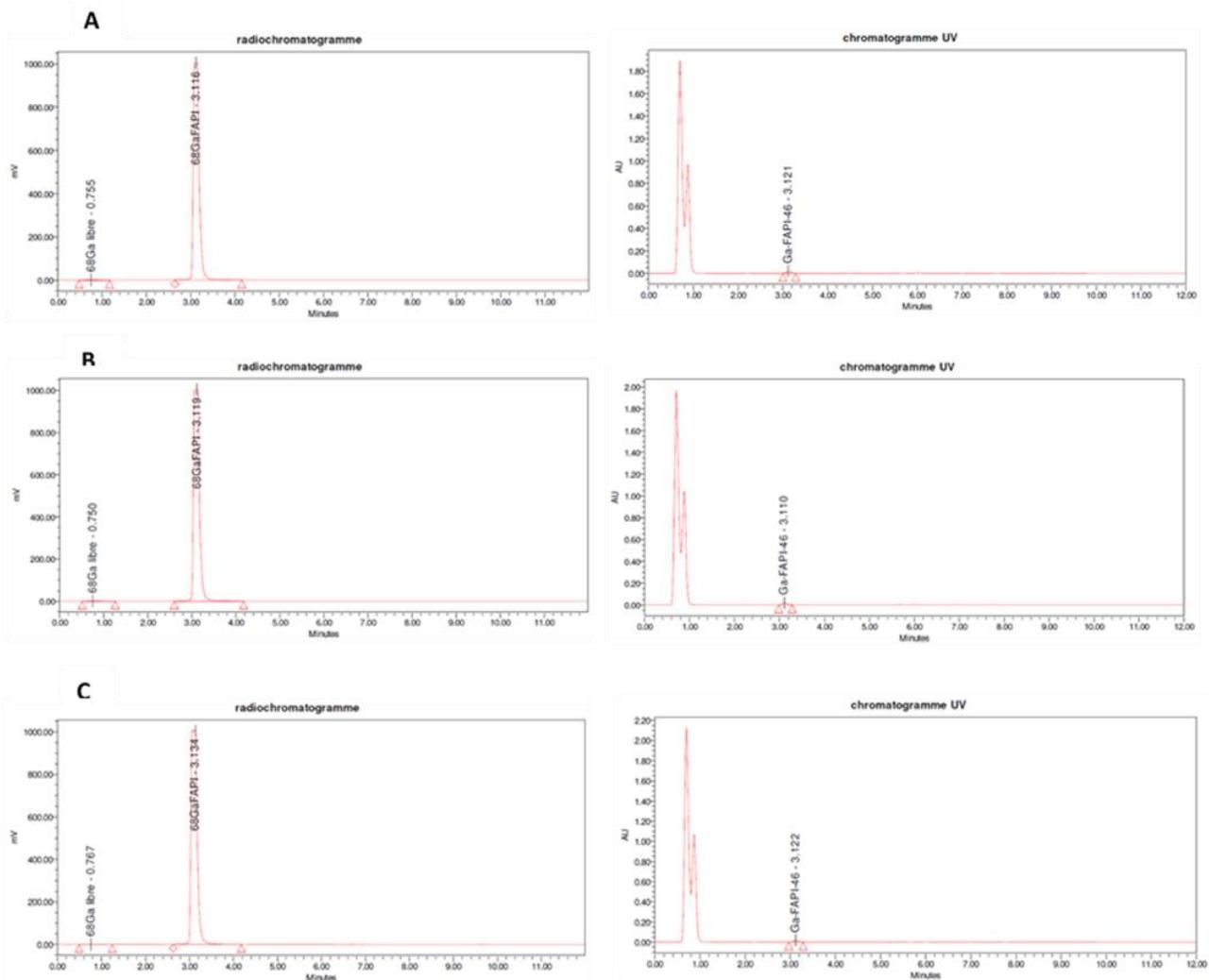


Figure 22 : **A/** radiochromatogramme et chromatogramme UV en HPLC synthèse n°1. **B/** synthèse n°2. **C/** synthèse n°3.

DISCUSSION

Depuis 2020, plusieurs équipes ont développé diverses méthodes automatisées pour la synthèse de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 en utilisant différents modules de synthèse et générateurs (cf tableau 3).

En raison de l'avancement de la recherche et des possibles applications diagnostiques du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46, la demande pour celui-ci est en constante augmentation.

Localement, le projet de l'essai clinique qui vise à évaluer l'intérêt préliminaire de la TEP au [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 dans les maladies inflammatoires et fibrosantes, a engendré la nécessité de mettre en place la production de ce MRP par la radiopharmacie. Afin d'être adaptée à une utilisation courante en clinique, la méthode de synthèse doit être fiable, reproductible, rapide et minimiser au maximum la radioexposition du manipulateur.

Les résultats préliminaires des synthèses de mise au point avec le filtre Millex-GS donnaient un rendement de synthèse relativement faible de 65,2 % en comparaison aux résultats d'autres équipes (cf tableau 3 : (3)(20) (31) (32) (33)) avec une rétention d'activité importante sur le filtre (19,8% de l'activité totale).

D'après les résultats de synthèse avec les différents filtres testés (tableau 7), les rendements sont meilleurs avec les filtres de chez PALL Medical et Millex-GV 0,22 µm (86% et 85% respectivement) qu'avec le premier filtre Millex-GS.

Plusieurs hypothèses pouvaient expliquer les faibles rendements de synthèses obtenus avec le filtre Millex-GS. Le radiomarquage du ⁶⁸Ga est sensible à trois paramètres essentiels qui sont : la présence d'impuretés métalliques pouvant rentrer en compétition avec le ⁶⁸Ga, le pH et la température du milieu réactionnel.

Concernant la présence d'impuretés métalliques dans le milieu réactionnel : Le générateur GalliaPharm® utilisé pour les synthèses possède une AMM en France conforme à la Pharmacopée Européenne et garantit un taux de ⁶⁸Ge <0,001 % dans l'éluat. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'étape de pré-purification de l'éluat n'est plus nécessaire quand on utilise des générateurs de nouvelle génération. Ce n'était pas le cas avec les premiers générateurs pour lesquels les éluats contenaient une quantité non négligeable de ⁶⁸Ge et d'autres métaux comme le Fer, l'Aluminium, le Zinc qui pouvaient rentrer en compétition avec le gallium lors de l'étape de radiomarquage (34) mais aussi poser des soucis en terme de radioprotection des patients et de gestion des déchets radioactifs du fait de la longue demi-vie du Germanium 68 (271 jours). Il existe plusieurs méthodes de pré-purification permettant de récupérer seulement le gallium sous forme de Ga³⁺ avec une bonne pureté radionucléidique (Méthode de fractionnement, Méthode chromatographie par échanges d'ions (anions ou cations)). (34)

Notre procédé ne comprend pas de pré-purification de l'éluat de gallium 68 contrairement à d'autres équipes (31)(32). Même si le meilleur rendement de synthèse est obtenu par Sprecklemeyer et al. (96%) avec pré-purification, des rendements plus faibles sont obtenus malgré une étape de pré-purification de l'éluat (Da Pieve et al. Et Phlak et al.). Plusieurs études démontrent que l'absence de pré-purification pour le marquage de peptide n'empêche pas l'obtention de médicaments radiopharmaceutiques conformes aux spécifications de la Pharmacopée Européenne. Toutefois, pour la validation du procédé, nous avons contrôlé le taux de germanium pour les trois lots de validation et il était <0,001% (limite donnée par la Pharmacopée Européenne). De plus, la suppression de l'étape de pré-purification permet de diminuer le temps de synthèse qui est un paramètre important à optimiser au vu de la demi-vie courte du gallium 68.

Pour le suivi de la température réactionnelle nous avons utilisés les valeurs fournies par les graphiques du logiciel de pilotage TRASIS qui étaient conformes à celles attendues soit un chauffage à 95°C pendant 10 min.

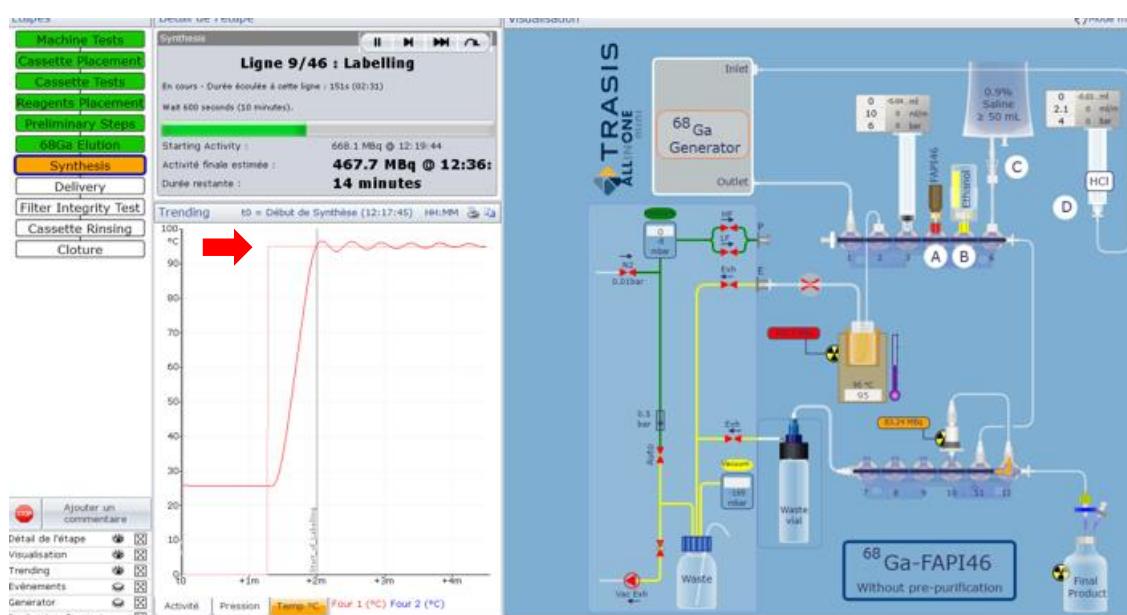


Figure 23 : Suivi de la température lors du radiomarquage à l'aide du logiciel Trasis Supervision.

En ce qui concerne le pH, lors de la mise au point, la valeur du pH du milieu réactionnel obtenue ($\text{pH}=4,5$) était conforme pour la complexation du DOTA avec le gallium 68. Les conditions adéquates pour le radiomarquage étaient réunies.

Etant donné ces résultats, une autre hypothèse était la rétention du produit sur le filtre stérilisant Millex-Gs 0,22 µm. En effet, les résultats de mesure du filtre après la synthèse indiquent que 19,8% de l'activité totale était retenue.

Les fabricants rapportent que selon la composition de la membrane des filtres, celle-ci pouvait présenter un taux plus ou moins important de rétention protéique. Pour cela nous avons décidé de tester d'autres filtres présentant une membrane avec une composition différente que celle du filtre déjà utilisé.

Le filtre Millex-GS est constitué d'une membrane à base d'esters de cellulose qui sont connus pour présenter une adsorption protéique élevée. Les membranes en polyéthersulfone (PES) présentent une excellente capacité de filtration et une faible adsorption protéique. Enfin, les membranes en PVDF hydrophile ont une adsorption protéique quasiment nulle.

Nous avons donc testé 2 autres filtres que TRASIS a utilisé pour la mise au point de la synthèse et un autre que le laboratoire utilise en recherche et développement. Ces filtres sont également compatibles avec une administration à l'homme du produit filtré. Les résultats obtenus avec ces deux filtres sont nettement meilleurs : Avec le filtre PALL Medical (PES) la quantité de radioactivité retenue sur le filtre représente 2,92% avec un rendement de synthèse de 86%. Et avec le filtre Millex-GV (PVDF hydrophile), l'activité retenue représente 1,05% de l'activité totale avec un rendement de 85%. Au vu de ces résultats, il est probable que le peptide FAPI s'adsorbe fortement sur les membranes en nitrocellulose et beaucoup moins sur les membranes de type PES ou PVDF-hydrophile.

Etant donné les similarités observées en termes de rendements entre les filtres PALL Medical et Millex-GV, le critère qui a guidé la sélection du filtre pour les synthèses de validation a été le coût. Les filtres Millex-GV se sont révélés plus économiques, et de plus, ils sont disponibles auprès de notre centrale d'achat. Cette disponibilité facilitera les procédures de commande pour une utilisation régulière.

Lors de la production des 3 lots de validation, le rendement de synthèse moyen après optimisation de la filtration stérilisante est de $86,9 \pm 0,8\%$ avec en moyenne 1,2 % de l'activité retenue sur le filtre. Le changement de filtre a permis une nette amélioration du rendement de synthèse avec une franche diminution du taux d'activité retenu sur le filtre stérilisant.

En prenant en compte les résultats de chaque équipe présentés dans le tableau 3, le rendement de synthèse moyen est d'environ 81,6% (*96% pour Spreckelmeyer et al.* *93% pour Alfteimi et al.* *66 ± 7,6 % pour Da Pieve et al.*, *81 ± 5% pour Nader et al* et *72,6 ± 4,9 % pour l'équipe de Phlak et al*)

Avec un rendement à 86,9 %, nous obtenons des résultats conformes et même supérieurs à ceux de la littérature.

Concernant les contrôles qualité du produit fini, les PRC du produit fini sont bonnes (98% en CCM et 99,7 % en HPLC) et cohérentes avec la littérature (cf tableau 3). Le produit fini est stérile avec un taux d'endotoxines <5 UI/ml et un taux d'éthanol compatible pour une administration à l'homme (<10% v/v). Nos résultats sont conformes aux spécifications de la Pharmacopée Européenne.

Dans notre procédé de synthèse, le milieu réactionnel est composé d'un aliquot de 50 µg de FAPI-46 dissout dans 1 ml de tampon acétate de sodium 0,7M ; de 0,6 ml du mélange ascorbate de sodium/NaCl (à 10,8mg/ml d'ascorbate) soit 6,5 mg environ d'ascorbate de sodium et de 5 ml d'éluat de gallium 68. L'ascorbate de sodium est connu comme étant un agent limitant les phénomènes de radiolyse et comme stabilisateur pour le marquage des conjugués du DOTA avec des biomolécules. L'équipe de Alfteimi et al obtenait des PRC <95% lors de synthèses sans utilisation d'ascorbate de sodium et celui-ci était nettement amélioré en rajoutant 300 µg d'ascorbate de sodium au milieu réactionnel (PRC >99,5%) (3). L'ascorbate de sodium agit comme un antioxydant piégeant les radicaux notamment hydroxyle et superoxydes et évite ainsi les phénomènes de radiolyse. De plus, il a des capacités de tampon à des pH compris entre 3,5 et 5,5 et peut aussi être utilisé comme chélateur faible à des pH >4,2 et ainsi prévenir la formation de colloïdes radiométalliques (35).

Dans notre procédé, la quantité d'ascorbate de sodium ajoutée au milieu réactionnel est plus élevée que ce que nous pouvons lire dans la littérature (6,5 mg versus 300 µg ou 1mg selon les équipes). De plus, le fait de pré-diluer l'ascorbate de sodium dans le NaCl avant le début de synthèse permet d'avoir un apport d'ascorbate de sodium lors de la formulation finale. Cela aurait un rôle pour augmenter la stabilité du produit (35). En effet, Phlak et al, ont testé la pureté radiochimique de leur produit fini 3 heures après la synthèse (sans ascorbate de sodium) et ils ont observés une augmentation non négligeable de la quantité de gallium 68 libre. Dans ces conditions la PRC était >95% seulement pendant 2 heures après la synthèse (33). Nous concernant, après 3 heures à température ambiante, les PRC étaient conformes : en moyenne pour les 3 synthèses 97% en CMM et 99% en HPLC. Une stabilité à T+3heures est suffisante au vu de la demi-vie du gallium 68.

A propos du pH du milieu réactionnel, il doit être suffisamment acide pour avoir des ions gallium Ga³⁺ en quantité suffisante pour permettre le radiomarquage (ph< 3), mais également compatible avec une administration à l'homme (pH plus basique). L'éluat de gallium obtenu après élution du générateur par de l'HCl 0,1M a un pH proche de 1. L'utilisation d'un tampon est donc indispensable. Il existe plusieurs tampons comme le succinate, le tampon citrate, l'HEPES (Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique, acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique) et l'acétate de sodium. L'HEPES est un très bon agent compatible avec la radiochimie du gallium (7) toutefois, la quantité administrable à l'homme est limitée (200µg/ dose IV Ph Eur 2017 Monographie du ⁶⁸Ga-Edotréotide) et nécessite le contrôle du taux résiduel dans la préparation finale ce qui rajoute des contrôles analytiques chronophages (36). Le tampon d'acétate de sodium, utilisé ici, permet d'obtenir des bons résultats de synthèse et est compatible avec un usage chez l'homme sans nécessité de doser le taux résiduel. (7)

En ce qui concerne la durée et la température de chauffage, dans le procédé TRASIS sur MiniAiO. Le milieu réactionnel est porté à 95°C pendant 10 minutes. Ces paramètres sélectionnés correspondent à ceux rapportés dans la littérature et ceux déjà rencontrés pour d'autres synthèses avec le DOTA. Étant donné que le chélateur DOTA présente une cinétique de complexation lente, le chauffage du milieu réactionnel permet d'accélérer la cinétique de la réaction. Une température supérieure à 90°C est recommandée avec ce chélateur par Lepareur et al. (4) avec une durée de chauffage de 10 minutes. Cependant, Alfteimi et al. ont démontré qu'ils obtenaient des rendements de synthèse supérieurs à 92% après seulement 4 minutes de chauffage à 90°C, alors que ceux obtenus à une température de 95°C pour une durée similaire sont moins élevés (Figure 24). Bien que nos rendements de marquage soient satisfaisants, envisager un chauffage à 90°C reste une perspective d'amélioration à considérer. La durée du radiomarquage est de 17 min à chaque synthèse, le produit fini est obtenu après 23 minutes. Enfin la durée totale du procédé de synthèse est de 35 minutes du début de l'élution jusqu'à la fin du test d'intégrité du filtre. Les autres équipes communiquent des durées similaires même si il est difficile de savoir quelles étapes exactement sont incluses dans ces données.

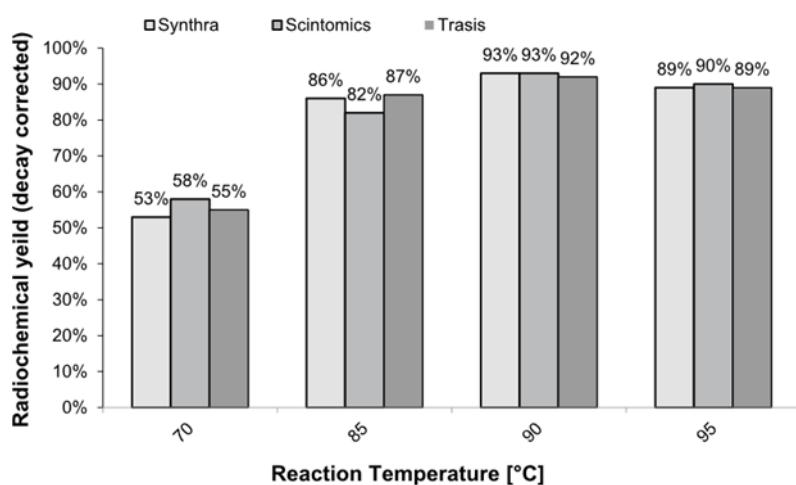


Fig. 8 Radio chemical yield of $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 ($n=3$, corrected for decay) versus varied temperature for 4-min reaction time and in buffered medium containing 300 μg ascorbic acid

Figure 24 : Rendements de synthèse à différentes températures pendant 4 min obtenus par Alfteimi et al 2022.

Concernant la rétention de la radioactivité sur les composants de la cassette : pour les 3 synthèses de validation le taux de radioactivité restante sur la cartouche de purification est constant soit en moyenne $3,3 \pm 0,2$ % de la radioactivité totale. La cartouche de purification retient le peptide radiomarqué et le gallium colloïde potentiellement présent en solution, le reste du milieu réactionnel, non retenu, est envoyé dans le flacon déchet. Le peptide marqué est ensuite décroché de la cartouche par 0,8 ml d'Ethanol 100%. L'activité restante sur la cartouche est donc due soit à un décrochage incomplet du $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-FAPI-46 par l'éthanol soit par le gallium colloïde piégé.

Le flacon déchets a été mesuré avant et après rinçage de la cassette lors des trois synthèses. Pour rappel, le rinçage de la cassette est effectué à la fin de la production après la réalisation du test d'intégrité du filtre. En moyenne $7 \pm 1,3$ % de l'activité totale est retrouvé dans le flacon déchet avant rinçage de la cassette. La mesure des flacons déchets après le rinçage montre des activités résiduelles moyennes de $9,3 \pm 1,3$ %, ce qui signifie qu'environ 2,3% de l'activité totale est retenue sur la cassette et possiblement dans les « tubulures ». Spreckelmeyer et al. qui ont validé la synthèse du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 sur deux automates (MLPT et ML eazy) ont également analysé les divers composants de la cassette. Seule la procédure sur le module MLPT inclut un rinçage du flacon réacteur entraînant un pourcentage d'activité résiduelle dans le flacon réacteur inférieur à celui retrouvé en l'absence de rinçage (0,9 % contre 3,7 %). L'activité résiduelle peut donc aussi se trouver dans le flacon réacteur. La mesure des composants de la cassette sont des étapes irradiantes pour le manipulateur, par conséquent, pour des raisons de radioprotection et au vu de nos bons résultats de synthèse, nous n'avons pas mesuré le flacon réacteur.

Le tableau ci-dessous résume les paramètres de synthèses et les résultats principaux que nous avons obtenus :

| Synthèse [⁶⁸ Ga]Ga-FAPI-46 à Brest | |
|--|---|
| Générateur | GalliaPharm® (Eckert et Ziegler) |
| Module | MiniAiO® |
| Pré-purification | Non |
| Purification du produit fini | Oasis HLB |
| Tampon/milieu réactionnel | Acétate de sodium 0,7M et ascorbate de sodium 6,5mg |
| T°C et temps de marquage | 95°C 10min |
| Rendement% | $86,9 \pm 0,8\%$ |
| PRC% | CCM : 98% HPLC : 99,7% |
| Temps de synthèse | 23 min (Elution → obtention produit fini) |

Tableau 15 : Paramètres et résultats de synthèse du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 à Brest.

L'objectif de ce travail comprenait aussi la mise au point et la validation des méthodes analytiques de notre produit fini, notamment les méthodes de contrôles par CCM et HPLC.

Etant donné l'absence de monographie disponible pour le contrôle du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI 46 dans la Pharmacopée Européenne nous nous sommes basés sur la monographie générale des préparations radiopharmaceutiques, sur celle du ⁶⁸Ga-Edotréotide (Somakit®), sur les contrôles déjà effectués pour le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA (dosage des endotoxines et les essais de stérilité notamment).

Pour tester la méthode CCM nous avons utilisé les recommandations du laboratoire TRASIS. Le solvant utilisé est un mélange acétate d'ammonium/ méthanol 50:50 (v/v). Dans ce solvant, le gallium libre et le gallium colloïdal sont détectés à des Rf <0,2 tandis que le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 migre à des Rf >0,8.

Pour séparer le gallium libre du gallium colloïdal, nous nous sommes basés sur le RCP du Somakit® en faisant migrer la solution du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI 46 dans le solvant citrate 0,1M. Le Ga³⁺ qui a une affinité pour le citrate migre avec le solvant à des Rf >0,8. Tandis que le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI 46 reste au point de dépôt (Figure 25). Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Nader et al. (20). Etant donné que la méthode HPLC nous permet d'évaluer le pourcentage de gallium libre dans la préparation, nous allons nous affranchir de la CCM en citrate lors des opérations de routine.

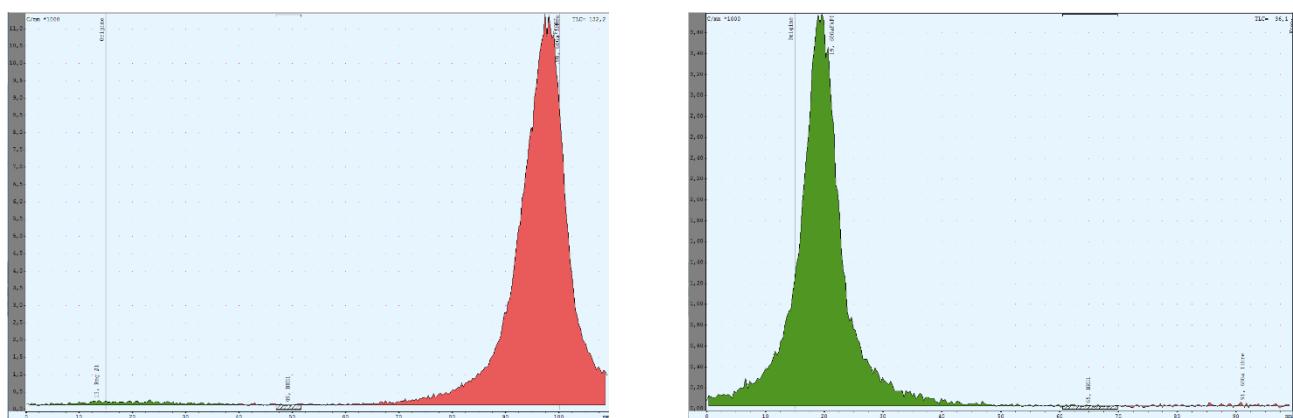


Figure 25 : CCM dans citrate 0,1 M : A/CCM ITLC de l'éluat de ⁶⁸Ga B/CCM ITLC [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46

La validation de la méthode en HPLC a été effectuée conformément aux recommandations ICH Q2 R1 (37).

Pour la spécificité de notre méthode : Le temps de rétention moyen du [^{nat}Ga]Ga-FAPI-46 est de $t_r = 3,091$ min et l'intervalle $\pm 5\%$ des temps de rétention est [2,937-3,244min].

Le gallium libre sort à des $t_r \approx 0,8$ min. En UV, le FAPI-46 est détecté mais son pic est écrasé par celui de l'acide ascorbique qui sort avec un temps de rétention d'environ 1 min. Dans les travaux de Da Pieve et al, le chromatogramme UV en HPLC obtenu lors de l'analyse d'une solution de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 montre aussi un grand pic correspondant à l'ascorbate de sodium en début de chromatogramme (cf Figure 27) écrasant le pic de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 à $t_r \approx 8$ min.

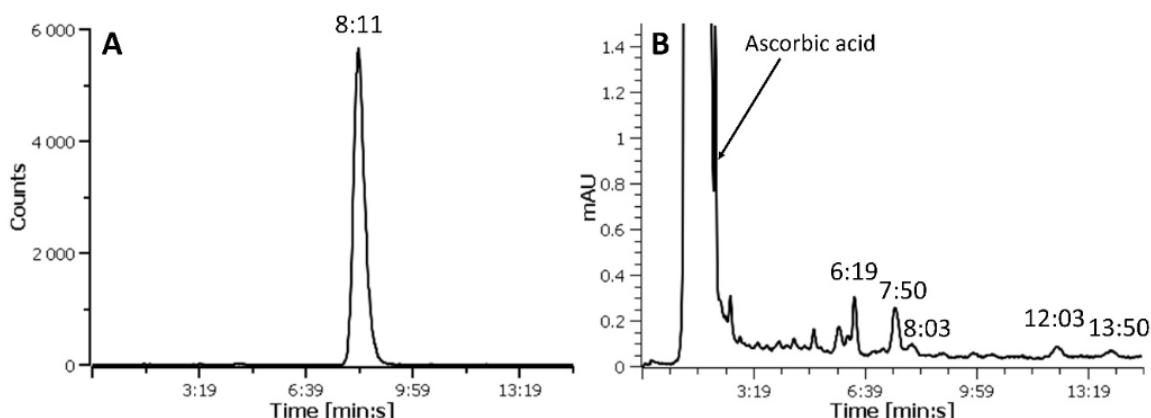


Figure 26: A/ Radiochromatogramme et B/ Chromatogramme en HPLC d'une solution de ⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46.(Da Pieve et al. 2022)

La précision de la méthode a été évaluée par l'analyse de la répétabilité et de la précision interne. Les ICH exigent d'évaluer la répétabilité d'une méthode sur « au moins 6 mesures d'une concentration à 100% de la teneur escomptée» ici $C = 5\mu\text{g}/\text{ml}$. Le coefficient de variation obtenu est faible (1,4%). L'analyse de variance par le test ANOVA donnait un $F_{\text{calculé}} < F_{\text{table}}$. La précision de la méthode est validée.

Concernant la linéarité, elle a été démontrée pour des concentrations allant de $4\mu\text{g}/\text{ml}$ à $7\mu\text{g}/\text{ml}$ avec un $R^2 > 0,99$ (conformément aux critères d'acceptation) et par les tests statistiques montrant que la pente de la droite de régression linéaire existe.

Le procédé de synthèse mis au point avec le module de synthèse MiniAiO de chez TRASIS est simple, conforme aux bonnes pratiques de préparation et complètement automatisée. Le procédé est fiable et reproductible avec de bons rendements de synthèse (86,9%). Avec le générateur utilisé (calibration février 2023), l'activité de l'éluat mesuré est de 775 MBq et les produits finis ont une activité totale moyenne de 472 MBq. Ces résultats sont suffisants pour une utilisation en routine sachant que l'activité injectée pour chaque patient sera comprise entre 150 et 200 MBq.(38) (39) (40).

Le

Tableau 16 donne l'activité du produit fini (non corrigé de la décroissance) selon l'âge du générateur. En effet, nous possédons deux générateurs et pour des raisons de radioprotection, nous avons utilisé le générateur le plus vieux pour effectuer les synthèses de validation. Lors de la mise en place en routine clinique de ce marquage, nous utiliserons un générateur donnant un éluat avec une activité volumique supérieure à celle obtenue en phase de validation.

| Nouveau générateur (proche date de calibration) | Générateur utilisé pour la validation du procédé de synthèse (+6 mois de la date de calibration) |
|---|---|
| Volume HCl 0,1M pour l'élution | 5 ml |
| Activité volumique de l'éluat | $\approx 1100 \text{ MBq}/5\text{ml}$ soit 220MBq/ml |
| Fourchette activité produit fini (sans correction de la décroissance) avec Rdt de synthèse= $86,9 \pm 0,8\%$ | [191-193] MBq/ml |
| | [134-136]MBq/ml |

Tableau 16 : Activité volumique non corrigée de la décroissance du produit fini selon l'âge du générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$.

Parmi les avantages de notre procédé nous pouvons citer la non nécessité de l'étape de pré-purification de l'éluat ; le fait que le tampon utilisé ne nécessite pas de dosage contrairement à certaines équipes utilisant l'HEPES pour le radiomarquage et également l'inclusion dans la séquence de synthèse du test

d'intégrité du filtre grâce au logiciel de pilotage TRASIS permettant ainsi de diminuer le risque de contamination et de radioexposition du manipulateur.

En revanche, notre procédé est validé selon les recommandations de TRASIS et nous utilisons les dispositifs et réactifs de chez TRASIS. Dans l'état actuel des choses, nous sommes dépendants de la disponibilité des produits. Concernant les réactifs, il serait intéressant de produire notre propre tampon acétate/ascorbat de sodium à partir de matières premières pharmaceutiques afin de pallier à une éventuelle rupture du laboratoire. En revanche, le développement d'une méthode manuelle semble difficilement envisageable pour des questions de radioprotection, par conséquent nous resterons dépendant de la disponibilité des cassettes malgré le coût non négligeable de celles-ci.

CONCLUSION

Ce travail mené au sein de la radiopharmacie du CHRU de Brest a permis la mise au point d'une méthode automatisée, rapide, fiable et reproductible de la préparation du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ 46 à partir du procédé fourni par TRASIS sur le module MiniAiO à l'aide d'un générateur Eckert et Ziegler. Après validation de la méthode analytique par HPLC et la mise au point des autres méthodes, les résultats des contrôles qualité du produit fini à l'issue des trois synthèses de validation sont conformes à la Pharmacopée Européenne et respectent les spécifications du laboratoire TRASIS.

Les données de ce travail seront reprises pour la soumission du DME à l'ANSM dans le cadre de l'essai clinique présentant comme objectif principal la détermination de l'intérêt préliminaire de la TEP au $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ 46 dans différentes maladies inflammatoires chroniques et/ou fibrosantes.

Bibliographie

1. Bonnes Pratiques de Préparation 2023.
2. Guide de l'ASN n°32 [cité le 22 sept 2023]. Disponible: <https://www.asn.fr/l ASN-reglemente/guides-de-l ASN/guide-de-l ASN-n-32-installations-de-medecine-nucleaire-in-vivo-regles-techniques-minimales-de-conception-d-exploitation-et-de-maintenance>
3. Alftemi A, Lützen U, Helm A, Jüptner M, Marx M, Zhao Y, et al. Automated synthesis of [68Ga]Ga-FAPI-46 without pre-purification of the generator eluate on three common synthesis modules and two generator types. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2022;7(1):20. DOI: 10.1186/s41181-022-00172-1
4. Lepareur N. Cold Kit Labeling: The Future of 68Ga Radiopharmaceuticals? *Front Med*. 2022;9:812050. DOI: 10.3389/fmed.2022.812050
5. Stasiuk GJ, Long NJ. The ubiquitous DOTA and its derivatives: the impact of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid on biomedical imaging. *Chem Commun Camb Engl*. 2013;49(27):2732-46. DOI: 10.1039/c3cc38507h
6. [En ligne]. Gallium 68 - an overview | ScienceDirect Topics [cité le 4 sept 2023]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/gallium-68>
7. Bauwens M, Chekol R, Vanbilloen H, Bormans G, Verbruggen A. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of 68Ga-Dotatoc for clinical application. *Nucl Med Commun*. 2010;31(8):753. DOI: 10.1097/MNM.0b013e32833acb99
8. Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(3):783-803. DOI: 10.1007/s10555-020-09909-3
9. Edosada CY, Quan C, Wiesmann C, Tran T, Sutherlin D, Reynolds M, et al. Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity*. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7437-44. DOI: 10.1074/jbc.M511112200
10. Siveke JT. Fibroblast-Activating Protein: Targeting the Roots of the Tumor Microenvironment. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2018;59(9):1412-4. DOI: 10.2967/jnumed.118.214361
11. Bauer S, Jendro MC, Wadle A, Kleber S, Stenner F, Dinser R, et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R171. DOI: 10.1186/ar2080
12. Tillmanns J, Hoffmann D, Habbaba Y, Schmitto JD, Sedding D, Fraccarollo D, et al. Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;87:194-203. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.016
13. Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene*. 2018;37(32):4343-57. DOI: 10.1038/s41388-018-0275-3
14. Kilvaer TK, Khanehkani MR, Hellevik T, Al-Saad S, Paulsen E-E, Bremnes RM, et al. Cancer Associated Fibroblasts in Stage I-IIIA NSCLC: Prognostic Impact and Their Correlations with Tumor Molecular Markers. *PLOS ONE. Public Library of Science*; 2015;10(8):e0134965. DOI: 10.1371/journal.pone.0134965
15. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K, Yokoe T, Okugawa Y, Fujikawa H, et al. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Oncol*. 2011;38(3):655-63. DOI: 10.3892/ijo.2011.906
16. Liu F, Qi L, Liu B, Liu J, Zhang H, Che D, et al. Fibroblast activation protein overexpression and clinical implications in solid tumors: a meta-analysis. *PloS One*. 2015;10(3):e0116683. DOI: 10.1371/journal.pone.0116683

17. Moon ES, Elvas F, Vliegen G, De Lombaerde S, Vangestel C, De Bruycker S, et al. Targeting fibroblast activation protein (FAP): next generation PET radiotracers using squaramide coupled bifunctional DOTA and DATA5m chelators. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2020;5:19. DOI: 10.1186/s41181-020-00102-z
18. Jansen K, Heirbaut L, Cheng JD, Joossens J, Ryabtsova O, Cos P, et al. Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4(5):491-6. DOI: 10.1021/ml300410d
19. Lindner T, Loktev A, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, Debus J, et al. Development of Quinoline-Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2018;59(9):1415-22. DOI: 10.2967/jnumed.118.210443
20. Nader M, Valla DF, Vriamont C, Masset J, Pacelli A, Herrmann K, et al. [68Ga]/[90Y]FAPI-46: Automated production and analytical validation of a theranostic pair. *Nucl Med Biol*. 2022;110-111:37-44. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2022.04.010
21. Loktev A, Lindner T, Mier W, Debus J, Altmann A, Jäger D, et al. A Tumor-Imaging Method Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2018;59(9):1423-9. DOI: 10.2967/jnumed.118.210435
22. Loktev A, Lindner T, Burger E-M, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, et al. Development of Fibroblast Activation Protein-Targeted Radiotracers with Improved Tumor Retention. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2019;60(10):1421-9. DOI: 10.2967/jnumed.118.224469
23. Kratochwil C, Flechsig P, Lindner T, Abderrahim L, Altmann A, Mier W, et al. 68Ga-FAPI PET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2019;60(6):801-5. DOI: 10.2967/jnumed.119.227967
24. Meyer C, Dahlborn M, Lindner T, Vauclin S, Mona C, Slavik R, et al. Radiation Dosimetry and Biodistribution of ⁶⁸ Ga-FAPI-46 PET Imaging in Cancer Patients. *J Nucl Med*. 2020;61(8):1171-7. DOI: 10.2967/jnumed.119.236786
25. Giesel FL, Kratochwil C, Lindner T, Marschalek MM, Loktev A, Lehnert W, et al. 68Ga-FAPI PET/CT: Biodistribution and Preliminary Dosimetry Estimate of 2 DOTA-Containing FAP-Targeting Agents in Patients with Various Cancers. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2019;60(3):386-92. DOI: 10.2967/jnumed.118.215913
26. Schmidkonz C, Rauber S, Atzinger A, Agarwal R, Götz TI, Soare A, et al. Disentangling inflammatory from fibrotic disease activity by fibroblast activation protein imaging. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(11):1485-91. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-217408
27. Yang P, Luo Q, Wang X, Fang Q, Fu Z, Li J, et al. Comprehensive Analysis of Fibroblast Activation Protein Expression in Interstitial Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;207(2):160-72. DOI: 10.1164/rccm.202110-2414OC
28. Treutlein C, Distler JHW, Tasclar K, Fakhouri SC, Györfi A-H, Atzinger A, et al. Assessment of myocardial fibrosis in patients with systemic sclerosis using [68Ga]Ga-FAPI-04-PET-CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023;50(6):1629-35. DOI: 10.1007/s00259-022-06081-4
29. Chen L, Zhong X, Li L, Li X, Liu Y, Guo C, et al. [68Ga]Ga-FAPI-04 PET/CT on assessing Crohn's disease intestinal lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023;50(5):1360-70. DOI: 10.1007/s00259-023-06107-5
30. Bauer S, Jendro MC, Wadle A, Kleber S, Stenner F, Dinser R, et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R171. DOI: 10.1186/ar2080
31. Da Pieve C, Costa Braga M, Turton DR, Valla FA, Cakmak P, Plate K-H, et al. New Fully Automated Preparation of High Apparent Molar Activity 68Ga-FAPI-46 on a Trasis AiO Platform. *Molecules*. 2022;27(3):675. DOI: 10.3390/molecules27030675

32. Spreckelmeyer S, Balzer M, Poetzsch S, Brenner W. Fully-automated production of [68Ga]Ga-FAPI-46 for clinical application. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2020;5(1):31. DOI: 10.1186/s41181-020-00112-x
33. Plhak E, Pichler C, Dittmann-Schnabel B, Gößnitzer E, Aigner RM, Stanzel S, et al. Automated Synthesis of [68Ga]Ga-FAPI-46 on a Scintomics GRP Synthesizer. *Pharmaceuticals.* 2023;16(8):1138. DOI: 10.3390/ph16081138
34. Rösch F. Past, present and future of 68Ge/68Ga generators. *Appl Radiat Isot.* 2013;76:24-30. DOI: 10.1016/j.apradiso.2012.10.012
35. Liu S, Ellars CE, Edwards DS. Ascorbic Acid: Useful as a Buffer Agent and Radiolytic Stabilizer for Metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem.* American Chemical Society; 2003;14(5):1052-6. DOI: 10.1021/bc034109i
36. le Roux J, Kleynhans J, Rubow S. The use of HEPES-buffer in the production of gallium-68 radiopharmaceuticals – time to reconsider strict pharmacopoeial limits? *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2021;6:15. DOI: 10.1186/s41181-021-00129-w
37. Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2006;
38. Mona CE, Benz MR, Hikmat F, Grogan TR, Lueckerath K, Razmaria A, et al. Correlation of ⁶⁸ Ga-FAPI-46 PET Biodistribution with FAP Expression by Immunohistochemistry in Patients with Solid Cancers: Interim Analysis of a Prospective Translational Exploratory Study. *J Nucl Med.* 2022;63(7):1021-6. DOI: 10.2967/jnumed.121.262426
39. Meyer C, Dahlbom M, Lindner T, Vauclin S, Mona C, Slavik R, et al. Radiation Dosimetry and Biodistribution of 68Ga-FAPI-46 PET Imaging in Cancer Patients. *J Nucl Med.* 2020;61(8):1171-7. DOI: 10.2967/jnumed.119.236786
40. Unterrainer LM, Lindner S, Eismann L, Casuscelli J, Gildehaus F-J, Bui VN, et al. Feasibility of [68Ga]Ga-FAPI-46 PET/CT for detection of nodal and hematogenous spread in high-grade urothelial carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2022;49(10):3571-80. DOI: 10.1007/s00259-022-05761-5

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 9 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 11 |
| INTRODUCTION | 13 |
| PARTIE 1 :..... | 14 |
| 1. La Tomographie par émissions de positons | 14 |
| 2. La réglementation pharmaceutique | 16 |
| 2.1. Cadre réglementaire de la radiopharmacie et des médicaments radiopharmaceutiques | 16 |
| 2.2. Préparation et contrôles des médicaments radiopharmaceutiques (MRP) | 18 |
| 2.2.1. Environnement et locaux de préparations des MRP | 18 |
| 2.2.2. Les contrôles de l'environnement et des équipements | 18 |
| a) L'environnement | 18 |
| b) Les équipements | 19 |
| 2.2.3. Le personnel | 19 |
| 2.2.4. La préparation des MRP injectables | 20 |
| 2.2.5. Les contrôles qualité des MRP injectables | 21 |
| 3. La législation des essais cliniques | 22 |
| 3.1. Autorisations et mise en place d'un essai clinique | 22 |
| 3.2. Le dossier du médicament expérimental | 24 |
| 4. Le gallium 68 (⁶⁸Ga) | 25 |
| 4.1. Propriétés physicochimiques | 25 |
| 4.1.1. Propriétés chimiques | 25 |
| 4.1.2. Propriétés physiques | 25 |
| 4.2. Production : le générateur de ⁶⁸ Ge (germanium 68)/ ⁶⁸ Ga | 25 |
| 4.3. Radiochimie du ⁶⁸ Ga | 26 |
| 4.3.1. Principe de radiomarquage | 26 |
| 4.3.2. Les chélateurs : Cas du DOTA | 28 |
| 5. Le FAPI-46 « Fibroblast activation protein inhibitor » | 29 |
| 5.1. Les fibroblastes et myofibroblastes | 29 |
| 5.2. La FAP « Fibroblast Activation protein » ou protéine activatrice des fibroblastes | 30 |
| 5.3. Les FAPI et le de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 | 30 |
| 6. Les applications diagnostiques du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI..... | 33 |
| 6.1. En oncologie | 33 |
| 6.2. Maladies inflammatoires et fibrosantes | 34 |
| PARTIE 2 : PRODUCTION DU [⁶⁸GA]GA-FAPI-46 AU SEIN DE LA RADIOPHARMACIE DE BREST | 36 |
| 1. Contexte et objectifs | 36 |
| 2. Matériels et méthodes | 37 |
| 2.1. Locaux et isolateurs de haute énergie | 37 |
| 2.2. Réactifs | 38 |
| 2.3. Synthèse | 38 |
| 2.4. Filtration stérilisante | 40 |
| 2.5. Validation du procédé de synthèse | 41 |
| 2.6. Contrôles qualité | 42 |
| 2.6.1. Intégrité du filtre | 42 |
| 2.6.2. Activité du produit fini | 42 |
| 2.6.3. Caractères organoleptiques | 42 |
| 2.6.4. pH | 42 |
| 2.6.5. Identification radionucléidique | 42 |
| a) Par spectrométrie | 42 |
| b) Par détermination de la demi-vie | 43 |
| 2.6.6. Pureté radiochimique par Chromatographie sur couche mince (CCM) | 43 |
| 2.6.7. Pureté radiochimique et identification par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) | 43 |
| 2.6.8. Endotoxines | 45 |

| | | |
|--------------------------------------|---|-----------|
| 2.6.9. | Stérilité | 46 |
| 2.6.10. | Teneur finale en éthanol..... | 46 |
| 2.6.11. | Stabilité..... | 46 |
| 3. | Résultats..... | 46 |
| 3.1. | Mise au point de la synthèse (avec le filtre Millex®-GS 0,22µm, Millipore, Merck) | 46 |
| 3.2. | Optimisation de l'étape de filtration stérilisante..... | 47 |
| 3.3. | Validation du procédé de synthèse avec filtration stérilisante optimisée..... | 48 |
| 3.4. | Mise au point de la méthode CCM..... | 48 |
| 3.5. | Mise au point et validation de la méthode HPLC | 49 |
| 3.6 | Contrôles qualités des 3 lots de validation | 52 |
| DISCUSSION | | 55 |
| CONCLUSION | | 63 |
| BIBLIOGRAPHIE | | 64 |
| TABLE DES MATIERES | | 67 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | | 69 |
| TABLE DES TABLEAUX..... | | 70 |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1</u> : Formule générale de la désintégration $\beta+$ | 14 |
| <u>Figure 2</u> : Principe physique de la TEP..... | 15 |
| <u>Figure 3</u> : Catégories de recherches et démarches réglementaires (INSERM) | 23 |
| <u>Figure 4</u> : Complexe ^{68}Ga -DOTA (6)..... | 28 |
| <u>Figure 5</u> : a/ Fibroblaste normal ; b/ Fibroblaste activé (CAF) (<i>Kalluri Nature Rev Cancer 2006</i>) | 29 |
| <u>Figure 6</u> : Structure chimique de quinoléine..... | 31 |
| <u>Figure 7</u> : Structures chimiques des précurseurs de FAPI utilisés dans l'application clinique..... | 31 |
| <u>Figure 8</u> : Images TEP corps entier de tumeurs de patients (A à G) 1h après injection de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-21}$ (A à C) et $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ (E à G) | 32 |
| <u>Figure 9</u> : Structure du FAPI-46 marqué au gallium-68 | 32 |
| <u>Figure 10</u> : Comparaison intra-individuelle d'imagerie TEP 1h post-injection de patients injectés en $[^{18}\text{F}]$ FDG ou en $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI}$ (25)..... | 33 |
| <u>Figure 11</u> : Module de synthèse MiniAIO ® (Trasis, Belgique) | 38 |
| <u>Figure 12</u> : Cassette à usage unique pour la synthèse du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ (Trasis, Belgique) | 39 |
| <u>Figure 13</u> : Reconstitutions préalables A/ Ascorbate de sodium avec NaCl 0,9% B/ FAPI-46 et acétate de sodium..... | 39 |
| <u>Figure 14</u> : Schéma du montage de synthèse du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ avec le module MiniAiO (TRASIS) | 40 |
| <u>Figure 15</u> : CCM du ^{68}Ga libre. La région verte est la radioactivité relative au ^{68}Ga libre | 49 |
| <u>Figure 16</u> : CCM du ^{68}Ga Colloïdal. La région verte est la radioactivité relative au ^{68}Ga -colloidal | 49 |
| <u>Figure 17</u> : CCM du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ | 49 |
| <u>Figure 18</u> : Profil radiochromatographique du ^{68}Ga libre en HPLC..... | 50 |
| <u>Figure 19</u> : Chromatogramme UV en HPLC / injection de 5 μL de matrice..... | 50 |
| <u>Figure 20</u> : Chromatogramme UV en HPLC / injection 20 μL de $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 50 |
| <u>Figure 21</u> : Droite de régression linéaire des AUC moyennes (mAU.s) en fonction de la concentration du $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$ | 52 |
| <u>Figure 22</u> : A/ radiochromatogramme et chromatogramme UV en HPLC synthèse n°1. B/ synthèse n°2. C/ synthèse n°3..... | 54 |
| <u>Figure 23</u> : Suivi de la température lors du radiomarquage à l'aide du logiciel Trasis Supervision..... | 56 |
| <u>Figure 24</u> : Rendements de synthèse à différentes températures pendant 4 min obtenus par Alfteimi et al 2022..... | 59 |
| <u>Figure 25</u> : CCM dans citrate 0,1 M : A/CCM ITLC de l'éluat de ^{68}Ga B/CCM ITLC ^{68}Ga -FAPI-46 | 61 |
| <u>Figure 26</u> : A/ Radiochromatogramme et B/ Chromatogramme en HPLC d'une solution de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-FAPI-46}$.(Da Pieve et al. 2022) | 61 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| <u>Tableau 1</u> : Isotopes émetteurs de positons pour l'imagerie TEP | 16 |
| <u>Tableau 2</u> : Recommandations BPP 2023 sur les contrôles microbiologiques de la ZAC | 19 |
| <u>Tableau 3</u> : Exemple de synthèses de [⁶⁸ Ga]Ga-FAPI-46 décrites dans la littérature. | 37 |
| <u>Tableau 4</u> : Références et caractéristiques des filtres stérilisants testés. | 41 |
| <u>Tableau 5</u> : Gamme étalon de [^{nat} Ga]Ga-FAPI-46 pour la linéarité..... | 45 |
| <u>Tableau 6</u> : Résultats de synthèse avec le filtre Millex®-GS 0,22 µm (n°1)..... | 47 |
| <u>Tableau 7</u> : Résultats des synthèses test des filtres stérilisants. | 47 |
| <u>Tableau 8</u> : Résultats des 3 synthèses de validation avec le filtre Millex-GV 0,22 µm (n°3)..... | 48 |
| <u>Tableau 9</u> : Radioactivité restante (%) à la fin de la synthèse. | 48 |
| <u>Tableau 10</u> : Gradient d'analyse avec % des solvants A (H ₂ O+TFA) et B (Acétonitrile + TFA) | 49 |
| <u>Tableau 11</u> : Résultats de spécificité de la méthode HPLC. | 51 |
| <u>Tableau 12</u> : Valeurs des AUC (mA.U.s) du [^{nat} Ga]Ga-FAPI-46 pour la répétabilité..... | 51 |
| <u>Tableau 13</u> : AUC (mA.U.s) du [^{nat} Ga]Ga-FAPI-46 pour la linéarité..... | 51 |
| <u>Tableau 14</u> : Résultats des contrôles qualité des 3 lots de validation. | 53 |
| <u>Tableau 15</u> : Paramètres et résultats de synthèse du [⁶⁸ Ga]Ga-FAPI-46 à Brest..... | 60 |
| <u>Tableau 16</u> : Activité volumique non corrigée de la décroissance du produit fini selon l'âge du générateur ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga. | 62 |

ABSTRACT

RÉSUMÉ

GRASSAL Adèle

Le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 un traceur TEP prometteur pour l'imagerie des maladies inflammatoires et fibrosantes : Production au sein de la radiopharmacie de Brest

Le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 est un radiotraceur prometteur pour la détection de la protéine d'activation des fibroblastes (FAP) exprimée dans de nombreuses pathologies. Ce travail a été initié dans le cadre de la mise en place d'une étude pilote monocentrique dont l'objectif est de déterminer l'intérêt préliminaire de la TEP au [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 dans différentes maladies inflammatoires chroniques et/ou fibrosantes. Dans ce contexte, le [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 constitue un médicament expérimental nécessitant la rédaction d'un DME qui sera soumis à l'ANSM. L'objectif est la mise au point de la synthèse automatisée du [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 conforme aux BPP et à partir du procédé déjà validé par le laboratoire Trasis® ainsi que la mise au point et la validation des méthodes de contrôle qualité du produit fini. La synthèse a été développée sur l'automate MiniAiO® couplé à un générateur ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga GalliaPharm® et à l'aide de cassettes de synthèse à usage unique, des réactifs fournis par Trasis et le peptide FAPI-46 fourni par SOFIE Biosciences. Différents filtres ont été testés pour l'optimisation de l'étape de filtration stérilisante. Une mise au point des contrôles qualité au produit analysé a été nécessaire et une validation de la méthode analytique par HPLC a été effectuée selon les recommandations de ICH Q2R1. Pour valider le procédé de synthèse, trois lots de [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 ont été produits et contrôlés. Le rendement de synthèse moyen est de 86,9%. Le produit obtenu est stérile, avec un taux d'endotoxines <5UI/ml, comportant un taux d'éthanol < 10% (v/v) et présente une pureté radiochimique moyenne de 98,0±0,3% en CCM et 99,7 ±0,04% en HPLC.

Mots-clés : [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46, maladies inflammatoires et fibrosantes, TEP, Synthèse automatisée, filtration stérilisante, Radiomarquage

The [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46, a promising PET tracer for imaging inflammatory and fibrotic diseases: Production at the Brest radiopharmacy

[⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 is a promising radiotracer for the detection of the fibroblast activating protein (FAP) expressed in many pathologies. This work was initiated as part of a single-center pilot study to determine the preliminary value of [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 PET in various chronic inflammatory and/or fibrosing diseases. In this context, [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 constitutes an experimental drug requiring the drafting of an IMP to be submitted to the ANSM. The aim is to develop an automated synthesis of [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 in compliance with GMP, using the process already validated by the Trasis® laboratory, and to develop and validate quality control methods for the finished product. The synthesis was developed on the MiniAiO® automated system coupled to a GalliaPharm® ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator, using single-use synthesis cassettes, reagents supplied by Trasis and the FAPI-46 peptide supplied by SOFIE Biosciences. Various filters were tested to optimize the sterilizing filtration step. Quality controls for the analyzed product had to be developed, and the HPLC analytical method was validated in accordance with ICH Q2R1 recommendations. To validate the synthesis process, three batches of [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46 were produced and monitored. The average synthesis yield was 86.9%. The product obtained is sterile, with an endotoxin level <5IU/ml, comprising an ethanol level <10% (v/v) and an average radiochemical purity of 98.0±0.3% in TLC and 99.7 ±0.04% in HPLC.

Keywords: [⁶⁸Ga]Ga-FAPI-46, inflammatory and fibrotic diseases, PET, automated synthesis, sterilizing filtration, radiolabeling