

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Dipartimento Biotecnologie, Chimica e Farmacia

Università degli Studi di Siena

Prof. Germano Giuliani

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Programma:

- **Introduzione** sullo sviluppo farmaci e nuove prospettive
- **Acqua per uso farmaceutico** (Acqua depurata; Metodi di depurazione; Distillatori)
- **Sterilizzazione** (Concetti base; Generatori di vapore; Sterilizzazione a caldo e a freddo, Tipi di Autoclavi)
- **Liofilizzazione** (Teoria e fasi della liofilizzazione; Impianto di liofilizzazione; Ciclo frigorifero; Liofilo sterile)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Programma:

- Concetti di **Qualificazione e Convalida** del prodotto farmaceutico (*esempi di metodiche di Convalida basate su esperienza Impresa Toscana*).
- **Impianti di lavoro** (Classificazione e requisiti delle aree di lavoro; *Clean Room* e relative Normative)
- **Radiofarmaci** (Concetti base di Radiochimica, Produzione di Radiofarmaci, Apparecchiature e macchinari per la diagnostica)
- **Anticorpi monoclonali** (Struttura e funzioni, Produzione industriale e nuove prospettive terapeutiche)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Programma:

- Applicazioni della **fluorescenza** e **bioluminescenza** in campo diagnostico medico e biologia molecolare.
- Breve introduzione su **metodologie computazionali**, focalizzandoci su applicazioni a scopi farmaceutici. *MM, MD, Drug Design, Docking Molecolare.*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Informazioni:

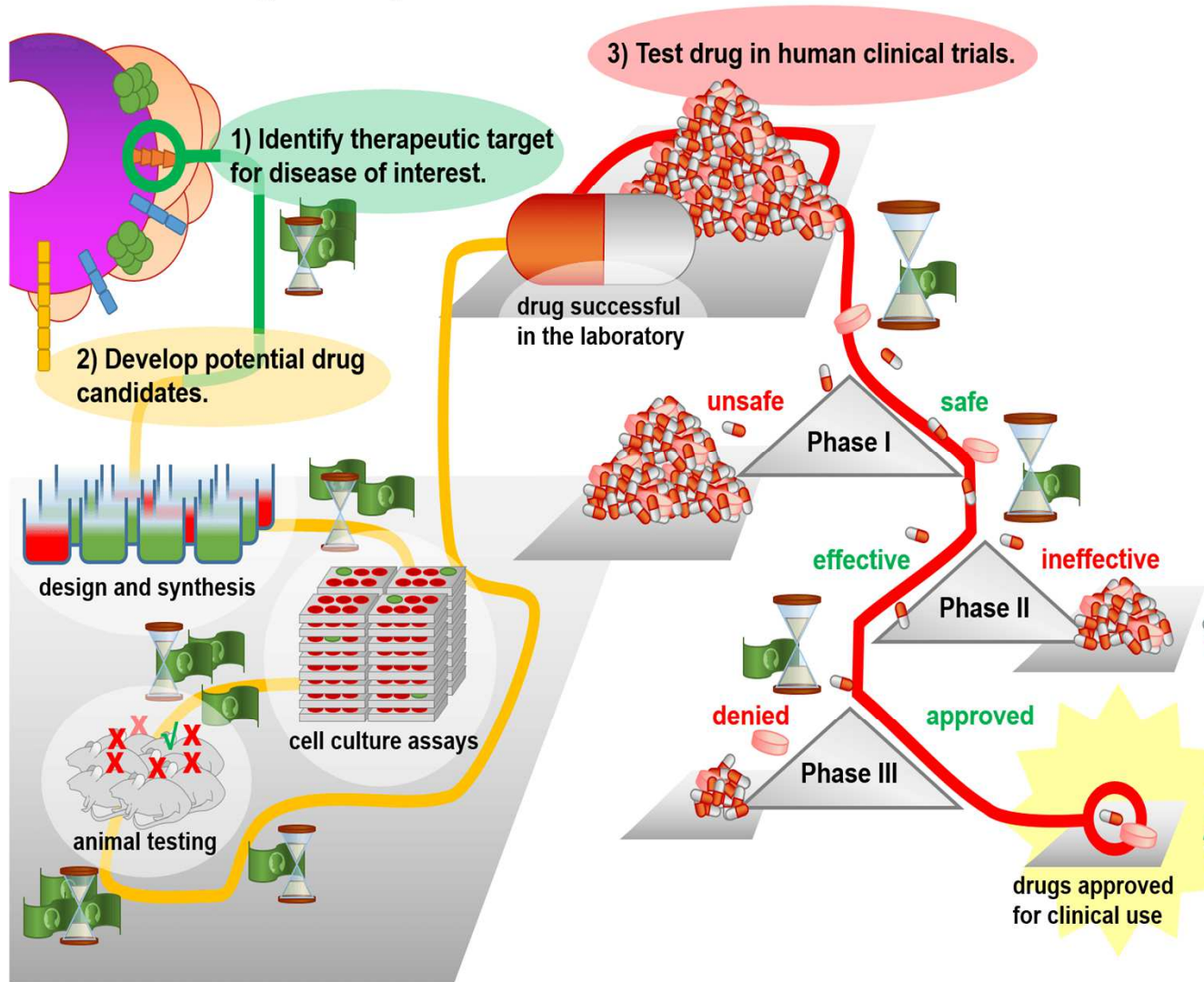
- **Lezioni: vedi allegato**

Mail: giuliani5@unisi.it

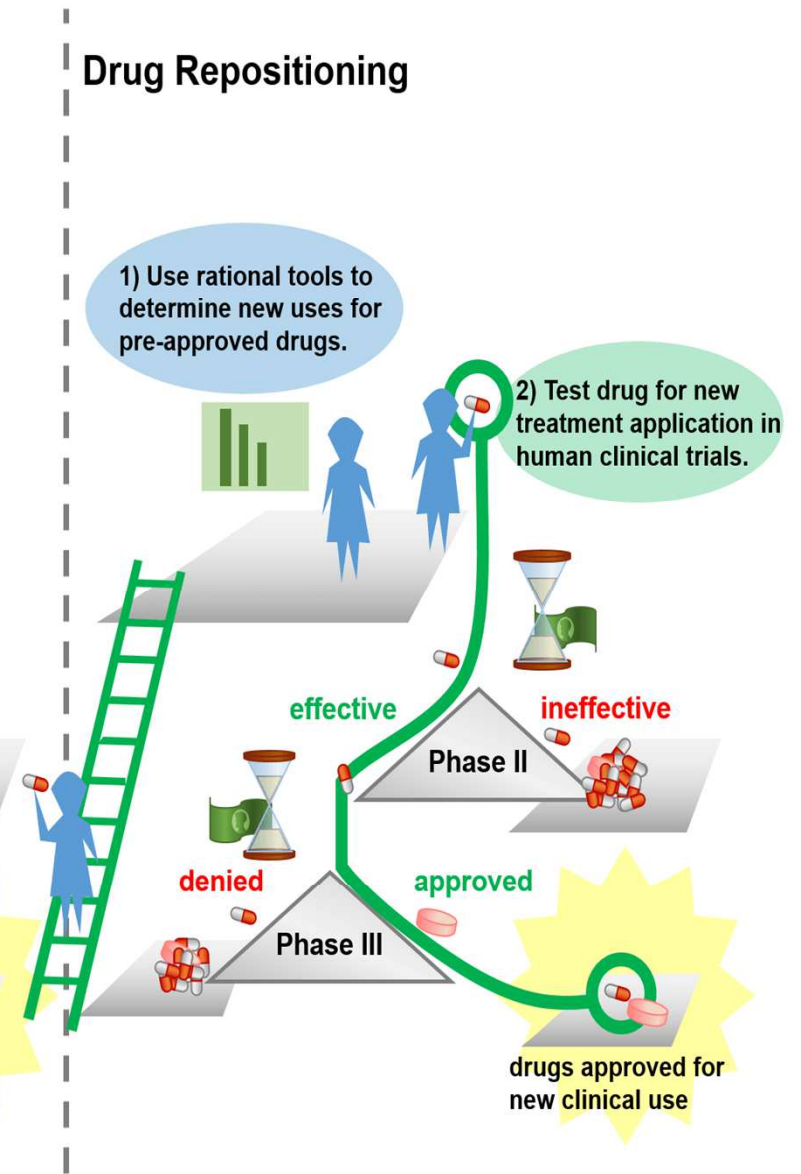
- Esami svolti esclusivamente durante sessioni ufficiali (2 appelli per studenti in corso; 1 appello per fuori corso).
- Anno 2025-26 materiale (diapositive) disponibili a fine lezioni.
- Web di riferimento per comunicazioni:
<https://docenti.unisi.it/it/giuliani>
- Testo consigliato: «La Fabbricazione Industriale dei Medicinali»
L.Fabris-A.Rigamonti. Soc.Editrice Esculapio.

Drug repositioning

Traditional Drug Development



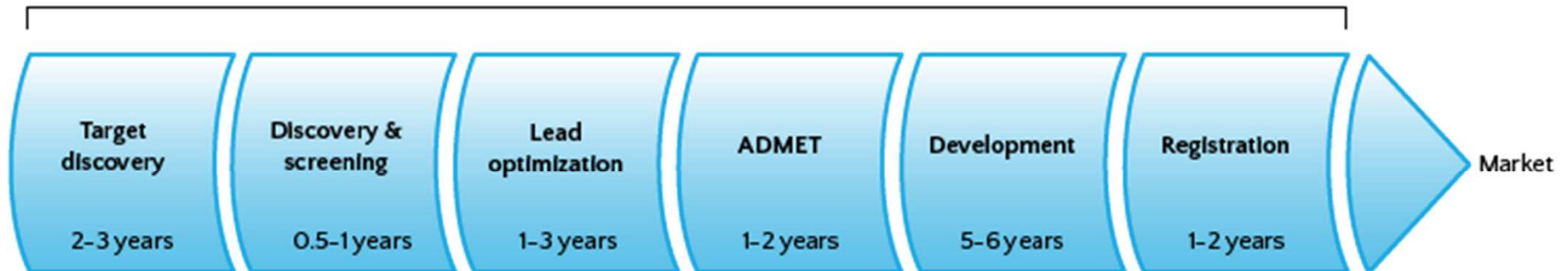
Drug Repositioning



Drug repositioning

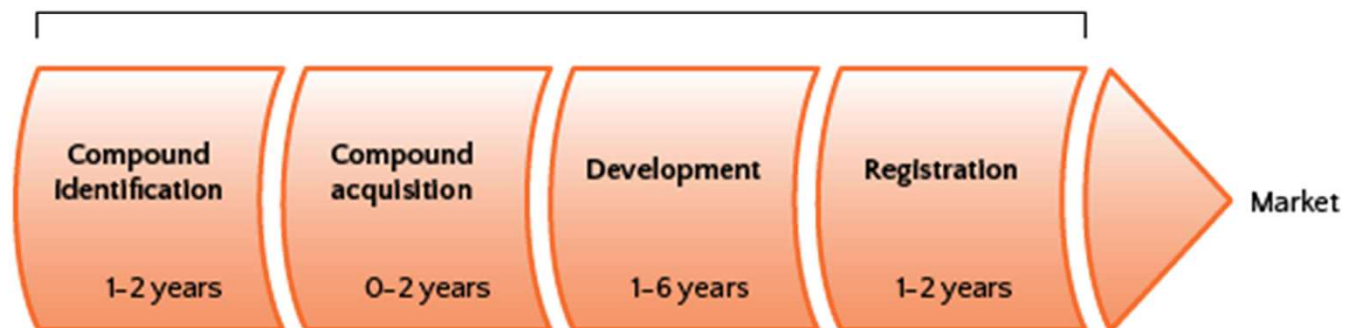
De novo drug discovery and development

- 10-17 year proces
- <10% overall probability of success



Drug repositioning

- 3-12 year proces
- Reduced safety and pharmacokinetic uncertainty



Sterilizzazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE**

Metodi di sterilizzazione:

- **Calore Umido** (Vapore saturo puro; Pioggia d'acqua surriscaldata; Miscela vapore+aria)
- **Calore secco** (Metodi discontinui o batch a circolazione forzata di aria calda; Metodi continui in tunnel a circolazione forzata di aria calda o ad irraggiamento diretto)
- **Ossido di Etilene** (Metodi in pressione con miscele di ETO non infiammabili; Metodi in pressione con ETO puro o sue miscele infiammabili)
- **Radiazioni ionizzanti** (Radionuclidi β e γ emettitori, raggi X, acceleratore di elettroni)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE**

Obiettivi della sterilizzazione: Distruzione o inattivazione dei microrganismi presenti su un oggetto o in una preparazione. Se la preparazione è già ripartita nel suo contenitore primario, si parla di sterilizzazione terminale.

Sterilità: Assenza assoluta di microorganismi vitali.

Sterile: La definizione di «oggetto sterile» in quanto sottoposto ad un adeguato processo di sterilizzazione è PROBABILISTICA. Se in base ad una trattazione statistica si è in grado di dimostrare che non più di 1 unità su 1.000.000 trattate *può non aver raggiunto* la sterilità.



Oggetto o preparazione sterile

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE**

Sterile: Questa condizione è espressa mediante algoritmi, PNSU (*Probability of Non Sterile Unit*) o il più recente SAL (*Sterility Assurance Level*).

Bisogna conoscere le condizioni iniziali di:

Popolazione microbica,

Composizione,

Resistenza al trattamento da utilizzare.

Ma anche:

Programma di sterilizzazione opportunamente CONVALIDATO,
Affidabilità e Riproducibilità dei parametri della convalida con gli strumenti dell'impianto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE**

Pirogeni: La «distruzione» dei microrganismi con trattamenti di sterilizzazione comporta la formazione di pirogeni ed endotossine che possono aggiungersi a quelle eventualmente già presenti nella preparazione .

Quindi limitare il più possibile il *bioburden* di preparazioni/materiali da portare alla sterilizzazione. In questo modo riduciamo anche la drasticità di trattamento, evitando problematiche relative alla stabilità chimica stessa dei prodotti.

- Controllo microbiologico di tutti i componenti delle preparazioni (con particolare attenzione al solvente, in genere acqua)
- Pulizia accurata di tutte le macchine ed attrezzature coinvolte nel processo

«**Bioburden** is normally defined as the number of bacteria living on a surface that has not been sterilized”

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **ELIMINAZIONE DI MICRORGANISMI**

La necessità di una bassa carica microbica è evidente, considerando la patogenicità di alcuni microrganismi. I microrganismi inoltre a causa della loro attività enzimatica possono determinare notevoli alterazioni nei principi attivi e nelle forme farmaceutiche.

Pirogeni: se iniettati per via endovenosa, possono provocare varie reazioni avverse come rialzo termico, aumento della pressione arteriosa, vasocostrizione cutanea e nei casi più gravi shock settico letale. Essi sono costituiti per la maggior parte da endotossine, molecole proteiche ad alto peso molecolare prodotte dal metabolismo o dalla degradazione cellulare di batteri per lo più Gram-negativi tipo *Escherichia Coli*, *Streptococcus faecalis* ecc. Sono solubili in acqua e resistenti al calore.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

D, tempo di decadimento decimale (o decadale)

E' stato determinato sperimentalmente che la reazione di degradazione termica dei microrganismi segue una cinetica di primo ordine (riconducibile ad una reazione di degradazione chimica):

$$\text{Log } (N_0/N) = t / D;$$

$$\text{Log } N_0 - \text{Log } N = t / D;$$

$$N = N_0 \cdot 10^{(-t/D)}$$

**Ad una data T costante,
la velocità di reazione è proporzionale, in ogni
momento, solo alla quantità di microrganismi
ancora da degradare.**

Dove:

N_0 = popolazione iniziale microrganismi ($t=0$)

N = popolazione microrganismi al tempo t

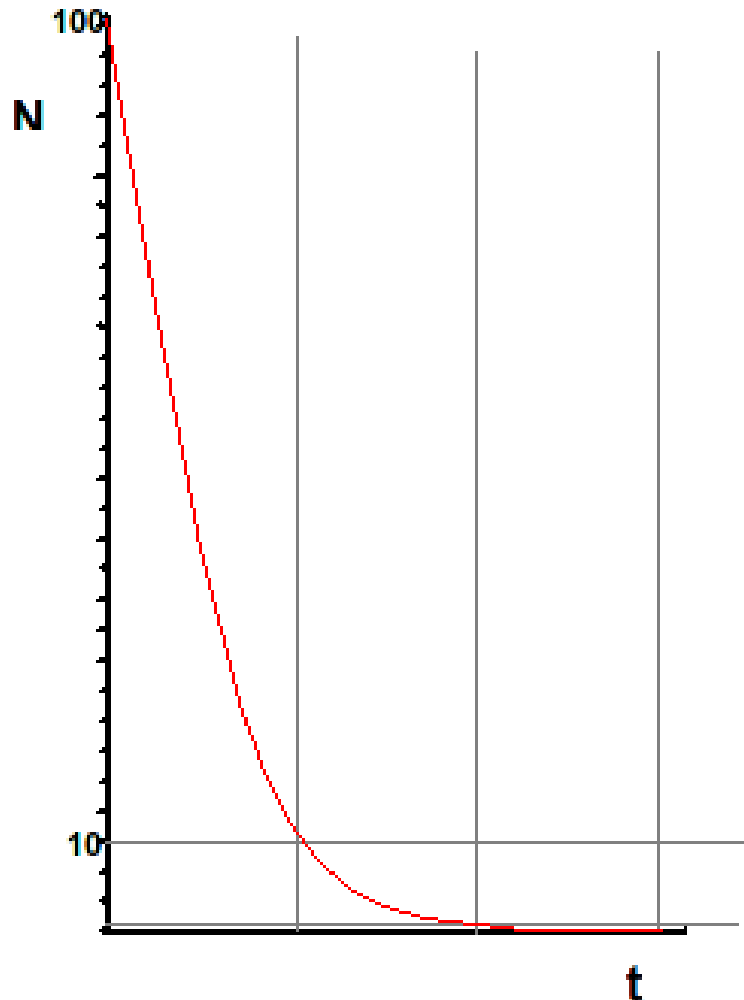
D = tempo di decadimento decimale

t = tempo di esposizione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

D, tempo di decadimento decimale (o decadale)



Andamento della riduzione delle cellule attive trattate per tempi diversi ad una medesima temperatura

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

D, tempo di decadimento decimale (o decadale)

D è il tempo espresso in minuti primi necessario perché la popolazione di m.o. si riduca ad un decimo di quella iniziale. In pratica, è la velocità della reazione di sterilizzazione.

D è funzione:

- Della temperatura di sterilizzazione ($f(T)$)
- Della specie microbica considerata

D, definita anche come valore di resistenza (*resistance value*) ed è normalmente riferita alla T di 121,11°C (pari a 250°F), per comodità 121°C.

D_{121} compreso tra 0.05 e 1.0 minuti. Quando una specie microbica non è nota (quindi non si conosce D per essa) si assume come valore cautelativo $D=1.0'$

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

D, tempo di decadimento decimale (o decadale)

- $D_{121} = 1.0'$
- Poniamo popolazione iniziale (N_0) sia di 10^3 , avremo andamento del tipo:

Dopo 3' popolazione ridotta a 1 m.o.

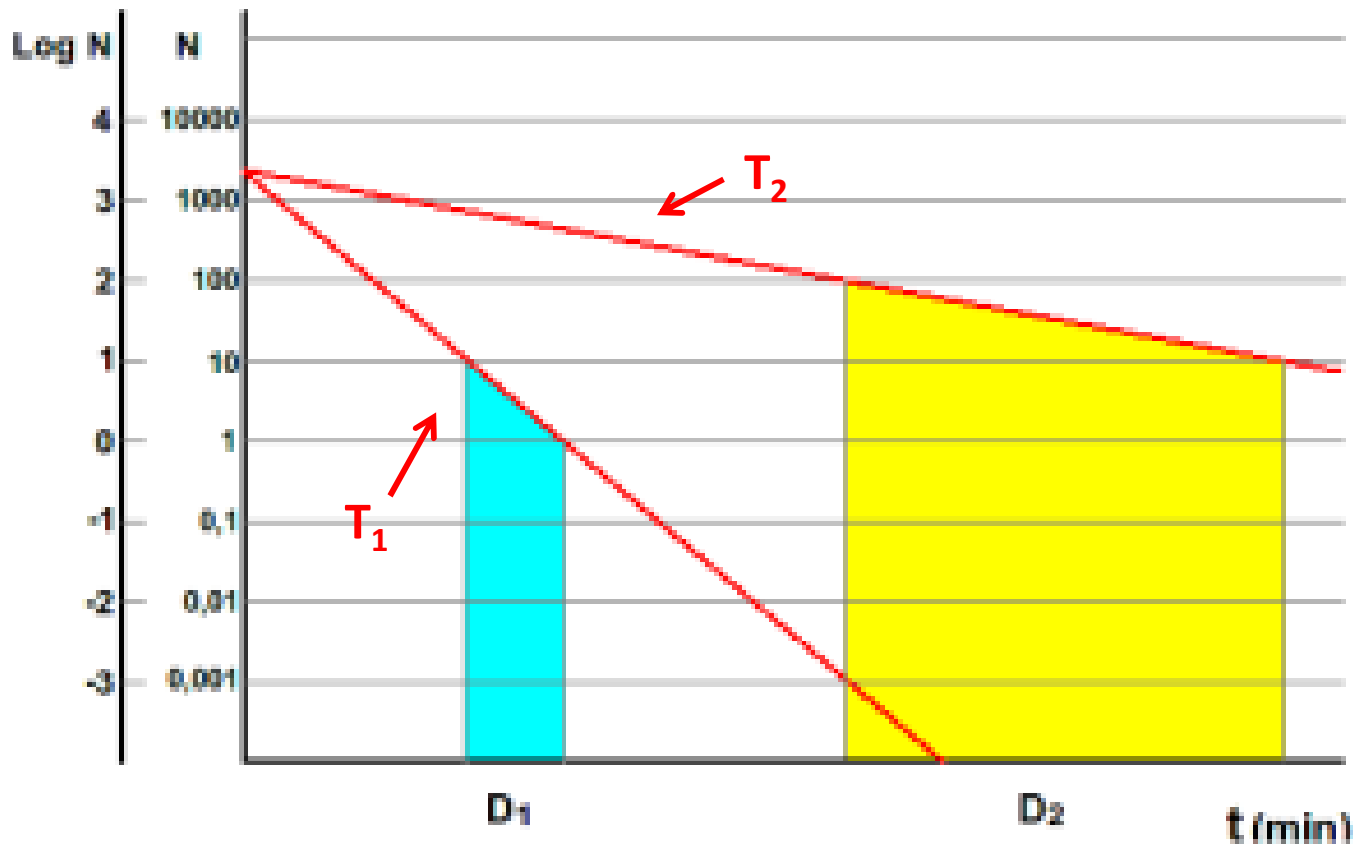
Dopo ulteriore 1' 0.1 m.o. non ha più senso riferirsi ad unità microbiche, bensì considerare che la probabilità che l'unità trattata sia tuttora non sterile è 1 contro 10.

Dopo ulteriori 5' abbiamo ottenuto la probabilità di $1/10^6$ che corrisponde esattamente al *requisito minimo* richiesto dal PNSU/SAL per definire «sterile» l'unità.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

D, tempo di decadimento decimale (o decadale)



Calcolo dei minuti necessari (**D-value**) per inattivare, a due determinate temperature ($T_1 > T_2$), il 90% degli individui

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

z, coefficiente di temperatura

Esprime di quanti gradi si deve variare la T di sterilizzazione per provocare una variazione di 10 volte del valore di D.

Tale variazione si ottiene con una variazione di T mediamente di 10°C (z= 10°C), il che ci indica come sia conveniente alzare significativamente la T diminuendo la durata del processo di sterilizzazione (es. metodo UHT-Ultra High Temperature- per il latte).

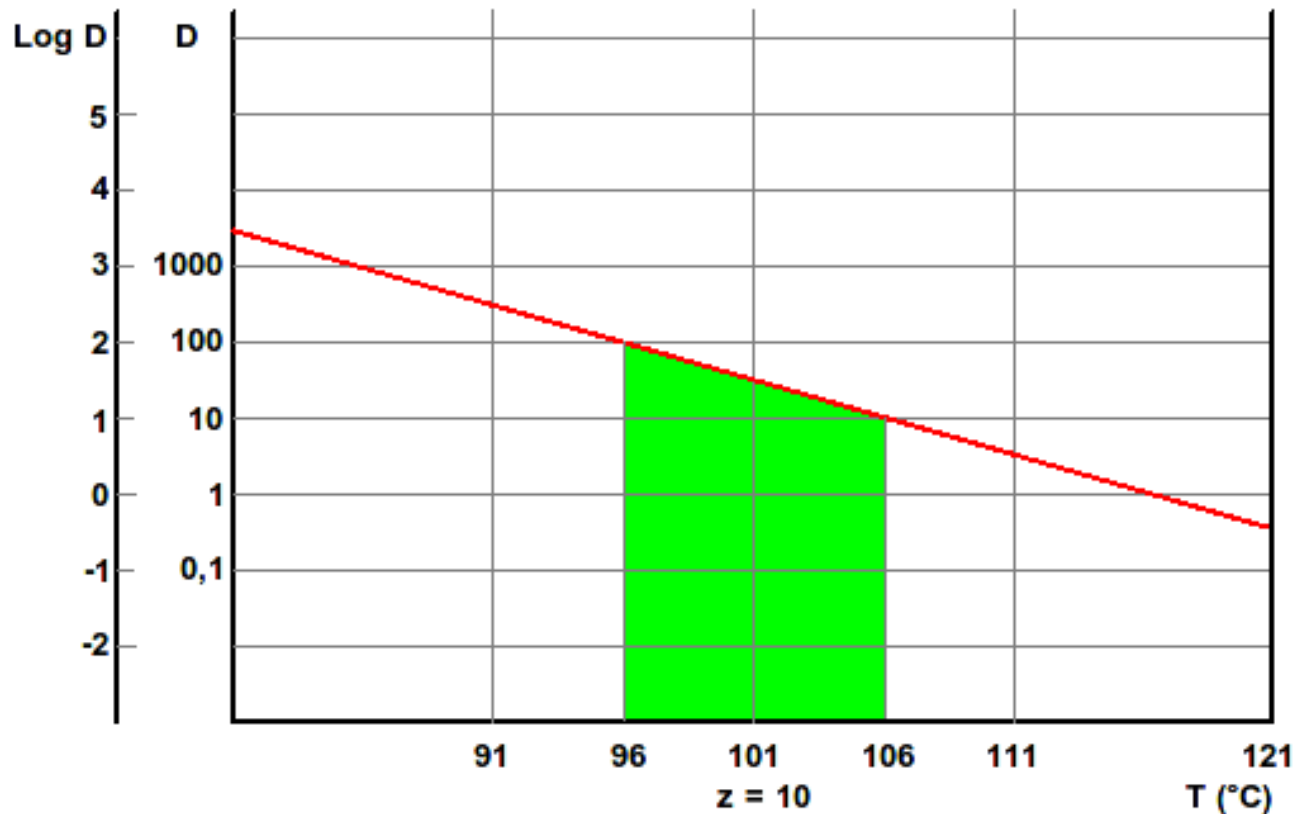
z dipende da T

z dipende dalla specie microbica

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

z, coefficiente di temperatura



Calcolo della variazione di gradi (z-value) necessaria per ridurre o aumentare di 10 volte il D-value

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

Valore F_0 detto anche **Tempo di Morte Termica** (*Thermal Death Time*, abbreviato in **TDT**)

Utile parametro per valutare l'effetto letale di una sterilizzazione **effettuata ad una qualsiasi T o a temperature non costanti.**

$$F_0 = \Delta t * 10^{(T-121/z)}$$

Dove:

T = temperatura di sterilizzazione

$\Delta t = 60 \text{ sec.} = 1 \text{ minuto}$

Z = 10°C

Indica come non sia importante la T, ma l'effetto letale deve rimanere il medesimo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **CINETICA DELLA STERILIZZAZIONE**

- Valore F_0 riferito a 121°C ma utile per determinare il tempo di esposizione ad una diversa T.
- **NB** Queste valutazioni in forma semplificata (*ideale*) valgono solo per la sterilizzazione a caldo umido. Discorso più *complesso* per trattamenti a calore secco.

Ad esempio:

- Vogliamo sterilizzare un prodotto a 115°C ($Z = 10^\circ\text{C}$)
- $F_0 = 1 \times 10^{(T-121) / z}$ (risultato per 121°C = 1 min)
- $F_0 = 1 \times 10^{(115-121) / 10}$
- $F_0 = 1 \times 10^{(-0.6)} = 3.98$ minuti

Quindi per avere stesso effetto letale a 115°C bisogna sterilizzare il prodotto per 3.98 minuti.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Temperatura e umidità

Presenza di acqua, allo stato di *vapore* oppure di *liquido* alla temperatura adeguata.

Metodo diretto: il vapore arriva direttamente sulle superfici contaminate di un oggetto solido, che può essere permeabile al vapore (come una busta o un cestello)

Metodo indiretto: sterilizzazione di una soluzione acquosa contenuta in un recipiente chiuso ed impermeabile al vapore (ad es. una fiala di vetro). In questo caso il vapore sterilizza direttamente soltanto l'esterno della fiala, ma porta alla sua temperatura anche la soluzione acquosa che si «autosterilizza» e , generando una tensione di vapore al suo interno, sterilizza anche le superficie interne non bagnate direttamente dalla soluzione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Temperatura e umidità

Vantaggi:

- Procedura ben regolamentata, a livello normativo e consultivo;
- Cinetica ben nota;
- Ottimo compromesso di affidabilità e flessibilità;
- Costi di apparecchiature e gestione ragionevoli;

Svantaggi:

- Temperatura operativa piuttosto alta (no materiali termolabili);
- Materiali sterilizzati devono essere in grado di tollerare le pressioni che il metodo comporta (pressioni esterno/interno di contenitori chiusi contenenti le soluzioni)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Produzione del vapore? GENERATORI DI VAPORE (CALDAIE)

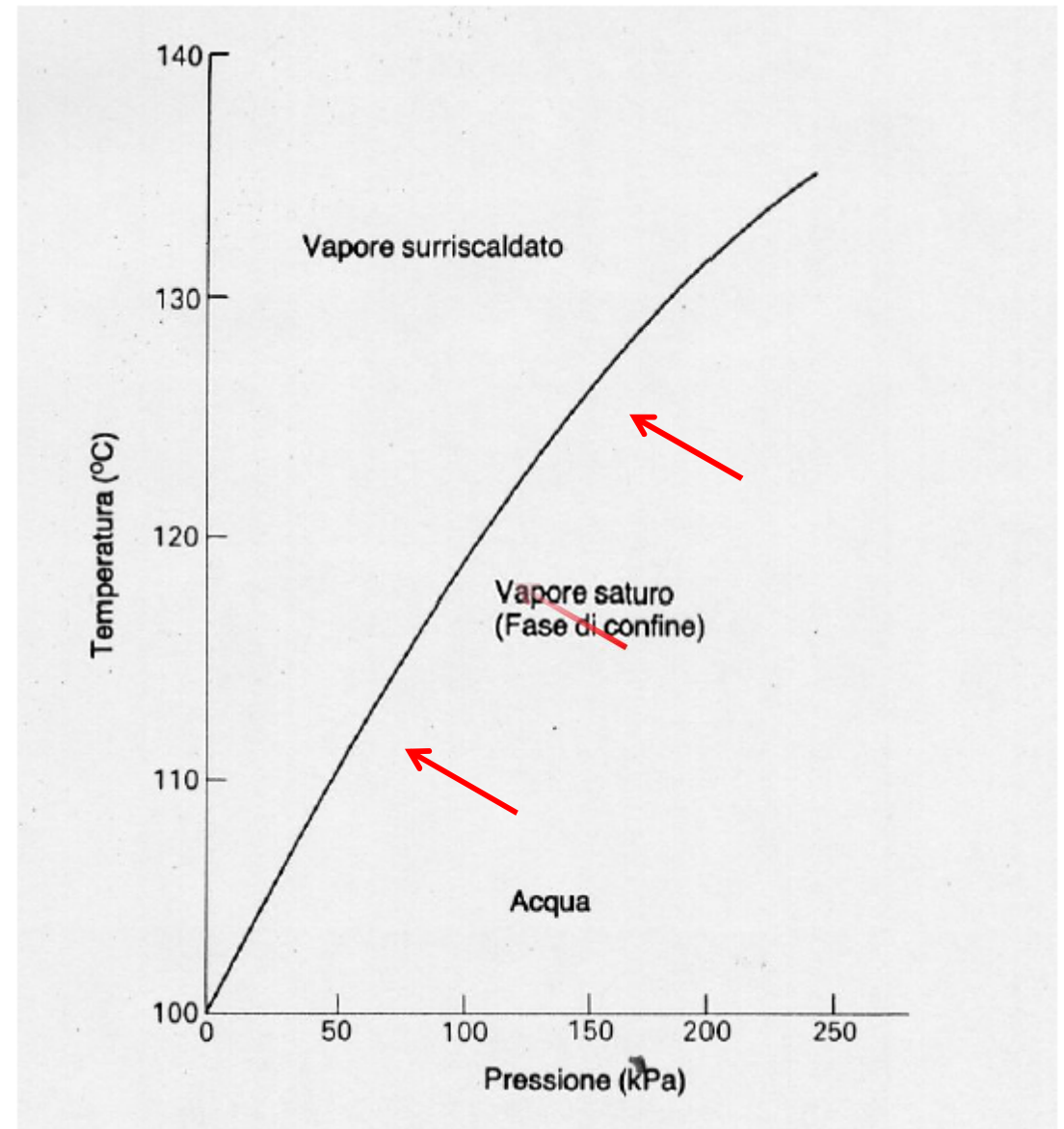
La sterilizzazione col calore umido prevede l'uso di vapore acqueo; poiché le temperature richieste per la sterilizzazione con questo metodo sono comprese tra i 115 e 134°C il vapore deve essere sotto pressione.

Temperatura (°C)	Pressione del vapore	
	kPa	psi
115	69	10
121	103	15
126	138	20
134	207	30

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Inoltre il vapore deve essere «satturo» e puro (senza aria). Il vapore è saturo quando si trova in equilibrio termodinamico con l'acqua da cui viene prodotto. Solo in queste condizioni è in grado di sterilizzare.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caratteristiche del vapore come agente sterilizzante:

- E' capace di cedere elevate quantità di energia perché nel cambiamento di stato cede le sue elevate calorie di condensazione (1 kg di vapore che condensa a 121°C cede 525 kcal);
- In termodinamica, il **calore latente** è la quantità di energia scambiata (sotto forma di calore) durante lo svolgimento di una transizione di fase (o "passaggio di stato").
- Le calorie vengono cedute a temperatura costante (T di condensazione) ed il vapore si trasforma in acqua liquida alla stessa T del vapore condensante;

Temperatura di vapore saturo (°C)	Contenuto in calore (kJ/kg)		Latente (come % del calore totale)
	Misurato	Latente	
115	483	2216	82
121	505	2202	81
126	530	2185	80
134	561	2164	79

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caratteristiche del vapore come agente sterilizzante:

- Il vapore condensandosi si contrae di quasi 1000 volte, che determina una pressione negativa che richiama altro vapore (è importante che non ci sia aria)
- La condensa tende a spostarsi spontaneamente sul fondo, dove è facilmente rimuovibile;

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Perché assenza di aria (e CO₂)?

- E' indispensabile eliminare l'aria inizialmente presente in camera.
- A parità di T e P, l'aria ha una densità circa 1.7 volte maggiore del vapore e tende a stratificarsi sul fondo della camera generando gradienti di temperatura (*sacche d'aria*).
- Con le pompe a vuoto, si riesce a produrre un vuoto al massimo di 60-80 mbar residui (6-8% dell'aria inizialmente presente rimane in camera).
- Per eliminarla si usa la metodologia del vuoto pulsato, che consiste nel raggiungere il limite della pompa a vuoto e poi immettere nella camera vapore fino a pressione atmosferica, quindi si ripete la precedente fase di vuoto. Ripetendo queste pulsazioni vuoto/vapore 3 o più volte si riesce ad eliminare completamente l'aria.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Perché assenza di aria (e CO₂)?

- La CO₂ comporta i medesimi inconvenienti dell'aria, anzi peggio poiché è più densa della stessa.
- La CO₂ fa parte di quei *gas non condensabili* (NCG) che derivano dal fatto che l'acqua utilizzata per produrre vapore non è stata degasata a dovere (vedere caratteristiche dell'acqua dell'industria farmaceutica).

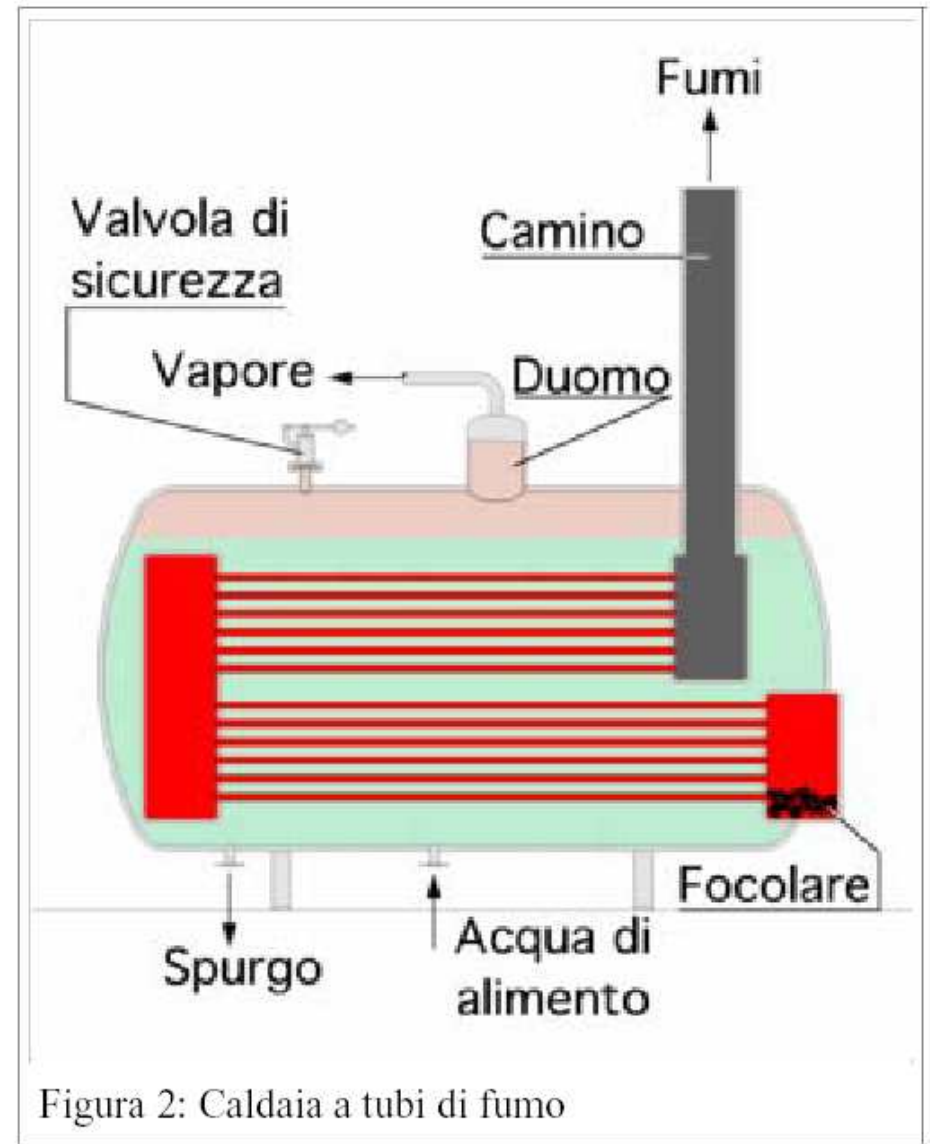
Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori) a tubi di fumo



Focolare-camera a forma di grosso cilindro dove avviene la combustione di gas o combustibile liquido
I *fumi caldi* si raccolgono dalla parte opposta del bruciatore e vengono inviati ad una serie di tubi di piccolo diametro che permettono un intimo scambio di calore.



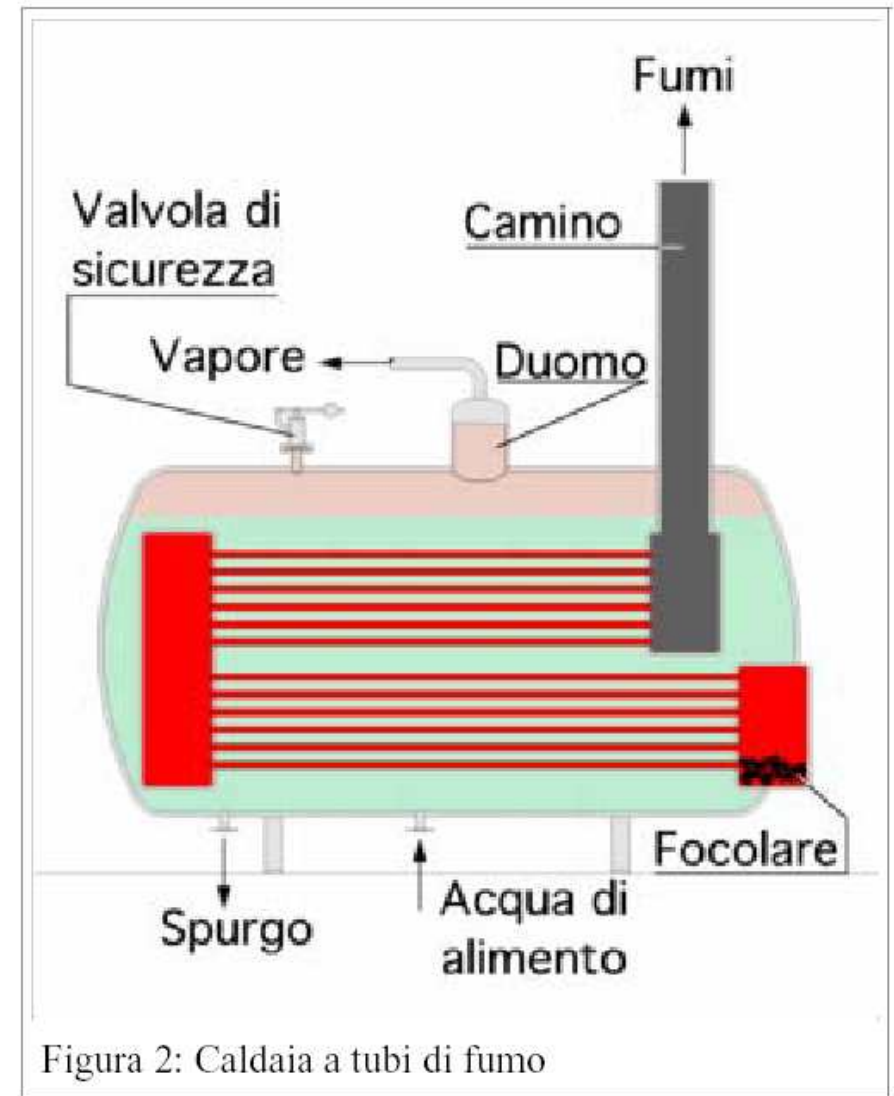
Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori) a tubi di fumo

Dopo aver percorso questi tubi nel senso opposto a quello percorso nella camera principale, i fumi vengono inviati al camino per l'espulsione nell'atmosfera.

Duomo-è di fatto una camera di calma nella parte alta del generatore in cui si ottiene una separazione per gravità del vapore (leggero) dalle goccioline d'acqua (pesanti) che vengono trascinate dal vapore stesso.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori) a tubi di fumo

I fumi devono lasciare il camino ad una temperatura superiore a 100°C onde evitare la condensazione del vapore d'acqua formatosi durante la combustione: *acqua e anidride solforosa* presente nei fumi darebbe luogo alla formazione di *acido solforico* con corrosione rapida di tutte le parti metalliche.

Il tiraggio dei fumi è detto **forzato** quando è la pressione del bruciatore a provocarne la fuoriuscita. E' detto **indotto** quando i fumi sono aspirati dalla caldaia per mezzo di un sistema ad induzione (non un comune ventilatore che andrebbe fuori uso per eccesso di temperatura).

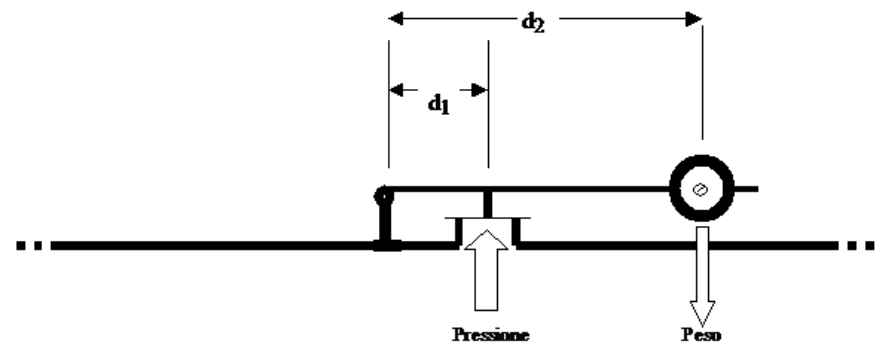
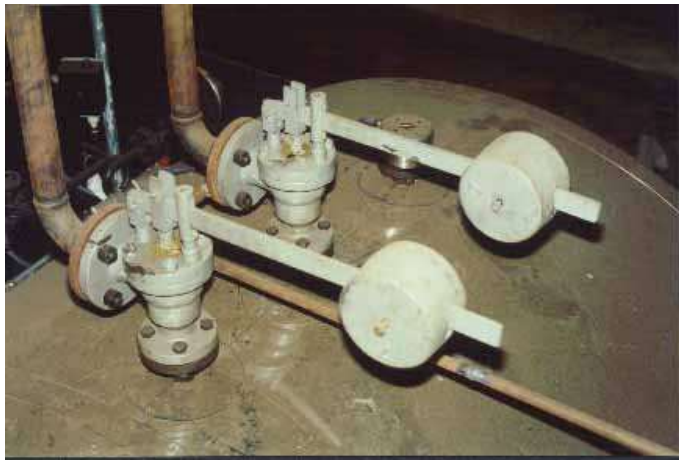
Aspiratori gas di scarico



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Valvole di sicurezza



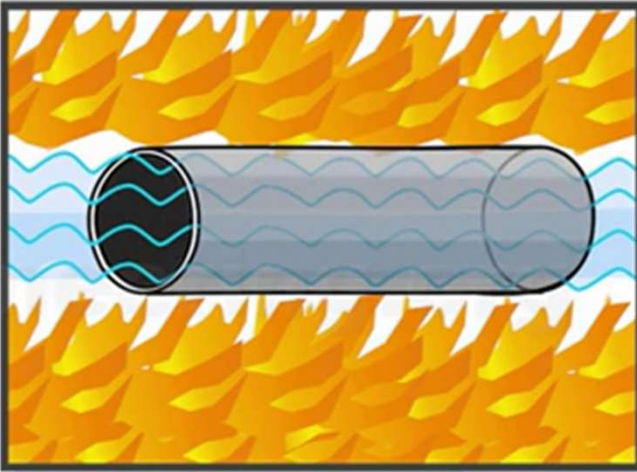
SCHEMA DI UNA VALVOLA DI SICUREZZA

(Leva di terzo grado)

Leve di terzo grado: la forza motrice (potenza) è tra il fulcro e la forza resistente; sono sempre svantaggiose.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO Caldaie (o generatori) a tubi d'acqua



Il fascio di tubi è direttamente investito dai gas di combustione che si originano dal focolare sottostante. Sono caldaie costituite da un'ampia camera di combustione completamente rivestita all'interno di materiale refrattario. I tubi di piccolo diametro sono percorsi dall'acqua il cui movimento è provocato dai *moti convettivi*.

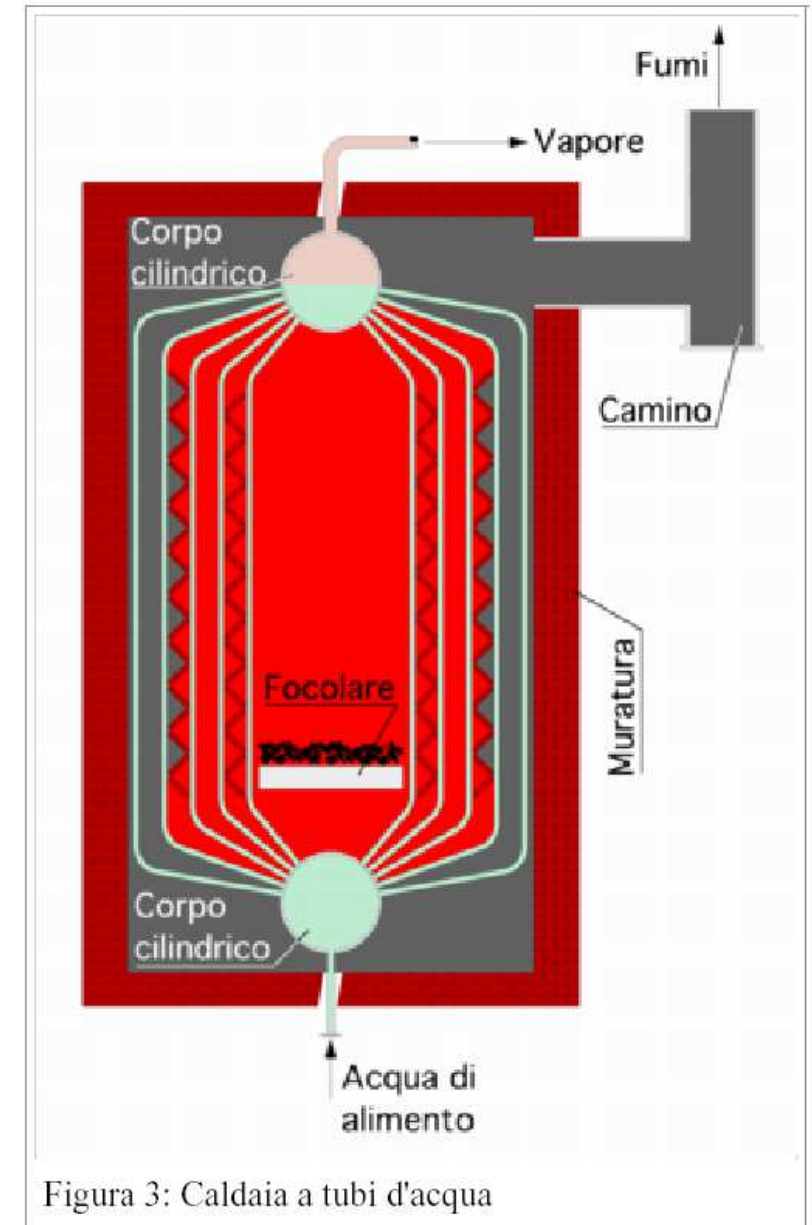
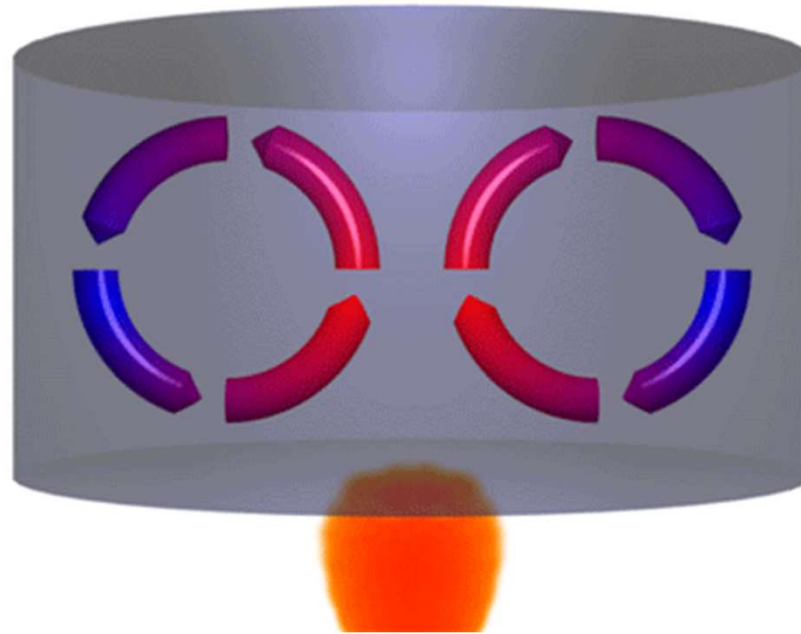


Figura 3: Caldaia a tubi d'acqua

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO Caldaie (o generatori) a tubi d'acqua



Moti convettivi : riscaldata dal basso, l'acqua più calda e meno densa, per il **principio di Archimede** galleggia su quella più fredda e si muove verso l'alto per perdere calore a contatto con la superficie, mentre, al contrario, l'acqua più fredda e densa in superficie affonda verso la zona più calda vicina alla fiamma per riscaldarsi.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori) a tubi d'acqua

I tubi partono ed arrivano ad un serbatoio di acqua generalmente posto in alto. La posizione dei tubi obbliga i fumi ad un percorso tortuoso prima di raggiungere il camino, così da migliorare lo scambio termico.

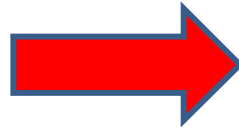
Confronto fra i due tipi di caldaie:

Caratteristiche caldaie	A tubi di fumo	A tubi d'acqua
Ingombro per la stessa produzione di vapore	Alto	Basso
Tempi di messa a regime	Lunghi	Medi
Capacità di far fronte a richieste di vapore variabili nel tempo	Ottima	Media
Produzione di vapore specifica	18-25 Kg/h m ²	30-100 Kg/h m ²
Pressione di esercizio	Bassa	Alta
Rendimento termico	Basso	Elevato
Potenza	Bassa	Elevata

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori di vapore)



Autoclavi per sterilizzazione

Il vapore in uscita dalla caldaia viene trasportato (ad alta pressione) ai reparti di lavorazione ove sono presenti le autoclavi tramite *tubazioni in acciaio* esternamente coibentate e provviste di compensatori di dilatazione. Mediante appositi riduttori il vapore viene portato alla pressione di utilizzo , generalmente 2-3 bar.

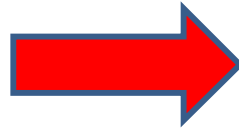
E' molto importante che il vapore in uscita mantenga inalterato il suo contenuto termico, tramite:

- Corretto dimensionamento della linea di distribuzione;
- Esatta scelta della P d'alimentazione degli apparecchi utilizzatori;
- Coibentazione della linea di distribuzione;
- Adeguato drenaggio di eventuali particelle d'acqua portate dal vapore

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Caldaie (o generatori di vapore)



Autoclavi per sterilizzazione

Corretto dimensionamento della linea di distribuzione.

Tre i parametri principali che determinano il dimensionamento:

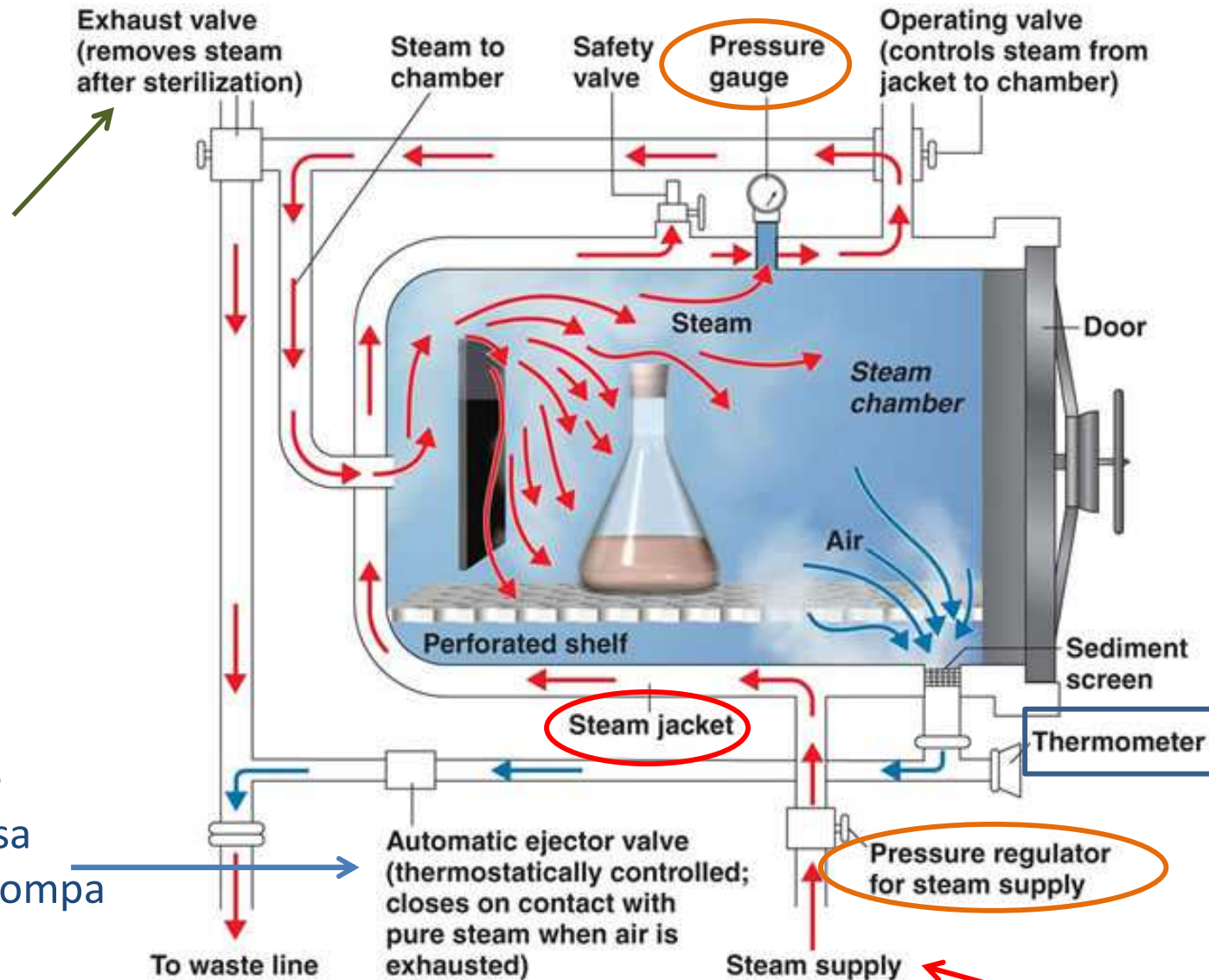
- Portata;
- Velocità;
- Perdite di carico;

Le tubazioni devono avere una leggera pendenza (1-4 mm per metro lineare) nel senso del flusso del vapore. Tale pendenza può essere assicurata solo con l'installazione di *giunti di dilatazione* che neutralizzano le distorsioni ed i disassamenti dovuti alla dilatazione termica.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Schema di una Autoclave



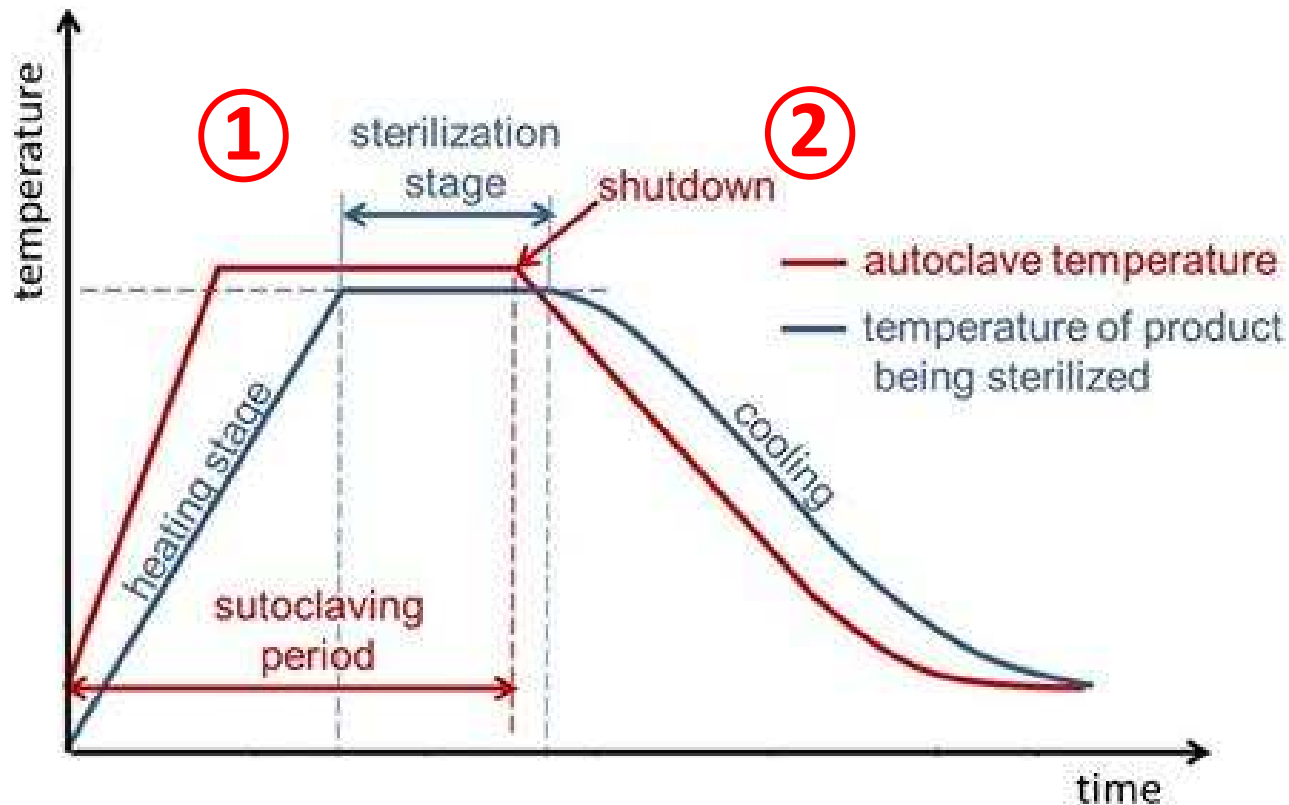
Valvola
eliminazione
aria/condensa
collegata a pompa
a vuoto
(scarico dinamico)

Vapore da caldaia

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

FASI Sterilizzazione



① Fase di riscaldamento/sterilizzazione

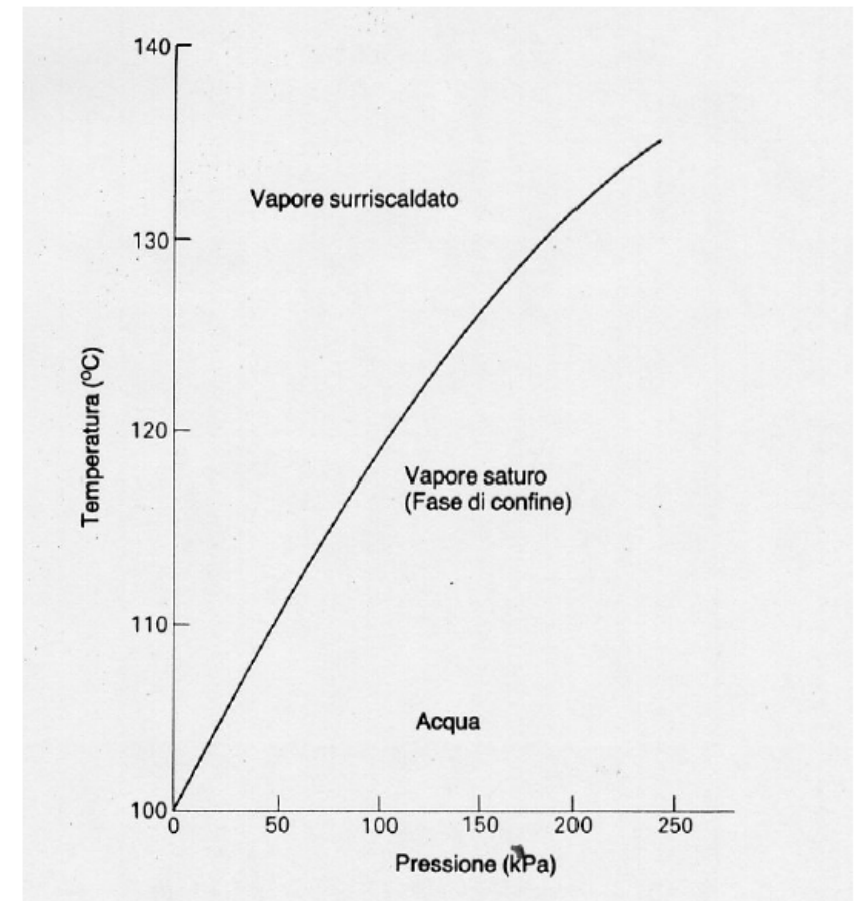
② Fasi post-sterilizzazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

FASI Sterilizzazione

L'utilizzo di vapore saturo puro come agente sterilizzante permette di avere una **relazione biunivoca tra temperatura e pressione**. Nel diagramma di stato la condizione di vapore saturo è rappresentata da una linea, ciò significa che scelta la temperatura del vapore, la sua pressione risulta automaticamente determinata e viceversa. Se si decide di sterilizzare a 121 °C la pressione del vapore saturo sarà inevitabilmente di 2.05 bar assoluti; se si sterilizza ad una pressione di 3.04 bar assoluti la temperatura corrispondente del vapore sarà 134°C.



Temperatura (°C)	Pressione del vapore	
	kPa	psi
115	69	10
121	103	15
126	138	20
134	207	30

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Fase di riscaldamento/sterilizzazione

- Eliminata l'aria inizia la fase di riscaldamento, durante la quale si formano notevoli q.tà di condensa che si raccolgono sul fondo della camera: i carichi e i relativi sistemi di supporto devono favorire lo scolo di tale condensa tramite l'opportuno orifizio.
- Fase di sterilizzazione (o mantenimento) vero e proprio
- La camera è avvolta da una intercapedine (*seconda camera*) che risulta abitualmente riempita di vapore con una regolazione indipendente da quella, più raffinata della camera di sterilizzazione.

Gli **scopi** di questa intercapedine sono:

- Preriscaldare e mantenere calda la camera durante le fasi di carico/scarico;
- Agire come **elemento di termostatazione**;
- Collaborare a fornire al carico (ad es. fase di asciugatura sotto vuoto) l'energia d' evaporazione della condensa che bagna il carico.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Fase post sterilizzazione

Dipende dal carico trattato e dal programma adottato.

- Vuoto finale di asciugamento/raffreddamento (*fase tipica per carichi di materiali solidi, porosi o non*). Si realizza rimettendo in funzione la pompa a vuoto per un tempo adeguato e prefissato.
- Raffreddamento mediante circolazione di acqua fredda in intercapedine, previa pressurizzazione della camera con aria sterile allo scopo di scacciarne il vapore e di migliorare lo scambio termico carico-intercapedine. *Fase tipica per mezzi di coltura contenuti in recipienti aperti o tappati con sistemi non a tenuta.*
- Raffreddamento mediante nebulizzazione d'acqua DI direttamente sul carico. T di raffreddamento piuttosto alta (80°C) perché il carico, una volta estratto dall'autoclave, contenga sufficiente energia per evaporare spontaneamente l'acqua che lo bagna. *Fase tipica per fiale di vetro di non grandi dimensioni contenenti soluzioni e che possono tollerare pressioni differenziali.*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Sovrappressioni interne durante la sterilizzazione di recipienti chiusi contenenti soluzioni.

Una fiala di vetro (o flacone) contenente una soluzione presenta un «*volume di testa*» d'aria o altro gas. Tale volume è indispensabile anche perché, in sua assenza, il contenitore si romperebbe in sterilizzazione per la dilatazione termica dell'acqua non compensata dalla modesta dilatazione del vetro.

Quando il contenitore viene chiuso la pressione del volume di testa è pari a quella atmosferica (1.0 bar/atm).



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Sovrappressioni interne durante la sterilizzazione di recipienti chiusi contenenti soluzioni.

Quando inizia il riscaldamento fino a 121°C si originano i seguenti fenomeni:

- La pressione del volume di testa aumenta fino ad un valore di 1.30-1.35 bar;
- La soluzione acquosa genera una pressione parziale di vapor d'acqua corrispondente alla tensione di vapore di esso a tale temperatura, ovvero 2.05 bar che sommatasi alla pressione parziale dell'aria produce una pressione totale di 3.35-3.40 bar;
- In realtà la pressione aumenta maggiormente (3.50 bar) perché la soluzione si dilata col riscaldamento mentre il vetro meno e i gas eventualmente disciolti dalla soluzione tendono ad uscirne con il riscaldamento.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Sovrappressioni interne durante la sterilizzazione di recipienti chiusi contenenti soluzioni.

Quindi abbiamo 3.50 bar contro una pressione operativa in autoclave di 2.05 bar.

Questa differenza provoca una PRESSIONE DIFFERENZIALE dall'interno della fiala verso l'esterno nell'ordine dei 1.40 bar (per un tappo di 4 cm² di sezione abbiamo una forza di quasi 6 kg).

- Rischio di rottura per fiale di notevoli dimensioni (soprattutto se a frattura prestabilita)
- Rischi di rottura e di sollevamento dei tappi per flaconi di vetro e vials
- Sterilizzazione inapplicabile per contenitori di plastica che si deformerebbero irrimediabilmente per la pressione differenziale (blister, siringhe preriempite, barattoli con tappi/coperchi di notevoli dimensioni, ecc.)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Sovrappressioni interne durante la sterilizzazione di recipienti chiusi contenenti soluzioni.

PARTICOLARE ATTENZIONE ALLA FASE DI RAFFREDDAMENTO

Infatti molti pericolosi inconvenienti avvengono quasi sempre per un insufficiente raffreddamento prima dello scarico. Per le fiale di vetro ad una temperatura di 95°C corrisponde ancora una pressione di 2.10 bar, di conseguenza se scaricate troppo presto saranno sottoposte ad una doppio shock sia termico che pressorio (a 25°C e 1 bar). È molto probabile che qualche fiala tensionata non tolleri questa situazione e scoppi (coinvolgendo per «simpatia» anche altre fiale).

È quindi importante che la temperatura della soluzione si sia abbassata almeno a 70-80 °C prima di estrarre il carico dall'autoclave, anzi prima di aprire la porta dell'autoclave.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Fase post sterilizzazione

- Per *flaconi/flaconcini di vetro chiusi contenenti soluzioni e per fiale di vetro di notevoli dimensioni o con frattura prestabilita*, non sono possibili fasi di raffreddamento senza una pressurizzazione della camera con aria (in generale ben oltre la P di sterilizzazione) e la si mantiene per tutto il raffreddamento.

«Test tenuta fiale» è una fase post-sterilizzazione di controllo.

Penetrazione di soluzioni colorate (*blu di metilene*):

- Vuoto spinto in camera
- Allagamento della camera con soluzione acquosa colorata fino a coprire il carico
- Pressurizzazione della soluzione colorata per penetrare le fiale non a tenuta;
- Scarico soluzione colorata;
- Lavaggio fiale con ulteriori allagamenti;
- Scarico delle fiale e **controllo**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Fase post sterilizzazione

«Vuoto rapido post sterilizzazione»

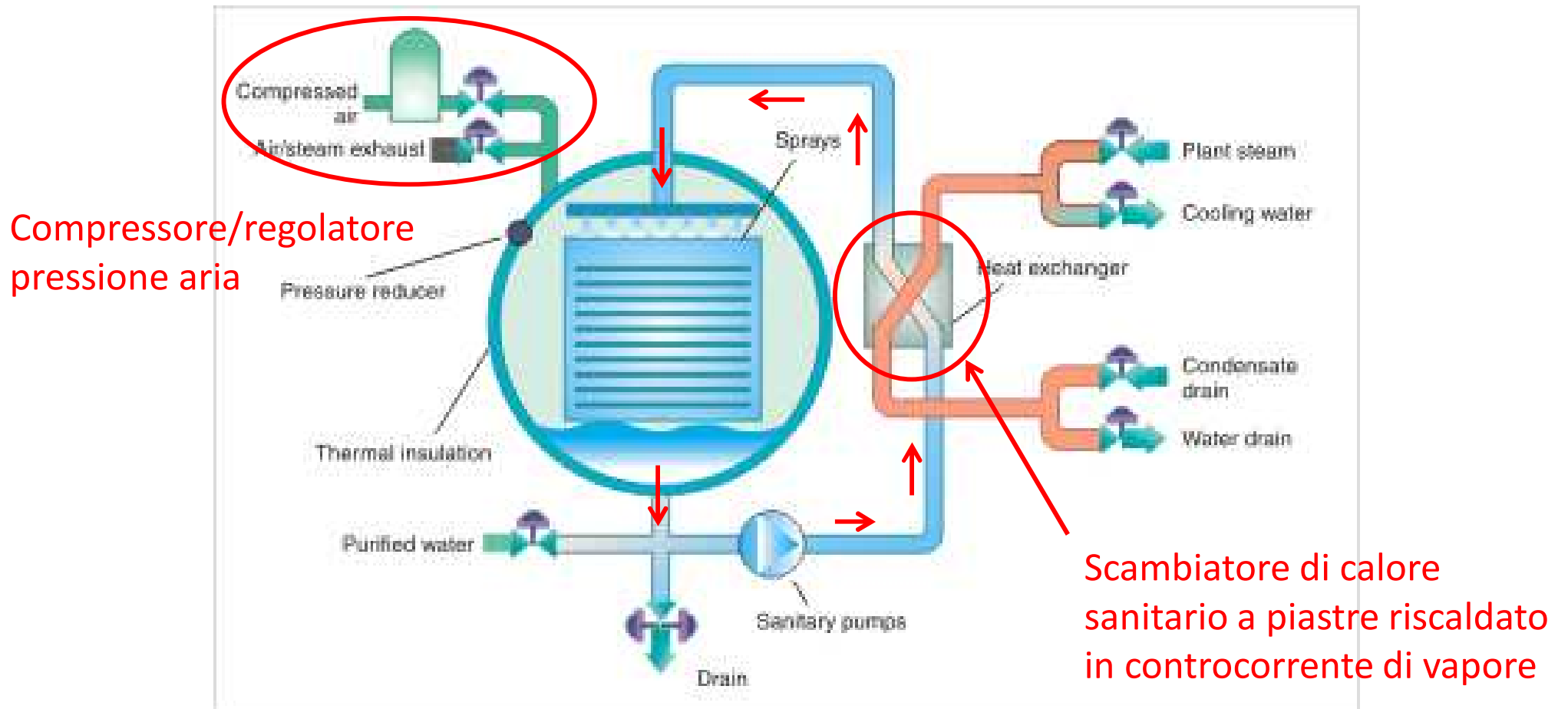
Terminata la fase di sterilizzazione, quando la pressione interna delle fiale è massima, si produce in camera un vuoto quanto più possibile rapido mettendo in funzione la pompa a vuoto e mantenendo questa situazione per un certo tempo. La pressione differenziale tende a far scoppiare le fiale assottigliate e tensionate.

Anche in questo caso il test termina con una serie di lavaggi e con l'eliminazione delle fiale che presentano riduzioni di volume di soluzione e ovviamente quelle che si sono rotte.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Schema di una Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

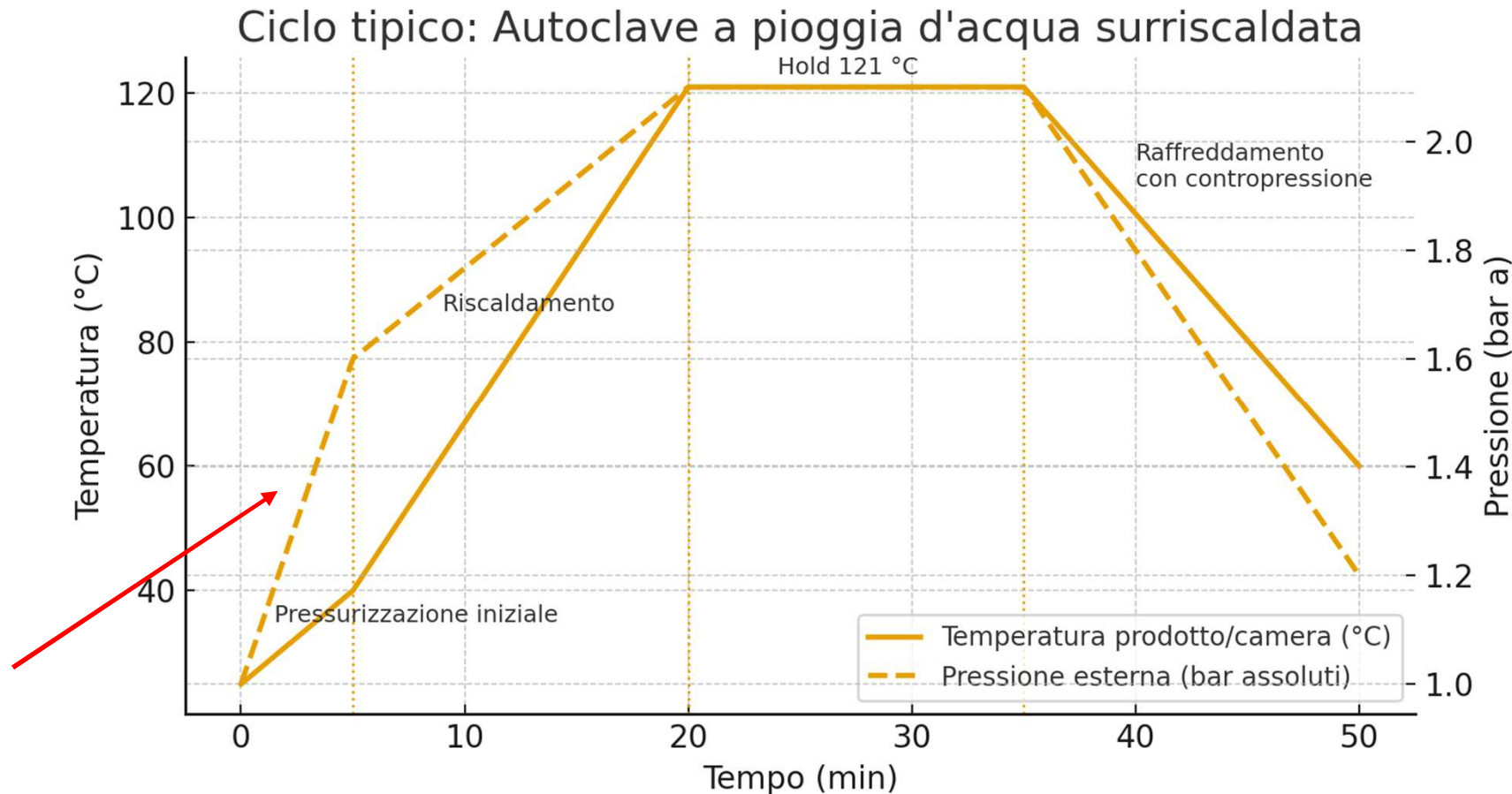


L'aria presente nella camera non viene rimossa (nessuna pompa a vuoto è presente)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Schema di una Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata



Si lavora in **sovrapressione** (aria compressa+aumento pressione da aumento T) per impedire l'ebollizione dell'acqua a 121°C (pressione circa 2,04 bar)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

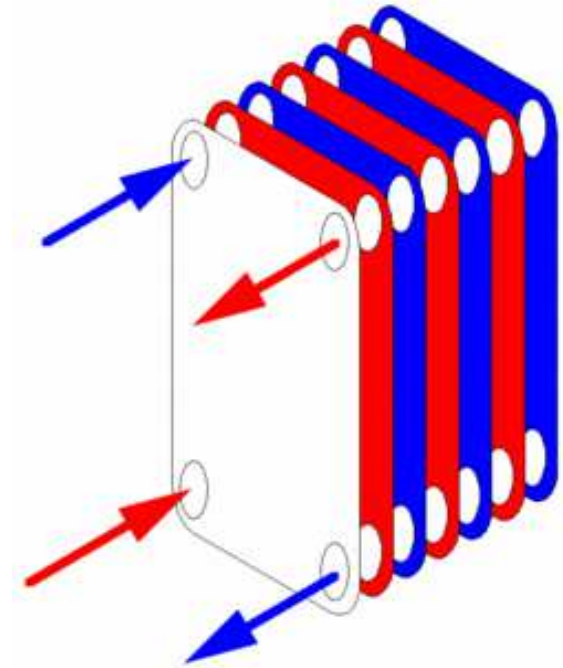
STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

Scambiatore di calore a piastre

Lo scambiatore a piastre è costituito da una sequenza di piastre corrugate (in modo da aumentare la superficie di scambio) dello spessore di circa 0,5-3 mm, separate l'una dall'altra ad una distanza di circa 1,5-5 mm attraverso una guarnizione in gomma o in altro materiale, che garantisce la tenuta idraulica verso l'esterno e intorno ai fori di passaggio.

Ciascuna coppia di piastre delimita una camera di passaggio per il fluido caldo o per il fluido freddo, a seconda della posizione delle piastre; infatti ciascuna piastra è a contatto da un lato con il fluido caldo e dall'altro lato con il fluido freddo, in maniera alternata (per cui nella prima piastra il fluido freddo si trova sul lato destro e il fluido caldo sul lato sinistro, nella successiva il fluido caldo si trova sul lato destro e il fluido freddo sul lato sinistro, e così via). Ciascuna piastra presenta quattro fori (due fori di alimentazione e due fori di scarico) agli angoli della piastra.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

- All'inizio del processo (una volta introdotto il carico e chiusa la porta) il settore circolare inferiore della camera viene riempito d'acqua di adeguata qualità
- Aria non viene rimossa
- Mediante compressore si immette aria compressa per aumentare la pressione, che tenderà ad aumentare ulteriormente per il riscaldamento dell'acqua fino a valori assoluti di 2,04 bar. SISTEMA CHIUSO.
- L'acqua di riempimento viene prelevata da una pompa di circolazione che la porta allo scambiator di calore.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

- L'acqua quindi rientra in camera e viene distribuita uniformemente sul carico mediante un sistema di ugelli a spruzzo a cono pieno, collocato generalmente nel settore circolare superiore della camera
- I dispositivi di supporto devono permettere la ridistribuzione rapida dell'acqua agli strati inferiori
- Il riscaldamento dell'acqua avviene gradualmente (un carico di contenitori da 500 mL arriva a 121°C in 20-30 min.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

- A questo punto inizia la fase di sterilizzazione (12 minuti o anche meno) e la conseguente fase di raffreddamento (in 15 minuti si raggiungono gli 80°C) durante la quale l'acqua di circolazione (ormai divenuta sterile) passa sempre per lo scambiatore di calore che in questo caso viene alimentato in controcorrente con acqua fredda.

Energia ceduta al carico



**Calore di condensazione
(vapore)**

**Calore sensibile
(acqua surriscaldata)**

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

- Quindi l'energia ceduta al carico è data dall'acqua che *deve raffreddarsi* per cedere tale calore.
- Di conseguenza avremo che l'acqua che entra nella camera è un po' più calda di quella che si raccoglie sul fondo (quindi la ideale *uniformità di temperatura* viene meno).
- Per ovviare questa problematica si opera con modeste quantità di acqua ed aumentando la velocità di circolazione fino ad arrivare ad un valore tollerabile di differenza t di 0.1°C
- Se la fase di riscaldamento avviene prima nelle zone alte del carico è anche vero che nella fase di raffreddamento il fenomeno avviene al contrario con valori di F_0 che rimangono accettabilmente omogenei
- Elevata velocità di circolazione e conseguente turbolenza è il meccanismo che mantiene omogenea la miscela acqua+aria che si crea in camera di sterilizzazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

- CONDIZIONI DI TEMPERATURA DELLA CAMERA SONO REGOLATE SEPARATAMENTE DA QUELLE DI PRESSIONE.
- La *temperatura di regolazione* determina la pressione parziale del vapore mentre la *pressione di regolazione* determina la pressione parziale dell'aria come addendo indipendente per raggiungere la pressione totale prefissata (da 1 bar a 2,04 bar).
- Risulta quindi possibile variare a piacimento (nel rispetto della pressione di esercizio massima dell'autoclave) la pressione parziale dell'aria adattandola allo specifico carico. Questo permette di:
 - Trattare carico con T da 60-127°C
 - Evitare stress termico poiché sia riscaldamento che raffreddamento sono graduali
 - Regolare la pressione differenziale tra interno dei contenitori e camera (mantenerla in ogni fase su valori adeguati allo specifico carico).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata

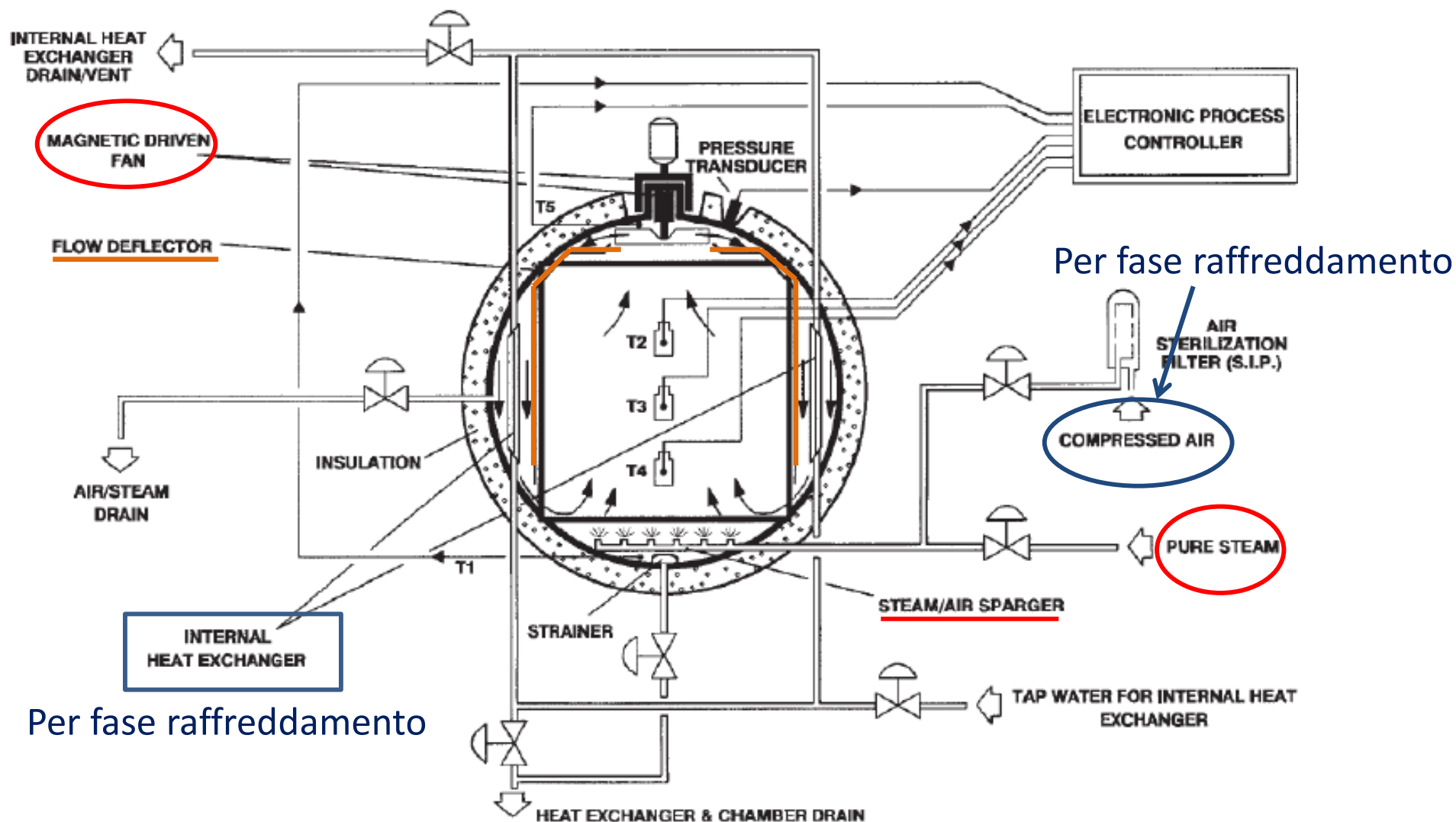
Come conseguenza il metodo può essere applicato anche a carichi particolarmente sensibili alla pressione differenziale quali siringhe preriempite, flaconi e sacche di plastica contenenti soluzioni, blister ecc.

Queste autoclavi sono quindi macchine **specializzate**, ma non idonee a trattare carichi porosi od oggetti con concavità.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Schema di una Autoclave a miscela vapore + aria



L'aria presente nella camera non viene rimossa (nessuna pompa a vuoto è presente)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a miscela vapore + aria

- Aria contenuta inizialmente non viene rimossa
- Processo inizia con immissione in camera di vapore da sterilizzazione tramite uno sparger posto nel settore circolare inferiore
- Si forma una miscela vapore + aria che viene mantenuta omogenea e rapidamente ricircolata da uno o più ventilatori a trascinamento magnetico (più equilibrato ed a tenuta meccanica perfetta durante le varie fasi rispetto ad un ventilatore ad albero passante) collocato sulla sommità della camera
- In combinazione coi ventilatori vi sono deflettori di flusso posizionati su entrambi i lati della camera
- Fasi riscaldamento/sterilizzazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

Autoclave a miscela vapore + aria

▪ Fase di raffreddamento

CONDIZIONI DI TEMPERATURA DELLA CAMERA SONO REGOLATE SEPARATAMENTE DA QUELLE DI PRESSIONE.

- Si fa circolare acqua fredda in due *batterie di piastre raffreddanti* poste nei due settori laterali della camera, tra le pareti e i deflettori, mentre il ventilatore continua a funzionare.
- Allo stesso tempo si sostituisce la miscela vapore + aria con aria pura (sempre dallo *sparger*)
- Durante il raffreddamento si mantiene una pressione dell'aria piuttosto elevata in modo da migliorare l'efficacia degli scambi termici (compatibilmente con natura del carico e pressione di esercizio autoclave)
- Rispetto ad Autoclave a pioggia questa fase risulta meno efficace e con tempi di raffreddamento più lunghi.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE UMIDO

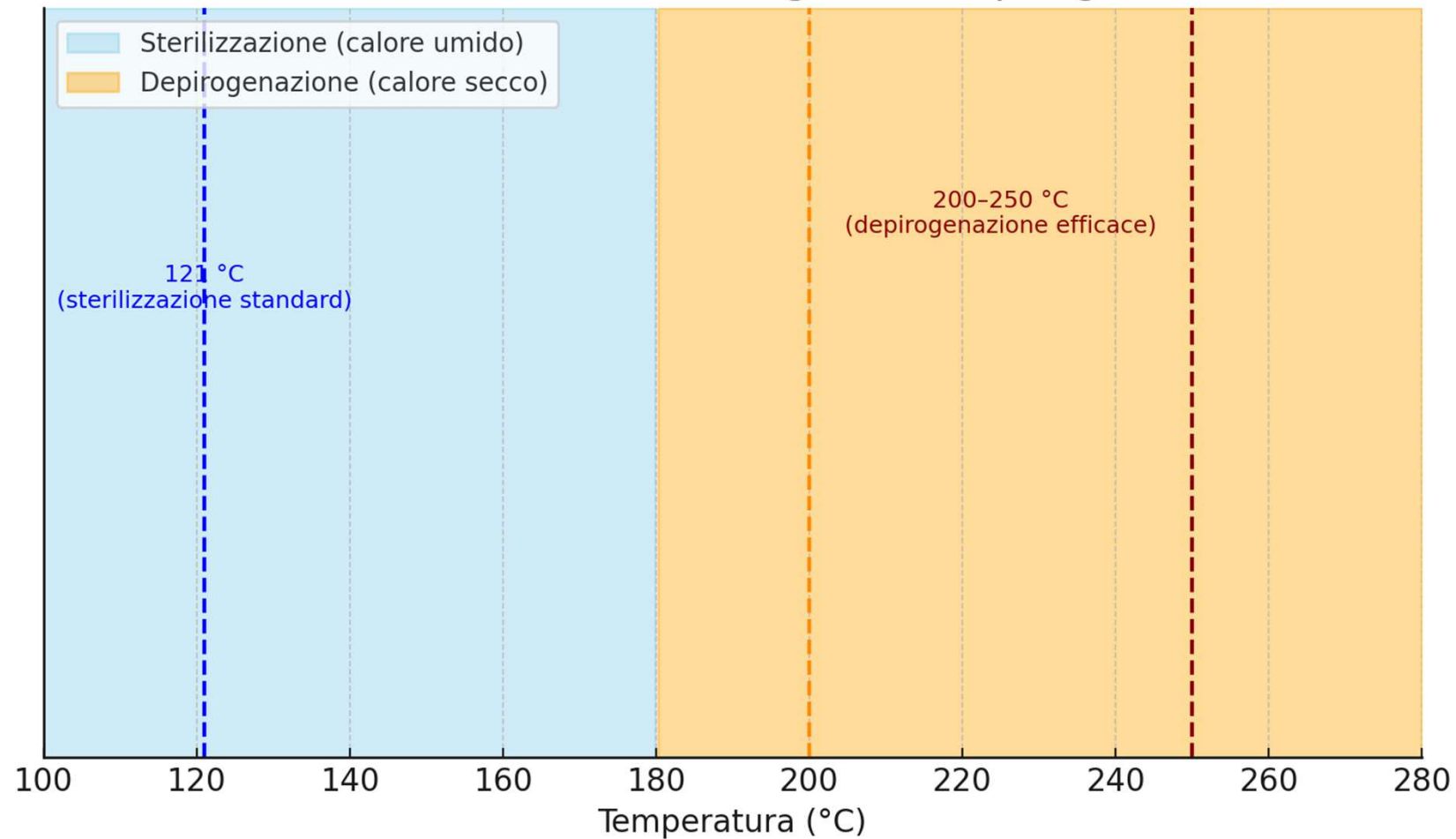
Autoclave a miscela vapore + aria

- Nonostante queste caratteristiche negative rispetto all'autoclave a pioggia d'acqua surriscaldata, questo tipo di autoclave viene sempre più spesso combinata con autoclavi a vapore puro come le tradizionali.
- Infatti aggiungendo l'intercapedine e la pompa da vuoto in camera (previa adeguamenti strutturali per il vuoto) si ottengono autoclavi estremamente flessibili ad un costo ragionevole.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Zone di efficacia: sterilizzazione biologica vs depirogenazione chimica



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Trattamenti a calore secco

- La *sterilizzazione* (inattivazione dei microrganismi)
 - 120-180 minuti a 160°C
 - 45-60 minuti a 180°C
- La *depirogenazione* (inattivazione dei pirogeni e delle endotossine pirogeniche)
 - 60-90 minuti a 230°C
 - 30-60 minuti a 250°C
- Processi notevolmente più lunghi.
- Entrambi i processi consistono in una ossidazione spinta (presenza di ossigeno) ma la T richiesta per la depirogenazione è notevolmente più alta.
- Se tramite calore secco ottengo depirogenazione si ottiene anche la sterilizzazione (non valido il contrario)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Trattamenti a calore secco

- I materiali da sottoporre ai trattamenti a calore secco devono resistere (chimicamente e meccanicamente) alle temperature elevate di tali trattamenti. No materiali plastici o elastomerici.
- Se il prodotto da trattare è inizialmente bagnato la maggior parte dell'energia richiesta per il processo è destinata all'evaporazione preliminare dell'acqua che bagna il prodotto (100°C). Quindi l'efficacia sterilizzante (e ancora di più depirogenante) viene meno, determinando una durata del processo maggiore.
- Le apparecchiature necessitano di notevoli quantità di aria , che in gran parte è fatta ricircolare. Tale aria deve essere trattata con particolari filtri, detti **HEPA** (*High Efficiency Particulate Air filters*). Vedere filtri aria di Impianti farmaceutici.
- Cinetica differente e di conseguenza anche gli approcci di convalida sono diversi.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Cinetica dei trattamenti a calore secco

Tempo equivalente di sterilizzazione a calore secco (F_H):

$$F_H = \Delta t * 10^{(T-170/z)}$$

Dove:

T = temperatura di sterilizzazione

$\Delta t = 60 \text{ sec.} = 1 \text{ minuto}$

Z = 20°C

D_H = tempo di decadimento decimale a 170°C

$$D_H = D_T * 10^{(T-170/z)}$$

D_T = tempo di decadimento decimale ad una generica T di sterilizzazione

z = coefficiente di temperatura pari a 20°C

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Cinetica dei trattamenti a calore secco

Tempo equivalente di depirogenazione a calore secco (F_T):

$$F_T = \Delta t * 10^{(T-250/z)}$$

Dove:

T = temperatura di sterilizzazione

$\Delta t = 60 \text{ sec.} = 1 \text{ minuto}$

Z = 54°C

D_T = tempo di decadimento decimale a 250°C

$$D_T = D_{T_2} * 10^{(T_2-250/z)}$$

D_{T_2} = tempo di decadimento decimale ad una generica T di depirogenazione

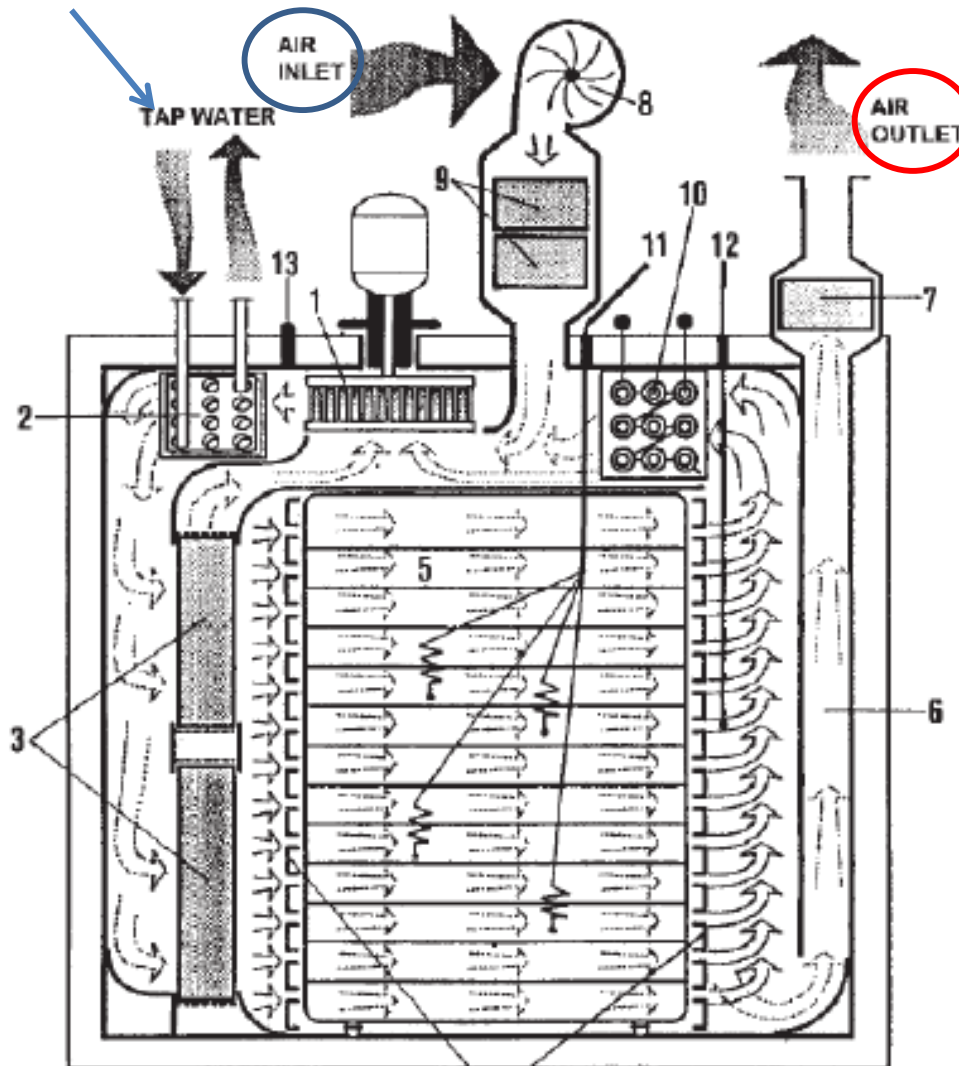
z = coefficiente di temperatura pari a 54°C

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatore-depirogenatore a calore secco a funzionamento discontinuo (batch oven)

Per fase raffreddamento



1. Ventilatore di circolazione interna aria
2. Scambiatore raffreddamento ad acqua
3. Filtri di circolazione **HEPA**
4. Paratie regolabili per circolazione aria
5. Carrello di carico
6. Condotto di scarico
7. Filtro **HEPA** su scarico
8. Ventilatore di pressurizzazione regolabile
9. Filtri **HEPA** su circuito di pressurizzazione
10. Riscaldatore a resistenze elettriche
11. Termosonde flessibili
12. Termosonda di regolazione
13. Trasduttore differenziale di pressione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatore-depirogenatore a calore secco a funzionamento discontinuo (batch oven)

Detto anche **forno** è molto utilizzato a livello industriale. Spesso è dotato di due porte, con scarico verso l' ambiente sterile o a «contaminazione controllata».

La pressione nella camera del forno è regolata in modo continuo in modo costante e leggermente più alto (10-30 Pa) di quello dell'ambiente non sterile (sul quale si affaccia la porta di carico) ma inferiore a quello dell'ambiente sterile (porta di scarico).

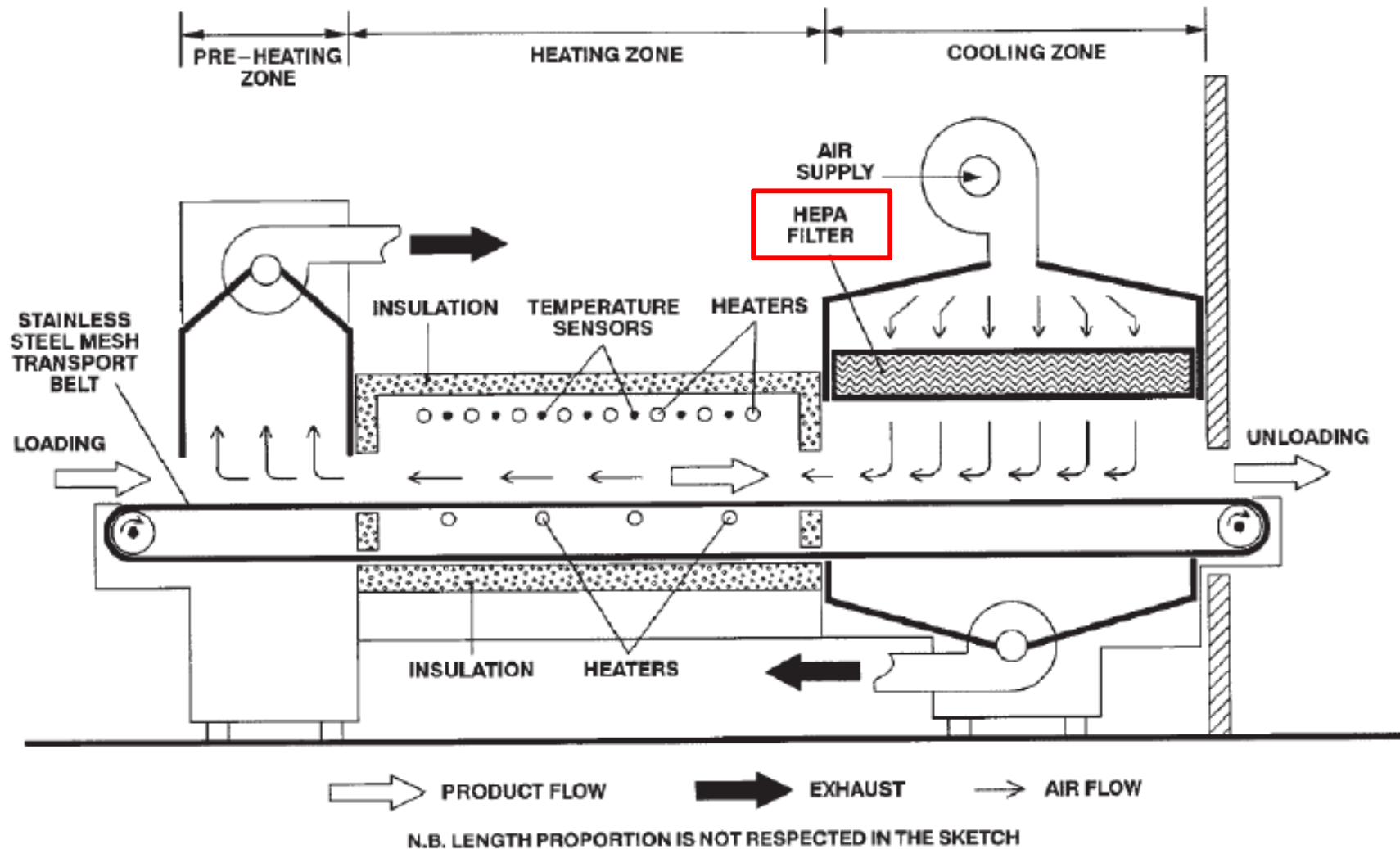
L'efficienza della circolazione dell'aria è governata dalla ventola e i materiali strutturali che devono mantenere *uniformità di temperatura* (alte) nello spazio e nel tempo. Evitare punti più caldi o più freddi all'interno della camera (hot/cold spot).

Comunque, dati i **tempi più lunghi** dei processi rispetto al calore umido sono tollerate oscillazioni maggiori della temperatura operativa (qualche grado centigrado).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)

- Elemento di trasporto è un nastro flessibile di acciaio inossidabile, che scorre orizzontalmente su cilindri di guida e trascinamento orizzontale. La struttura è isolata termicamente ed è suddivisa in 3 parti: fase di riscaldamento, mantenimento e raffreddamento.
- Il tunnel è abitualmente collegato: a monte da una macchina lavatrice, a valle all'ambiente sterile o agli isolatori entro i quali sono collocate le macchine di ripartizione/riempimento/chiusura.
- **Tunnel a irraggiamento infrarosso diretto** (*tunnel IR o Infra Red radiant heat*)
- **Tunnel a flusso laminare d'aria calda** (*tunnel LF o Laminar Flow*)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)

- Elementi radianti collocati sopra e sotto il nastro trasportatore
- La zona di raffreddamento viene alimentata da aria (trattata con filtri HEPA) che fluisce in **controcorrente** lungo tutto il tunnel. Serve per la fase di raffreddamento finale del prodotto, sia per la pressurizzazione del tunnel stesso, sia per importanti funzioni di asciugamento e preriscaldamento del prodotto nella zona di carico.
- Nel *tunnel a flusso laminare* il prodotto non riceve calore per irraggiamento diretto ma per convezione forzata di un flusso d'aria calda filtrata.
- A parte il metodo di riscaldamento, non ci sono differenze di concetto tra i due tunnel. Il tunnel LF, a parità di potenzialità del processo ha tempi operativi minori (velocità riscaldamento maggiore).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)

- **Zona alimentazione**

In entrambi i tunnel bisogna prevenire la possibile penetrazione di aria contaminata, mantenendo la zona in leggera sovrappressione rispetto all'ambiente di alimentazione si ottiene questo effetto.

Creare anche una barriera termica tra la zona sterilizzazione/depirogenazione e pre-lavaggio al fine di non danneggiare quest'ultimo macchinario con alte T.

- **Zona di trattamento**

Il prodotto viene riscaldato (lampade IR o aria riscaldata da batterie di resistenze elettriche) e mantenuto in temperatura per un tempo idoneo a realizzare il trattamento di depirogenazione (280°C). Infatti nella produzione industriale non si usano quasi mai i tunnel per effettuare solo la sterilizzazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A CALORE SECCO

Sterilizzatori-depirogenatori a calore secco a funzionamento continuo (tunnel)

- **Zona di trattamento**

Nei tunnel LF la circolazione dell'aria non è perfettamente laminare, al fine di avere fenomeni di turbolenza che favoriscono una omogeneità della temperatura e maggiore efficienza di scambio termico. Anche la velocità del flusso (0.7-0.9 m/s) viene ottimizzata a tal fine.

- **Zona di raffreddamento**

Il prodotto viene raffreddato per venir poi inviato nella camera sterile o negli isolatori. Talvolta questa zona è divisa in due, una prima zona a T più alte (55-75°C) e una a T più basse (25-40°C) al fine di evitare shock termici al prodotto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A *FREDDO*

Sterilizzazione con Ossido di Etilene (ETO)

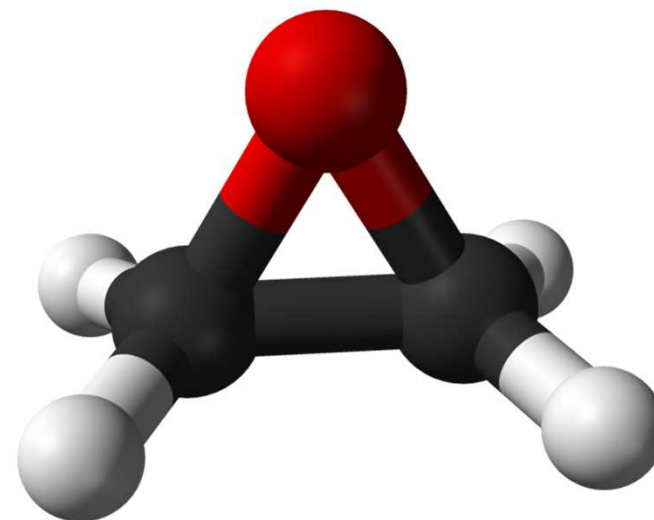
Sterilizzazione con radiazioni ionizzanti

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Caratteristiche introduttive:

Molti oggetti (soprattutto dispositivi medici) non tollerano le elevate temperature delle sterilizzazioni termiche. Si tratta di materiali plastici non adeguatamente termostabili, che necessitano di metodi di sterilizzazione «**a freddo**». Questi metodi prevedono l'utilizzo di un agente stabilizzante (gas o vapore) che abbia una adeguata efficacia a bassa T e non presenti irrisolvibili problemi per la tutela dell'uomo, dell'ambiente e del prodotto. Tra questi il più usato frequentemente è il trattamento dei DM con ossido di etilene (PM 44; punto ebollizione 11°C; odore etereo ed incolore).



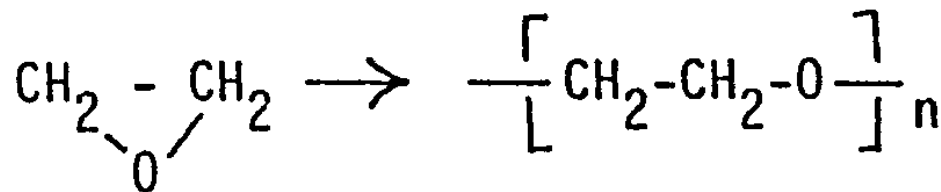
Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Caratteristiche chimiche:

L'uso di ETO comporta notevoli problemi: è tossico, cancerogeno e teratogeno, infiammabile in miscele d'aria. Tutto ciò fa sì che sia sottoposto a severi regolamenti di utilizzo e anche di semplice detenzione.

Il ponte ad ossigeno è chimicamente instabile e ne attribuisce un'elevata capacità alchilante alla quale è dovuta la sua azione sterilizzante; purtroppo l'ETO ha anche una notevole tendenza a polimerizzare.

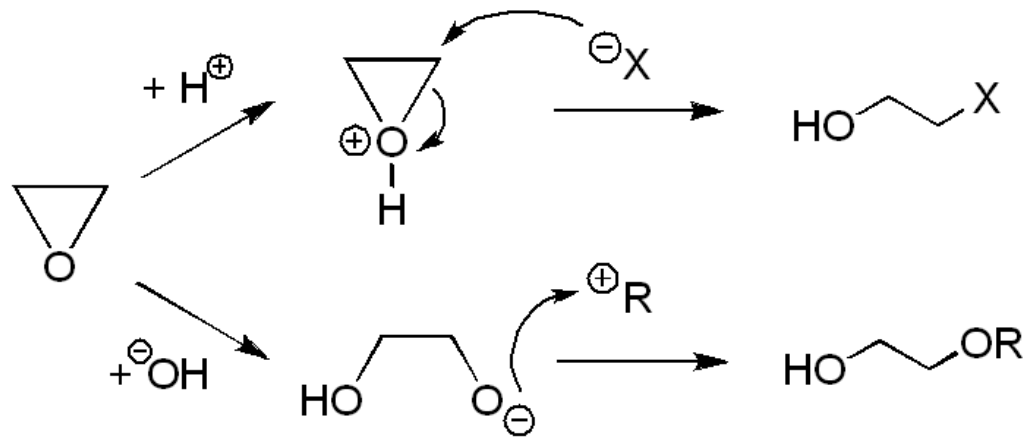


Ethylene oxide

Poly (oxy) ethylene

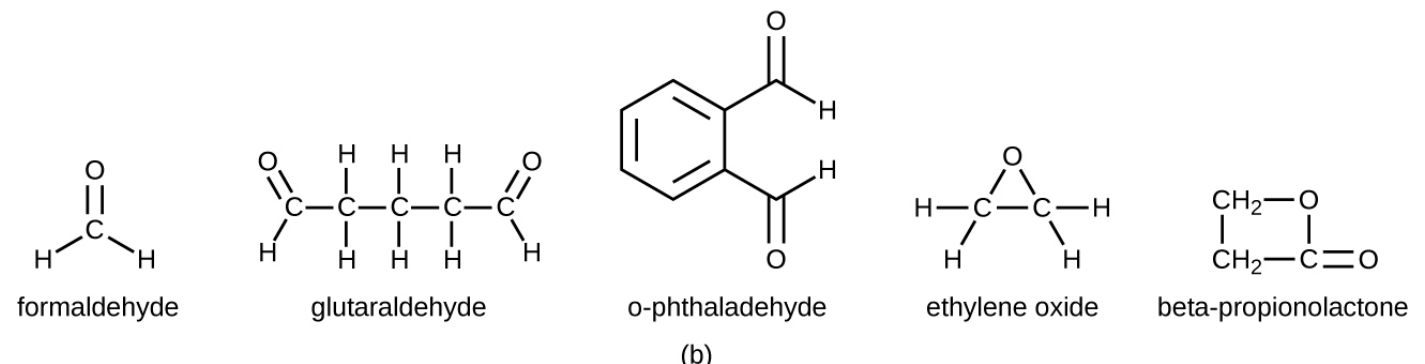
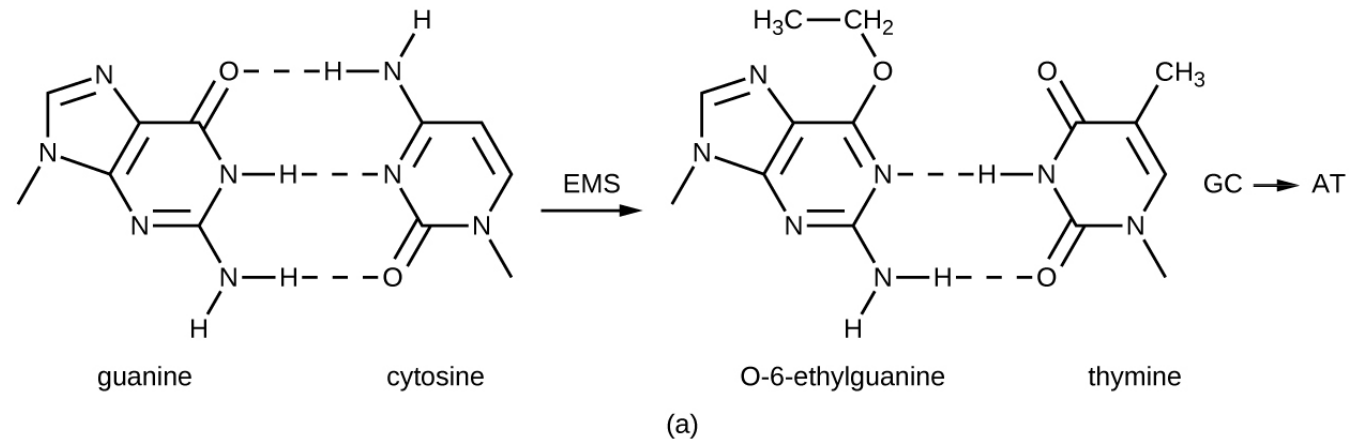
Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)



Reattività

Agente alchilante



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Condizioni di sterilizzazione:

La sterilizzazione ad ETO è una vera e propria reazione chimica; viene effettuata a temperature tra i 40 e i 60°C in funzione della compatibilità termica del prodotto.

La velocità di reazione è legata alla concentrazione di ETO e quindi alla sua pressione o pressione parziale se in miscela (dai 250 ai 1000 mg/L). È necessaria la presenza di una certa quantità di vapor d'acqua (catalizzatore) ed abitualmente si usa trattare il carico con una umidità relativa del 40-60%.

Sono quindi 4 parametri che bisogna considerare:

- Concentrazione di ETO
- Temperatura
- Umidità relativa
- Tempo

Ciò rende la cinetica di sterilizzazione alquanto complessa e poco prevedibile.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Condizioni di sterilizzazione:

Se possibile sterilizzare a vapore è sconsigliato utilizzare la sterilizzazione con ETO (R.D. 147/27, Ministero della Sanità, 1983, Circolare 56 che «richiama l'attenzione sui problemi e sull'estrema delicatezza che l'uso dell'ETO comporta»).

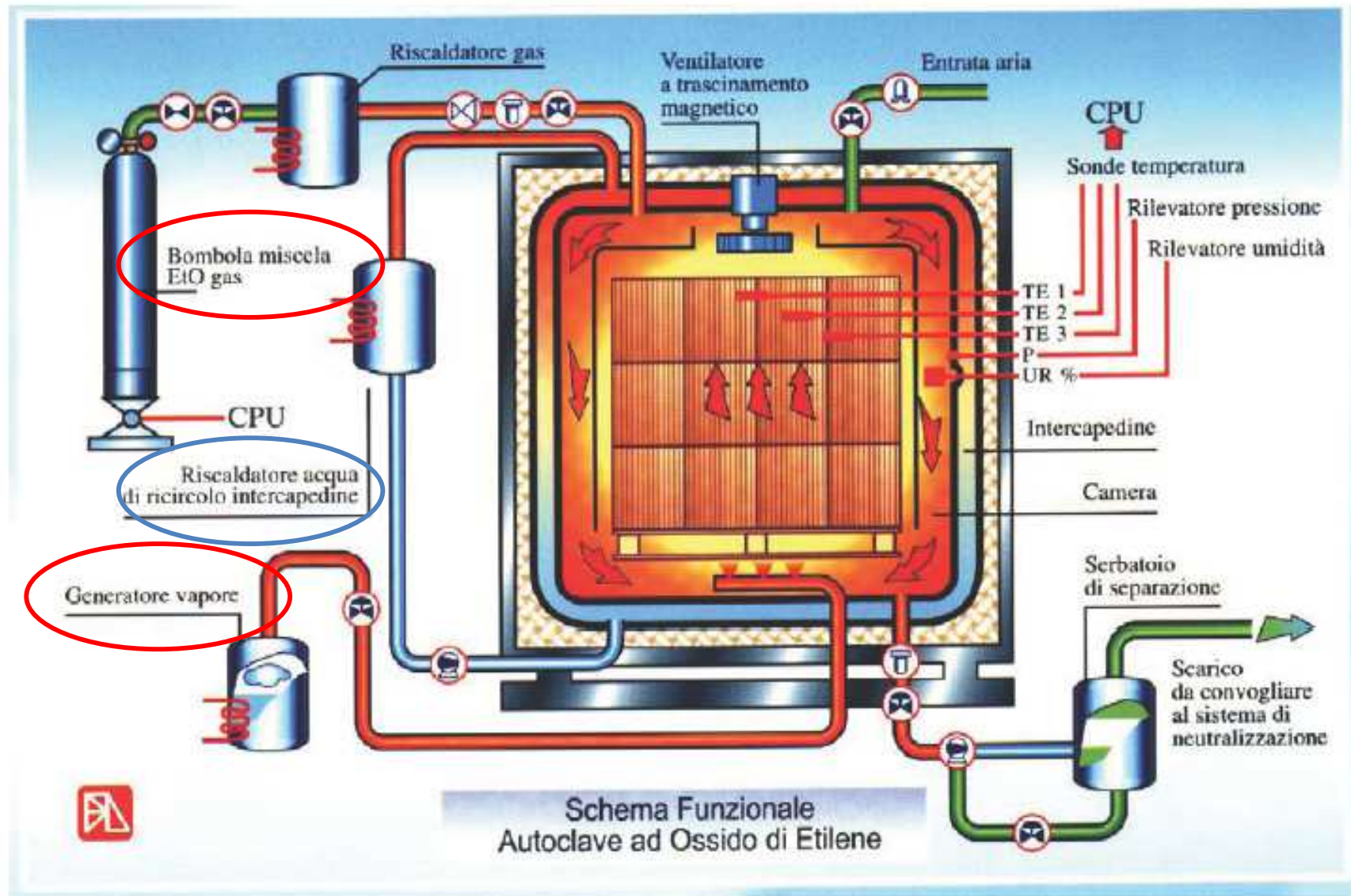
Oltre ai problemi già analizzati vi è una ragione economica (sterilizzazione con ETO ha costi da 5 a 10 volte maggiori di quella a vapore) e di residuo di gas sui prodotti.

Infatti l'azione sterilizzante richiede contatto diretto con i microrganismi e poiché si trattano i DM già nel loro confezionamento primario (spesso secondario o di trasporto) è necessario che essi siano adeguatamente **permeabili all'ETO** ed all'aria inizialmente presente nel DM stesso, aria che deve essere estratta con il vuoto iniziale del processo (problema infiammabilità). Ecco quindi altro fattore negativo da considerare, ovvero la **difficoltà nel degasare i prodotti alla fine del processo**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Schema di una Autoclave ETO con miscele non infiammabili (ETO+CO₂)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

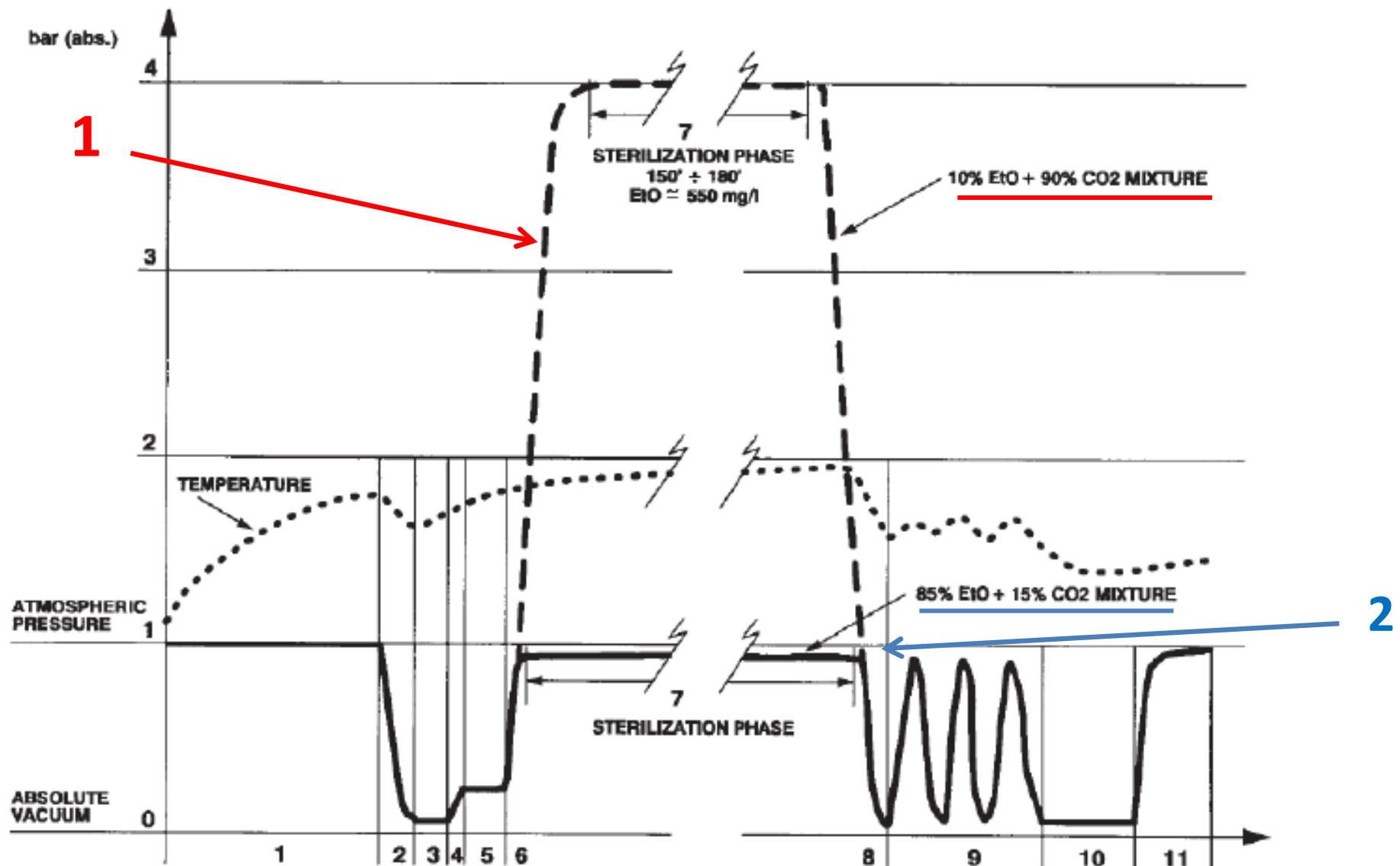
Autoclave ETO con miscele non infiammabili (ETO+CO₂)

- Consigliata dalla Circolare 56.
- Miscela ETO + CO₂ con concentrazioni di ETO non superiori al 10%, che portano la miscela fuori dal campo di infiammabilità in qualsiasi combinazione di aria.
- Si lavora a pressioni piuttosto elevate (4-5 bar), quindi le sterilizzatrici sono delle vere e proprie autoclavi e la durata della fase di sterilizzazione (tempo di esposizione) è di qualche ora.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Andamento diagrammatico di P per entrambi i metodi (1 e 2):



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Autoclave ETO con miscele non infiammabili (ETO+CO₂)

- **ANALISI DELLA PRESSIONE OPERATIVA DI STERILIZZAZIONE CON QUESTO METODO (1):**
 - Preriscaldamento camera tramite intercapedine o altri dispositivi
 - Vuoto in camera (60-90 mbar) per estrarre aria dalla camera, dal DM e dai suoi confezionamenti
 - Mantenimento vuoto per perfezionare l'estrazione aria dal carico e valutare la tenuta della camera
 - Umidificazione mediante immissione in camera di una adeguata pressione parziale di vapore d'acqua
 - Penetrazione dell'umidità nel carico
 - Carico in camera dell'ETO in miscela fino a raggiungimento della P che corrisponde alla prevista concentrazione
 - **Tempo di esposizione (T 40-50°C) di 3-5 ore**
 - Scarico ETO mediante vuoto
 - Pulsazioni ripetute aria/vuoto per completare lo scarico
 - Mantenimento in vuoto per degasaggio ETO
 - Bilanciamento barico

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

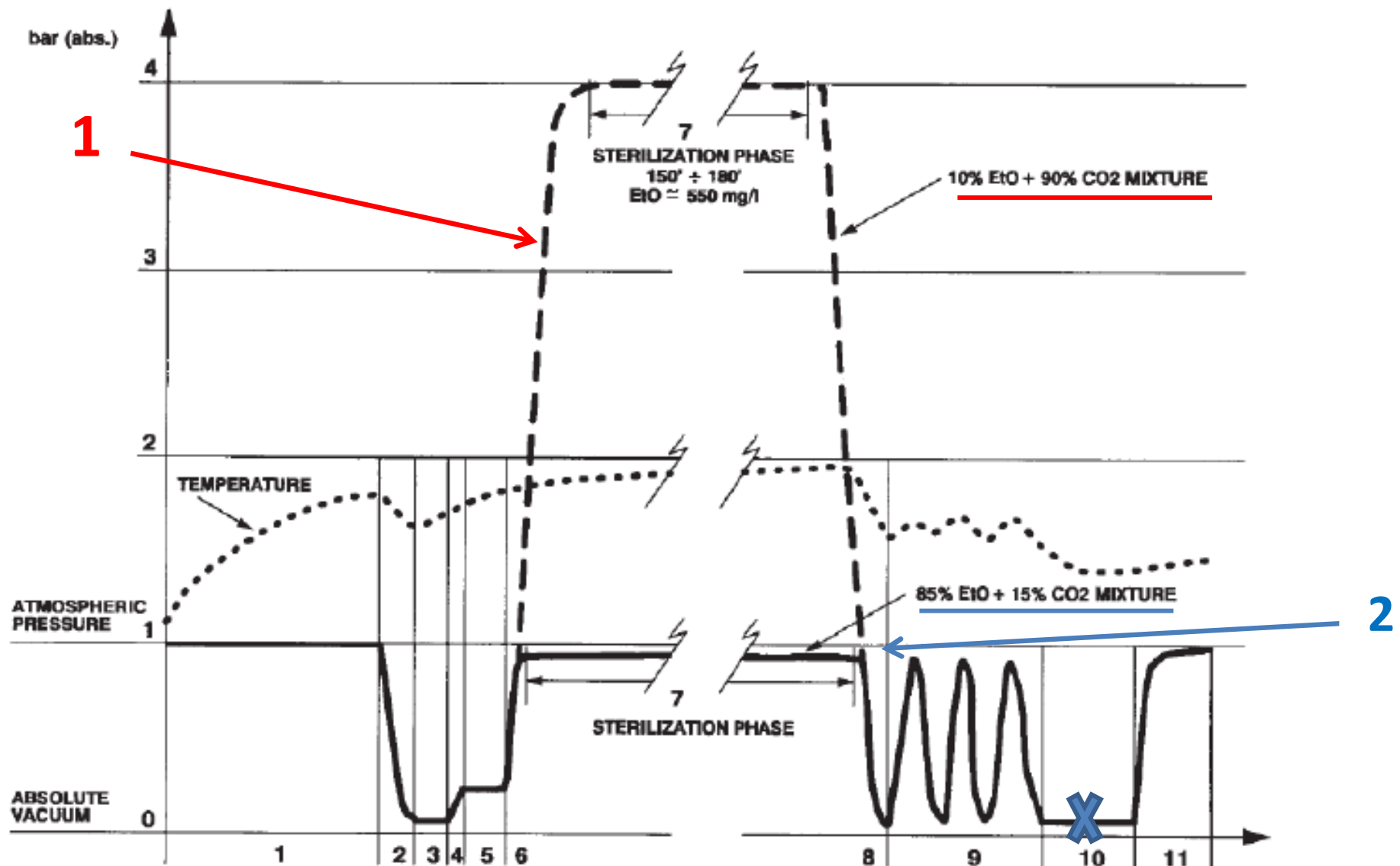
Metodo in depressione con ETO puro o sue miscele infiammabili

- Uso di miscele ETO + CO₂ con 20% di anidride carbonica (infiammabili)
- Il metodo prevede che la camera non superi **MAI** la P atmosferica per evitare perdite dalla camera stessa.
- I problemi persistono a livello dello stoccaggio, distribuzione, decompressione, vaporizzazione, abbattimento allo scarico.
CONTROLLO (sensori posti nei punti critici) di tutto l'impianto di lavoro posto in «esecuzione antideflagrante» (costi maggiori).
- Nelle bombole le miscele sono compresse allo stato liquido: la vaporizzazione deve essere effettuata con cautela per evitare polimerizzazioni dell'ETO.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE A OSSIDO DI ETILENE (ETO)

Andamento diagrammatico di P per entrambi i metodi (1 e 2):



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Metodo in depressione con ETO puro o sue miscele infiammabili

• ANALISI DELLA PRESSIONE OPERATIVA DI STERILIZZAZIONE CON QUESTO METODO (2):

- Preriscaldamento camera tramite intercapedine o altri dispositivi
- Vuoto in camera (60-90 mbar) per estrarre aria dalla camera, dal DM e dai suoi confezionamenti
- Mantenimento vuoto per perfezionare l'estrazione aria dal carico e valutare la tenuta della camera
- Umidificazione mediante immissione in camera di una adeguata pressione parziale di vapore d'acqua
- Penetrazione dell'umidità nel carico
- Carico in camera dell'ETO in miscela fino a raggiungimento della **P atmosferica che corrisponde alla concentrazione di 230-350 mg/L**
- **Tempo di esposizione (T 40-50°C) molto maggiore (12-18 h)**
- Scarico ETO mediante vuoto
- Pulsazioni ripetute aria/vuoto per completare lo scarico (limiti di esplosività circa **3–100% v/v in aria**), dopo il primo vuoto siamo al disotto del 3% di miscela gas.
- Bilanciamento barico

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**



Le **radiazioni ionizzanti** sono radiazioni dotate di sufficiente energia da ionizzare gli atomi o le molecole con i quali vengono ad interagire; le energie di soglia dei processi di ionizzazione sono dell'ordine di alcuni **elettronVolt (eV)**. La caratteristica di una radiazione di poter ionizzare un atomo, o di penetrare più o meno in profondità all'interno della materia, dipende oltre che dalla sua energia anche dal tipo di radiazione e dal materiale con il quale avviene l'interazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**
Elementi di radiochimica

Periodic Table of the Elements

1																	10					
3	4																	9				
5	6	7	8	9	10																	18
11	12																	17				
13	14	15	16	17	18																	36
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36					
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54					
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86					
87	88	89	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113						118				

* Lanthanide Series

58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu

+ Actinide Series

90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Radioattività

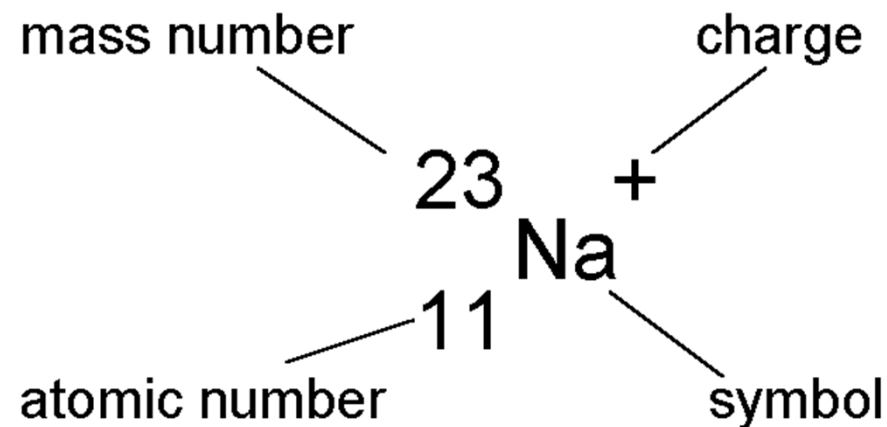
La radioattività è il fenomeno per cui alcuni nuclei, non stabili, si trasformano in altri *emettendo particelle/radiazioni ionizzanti*. La radioattività non è stata inventata dall'uomo, anzi, al contrario, l'uomo è esposto alla radioattività fin dal momento della sua apparizione sulla Terra. La radioattività è antica quanto l'Universo ed è presente ovunque: nelle Stelle, nella Terra e nei nostri stessi corpi.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Elementi di radiochimica

La struttura dell'atomo (nucleo di protoni e neutroni ed elettroni orbitanti intorno al nucleo) è la stessa per tutti gli elementi chimici che conosciamo. Quello che cambia da un elemento all'altro è il numero dei protoni (e quindi degli elettroni) e dei neutroni che l'atomo contiene.



Numero di massa (A) = Z + N

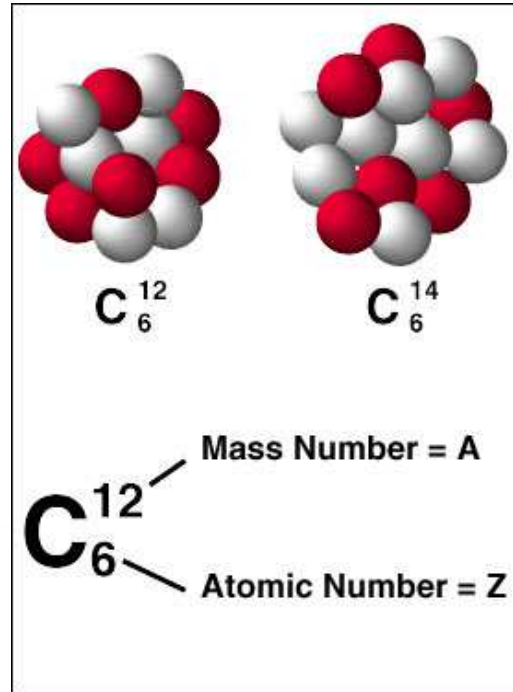
Numero atomico o numero di protoni (Z)

Numero di neutroni (N) = A – Z VARIABILE

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Elementi di radiochimica



Isotopi

- Mentre il numero di protoni di un elemento chimico è fisso, il numero di neutroni può essere variabile. In questo caso parliamo di “**isotopi**” di un elemento chimico.
- Ad esempio: il ferro presente in natura è costituito da 4 isotopi, tutti con 26 protoni ma con 28, 30, 31 e 32 neutroni rispettivamente. Gli isotopi sono identificati dal nome dell'elemento e dal numero di massa, che viene *di solito* riportato in alto a sinistra del simbolo dell'elemento chimico, per esempio l'isotopo del Carbonio con numero di massa 14 si indica con ^{14}C .

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

- Gli isotopi presenti in natura sono quasi tutti stabili. Tuttavia, alcuni isotopi naturali, e quasi tutti gli isotopi artificiali, presentano nuclei instabili, a causa di un eccesso di protoni o di neutroni. Tale instabilità provoca la *trasformazione spontanea* in altri isotopi, e questa trasformazione si accompagna **con l'emissione di particelle**. Questi isotopi sono detti *isotopi radioattivi*, o anche *radioisotopi*, o anche *radionuclidi*.
- La trasformazione di un atomo radioattivo porta alla produzione di un altro atomo, che può essere anch'esso radioattivo oppure stabile. Essa è chiamata **disintegrazione o decadimento radioattivo**.
- Il *tempo medio* che occorre aspettare per avere tale trasformazione può essere estremamente breve o estremamente lungo. Esso viene detto **“vita media”** del radioisotopo e può variare da frazioni di secondo a miliardi di anni (per esempio, il potassio-40 ha una vita media di 1.8 miliardi di anni). Un altro tempo caratteristico di un radioisotopo è il **tempo di dimezzamento** ($T_{1/2}$), ovvero *il tempo necessario affinché la metà degli atomi radioattivi inizialmente presenti subisca una trasformazione spontanea*.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Ciascun radioelemento é caratterizzato da una propria costante di decadimento λ che esprime la probabilità che si verifichino delle disintegrazioni. La vita media (τ) di un radionuclide é il reciproco di λ e quindi ciascun radionuclide ha un decadimento nel tempo secondo la relazione seguente:

$$dN = -\lambda N_t dt$$

$$N_t = N_0 e^{-\lambda t}$$

N_t é il numero di atomi radioattivi al tempo t ,
 λ é la costante di decadimento caratteristica per ciascun elemento radioattivo.

Quando il numero degli atomi ad un tempo t é uguale alla metà del numero di atomi iniziali si ha:

$$N_t = \frac{1}{2} N_0$$

Il tempo t , necessario perché l'attività di una sorgente si riduca alla metà del valore iniziale, viene definito periodo fisico o *emivita* ($T_{1/2}$) di un radioisotopo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Quindi sostituendo nella precedente equazione:

$$\frac{1}{2} N_0 = N_0 e^{-\lambda T_{1/2}}$$

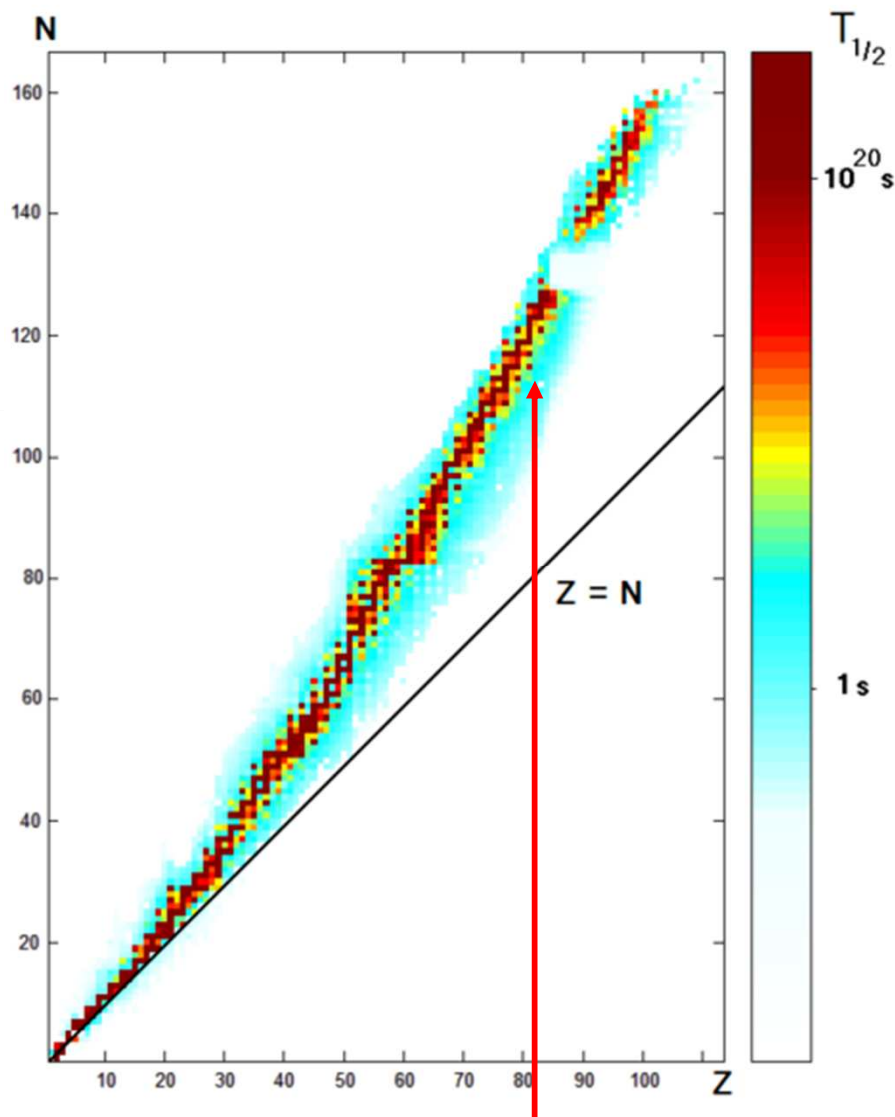
$$\frac{1}{2} = e^{-\lambda T_{1/2}}$$

$$\text{Ma } \frac{1}{2} = e^{-0.693} \quad \text{quindi } T_{1/2} = 0.693/\lambda$$

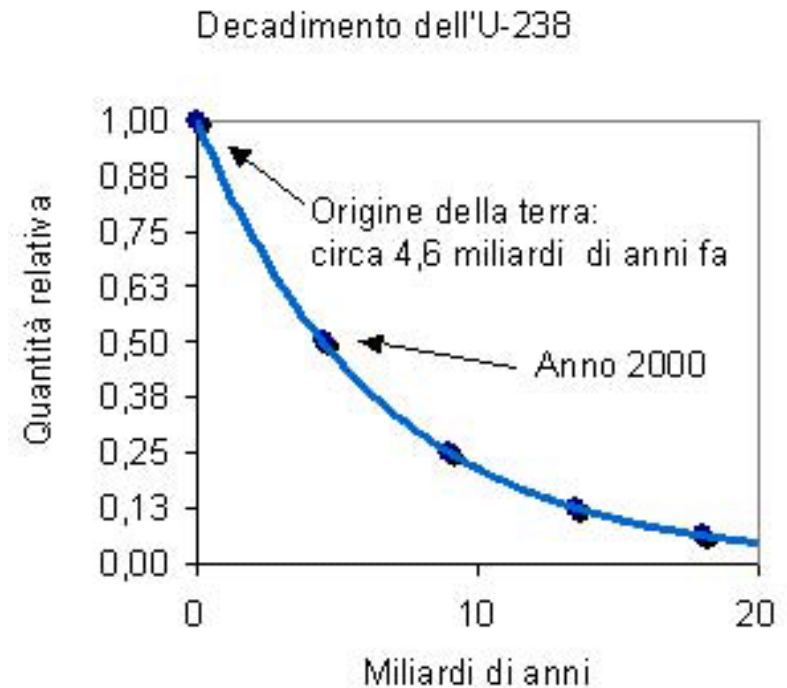
Il $T_{1/2}$ é uguale ad una costante, 0.693, moltiplicata per $1/\lambda$, caratteristico per ogni elemento radioattivo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**



$Z > 82$ sono elementi radioattivi



$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Elementi di radiochimica

➤ In natura sono stati riconosciuti *290 differenti isotopi* variamente distribuiti tra tutti gli elementi: mentre pochi elementi sono presenti in natura con un solo isotopo, come il fluoro e l'oro, la maggioranza vi sono presenti con vari isotopi, fino a dieci nel caso dello stagno. Oltre agli isotopi naturali, vi sono isotopi artificiali prodotti attraverso opportune *reazioni nucleari*.

➤ Sostanze radioattive in natura sono ad esempio le seguenti:

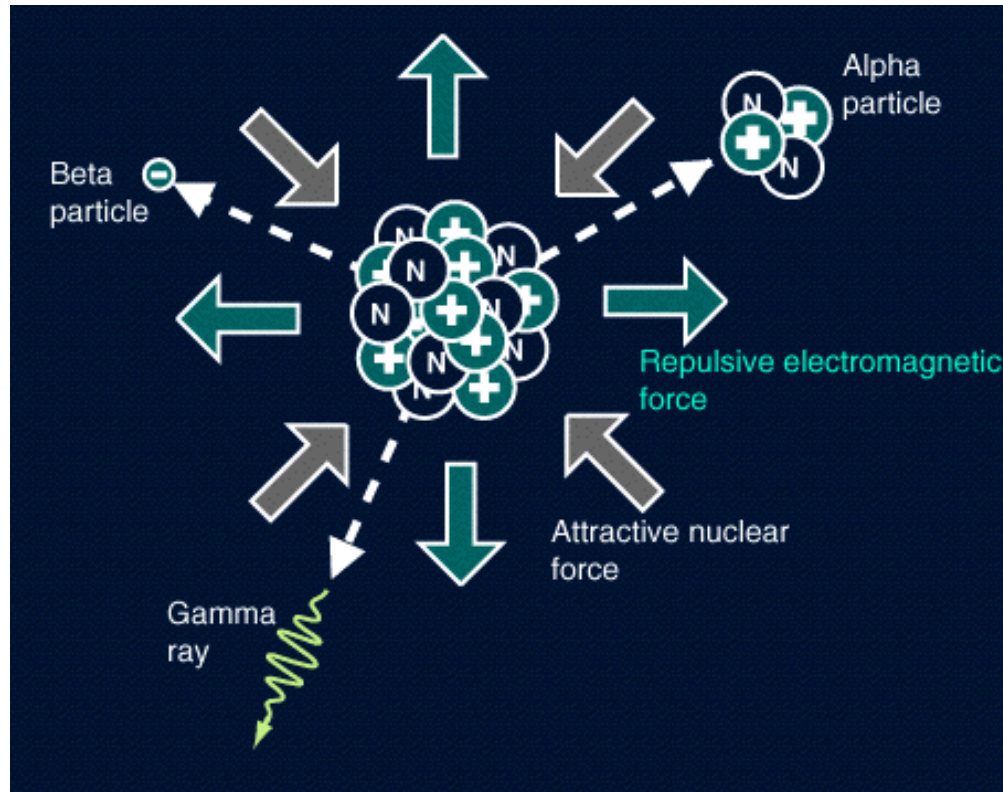
- Radio (Ra)
- Uranio (U)
- Torio (Th)
- Attinio (Ac)
- Polonio (Po)

➤ Quelle artificiali sono, ad esempio, il plutonio (Pu) e i prodotti di fissione formati dal *bombardamento neutronico* di certi elementi pesanti in un reattore nucleare, nonché altri radioisotopi prodotti dall'uomo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Emissione di particelle



Decadimento radiattivo

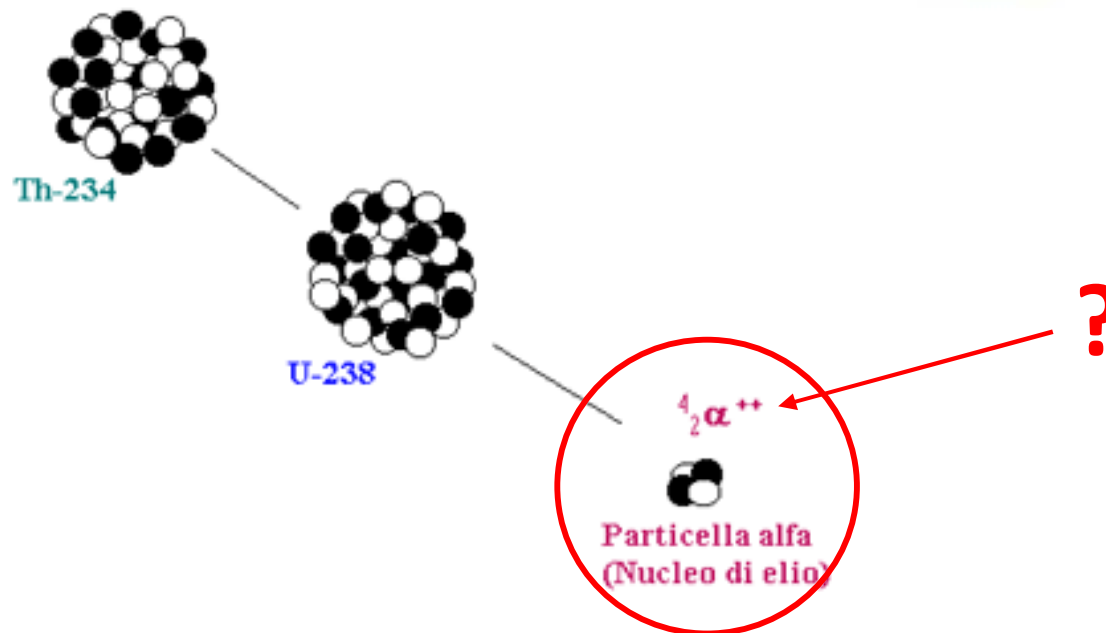
- *Decadimento alfa (α)*
- *Decadimento beta negativo (β^-)*
- *Decadimento beta positivo (β^+)*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

• **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI** Emissione di particelle

➤ *Decadimento alfa (α)*

Consiste nell'emissione di una particella caratterizzata da una carica uguale a due unità atomiche e massa uguale a quattro (*atomo di Elio* particolarmente stabile).



Impianti dell'Industria Farmaceutica

• **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI** Emissione di particelle

➤ *Decadimento alfa (α)*

Nel decadimento α , il nucleo di uranio perde 2 protoni e 2 neutroni, formando torio-234 e una particella α (nucleo di elio).

Gli **elettroni totali dell'atomo originario rimangono attorno al torio**, quindi **rimane con due elettroni "in più"**, mentre **l'elio espulso è privo di elettroni**, cioè un **ione He^{2+}** .



$^{238}\text{U} \rightarrow ^{234}\text{Th}^{2-} + ^4\text{He}^{2+}$ decadimento nucleare è troppo veloce per riassetamento degli elettroni (10^{-21} sec). Poi, in un attimo, entrambi si **ricombinano con elettroni dell'ambiente**, diventando neutri.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

• STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

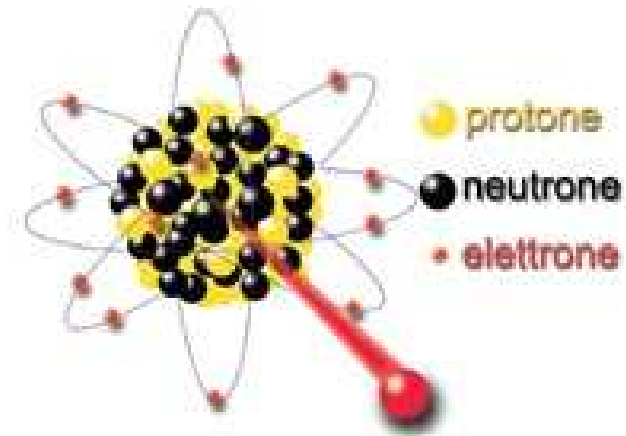
Emissione di particelle

➤ Decadimento beta negativo (β^-)

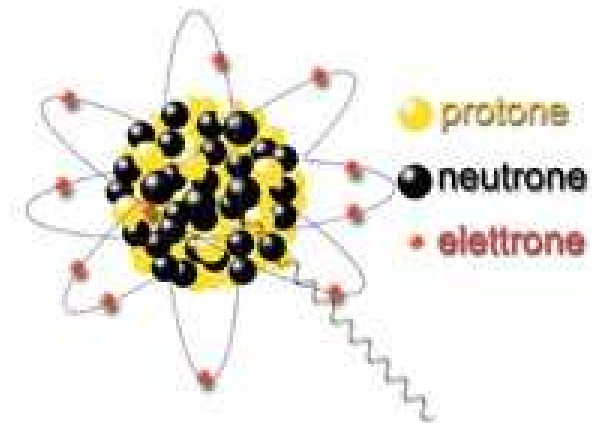
Quando il nucleo è instabile per **eccesso di neutroni**, un neutrone in eccesso si trasforma in un protone:

$$n^0 = p^+ + \beta^- \text{ (negatrone) } + \text{antineutrino}$$

- L'energia che si libera da questa trasformazione,
- in parte diviene energia cinetica della particella β^- (carica unitaria negativa e massa uguale ad elettrone) e dell'antineutrino (privo di massa) che *vengono espulsi dal nucleo*,
- in parte rimane al nucleo stesso che per diseccitarsi emette un **fotone gamma (γ)**



Radiazione Beta



Radiazione gamma

Impianti dell'Industria Farmaceutica

• STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Emissione di particelle

➤ Decadimento beta positivo (β^+)

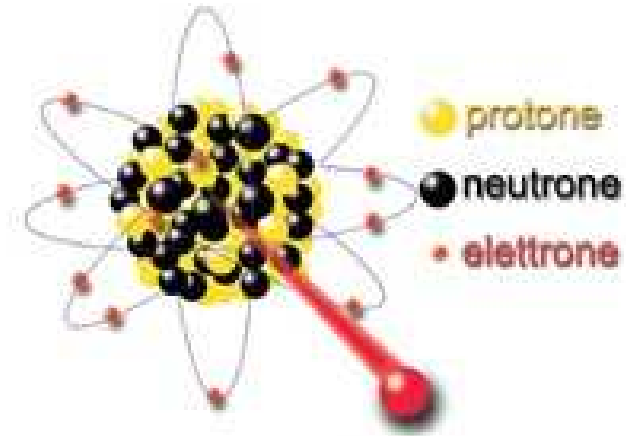
Quando il nucleo è instabile per **difetto di neutroni**, un protone in eccesso si trasforma in un neutrone:

$$p^+ = n^0 + \beta^+ \text{ (positrone) } + \text{ neutrino}$$

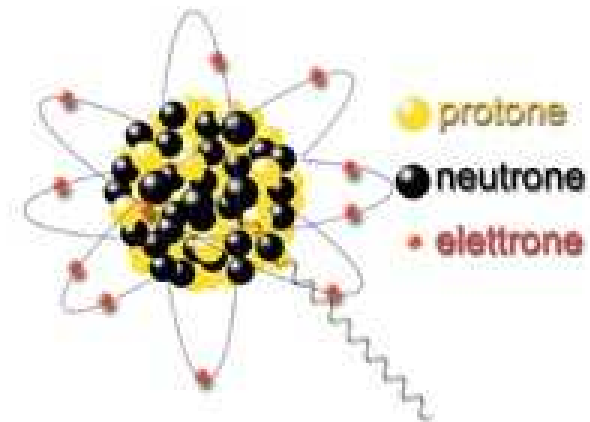
➤ L'energia che si libera da questa trasformazione,

➤ in parte diviene energia cinetica della particella β^+ (carica unitaria positiva e massa uguale ad elettrone) e del neutrino (privo di massa) che *vengono espulsi dal nucleo*,

➤ in parte rimane al nucleo stesso che per diseccitarsi emette un **fotone gamma (γ)**



Radiazione Beta



Radiazione gamma

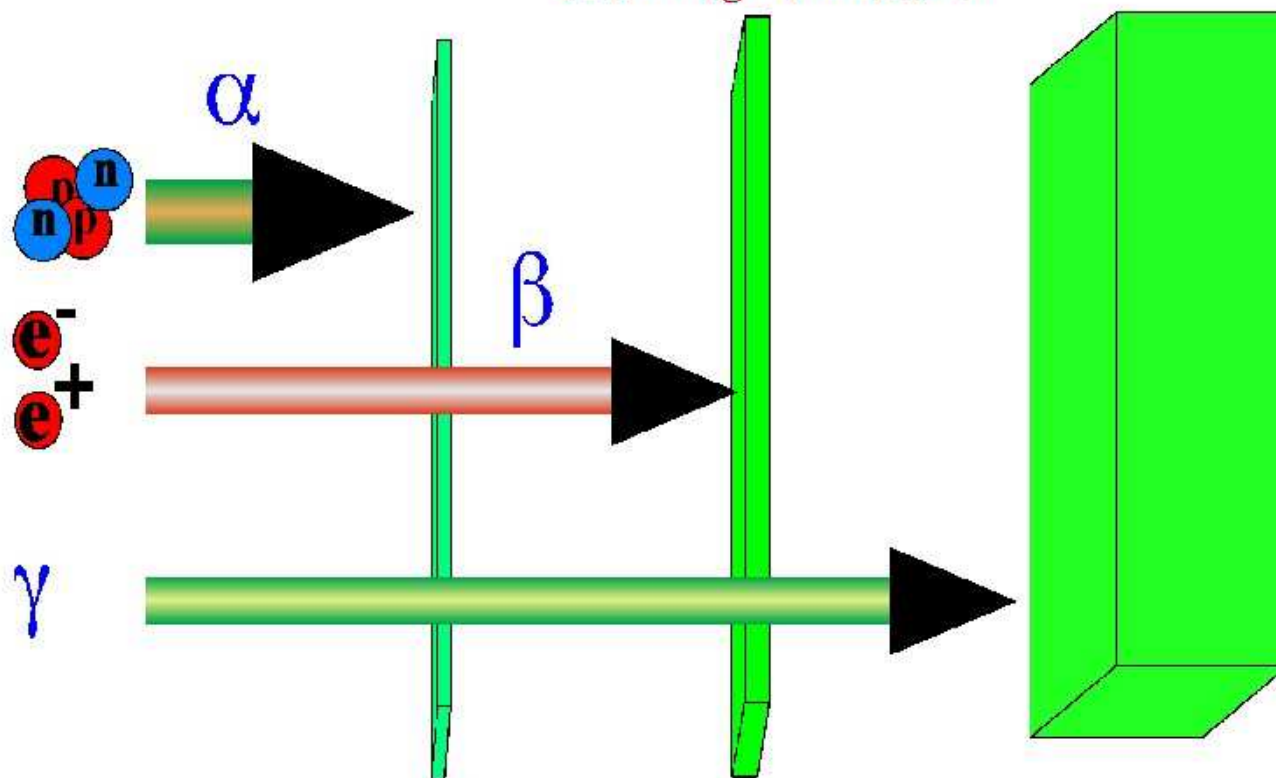
Impianti dell'Industria Farmaceutica

- STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Potere penetrante delle radiazioni nucleari

Spessori di materiale attraversato dalle radiazioni alfa, beta e gamma

Sottili fogli di metallo



Fogli di carta

Grandi spessori di metallo

Grandi spessori di calcestruzzo

Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Una radiazione è ionizzante se possiede energia sufficiente ad allontanare almeno un elettrone dall'atomo o dalla molecola con cui essa si trova ad interagire.

Convenzionalmente si considerano ionizzanti le radiazioni con frequenza maggiore di 3×10^{15} Hertz (le particelle cariche α , β^- e β^+ ; neutroni, raggi γ e raggi X).

U.I. becquerel (Bq) corrisponde a una trasformazione chimica per secondo.

Curie (**Ci**) che corrisponde a 3.7×10^{10} Bq

Rivelatori

Contatore Geiger

Il **contatore Geiger-Müller** è un dispositivo per il conteggio di particelle cariche (alfa, beta, protoni e generalmente particelle ionizzanti) che consiste in un cilindro metallico contenente un gas rarefatto (**catodo**) e in un filo conduttore isolato (**collettore**) cui è applicata un'alta differenza di potenziale, prossima a quella di scarica. In tali condizioni, quando *una particella ionizzante attraversa il tubo*, determina una breve scarica elettrica che, opportunamente amplificata, viene segnalata dallo strumento. Il contatore Geiger-Müller è quindi in grado di *rilevare il numero di particelle presenti*.

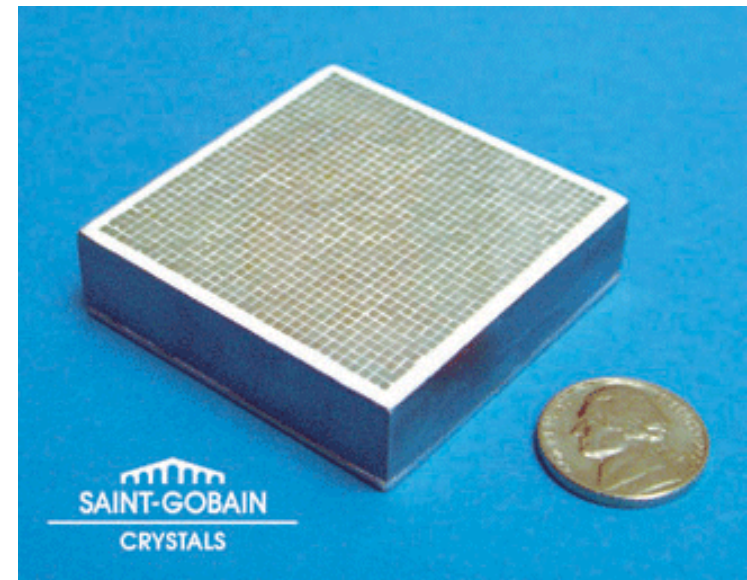
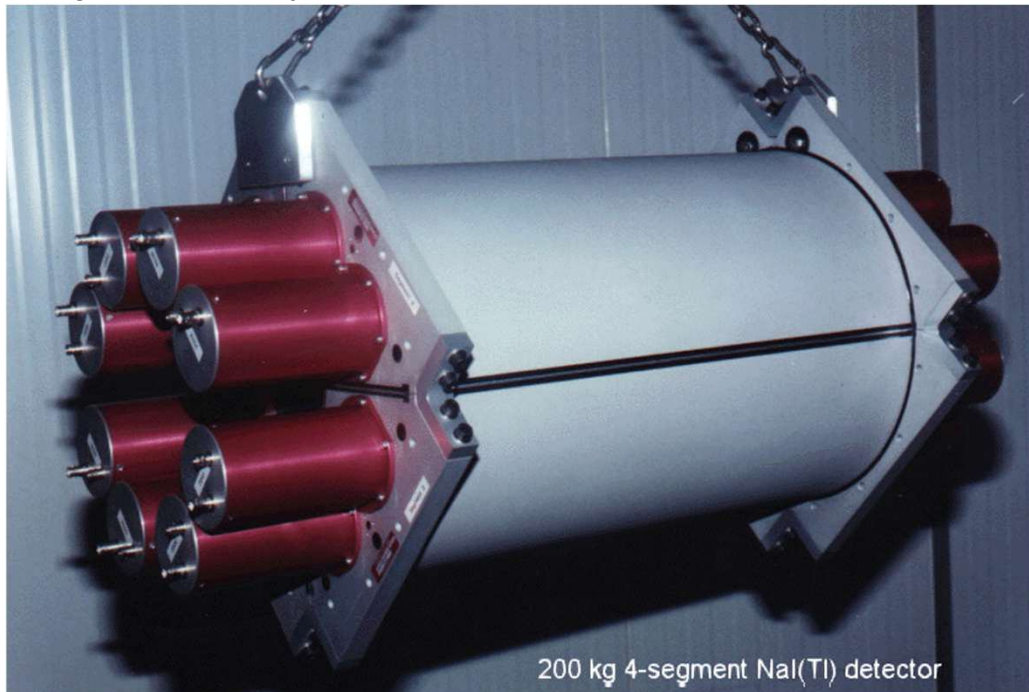


Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

Scintillatori

Uno **scintillatore** è un materiale capace di emettere impulsi di luce, in genere visibile o ultravioletta, quando viene attraversato da fotoni di alta energia o da particelle cariche. Al proprio passaggio la particella incidente cede parte della propria energia allo scintillatore causando, ad esempio, l'eccitazione di un elettrone che si sposta in un *livello ad energia superiore*. Quando l'elettrone decade al livello che occupava prima dell'eccitazione *emette un fotone* di energia relativamente bassa, tipicamente nel visibile. Tale impulso di luce viene poi rivelato ed amplificato da opportuni sensori, ad esempio da un *fotomoltiplicatore*.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Dose assorbita

Rappresenta la quantità di energia ceduta al materiale irraggiato per unità di massa: essa è espressa in Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg}$).

Effetti delle radiazioni sui microrganismi

Negli organismi viventi le radiazioni ionizzanti agiscono principalmente danneggiando il DNA, provocandone rotture o altre modificazioni che impediscono la crescita o la riproduzione.

0.1 kGy letale per insetti, parassiti e impedisce alle piante di germogliare;

1.5-4.5 kGy letale per la maggior parte dei batteri patogeni;

10-45 kGy inattiva le spore e alcuni virus;

4-6 kGy dose letale per gli esseri umani;

Anche in questo caso, per ciascun tipo di microrganismo si determina un modello statistico simile alla sterilizzazione termica, per determinare le cinetiche di esposizione alle radiazioni e relative energie.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **A) Impianto con sorgente radioattiva**

Sorgente di ^{60}Co vedi diapositiva seguente

Sorgente di ^{137}Cs vedi diapositiva seguente

Costituita da un rack metallico dove sono alloggiate le barre radioattive, all'interno di una struttura in calcestruzzo (1.5-2 m di spessore) per la schermatura delle radiazioni. Sistema automatizzato di trasporto su nastro del materiale da sterilizzare.

Tipo di schermatura-tipologia impianto

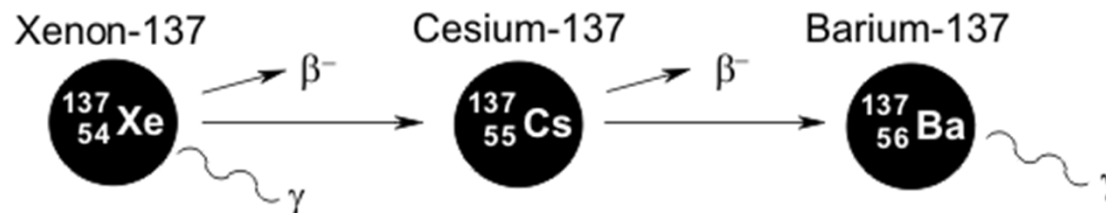
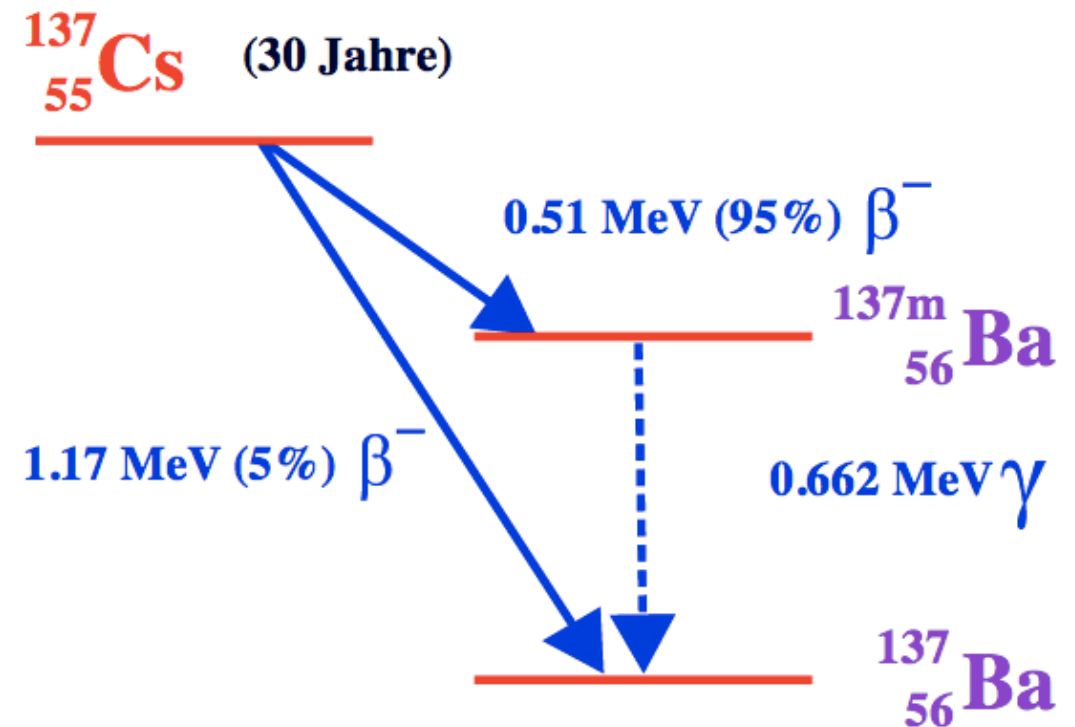
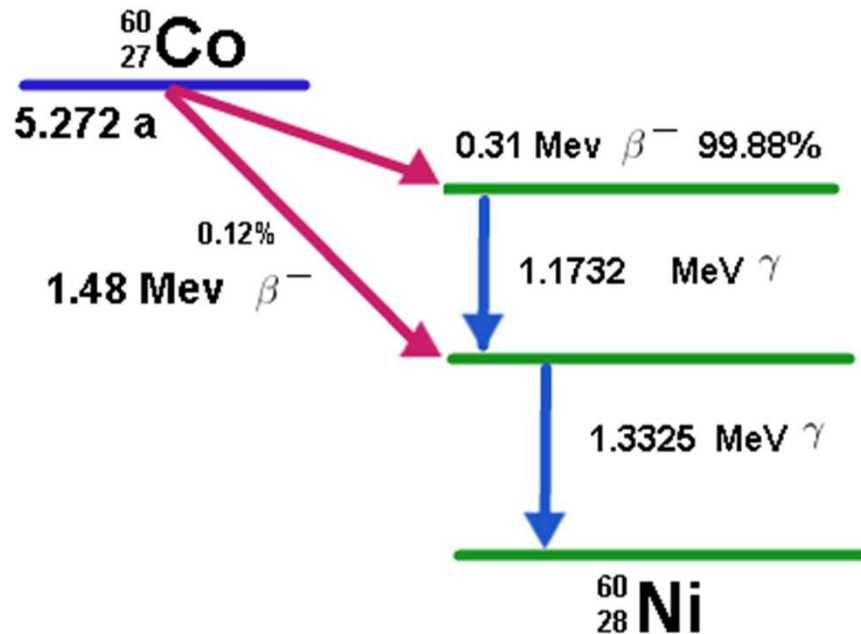
A secco: in cui la sorgente in fase di riposo è racchiusa in uno schermo di calcestruzzo o piombo

A piscina: in cui la sorgente in fase di riposo viene calata in una vasca di acqua che, con un battente di 5 m, è idonea a schermare totalmente le radiazioni emesse.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

Il ^{60}Co ha $T_{1/2}$ di 5.27 anni e ^{137}Cs di 30 anni, quanto tempo è necessario aspettare per prelevare il carico dopo sterilizzazione? Si può prelevare il carico **subito**. Con **gamma** (^{60}Co , ^{137}Cs) **e-beam** o **X-ray** i prodotti **non diventano radioattivi**: l'energia usata non induce attivazione dei materiali (al disotto dei 7-10 Mev).

Note pratiche

Possibile **lieve riscaldamento** del carico o **ozono**: di solito basta un breve **raffreddamento/aerazione** logistica del pallet o dell'imballo, non per ragioni radiologiche.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

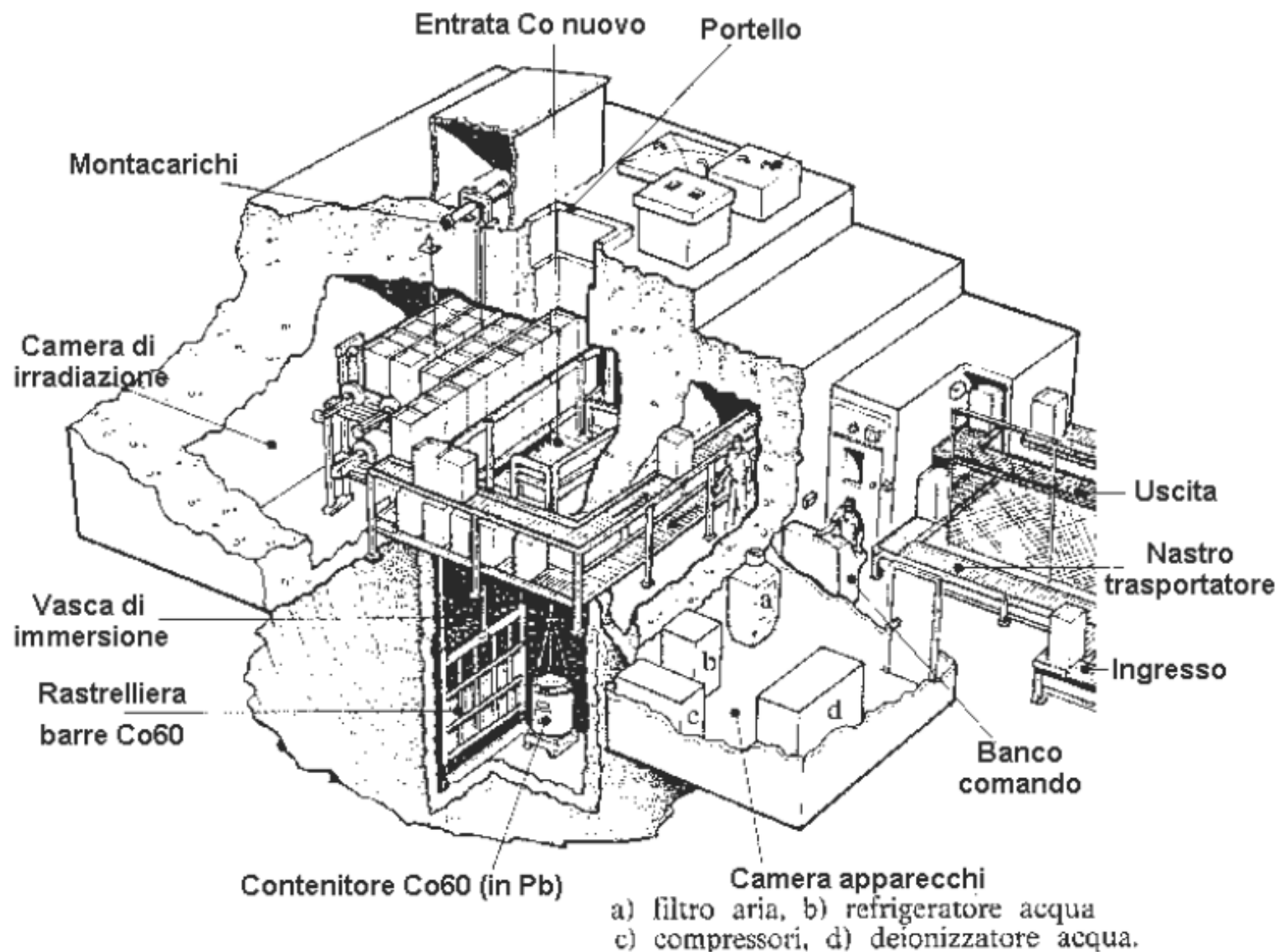
- **A) Impianto con sorgente radioattiva**

Per aumentare l'efficienza nucleare del trattamento, i convogliatori del materiale da sterilizzare seguono un percorso a pettine intorno alla sorgente, alternativamente e più volte, presentano ad essa le due facce del collo in modo da irraggiare il massimo volume di materiale e ottenere il massimo grado di uniformità di irraggiamento.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

- A) Impianto con sorgente radioattiva a piscina



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **B) Impianto con acceleratore di elettroni**

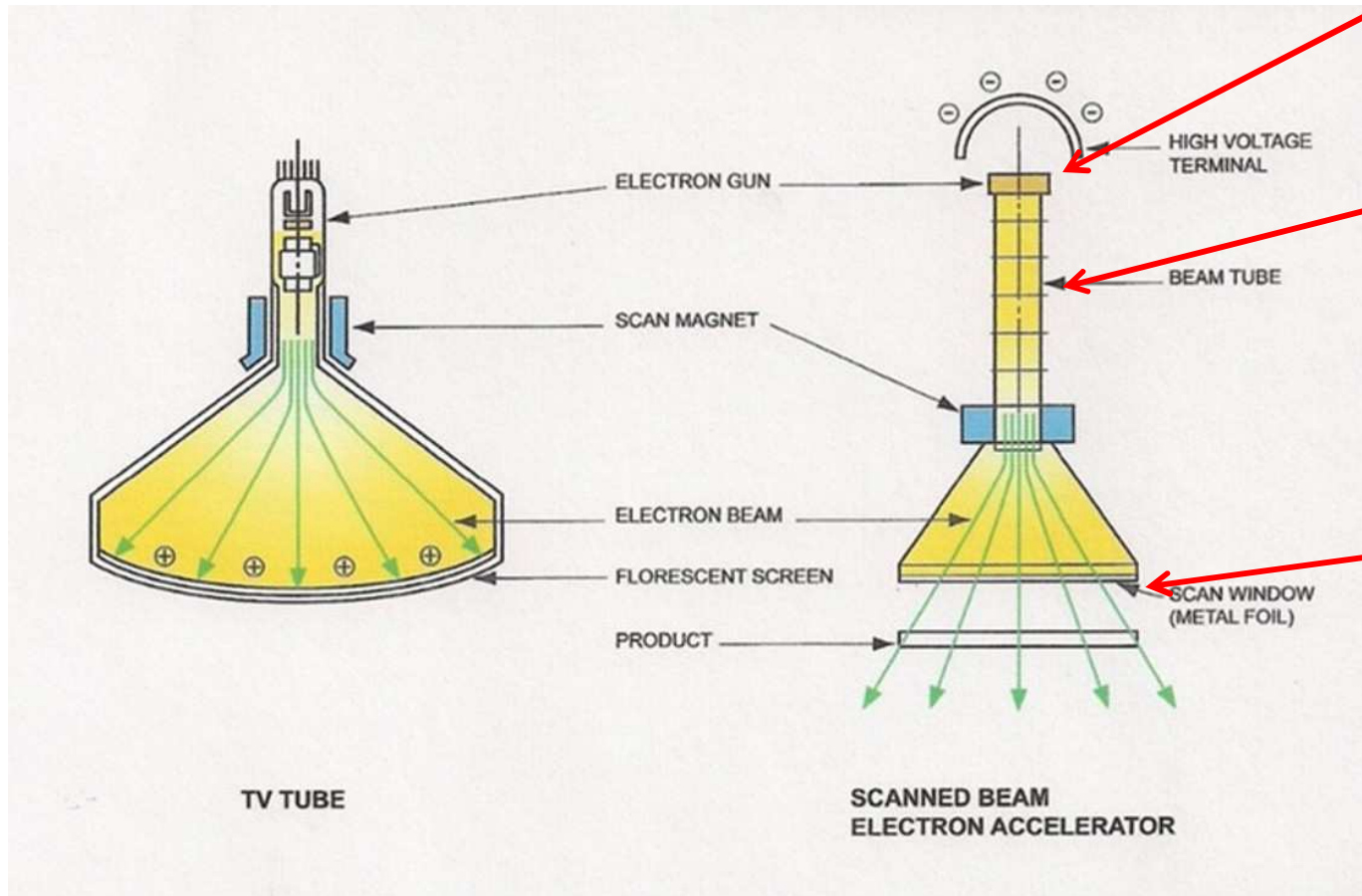
L'impianto è costituito dall'acceleratore di elettroni con il sistema di convogliamento ed emissione del **fascio elettronico** ($<10 \text{ MeV}$), dalla struttura in calcestruzzo (pareti di 3-4 m di spessore) per la schermatura delle radiazioni e da un sistema automatizzato per il trasporto del materiale. L'impianto è dotato di una camera dove è installato l'acceleratore, una camera di irraggiamento ed un labirinto per il confinamento e schermatura delle radiazioni secondarie (che comunque **cessano istantaneamente** quando il generatore si spegne). Anche in questo caso il materiale viene fatto passare 2 volte sotto il fascio di elettroni e alternativamente le 2 facce opposte del collo stesso vengono irradiate.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

B) Impianto con acceleratore di elettroni



Emettitore di elettroni (Electron gun) a determinata energia in **sistema a vuoto spinto** che li accelera per la presenza di un campo magnetico. Gli elettroni escono dal sistema a vuoto attraverso una **sottile lamina di titanio** e colpiscono il prodotto che viene convogliato ad una velocità controllata attraverso la cortina di elettroni.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

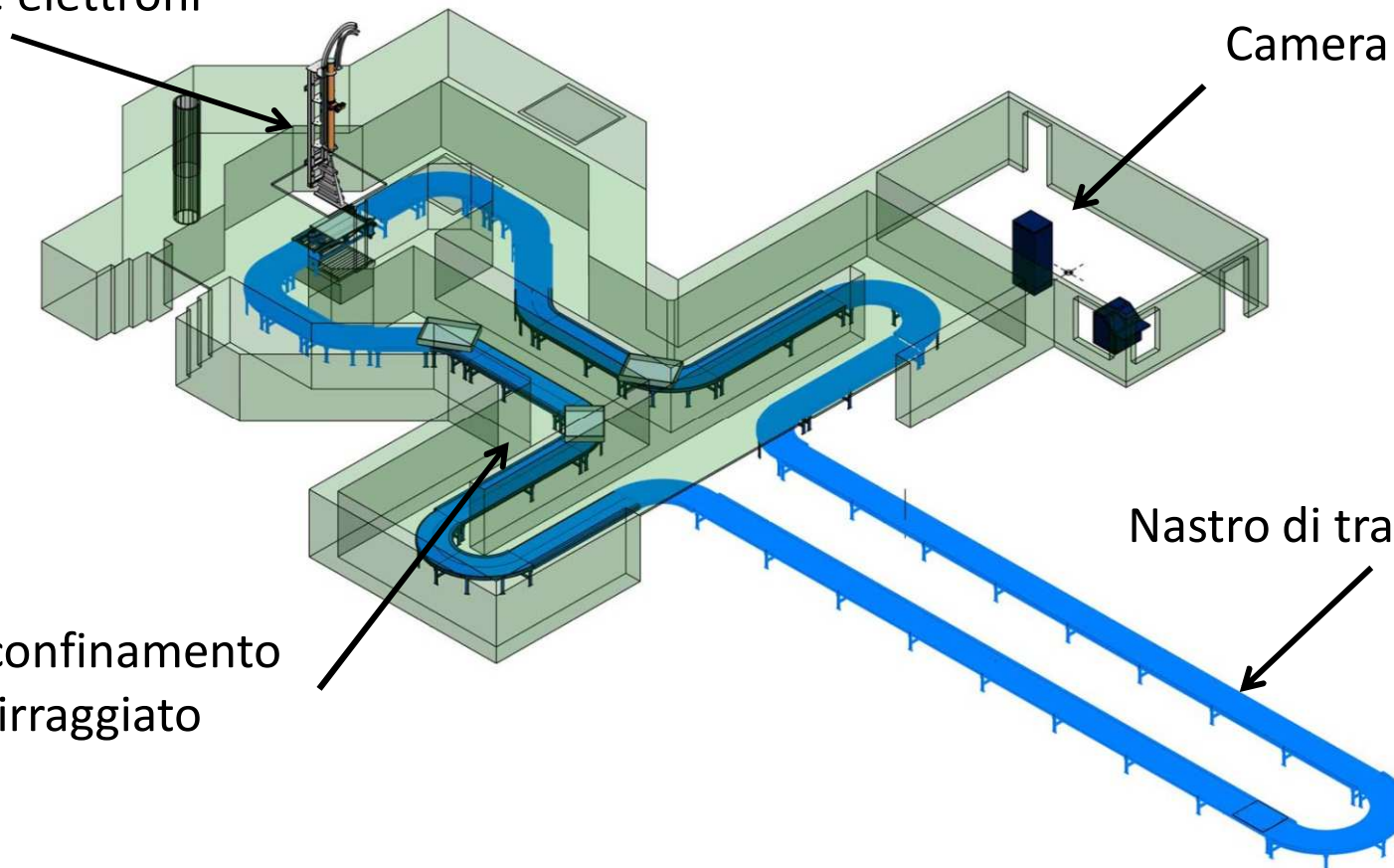
- **B) Impianto con acceleratore di elettroni**

Acceleratore elettronico

Camera di controllo

Labirinto confinamento
materiale irraggiato

Nastro di trasporto materiale



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **C) Impianto di sterilizzazione mediante raggi X**

L'irradiazione con raggi X è un'alternativa pratica ai metodi di sterilizzazione e di controllo della contaminazione più comunemente utilizzati. L'uso commerciale dei raggi X ebbe inizio circa 20 anni fa. Tuttavia, a causa della scarsa potenza di uscita degli acceleratori utilizzati, la tecnica fu generalmente tralasciata come metodo valido di sterilizzazione. Ora, con l'introduzione di **acceleratori ad alta energia e con potenza elevata**, abbiamo una tecnologia a base di raggi X con un livello commerciale pari a quello degli altri metodi di sterilizzazione.

Un'ampia gamma di prodotti sanitari, dagli impianti ai prodotti farmaceutici, impiegano la tecnologia dei raggi X per le sue capacità sterilizzanti. Tuttavia, l'uso dei raggi X non è ristretto alla sterilizzazione dei dispositivi medici; i raggi X vengono regolarmente utilizzati anche per il trattamento di **prodotti farmaceutici, per la decontaminazione di materiali per imballaggi, per il trattamento di materiali grezzi utilizzati in ambito farmaceutico e cosmetico.**

Tubo di Coolidge



- **STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI**

- **C) Impianto di sterilizzazione mediante raggi X**

- Un fascio di elettroni (ottenuti da un filamento, con correnti dell'ordine di alcune decine di mA) viene accelerato ad elevato voltaggio (ordine di decine di kV) contro un anodo metallico.
- L'energia viene principalmente dissipata come calore (>95%) e in parte minore utilizzata per l'emissione di radiazioni X.
- Le energie delle linee caratteristiche (e quindi le lunghezze d'onda prodotte) dipendono dal materiale impiegato come anodo (i più usati sono rame e molibdeno).

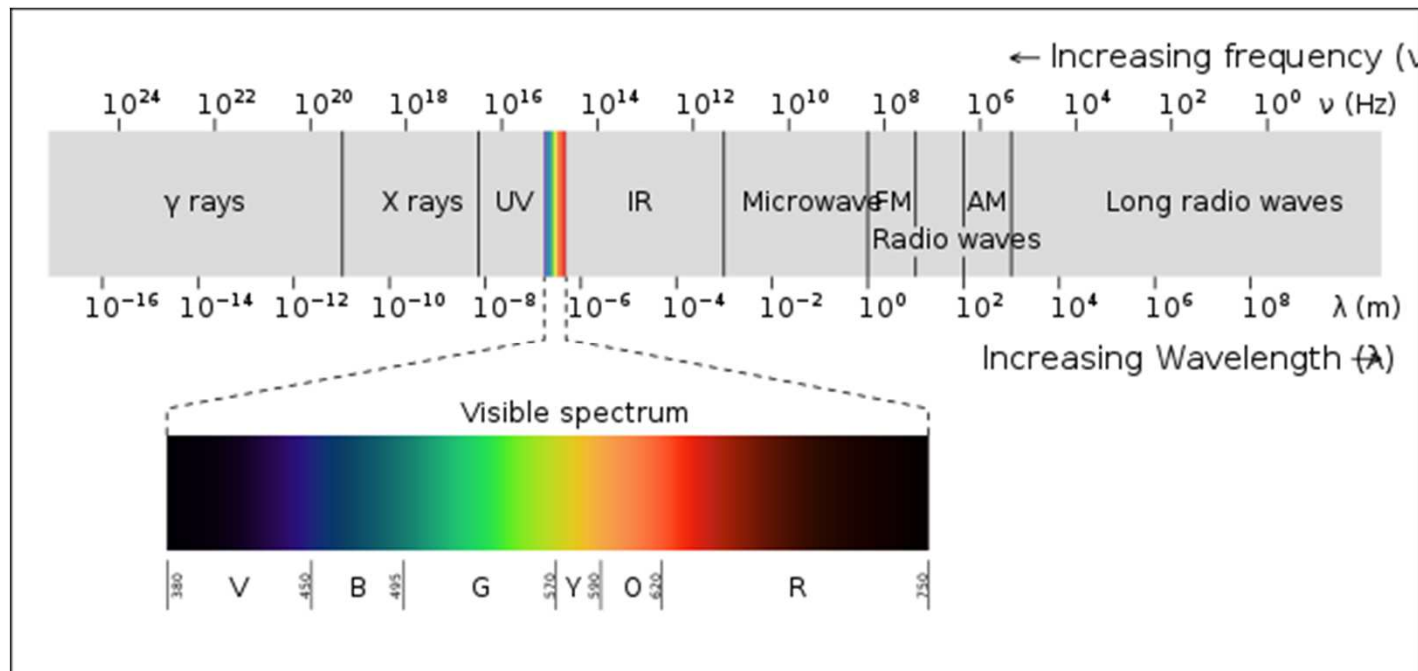
Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **C) Impianto di sterilizzazione mediante raggi X**

La combinazione di un **tempo di esposizione inferiore** e di un **rapporto di uniformità di dose (DUR) migliorato**, rende la sterilizzazione con raggi X un'opzione di trattamento valida per una grande varietà di prodotti. Similmente al fascio di elettroni accelerati, il trattamento con raggi X è alimentato mediante elettricità.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **C) Impianto di sterilizzazione mediante raggi X**

Flessibilità

La possibilità di miscelare prodotti differenti aventi diversi requisiti di dosaggio nello stesso ciclo di irradiazione, è data dal fatto che la soluzione si basa su un concetto di **dose incrementale**. Un incremento consiste di quattro passaggi del pallet davanti al bersaglio dei raggi X (pallet irradiato dall'alto verso il basso, frontalmente e posteriormente). L'incremento di dose è dato dalla dose minima che il prodotto può ricevere. Ciascun multiplo della dose incrementale può essere erogato al prodotto aggiungendo incrementi (ovvero se gli incrementi hanno un valore di 2,5 kGy, è possibile erogare al prodotto 25 kGy con 10 incrementi).

Penetrazione

Migliore che nel fascio di elettroni accelerati e simile all'irradiazione gamma con **meno impatto** sui materiali del prodotto. Il trattamento con irradiazione di raggi X copre una serie di applicazioni che vanno dalla sterilizzazione di dispositivi medici alla sanitizzazione di imballaggi, cosmetici e prodotti per l'igiene personale.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

STERILIZZAZIONE MEDIANTE RADIAZIONI IONIZZANTI

Impianti di irraggiamento

- **C) Impianto di sterilizzazione mediante raggi X**

Penetrazione

Ulteriore vantaggio rispetto alla sterilizzazione mediante raggi gamma è legato al fatto che, a differenza dei gamma, l'esposizione di **prodotti polimerici** non risente di modificazioni strutturali e/o meccaniche dato il limitato tempo di esposizione e l'energia inferiore dei raggi X.

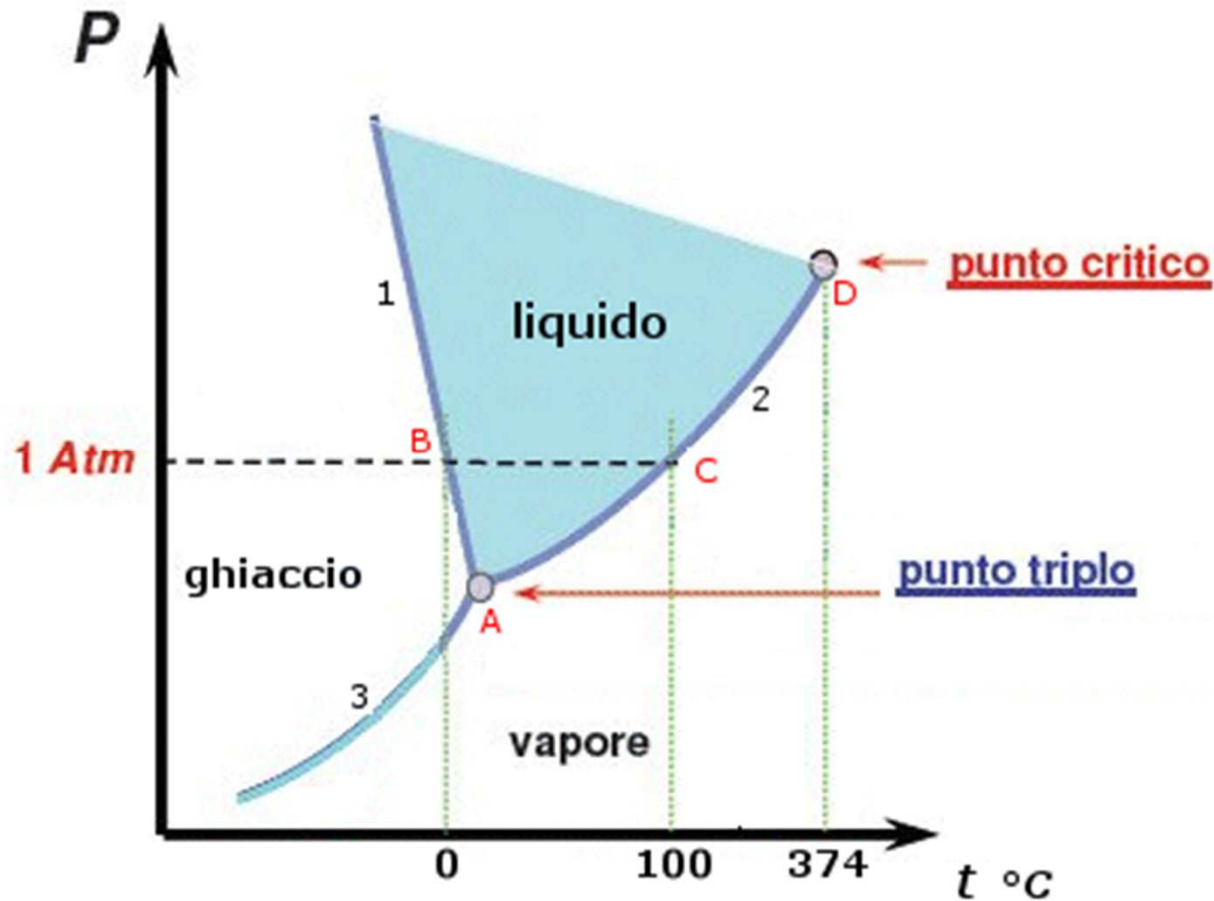
Sostenibilità ambientale

A differenza delle sterilizzazioni a ETO e raggi gamma, questa tecnologia permette di ridurre rifiuti di varia natura che prevedono costose procedure per il loro smantellamento. La tecnica a raggi X si basa sull'utilizzo di corrente elettrica e può contare su **una normativa semplificata e meno costosa per il suo utilizzo**. Questo fattore influenza notevolmente anche la fase di convalida del processo, in quanto le norme sono effettivamente semplificate.

L'acqua per uso farmaceutico

Impianti dell'Industria Farmaceutica

H₂O per uso farmaceutico



L'acqua rappresenta uno dei componenti di maggiore importanza per la **qualità** e la **sicurezza** dei medicinali. In funzione delle caratteristiche del prodotto finito e dello stadio di lavorazione viene impiegata acqua con diverso grado di purezza e con diversi costi di produzione. Le specifiche dell'acqua per uso farmaceutico sono riportate nelle monografie delle **Farmacopee**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

H₂O per uso farmaceutico

L'acqua è l'**eccipiente** più usato nella preparazione dei medicinali per la sua funzione di veicolo, solvente, diluente. L'acqua viene inoltre utilizzata in diversi processi produttivi come materiale coadiuvante-ausiliario e in tal caso permane nella forma finale solo in bassa percentuale (granulazione in umido, rivestimenti ecc.).

L'ampio utilizzo dell'acqua dipende dal fatto che è chimicamente stabile in ogni stato, non presenta problemi di tossicità o tollerabilità, costituendo la base di ogni forma di vita biologica.

Il suo alto **potere solvente** è dovuto essenzialmente ad alcune **caratteristiche chimico-fisiche**: basso volume molare che permette di penetrare facilmente nei reticoli cristallini, forte dipolo permanente, capacità di formare legami idrogeno e alta costante dielettrica.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Proprietà chimico-fisiche acqua:

P.M.	18.02
Punto ebollizione	100°C
Pressione critica	218.3 atm
Temperatura critica	374.2°C
Costante dielettrica	$D^{25}=78.50$
Momento dipolare	1.76 in benzene a 25°C
Costante ionizzazione (K)	$1.0008 \cdot 10^{-14}$ a 25°C
Calore latente di fusione	6 kJ/mole
Calore latente di vaporizzazione	40.7 kJ/mole
Punto di fusione	0°C
Indice di rifrazione ($\lambda=589$ nm)	$N^{20}_D = 1.333$
Peso specifico	0.9971 a 25°C
Calore specifico (liquido)	4.184 J/g/°C a 14°C
Tensione superficiale	71.97 mN/m a 25°C
Tensione di vapore	3.17 kPa
Viscosità (dinamica)	0.89 mPa s a 25°C
Conducibilità elettrica	0.055 $\mu\text{S/cm}$ a 25°C

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualità dell' H₂O per uso farmaceutico

L'acqua potabile già risponde a particolari requisiti riportati in norme nazionali, ma **non** può essere usata come tale per la produzione farmaceutica per la presenza di numerose impurezze:

- Ioni;
- Sostanze organiche;
- Gas disciolti;
- Microrganismi non patogeni;
- Microrganismi pirogeni;

L'uso di questo tipo di acqua è limitato ai primi stadi di produzione di materie prime *in bulk*, alimentare impianti per la produzione di acqua purificata, ma **non** nella preparazione delle forme di dosaggio o nella preparazione dei reagenti o delle soluzioni per i test.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualità dell' H₂O per uso farmaceutico

➤ Ioni

Gli ioni contenuti nell'acqua potabile possono provocare la formazione e precipitazione di sali insolubili in forme farmaceutiche liquide, alterare la viscosità e consistenza di geli ed altri preparati semisolidi, influire sulla stabilità chimica del principio attivo agendo da catalizzatori di processi di degradazione.

➤ Sostanze organiche

Nel caso di solventi organici miscibili può avvenire una alterazione delle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua e causare difficoltà nella sua purificazione (es. miscele azeotropiche).

➤ Gas disciolti

Principalmente CO₂

➤ Microrganismi non patogeni

➤ Microrganismi pirogeni

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualità dell' H₂O per uso farmaceutico

Acqua depurata (PW)

Essa si prepara mediante distillazione, scambio ionico o altro metodo adeguato a partire dall'acqua potabile. Le Farmacopee prescrivono l'utilizzo di acqua depurata per la preparazione di medicinali diversi da quelli che devono presentare caratteristiche di sterilità e apirogenicità.

Parametri	Valori limite
Conducibilità	≤ 4.3 μS/cm a 20°C
TOC (Carbonio Organico Totale)	≤ 0.5 mg/L
Carica microbica	≤ 100 CFU/mL "CFU=Unità Formanti Colonie"
Nitrati	≤ 0.2 ppm
Metalli pesanti	≤ 0.1 ppm
Alluminio	≤ 10 μg/L (soluzioni per dialisi)
Endotossine batteriche	≤ 0.25 UI/ml (soluzioni per dialisi) "UI=Unità Internazionali"

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualità dell' H₂O per uso farmaceutico

Acqua per preparazioni iniettabili (WFI)

Delle varie qualità di acqua usate nell'industria farmaceutica, la WFI è sicuramente la più critica essendo destinata alla fabbricazione di soluzioni parenterali (vaccini, fleboclisi,..) che entrano direttamente a contatto col sangue dei pazienti. Essenziale quindi che non siano presenti contaminanti tossici o che possano interferire con l'effetto terapeutico del prodotto.

Parametri	Valori limite
Conducibilità	$\leq 1.1 \mu\text{S/cm}$ a 20°C
TOC (Carbonio Organico Totale)	$\leq 0.5 \text{ mg/L}$
Carica microbica	$\leq 10 \text{ CFU/mL}$ "CFU=Unità Formanti Colonie"
Nitrati	$\leq 0.2 \text{ ppm}$
Metalli pesanti	$\leq 0.1 \text{ ppm}$
Endotossine batteriche	$\leq 0.25 \text{ UI/ml}$ (soluzioni per dialisi) "UI=Unità Internazionali"

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualità dell' H₂O per uso farmaceutico

Acqua altamente depurata (HPW)

La HPW soddisfa gli stessi standard qualitativi della WFI pur non essendo prodotta per distillazione. Essendo il metodo meno affidabile, non è accettato un suo uso al posto della WFI per produzione medicinali parenterali. È invece una valida alternativa per preparazione di medicinali sterili (prodotti oftalmici, nasali, otologici (orecchio) o per uso cutaneo).

Parametri	Valori limite
Conducibilità	≤ 1.1 μS/cm a 20°C
TOC (Carbonio Organico Totale)	≤ 0.5 mg/L
Carica microbica	≤ 10 CFU/mL “CFU=Unità Formanti Colonie”
Nitrati	≤ 0.2 ppm
Metalli pesanti	≤ 0.1 ppm
Endotossine batteriche	≤ 0.25 UI/ml (soluzioni per dialisi) “UI=Unità Internazionali”

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Tecnologie di produzione

Nella produzione di acqua farmaceutica si impiegano unità operative sequenziali per ottenere un prodotto conforme agli attributi di qualità prestabiliti.

I processi produttivi specifici si basano essenzialmente sulla:

- Demineralizzazione su resine a scambio ionico;
- Osmosi inversa (RO);
- Distillazione;

Inoltre **pretrattamenti** (coadiuvanti) come filtrazione su carbone, ultrafiltrazione, raggi UV possono contribuire a limitare la proliferazione, distruggere o rimuovere m.o e altri contaminanti.

La scelta degli impianti di trattamento dipende dalla qualità dell'acqua di alimentazione, dalle specifiche di qualità dell'acqua richiesta e dalla applicazione farmaceutica.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Tecnologie di produzione

Produzione di acqua WFI:

Distillazione –metodo dispendioso ma efficace e riconosciuto come il migliore dalle Farmacopee (passaggio di stato dell'acqua e alte temperature operative)

Membrane semipermeabili (pretrattamento) -capacità filtranti delle membrane ultrafiltrazione con cut-off di 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) e membrane per RO con cut-off di 200 NMWL. Metodi produzione WFI non accettati in tutti i paesi. Può essere utilizzata come metodica per acqua HPW.

Problema



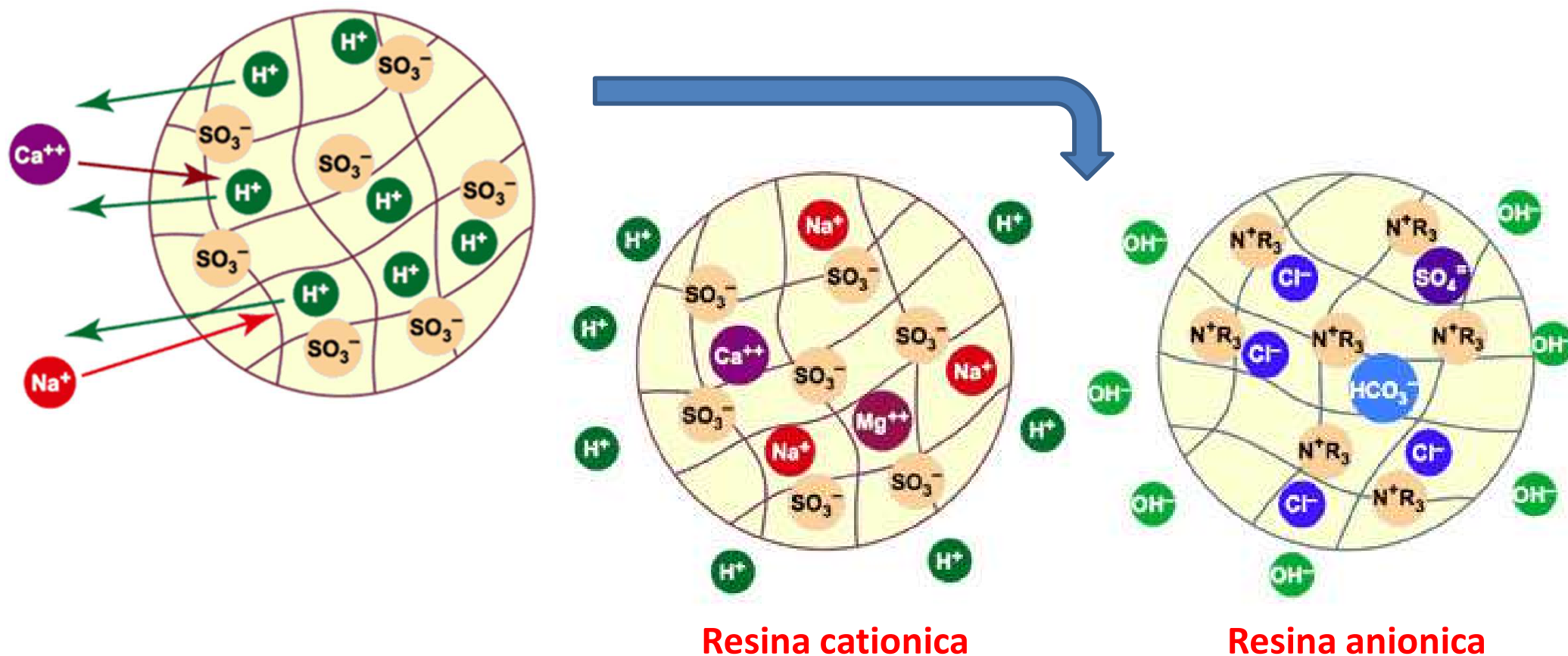
La perfetta integrità delle membrane
non determinabile per la CONVALIDA

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Premesso che la qualità dell'acqua non dipende solo dai sistemi di **produzione** ma anche dallo **stoccaggio e distribuzione** che devono mantenerla entro gli standard previsti, vediamo i trattamenti più utilizzati per la sua produzione.

Demineralizzazione con resine a scambio ionico



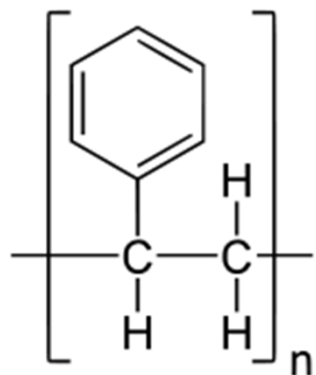
Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

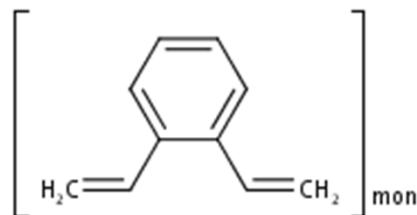
Demineralizzazione con resine a scambio ionico

La matrice delle resine a scambio ionico è di natura polimerica.

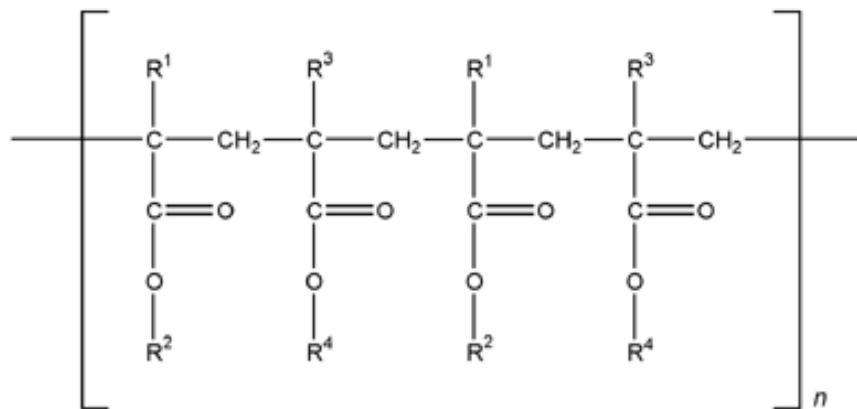
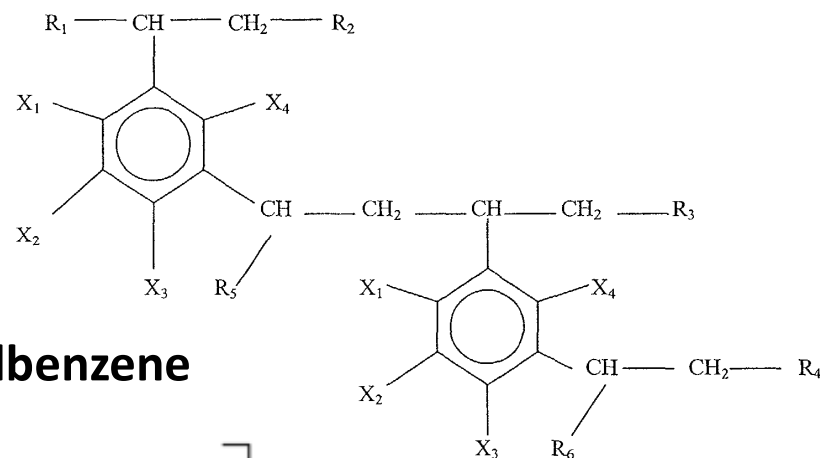
Costituito da un **copolimero** fatto di stirene e divinil benzene o metacrilato, strutture alle quali sono legati i gruppi ionici.



Polistirene



Polidivinilbenzene

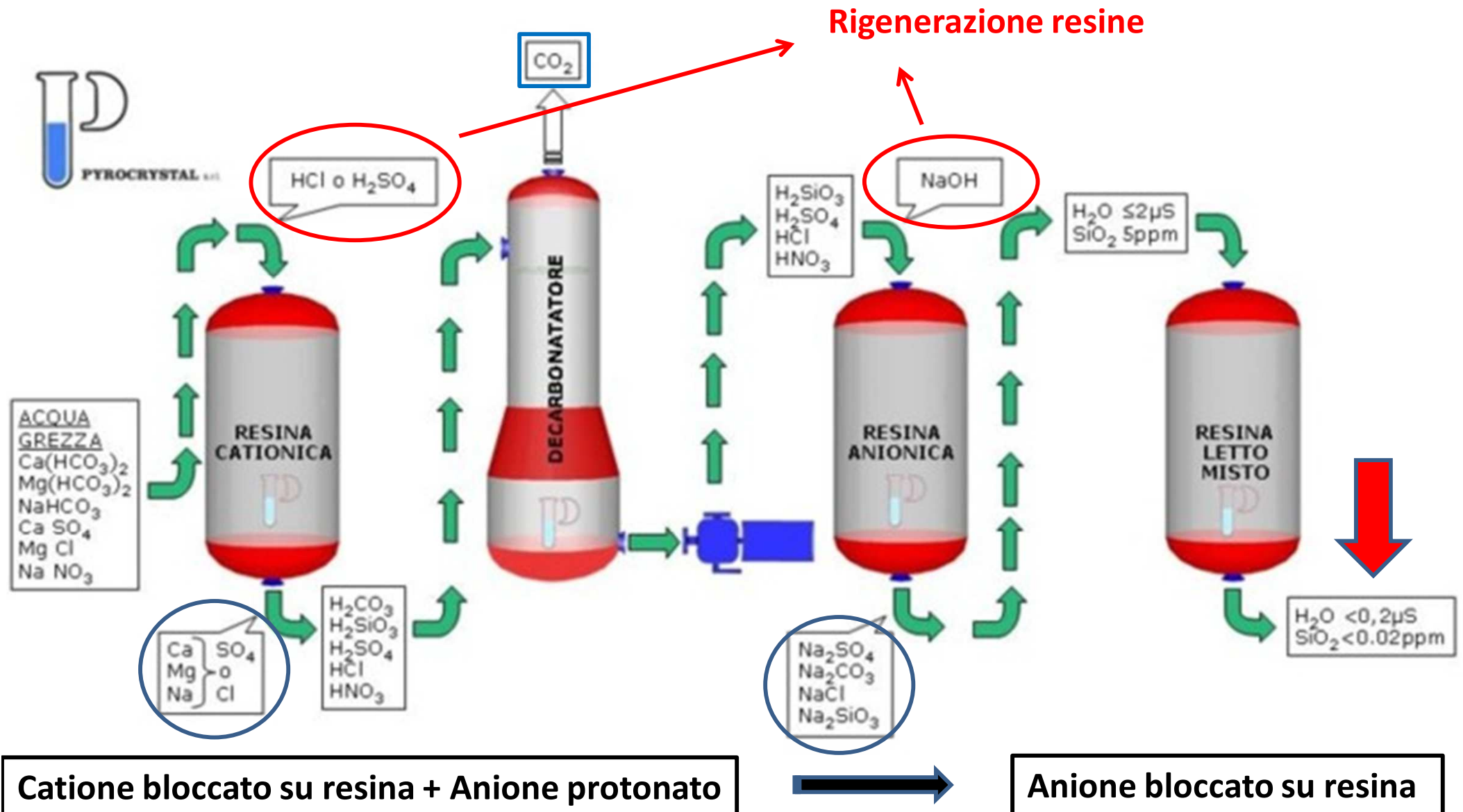


Polimetacrilato

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Demineralizzazione con resine a scambio ionico + Degasatore



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Demineralizzazione con resine a scambio ionico + Degasatore

- Impianti di piccola portata ($10\text{m}^3/\text{h}$)
- Conducibilità acqua prodotta di circa $1\mu\text{S}$
- Rigenerazione resine effettuata ogni 48 h.
- Degasatore opera per via fisica l'eliminazione di CO_2

Problematiche:

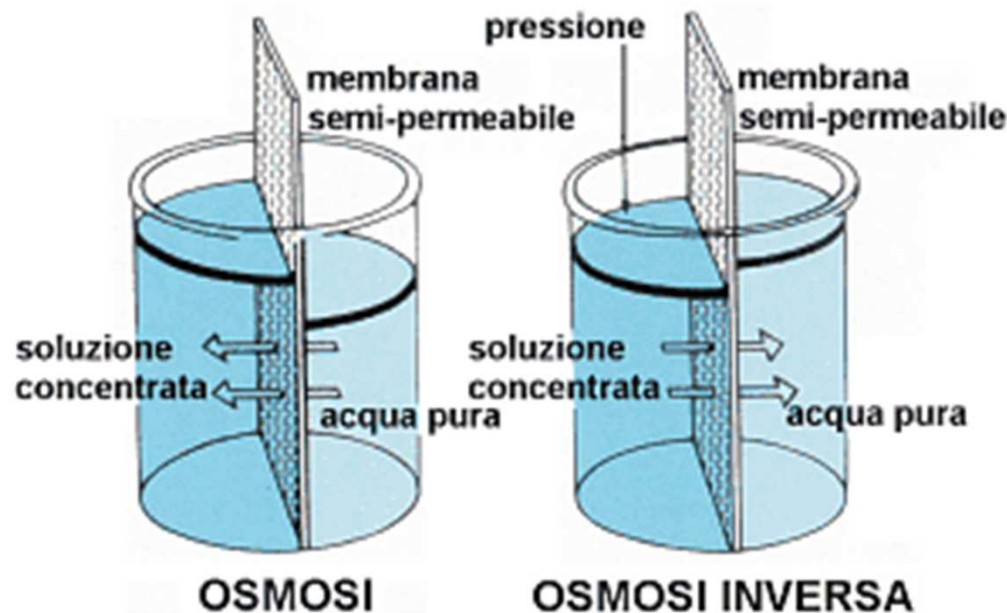
- Peggioramento nel tempo della qualità dell'acqua
- Diminuzione della resa
- Prolungamento dei tempi di lavaggio, aumento delle perdite di carico
- Manipolazione da parte degli addetti di soluzioni concentrate di HCl e NaOH
- Gestione dei reflui di rigenerazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Osmosi inversa (Reverse Osmosis)

Processo osmotico naturale per il quale l'acqua passa da una soluzione più diluita ad una più concentrata attraverso una membrana semipermeabile. Se si applica una pressione superiore a quella osmotica dalla parte della soluzione più concentrata si attua **l'osmosi inversa**.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Osmosi inversa (Reverse Osmosis)

La membrana semipermeabile è un particolare tipo di membrana detta ***a spirale avvolta RO***. Nell'industria farmaceutica è il più usato.

Questa dovrebbe idealmente lasciar passare l'acqua trattenendo completamente i sali. Poiché questo non si verifica mai, ogni membrana a seconda della percentuali di sali che lascia passare viene caratterizzata da un **tasso di reiezione**:

$$T_{\text{rey}} = (1 - C_p / C_a) * 100$$

Dove:

Trey= tasso di reiezione ai Sali in %

Cp= concentrazione in Sali del prodotto

Ca= concentrazione in Sali dell'alimentazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Osmosi inversa (Reverse Osmosis)

Il sistema RO svolge un processo di esclusione ionica per cui solo il solvente può attraversare la membrana semipermeabile, mentre virtualmente tutte le molecole disciolte - inclusi i sali e gli zuccheri - vengono ritenute. Questa membrana semipermeabile reietta i sali (ioni) in **funzione della carica**: maggiore è la carica e maggiore è la percentuale di reiezione. In ogni caso, gli ioni polivalenti vengono reiettati oltre il 99%, mentre gli ioni monovalenti, quali il sodio, vengono reiettati per il 95%.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Osmosi inversa (RO)

Queste membrane sono costituite da materiali polimerici.

Le qualità che si richiedono ad una membrana semipermeabile sono:

- Alta permeabilità all'acqua pura
- Alta selettività ai Sali minerali e ai composti organici
- Bassa biodegradabilità ed elevata inerzia
- Possibilità di utilizzo entro un ampio intervallo di pH
- Buona resistenza meccanica
- Buona stabilità nel tempo

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Elettrodeionizzazione

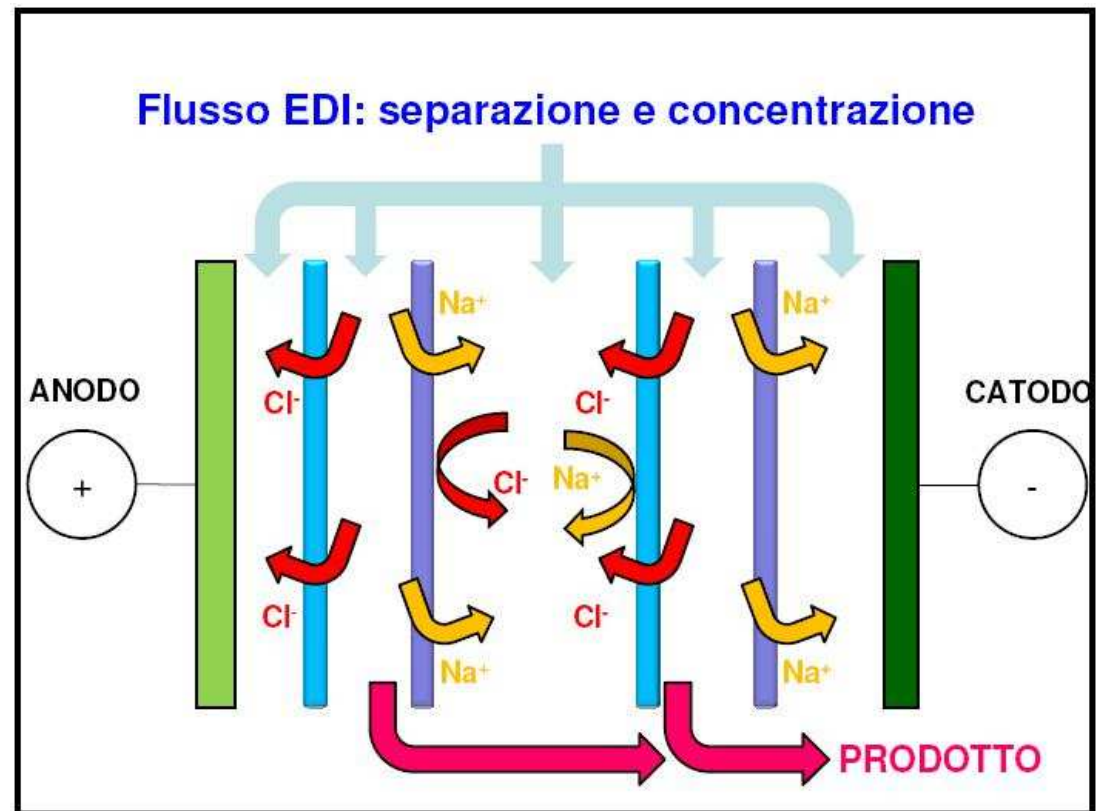
Combina l'impiego di resine e membrane a scambio ionico per la produzione di acqua ad elevato grado di demineralizzazione. Nelle industrie farmaceutiche per produzione di acqua PW e HPW.

Le membrane semipermeabili di scambio cationico e anionico sono posizionate **alternativamente** formando diverse colonne all'interno dell'impianto cosicché gli ioni possano **migrare sotto l'effetto del campo elettrico**, attraversare la membrana ad essi permeabile e concentrarsi nella colonna di rigetto. Una volta finiti in quest'ultima agli ioni non è consentito di riattraversare la membrana successiva perché essa è a loro impermeabile.

- **Elettrodeionizzazione**

- Le resine a scambio anionico catturano gli anioni presenti nell'acqua e liberano ioni ossidrilici nel comparto di impoverimento; grazie al campo elettrico imposto dall'esterno detti anioni migrano attraverso la membrana stessa per accumularsi nel comparto di rigetto; in modo speculare avviene per le resine a scambio cationico che liberano però ioni idrogeno nel comparto di impoverimento. Gli ioni idrogeno (H^+) e ossidrilici (OH^-) nel comparto di impoverimento rigenerano H_2O .

- L'acqua deionizzata (prodotto) viene raccolta invece dalle colonne dove avviene l'impoverimento degli ioni.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Elettrodeionizzazione

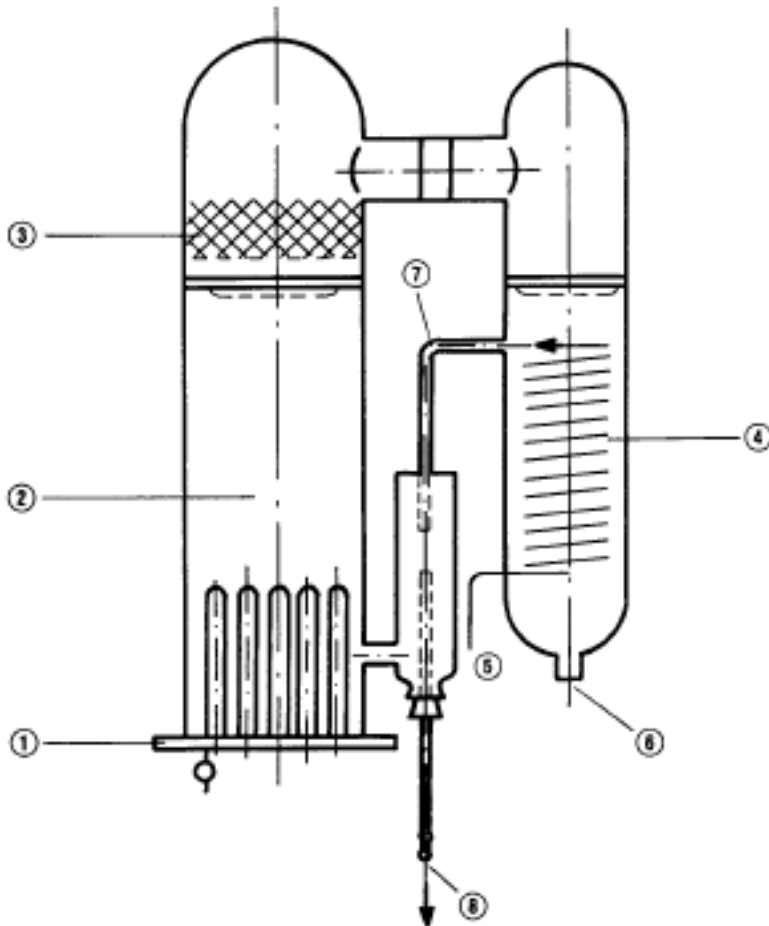
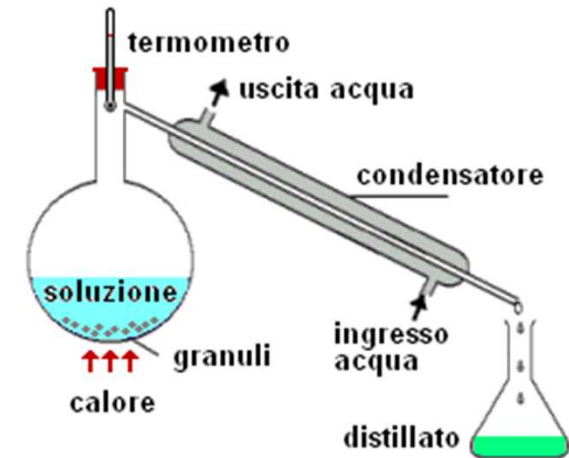
I sistemi a elettrodeionizzazione operano in **continua rigenerazione dovuta al campo elettrico applicato alle membrane di elettrodialisi**. Infatti, le resine anioniche hanno bisogno di essere continuamente rigenerate di ioni ossidrile, viceversa quelle cationiche di ioni idrogeno. Detti ioni vengono prodotti dall'idrolisi dell'acqua sulla superficie delle resine per effetto del forte campo elettrico applicato. Questo tipo di rigenerazione utilizza perciò unicamente l'acqua ed è rispettoso per l'ambiente.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione semplice

I sistemi non permettono l'ottenimento di acqua WFI. Non in uso nell'industria farmaceutica.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

I sistemi permettono l'ottenimento di acqua WFI.

Negli impianti di evaporazione/concentrazione il maggior costo di esercizio è costituito dalla produzione di *vapore di rete*, ottenuto mediante ebollizione in apposite caldaie di acqua demineralizzata, distribuzione del vapore prodotto in rete come vapore saturo secco- in realtà leggermente surriscaldato per evitare la condensazione durante il percorso-recupero e riciclo alla caldaia delle acque di condensa.

In un impianto di evaporazione si definisce efficienza (**E**) il rapporto tra portata di vapore prodotto e portata vapore di rete consumato:

$$E = \frac{\text{Vapore prodotto}}{\text{Vapore di rete}}$$

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

In un impianto **a singolo effetto** il valore di E è vicino a 1, cioè per ogni kg di vapore svolto è necessario circa 1kg di vapore di rete e quindi l'efficienza dell'impianto è modesta, in quanto la produzione di vapore di rete è molto onerosa dal punto di vista energetico, in quanto l'acqua ha un elevato calore latente di evaporazione.

Negli impianti **a multiplo effetto**, dove sono presenti più evaporatori collegati in serie, si cerca di aumentare il valore di E in modo che:

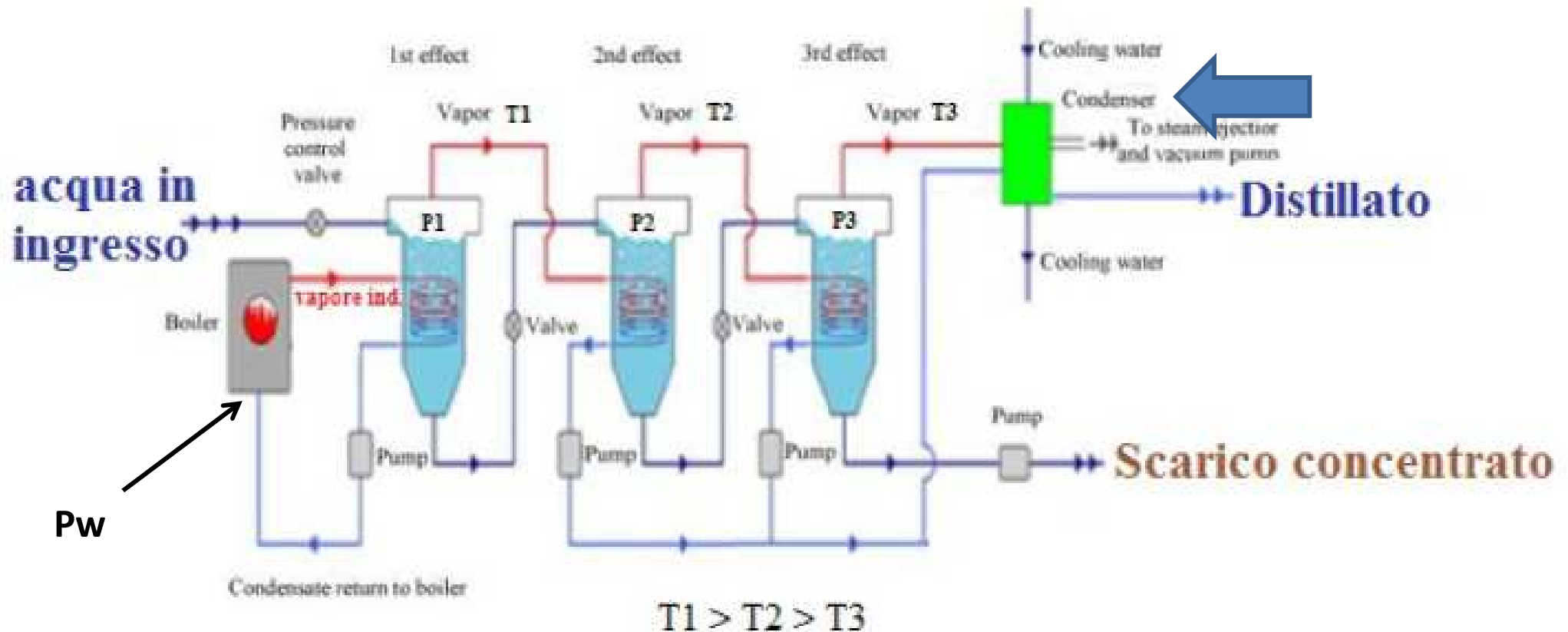
$E > 1$. Per raggiungere questo obiettivo si utilizza il vapore prodotto V come fluido di riscaldamento per l'operazione di evaporazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto in equicorrente

I sistemi permettono l'ottenimento di acqua WFI.



$$P1 > P2 > P3$$

$$\text{Conc.1} < \text{Conc. 2} < \text{Conc.3}$$

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

Se TW (temperatura vapore di riscaldamento) è **uguale** a TS (temperatura di ebollizione della soluzione, ovvero temperatura TV del vapore prodotto) allora:

$$\Delta T = 0$$

e quindi il calore scambiato Q sarebbe nullo.

Pertanto il vapore prodotto in un effetto potrà essere utilizzato come fluido di riscaldamento per un secondo evaporatore e così via **solo se tra i diversi effetti viene stabilita un differenza di pressione**, cioè passando da un effetto al successivo si ha una progressiva diminuzione della pressione e quindi anche della temperatura di ebollizione della soluzione, ovvero del vapore prodotto; in tal modo si avrà sempre un ΔT diverso da zero.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

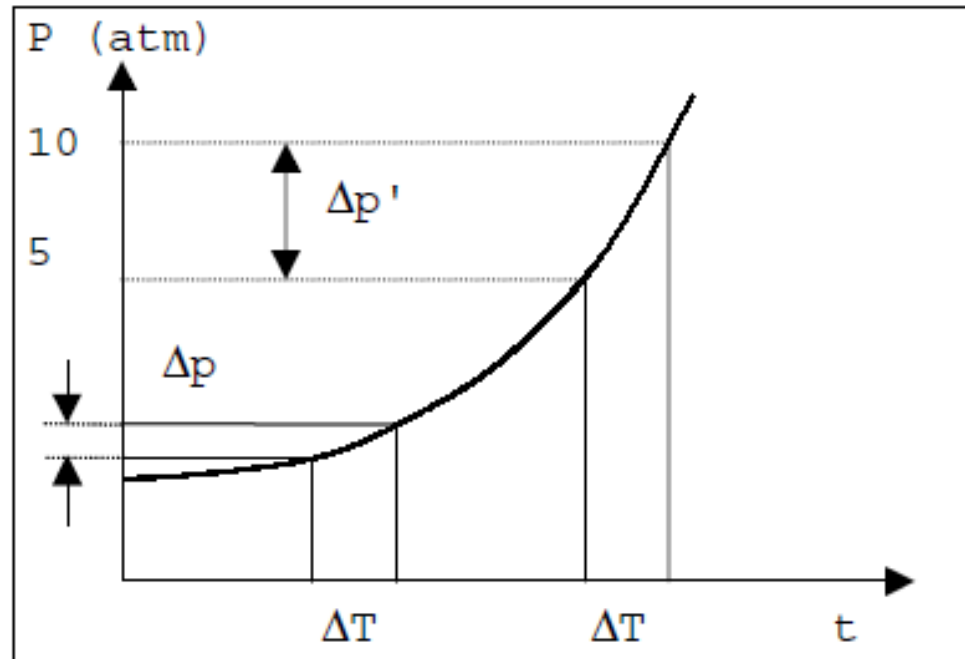


Diagramma della **tensione di vapore** al variare di T e P (andamento esponenziale). All'interno di ogni evaporatore, la nostra esigenza è avere più differenza possibile (ΔT) tra la **temperatura del vapore che condensa** (nella serpentina) e la **temperatura dell'acqua che evapora dalla soluzione**. Come valori di **P_{max}** quindi conviene partire dalla P atm. e muoversi verso il vuoto (piccolo ΔP) per ottenere lo stesso ΔT che si otterrebbe a pressioni più elevate.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

- Con questa distillazione si ottiene una riduzione del consumo di energia termica.
- Il calore iniziale è fornito da una sorgente esterna (vapore industriale) soltanto al primo effetto (1° stadio).
- Il fatto che la soluzione si concentri procedendo negli effetti determina il fenomeno *dell'innalzamento ebullioscopico* che deve essere considerato nella corretta impostazione della ΔP (e di conseguenza ΔT).
- L'acqua distillata esce dal condensatore finale ad una temperatura di circa 95°C.
- Da studi effettuati sul bilancio energetico totale del processo, risulta che il gradiente di temperatura fra gli effetti non deve subire un salto di temperatura inferiore ai 5-6°C.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillazione a multiplo effetto

A seconda del percorso di vapori e soluzioni si hanno due tipi di impianti a multiplo effetto:

- **equicorrente**: vapori e soluzioni si muovono nell'impianto nella stessa direzione
- **controcorrente**: vapori e soluzioni si muovono nell'impianto in direzioni opposte

Le caratteristiche del multiplo effetto **in equicorrente** sono le seguenti:

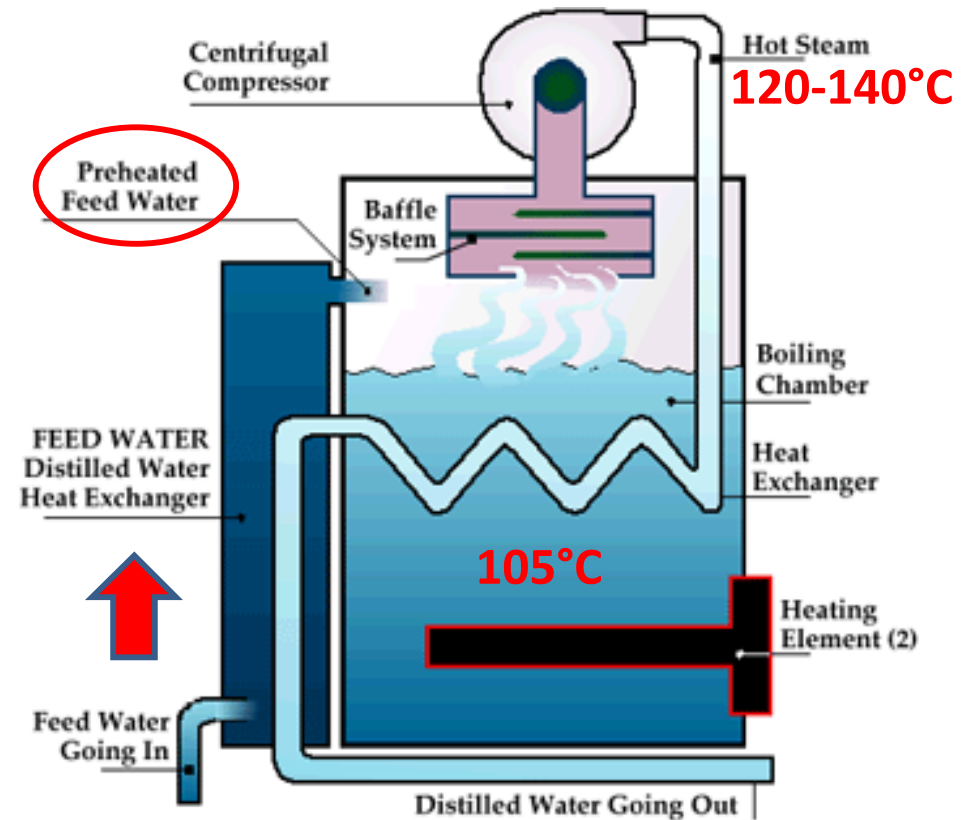
- Le soluzioni si spostano senza bisogno di pompe di circolazione tra gli effetti in quanto si muovono spontaneamente verso ambienti a pressione decrescente e ciò permette di risparmiare nei costi di impianto. Solo nell'ultimo effetto è necessaria una pompa di estrazione della soluzione concentrata, di tipo rotativo e non centrifugo vista l'elevata concentrazione e quindi l'elevata viscosità;

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillatore con termocompressore

Il preriscaldatore dell'acqua di alimentazione è separato rispetto alla camera di evaporazione. Esso consiste in uno scambiatore di calore a fascio tubiero, il distillato caldo, viene fatto passare sia attraverso l'evaporatore (mantenendo la soluzione a T evaporazione) sia attraverso lo scambiatore. Ciò permette di ottenere un distillato già raffreddato prima di essere raccolto. Utilizzato per produzione di WFI.

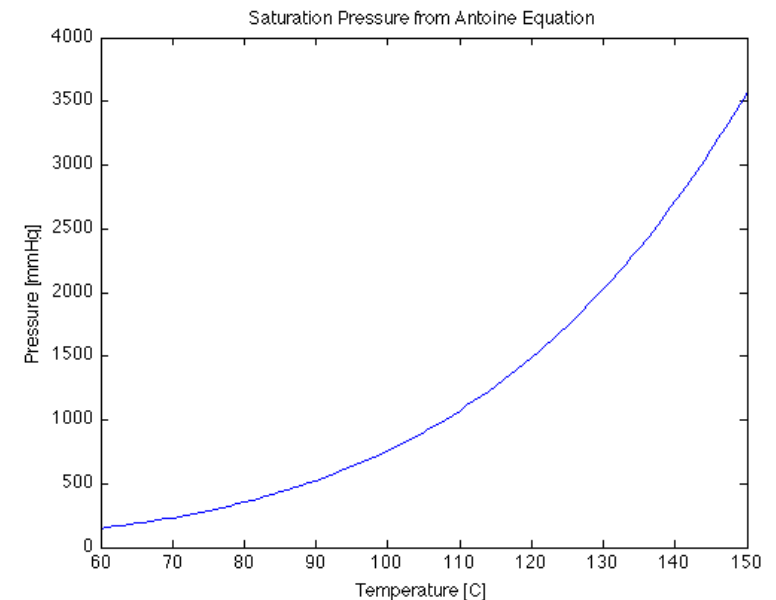
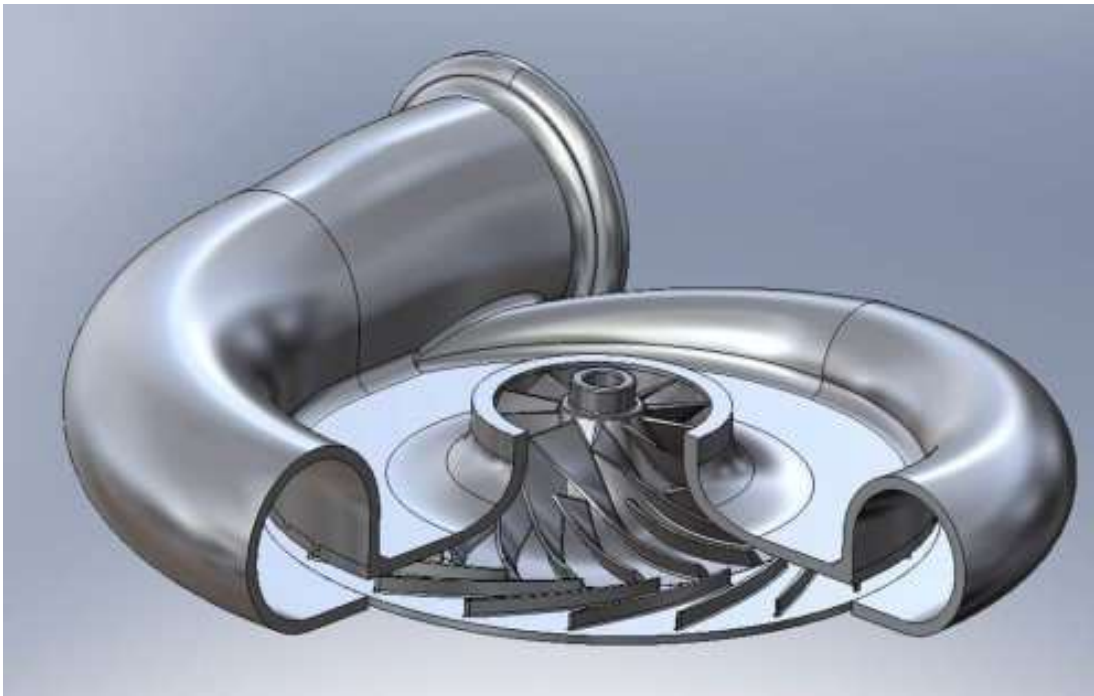


Impianti dell'Industria Farmaceutica

Trattamenti e condizionamenti

Distillatore con termocompressore

La **compressione meccanica del vapore** si basa sul principio che il vapore in uscita dall'evaporatore viene compresso, aumentando così la sua pressione e temperatura di saturazione. Questo vapore compresso può quindi essere utilizzato come vapore di riscaldamento nella stessa fase.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Distillatori a multiplo effetto e con termocompressore

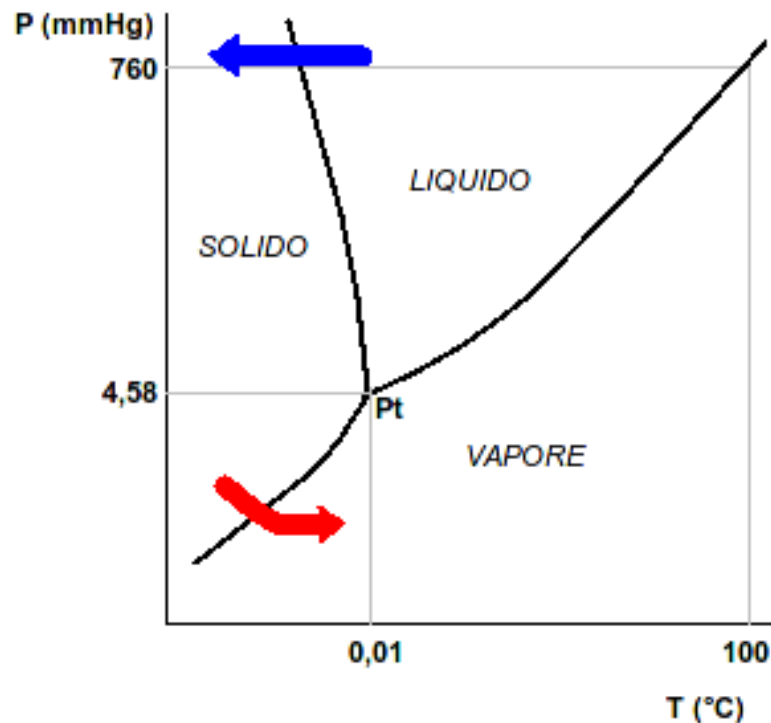


Liofilizzazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Liofilizzazione

La liofilizzazione è una tecnica di essiccamento di soluzioni o sospensioni mediante **sublimazione**, nella quale il materiale da essiccare viene prima portato ad una temperatura sufficientemente bassa da consentire il congelamento del liquido da evaporare e poi posto sotto vuoto spinto per permettere la sublimazione.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Liofilizzazione

La liofilizzazione o crioessiccamento (*lyophilization* o *freeze-drying*) è un metodo ampiamente utilizzato per la **stabilizzazione/conservazione** di prodotti altrimenti facilmente degradabili se allo stato liquido. Trova applicazione in campo microbiologico (conservazione di batteri e virus), biologico (frazioni di sangue, tessuti), alimentare (bevande liofilizzate, ecc.), e farmaceutico (antibiotici, proteine, vaccini, vitamine) **sia come principi attivi che come forma farmaceutica finale**. Nella pratica farmaceutica trova largo impiego anche per l'impiego di farmaci per uso orale e nella produzione di farmaci sterili ad uso iniettabile o oftalmico.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Liofilizzazione

Vantaggi:

- Possibilità di conservare il farmaco nella forma deidratata a TA;
- Creazione di una struttura porosa e friabile con una veloce reidratazione;
- Possibilità di dosare accuratamente la sostanza nel contenitore finale

Svantaggi:

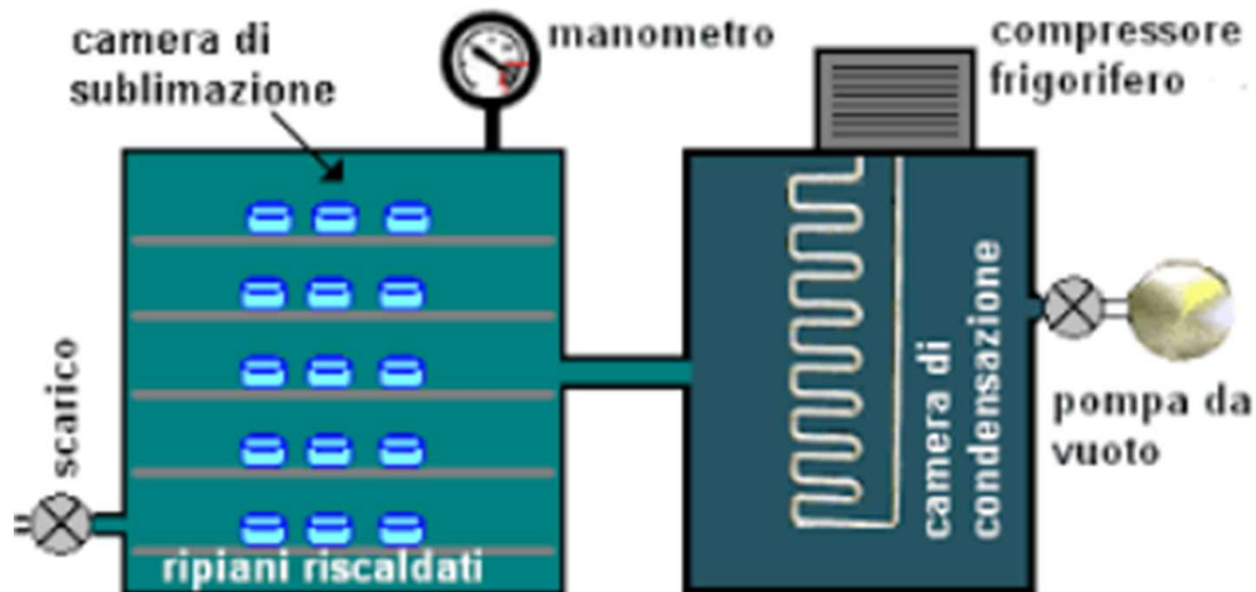
- Costi alti per le attrezzature;
- Consumo di energia elevato;
- Lentezza del processo (24-48 h di media)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

Nella pratica industriale abbiamo le seguenti fasi:

- Fase preliminare
- **Congelamento**
- **Essiccamento primario**
- **Essiccamento secondario**
- Fase conclusiva



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Fase preliminare

- Preparazione della soluzione da liofilizzare: dissoluzione o dispersione del principio attivo e degli eccipienti nell'acqua per preparazioni iniettabili (WFI) quando si tratta di farmaci sterili.
- Filtrazione della soluzione ottenuta
- Ripartizione della soluzione (tecnica asettica per farmaci sterili) in contenitori primari, generalmente flaconi (*vial*) o fiale
- Caricamento dei flaconi contenenti il prodotto da liofilizzare nella camera di liofilizzazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

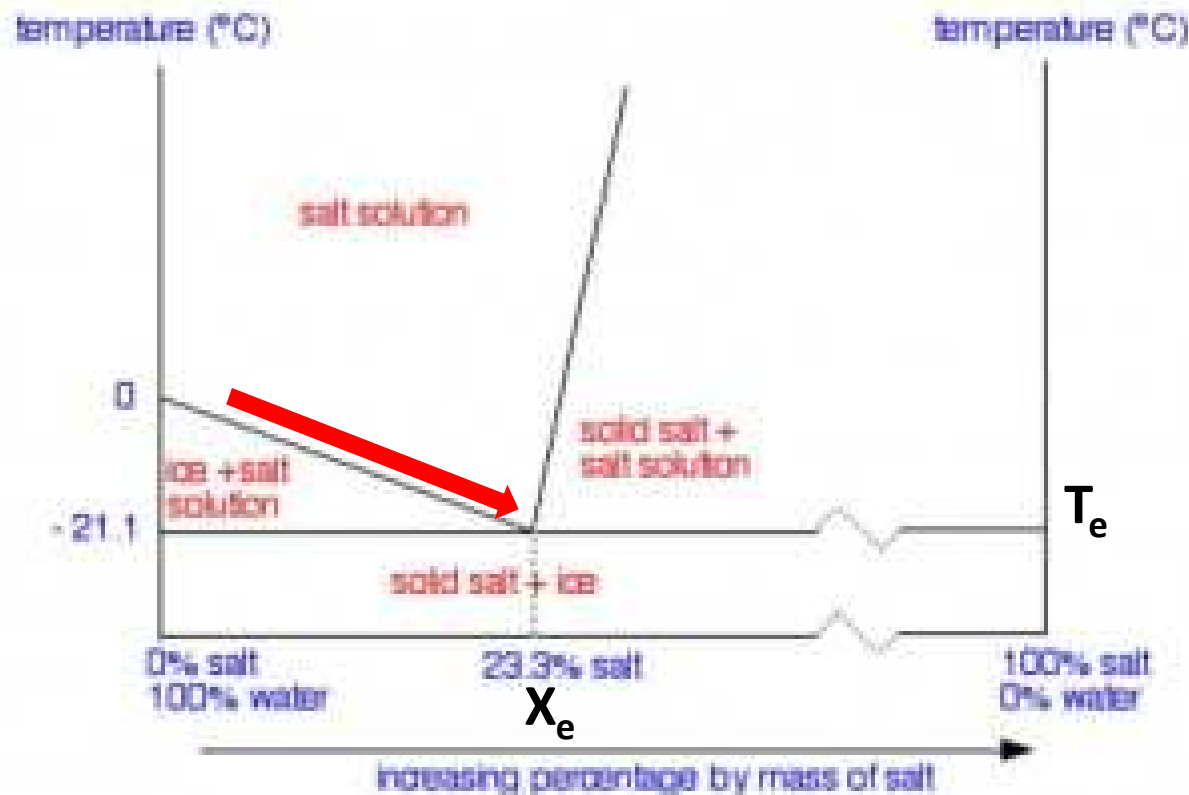
Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

Congelamento miscela binaria Cloruro di Sodio/Acqua, dove:

T_e = Temperatura eutettica

X_e = frazione % NaCl solido



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

- Assumendo che la solubilità del soluto (es. NaCl) sia sufficientemente alta da non permettere la precipitazione dello stesso durante il raffreddamento, si formano prima cristalli di ghiaccio ad una T usualmente al di sotto dei 0°C per effetto del sovraraffreddamento (abbassamento crioscopico o *supercooling*).
- I cristalli di ghiaccio si formano e crescono e la soluzione rimanente (*fluido interstiziale*) diventa più concentrata di soluto
- Continuando a raffreddare si raggiunge la **temperatura eutettica** (T_e) intesa come T in cui la miscela presenta ancora una fase liquida. A questa temperatura si solidifica un miscuglio di cristalli di ghiaccio e cristalli di soluto.
- Con ulteriore lieve abbassamento T anche l'ultima parte liquida solidifica rapidamente

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

Per soluzioni generiche:

- Si definisce la temperatura più alta alla quale l'intero sistema congela (solidifica) come **Temperatura di Completa Solidificazione** (T_{cs}). Questa è la temperatura alla quale non vi è più presenza dello stato liquido ed è OBBLIGATORIO raggiungere tale temperatura se si desidera liofilizzare un prodotto.
- Se il soluto non cristallizza (non forma un vero eutettico) si trasforma in una massa vetrosa rigida quando la temperatura scende al di sotto della Temperatura di Transizione Vetrosa (T_g).

Nelle preparazioni farmaceutiche si dispone raramente di soluzioni semplici da congelare, di conseguenza è necessario stabilire con la maggior cura possibile il comportamento al congelamento e decongelamento del prodotto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

Metodi per lo studio del comportamento del prodotto al congelamento/decongelamento

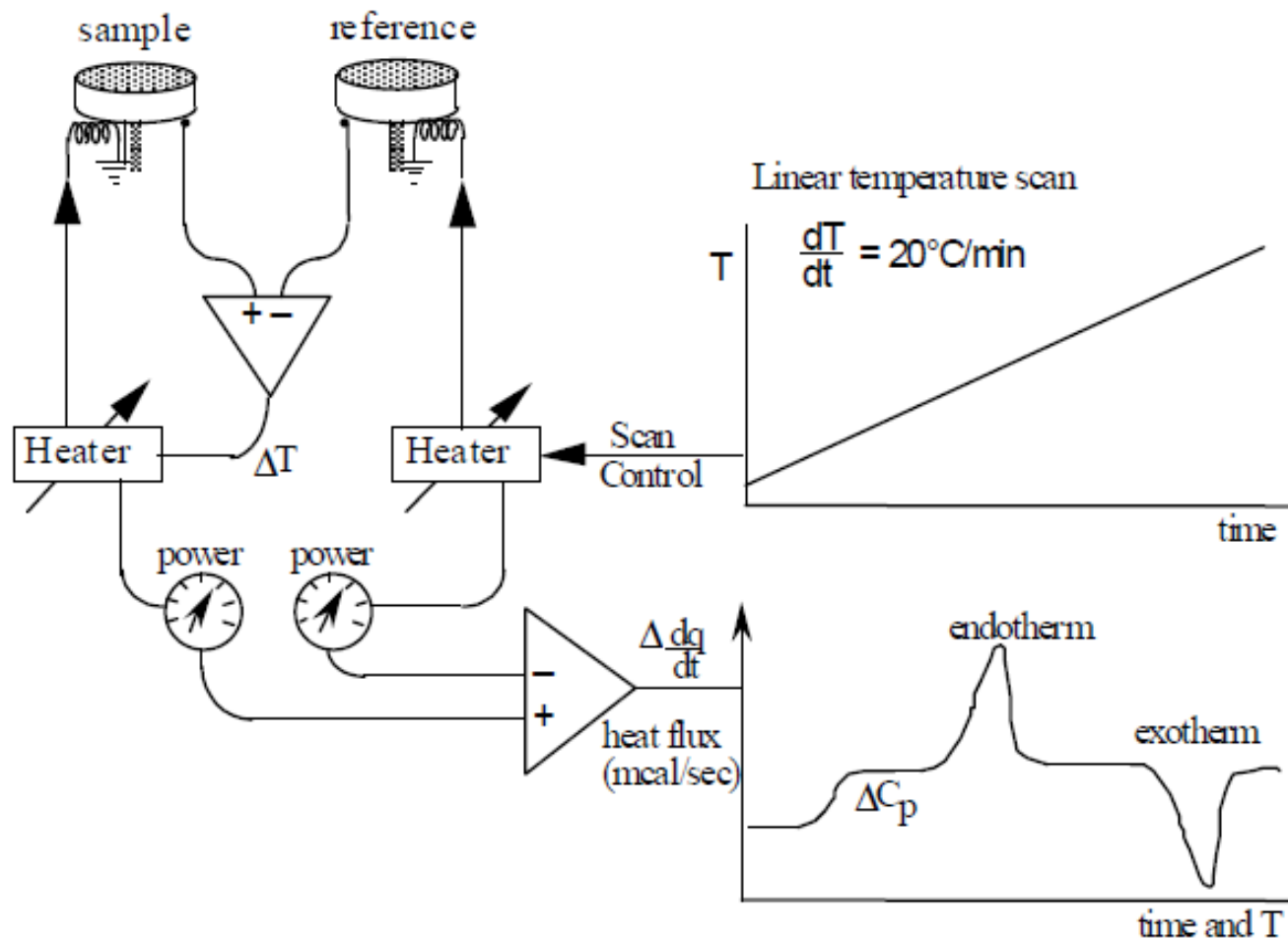
- **DSC (Calorimetria Differenziale a Scansione)**
- **Analisi elettrotermica**
- **Microscopia**

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

DSC (Calorimetria Differenziale a Scansione)



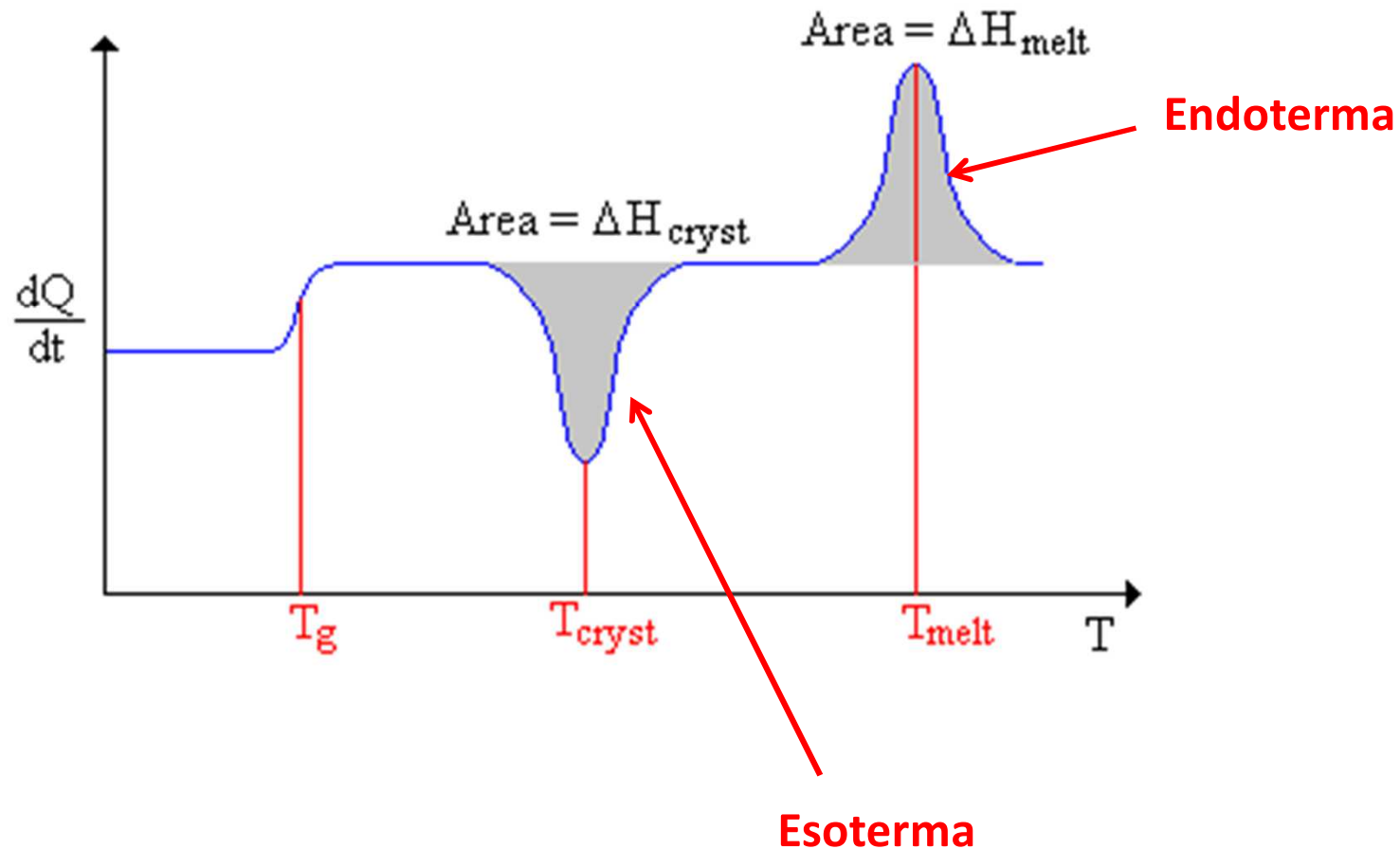
Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

DSC (Calorimetria Differenziale a Scansione)

Un generico termogramma



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

Analisi elettrotermica (misure di resistenza elettrica)

Tale metodica consiste nella simultanea misurazione della **resistenza** e della **temperatura** di un campione ed è vantaggiosa rispetto alla analisi termica di T_{cs} e T_{im} , in quanto la **conduttanza** (e quindi la resistenza) di una soluzione **dipende dalla mobilità delle specie disciolte**.

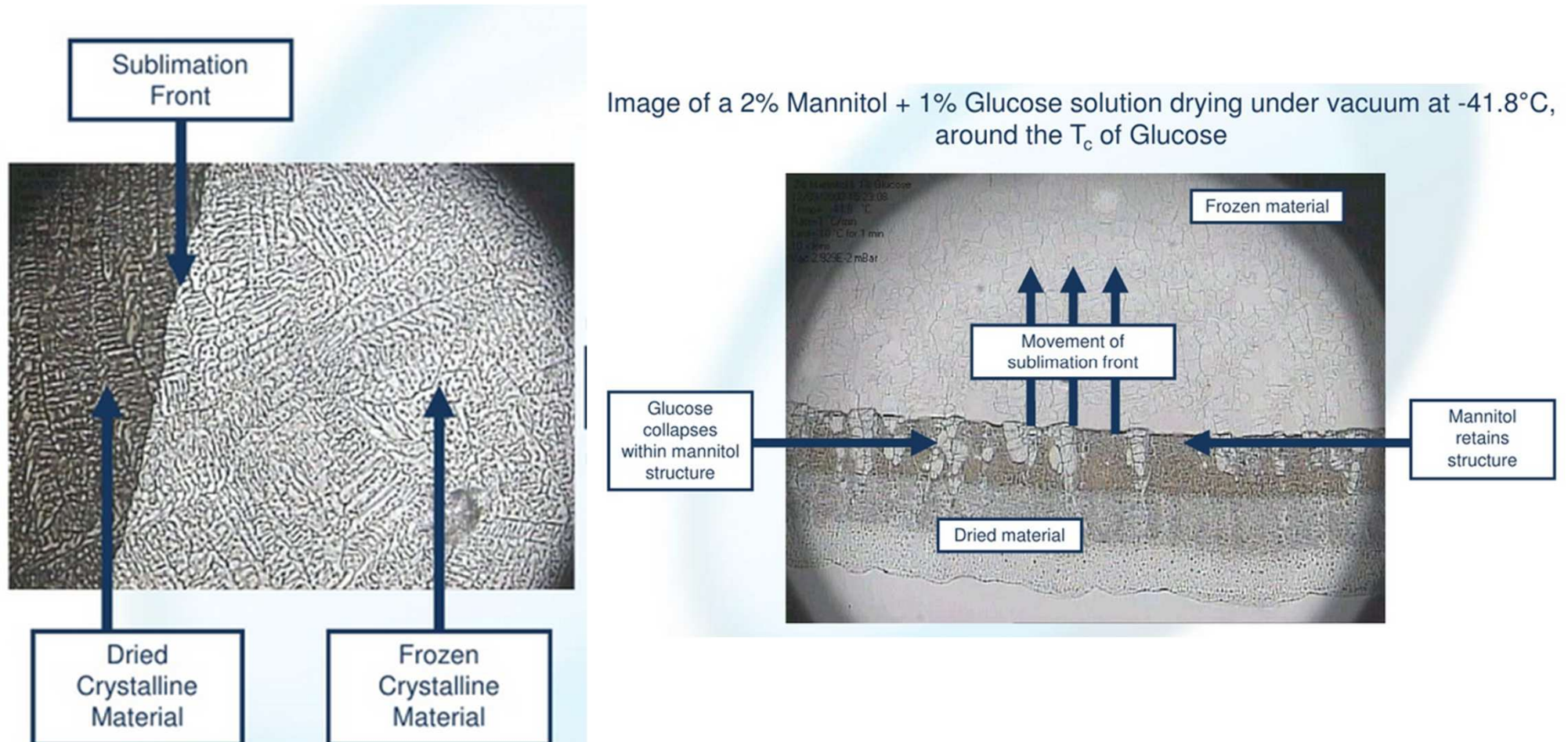
Quando una soluzione è congelata, indipendentemente che la sostanza si trovi allo stato cristallino o vetroso, la sua resistenza aumenta a causa della ridotta mobilità degli ioni.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Congelamento

Microscopia (*freezing and freeze-drying microscopy*)

Questa tecnica permette un controllo diretto del campione mentre viene riscaldato o raffreddato. Può essere visualizzato il corretto congelamento del prodotto (*freezing*) ma anche il processo di liofilizzazione (*freeze-drying*).



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Congelamento

Sistemi di congelamento

Di normale utilizzo nella pratica industriale vi è il congelamento per raffreddamento. Il prodotto viene disposto in vassoi (fiale, vial ecc.) e può essere congelato nella camera di liofilizzazione mediante piastre refrigerate. È ovviamente fondamentale , per un rapido e completo congelamento del prodotto, disporre il materiale su un ampia superficie e minimizzare lo spessore del prodotto da congelare. È inoltre necessario che il contatto fra le superfici delle piastre, dei vassoi contenenti i flaconi sia il più uniforme e continuo possibile.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento primario

Consiste nella rimozione per sublimazione del ghiaccio dal prodotto congelato. Si ottiene **abbassando la pressione** ben al di sotto del punto triplo (200 microbar pari a $2 \cdot 10^{-4}$ atm) e **scaldando il prodotto congelato**. La sublimazione è un fenomeno endotermico, bisogna fornire calore alla massa congelata (*trasferimento di calore*).

I parametri che regolano la velocità di sublimazione seguono la seguente relazione:

$$\text{Velocità sublimazione} = (P_0 - P_C) / (R_P + R_S) \quad \text{dove:}$$

P_0 = pressione di vapore ad una data T del prodotto

P_C = pressione nella camera di liofilizzazione

R_P = resistenza dovuta al prodotto secco (90% della resistenza totale)

R_C = resistenza dovuta al tappo

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento primario

$$\text{Velocità sublimazione} = (P_0 - P_C)/(R_p + R_s)$$

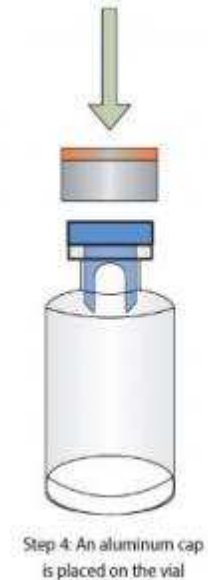
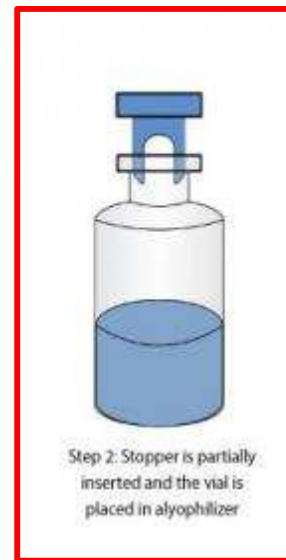
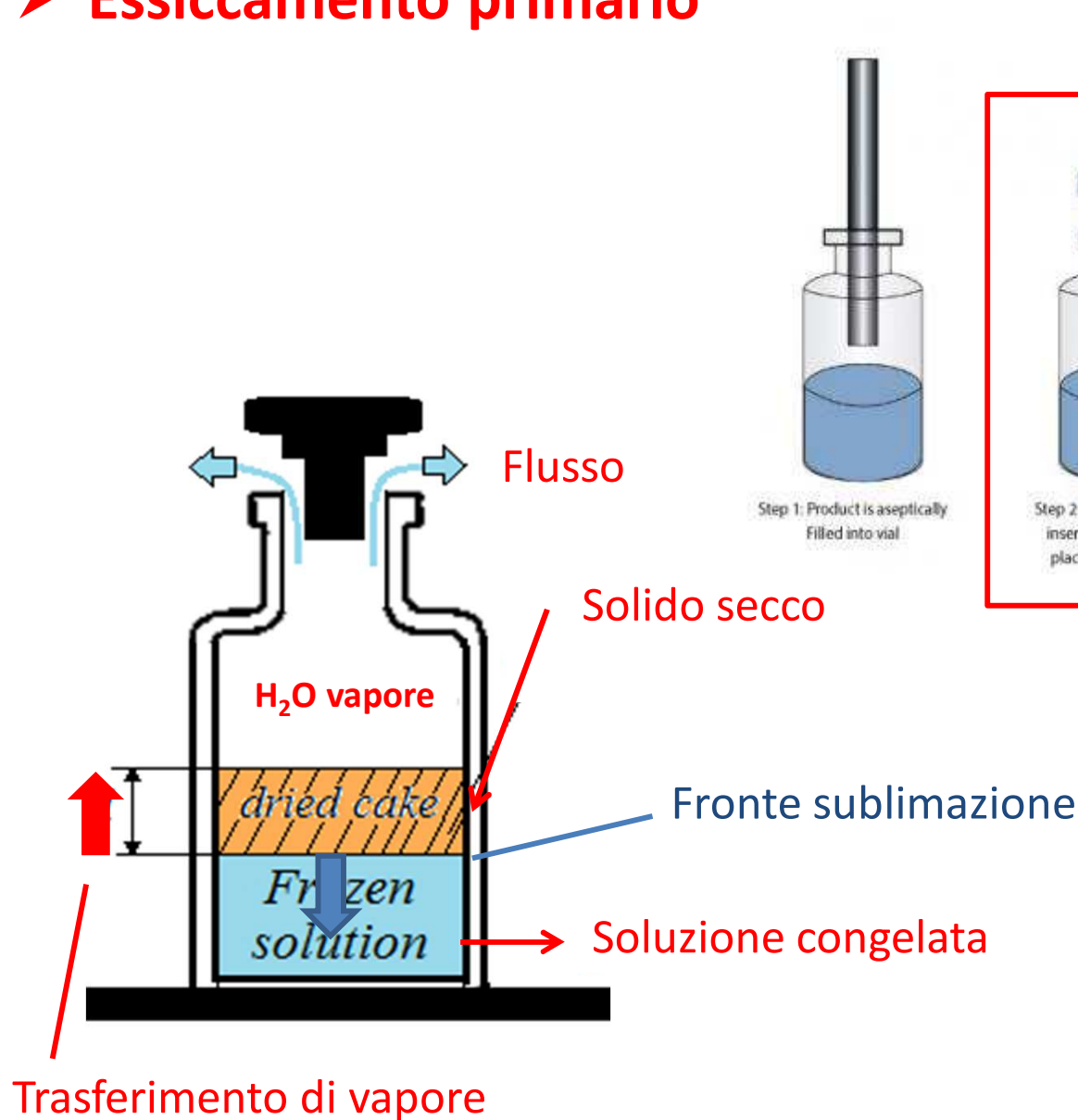
P_0 aumenta esponenzialmente con T , la velocità sublimazione aumenta all'innalzarsi della T del prodotto (13% per ogni grado). Ne consegue che l'essiccamento primario dovrebbe essere svolto alla T più alta possibile per minimizzare la durata del processo di liofilizzazione. Esiste però una T limite che dipende dal prodotto (*T di incipiente fusione*). Se si supera tale T l'essiccamento non produce un liofilo compatto e ben strutturato (problema collassamento prodotto).

Anche abbassare troppo la P_c (pressione camera liofilizzatore) può portare ad un danneggiamento del prodotto e un rallentamento della sublimazione. Di solito la ΔP è di 0.1–0.3 mbar.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento primario



DOIT
Professional & Quality

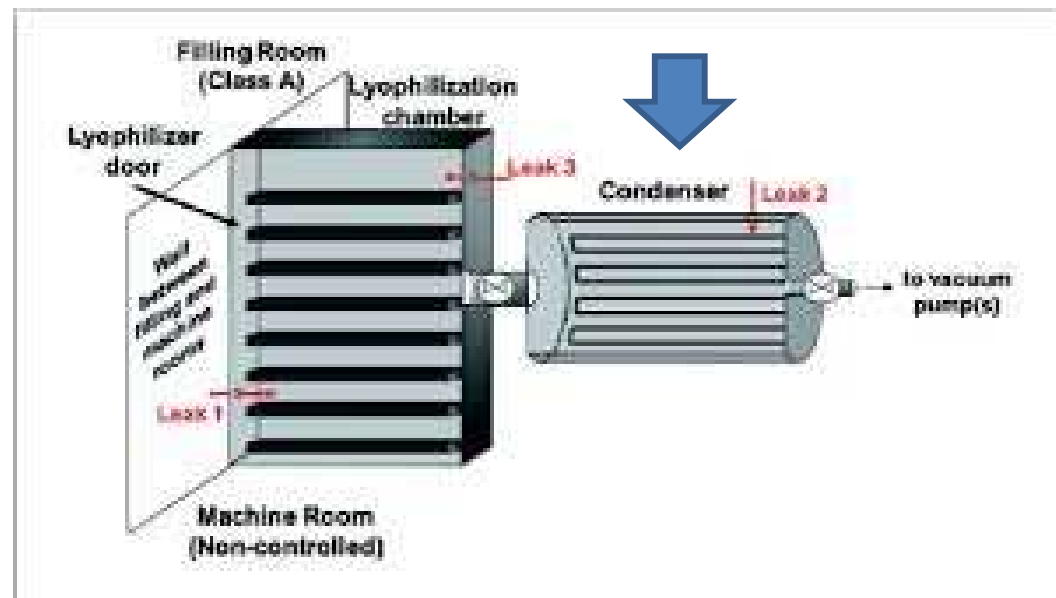
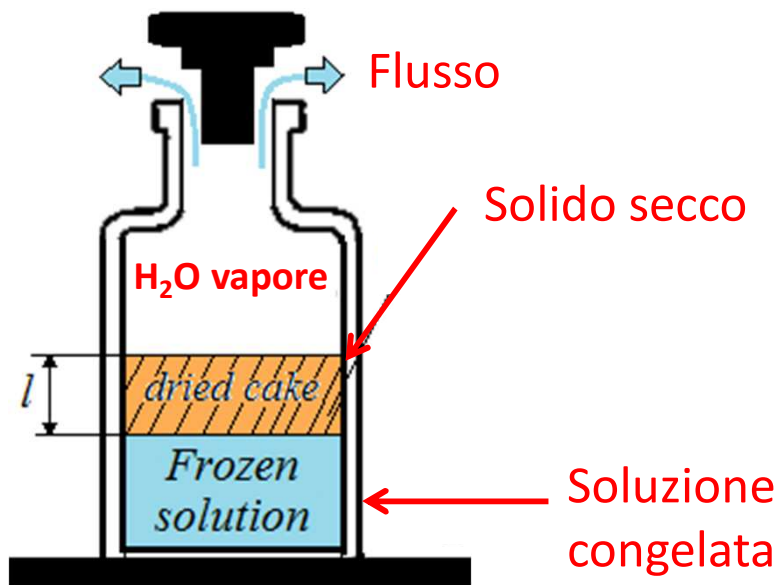


Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento primario

La sublimazione avviene SOLO SE la P parziale del vapore d'acqua a livello della superficie congelata è maggiore o uguale alla P dell'atmosfera sovrastante. Se la massa di vapore generata non viene rimossa, si genera un equilibrio tra le molecole che evaporano e quelle presenti e il processo si arresta. Nella pratica industriale si **rimuove il vapore condensandolo** a basse temperature mediante **condensatori** posti tra la camera di liofilizzazione e la pompa a vuoto.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

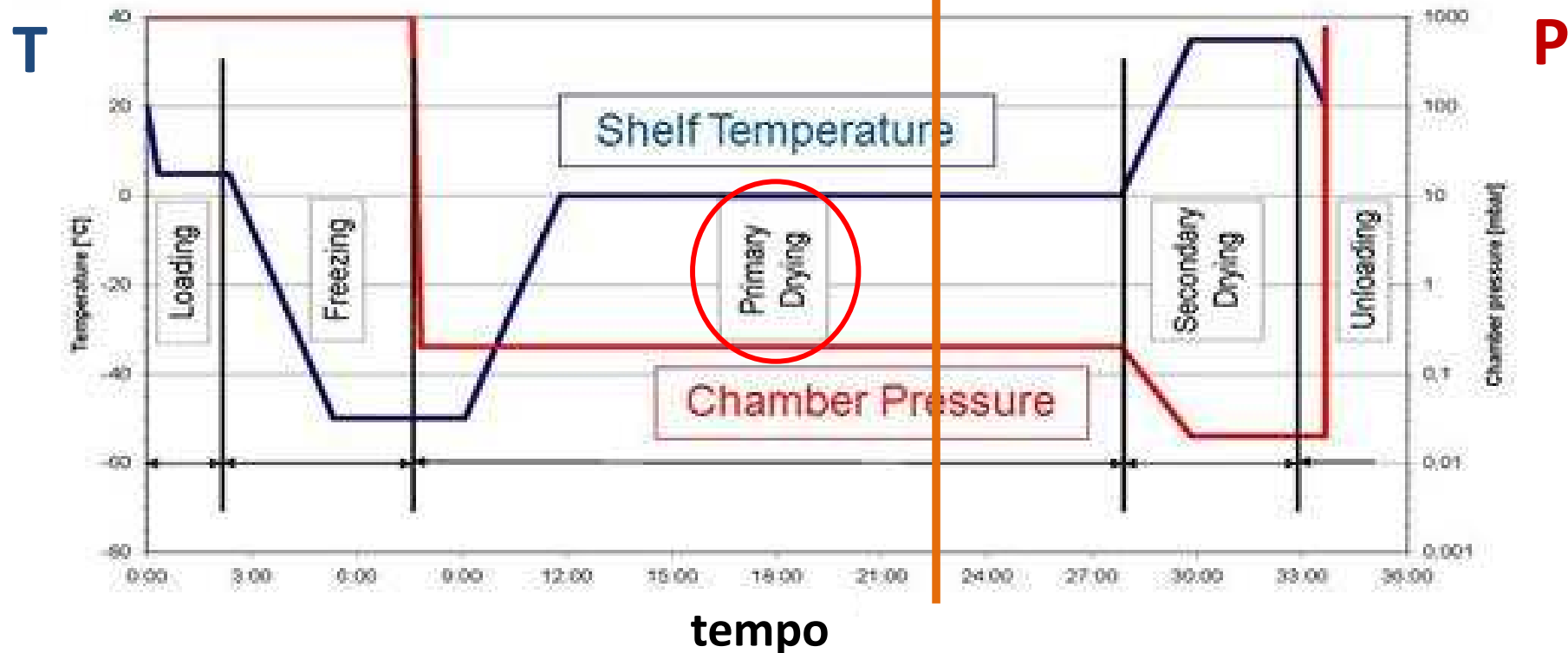
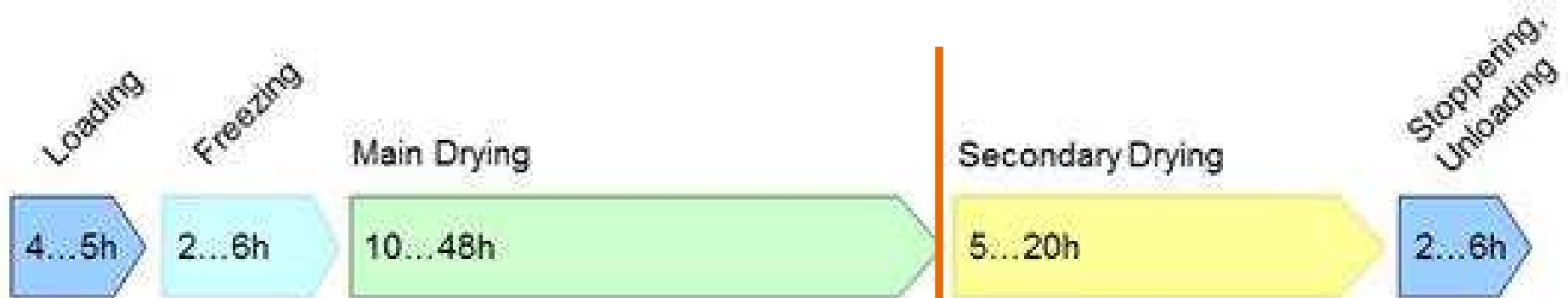
➤ **Essiccamento primario**

Contributo importante all'eliminazione del vapore dai contenitori per la liofilizzazione è data dalla contrazione di volume che avviene in fase di condensazione (**vapore che ricondensa a ghiaccio**), considerando che le due camere (liofilizzazione e condensazione) sono tenute allo stesso valore di depressione. Le temperature operative vanno dai -50°C ai -70°C ovvero temperature di circa 20 gradi inferiori a quelle della massa in corso di liofilizzazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Essiccamento primario

Typical Freeze Drying Cycle



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ **Essiccamento primario**

- Il calore è trasferito dalle piastre della camera di liofilizzazione attraverso i vassoi e la vial al fronte di sublimazione del prodotto.
- Il ghiaccio sublima ed il vapore formato passa attraverso la porzione secca del prodotto sino alla superficie.
- Il vapore è trasferito dalla superficie del prodotto attraverso la camera di liofilizzazione al condensatore.
- Il vapore condensa sulla superficie refrigerata del condensatore.

Il trasferimento di calore avviene per conduzione attraverso la piastra, i vassoi, la vial, lo spessore di prodotto congelato.

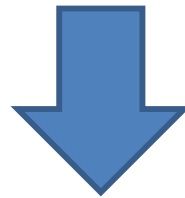
L'essiccamento primario termina quando tutto il ghiaccio è stato rimosso.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento primario

Terminata la fase dove il calore veniva trasformato in energia necessaria per il passaggio di stato solido-gas, il prodotto inizia a scaldarsi e la T aumenta fino quasi a raggiungere la T delle piastre. Opportune sonde per la rivelazione della temperatura del prodotto determinano l' *end point* dell'essiccamento primario e il passaggio alla fase successiva.



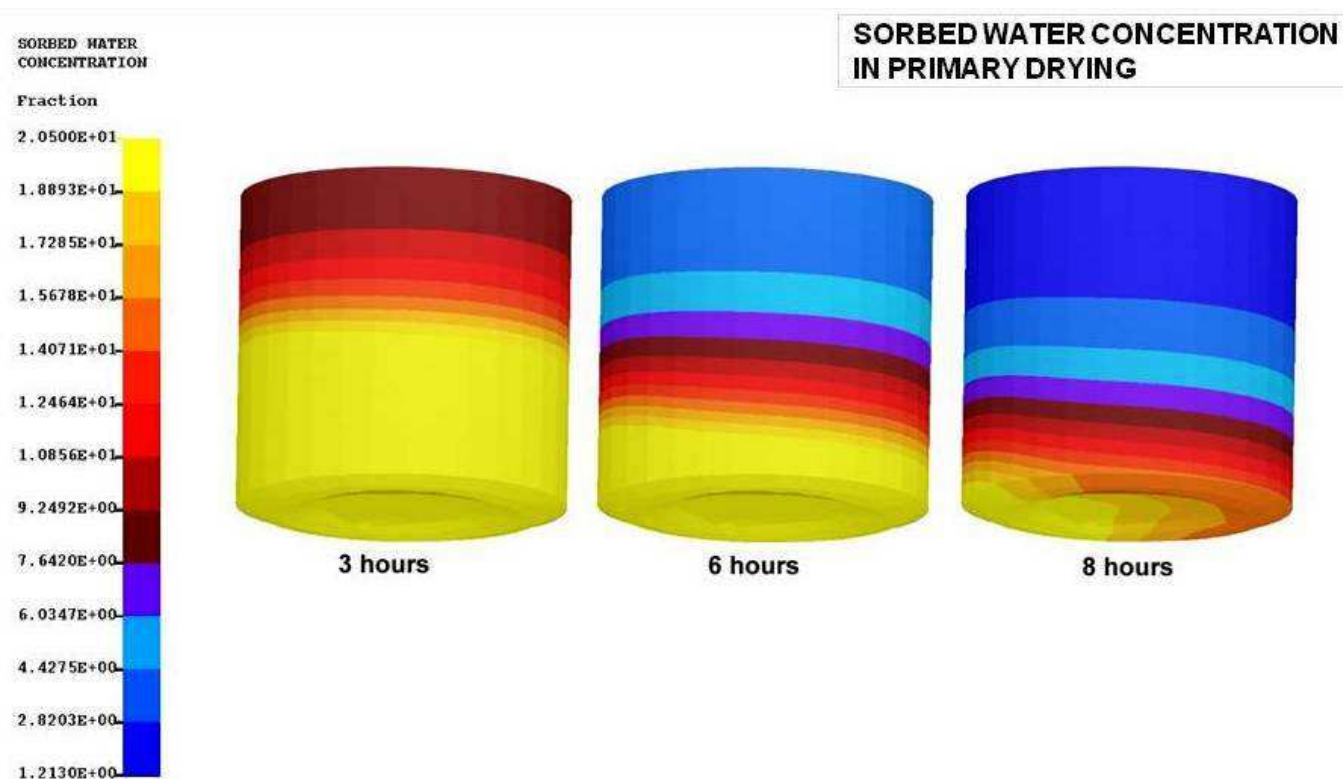
Essiccamento secondario

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento secondario

L'essiccamento primario permette la rimozione della quasi totalità dell'acqua solidificata durante la fase di congelamento, ma rimane una quantità d'acqua legata (o *adsorbita*), pari al 10-20%, che per essere rimossa richiede l'apporto di ulteriore energia.

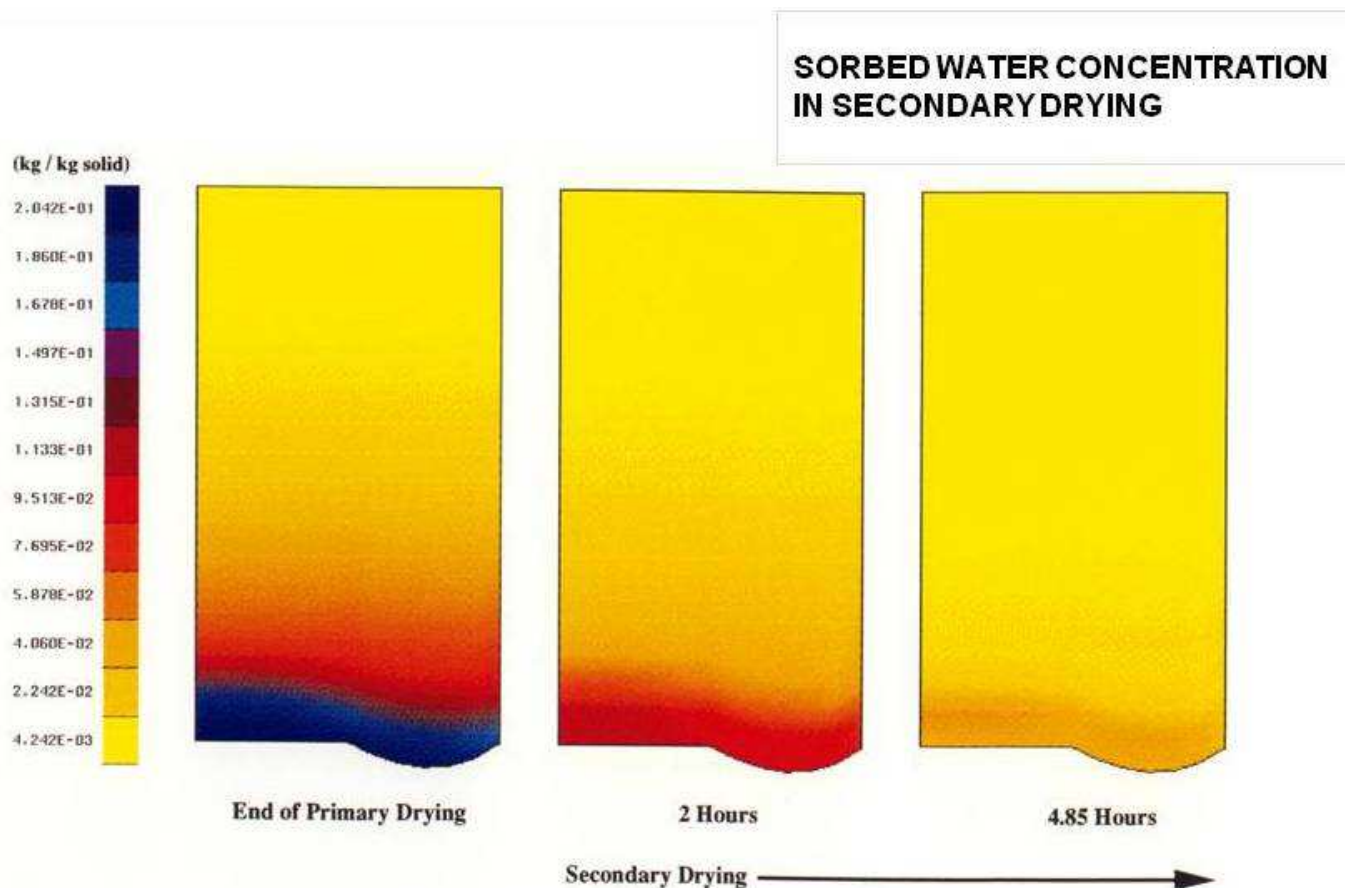


Impianti dell'Industria Farmaceutica

Teoria e fasi della Liofilizzazione

➤ Essiccamento secondario

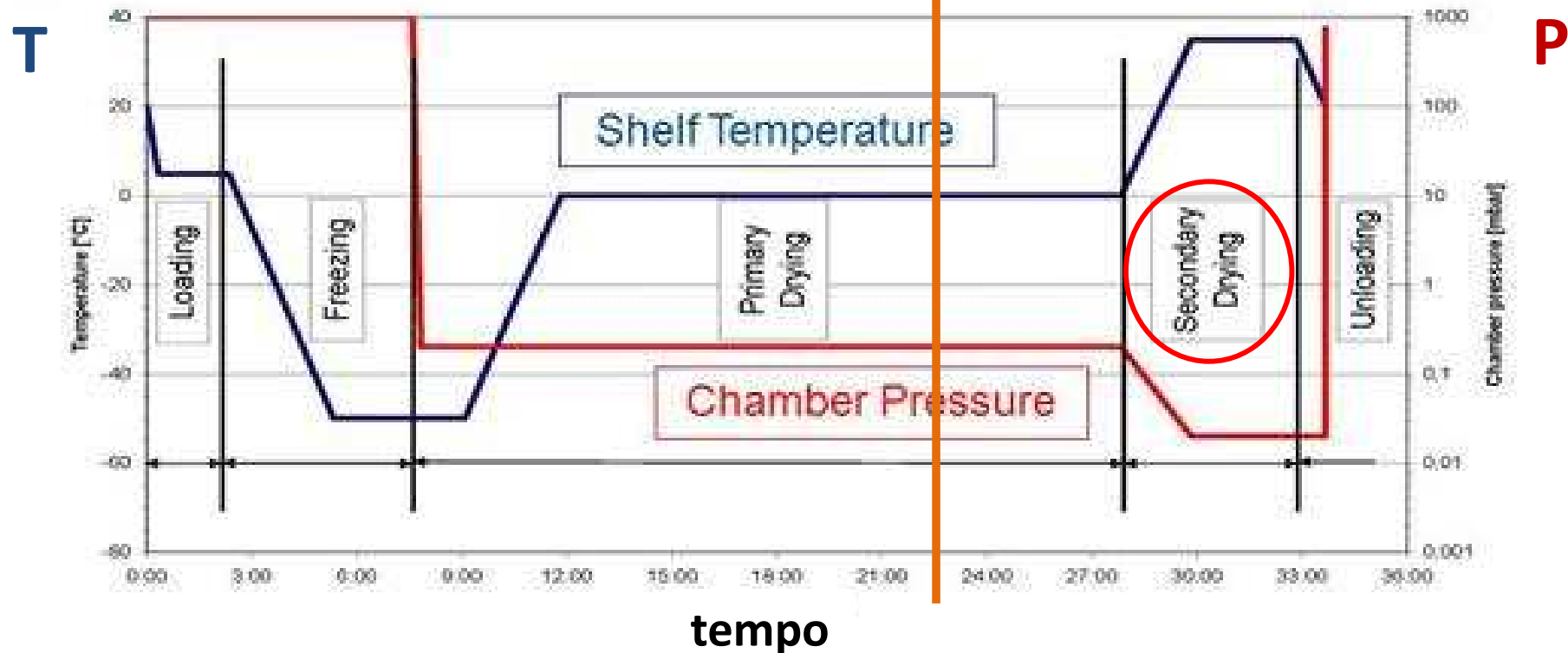
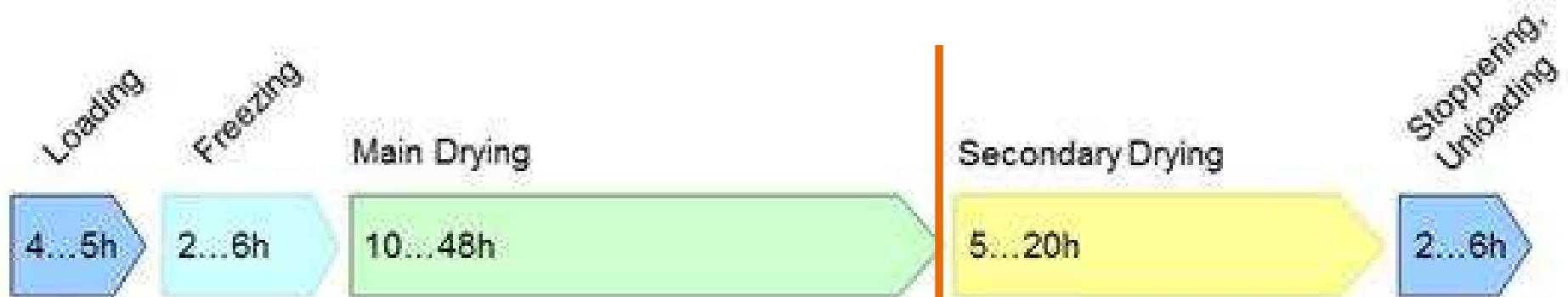
L'essiccamento secondario ha lo scopo di **rimuovere questo contenuto di umidità residua per aumentare la stabilità del prodotto nel tempo**. In genere, dopo l'essiccamento secondario, il valore finale di contenuto d'acqua è del 0.5-2%.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Essiccamento secondario

Typical Freeze Drying Cycle



Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Essiccamento secondario

La durata dell'essiccamento secondario è dell'ordine di 0.3-0.5 volte di quello primario. Tale durata sarà tanto inferiore quanto maggiore sarà la temperatura applicata (riduzione dei costi).

ATTENZIONE però che questa temperatura non sia in grado di indurre decomposizione o degradazione del prodotto.

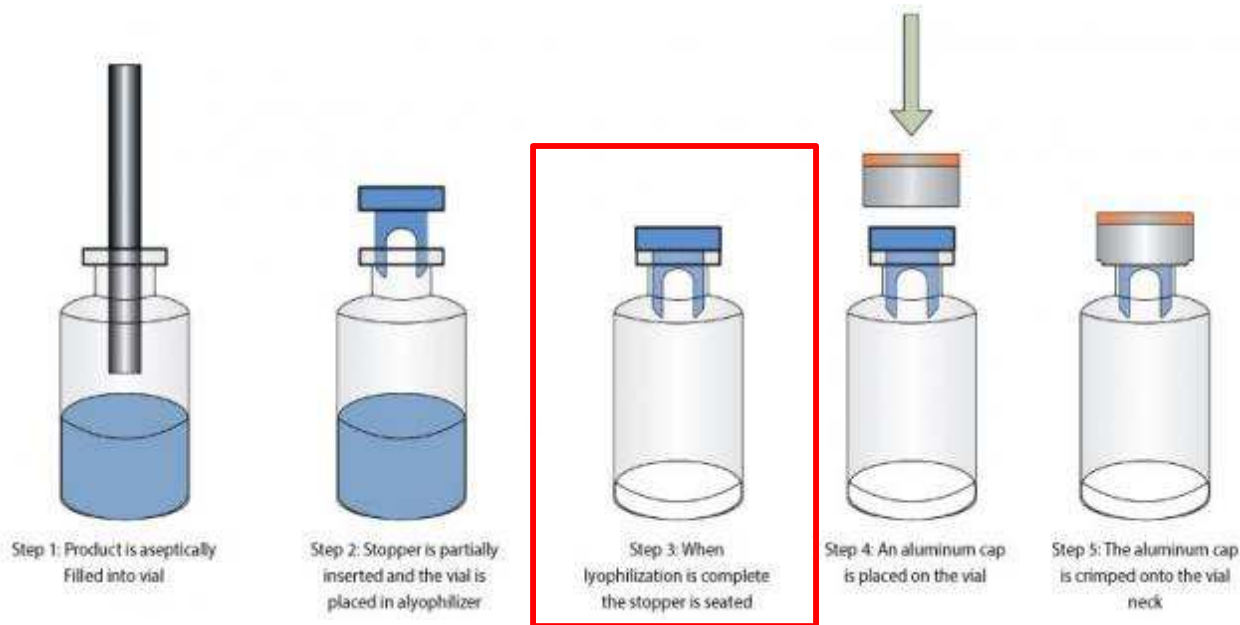
Per stabilire il **termine dell'essiccamento**:

- Metodo empirico (o indiretto): quando il prodotto raggiunge la T delle piastre lo si mantiene a tale temperatura per un periodo predeterminato (in genere 3-4 h)
- Misura umidità residua: tramite un particolare dispositivo (*sample thief*) che preleva un campione di prodotto dalla camera di liofilizzazione si effettua la misurazione (vedi diapositive precedenti)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Fine ciclo

Terminato l'essiccamento secondario, i flaconcini vengono chiusi all'interno della camera di liofilizzazione mediante l'operazione di *stoppering*. La camera viene quindi isolata dal condensatore e dalle pompe a vuoto e si procede all'operazione di «rottura del vuoto» che prevede l'immissione di gas inerte in camera (N_2) fino a pressione ambiente. Successivamente avviene l'apertura della porta della camera e lo scarico dei flaconcini.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ **Controllo del processo**

I parametri da tenere sotto controllo durante il processo di liofilizzazione sono: la temperatura delle piastre, la pressione e l'umidità residua. Vediamo nelle fasi del processo:

- **Congelamento**- il congelamento del prodotto avviene a P ambiente, quindi bisogna controllare il grado di solidificazione del prodotto (separazione fra soluto e solvente) e che la mobilità dell'acqua interstiziale sia pressochè nulla.
- **Essicamento primario**- incremento T piastre per ottenere sublimazione ghiaccio deve essere inferiore alla T di *incipiente fusione*. La P deve compensare piccole variazioni di T piastre in camera e viceversa per ottenere il prodotto più omogeneo possibile.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ **Controllo del processo**

Essiccamento secondario- contenuto di umidità è influenzato dalla temperatura della «torta» (cake) essiccata, dalla pressione parziale del vapore all'interfaccia gas-solido e dalle interazioni chimiche tra prodotto e acqua. La percentuale di umidità residua può essere diminuita aumentando la T delle piastre mantenendo costante la P in camera o riducendo la pressione parziale del vapore acqueo mantenendo costante la T del prodotto.

➤ **Strumenti di misura**

Termoresistenze (misura della T)- materiali utilizzati a base di elementi quali Platino, Rame, Nichel hanno la proprietà di cambiare la loro resistenza quando sono sottoposti ad un cambiamento di T . Poiché la maggior parte dei prodotti liofilizzati contiene Sali o altre sostanze elettrolitiche che conducono in fase acquosa, le termoresistenze possono essere usate a livello industriale per il controllo della T .

Impianti dell'Industria Farmaceutica

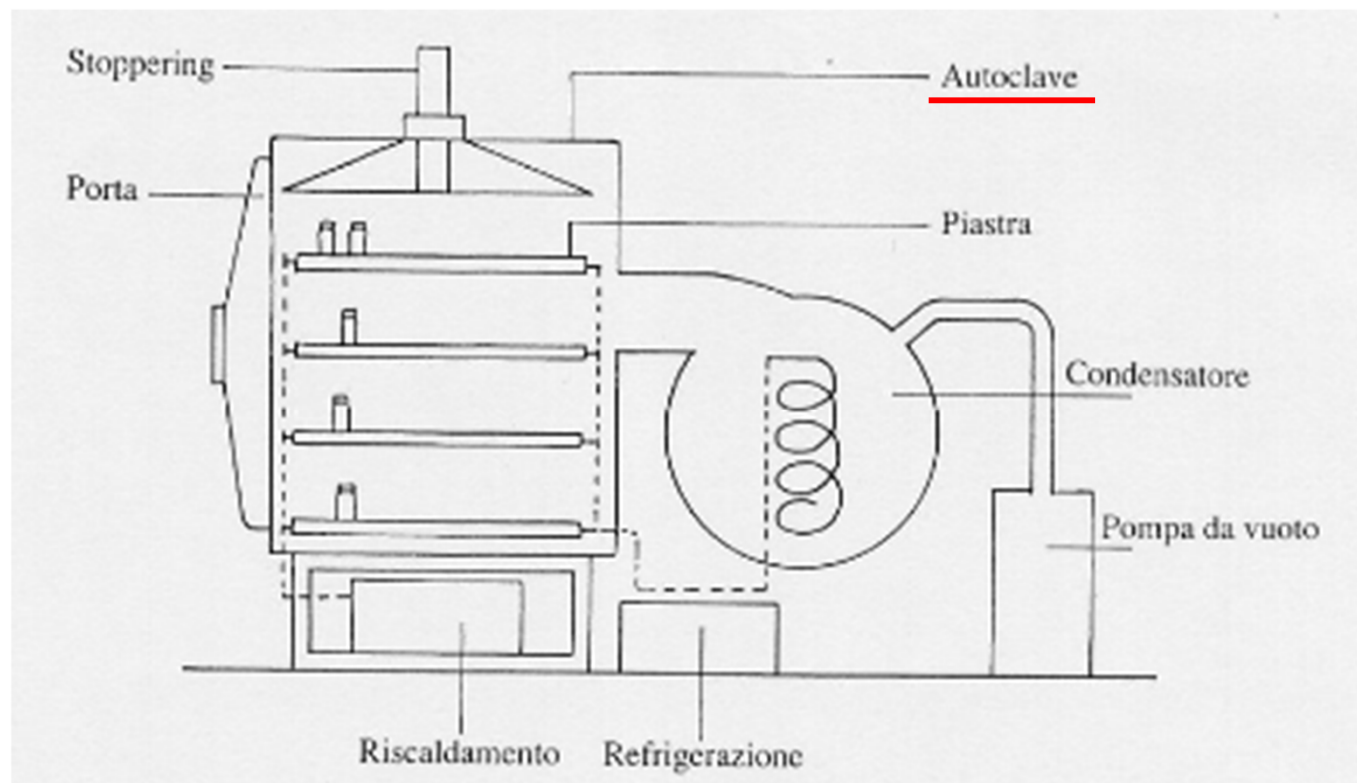
➤ Strumenti di misura

Vacuometro Pirani (misura della P)- misuratore termococonduttivo, ossia che determinano la P in funzione della conducibilità dei gas.

Metodo di Karl-Fisher (misura dell'umidità)- titolazione chimica per risalire alla quantità di acqua contenuta nel campione. Con questa metodica è possibile titolare anche l'acqua di cristallizzazione solo se il composto è solubile nel solvente utilizzato (es. metanolo). In funzione del risultato ottenuto è possibile valutare la stabilità chimico-fisica del prodotto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

- **MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)**
- **Camera di liofilizzazione**
- **Condensatore**
- **Gruppi frigoriferi per il raffreddamento delle superfici condensanti e delle piastre termiche (la produzione del freddo)**
- **Gruppo di riscaldamento delle piastre**
- **Gruppo di vuoto (produzione del vuoto)**

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

La camera di liofilizzazione

E' in pratica un autoclave, progettata per resistere a differenze di pressione di 1 atm dall'esterno verso l'interno.

Parametro importante: il corretto funzionamento delle piastre termiche deve garantire **l'uniformità di temperatura** in ogni punto della camera;

Altra parte importante è il condotto che collega l'autoclave con il condensatore, è possibile bloccare questa comunicazione mediante una valvola che garantisce il facile passaggio dei vapori dalla camera al condensatore senza creare eccessive sovrappressioni nella camera anche in momenti di massima intensità di evaporazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Il condensatore

Il condensatore ha il compito di condensare, su superfici fredde, i vapori provenienti dall'autoclave. **Lavora in depressione.** I condensatori possono essere integrati con la camera di liofilizzazione o esterni ad essa.

Le superfici condensanti sono costituite in genere dalle superfici esterne di tubi che formano serpentine entro cui scorre il *liquido di raffreddamento*.

La capacità di ghiaccio di un condensatore può variare da 4 a 10 L al secondo per centimetro quadro di superficie di contatto delle serpentine. È essenziale che la temperatura media di tali superfici sia inferiore di almeno 10-20°C rispetto a quella della superficie dove il ghiaccio sublima (camera di liofilizzazione). Una simile differenza favorisce il mantenimento nel sistema di una pressione di vapore tale da garantire il trasporto della massa di vapore che si sprigiona dal prodotto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Il condensatore

Le caratteristiche di un efficiente condensatore sono:

- Elementi di collegamento con l'autoclave di ampia sezione
- Raffreddamento delle superfici condensanti superiore a quello dell'autoclave
- Superficie totale di condensazione sufficiente a mantenere lo strato di ghiaccio ad un livello non troppo consistente, in modo da non diminuire la conducibilità e con essa il flusso di vapore
- Efficiente isolamento dall'ambiente esterno

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

La produzione del freddo

I sistemi di refrigerazione sono essenzialmente di 2 tipi:

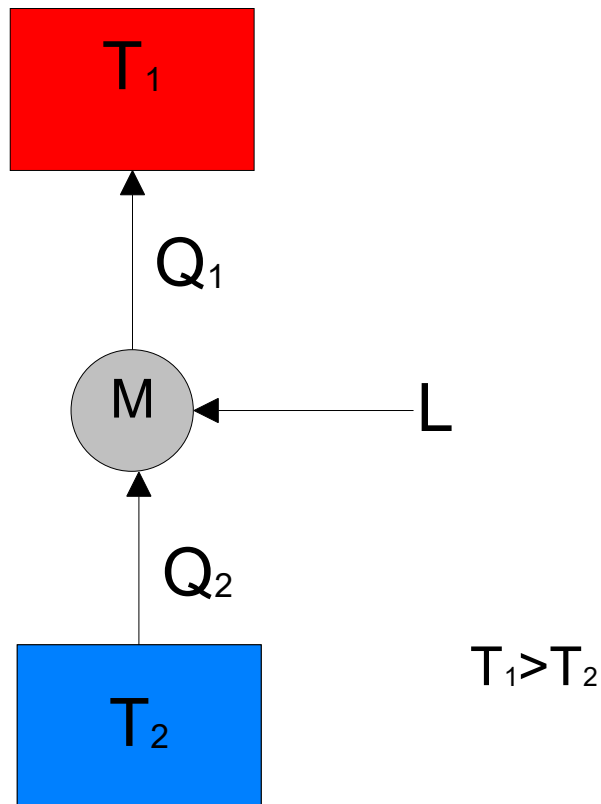
A compressione-(normali gruppi frigoriferi) presenta alcuni inconvenienti quali rumorosità, presenza di organi in movimento e scarso rendimento quando la T da raggiungere è particolarmente bassa. Inoltre le normative riguardanti i gas frigoriferi (come i CFC) rende sempre più difficoltosa l'applicazione di tali macchinari.

Ad azoto liquido- (punto di ebollizione -196°C) è un sistema statico (quindi elimina inconvenienti del primo tipo di sistema) ma necessita di particolari accorgimenti impiantistici che comportano un notevole impatto economico. L'utilizzo di azoto liquido come fluido refrigerante permette comunque un incremento del 30% di efficienza e della capacità di accumulo di ghiaccio nel condensatore.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero



I cicli frigoriferi sono **trasformazioni termodinamiche cicliche** che avvengono in particolari macchine chiamate *macchine inverse*, in quanto in queste macchine il lavoro L viene sfruttato invece di essere prodotto (utilizzo di un motore elettrico).

Una macchina inversa può essere schematizzata come in figura. La macchina **M** mantiene la temperatura T_2 costante assorbendo il calore Q_2 , inoltre cede il calore Q_1 al serbatoio a temperatura T_1 , che di solito è rappresentato dall'ambiente esterno. E' per questo motivo che un normale frigorifero, durante il suo funzionamento, emette calore nell'ambiente attraverso una serpentina che funziona come una vera e propria stufetta, rendendo spesso la cucina la stanza più calda di una casa.

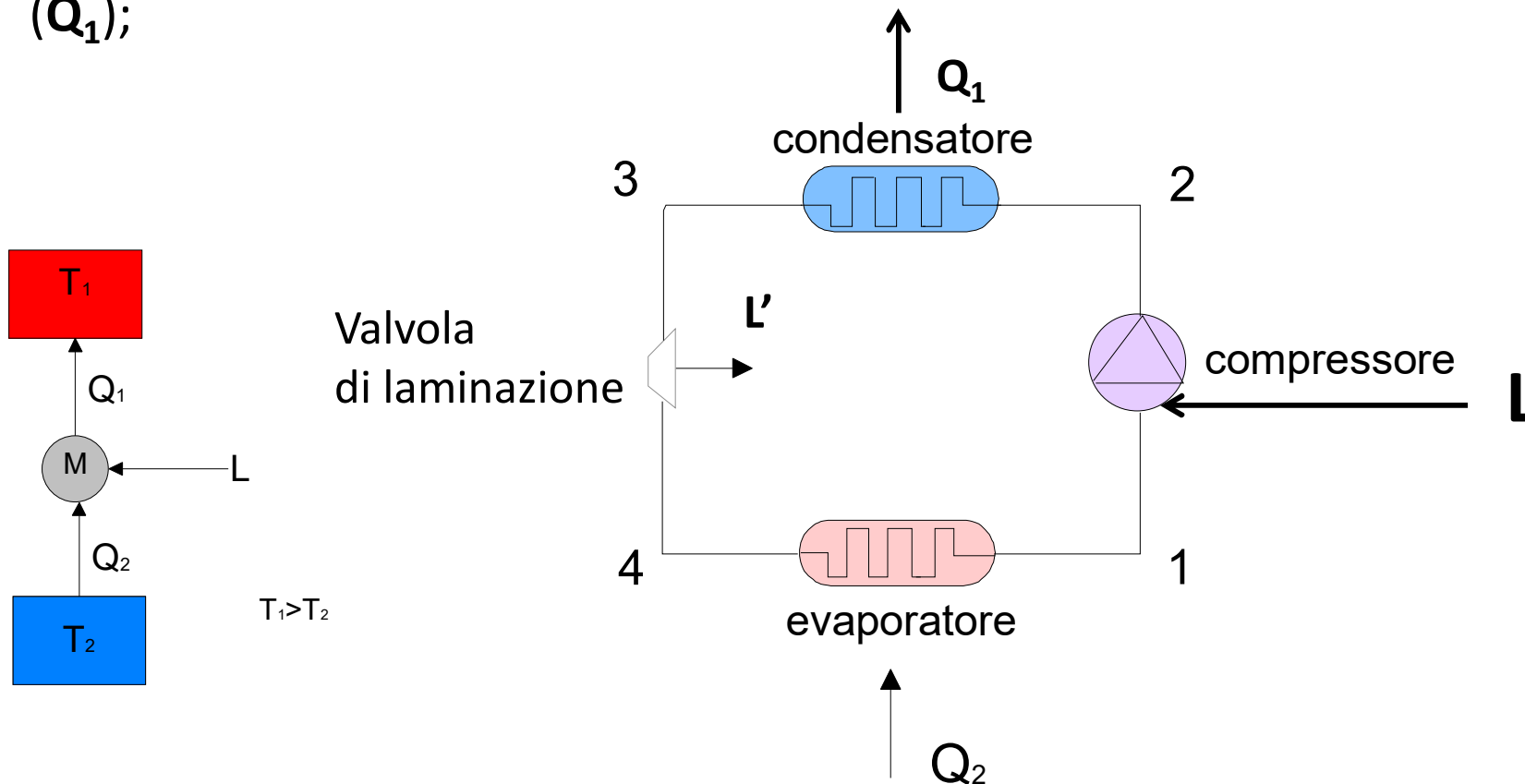
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Parti costituenti l'impianto frigorifero a compressione M:

- *Compressore* –L (motore elettrico) aumenta la pressione del liquido refrigerante (**allo stato gassoso**, trasformazione adiabatica reversibile);
- *Condensatore* -percorrendo la serpentina del condensatore (**da non confondere con il condensatore del liofilizzatore**) il gas inizia a condensare cedendo calore (Q_1);



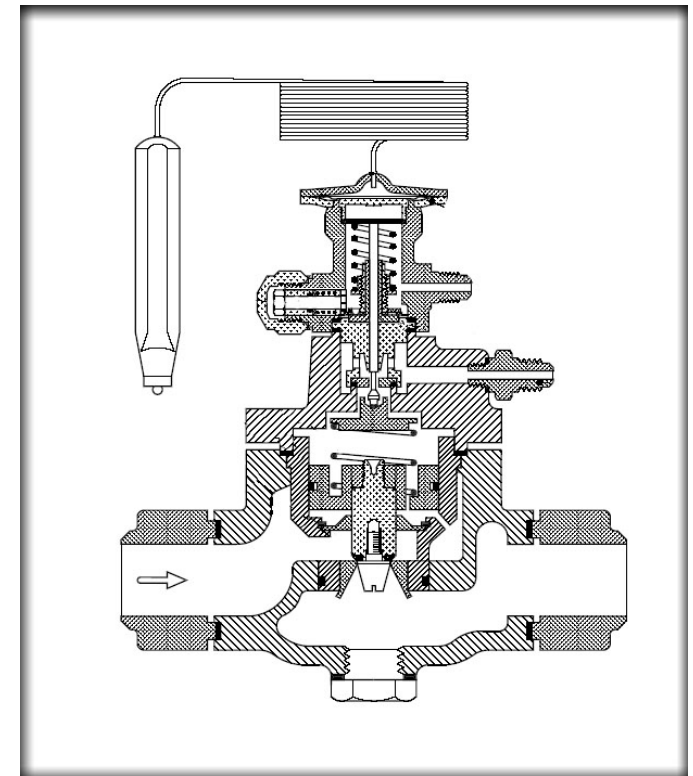
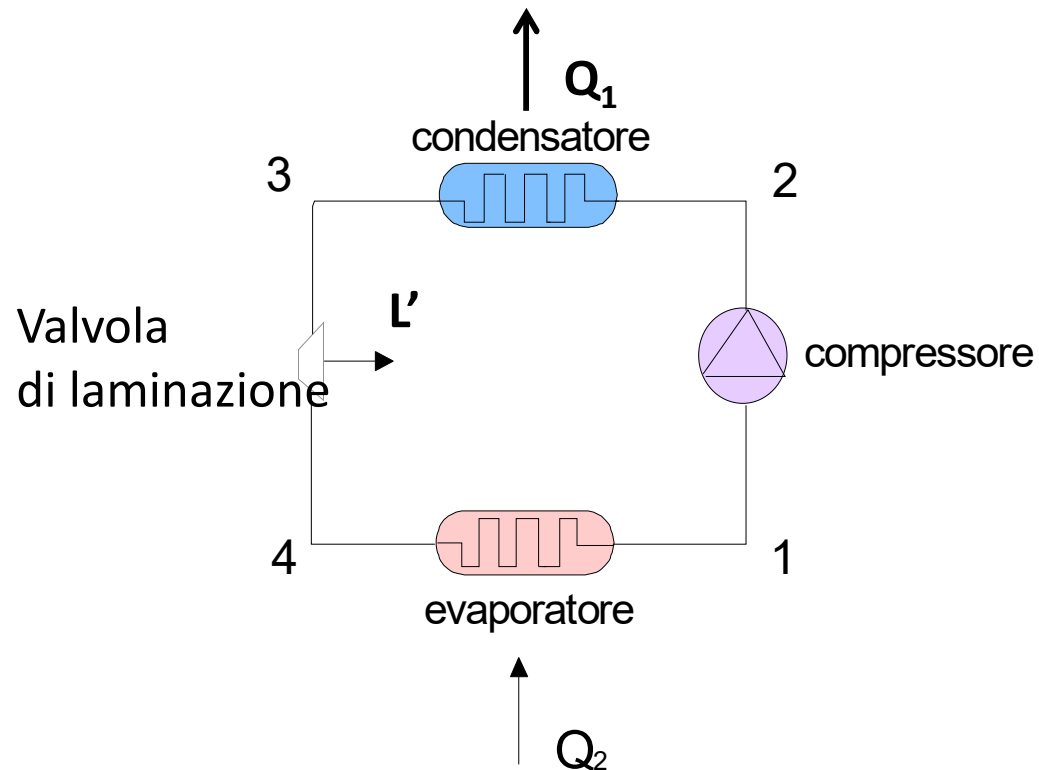
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Parti costituenti l'impianto frigorifero a compressione M:

- *Valvola di laminazione* -La valvola di laminazione è un organo statico che rende possibile l'espansione irreversibile in cui l'entalpia iniziale è uguale a quella finale (**trasformazione isoentalpica dove diminuisce P e T del fluido e ne aumenta il volume**). Si tratta quindi di un organo di strozzamento che degrada l'energia di pressione in attrito L' ;



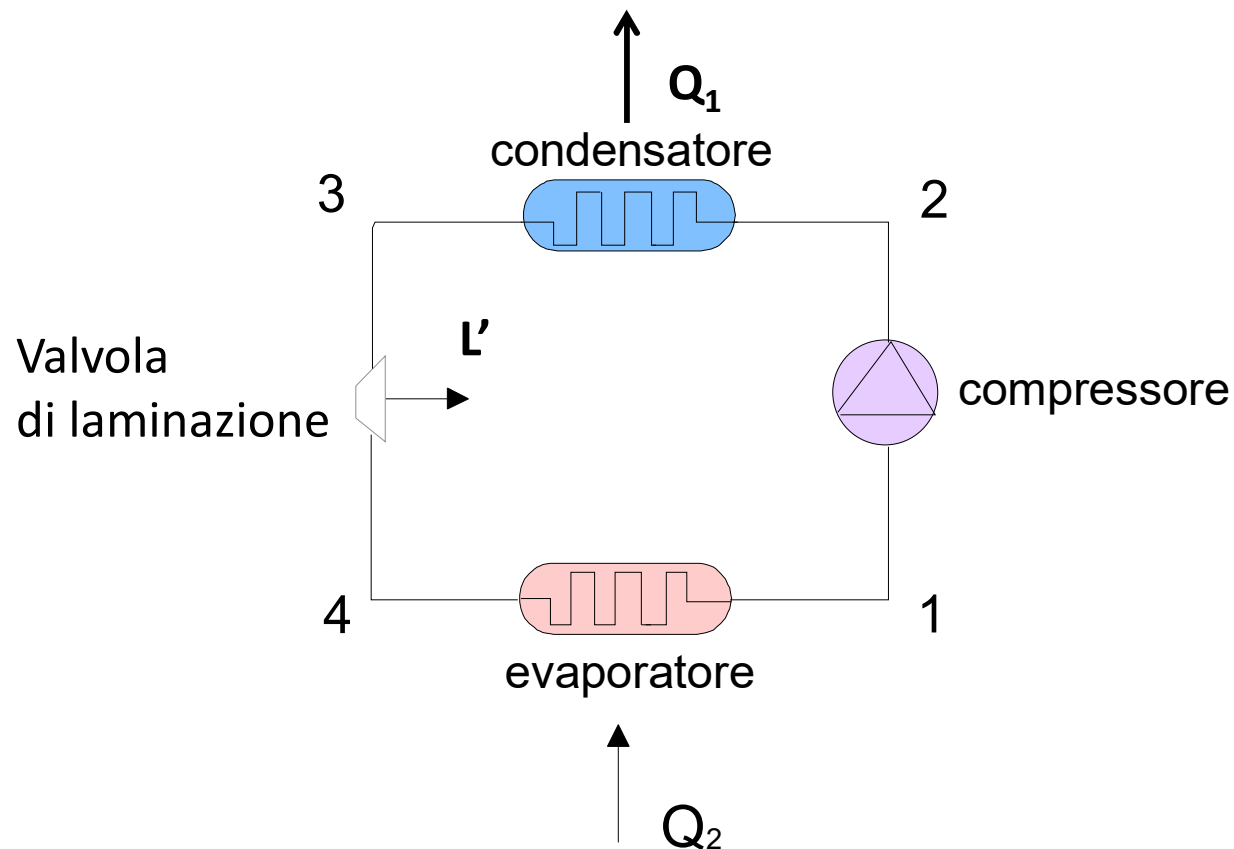
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Parti costituenti l'impianto frigorifero a compressione M:

- *Evaporatore* – liquido entra nell'evaporatore dove assorbe calore (Q_2) a pressione costante per riiniziare il ciclo frigorifero come vapore dal punto 1 di partenza;



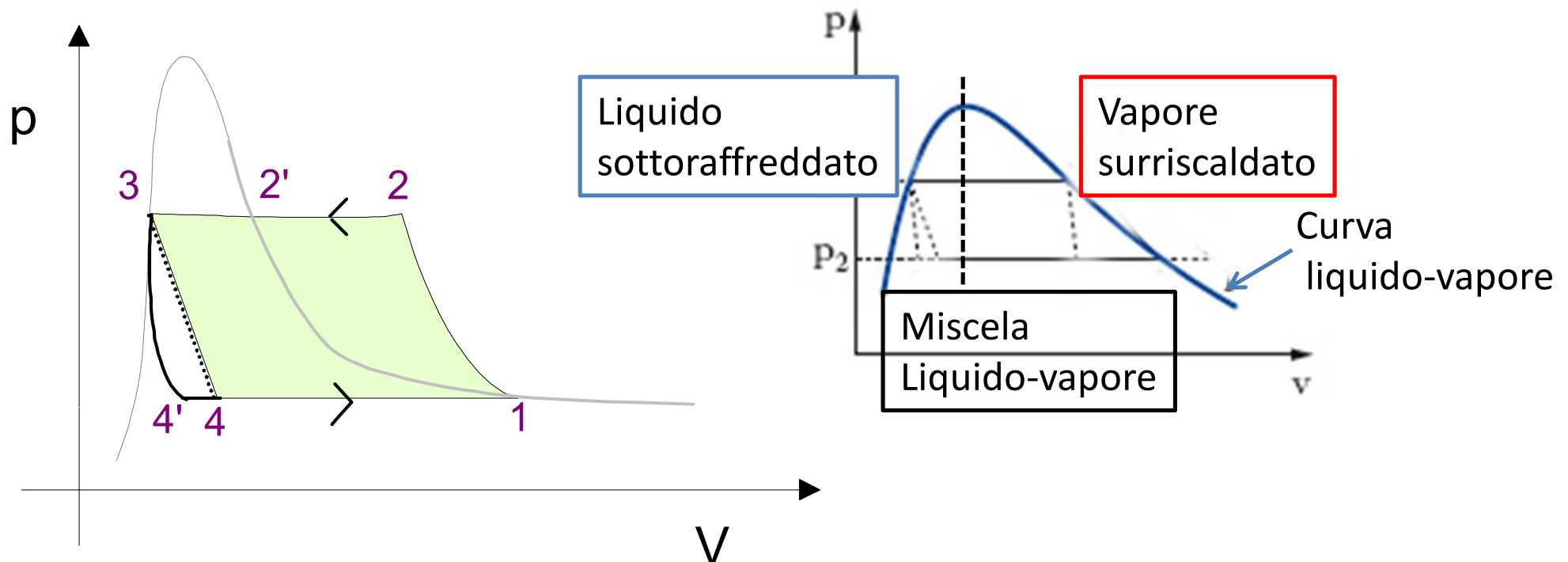
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Fasi ciclo frigorifero (diagramma P-V):

- **1->2** Il fluido, che in **1** si trova allo stato di vapore saturo secco, passa attraverso un compressore che ne **aumenta la pressione** per mezzo di una trasformazione adiabatica reversibile. Durante questo passaggio si verifica un aumento significativo della temperatura del fluido, che in **2** si trova nel campo del vapore surriscaldato.



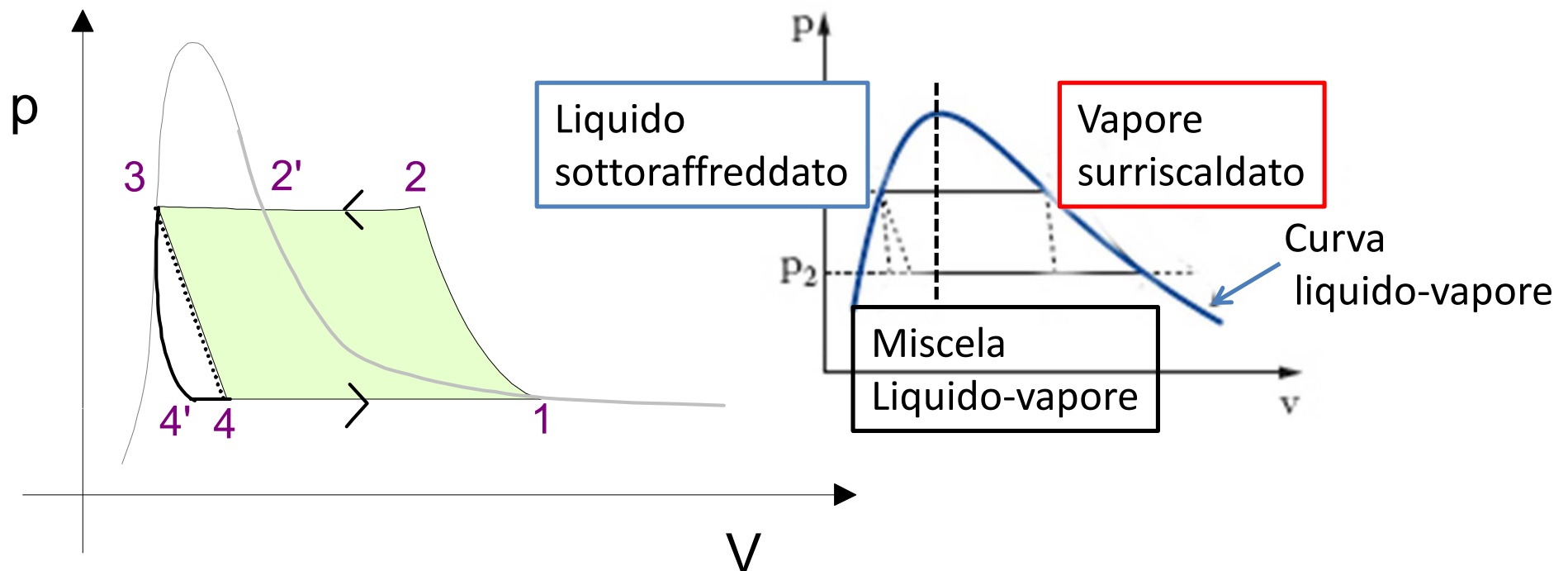
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Fasi ciclo frigorifero (diagramma P-V):

- **2->2', 2'->3** Il fluido percorre la serpentina del condensatore e cedendo calore **Q1** comincia a raffreddarsi (2->2') a pressione costante, fino a raggiungere in **2'** lo stato di vapore saturo secco; a questo punto, sempre a pressione costante, il vapore comincia a condensare (2'->3) e a temperatura costante giunge in **3**, che si trova sulla curva limite inferiore.



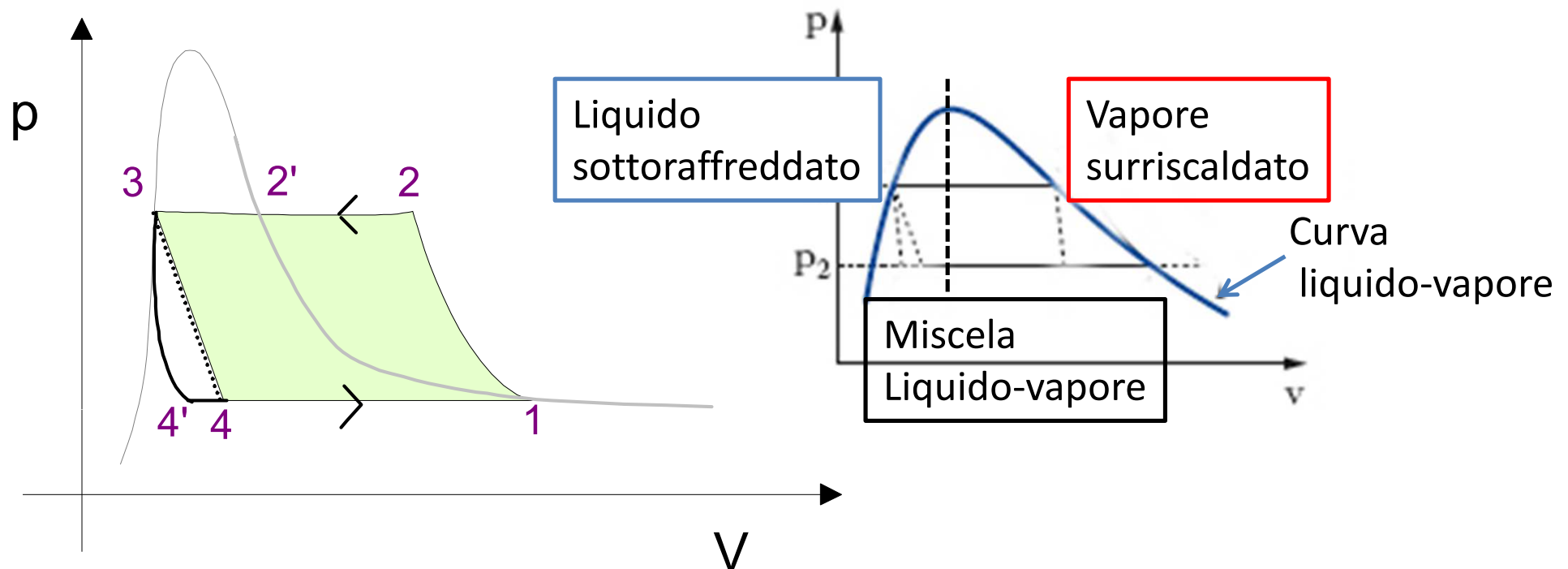
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Fasi ciclo frigorifero (diagramma P-V):

- **3-→4** Il fluido entra nella valvola di laminazione e subisce una trasformazione isoentalpica ($h_3 = h_4$) che ne **diminuisce la pressione e la temperatura e ne aumenta il volume**. L'uso della valvola fa sì che questo processo sia fortemente irreversibile e da ciò deriva l'impossibilità di tracciare un percorso definito da **3** a **4**.



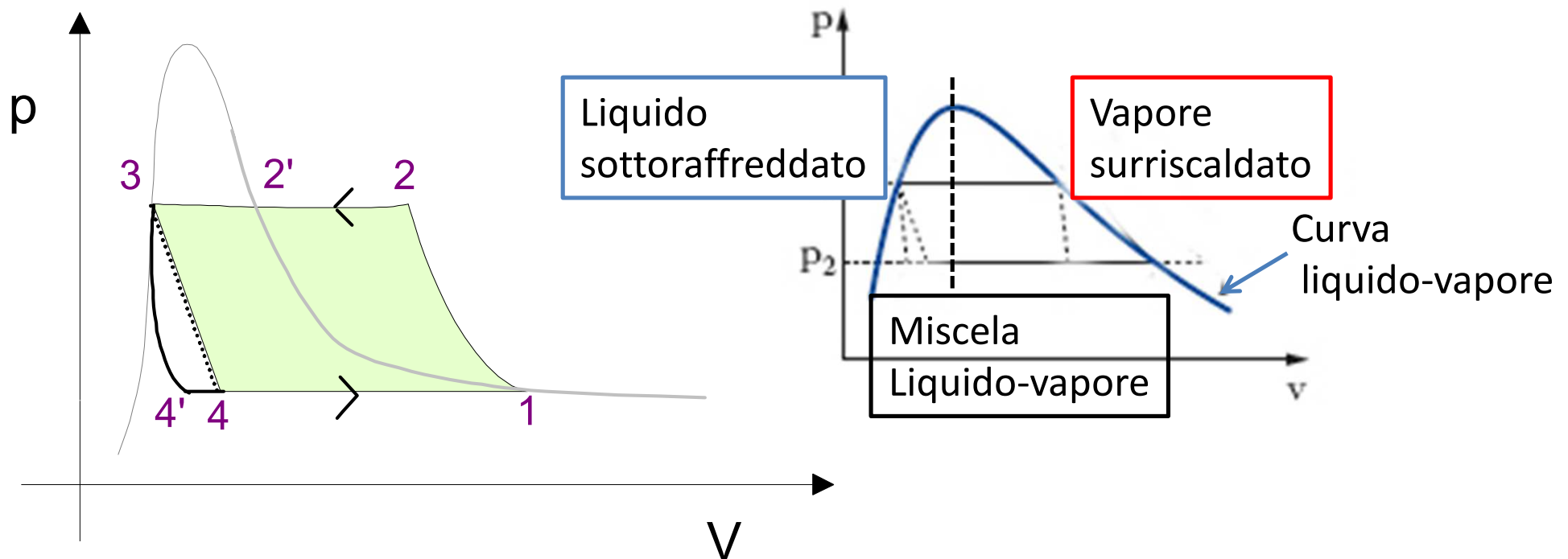
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Ciclo frigorifero

Fasi ciclo frigorifero (diagramma P-V):

4→1 Il fluido, che in **4** è quasi completamente liquido, entra nell'evaporatore e a pressione costante comincia la vaporizzazione assorbendo il calore **Q₂** fornito al sistema, fino a raggiungere lo stato iniziale **1** nel quale può ricominciare il ciclo.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Fluidi refrigeranti

La sostanza utilizzata all'interno di una macchina frigorifera viene chiamata *refrigerante*. Uno dei fluidi refrigeranti più utilizzati a livello industriale è il Freon **F12**, che purtroppo ha la caratteristica di appartenere alla categoria dei CloroFluoroCarburi (CFC), che danneggiano lo strato di ozono che protegge la Terra dalle radiazioni ultraviolette emesse dal Sole. Per questo motivo sono state emanate alcune leggi che vietano l'uso del Freon e che obbligano a sostituire tale fluido nelle macchine vecchie che necessitano di riparazioni.

Le caratteristiche di un refrigerante sono:

- Non infiammabilità
- Non tossicità
- Pressioni di funzionamento non inferiori a quella atmosferica (per evitare ingresso di aria in caso di guasto) ma non eccessivamente elevate per ridurre l'ingombro e i costi dei macchinari
- Ridotto volume specifico allo stato di vapore
- Ridotta temperatura di condensazione
- Buona miscibilità con olii lubrificanti
- Assenza di effetti corrosivi sui metalli

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Fluidi refrigeranti

Le caratteristiche di un refrigerante sono:

- Facilità di individuazione perdite
- Basso costo
- Facile reperibilità

La ricerca di nuovi fluidi refrigeranti che siano il giusto compromesso fra **impatto ambientale, costi di produzione/gestione e riprogettazione degli impianti**, ha portato all'utilizzo di miscele *azeotropiche* e *non azeotropiche*.

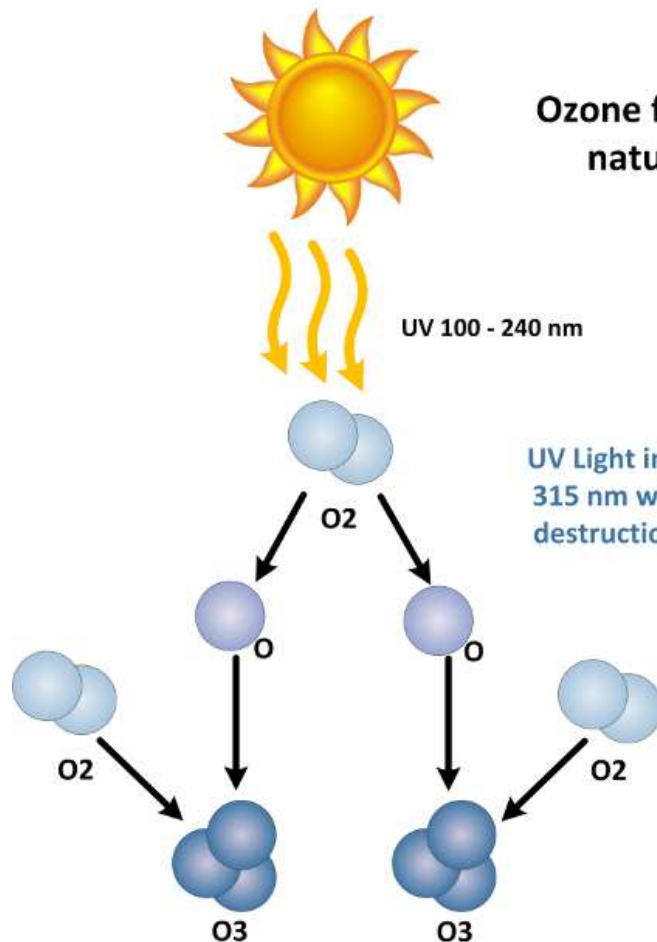
Tra questi:

- HFC 134a- (Freon R134a) è un refrigerante puro, con basso impatto ambientale.
- HFC 407C- miscela azeotropica, utilizzato perché l'impianto refrigerante non necessita di costi e cambiamenti rilevanti per funzionare con il nuovo gas.
- HFC 410A- miscela azeotropica, ottimo sostituto dei vecchi liquidi refrigeranti con maggiore resa frigorifera (anche il 50% rispetto ai vecchi fluidi), basso impatto ambientale ma necessita una riconversione dell'impianto.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Fluidi refrigeranti



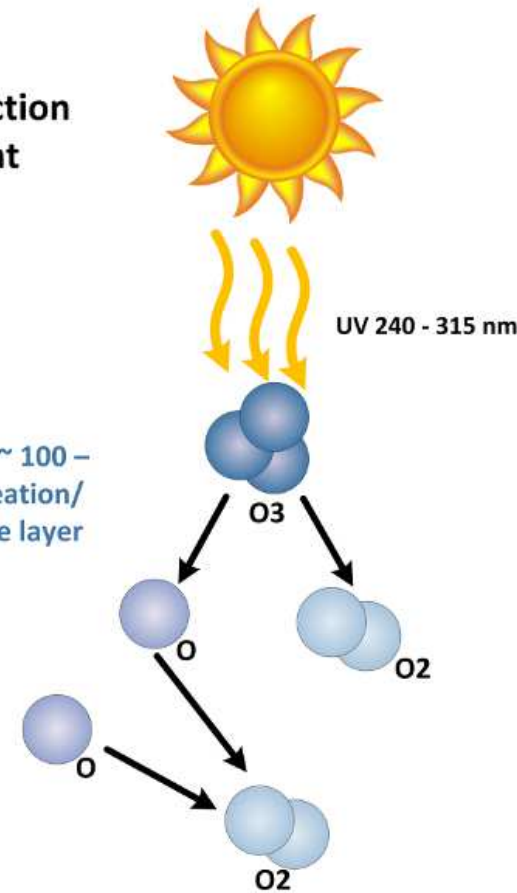
Ozone formation/destruction
naturally from UV Light

UV 100 - 240 nm

UV Light in the wavelength from ~ 100 – 315 nm will be filtered by the creation/destruction of ozone in the ozone layer

UV Light below 240 nm will disrupt the bond of the oxygen molecule and form two oxygen atoms. These oxygen atoms will quickly attach to natural oxygen to form Ozone (O₃).

Peak ozone generation occurs at 185 nm wavelength of UV light.



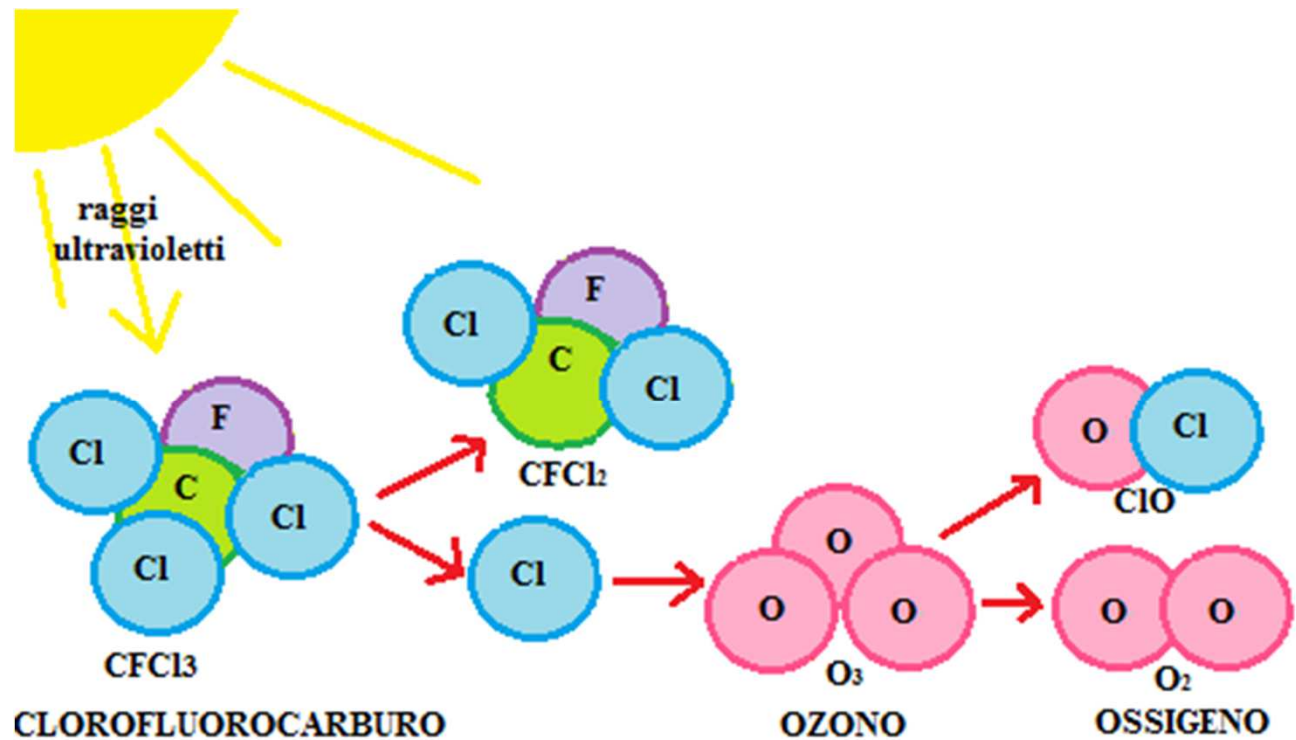
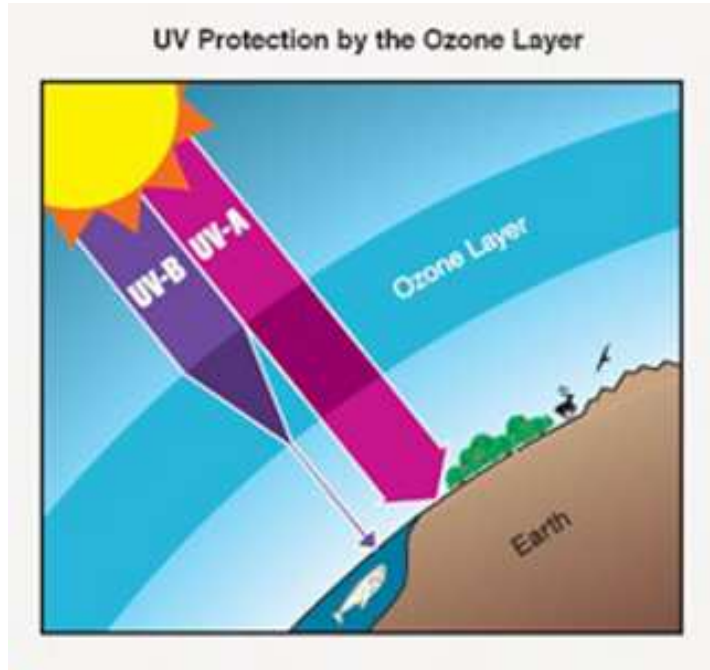
UV Light in the 240-315 nm will disrupt the bond of the ozone molecule and convert this ozone back to oxygen.

Peak ozone destruction occurs at 254 nm wavelength of UV light.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Fluidi refrigeranti



Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

La produzione del vuoto

Per il corretto funzionamento del processo è necessario mantenere un gradiente negativo di pressione tra la camera di liofilizzazione ed il condensatore **in modo da garantire il fluire del gas**. Inoltre la portata delle pompe deve essere tale da evacuare i gas prodotti nella camera di liofilizzazione in un tempo ragionevole (15-20 min).

Se il condensatore non fosse presente e **i vapori non fossero quindi fatti brinare**, lo sforzo operato dalle pompe a vuoto sarebbe molto superiore. **Infatti il condensatore riduce la pressione parziale del vapore, limitando il lavoro delle pompe da vuoto.**

Come pompe da vuoto per uso industriale vi sono:

Le **pompe a velo d'olio a palette**-presenta alcuni inconvenienti quali inquinamento ambientale e potenzialmente possono contaminare il processo di liofilizzazione.

Pompe a secco-basato su rotori non lubrificati:

- Pompe Booster
- Pompe a secco a vite

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

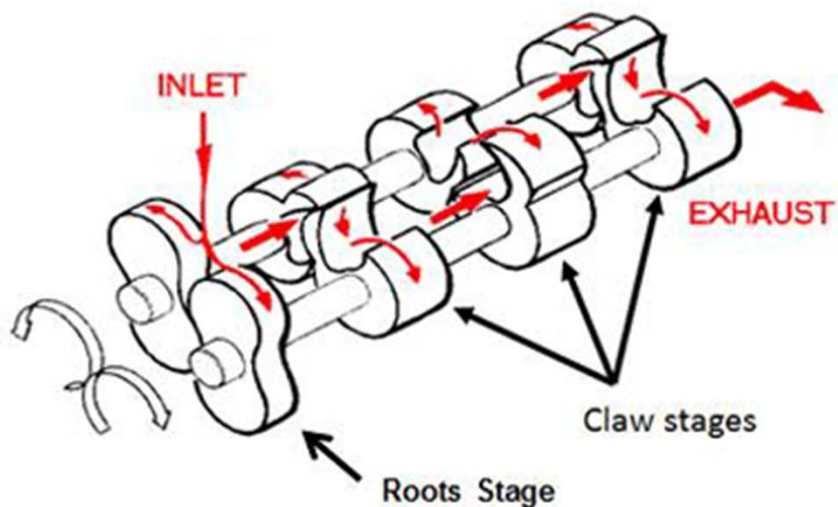
Funzionamento pompa Booster



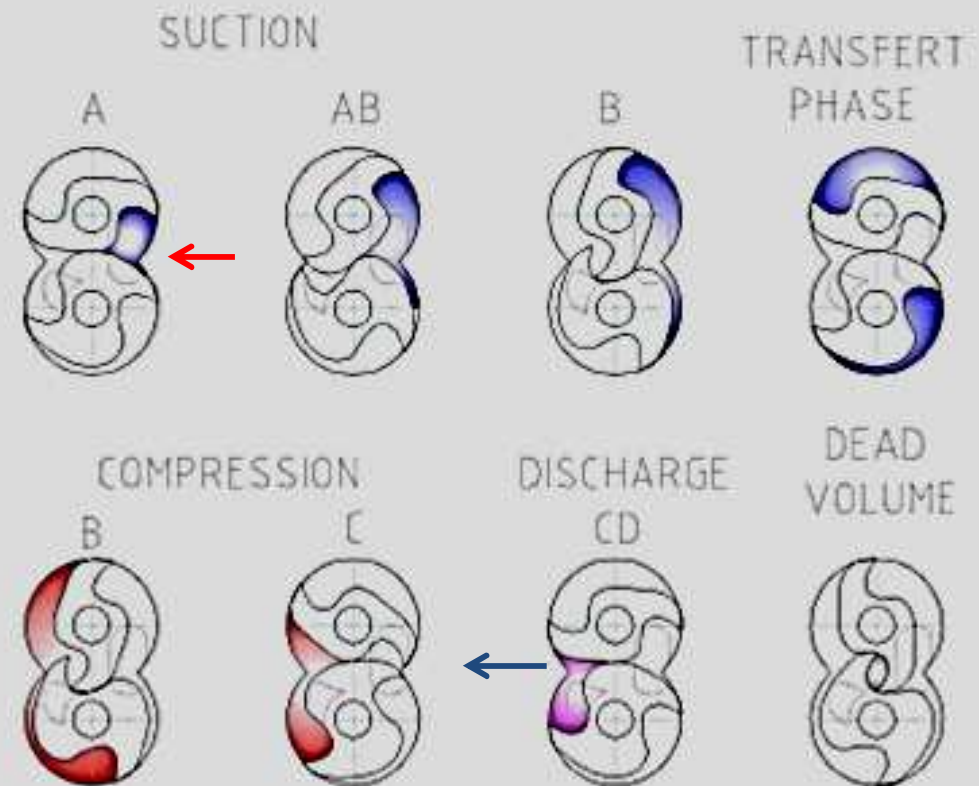
Flusso in entrata



Flusso in uscita



OPERATING PRINCIPLE



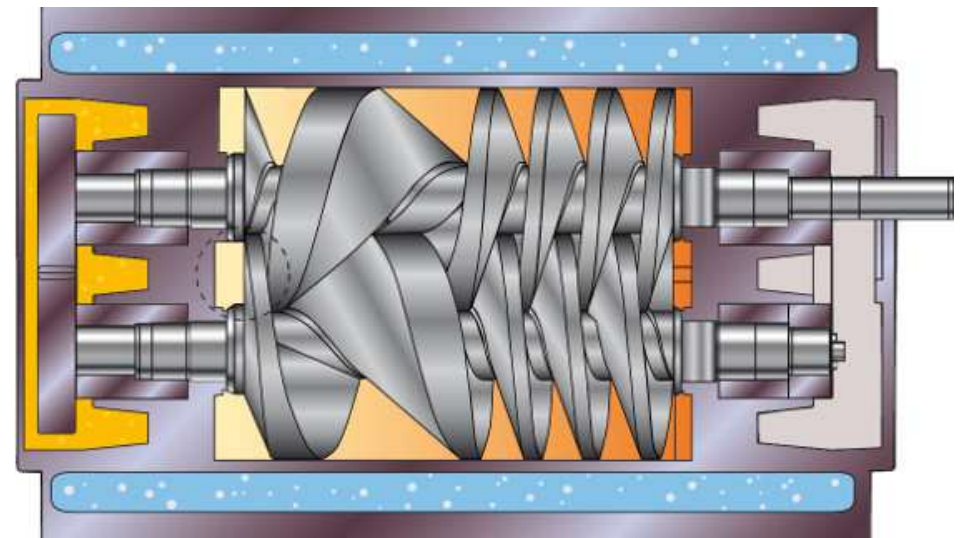
Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ MACCHINARI (Impianto di Liofilizzazione)

Pompa a secco a vite

Sono le pompe ideali per tutte le applicazioni di processo nell'industria, ma insostituibili **nell'industria chimica e chimico-farmaceutica** per l'aspirazione di vapori da processi di essiccamento, distillazione, evaporazione, ecc. L'assoluta mancanza di olio consente di condensare e recuperare i solventi senza alcun inquinamento esterno.

La tecnologia a vite monostadio senza contatto di parti meccaniche rende le pompe silenziose, robuste, estremamente affidabili e con lunga durata senza manutenzione. Tutte le parti interne a contatto con il processo hanno rivestimento anticorrosione in Teflon PFA. Le viti hanno un sistema di raffreddamento interno che consente di poter controllare la temperatura della pompa adattandola alla necessità dei diversi processi.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

- Sviluppi nella pulizia e sterilizzazione dei liofilizzatori industriali

Liofilo sterile

Assicurare la SAL (*Sterility Assurance Level*) ed evitare contaminazioni incrociate (*cross contamination*)

In passato la camera e le piastre di liofilizzazione venivano pulite manualmente (usando disinfettanti o introducendo gas come formaldeide, ossido di etilene) ma:

- Persistenza di residui
- Pericolosità per operatori e ambiente
- Risultati qualitativi non ripetibili
- Difficoltà di validazione
- Necessità di continuo monitoraggio

hanno determinato lo sviluppo di **nuove tecnologie**

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Sviluppi nella pulizia e sterilizzazione dei liofilizzatori industriali

CIP (*Clean In Place*) e SIP (*Steam In Place*)

I processi CIP e SIP vengono monitorati tramite sistemi computerizzati e assicurano un processo riproducibile e sicuro di pulizia e sterilizzazione. La sterilizzazione «in place» mediante vapore a pressione è attualmente il metodo preferito dalle autorità sanitarie/regolatorie.

➤ **CIP**

I moderni liofilizzatori sono equipaggiati con sistemi CIP, normalmente operano **prima** della fase di sterilizzazione. Viene spruzzata **acqua in pressione** in tutte le parti della camera di liofilizzazione e del condensatore mediante ugelli rotanti, cosicchè l'azione dell'acqua (e del getto) possa rimuovere ogni particella solubile e insolubile presente.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Sviluppi nella pulizia e sterilizzazione dei liofilizzatori industriali

CIP (*Clean In Place*) e SIP (*Steam In Place*)

➤ **CIP**

A differenza dell'industria alimentare, dove all'acqua vengono aggiunti detergenti, nel processo farmaceutico si usa solo acqua in quanto i prodotti da liofilizzare presentano generalmente alta solubilità nella medesima. **Il risciacquo finale viene effettuato con acqua WFI.**

Portata del getto: fino a 15-20 litri/minuto e considerando che un ciclo CIP dura in media 20 minuti si arriva a consumare oltre 20 m³ di acqua. Per risparmiare si usa acqua depurata (PW) in una prima fase da 5 minuti, poi un ciclo di risciacquo da 10-15 minuti con acqua PW **ricircolata** ed infine un ciclo da 5 minuti con acqua WFI.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Sviluppi nella pulizia e sterilizzazione dei liofilizzatori industriali

CIP (*Clean In Place*) e SIP (*Steam In Place*)

➤ SIP

Per il ciclo SIP è raccomandato l'utilizzo di vapore saturo ultra puro ottenuto da acqua WFI. **NO vapore di rete.**

Il tempo di esposizione (sterilizzo) viene determinato a priori mediante F_0 ma la pratica industriale considera 2-3 cicli da 15 minuti (tempo minimo di sterilizzazione) con vapore a 121°C sufficienti allo scopo (*overkilling*).

La frequenza dei cicli SIP può dipendere da come il liofilizzatore viene utilizzato (frequenza giornaliera, settimanale, a campagna) tuttavia generalmente lo strumento viene sterilizzato prima di ogni nuovo ciclo di liofilizzazione, dopo la fase di scongelamento del condensatore o fase CIP.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Sviluppi nella pulizia e sterilizzazione dei liofilizzatori industriali

CIP (*Clean In Place*) e SIP (*Steam In Place*)

➤ **SIP**

- Per una corretta sterilizzazione è necessario eliminare la presenza di aria. Si usa la medesima operazione delle autoclavi con cicli vuoto/vapore fino a saturazione.
- Si porta il valore di pressione del vapore in camera al valore desiderato.
- Sterilizzazione vera e propria
- Al termine il vapore viene allontanato tramite opportuna valvole.
- Fase di asciugatura, ottenuta con cicli di vuoto e/o **attivando lievemente le piastre riscaldanti.**

Radiofarmaceutica



Radiofarmaceutica

Elementi di radiochimica

Molecole recanti Radioisotopi

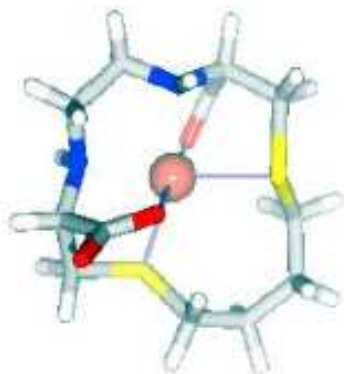
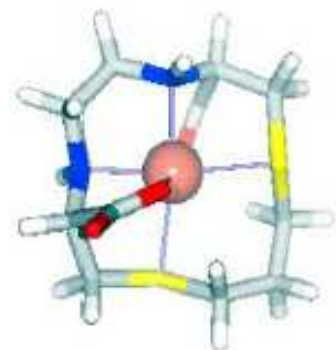
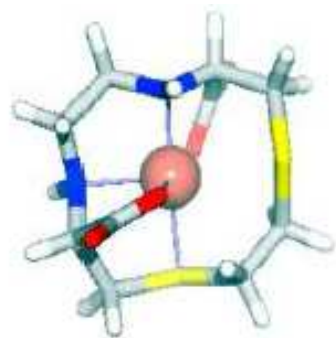


**Differenti proprietà
fisiche**

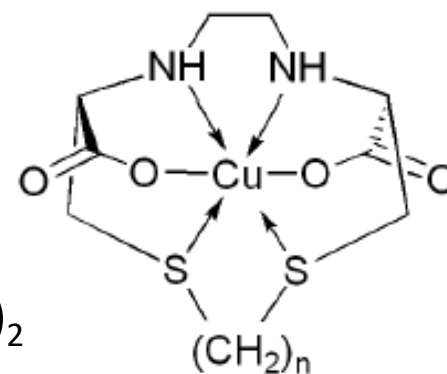
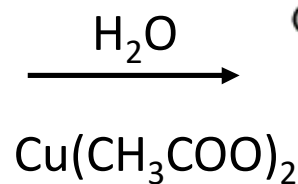
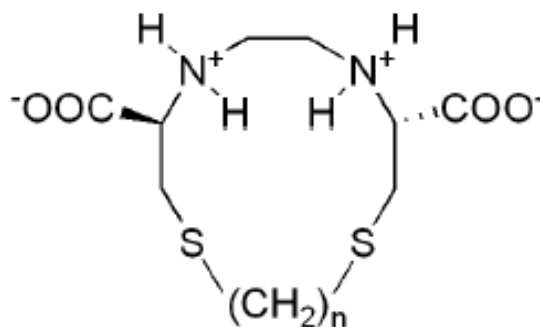


**Medesime proprietà
chimiche**

Radiofarmaceutica

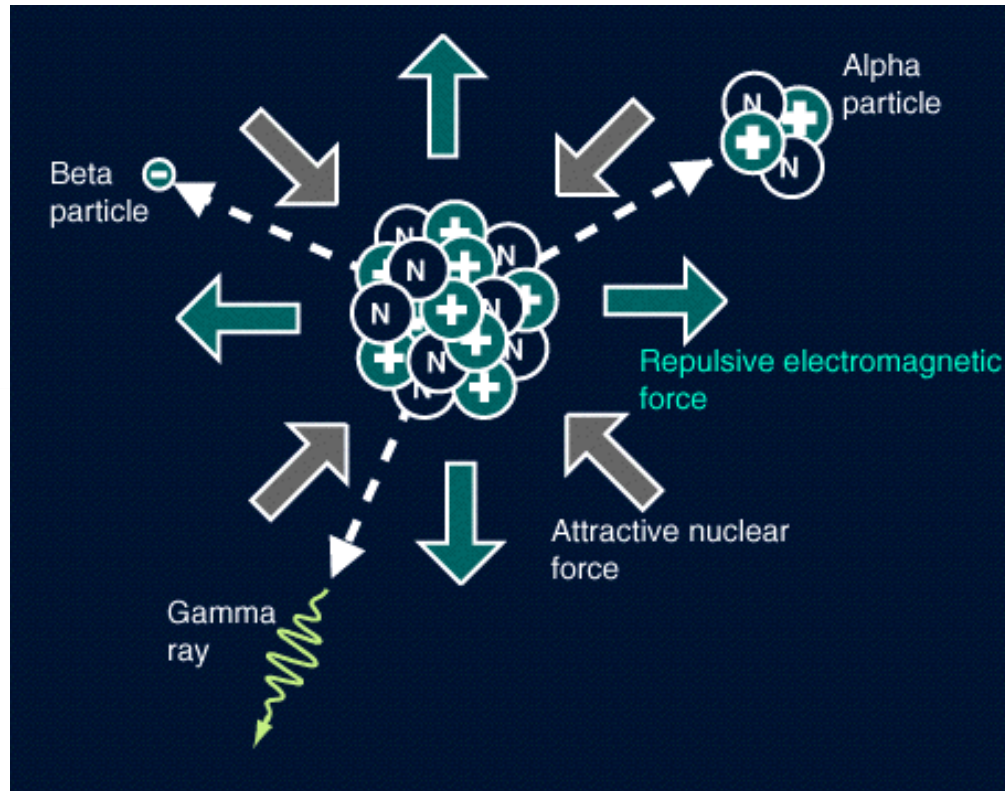


- Sintesi del tracciante (ad es. molecola organica con affinità per un certo recettore), ottimizzazione del processo sintetico “a freddo”
- Complessazione dell’atomo di interesse (in genere un catione di un metallo di transizione)
- Sintesi automatizzata “a caldo”



Radiofarmaceutica

Emissione di particelle



Decadimento radiattivo

- *Decadimento alfa (α)*
- *Decadimento beta negativo (β^-)*
- *Decadimento beta positivo (β^+)*

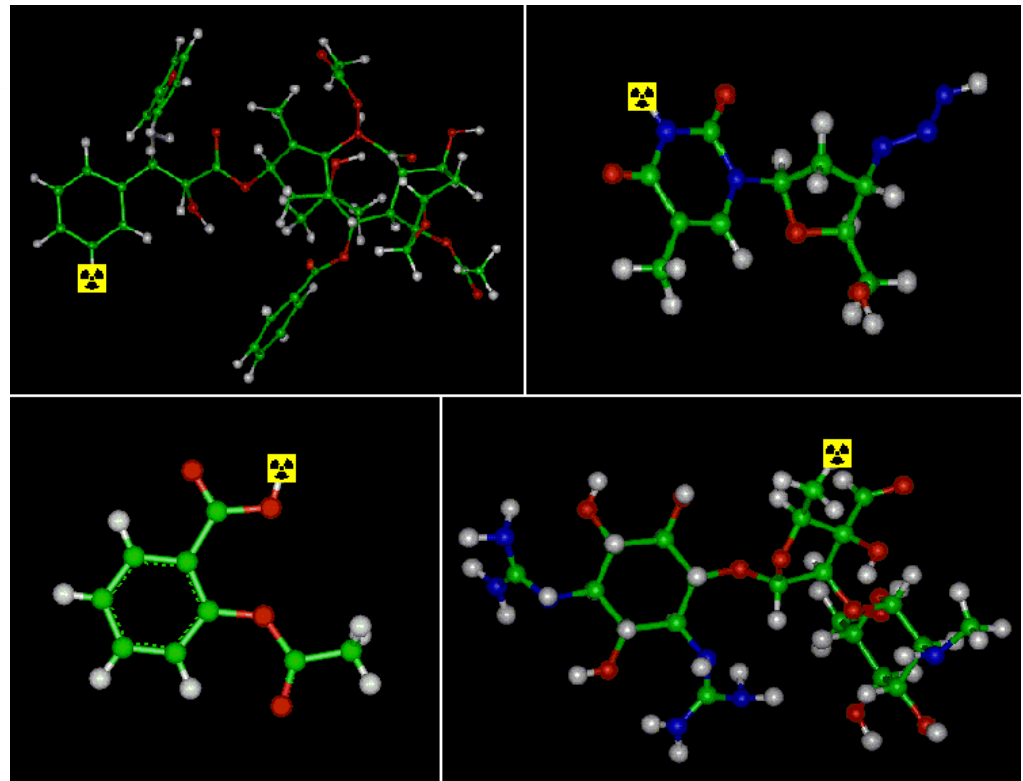
Radiofarmaceutica

Radiofarmaci

➤ Le preparazioni radiofarmaceutiche sono preparazioni contenenti uno o più radionuclidi, utilizzate in medicina come sorgenti di radiazioni per radioterapia o per uso diagnostico.

➤ Controlli di qualità

- Controlli di identificazione
- Controlli fisici
- Controlli chimici
- Controlli radionuclidici
- Controlli radiochimici
- Controlli biologici



Radiofarmaceutica

Radiofarmaci

➤ *Controlli di identificazione*

Sono utilizzati per accertare l'identità del prodotto in esame. L'identificazione dei radionuclidi avviene attraverso l'analisi dello spettro di emissione: il radionuclide viene identificato dal suo **tempo di dimezzamento** o dalla **natura e dall'energia** della o delle radiazioni emesse.

➤ *Controlli chimici*

Sono particolarmente utili per:

- Determinare le quantità di molecola *carrier* al fine di stabilire la concentrazione e l'*attività specifica*
- Valutare la presenza di impurezze chimiche nel preparato
- Determinare il rispetto dei limiti massimi accettabili per alcune sostanze potenzialmente pericolose

Radiofarmaceutica

Radiofarmaci

➤ *Controlli dei radionuclidi*

La **purezza radionuclidica** viene definita come la percentuale di radioattività dovuta a una impurezza radionuclidica rispetto alla radioattività del preparato.

La natura e l'energia delle radiazioni emesse possono essere determinate con diversi procedimenti quali la costruzione di una **curva di attenuazione** (emittitori di elettroni/positroni) e la **spettrometria** (radiazioni gamma).

➤ *Controlli radiochimici*

Hanno lo scopo di determinare la purezza radiochimica di un radiofarmaco, definita come la percentuale di radioattività totale presente sotto la *specific form*.

Tali controlli si basano su due distinte fasi:

- La separazione dei vari componenti
- Rilevamento e calcolo delle quantità di impurezze rilevate

Radiofarmaceutica

Radiofarmaci

➤ *Controlli biologici*

Sono eseguiti per accertare le caratteristiche farmacologiche del radiofarmaco, fra cui la distribuzione in vivo su animali, la sterilità, la pirogenia e tossicità.

➤ **Sterilità** : le preparazioni radiofarmaceutiche per somministrazione parenterale, devono essere preparate in condizioni tali da escludere ogni *contaminazione batterica* e da garantirne la sterilità.

➤ **Pirogenia**: per evitare l'*ipertermia* che potrebbe essere dovuta alla radioattività delle preparazioni, è talvolta necessario attendere che questa sia diminuita fino ad un certo limite (*breve tempo di dimezzamento dei radiofarmaci più utilizzati*).

➤ **Biodistribuzione**: *saggio della biodistribuzione fisiologica*, ovvero la distribuzione della radioattività in determinati organi, tessuti o altri distretti (precedentemente verificata su animali) dell'uomo.

La distribuzione fisiologica è calcolata ed espressa in termini di percentuale della radioattività che si trova in ciascuno degli organi o dei tessuti selezionati.

Radiofarmaceutica

Radiofarmaci

➤ *Utilizzi di radiofarmaci/radioligandi*

A scopo diagnostico

A scopo terapeutico

Ricerca farmaceutica

Radiofarmaceutica

Utilizzo di radiofarmaci a scopo diagnostico/ricerca

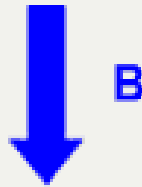
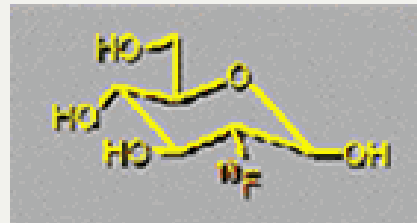
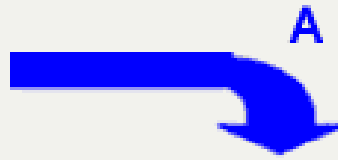
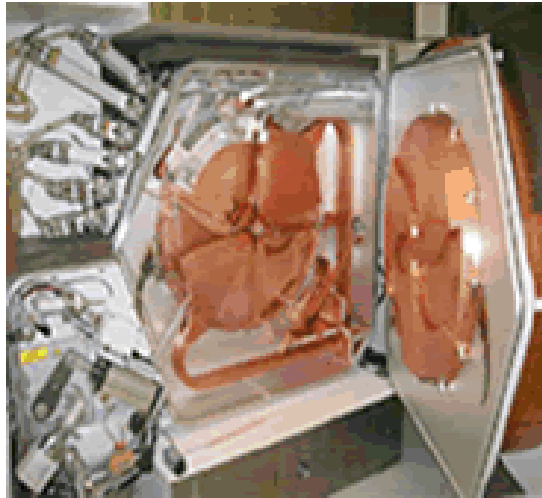
radio

Radioisotopo
Emittente puro
Breve emivita
Legato in modo stabile al
farmaco/ligando

farmaco

Sostanza chimica
Caratteristiche funzionali e metaboliche
simili a una sostanza dell'organismo
(diagnostica)
Studi di Biodistribuzione

Radiofarmaceutica



PET

Positron Emission Tomography

- **A:** Produzione di radioisotopi al Ciclotrone (es. ^{11}C , ^{18}F), sintesi del tracciante
- **B:** iniezione nel soggetto del tracciante, acquisizione tomografica
- **C:** ricostruzione immagine, localizzazione del tracciante

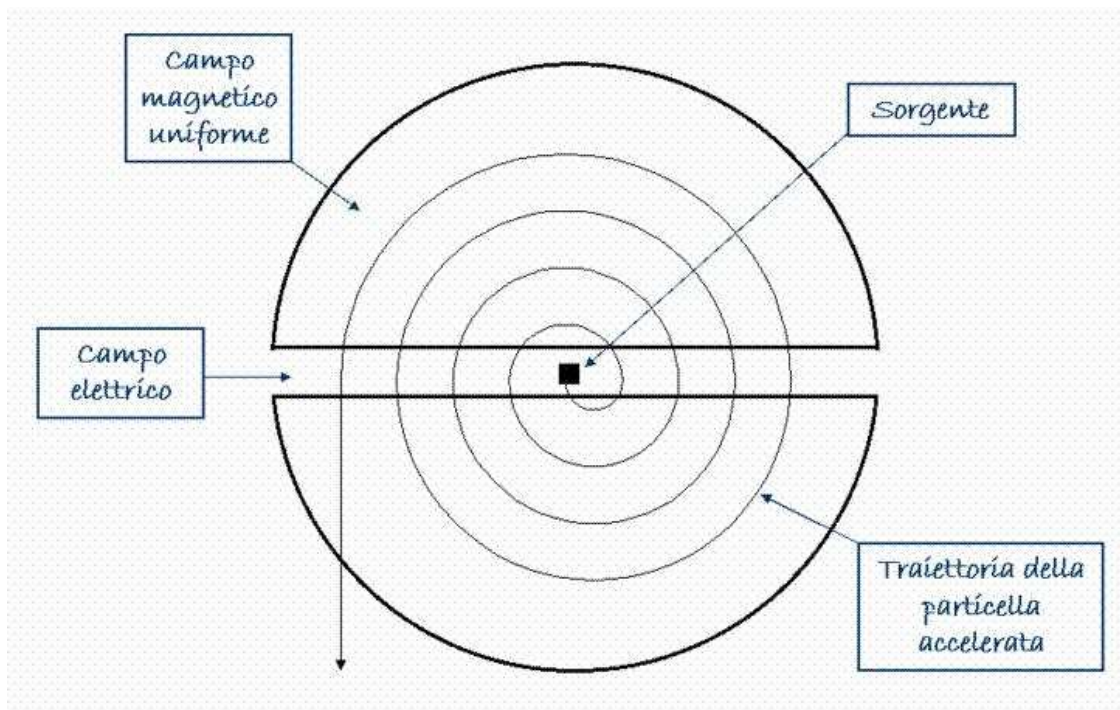
Radiofarmaceutica

Un **ciclotrone** è una macchina usata per *accelerare fasci di particelle* elettricamente cariche (normalmente **ioni leggeri**) utilizzando una corrente alternata ad alta frequenza ed alta tensione, in associazione con un campo magnetico perpendicolare.

$^1\text{H}^+$ (protoni o nuclei di idrogeno);

$^2\text{H}^+$ (deutoni o nuclei di deuterio, isotopo stabile dell'idrogeno);

$^3\text{H}^+$ (nuclei di trizio, radioisotopo dell'idrogeno)

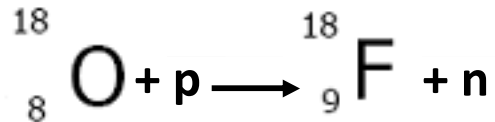


Bersaglio



Radiofarmaceutica

- Questi hanno il pregio di essere piccoli e leggeri; ciò li rende più facili da accelerare e, soprattutto, maggiormente in grado di vincere la repulsione elettrostatica dei nuclei degli atomi del **bersaglio** per penetrarvi.
- Particolarmente importante è il caso dei target per la produzione di ^{18}F . Il materiale bersaglio è acqua arricchita nell'isotopo stabile 18 dell'ossigeno. L'impatto degli ioni accelerati provoca la seguente reazione nucleare:



Sfruttando potenti acceleratori di particelle e reazioni di bombardamento (**bombardamento atomico**) indotte artificialmente, è possibile effettuare la *nucleosintesi artificiale* ottenendo nuovi isotopi non presenti in natura, isotopi aventi ciascuno un diverso livello di stabilità, e sintetizzare nuovi elementi la cui esistenza viene dapprima postulata da studi teorici.

Radiofarmaceutica

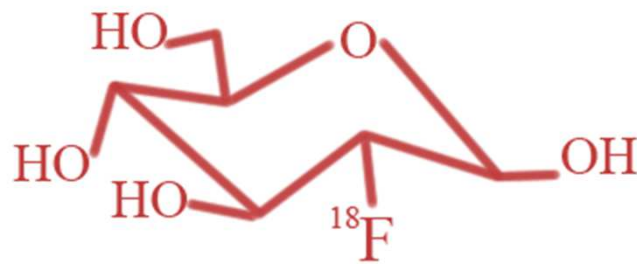
PET

Positron Emission Tomography

- Diversamente da quanto avviene per la *Tomografia Computerizzata* (TC) e per la *Risonanza Magnetica* (RM), che forniscono immagini principalmente morfologiche, la PET fornisce **immagini funzionali**, che permettono cioè di evidenziare l'attività di un organo o di un apparato e quindi anche la presenza di uno stato patologico attraverso la modificazione di tale funzione. Poichè i cambiamenti funzionali *si manifestano prima* delle alterazioni della struttura, la PET ha il vantaggio di consentire una **diagnosi precoce**, in particolare per alcune forme di tumore.
- Nuovi apparecchi all'avanguardia effettuano la cosiddetta TAC-PET, che permette di sovrapporre i risultati riguardanti la forma e l'anatomia degli organi forniti dalla TAC con quelli sul funzionamento delle cellule provenienti dalla PET.
- La PET è utilizzata, nella grande maggioranza dei casi, in campo oncologico (per la diagnosi o per valutare l'andamento della terapia), ma può anche servire per verificare la presenza di alcune malattie neurologiche o per controllare il funzionamento del cuore. Viene inoltre impiegata, nella ricerca, per studiare l'attività/funzionalità di radioligandi marcati (*biodistribuzione*).

Radiofarmaceutica

- Si sceglie innanzitutto la molecola di supporto più rappresentativa del processo biologico da studiare. Nel caso di un tumore questa molecola è il glucosio. Il tessuto tumorale dimostra un aumentato metabolismo energetico rispetto al tessuto normale: per produrre l'energia necessaria per la sua eccezionale vitalità, esso consuma grandi quantità di glucosio.
- La PET è in grado, per l'appunto, d'individuare questo iperconsumo ed evidenziare così le lesioni neoplastiche. Prima di cominciare, bisogna marcare le molecole di glucosio che saranno iniettate al paziente con un tracciante, cioè un atomo in grado di manifestare la propria presenza mediante emissione radioattiva.
- Il più utilizzato è il fluoro-18 (^{18}F) ($T_{1/2} = 120 \text{ min}$), un isotopo radioattivo artificiale che, incorporato alla molecola di glucosio, forma il *fluorodesossiglucosio* (**18-FDG**).



F-18 FDG

Radiofarmaceutica



Laboratorio attrezzato per sintesi di radiofarmaci

Contenitore per il trasporto di radiofarmaci



Radiofarmaceutica

PET

Positron Emission Tomography

➤ Una volta sintetizzato, questo composto viene iniettato nel paziente. Quindi, dopo aver atteso il tempo necessario al prodotto per diffondersi nell'organismo (40 minuti circa), il paziente viene fatto distendere su un lettino per essere sottoposto al processo diagnostico.

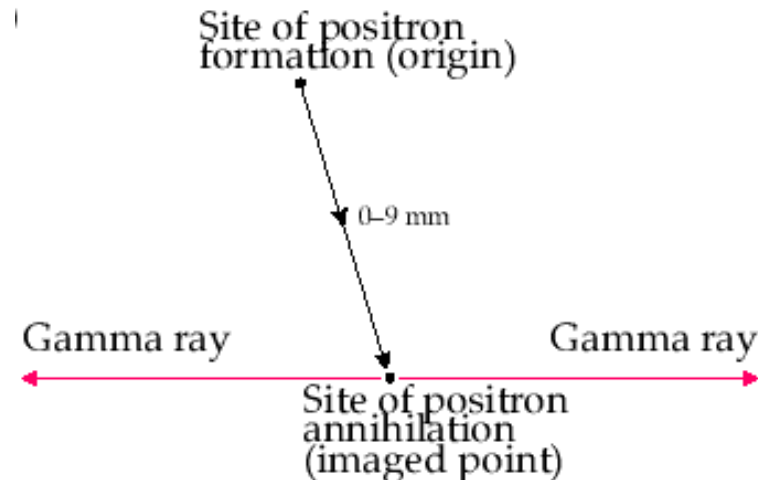


Radiofarmaceutica

PET

Positron Emission Tomography

- I radionuclidi utilizzati per la marcatura sono gli isotopi β^+ emettitori degli elementi naturali a maggior diffusione nel corpo umano (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O e ^{18}F), il che permette a molecole naturali o artificiali di essere marcate con questi isotopi senza alterarne le proprietà chimiche e biologiche.
- Una caratteristica comune di questi radioisotopi è di avere un brevissimo tempo di vita.
- Questo consente una sensibile riduzione della dose radiante assorbita dal paziente e permette di eseguire analisi in tempi ravvicinati.

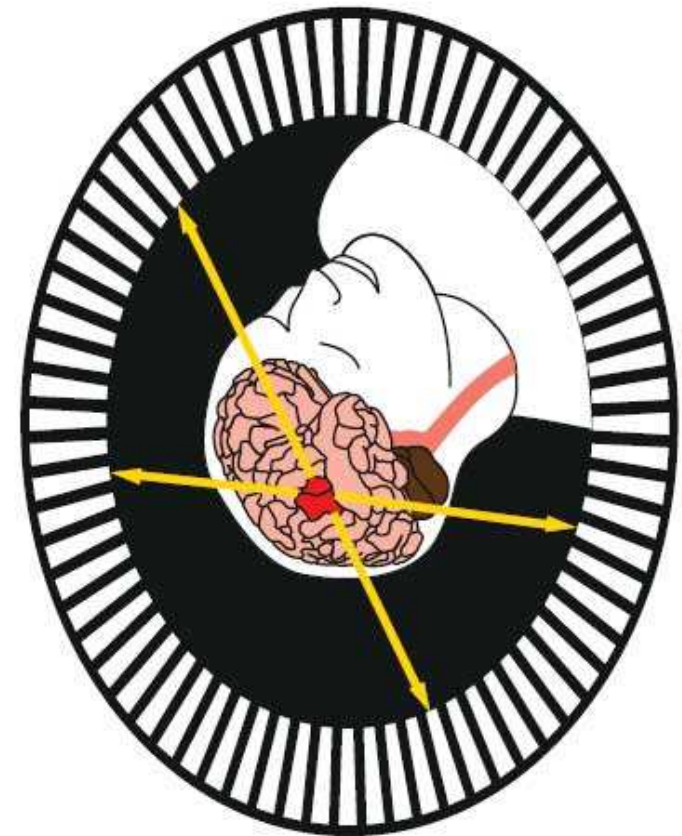
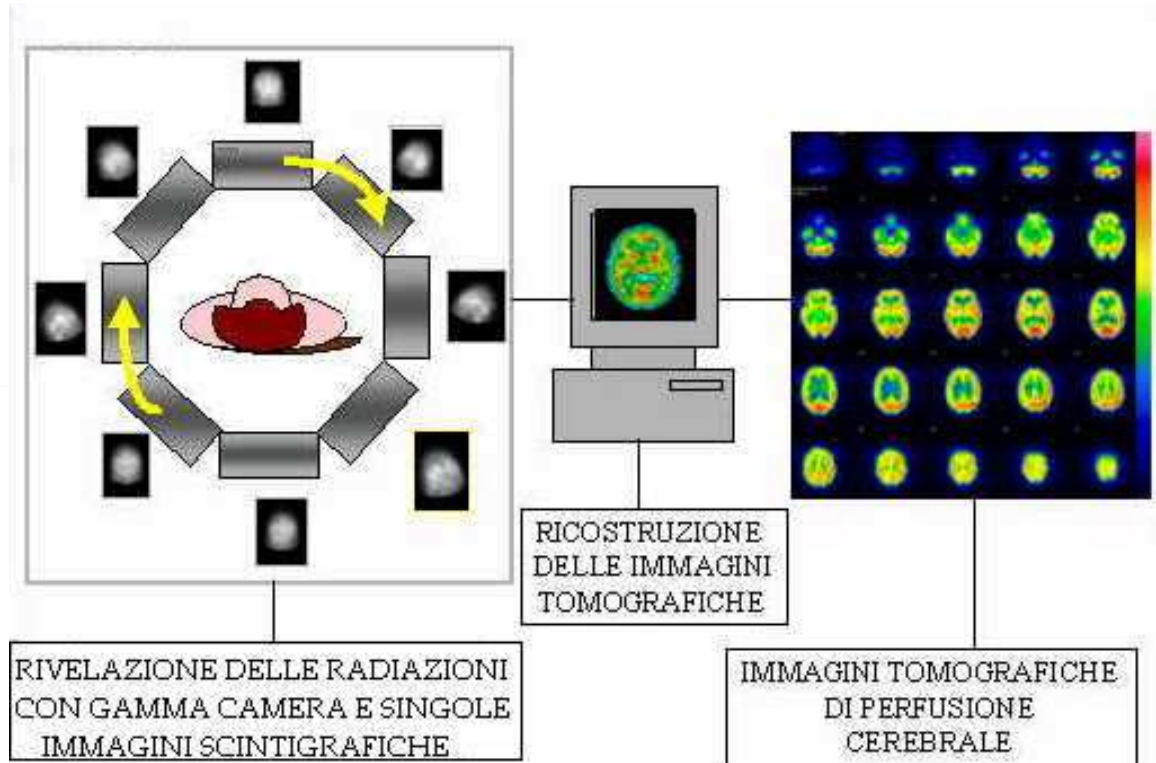


2 raggi gamma da 0,64 MeV

Radiofarmaceutica

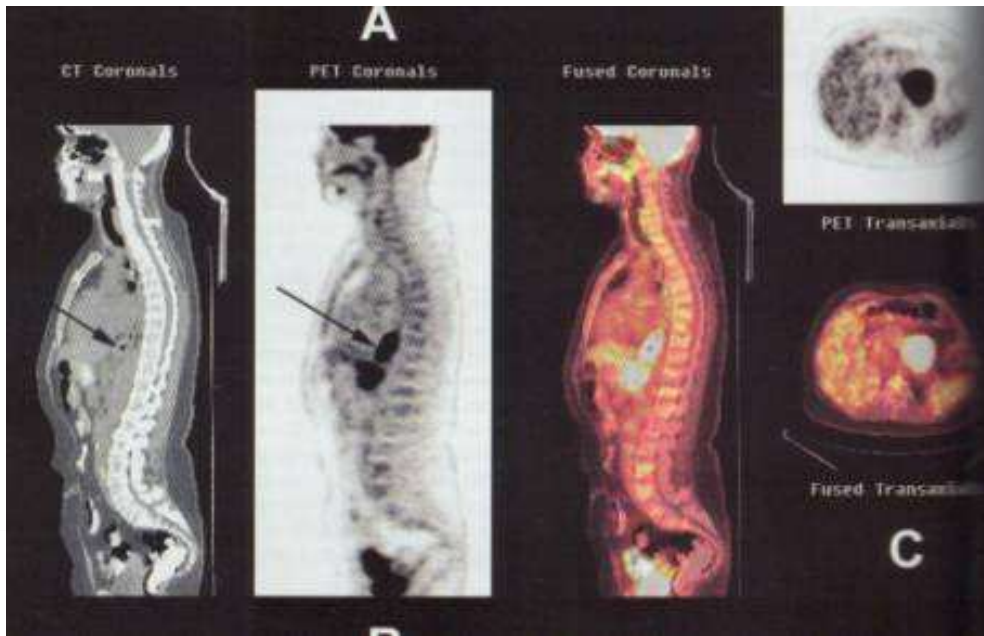
PET

Positron Emission Tomography



Radiofarmaceutica

Ricostruzioni tomografiche da emissioni di positroni

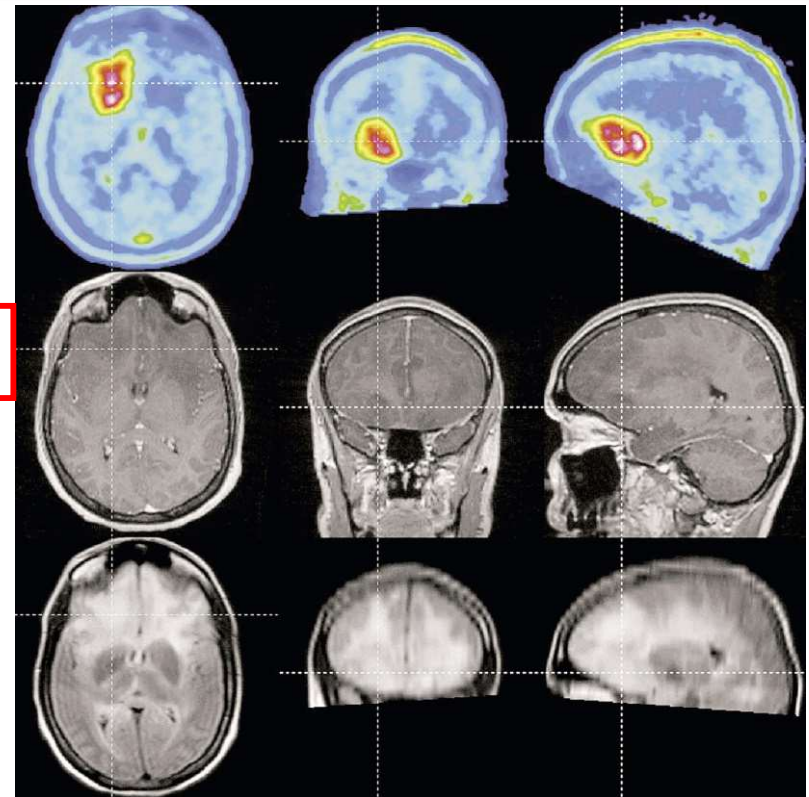


Tomografia TAC

Fusione tomografica

Tomografia PET

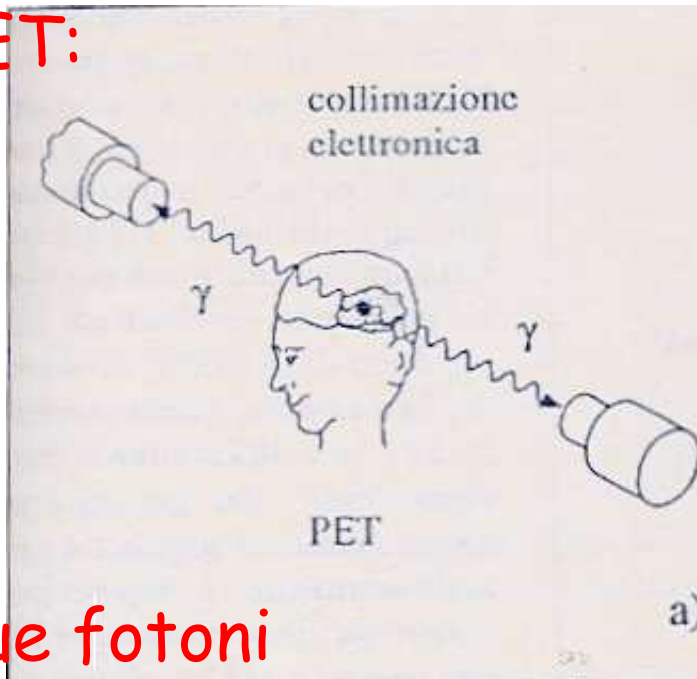
TAC-PET



Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

PET:



due fotoni
emessi in direzione opposta

SPECT:



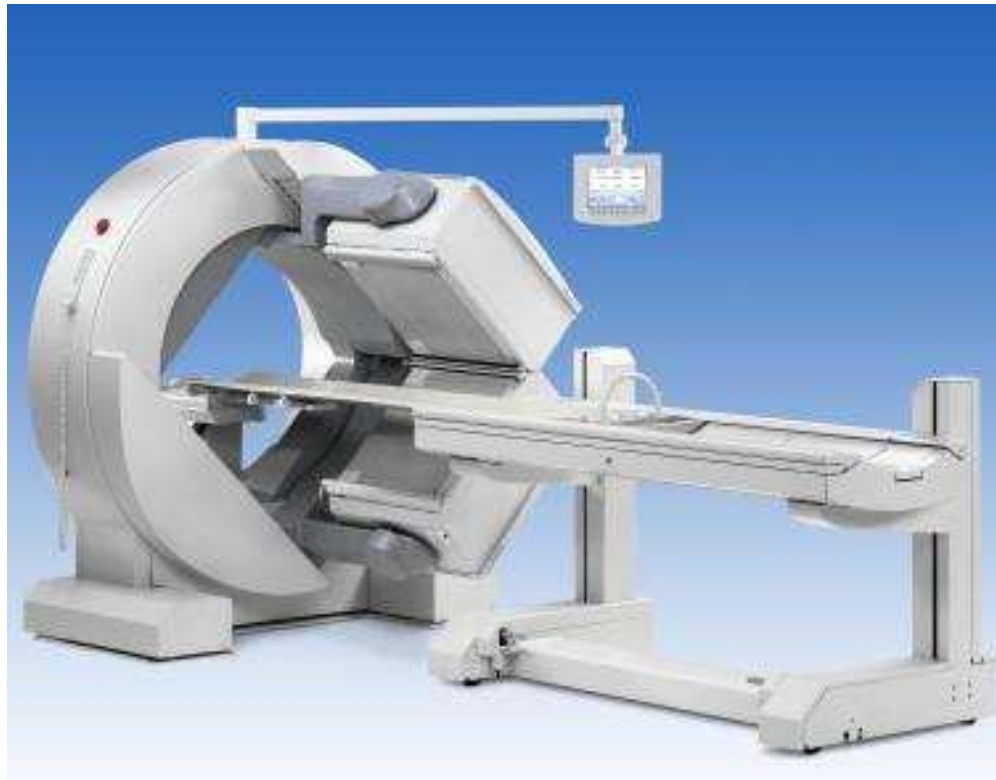
un solo fotone

Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

È una tecnica avanzata di imaging come la tomografia a emissione di positroni (PET) . Le immagini vengono ottenute applicando la tecnologia transassiale computerizzata a una gamma camera standard.

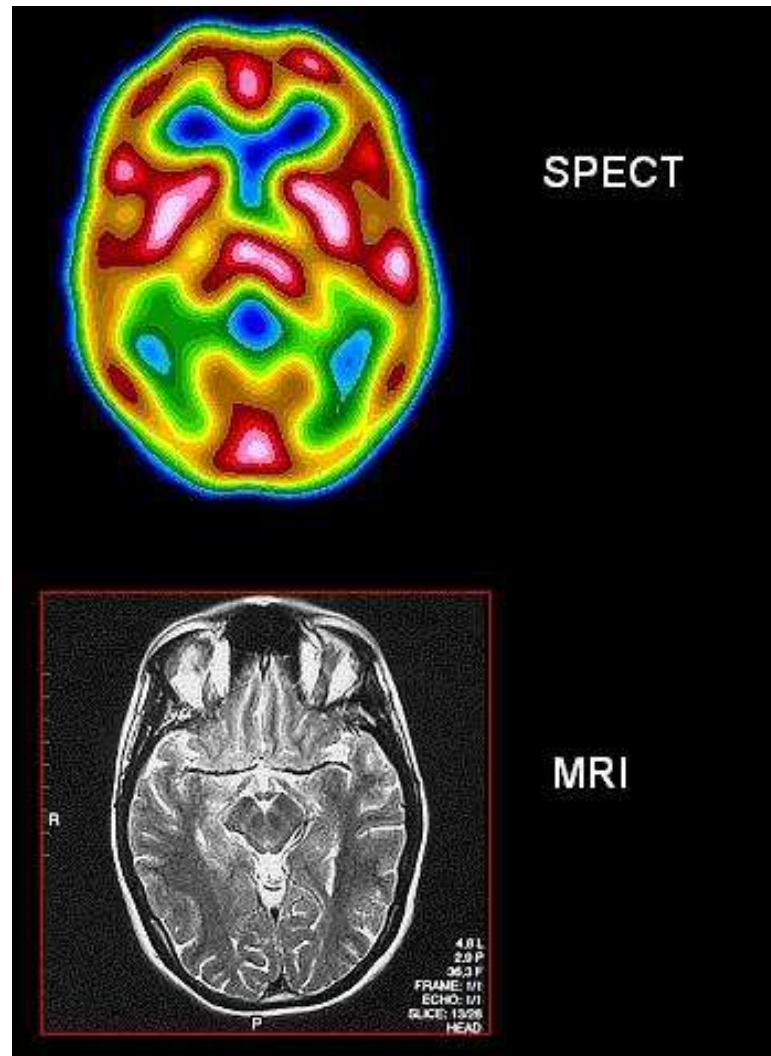
La differenza sostanziale tra SPECT e PET è dovuta al fatto che nella prima viene emessa una singola particella, mentre nella PET sono due le particelle emesse, permettendo di ottenere una localizzazione più precisa dell'evento e una migliore risoluzione dell'immagine. Il maggior vantaggio della SPECT sulla PET è la lunga emivita degli isotopi utilizzati, che non richiedono la presenza in sede di un ciclotrone.



Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

❖ Tomografia SPECT e MRI



Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

- ❖ Allo stesso modo con il quale noi otteniamo una normale radiografia bidimensionale (in 2D), che è una rappresentazione approssimativa di una struttura tridimensionale, la collezione di immagini ottenute da una gamma camera è una serie di viste bidimensionali della distribuzione di un radionuclide, da varie angolazioni.
- ❖ Il cosiddetto imaging SPECT viene eseguito adoperando una gamma camera per acquisire molteplici immagini 2D (note anche come proiezioni), da molteplici angoli. In seguito un computer viene impiegato per eseguire un algoritmo di ricostruzione tomografica partendo dalle numerose proiezioni, dando luogo ad un dataset 3D. Questo insieme di dati può essere in seguito manipolato, per mostrare sezioni sottili lungo qualsiasi asse del corpo si voglia scegliere, con elaborazioni simili a quelle di altre tecniche tomografiche, come l'imaging a risonanza magnetica, la tomografia computerizzata, e la PET.
- ❖ Dal momento che l'acquisizione delle immagini fatta dalla SPECT è molto simile all'imaging con la gamma camera planare, si possono utilizzare gli stessi radiofarmaci.

Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

❖ Per captare immagini SPECT, la gamma camera viene ruotata attorno al paziente. Si prendono molte immagini planari nelle diverse proiezioni ottenute in punti definiti durante la rotazione, tipicamente ogni 3-6 gradi d'arco. In molti casi, si esegue una rotazione di 360 gradi, che permette di ottenere una ricostruzione 3D ottimale. Il tempo necessario per ottenere ogni proiezione è variabile, ma è tipica una durata di 15 – 20 secondi. Questo comporta un tempo totale di scansione di circa 15-20 minuti.

❖ I tracciati più usati sono marcati con **iodio-123**, **tecnezio-99m** e **xenon-133** radioattivi.

❖ Lo xenon-133 è un gas nobile che può essere direttamente inalato; lo xenon entra rapidamente nel sangue e si distribuisce a varie aree encefaliche in funzione del flusso ematico cerebrale regionale. Normalmente l'emissione gamma delle amine (ad es. IBZM) marcate con iodio-123 è maggiore a livello della sostanza grigia, dei nuclei della base e del talamo. **Il segnale SPECT è proporzionale al flusso ematico regionale e quindi al livello di funzionamento della struttura.**

Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

- ❖ A livello della sostanza bianca vi è, in genere, un'ipoattività per il fatto che il flusso ematico è circa un quarto di quello della sostanza grigia. La tecnica fornisce misure tomografiche di flusso e volume ematico e di livello funzionale regionale e viene utilizzata per lo studio dei disturbi circolatori, dei focolai epilettogeni, dei focolai infiammatori, ecc. Inoltre, **utilizzando tracciati che si legano a classi di recettori**, sono possibili studi delle funzioni neurotrasmettitoriali: i ligandi marcati con iodio-123 possono essere usati per lo studio dei **recettori muscarinici, dopaminergici e serotoninergici**.
- ❖ Insieme alla PET, questa tecnica trova largo utilizzo soprattutto nel campo della ricerca in **ambito psichiatrico**, dove in alcune patologie è stato possibile identificare precise alterazioni in determinate sedi. Ad esempio, nel caso dei disturbi d'ansia si è riscontrata un'anomalia di grado variabile della corteccia frontale, delle aree occipitali e temporali e nel caso di disturbi da attacco di panico è stata osservata un'alterazione anche a carico della circonvoluzione paraippocampale. Molti sono, inoltre, i dati in letteratura che riguardano il flusso ematico cerebrale nei disturbi dell'umore, con risultati che dimostrano in alcuni casi un aumento, in altri una diminuzione del flusso a livello della corteccia, in particolare dell'area frontale.

Radiofarmaci

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

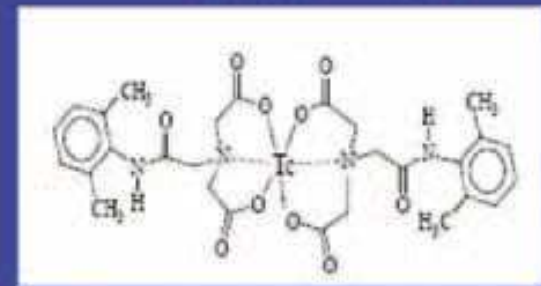
❖ *Neurodiagnostica per immagini*

❖ Un utilizzo sempre maggiore si ha nel caso delle **demenze**, con la dimostrazione di una riduzione irregolare del flusso cerebrale in aree variabili, sempre associata a una riduzione del consumo di ossigeno e glucosio. In questo caso, la SPECT permette solo un'**indagine semiquantitativa** del flusso utilizzando l'opportuno radioemettitore, con l'evidenziazione di una riduzione di flusso nelle regioni temporo-parietali bilateralmente in caso di malattia di **Alzheimer e demenza senile tipo Alzheimer**.

Anche il questo caso la PET viene utilizzata con il tracciante a base di glucosio

Marcato con ^{18}F (^{18}F -FDG) poiché la comunicazione neuronale, svolta a livello delle sinapsi, ha necessità di energia e l'energia è data dal glucosio. L'osservazione di come si distribuisce nel cervello, ci fornisce la possibilità di vedere se ci sono aree cerebrali che non assumono il glucosio radiomarcato o lo assumono poco (diagnosi precoce).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO



Esametilpropilen amminossima

STABILITÀ:

A causa della facile idrolisi dei gruppi esterei

→ HMPAO ha una stabilità molto limitata nel tempo:

- 1 ora: senza aggiunta di stabilizzanti

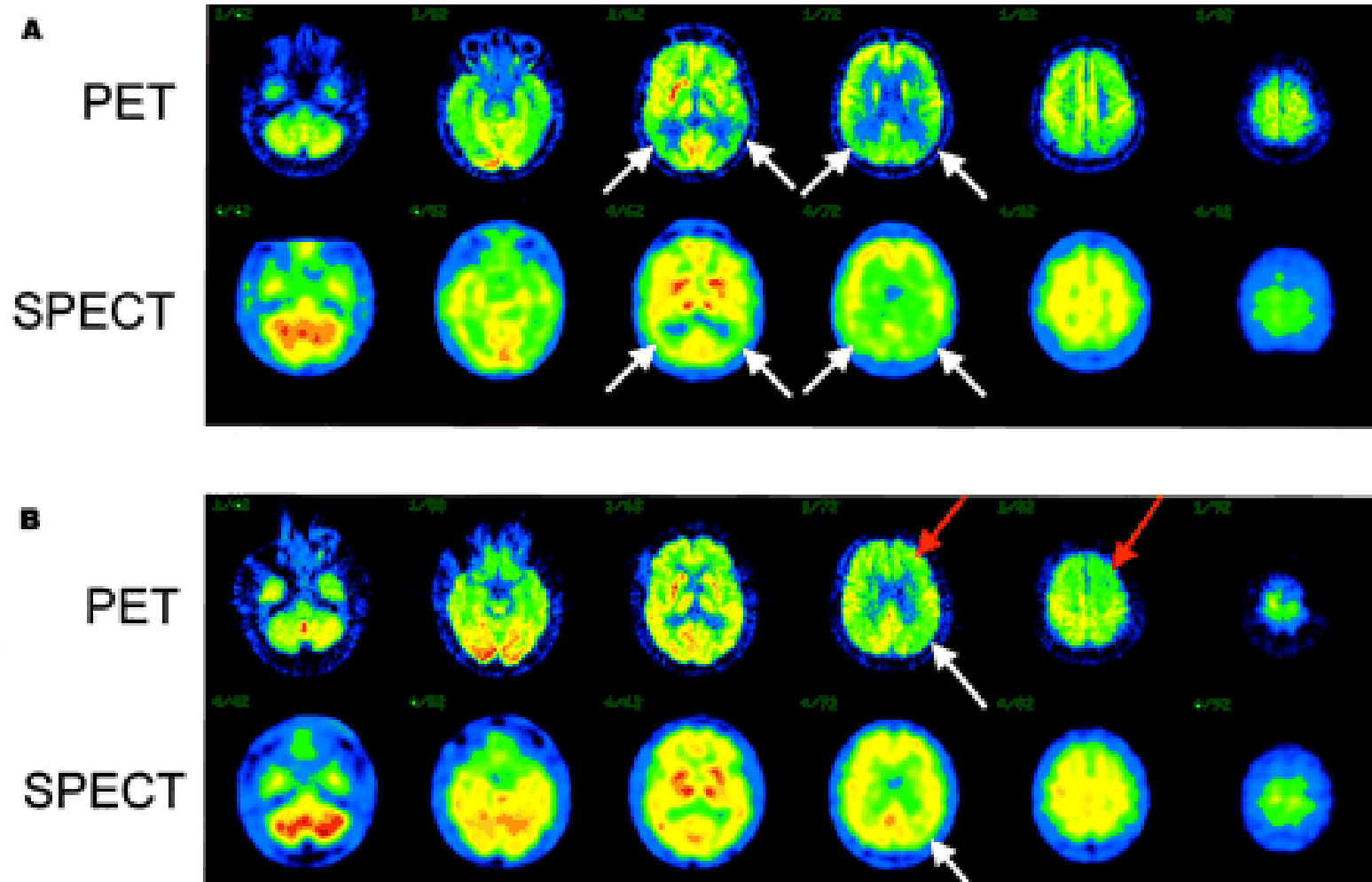
- 4-6 ore: con aggiunta di agenti stabilizzanti

➤ SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

❖ *Neurodiagnostica per immagini*

❖ In generale, il tracciante gamma-emittente utilizzato nel neuroimaging funzionale è il **99mTc-HMPAO**. Il 99mTc è un isomero nucleare metastabile in grado di emettere raggi gamma rilevabili da una gamma camera. Quando è unito ad un HMPAO, il 99mTc può essere assorbito dal tessuto cerebrale in maniera proporzionale al flusso di sangue, cosicché il flusso sanguigno cerebrale possa essere rilevato dalla gamma camera nucleare.

❖ Dato che il flusso sanguigno nel cervello è strettamente correlato al metabolismo locale ed alla energia utilizzata dal cervello, il tracciante 99mTc-HMPAO (così come il similare 99mTc-EC) è utilizzato per rilevare il metabolismo cerebrale regione per regione, nel tentativo di diagnosticare e differenziare le diverse cause patologiche della demenza. Analisi di molti studi riportati suggeriscono che la SPECT con questo tracciante abbia una sensibilità pari al 74% alla diagnosi del morbo di Alzheimer contro l'81% di sensibilità per l'esame clinico (test cognitivi, ecc.). Studi più recenti hanno mostrato un'accuratezza della SPECT nella diagnosi di Alzheimer pari all'88%. Nelle analisi, la SPECT risultava essere superiore all'esame clinico e ai criteri clinici (91% contro 70%) nella capacità di differenziare il morbo di Alzheimer dalle demenze vascolari.



❖ Confronto fra analisi PET e SPECT nella diagnosi della malattia di Alzheimer

Per i test PET viene utilizzato ^{18}F -FDG (fluorodesossiglucosio)

Per i test SPECT viene utilizzato ^{99}Tc -HMPAO

Metodi dei centiloidi per trattazione statistica

Risultati ottenuti:

Ottima correlazione tra i dati ottenuti, visualizzazione con entrambe le tecniche di un ridotto uptake a livello della corteccia tempoparietale.

Discordanza esclusiva sul uptake frontale, visualizzato dalla PET ma non dalla SPECT

Radiofarmaceutica

Sostanza chimica
Caratteristiche funzionali e metaboliche
simili a una sostanza dell'organismo
(diagnostica)
Studi di Biodistribuzione

Utilizzati:
Non legati a *carrier*
Legati a molecole *carrier*

Altri radionuclidi utilizzati in diagnostica (no PET/SPECT)

⁹⁹Tecnezio

- Attualmente il tecnezio rappresenta più del 90% dei radionuclidi impiegati in diagnostica.
- Esso emette solo *radiazioni gamma*, di energia adatta per ottenere immagini
- Ha emivita di 6 ore
- È un *radionuclide "economico"*, il generatore lo fornisce al Centro di medicina nucleare (di medie dimensioni) ad un costo di 1000-1500 euro alla settimana.

Radiofarmaceutica

⁹⁹Tecnezio

- Viene iniettato per via endovenosa e l'analisi del paziente avviene mediante l'utilizzo di gamma camera.
- Attraverso questa tecnica si possono analizzare per scansione molti organi come ossa, cervello, cuore, reni, polmoni, milza e tiroide.

¹²⁵Iodio, ¹³¹Iodio, ¹²³Iodio

- Gli isotopi radioattivi dello Iodio hanno la capacità, dopo somministrazione endovenosa, di *concentrarsi nelle cellule tiroidee* in quanto posseggono le stesse caratteristiche *dell'isotopo freddo* (¹²⁷I) utilizzato da suddette cellule per la produzione di ormoni tiroidei.
- Questo consente uno studio approfondito dei meccanismi biochimico-metabolici che stanno alla base della funzionalità tiroidea.
- ¹²⁵I α-emittenti puri a bassa energia (0.035 MeV). Sono poco costosi, utilizzati come tali o legati a *carrier*
- ¹²³I perfetto per uso diagnostico (T_{1/2} = 13 ore) energia radiante bassa , γ-emittente puro, non produce **radiazioni sporche** (misto β e γ ad alta energia), è più costoso.

Radiofarmaceutica

¹¹¹Indio

- Sostituto ideale del tecnezio, ha una T_{1/2} di 67 ore
- Prodotto per irraggiamento del cadmio con protoni di energia appropriata
- Per la marcatura del *carrier* si utilizza un metodo indiretto, vengono utilizzati particolari **chelanti** (es.idrossichinolina) per formare **complessi molto stabili**.

⁶⁷Gallio

- Il gallio-67 ha un periodo di dimezzamento di 3.26 giorni ed emette radiazioni gamma.
- È **simile al ferro**, si lega alla *trasferrina* attraverso la quale viene distribuito nel fegato e nel midollo
- Una fissazione elevata del radioisotopo si ha in quei tumori ad altissima crescita, come i linfomi, che richiedono elevate quantità di ferro per la loro crescita.

¹³³Xenon

- Lo xenon-133 ha un periodo di dimezzamento di 5 giorni, ed emette radiazioni gamma e beta.
- È un **gas inerte** con poca solubilità nel plasma, mescolato con aria o ossigeno è utilizzato per inalazione per studiare le funzionalità polmonari.

Radiofarmaceutica

Utilizzo di radiofarmaci a scopo terapeutico

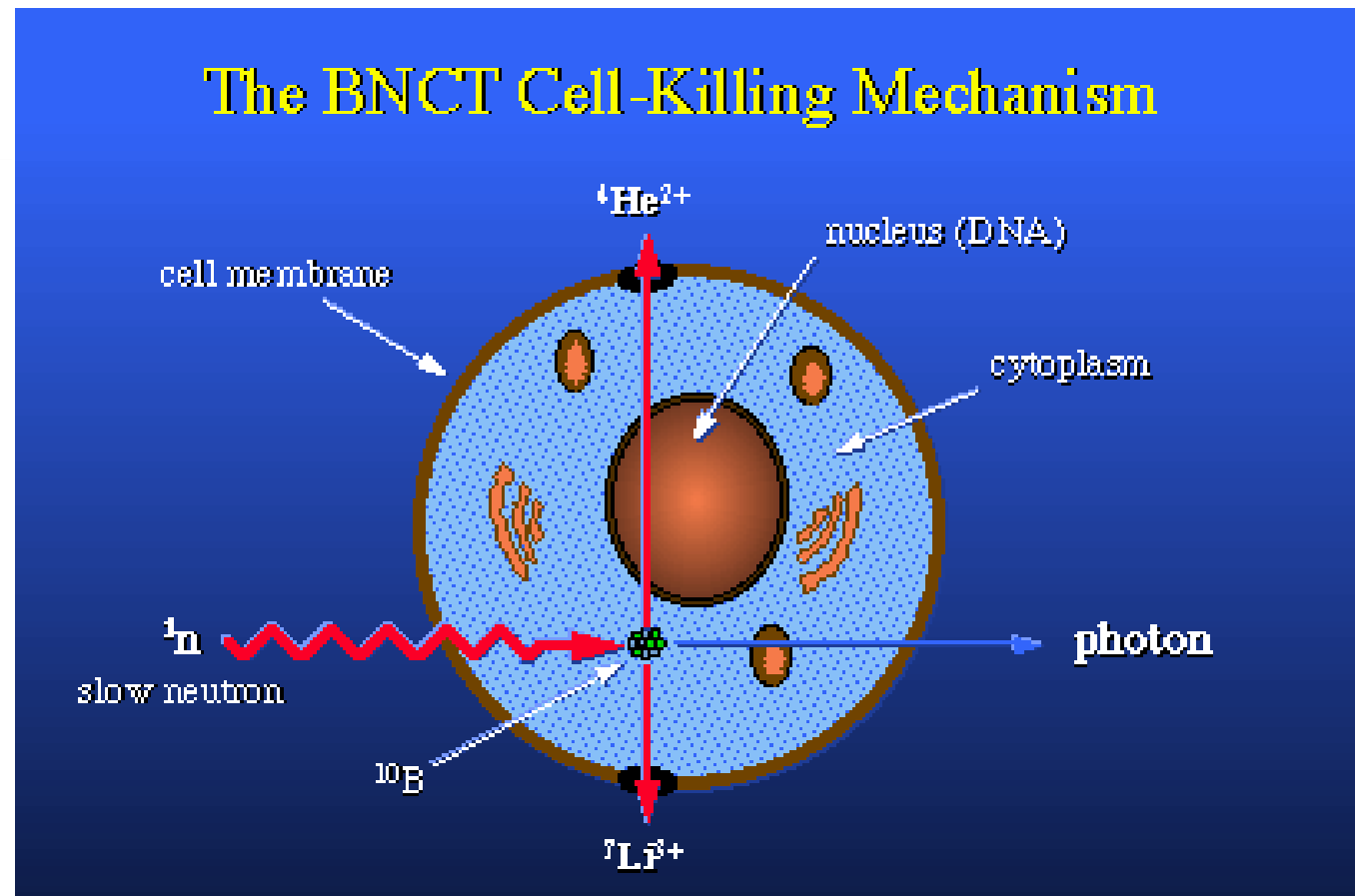
- Un radiofarmaco utilizzato in terapia deve consentire l'erogazione al tessuto malato di una quantità di radiazioni *molte volte superiore* a quella erogata al tessuto sano.
- Distruzione selettiva del tessuto malato (in genere neoplastico)
- Sono terapie allo scopo di ottenere **interventi palliativi sui sintomi del dolore** in pazienti che presentano metastasi in fase avanzata.
- Attualmente in clinica vengono utilizzati emittenti beta (e gamma) puri di radionuclidi quali:
 - ⁸⁹**Sr** cancro al seno e alla prostata
 - ¹³¹**I** tumori della tiroide e metastasi ossee
 - ¹⁸⁶**Re** gravi forme di artrite reumatoide
 - ⁹⁰**Y** beta emittente puro, costi bassi, utilizzato per *marcare anticorpi monoclonali* (*Zevalin*)
- Per avere radiofarmaci con **effetti veramente letali** sulle cellule tumorali, occorrerebbe mettere a punto clinicamente radiofarmaci α -emittenti come bismuto (²¹²**Bi**) o piombo (²¹²**Pb**) con elioni ad alta energia (5-6 MeV) e poco penetranti (5-10 nm).
- Ma la loro produzione è costosissima e hanno tempi di dimezzamento molto brevi (1-7 h)

Radiofarmaceutica

BNCT (*Boron Neutron Capture Therapy*)

La BNCT è una terapia antitumorale basata su:

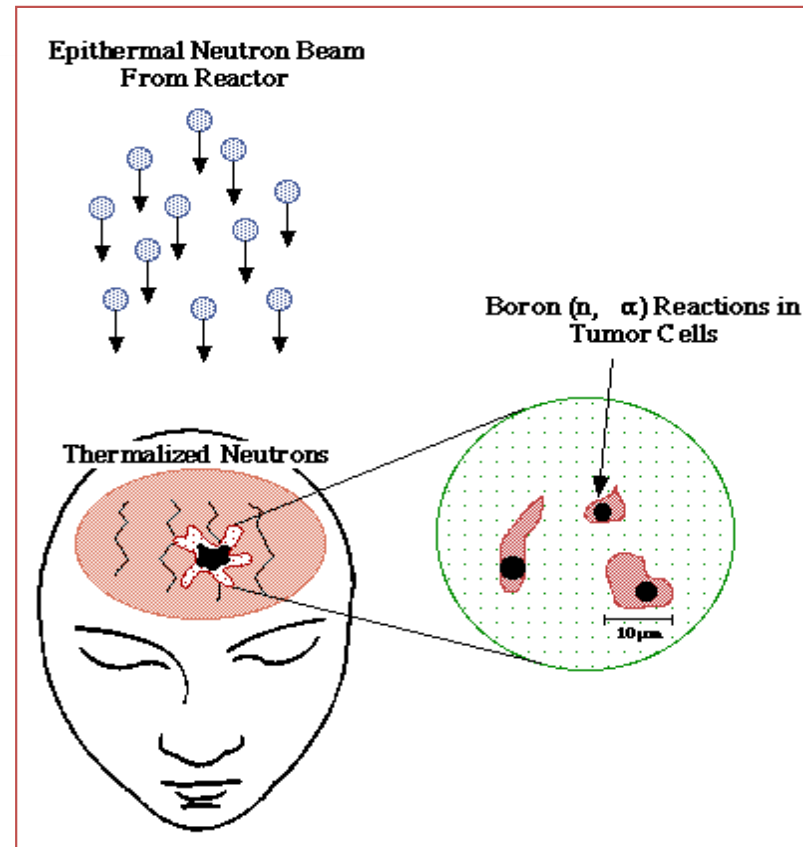
- La somministrazione per i.v. di un farmaco contenente Boro ($^{10}_5\text{B}$)
- Captazione selettiva del farmaco all'interno delle cellule tumorali
- Irradiazione del tessuto neoplastico con un fascio di *neutroni termici* (energia inferiore a 0.1 eV)
- Le **particelle α** citotossiche produrranno un danno alle cellule neoplastiche lasciando inalterato il tessuto sano circostante



Radiofarmaceutica

La BNCT è stata utilizzata per scopi clinici su pazienti affetti da melanoma e da tumori a carico del sistema nervoso centrale (SNC)

- Il melanoma è un tumore maligno a carico dell'epidermide, per la cura del quale sono stati utilizzati in terapia differenti agenti BNCT, tra i quali la ^{10}B -*p* borofenilalanina (^{10}BPA)
- Il glioblastoma multiforme è un tumore a carico del SNC. Per la cura di questa neoplasia è stato utilizzato **con successo** il mercaptoundecaidrododecaborano (^{10}BSH).



Radiofarmaceutica

In questo caso è stata utilizzata la ^{18}F -BPA sia come **tracciante PET** sia come agente **BNCT**. L' utilizzo di unico composto che funga da diagnostico e da agente terapeutico comporta evidenti vantaggi:



diretta irradiazione con i neutroni senza la necessità di ulteriori trattamenti

Radiofarmaceutica

Trattamento Avanzato di Organi Mediante Irraggiamento Neutronico ed Autotrapianto (TAOr-MINA)

Per la prima volta al mondo in Italia è stato applicato il metodo TAOr-MINA, messo a punto presso l'Università degli Studi di Pavia.

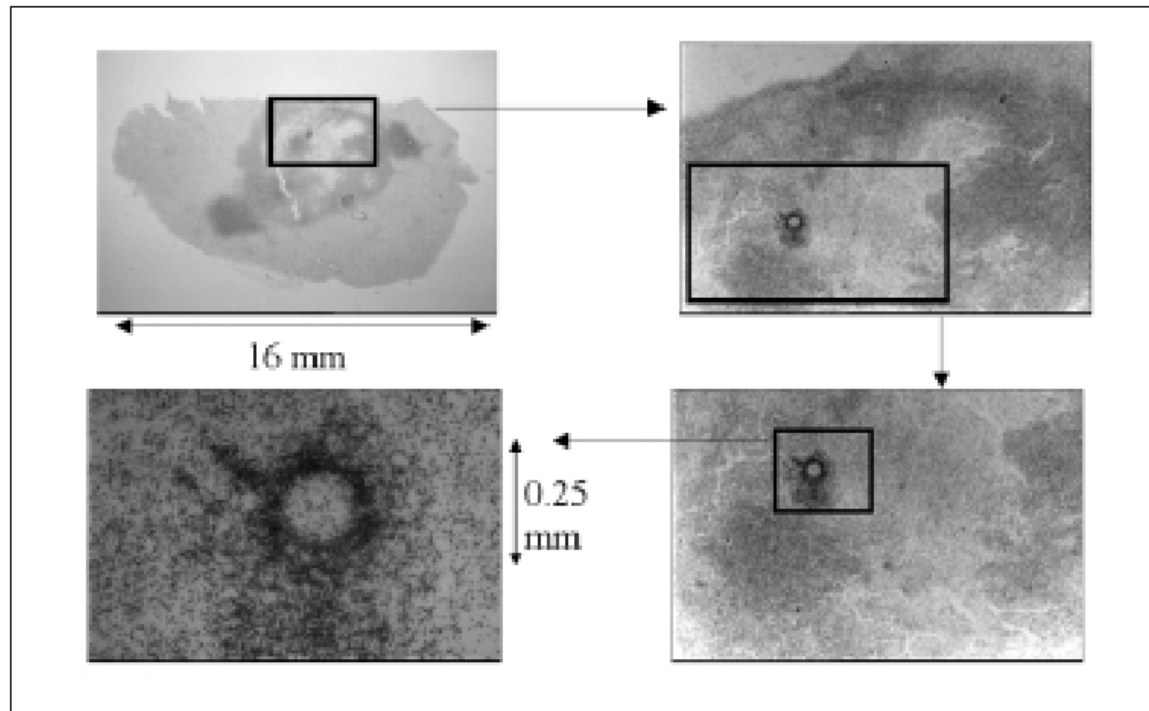
Il metodo in questione è stato effettuato su un paziente di 48 anni affetto da metastasi epatiche da adenocarcinoma del colon.

L'Adenocarcinoma del colon è un tumore maligno molto frequente a danno del tratto gastroenterico. Nel mondo intero vengono stimati circa 600.000 casi per anno, di cui 152.000 negli Stati Uniti d'America. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è inferiore al 40-50%

L'esito letale della patologia in questione è dovuto, per i due terzi del totale, all'insorgenza di metastasi epatiche che spesso si presentano multiple e diffuse, quindi non asportabili chirurgicamente

Radiofarmaceutica

Presso il Policlinico di Pavia, il fegato del paziente in questione, dopo l'infusione di BPA, è stato espantato, racchiuso in due sacchetti sterili di teflon e posto in un opportuno contenitore. Trasportato alla sorgente di neutroni, il fegato è stato introdotto nel reattore fino alla posizione d'irraggiamento.

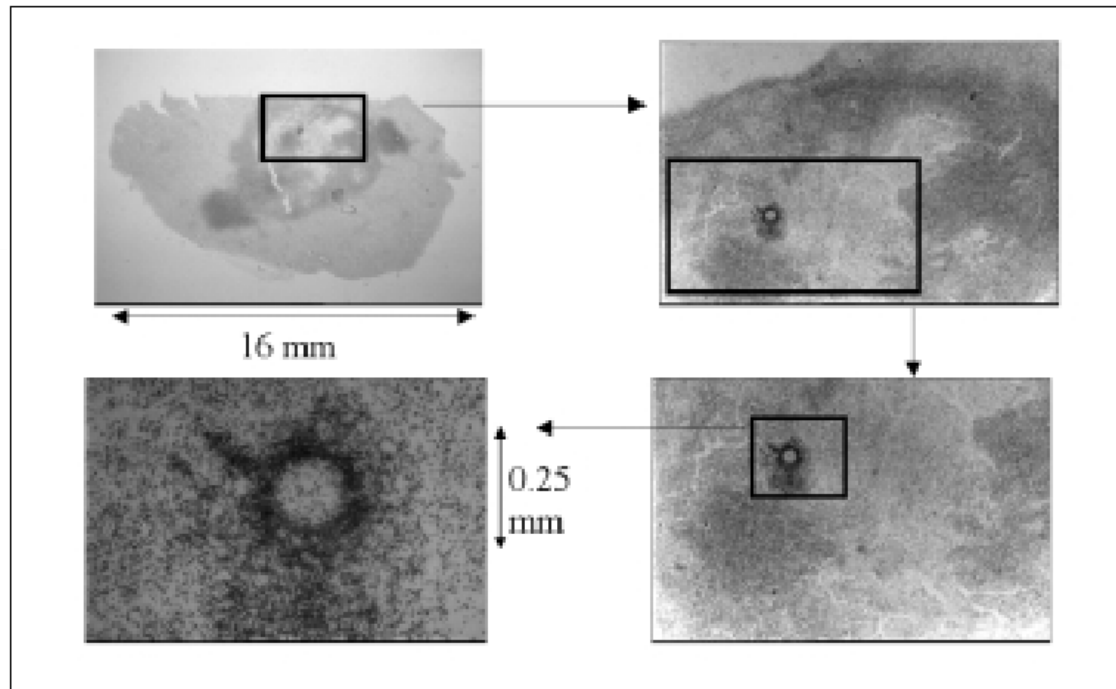


Le immagini ottenute col metodo della radiografia neutronica mostrano un nodulo metastatico prelevato dal paziente durante l'infusione di BPA.

Nelle immagini sono ben visibili le zone corrispondenti al tessuto tumorale, esse risultano scure grazie alla elevata concentrazione di ^{10}B

Radiofarmaceutica

Ingrandimenti di una piccola metastasi mostrano come il ^{10}B sia in grado di raggiungere gruppi di cellule tumorali estremamente piccole. La BNCT, quindi, può curare anche metastasi che gli attuali mezzi diagnostici non sono in grado di rilevare.



Dopo 10 giorni dal trattamento, una TAC ha mostrato che il tessuto epatico sano era in buone condizioni mentre le 14 metastasi rilevate con l'ecografia intraoperatoria erano in stato di necrosi. Il trattamento neutronico ha agito su tutto il fegato e tutte le metastasi, piccole o grandi che fossero, sono state trattate con efficacia

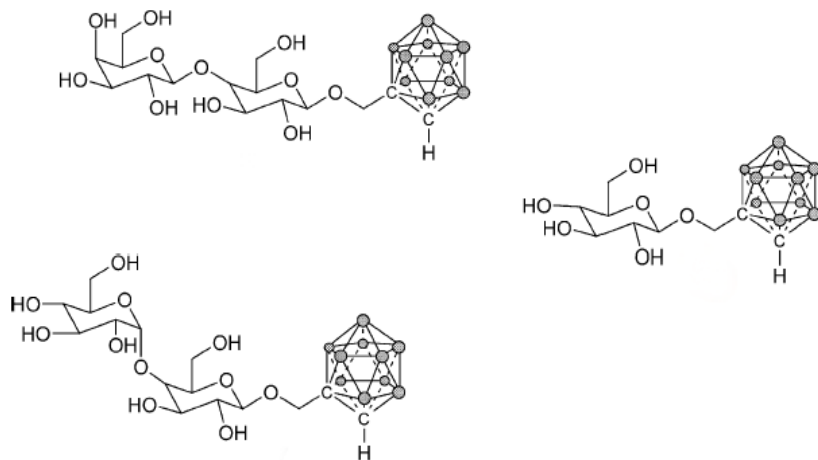
Radiofarmaceutica

- La BNCT ha efficacia terapeutica previa captazione selettiva da parte le cellule tumorali del farmaco contenente il ^{10}B , quindi l'aspetto fondamentale di questa terapia è la necessità che, all'interno del tessuto neoplastico, venga ad esserci una concentrazione di ^{10}B molto più alta rispetto a quella presente nei tessuti sani.
- La soglia minima di concentrazione affinché la BNCT sia efficace è di:
 - 5-10 μg di ^{10}B / g di tessuto tumorale
- Questo valore limite può essere sensibilmente ridotto se il ^{10}B è localizzato all'interno del nucleo cellulare o in prossimità di esso.
- L'unico farmaco approvato dall'FDA è la Borofenilalanina, il quale essendo un aminoacido modificato contiene un solo atomo di Boro per molecola e non presenta particolari caratteristiche di selettività verso le cellule tumorali. Questo fattore limita fortemente il successo terapeutico della BNCT.

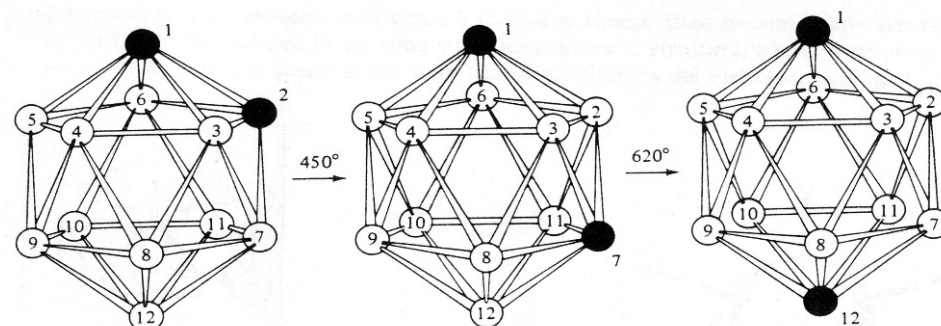
Radiofarmaceutica

La ricerca di nuovi agenti BNCT è ultimamente rivolta verso l'utilizzo di composti carboranil sostituiti.

L'utilizzo dei carborani infatti è principalmente legato a due fondamentali caratteristiche: l'alta percentuale in peso di boro presente in questi composti, e l'elevata versatilità chimica che consente di coniugarli con numerose molecole, sia di sintesi che naturali.



Derivati glucosidici



o-, *m*-, *p*-carborani e loro isomerizzazione

Radiofarmaceutica

Affinché la BNCT si riveli un utile strumento terapeutico per la cura di alcune forme tumorali è necessario che il farmaco contenente il ^{10}B o l'agente BNCT sia in grado di accumularsi selettivamente all'interno della cellula neoplastica.

Un altro importante requisito è che l'agente BNCT non sia di per se tossico e che contenga più di atomo di ^{10}B . Un'elevata percentuale di ^{10}B per molecola riduce il limite minimo di concentrazione di agente BNCT e riduce sensibilmente la tossicità essendo necessaria una minore quantità di farmaco

Una strategia per migliorare la selettività del agente BNCT, si è basata sulla progettazione e sulla sintesi di ligandi affini al **Recettore Periferico delle Benzodiazepine** recanti un cluster carboranico.

Radiofarmaceutica

Il recettore periferico delle benzodiazepine (PBR) inizialmente è stato scoperto nei tessuti periferici per mezzo del *diazepam* marcato con il trizio.

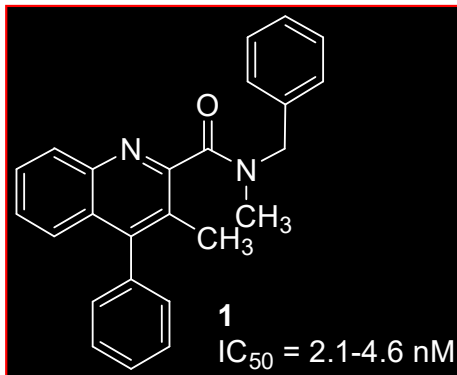
- Il PBR sembra prevalentemente coinvolto nella *steroidogenesi*
 - In condizioni patologiche è sovraespresso in:
- alterazioni del SNC (Malattia di Alzheimer, Sclerosi multipla, Corea di Huntington)
 - forme tumorali (carcinoma della mammella, neoplasie epatiche, melanoma, tumori cerebrali)

Radiofarmaceutica

- Il PBR, essendo sovraespresso nelle forme neoplastiche precedentemente elencate, può costituire un importante target biologico per farmaci antitumorali
- Ligandi ad elevata affinità per il PBR possono essere usati sia come traccianti per la Tomografia ad Emissione di Positroni (*PET*), sia come agenti potenzialmente utili nella Boron Neutron Capture Therapy (*BNCT*)

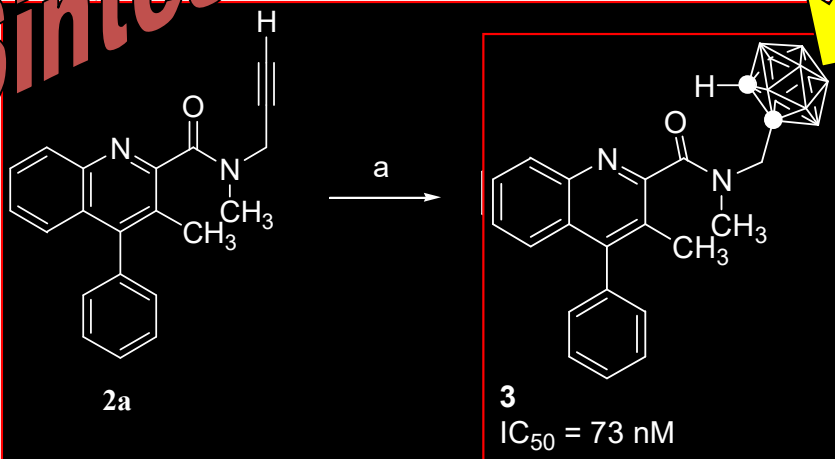
Primo Ligando PBR Potenzialmente Utile nella BNCT

La sostituzione del benzile con un gruppo carboranilmetile ha portato alla realizzazione del primo ligando PBR recante una gabbia carboranica e dotato di affinità nanomolare.



I derivati 2-chinolincarbossamidici più interessanti sono stati marcati con l'isotopo 11 del carbonio con lo scopo di ottenere traccianti PET

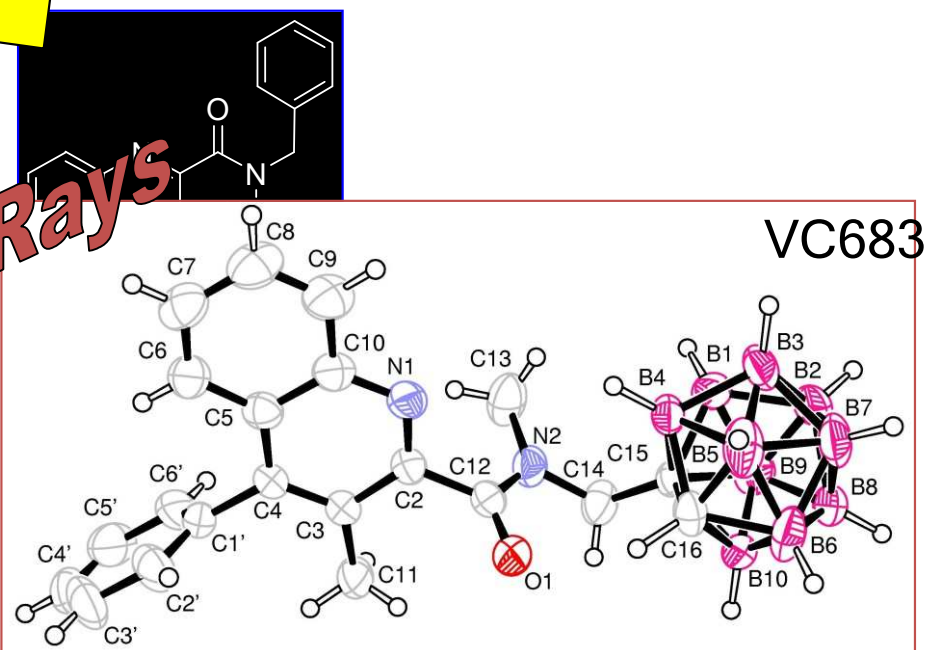
Sintesi



Nella struttura a gabbia icoesaedrica, i punti bianchi rappresentano gli atomi di carbonio, mentre gli altri vertici le unità BH.

Reagenti: (a) $B_{10}H_{14}$, CH_3CN , $CH_3C_6H_5$.

X-Rays



Radiofarmaci

Radiofarmaci

Radiofarmacia

➤ *Farmacista in Medicina Nucleare*

- Deve fornire un adeguato supporto tecnico-scientifico nella scelta e acquisto di radiofarmaci, generatori e kit
- Deve essere responsabile della qualità per ciò che riguarda le preparazioni radiofarmaceutiche, attraverso la definizione e implementazione del sistema di **assicurazione della qualità** per le fasi di allestimento e **controlli di qualità** dei radiofarmaci
- Deve occuparsi della farmacovigilanza sui radiofarmaci (monitoraggio e segnalazione al Ministero della Salute delle reazioni avverse ai radiofarmaci e dei difetti di fabbricazione)

Radiofarmaci

Radiofarmacia

➤ Definizione dei radiofarmaci

I radiofarmaci sono stati riconosciuti come prodotti medicinali dal 1989 in Europa (Direttiva 89/343/EEC) e dal 1991 in Italia (D.L.vo 178/1991 e D.M. 13 dicembre 1991).

La Farmacopea Italiana (XII ed.) definisce prodotto radiofarmaceutico ogni prodotto medicinale che, quando è pronto per l'uso, contiene uno o più radionuclidi (isotopi radioattivi) incorporati a scopo medico.

In qualità di medicinali, anche i radiofarmaci devono rispondere ai requisiti di:

- sicurezza
- efficacia
- correttezza qualitativa

I radiofarmaci sono descritti in Farmacopea Italiana (ed Europea) in una monografia a essi dedicata dal titolo "Preparazioni Radiofarmaceutiche".

Radiofarmaci

Radiofarmacia

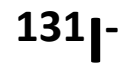
➤ Peculiarità dei radiofarmaci

- Le quantità somministrate sono dell'ordine dei *nanogrammi* o *picogrammi*, lontane dai milligrammi o grammi dei farmaci convenzionali
- *Non hanno attività farmacologica poiché nell'organismo raggiungono concentrazioni molto basse, a cui non sono attivi*
- La loro farmacocinetica è determinata dalle caratteristiche chimiche della molecola, le caratteristiche fisiche del radionuclide ne permettono la rilevazione
- Per i radiofarmaci è necessario distinguere tra:
 - T_{1/2} fisico (del radionuclide) Decadimento fisico
 - T_{1/2} biologico (del radiofarmaco) Farmacocinetica
- Molti radiofarmaci vengono sintetizzati in loco subito prima della somministrazione, è l'unico caso di sintesi chimica di farmaci sul luogo di somministrazione

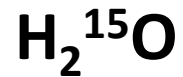
Radiofarmaci

➤ Tipologie di radiofarmaci

-Ioni e molecole monoatomiche



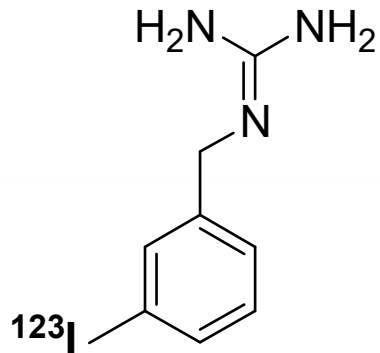
-Molecole semplici



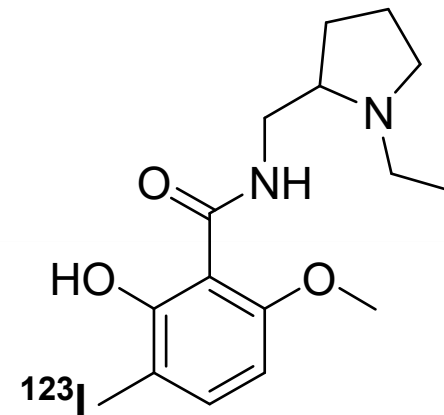
Radiofarmaci

➤ Tipologie di radiofarmaci

-Molecole con legami covalenti



MIBG (^{123}I -Metaiodobenzilguanidina)



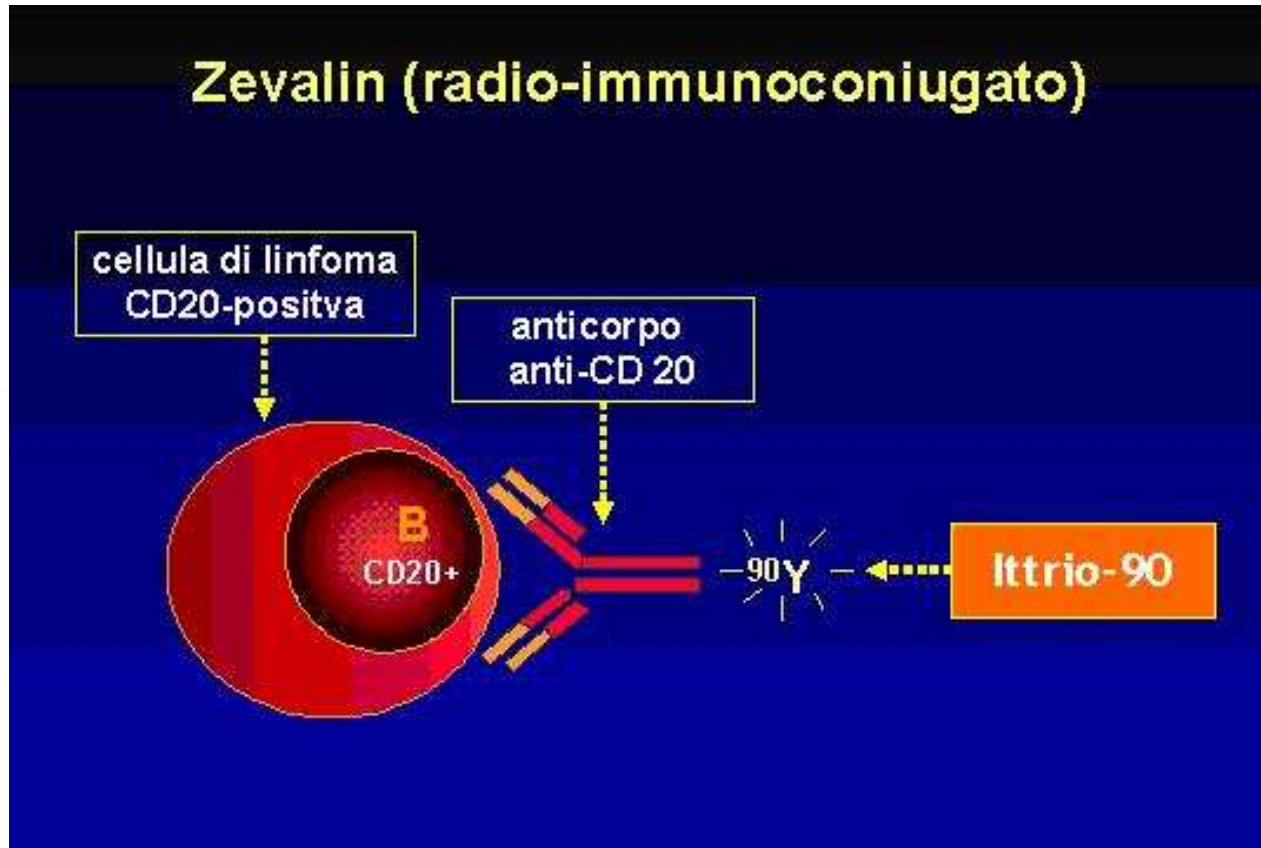
IBZM (^{123}I -Iolopride)

Per uso diagnostico pediatrico e per malattie neurodegenerative

Radiofarmaci

➤ Tipologie di radiofarmaci

-Radiofarmaci dove il radionuclide è legato ad un Anticorpo Monoclonale



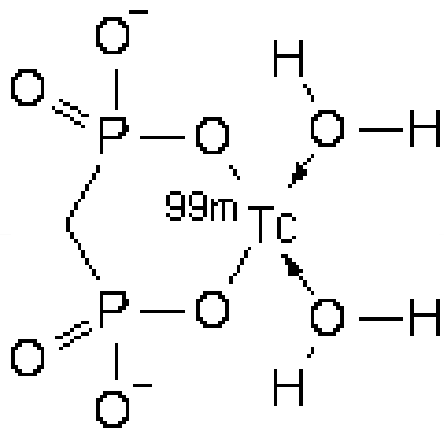
❖ Zevalin (Ibritumomab)

Zevalin radiomarcato con [^{90}Y] è indicato come terapia di consolidamento dopo l'induzione della remissione in pazienti con linfoma follicolare non pretrattati, o trattamento di pazienti adulti affetti da linfoma non-Hodgkin (NHL) follicolare a cellule B CD20+ ricaduti o refrattari a rituximab.

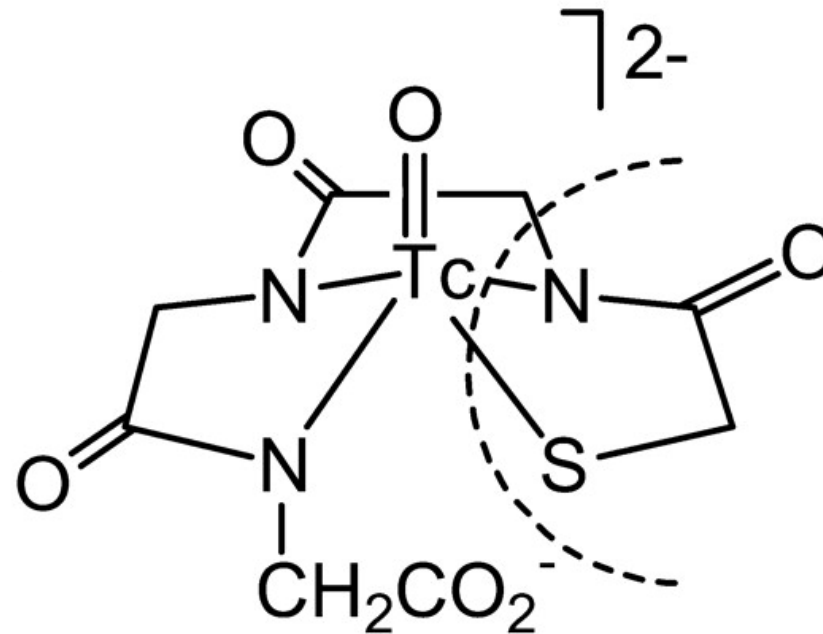
Radiofarmaci

➤ Tipologie di radiofarmaci

- *Complessi di coordinazione costruiti intorno al radionuclide*



^{99m}Tc -MDP



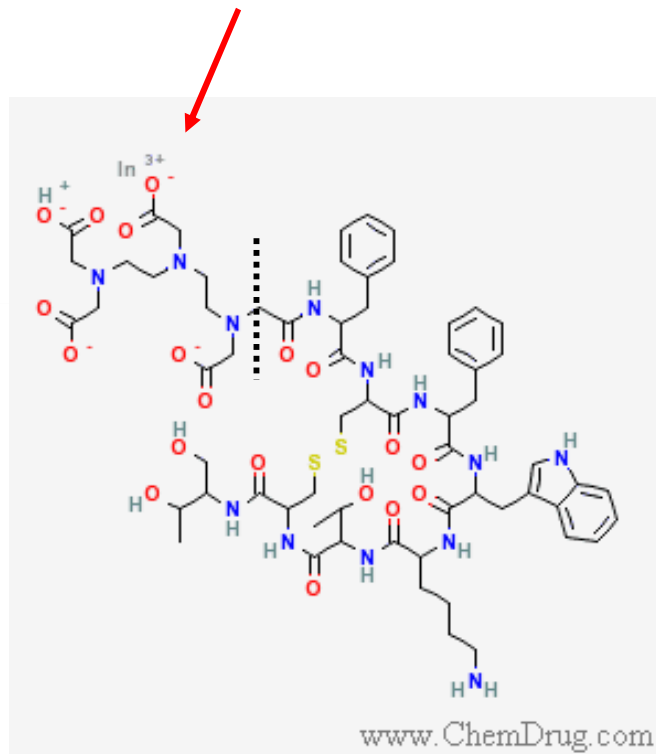
^{99m}Tc -MAG3

❖ La chimica di coordinazione è alla base della struttura chimica di molti radiofarmaci e consente di realizzare la loro sintesi *in loco* al momento della somministrazione.

Radiofarmaci

➤ Tipologie di radiofarmaci

- *Complessi di coordinazione in cui il radionuclide è legato mediante un agente chelante ad un peptide endogeno.*



Un esempio di peptide radiomarcato è l'**octreotide**, analogo della somatostatina, derivatizzato con un adatto agente chelante (*diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)*) che, a seconda delle caratteristiche di emissione del radionuclide con cui viene coniugato, può essere impiegato in diagnostica (^{111}In) o in terapia (^{90}Y).

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

In base al grado di manipolazione da svolgersi in Medicina Nucleare per la preparazione, i radiofarmaci si possono suddividere:

-Radiofarmaci pronti per l'uso: prodotti dall'industria e quindi garantiti in modo pressochè totale dal fabbricante

-Radiofarmaci preparati in loco per mezzo di kit (registrati): la loro preparazione richiede una sintesi chimica solitamente di facile esecuzione

-Radiofarmaci prodotti in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee: sono le preparazioni più critiche, in quanto la sintesi chimica , sia i controlli di qualità sono eseguiti dal personale del centro di Medicina Nucleare.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci pronti per l'uso

Controlli necessari (analoghi a quelli NON radioattivi):

- Documento di trasporto all'atto della ricezione
- Correttezza dell'etichetta
- Corrispondenza dell'attività dichiarata con quella misurata
- Esame visivo della preparazione

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco per mezzo di kit

Che cosa garantisce il **fabbricante** sui radiofarmaci da kit?

-PUREZZA CHIMICA

-STERILITA'

-APIROGENIA

-DIMENSIONI DELLE PARTICELLE

-PUREZZA RADIONUCLIDICA

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco per mezzo di kit

Che cosa DEVE controllare l'operatore che prepara un radiofarmaco da kit.

➤ Controllo visivo:

- del/dei flaconcini che compongono il kit prima della marcatura (assenza di corpi estranei)
- della preparazione finale (assenza di precipitati e variazioni di colore)

➤ Preparazione:

- la preparazione deve essere eseguita nel rispetto delle istruzioni del fabbricante (attività, volumi, temperatura, tempi)

➤ Controllo di purezza radiochimica:

- controllo effettuato secondo la metodica proposta dal fabbricante o, in assenza di queste, secondo quanto previsto in Farmacopea

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

La responsabilità del prodotto è TOTALMENTE del personale ospedaliero che prepara:

➤ I controlli devono essere eseguiti su tutte le preparazioni

➤ Si eseguono i controlli previsti dalle norme di *Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina* e nella relativa monografia di Farmacopea, ove presente.

Radiofarmaci

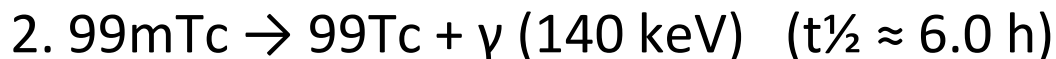
➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Esempio:

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

La maggior parte dei radiofarmaci **preparati da kit** viene marcata con tecnezio-99m, ottenuto dal *generatore molibdeno/tecnezio*.

Reazioni nucleari:



Oltre al controllo visivo della preparazione e delle modalità di allestimento, è fondamentale per i radiofarmaci da kit eseguire il controllo di purezza radiochimica. Questa prova è necessaria per valutare la resa di marcatura, cioè la quota di radionuclide presente nella forma chimica desiderata, e identificare e quantificare le eventuali impurezze radiochimiche presenti.

Radiofarmaci

➤ **Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati**

Per far ciò, le metodiche analitiche utilizzate sono:

- TLC (cromatografia su strato sottile)
- PC (cromatografia su carta)
- Cromatografia su colonna
- HPLC

➤ *Preparazione del campione ed eluizione*

- Porre nella camera cromatografica (provetta in vetro o polipropilene) un piccolo volume di fase mobile (4-5 ml) e chiuderla con un coperchio perché sia saturata dai vapori della fase mobile (per circa 10 min)
- Prelevare con siringa da insulina o da tuberculina il radiofarmaco e deporre una goccia (3-5 ml) sulla lastrina cromatografica sulla linea di deposizione tracciata a 1,5 cm circa dal fondo della lastrina
- Servendosi di pinze da laboratorio immergere la striscia verticalmente nella camera cromatografica, assicurandosi che:
 - la striscia non aderisca alle pareti della camera;
 - il livello della fase mobile non superi la linea di deposizione.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

➤ Rivelazione dei conteggi

- Sviluppare la cromatografia fino al raggiungimento, da parte della fase mobile, di un livello che disti 1 cm circa dall'estremità superiore della lastrina.
- Estrarre la lastrina e lasciarla asciugare all'aria.
- Acquisire i conteggi della striscia con uno scanner radiocromatografico o con gamma camera o con rivelatore autoradiografico oppure tagliare la lastrina in più parti in base agli Rf delle specie chimiche da separare e contare le varie porzioni in un pozzetto o con un beta counter (a seconda del radionuclide in esame).

Il fattore di ritenzione è definito come:

$$R_f = \frac{\text{Distanza percorsa dal composto dalla linea di deposizione}}{\text{Distanza percorsa dal solvente}}$$

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

➤ Rivelazione dei conteggi

-La purezza radiochimica (P.R.) è la percentuale di attività della preparazione dovuta al radionuclide considerato presente nella forma chimica desiderata, ed è definita come:

$$\text{P.R. (\%)} = \frac{\text{Attività del legato (cpm)}}{\text{Attività del legato (cpm)} + \text{Attività delle impurezze separate (cpm)}} \times 100$$

La purezza radiochimica minima accettabile affinché il radiofarmaco possa essere rilasciato per la somministrazione è definita dal produttore del radiofarmaco o dalla Farmacopea, o, in assenza di entrambi, dalla letteratura.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

I radiofarmaci tecneziati, a eccezione dello ione molecolare pertecnetato, sono complessi di coordinazione in cui l'atomo coordinato è il tecnezio, ottenuto dalla riduzione del pertecnetato a opera di un agente riducente (solitamente ioni Sn^{2+}) a numero di ossidazione V, IV, III e I a seconda delle condizioni di reazione.



Riduzione del pertecnetato

(reazioni da bilanciare)



Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

Nella miscela di reazione di un radiofarmaco tecneziato, il tecnezio può essere presente in più forme chimiche.

- **legato** (radiofarmaco: Tc(I) o Tc(III) o Tc(IV) o Tc(V))
- **pertechnetato** (Tc(VII) o TcO_4^- : è la forma chimica del Tc nell'eluato del generatore)
- **tecnezio ridotto idrolizzato**
(Tc(IV) come TcO_2 o Tc(OH)_4)

forme chimiche indesiderate

Le principali impurezze nelle preparazioni con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sono il pertechnetato libero ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) e il tecnezio ridotto idrolizzato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$). Queste due forme chimiche possono essere separate dal radiofarmaco mediante una delle **tecniche cromatografiche** già descritte.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

La purezza radiochimica può essere influenzata da diversi fattori:

Interferenze con le reazioni implicate nella sintesi del radiofarmaco.

Le sostanze che più frequentemente possono inficiare la resa di marcatura sono:

- a. ioni alluminio (Al^{3+}) presenti nell'eluato;
- b. ossigeno atmosferico: esso può ossidare lo Sn^{2+} a Sn^{4+} , sottraendo agente riducente alla reazione redox oppure può riossidare direttamente il tecnezio ridotto, pronto per la chelazione, a pertecnetato (TcO_4^- - Tc(VII));
- c. altri agenti ossidanti presenti nella formulazione del radiofarmaco;
- d. un elevato rapporto nell'eluato tra tecnezio-99 (allo stato fondamentale) e tecnezio-99m: il tecnezio-99 compete con la forma metastabile di tecnezio (**che è quella utile ai fini diagnostici**) nelle reazioni di marcatura, in quanto si tratta di specie chimiche identiche. Questo inconveniente può essere evitato eluendo la colonna del generatore frequentemente, cioè almeno ogni 24 ore, evitando in questo modo l'accumulo di tecnezio allo stato fondamentale.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

La purezza radiochimica può essere influenzata da diversi fattori:

Degrado chimico del radiofarmaco:

- a. da ossidazione, dovuta a ossigeno atmosferico e ad altri ossidanti (per evitare tali interferenze, bisogna operare con molta cura e con aghi molto fini);
- b. da radiolisi: per minimizzare la degradazione chimica indotta da questo processo, è necessario mantenere bassa la concentrazione degli eventuali prodotti di radiolisi dell'acqua nella preparazione del radiofarmaco finale, riducendo il tempo che intercorre tra preparazione e somministrazione del radiofarmaco..

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità su radiofarmaci tecneziati

Controlli microbiologici

Le preparazioni radiofarmaceutiche destinate alla somministrazione parenterale devono essere allestite in condizioni tali da escludere ogni contaminazione batterica e da garantirne l'apirogenia, pertanto devono essere analizzate per sterilità e apirogenia. Tali controlli sono eseguiti dal produttore sui radiofarmaci industriali, mentre le preparazioni da kit sono garantite per sterilità e apirogenia dal produttore, **se allestite con tecnica asettica**. È quindi necessaria solo la convalida, mediante *mediafill* (saggi di simulazione di tutte le fasi delle preparazioni che prevedono l'impiego di terreni di coltura per microrganismi e successiva incubazione per evidenziare eventuali contaminazioni), di ogni fase della preparazione asettica. Le preparazioni estemporanee, cioè eseguite a partire dalle materie prime, richiedono invece, oltre alla convalida del processo, l'esecuzione dei test di sterilità, effettuati come controlli di qualità della produzione, e di apirogenia, ove previsto.

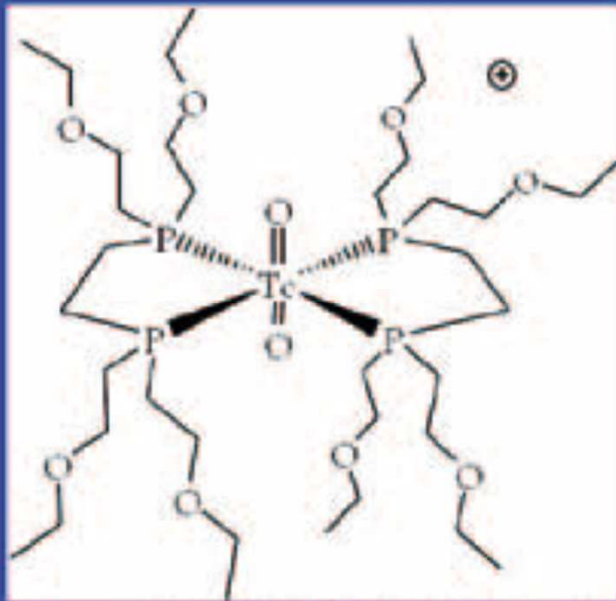
Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio della perfusione miocardica

I radiofarmaci per scintigrafia miocardica sono complessi monocationici del tecnezio (Tc^{5+}) che penetrano nel tessuto miocardico in modo proporzionale al flusso sanguigno e ivi sono trattieneuti.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin



*2 molecole di chelante (difosfine)
per un atomo di Tc*

PUREZZA RADIOCHIMICA:

Con una sola TLC su
lastrina di silica gel
(2x20 cm) si separano
sia $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ sia il
 $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ dal $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -legato

Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio della perfusione miocardica

Struttura chimica:

- Complesso di Tc(V) con 4 ligandi fosfinici (P)
- Formula: $[\text{TcO}_2(\text{tetrafosmin})_2]^+$
- Ogni ligando contiene catene laterali alchiliche ed etossi → molecola lipofila e neutra

Ruolo dei gruppi chimici:

- Fosforo (P): forma legami forti con Tc → complesso stabile nel sangue
- Catene laterali lipofile: permettono attraversamento di membrane cellulari e mitocondriali

Meccanismo di captazione:

- Distribuzione proporzionale al flusso ematico coronarico
- Diffusione passiva del complesso lipofilo attraverso la membrana miocardica
- Accumulo nei mitocondri per effetto del potenziale negativo → ritenzione intracellulare

Farmaco da kit con stabilità lunga (fino a 6h).

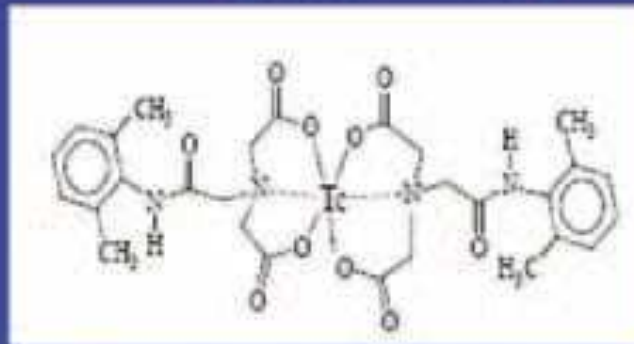
Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio della perfusione cerebrale

Questi complessi del tecnezio presentano la caratteristica comune di attraversare passivamente la barriera ematoencefalica e rimanervi, in seguito a modificazioni della loro struttura chimica

^{99m}Tc -HMPAO



Esametilpropilen amina ossima

STABILITA':

A causa della facile idrolisi dei gruppi esterei

→ HM-PAO ha una stabilità molto limitata nel tempo:

- 1 ora: senza aggiunta di stabilizzanti

- 4-6 ore: con aggiunta di agenti stabilizzanti

Radiofarmaci

Radiofarmaci per lo studio della perfusione cerebrale

Struttura chimica:

- Complesso neutro di Tc(VII) con ligando lipofilo **HMPAO** (hexamethylpropyleneamine oxime)
- Formula: $[\text{TcO}(\text{HMPAO})_2]$
- Esistono due forme isomeriche: una **lipofila** (attraversa la barriera emato-encefalica) e una **idrofila** (trattenuta nei tessuti)

Ruolo dei gruppi chimici:

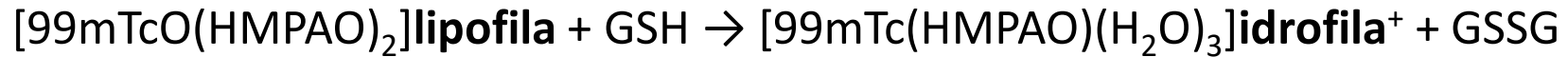
- Gruppi amminossimici ($-\text{N}-\text{OH}$): coordinano il Tc e consentono il passaggio reversibile tra forma lipofila e idrofila
- Catene alchiliche (metiliche): aumentano la lipofilia → attraversamento della barriera emato-encefalica (BBB)

Meccanismo di captazione:

- La forma lipofila attraversa rapidamente la BBB per diffusione passiva
- All'interno del cervello viene convertita in forma idrofila (riduzione intracellulare)
- La forma idrofila non può più uscire → intrappolamento nei neuroni proporzionale al flusso ematico locale.

Farmaco da kit e preparazione estemporanea (stabilità chimica breve, 30-45 min).

Radiofarmaci



GSH = Glutadione, è un piccolo tripeptide molto abbondante nelle cellule, composto da:

Glu–Cys–Gly → (acido glutammico, cisteina, glicina)

GSSG = Quando due molecole di **GSH** (forma ridotta) **donano elettroni** per ridurre un'altra specie (il Tc del complesso HMPAO), si **ossidano** formando un **ponte disolfuro (–S–S–)** tra le due cisteine:



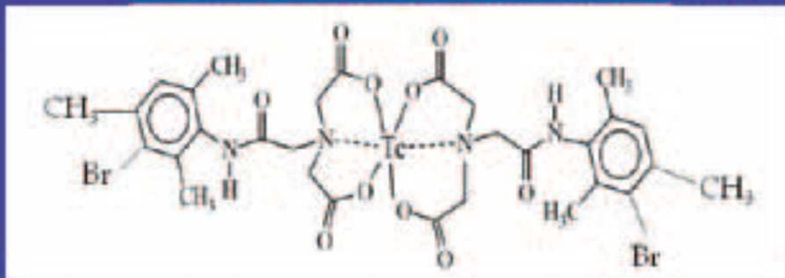
Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio della funzione epatobiliare

La scintigrafia epato-biliare si basa sulla somministrazione per via endovenosa di radiofarmaci a eliminazione prevalentemente epato-biliare. Con questo esame è possibile una valutazione della perfusione epatica, della concentrazione parenchimale di radiofarmaco, dell'eliminazione intra ed extraepatica, dell'inizio del transito intestinale e del suo ritmo, di eventuali aree di stasi biliare tardiva e dell'eventuale presenza di reflusso bilio-gastrico.

STUDIO DELLA FUNZIONE EPATOBILIARE:
 ^{99m}Tc -mebrofenina (trimetil-bromo-IDA)



PREPARAZIONE: un solo step

PUREZZA RADIOCHIMICA: doppia TLC

Radiofarmaci

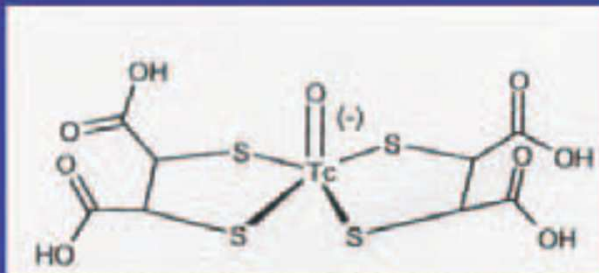
➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario

I radiofarmaci per scintigrafia renale si possono suddividere in agenti per scintigrafia statica (es. ^{99m}Tc -DMSA) e agenti per scintigrafia dinamica (es. ^{99m}Tc -MAG3).

STUDIO DELL'APPARATO URINARIO:

^{99m}Tc -DMSA (acido dimercaptosuccinico)



Due molecole di chelante per ogni atomo di tecnezio (III) chelato

PREPARAZIONE: un solo step

PUREZZA RADIOCHIMICA: doppia TLC

STUDIO DELL'APPARATO URINARIO:

^{99m}Tc -MAG3 (mercaptoacetiltriglicina)

PREPARAZIONE:

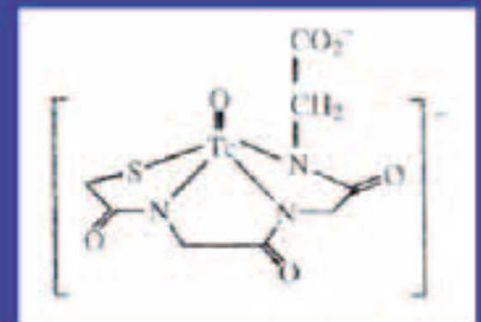
1. Aggiunta dell'eluato al kit → formazione di un **complesso debole** tra il Tc^{5+} e acido tartarico
2. Riscaldamento per 10 min di effettiva bollitura → formazione del complesso finale

STABILITÀ: breve

- 1h → preparazione concentrata
- 4h → preparazione diluita

PUREZZA RADIOCHIMICA: - TLC

- Separazione su colonnine (estrazione in fase solida)



Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario

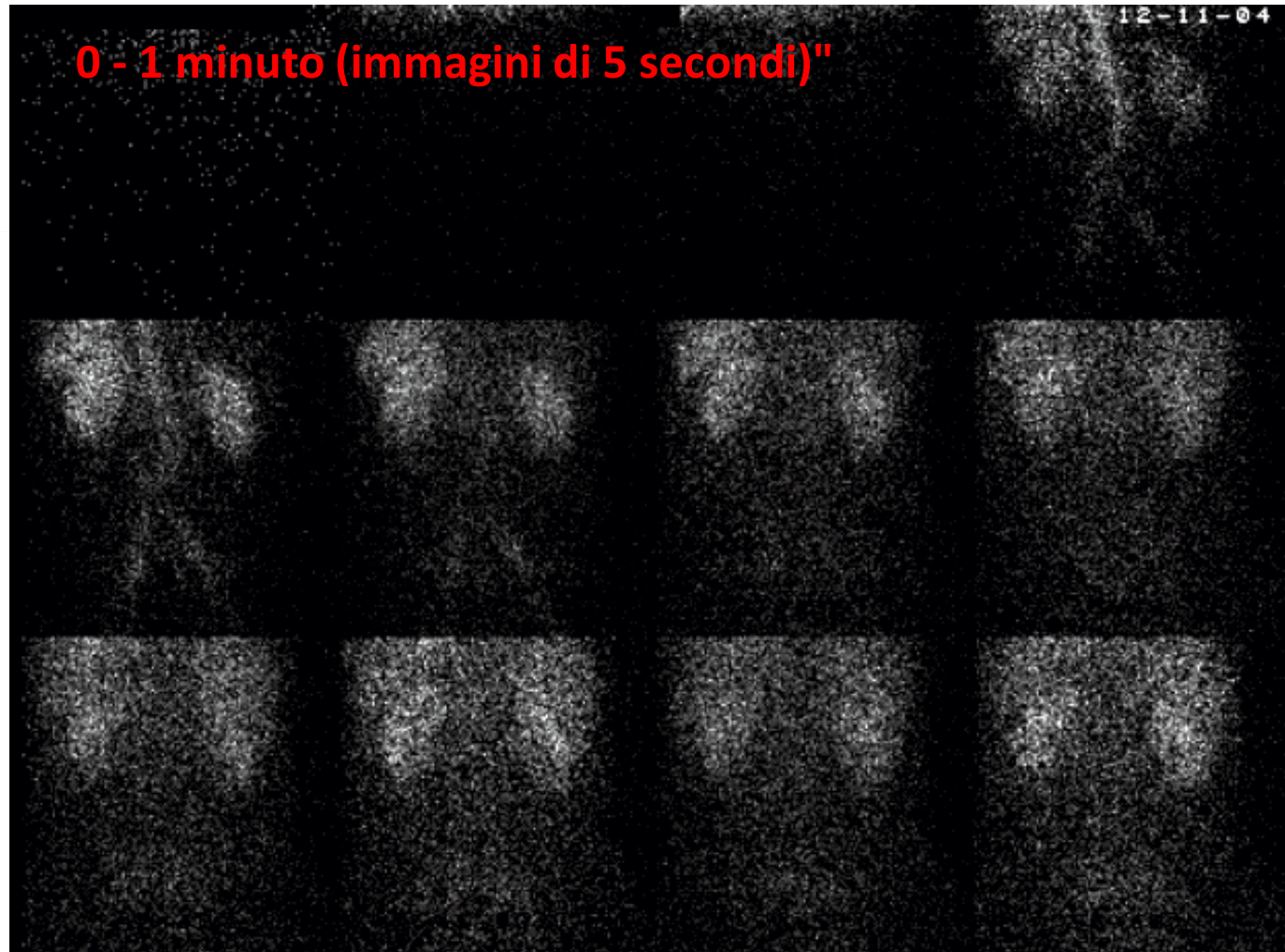
La **scintigrafia renale** è un esame che permette di verificare la funzionalità renale e si divide in **statica** o **dinamica**. La **scintigrafia renale statica** si esegue somministrando in vena una sostanza radioattiva (radiofarmaco), che si lega alle cellule della parte corticale del rene, consentendone la visualizzazione. Dopo almeno un paio d'ore dall'iniezione del tracciante, il paziente viene fatto stendere su un lettino, con la gamma camera posizionata sulla regione lombare. In presenza di una *alterazione del tessuto renale le cellule perdono la capacità di captare la sostanza*, per cui le aree sofferenti si identificano come zone in cui la concentrazione della radioattività, rilevata dall'apparecchio, è inferiore o assente. La scintigrafia statica permette di ottenere quindi un'immagine del tessuto funzionante nei due reni. Quella **dinamica**, o **sequenziale**, sfrutta invece *la caratteristica di alcuni radiofarmaci di venire captati ed eliminati dai reni in modo proporzionale alla funzionalità renale*. Permette quindi di valutare la funzionalità renale e il deflusso urinario lungo le vie urinarie.

Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Scintigrafia renale dinamica

FASE DI PERFUSIONE



Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

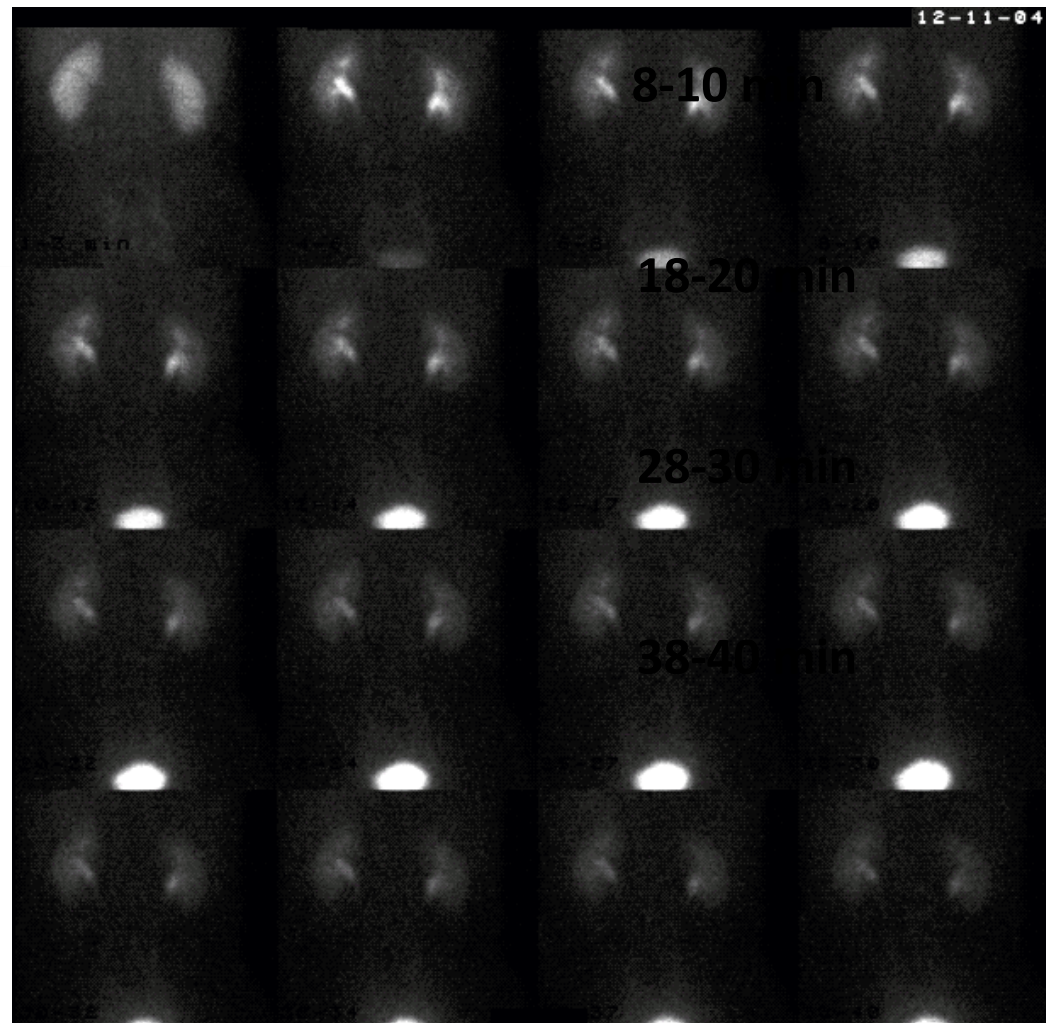
Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario FASE DI ESCREZIONE

1-3 min

10-12 min

20-22 min

30-32 min



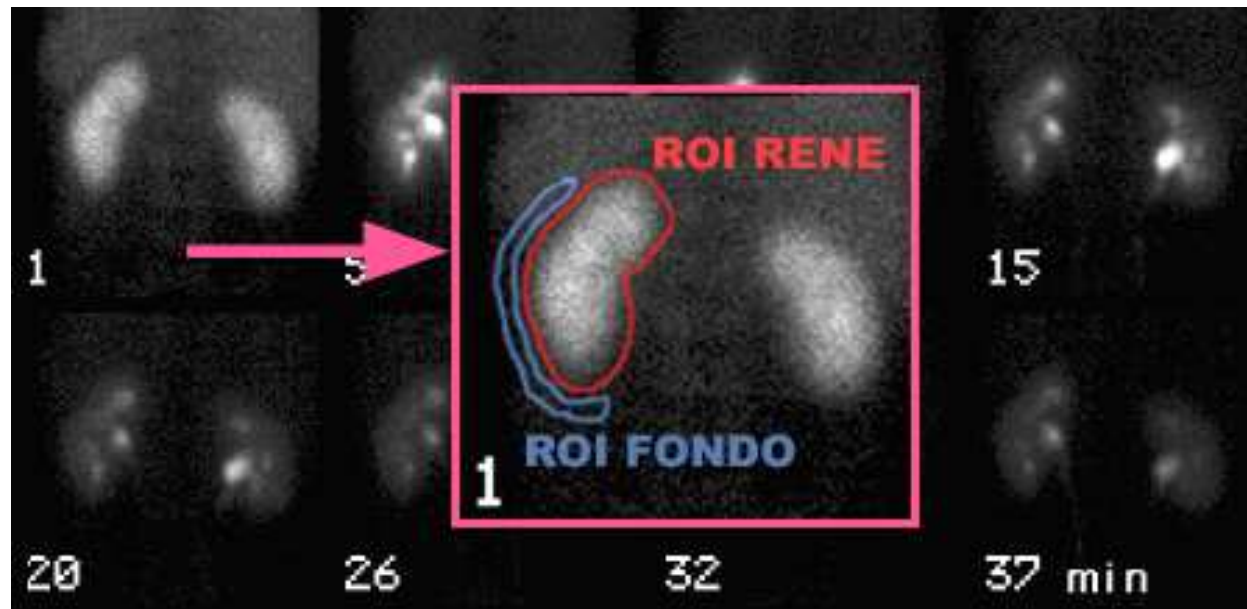
Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario

ROI - REGIONS OF INTEREST

- Vengono disegnate ROI su reni e fondo (eventualmente su aorta, calici, bacinetti, ureteri, vescica, ecc)
- Il computer misura la variazioni dell'attività all'interno delle aree selezionate e disegna le CURVE ATTIVITÀ - TEMPO o "curve renografiche"



Radiofarmaci

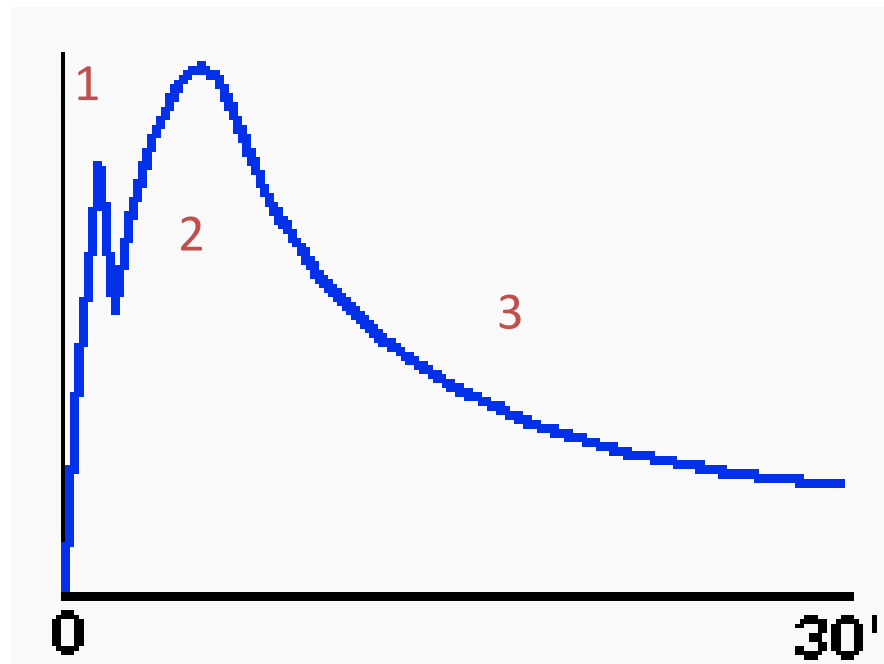
➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario

LE CURVE RENOGRAFICHE

Mostrano:

1. Picco vascolare: è un picco stretto e aguzzo dovuto al primo passaggio del bolo radioattivo
2. Secondo picco più largo: estrazione della radioattività da parte del rene -> espressione di FUNZIONALITÀ
3. Una discesa: rispecchia il deflusso dell'urina



Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Radiofarmaci per lo studio dell'apparato urinario

CHE INFORMAZIONI FORNISCE ?

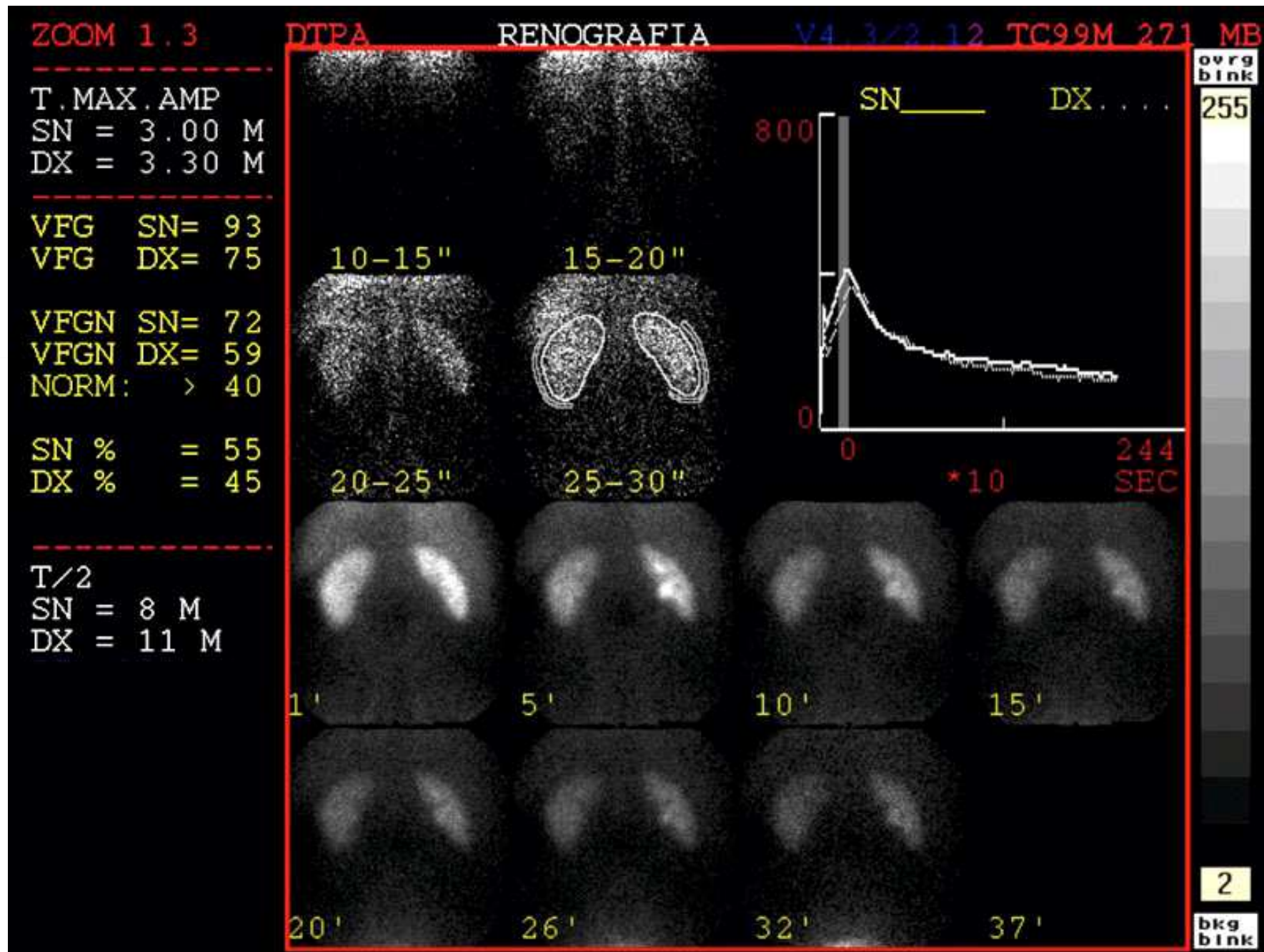
- Valutazione della perfusione renale
- Morfologia (a bassa risoluzione) e funzionalità del parenchima renale
- Formazione ed escrezione dell'urina

Inoltre, analizzando le **CURVE Attività-Tempo**:

- Funzionalità renale totale e separata espressa come:
 - VFG velocità di filtrazione glomerulare (DTPA)
 - FPRE flusso plasmatico renale efficace (MAG3)

Radiofarmaci

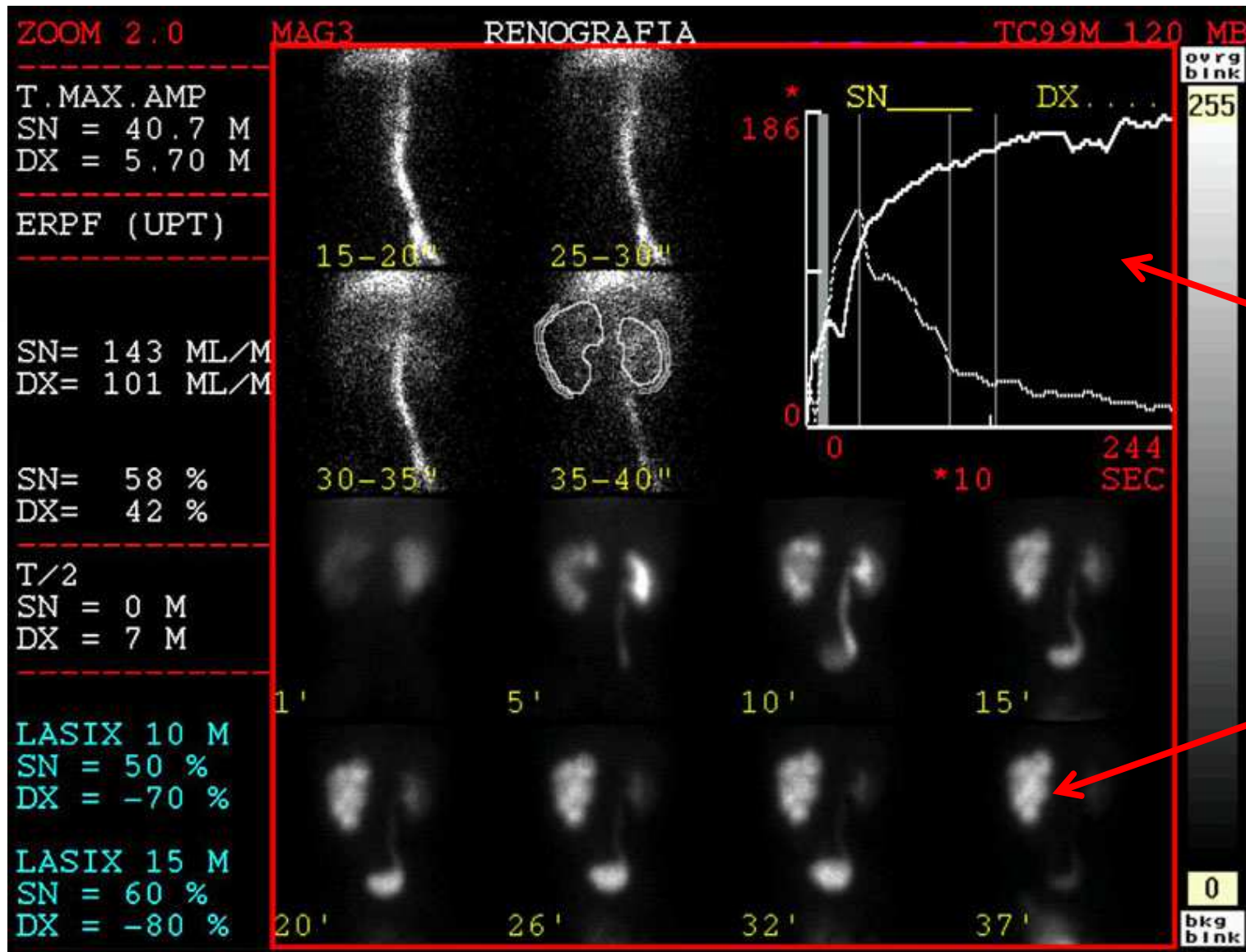
➤ Radiofarmaci tecneziati



Radiofarmaci

➤ Radiofarmaci tecneziati

Ostruzione renale (NEFRO-UROPATIA OSTRUTTIVA)



Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

La responsabilità del prodotto è TOTALMENTE del personale ospedaliero che prepara:

➤ I controlli devono essere eseguiti su tutte le preparazioni

➤ Si eseguono i controlli previsti dalle *Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina* e nella relativa monografia di Farmacopea, ove presente.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

➤ Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina

➤ Sono parte dell'Assicurazione della Qualità (AQ) che garantisce che i preparati:

1. siano sempre di qualità elevata e costante (omogeneità tra e nei lotti);
2. siano controllati per la loro rispondenza agli standard di qualità, appropriati per:
 - l'uso al quale sono destinati,
 - la conformità a quanto riportato in monografie associate o, in assenza di queste, alle specifiche del prodotto definite dal produttore.

Radiofarmaci

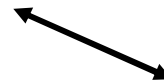
➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

➤ Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina

Queste norme di buona preparazione definiscono i percorsi di assicurazione della qualità delle preparazioni radiofarmaceutiche allestite in loco.

Protezione del paziente da ogni esposizione indebita al rischio biologico



Assicurazione della max efficacia diagnostica e terapeutica possibile del radiofarmaco

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

➤ Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina

Le norme sono strutturate seguendo la distinzione tra preparazioni da kit e generatore di $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ da una parte e preparazioni estemporanee (eseguite a partire dalle materie prime) dall'altra; sono chiaramente più cogenti per le preparazioni estemporanee, rispetto ai requisiti strutturali, operativi e di documentazione richiesti per le preparazioni da kit.

Le norme prevedono che ogni servizio di medicina nucleare si doti di un organigramma nominativo e uno funzionale con un responsabile generale, nella figura del medico nucleare responsabile del servizio, cui afferiscono tre figure tra loro indipendenti:

1. un responsabile per l'assicurazione della qualità;
2. un responsabile per le operazioni di preparazione;
3. un responsabile per i controlli di qualità.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

➤ Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina

Deve trattarsi di personale specializzato, in possesso di tutte le conoscenze necessarie per poter operare in condizioni controllate con sorgenti radioattive non sigillate.

Non sono però definite esattamente le figure professionali che possono accedere alle mansioni sopra descritte.

La figura istituzionalmente responsabile della preparazione e controllo dei medicinali è il farmacista, il quale, dopo aver ricevuto una formazione specifica adeguata, può sicuramente far fronte alle nuove esigenze della Medicina Nucleare per quanto riguarda allestimento e controllo di qualità dei radiofarmaci.

Inoltre, è necessario disporre di un adeguato sistema di documentazione relativo a tutte le preparazioni radiofarmaceutiche effettuate, strutturato sulla falsariga del sistema di documentazione richiesto per le preparazioni galeniche tradizionali dalle Norme di Buona Preparazione dei Medicinali in Farmacia.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

-Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee

➤ Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina

Anche in questo ambito, indipendentemente dal coinvolgimento diretto del farmacista nelle operazioni di allestimento in “camera calda” (il laboratorio di preparazione dei radiofarmaci della medicina nucleare), la figura del farmacista può portare il suo contributo, alla luce della sua esperienza nella gestione della documentazione delle preparazioni galeniche tradizionali.

Inoltre, nelle NBP dei radiofarmaci vengono definite le caratteristiche del laboratorio e delle attrezzature necessarie per la manipolazione dei radiofarmaci in sicurezza rispetto alla radioprotezione dell’operatore e alla qualità microbiologica delle preparazioni (quasi sempre iniettabili). I requisiti dei locali sono definiti facendo riferimento alla Norme di Buona Preparazione dei Medicinali in Farmacia (che, a loro volta, rimandano alle Good Manufacturing Practices) e dipendono dal grado di esposizione dei prodotti all’aria, che varia con la complessità delle preparazioni eseguite.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

➤ *Norme di Buona preparazione dei radiofarmaci per Medicina*

Anche per quanto riguarda i controlli di qualità, la loro frequenza e tipologia viene stabilita in base al grado di criticità delle preparazioni. Si tratta sia di controlli di processo, sia di controlli sul prodotto finito. La situazione più semplice è chiaramente quella delle preparazioni da kit, mentre controlli più stringenti sono richiesti per le preparazioni estemporanee.

Si possono così riassumere le azioni che vanno intraprese:

1. definire un organigramma nominativo e uno funzionale allo scopo di identificare i responsabili dei vari aspetti del sistema della qualità;
2. stilare procedure per il controllo e la manutenzione periodica delle apparecchiature e dei locali adibiti alla manipolazione dei radiofarmaci;
3. definire i requisiti dei locali necessari in base alla tipologia e al grado di complessità delle preparazioni allestite;
4. creare un sistema di documentazione per la tracciabilità completa delle preparazioni, dalle materie prime al radiofarmaco finito e dei relativi controlli di qualità richiesti.

Radiofarmaci

➤ Per fare chiarezza:

Radiofarmaci preparati in loco a partire dalle materie prime come preparazioni estemporanee si intendono quei radiofarmaci che **non arrivano già pronti all'uso**, ma che devono essere **preparati e controllati direttamente nel laboratorio di medicina nucleare**, a partire da materie prime radioattive (come un eluato da generatore o una soluzione radionuclidica). Ad esempio: **^{99m}Tc -HMPAO, ^{99m}Tc -DTPA**.

L' **^{18}F -FDG** (radiofarmaco per **PET**) è prodotto con **ciclotrone**, non con generatore. E non fa parte della categoria appena citata.

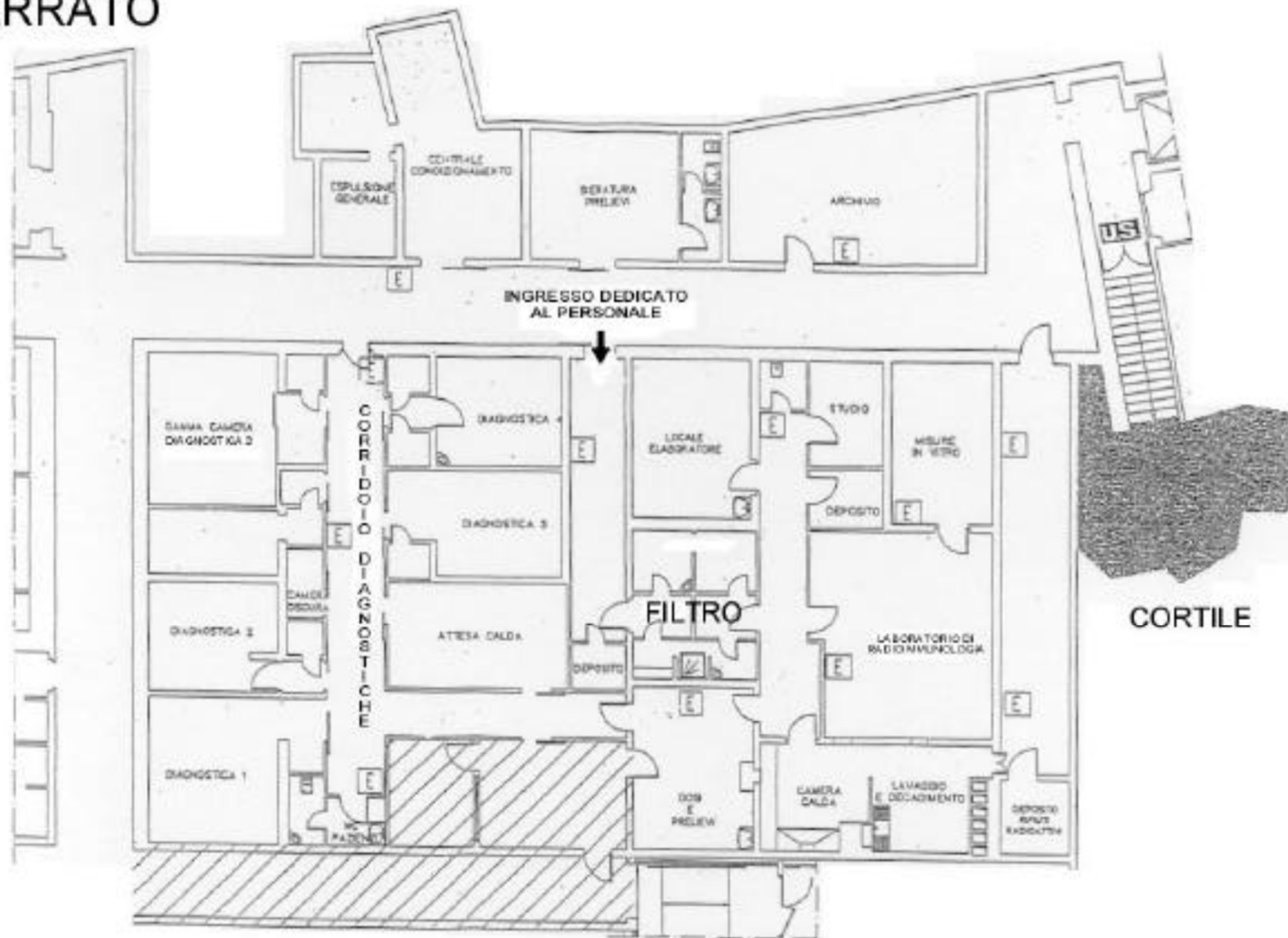
La sintesi richiede **attrezzature di radiochimica avanzata (sintetizzatori automatici)** e personale specializzato. Per motivi di complessità e radioprotezione, **non viene** preparato direttamente nel laboratorio clinico.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

Il laboratorio di preparazione dei radiofarmaci della medicina nucleare

MEDICINA NUCLEARE
PIANO INTERRATO



Radiofarmaci

Lo studio della **disposizione dei locali** è fondamentale al fine di confinare opportunamente i luoghi di lavoro all'interno dei quali sono manipolate sostanze radioattive e prevenire la dispersione indebita delle contaminazioni e il rischio di contaminazione interna.

In un servizio di MN devono essere gestiti diversi flussi di materiale radioattivo sia in ingresso che in uscita dal reparto.

In ingresso:

- radiofarmaci provenienti dall'esterno del reparto, generalmente trasportati mediante carrelli all'interno di idonei contenitori schermati, eventualmente consegnati attraverso un passapreparati o un montacarichi;
- rifiuti provenienti da altri reparti di solito trasportati in contenitori per rifiuti ospedalieri, smaltibili solo dopo opportuni decadimenti.

In uscita:

- trasporto di radiofarmaci per l'uso in altri reparti o in altre strutture;
- trasporto di rifiuti radioattivi per lo smaltimento.

Radiofarmaci

La **zona fredda**, non suscettibile di contaminazione, è rappresentata dall'insieme delle aree, presenti all'esterno del reparto, nelle quali è svolto il lavoro amministrativo e sostano i pazienti in attesa di essere chiamati per la somministrazione del radiofarmaco, detti **pazienti freddi**.

In tale zona sono generalmente previsti almeno:

- uffici amministrativi, per l'avvio dei pazienti al percorso diagnostico/terapeutico (accettazione), per il successivo congedo al termine del percorso medesimo (consegna referti) e per ulteriori eventuali necessità;
- attesa fredda;
- studio medico, per l'effettuazione della visita pre-esame.

Radiofarmaci

La **zona calda** comprende i locali nei quali è presente il rischio di contaminazione, ovvero quelle aree all'interno delle quali sono svolte attività comportanti l'impiego di sostanze radioattive:

- locale per la **preparazione e conservazione** dei radiofarmaci da somministrare;
- locale per il **controllo di qualità** dei radiofarmaci;
- locale per la **somministrazione** del radiofarmaco al paziente;
- almeno una **sala d'attesa calda**, dove sostano i pazienti a cui è stato somministrato il radiofarmaco;
- una sala d'attesa calda per pazienti barellati o, nel caso, un'area delimitata da barriere fisse o mobili all'interno della sala d'attesa calda per pazienti deambulanti;
- **sale diagnostiche**, che richiedono un locale/area comandi;
- **servizi igienici caldi** appositamente adibiti per i pazienti trattati con radiofarmaci, di cui almeno uno dotato di sanitari dedicati per pazienti disabili;
- **deposito** temporaneo per lo stoccaggio dei rifiuti radioattivi solidi e liquidi;
- area deposito delle attrezzature per la **pulizia** o di altri utensili che non devono essere impiegati al di fuori della zona calda.

Radiofarmaci

La **zona filtro** deve essere prevista prima dell'accesso alle zone a rischio di contaminazione. Tale zona deve essere dotata di **monitor per radiazioni**, lavello e doccia per una immediata decontaminazione in uscita dalle aree con rischio di contaminazione radioattiva. Sia i lavabi che la doccia devono essere dotati di azionamento a pedale/gomito/fotocellula. Il lavabo deve essere situato nelle immediate vicinanze dell'area di lavoro e auspicabilmente dotato di lavaggio oculare di emergenza.

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

Fattori di rischio per un reparto di Medicina Nucleare

Tabella 1 Fattori di peso in funzione del tipo di radionuclidi		
Classe	Radionuclide	Fattore f_1
A	^{75}Se , ^{89}Sr , ^{125}I , ^{131}I	100
B	^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{51}Cr , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{201}Tl	1
C	^3H , ^{14}C , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{127}Xe , ^{133}Xe	0,01

$$\text{Attività pesata} = A_{\text{max}} * f_1 * f_2$$

A_{Max} è attività che può essere istantaneamente presente in un area di lavoro;

F₁ (determinato dal tipo di nuclidi utilizzati) Tabella 1

F₂ (determinato dal tipo di utilizzo che se ne vuole fare) Tabella 2

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

Fattori di rischio per un reparto di Medicina Nucleare

Tabella 2 Fattori di peso in funzione del tipo di operazione	
Tipo di area di lavoro od operazione	Fattore f ₂
Deposito	0,01
Manipolazione rifiuti. Sale di diagnostica in cui non viene effettuata alcuna somministrazione del tracciante. Sale di attesa. Reparti di degenza.	0,1
Dispensario. Somministrazione. Sale di diagnostica in cui viene effettuata la somministrazione del tracciante. Reparti di degenza (pazienti sottoposti a trattamenti terapeutici). Preparazioni radionuclidiche semplici.	1
Preparazioni radionuclidiche complesse.	10

$$\text{Attività pesata} = A_{\text{max}} * f_1 * f_2$$

A_{Max} è attività che può essere presente istantaneamente presente in un area di lavoro;

F₁ (determinato dal tipo di nuclidi utilizzati) Tabella 1

F₂ (determinato dal tipo di utilizzo che se ne vuole fare) Tabella 2

Radiofarmaci

➤ Controlli di qualità dei Radiofarmaci

Fattori di rischio per un reparto di Medicina Nucleare

Tabella 3		Classificazione del rischio	
Categoria di rischio	Basso	Medio	Alto
Attività pesata	< 50 MBq	50 MBq - 50 GBq	> 50 GBq

Tabella 4		Adempimenti tecnici in funzione del rischio					
Categoria di rischio	Pavimento	Superficie	Cappa	Ventilazione locali	Strutture idrauliche	Pronto soccorso	Barriere
Basso	Decontaminabile	Decontaminabile	No	Normale	Standard	Strutture di lavaggio	Assenti
Medio	Impermeabile, facilmente decontaminabile, senza soluzioni di continuità	Decontaminabile	Si	Buona	Standard	Strutture di lavaggio e di decontaminazione	Assenti
Alto	Foglio unico continuo saldato ai muri	Decontaminabile	Si	Ottima, possibile ventilazione forzata	Possibili strutture idrauliche speciali	Strutture di lavaggio e di decontaminazione	Possibile presenza

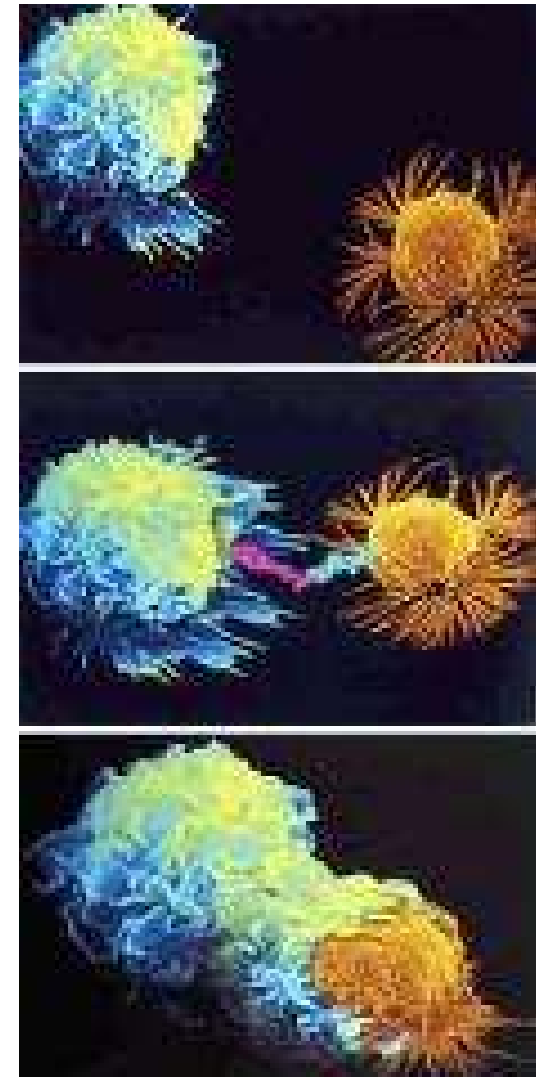
Anticorpi Monoclonali

Anticorpi monoclonali

❖ **Sistema immunitario**, il compito principale del sistema immunitario è di proteggerci dalle sostanze dannose sia endogene (prodotte all'interno dell'organismo) come il cancro (**Immunoterapia**), sia esogene (di provenienza esterna) come batteri e virus.

➤ Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è quindi la capacità di distinguere tra le strutture endogene o esogene che non costituiscono un pericolo e che dunque possono o devono essere preservate (*self*) e le strutture endogene o esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo e che devono quindi essere eliminate (*non-self*).

➤ La discriminazione tra le due “strutture” avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari (recettori Toll-like, recettori dei linfociti T, complessi MHC, **anticorpi**), che consentono la presentazione ed il riconoscimento di componenti dell'agente lesivo definite **antigeni** (*letteralmente induttori di anticorpi*).



Anticorpi monoclonali

❖ **Sistema immunitario**, a seconda delle modalità di riconoscimento degli antigeni si possono distinguere due aree del sistema immunitario:

❖ **immunità aspecifica**: comprende mediatori chimici (responsabili dell'**infiammazione**) e cellulari responsabili di una *prima linea di difesa contro le aggressioni*. E' evolutivamente più antica e consente il riconoscimento di un repertorio limitato di antigeni. Riconosce una generica condizione di pericolo e pone il sistema immunitario in una condizione di "allarme", che favorisce lo sviluppo dell'immunità specifica

❖ **immunità specifica**: comprende mediatori chimici e cellulari responsabili di una *risposta difensiva più potente e mirata* (**virtualmente in grado di riconoscere qualunque forma di antigene**), ma più lenta. E' evolutivamente più recente e poggia sulla risposta quasi totale per numerose funzioni di presentazione e distruzione degli antigeni.

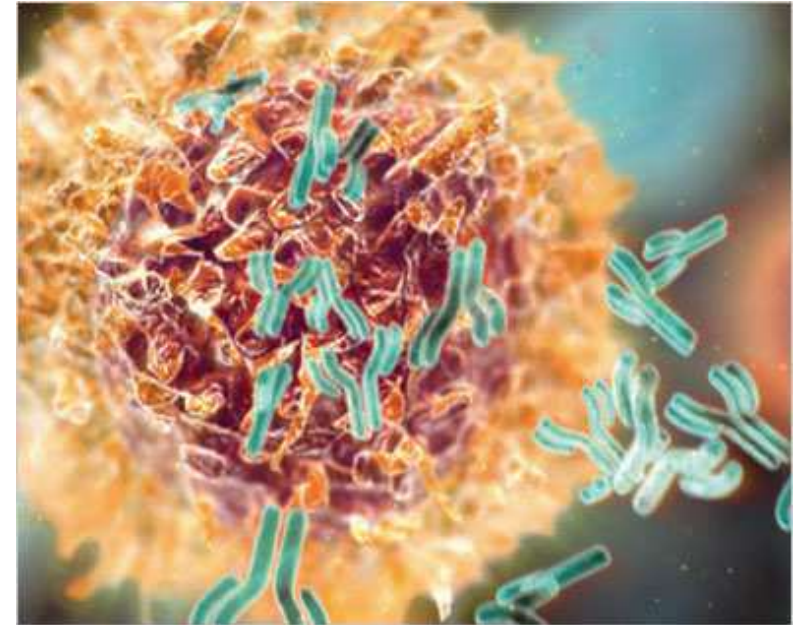


Anticorpi monoclonali

Immunità specifica

L'immunità specifica è costituita prevalentemente da cellule della linea **linfoide** (*della serie T e B*) e da cellule accessorie.

La funzione effettrice dei linfociti T è quella di coordinare il complesso della risposta immune attivandosi e sostenendo il processo infiammatorio. Tale attività è svolta attraverso interazioni cellula-cellula o mediante rilascio di particolari fattori solubili detti *citochine*. La funzione effettrice dei linfociti T è quella di lisare le cellule infette grazie alla produzione delle *linfocine*. I linfociti B attivati si specializzano invece in cellule secernenti **anticorpi** (*plasmacellule*).



problema

Anticorpi monoclonali

Problema

L'immunità specifica è stata selezionata dall'evoluzione per la sua capacità di ***adattarsi dinamicamente alla variabilità*** di agenti ambientali riconosciuti come un pericolo per l'organismo. Tale variabilità è ovviamente una caratteristica peculiare di molti microrganismi infettivi *in continua co-evoluzione* con il sistema immunitario che cerca di distruggerli. L'immunità specifica deve dunque essere in grado *di rispondere a tutte le possibili combinazioni molecolari* presenti in natura e in grado di interagire con l'organismo.

Poiché si stima che il numero di queste combinazioni si aggiri intorno a 10^{10} , l'immunità adattativa deve dotarsi di un numero altrettanto vasto di strutture cellulari capaci di legare specificatamente ad ogni singolo antigene. Dato che però il genoma umano comprende complessivamente solo 30.000 geni è impossibile che ciascuna struttura di presentazione e riconoscimento antigenico sia codificata da un singolo gene.

Particolare struttura e proprietà degli anticorpi

Anticorpi monoclonali

- Gli anticorpi infatti, sono dei complessi proteici costituiti dalla *combinazione di più strutture modulari* codificate da molteplici (ma comunque numericamente limitate) varianti di geni dello stesso tipo. Ogni cellula del sistema immunitario specifico nel corso della sua maturazione opera un *riarrangiamento casuale* del repertorio genetico ereditato dal soggetto in linea germinale generando una combinazione unica di MHC, linfociti T e anticorpi.
- Un ulteriore raffinato meccanismo di generazione della diversità del patrimonio anticorpale è dato dall'inserimento di piccole *mutazioni puntiformi* all'interno dei geni che codificano per i moduli delle strutture di riconoscimento antigenico.
- In altri termini ciascun individuo sviluppa autonomamente dal momento della nascita un sistema immunitario basato sui determinanti genetici ereditati in linea germinale, ma dotato di ***caratteristiche uniche e irripetibili dovute alla casualità degli eventi di ricombinazione e alla pressione selettiva dell'ambiente esterno.***

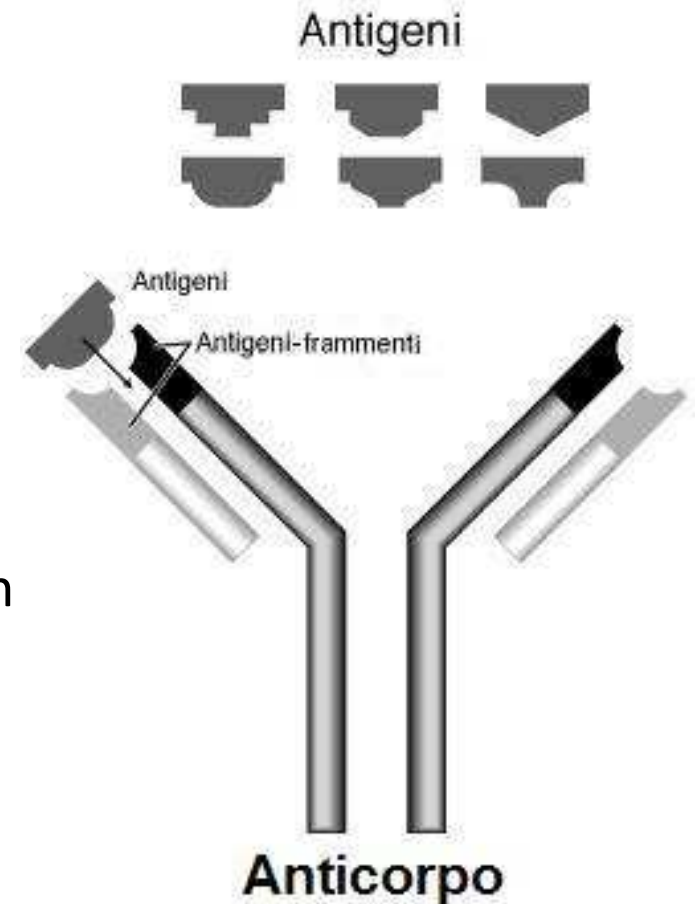
Anticorpi monoclonali

Anticorpi (o immunoglobuline)

Un **anticorpo** è una proteina con una peculiare *struttura quaternaria* (è l'organizzazione spaziale di più molecole proteiche in complessi multi-subunità) che le conferisce una forma a "Y". Gli anticorpi hanno due funzioni:

Nell'ambito del sistema immunitario di neutralizzare corpi estranei come virus e batteri, riconoscendo ogni antigene legato al corpo come un bersaglio. In maniera schematica e semplificata si può dire che ciò avviene perché al termine dei bracci della "Y" vi è una struttura in grado di "chiudere" i segmenti del corpo da riconoscere. Ogni chiusura ha una chiave diversa, costituita dal proprio antigene; quando la "chiave" (l'antigene) è inserita, l'anticorpo si attiva.

Vengono prodotte dai linfociti B degli organismi a sangue caldo.



Anticorpi monoclonali

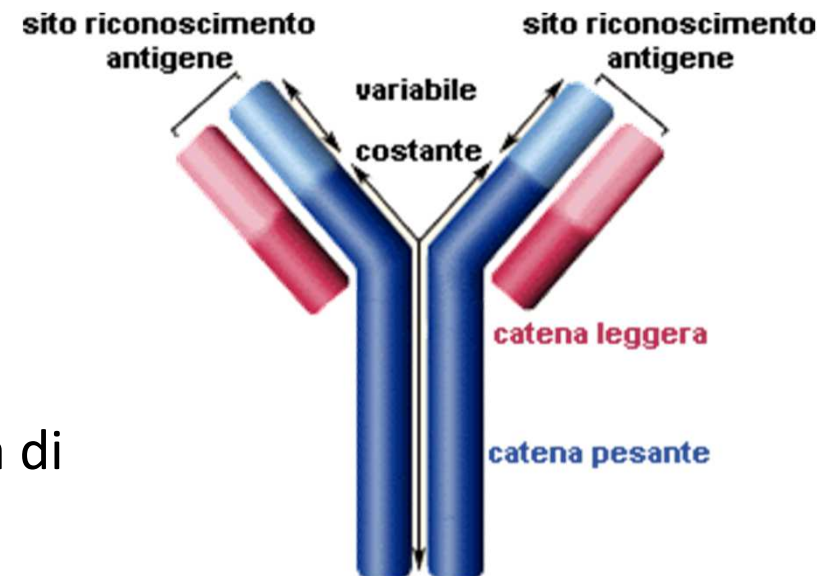
Anticorpi (o immunoglobuline)

La combinazione di più moduli (*sub-unità*) garantisce la possibilità di generare un elevato numero di strutture diverse, capaci di coprire l'intero spettro antigenico virtualmente incontrabile dal sistema immunitario in natura.

- ❖ Dal punto di *vista funzionale* sono distinguibili due componenti fondamentali:
 - una *regione costante* (C), che media l'interazione dell'anticorpo con cellule effettrici, elementi di complemento
 - una *regione variabile* (V), che contiene il *sito di combinazione* con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene

❖ Tali componenti sono poi organizzate a livello strutturale in un complesso proteico di tipo *tetrameric*. Le immunoglobuline sono infatti costituite da *quattro catene glicoproteiche*:

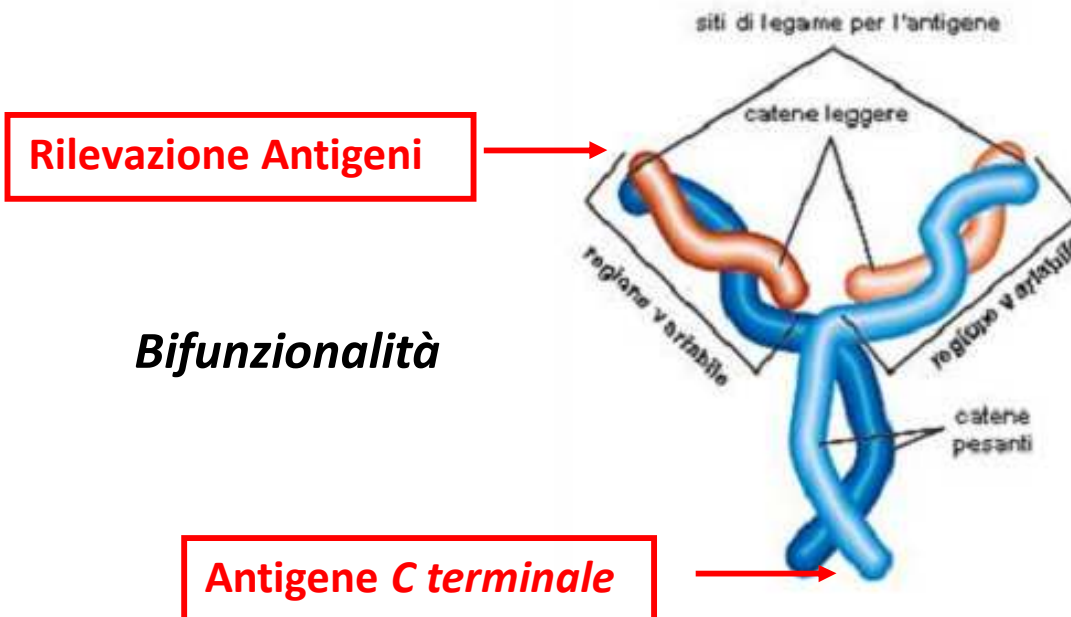
- due catene pesanti **H** uguali fra di loro
- due catene leggere **L** anch'esse uguali fra di loro



Anticorpi monoclonali

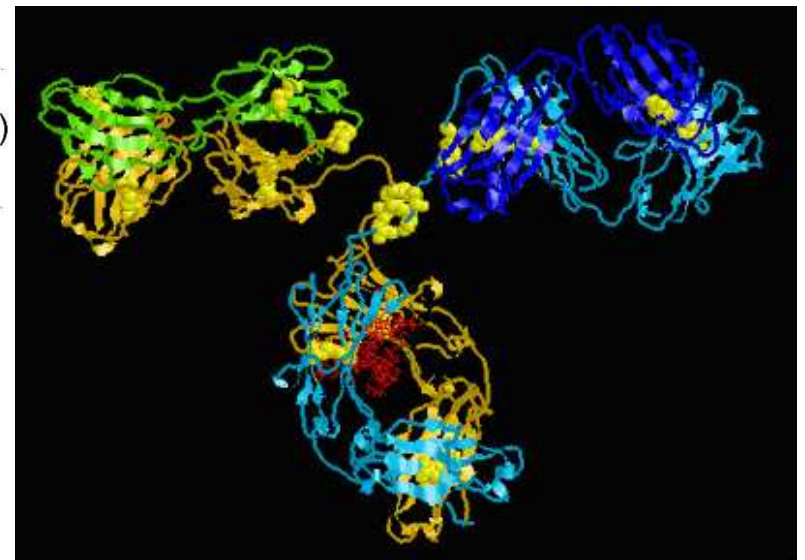
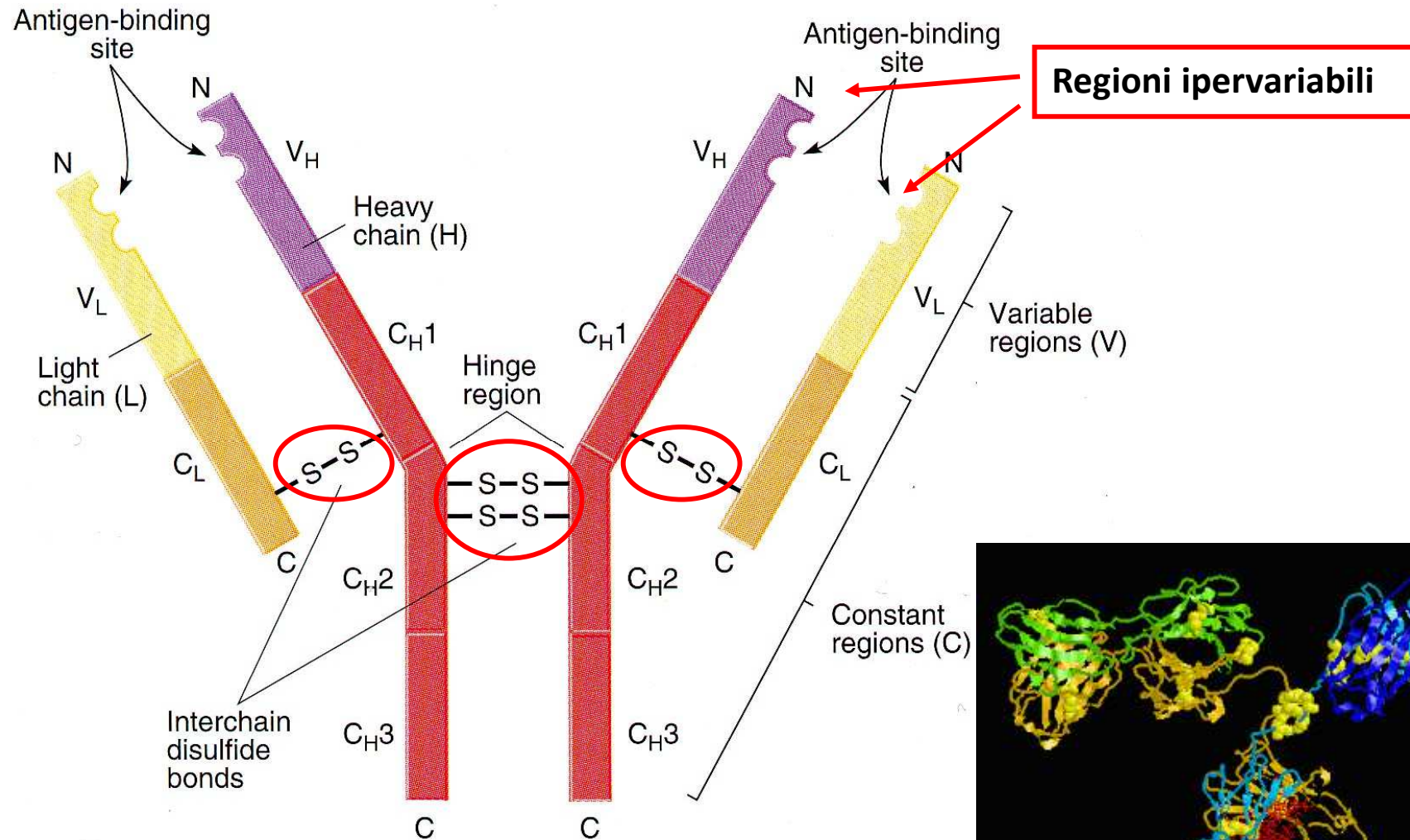
Anticorpi (o immunoglobuline)

- ❖ Ogni catena è poi costituita da un *dominio variabile* posto all'estremità amminoterminale e da uno o più *domini costanti* all'estremità carbossiterminale. Infine all'interno di ciascun dominio variabile, a livello del sito di legame con l'antigene, sono presenti segmenti caratterizzati da una **estrema variabilità** di sequenza e struttura.
- ❖ Tali segmenti, responsabili della specificità di legame con l'antigene, vengono definiti **regioni ipervariabili** e sono intervallati dalle cosiddette regioni cornice (*framework regions*).



Anticorpi monoclonali

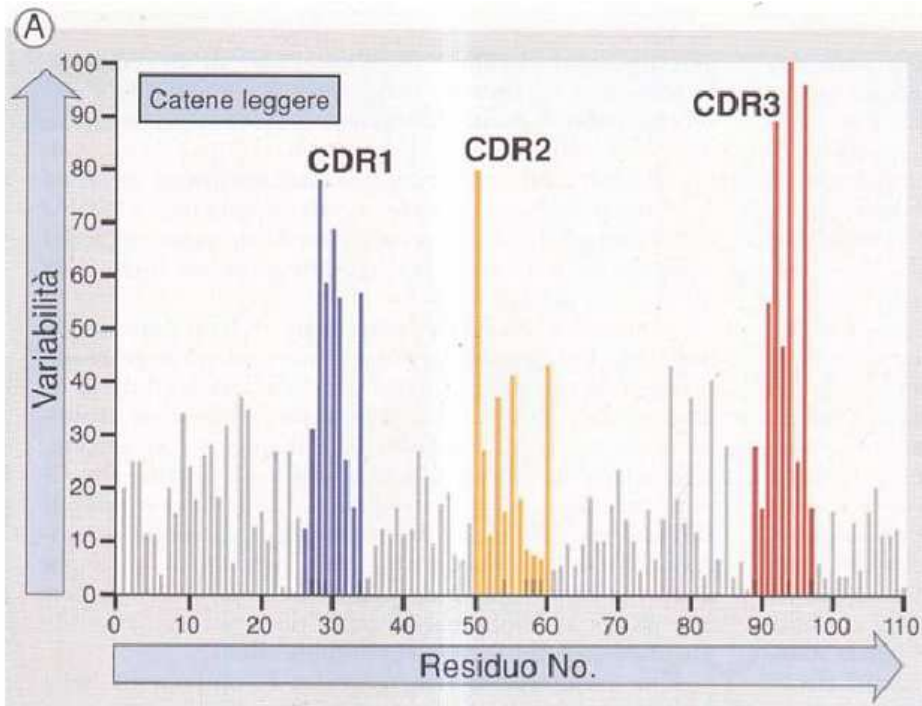
Anticorpi (*o immunoglobuline*)



Anticorpi monoclonali

Anticorpi (o immunoglobuline)

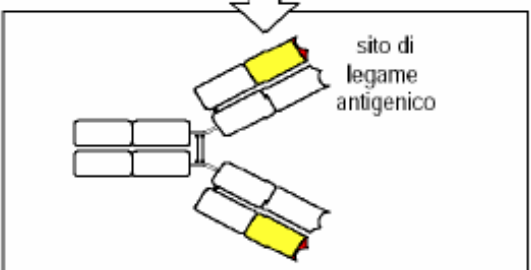
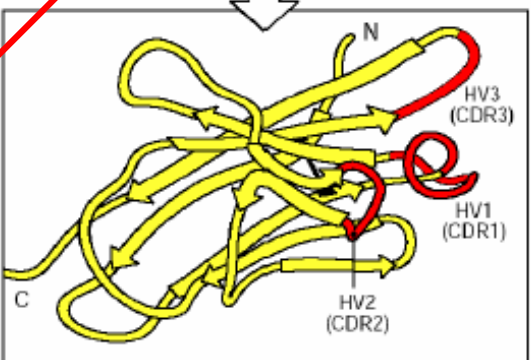
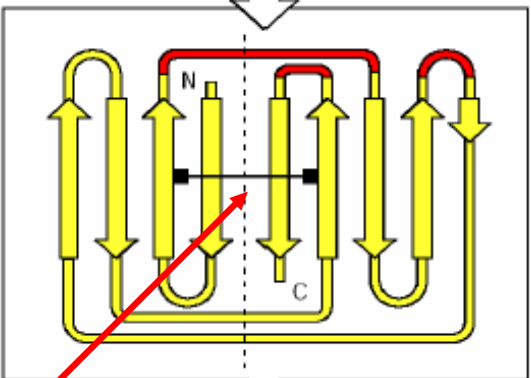
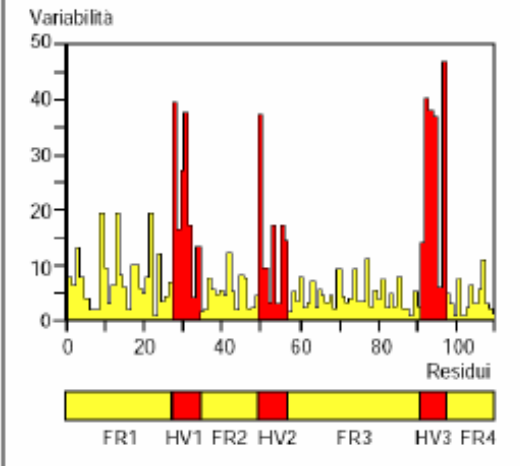
Quando le **regioni ipervariabili** sono posizionate nella struttura del dominio V, vengono a trovarsi all'interno di anse, avvicinate tra loro dal ripiegamento della molecola. Inoltre l'appaiamento di una catena leggera e una pesante riunisce le rispettive anse ipervariabili in modo da creare un'unica superficie ipervariabile ovvero il **sito di legame (Epitopo)** per l'antigene sulla sommità di ciascun braccio.



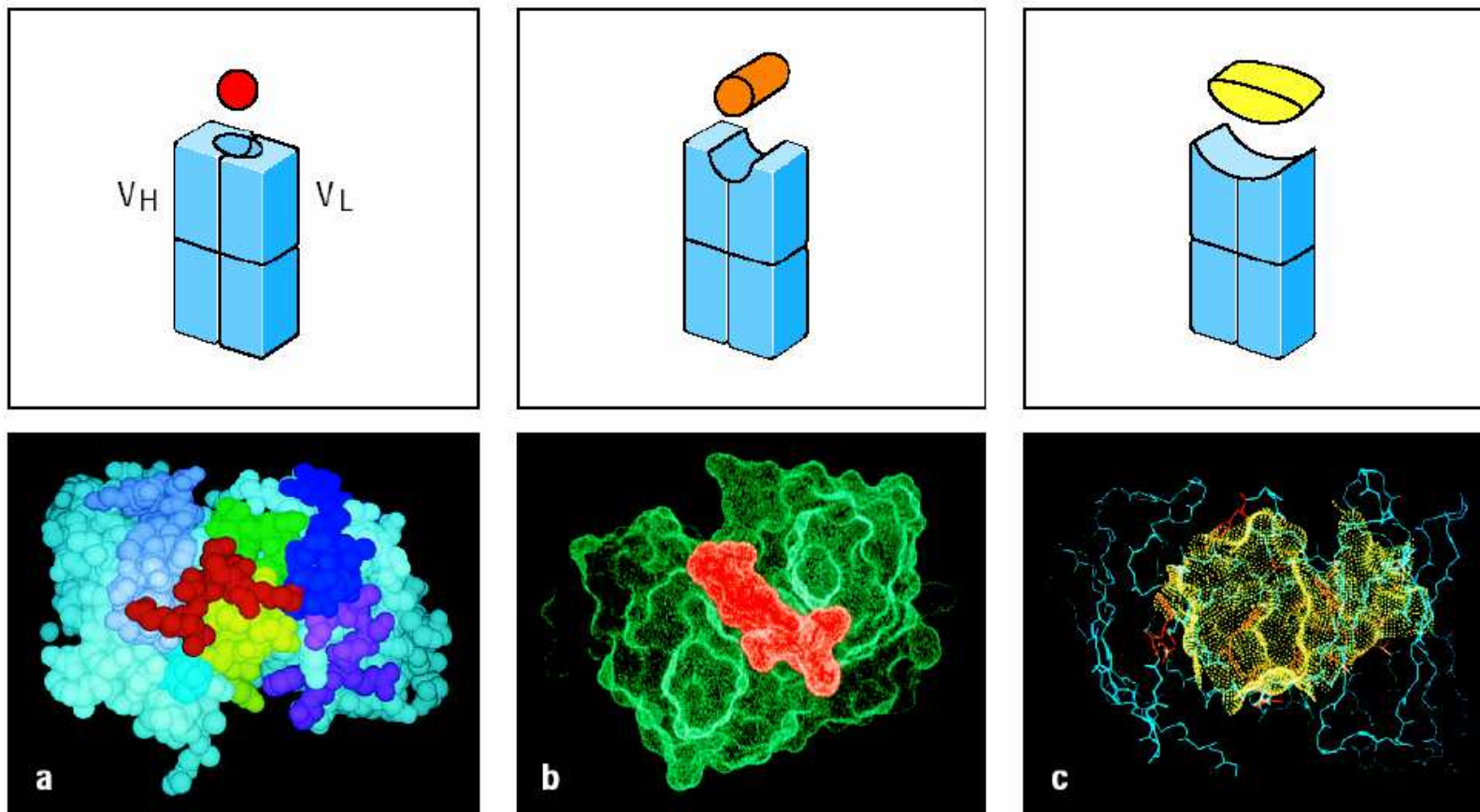
Ponte disolfuro

Variazioni reale (3D)

Regione V della catena leggera



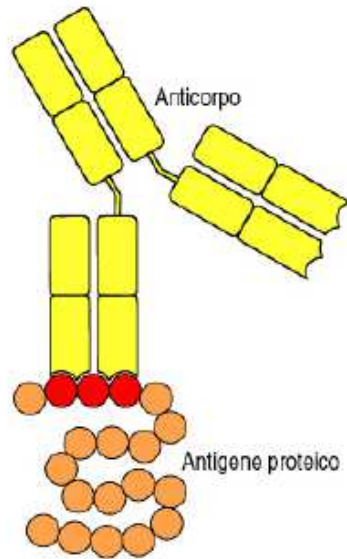
Anticorpi monoclonali



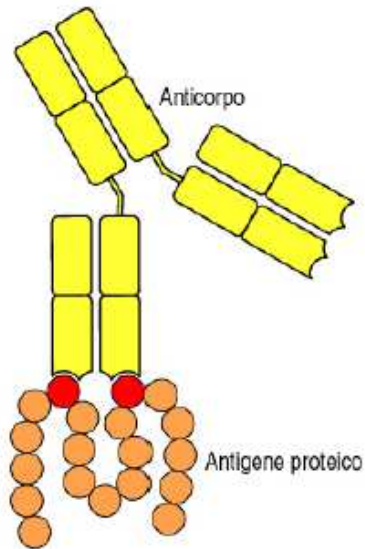
Gli **epitopi** si possono legare in tasche, nicchie oppure su estese superfici del sito combinatorio

Anticorpi monoclonali

Epitopo lineare

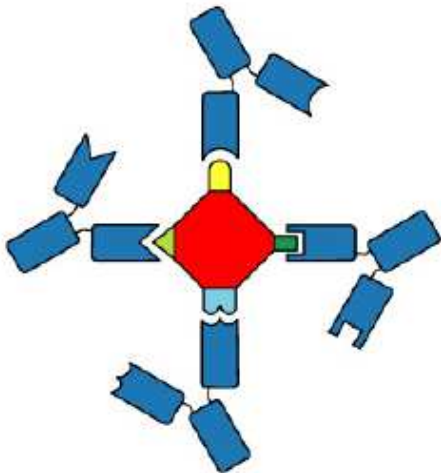


Epitopo discontinuo

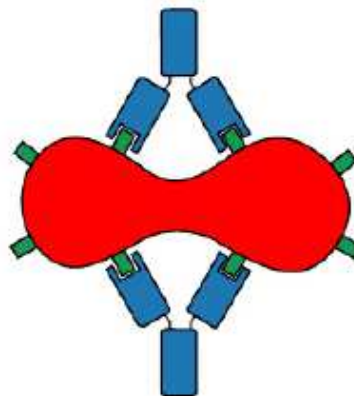


Legame anticorpo con
epitopo lineare o
conformazionale

Antigene multivalente con epitopi differenti



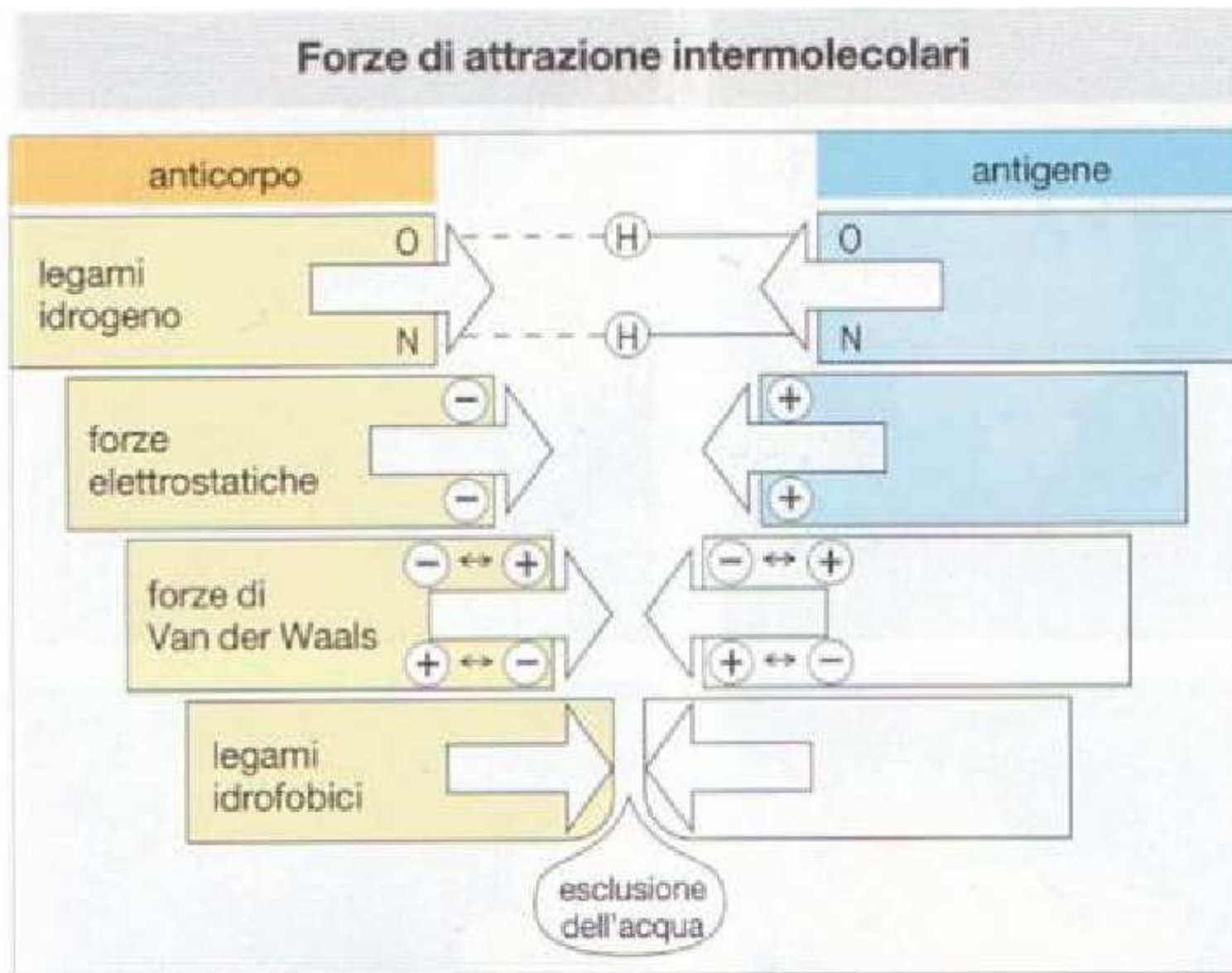
Antigene multivalente con epitopo ripetuto



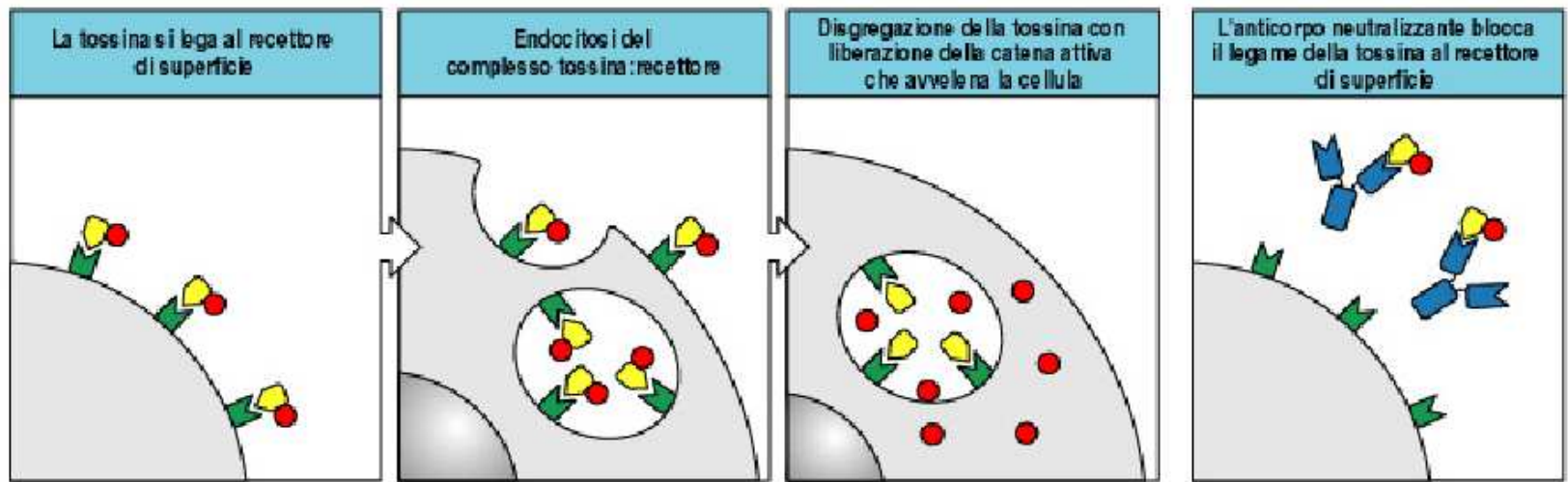
Legame anticorpi con
epitopo differenti o
ripetuti

Anticorpi monoclonali

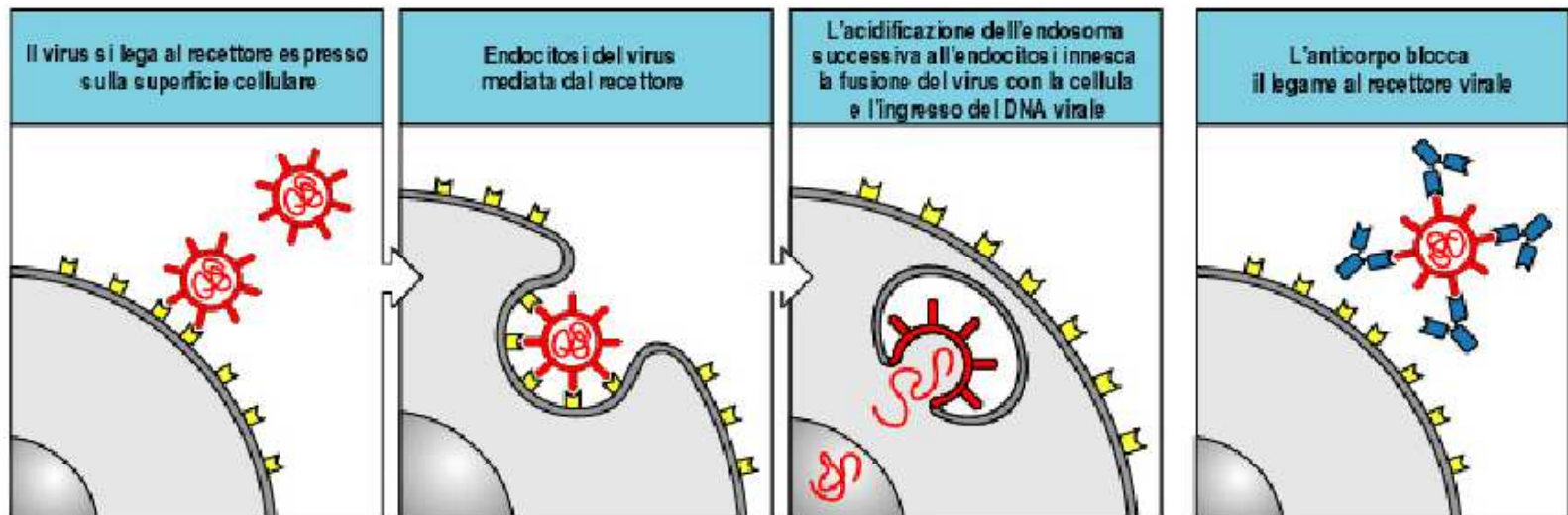
Gli anticorpi formano diversi tipi di legami non-covalenti con l'antigene



Neutralizzazione delle tossine batteriche



Neutralizzazione dei virus



Neutralizzazione dei batteri



Anticorpi monoclonali

Anticorpi (o immunoglobuline)

Le immunoglobuline umane sono suddivise in **5 classi principali**, elencate in ordine decrescente di concentrazione sierica: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Differiscono fra di loro per

- dimensioni
- carica elettrica
- composizione aminoacidica
- contenuto carboidrati

IgG:

- 70-80% di tutte le Ig (presenti nel sangue)
- 4 sottoclassi
- Intervengono nella risposta immunitaria secondaria
- Sono le più piccole (monomeri) e le uniche in grado di attraversare la barriera placentare
- La loro produzione è indotta da buona parte dei batteri, delle loro tossine, dai virus e dai funghi

Anticorpi monoclonali

IgA:

- 15-20% di tutte le Ig
- L'80% di struttura monomerica
- 2 sottoclassi
- Sono localizzate principalmente nelle membrane mucose del tratto gastrointestinale e dei bronchi
- Veicolate con nanosfere, polimeri, liposomi

IgM:

- 10% di tutte le Ig (presenti nel sangue)
- Struttura pentamerica (*deca-valente*)
- Fissano il *complemento*
- Sono molto potenti

IgE:

Scarse nel plasma

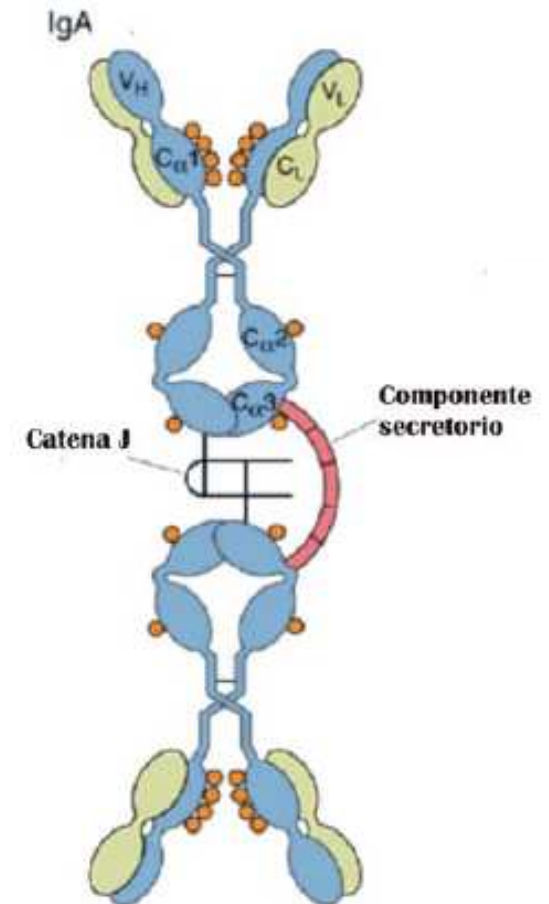
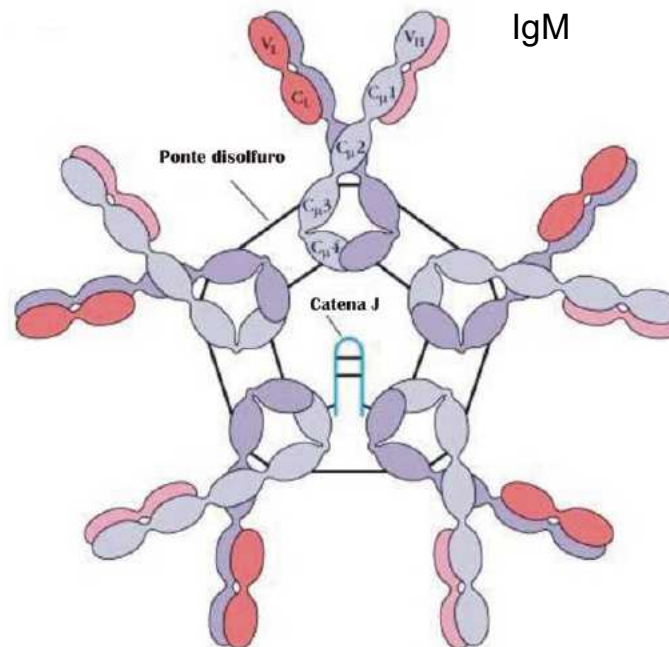
Intervengono nel caso di risposta immunitaria da parassiti

Non fissano il *complemento*

IgD:

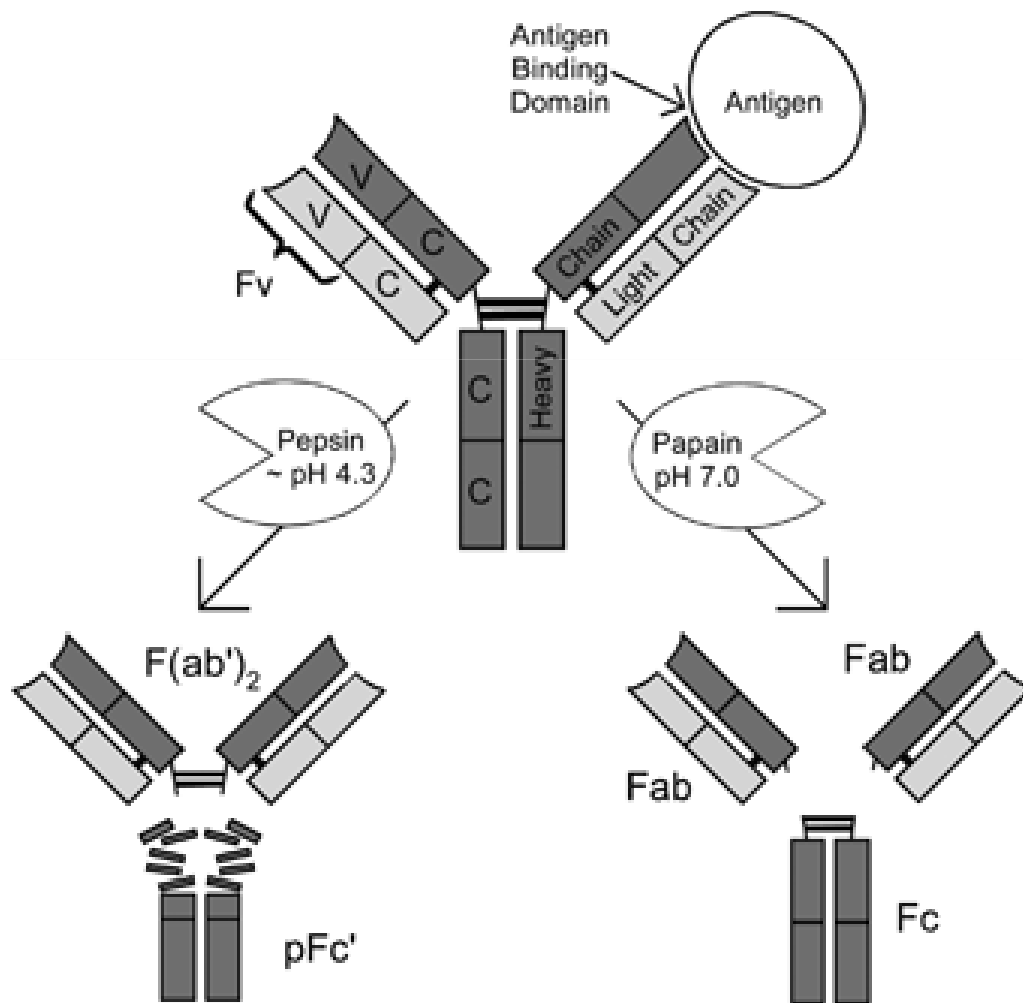
1% delle totali Ig

?



Anticorpi monoclonali

Anticorpi (o *immunoglobuline*)

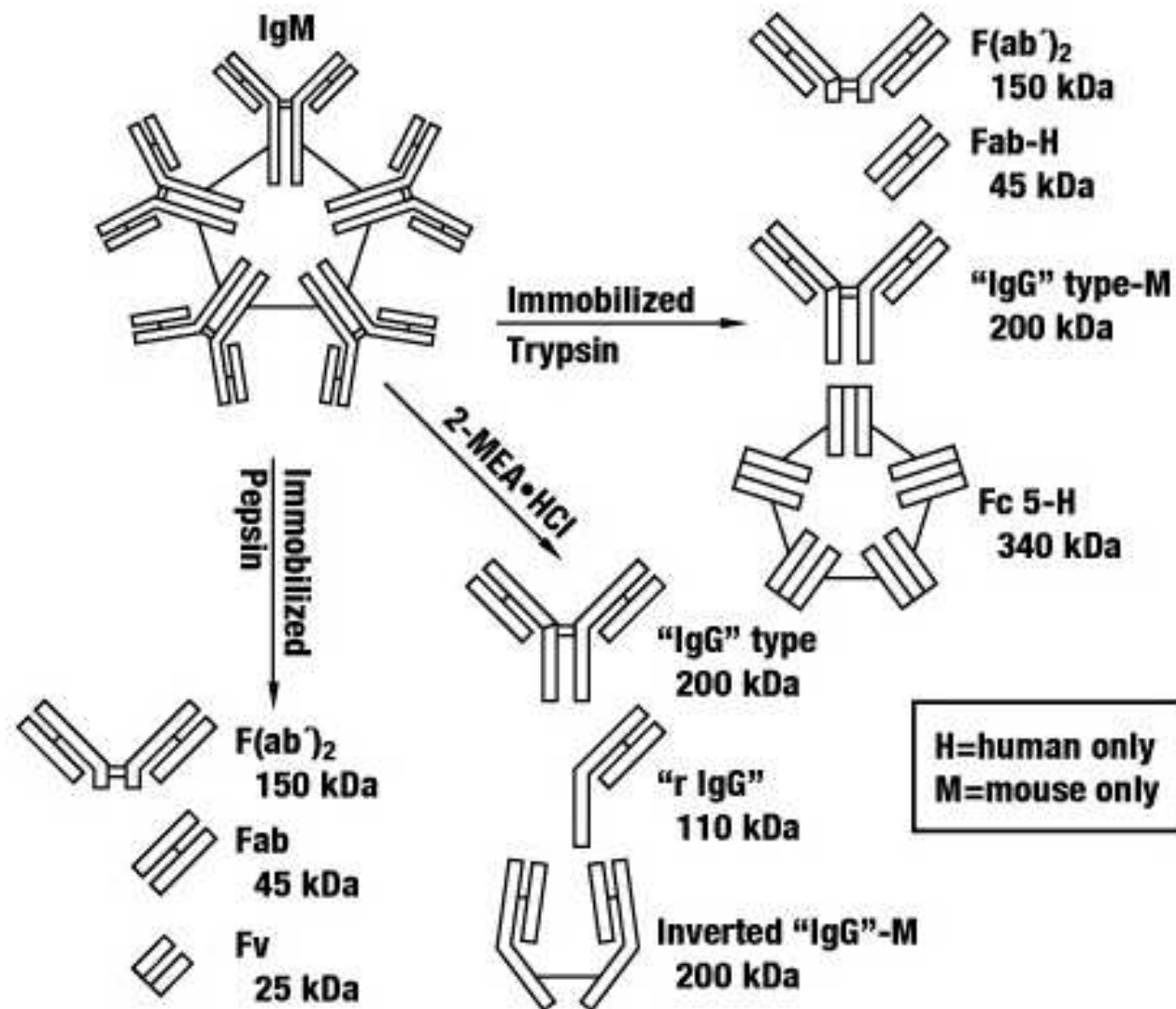


La frammentazione degli anticorpi

La papaina, pepsina pancreatica sono enzimi in grado di scindere una molecola di anticorpo. In questo modo è stato possibile studiare la struttura e il comportamento degli anticorpi in modo più dettagliato. Esistono due diverse categorie di frammenti di cui si compone una immunoglobulina: la regione *Fab* (*Fragment, antigen binding*) è la porzione che lega l'antigene mentre la principale peculiarità della regione F_C (*Fragment, crystallizable*) consiste nella capacità di legare il complemento.

Anticorpi monoclonali

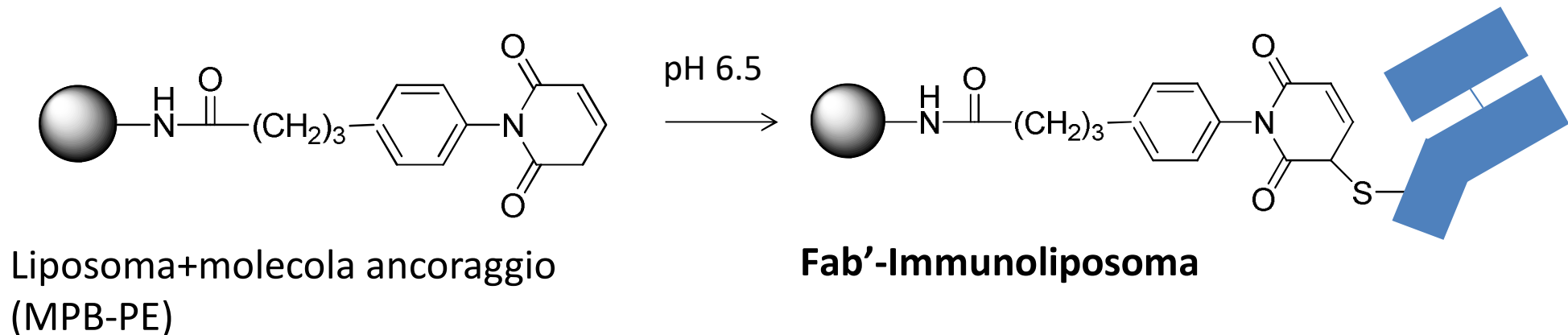
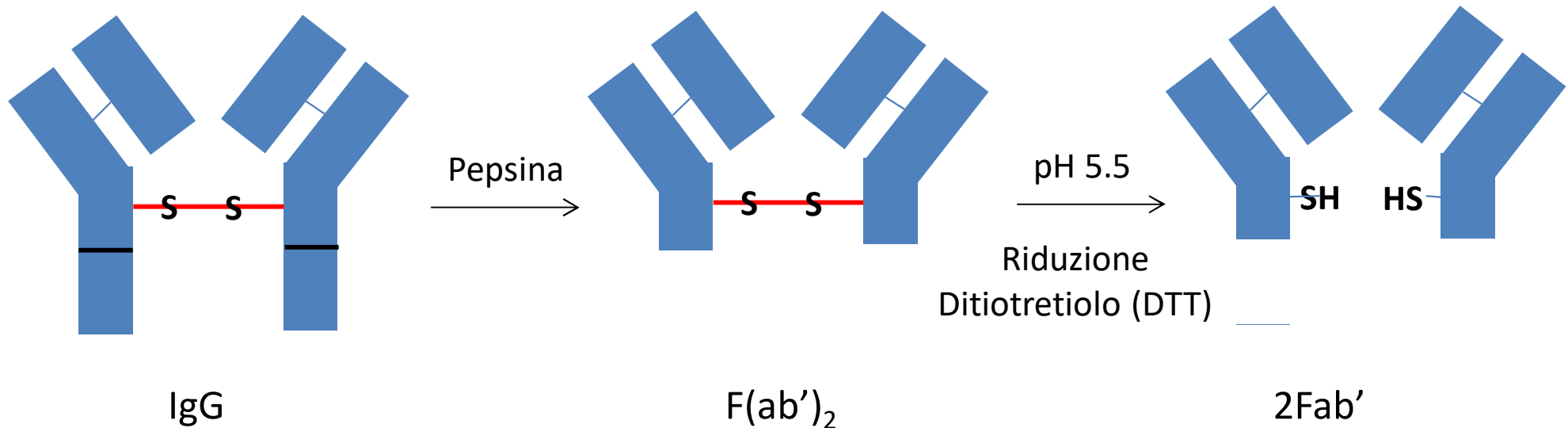
Anticorpi (*o immunoglobuline*)



Vettori micro e nanoparticellari

Liposomi

IMMUNOLIPOSOMI

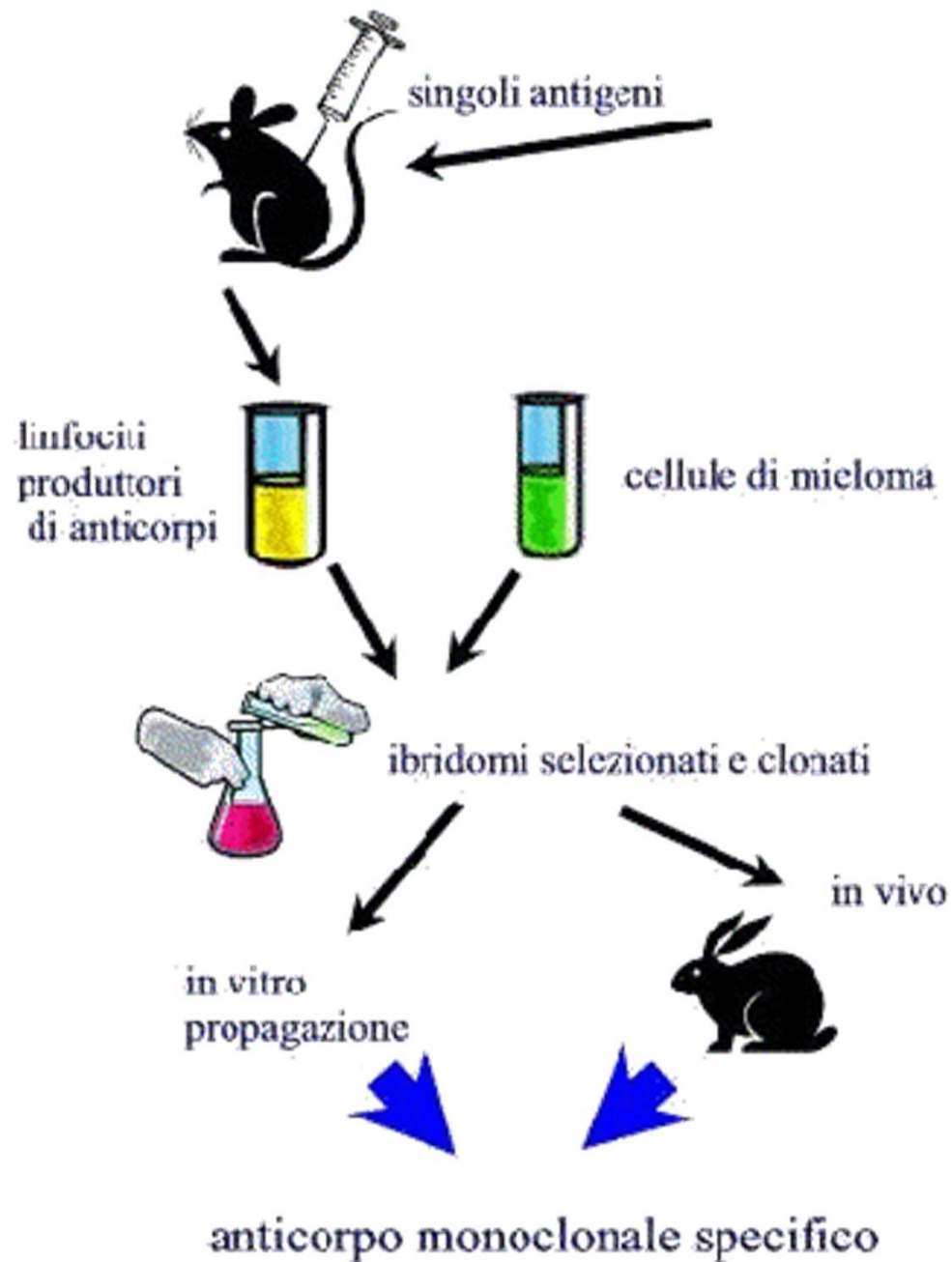


MPB-PE: N-(4-(p-maleimmidofenil)-butirril)fosfatidilamina

Anticorpi monoclonali

- Ogni anticorpo è prodotto da una specifico linfocita B. L'isolamento e la coltura *in vitro* di una cellula (*quindi un clone cellulare*) capace di produrre un singolo anticorpo rappresenta una fonte di **anticorpi monoclonali** (*monospecifici*).
 - Tuttavia i linfociti B, quando sono coltivati *in vitro*, muoiono dopo brevissimo tempo, e quindi non possono essere una fonte per la produzione a lungo termine di anticorpi.
 - La tecnologia dell'anticorpo monoclonale comprende l'isolamento di questi cloni di linfociti B che vengono fusi con cellule tumorali, dando luogo a cellule ibride, **ibridomi**, in grado di produrre grandi quantità di anticorpo specifico (caratteristica del clone di linfociti), riproducendosi continuamente (caratteristica della cellula tumorale).
 - Questi anticorpi, definiti **anticorpi monoclonali**, sono in breve tempo diventati un prezioso strumento diagnostico/terapeutico e di ricerca per biologi e medici.
- La **produzione di anticorpi monoclonali** è ottenuta mediante la sollecitazione dell'organismo di topi in laboratorio (*gen. Murine*).
- Viene iniettato l'antigene per il quale si vuole creare l'anticorpo in un topo A.
 - Si prelevano da un topo B cellule tumorali del suo organo linfatico che si riproducono velocemente, sono resistenti e non producono anticorpi specifici.
 - Si mettono a contatto con linfociti del topo A.

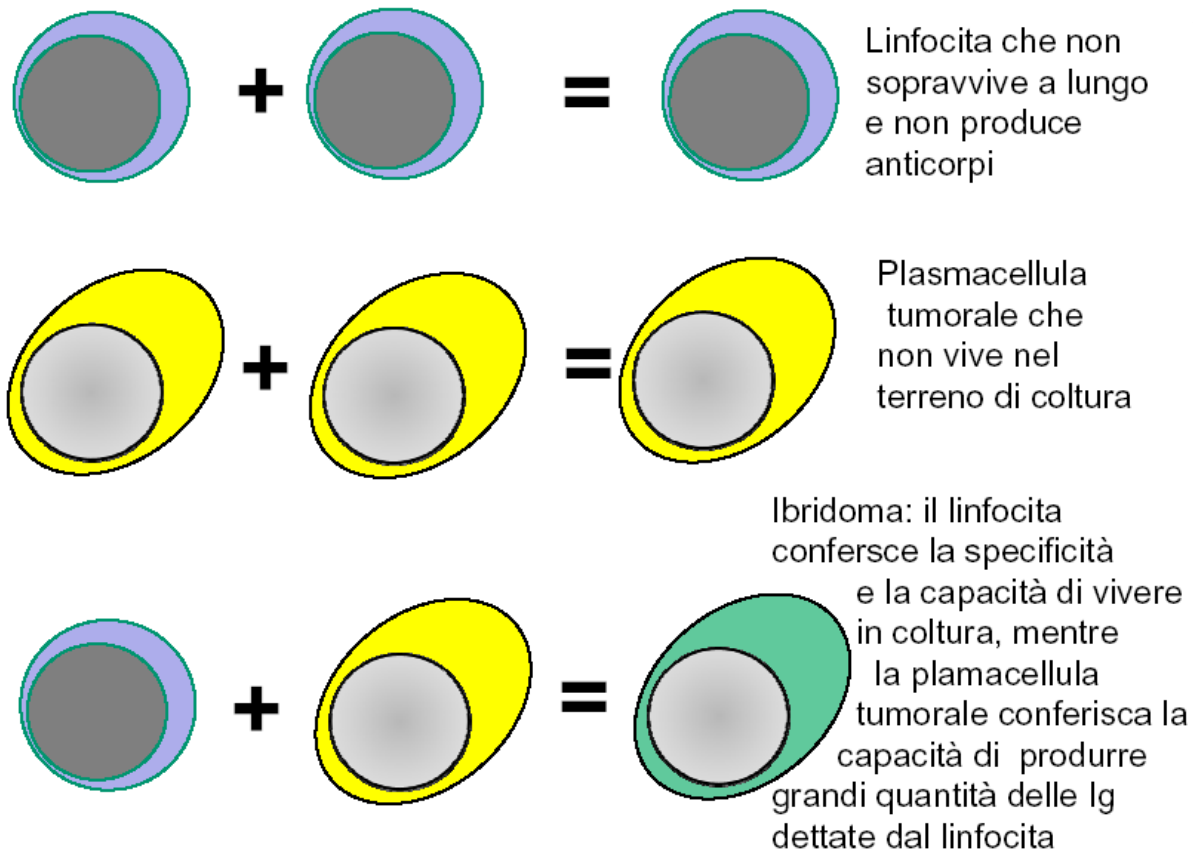
Anticorpi monoclonali



Anticorpi monoclonali

Dato che la fusione è casuale si possono formare *diversi tipi di ibridomi* (cellula B-cellula B, cellula B-cellula mielomatosa, cellula mielomatosa-cellula mielomatosa), quindi è necessario *selezionare l'ibridoma cellula B-cellula mielomatosa* per avere la produzione degli anticorpi monoclonali desiderati.

A questo punto bisogna eliminare i linfociti e le cellule tumorali che non si sono fuse, mediante l'utilizzo di un terreno selettivo (HAT) che fa crescere solo le cellule ibride.



Anticorpi monoclonali

Uso clinico di anticorpi monoclonali

In vitro agenti diagnostici

In vivo agenti per imaging (*immunoscintigrafia*)

Agenti terapeutici (MAb come farmaci)

Agenti come trasportatori (*carrier* di farmaci e proteine biologicamente attive)

Anticorpi monoclonali

Anticorpi monoclonali come agenti terapeutici

Il primo MAb introdotto sul mercato è stato Orthoclone OKT3, un MAb di topo usato per prevenire il rigetto di trapianti renali. Approvato nel 1986.

Da allora, molti altri MAbs sono stati registrati

Malattie interessate

- Poliartrite reumatoide
- Morbo di Cröhn
- Rigetto di trapianto di rene
- Tumore al seno
- Linfomi
- Leucemia mielode acuta
- Leucemia mieloide cronica

Anticorpi monoclonali

Currently Approved Therapeutic Monoclonal Antibodies

Tumori

Indication	Product Name	Antibody Type	Approved	Companies
Cancer				
Colorectal	Panorex+ edrecolomab	Murine Mab	1995	Centocor, Johnson & Johnson
Non-Hodgkin's lymphoma (NHL)	Rituxan rituximab	Chimeric Mab	1997	IDEC, Genentech, and Roche
Metastatic breast cancer	Herceptin trastuzumab	Humanized Mab	1998	Genentech, Roche
Acute myeloid leukemia	Mylotarg gemtuzumab ozogamicin	Humanized Mab conjugated to calicheamicin	2000	Celltech Chiroscience, Wyeth
B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)	Campath alemtuzumab	Humanized Mab	2001	Millennium Pharmaceuticals, Illex Oncology
Non-Hodgkin's lymphoma	Zevalin™ Ibritumomab Tiuxetan	Murine Mab combined with yttrium 90	2002	Idec Pharmaceuticals
Cardiovascular Disorders				
Coronary intervention and angioplasty	Reopro abciximab	Fab derived from chimeric Mab	1994	Centocor, Johnson & Johnson
Refractory unstable angina	Reopro abciximab	Fab derived from chimeric Mab	1997	Centocor, Johnson & Johnson
Inflammatory Diseases				
Allergic asthma	Xolair omalizumab	Humanized Mab	2002	Genentech, Novartis
Crohn's disease	Remicade Infliximab	Chimeric Mab	1998	Centocor, Johnson & Johnson
Rheumatoid arthritis	Remicade Infliximab	Chimeric Mab	1999	Centocor, Johnson & Johnson
Rheumatoid arthritis	Humira adalimumab	Fully human Mab	2002	Abbott, Cambridge Antibody Technology
Allergic asthma	Xolair omalizumab	Humanized Mab	2002	Genentech, Novartis
Infectious Diseases				
Respiratory syncytial virus	Synagis palivizumab	Humanized Mab	1998	Medimmune
Transplantation				
Organ transplant rejection	Orthoclone OKT3 muromomab-CD3	Murine Mab	1986	Ortho Biotech, Johnson & Johnson
Kidney transplant rejection	Zenapax daclizumab	Humanized Mab	1997	Protein Design Labs
Kidney transplant rejection	Simulect basiliximab	Chimeric Mab	1998	Novartis

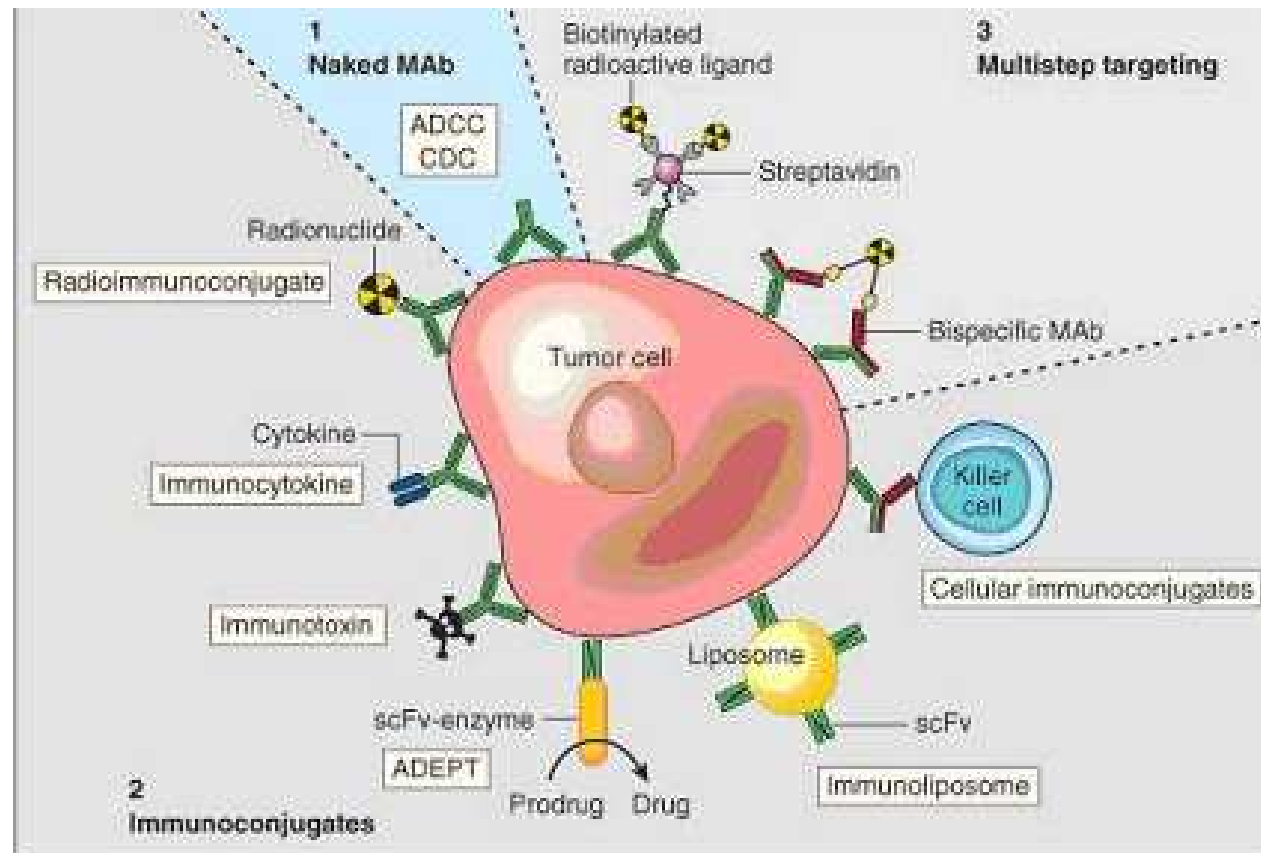
Malattie cardiovascolari

Patologie infiammatorie

Malattie infettive

Trapianti

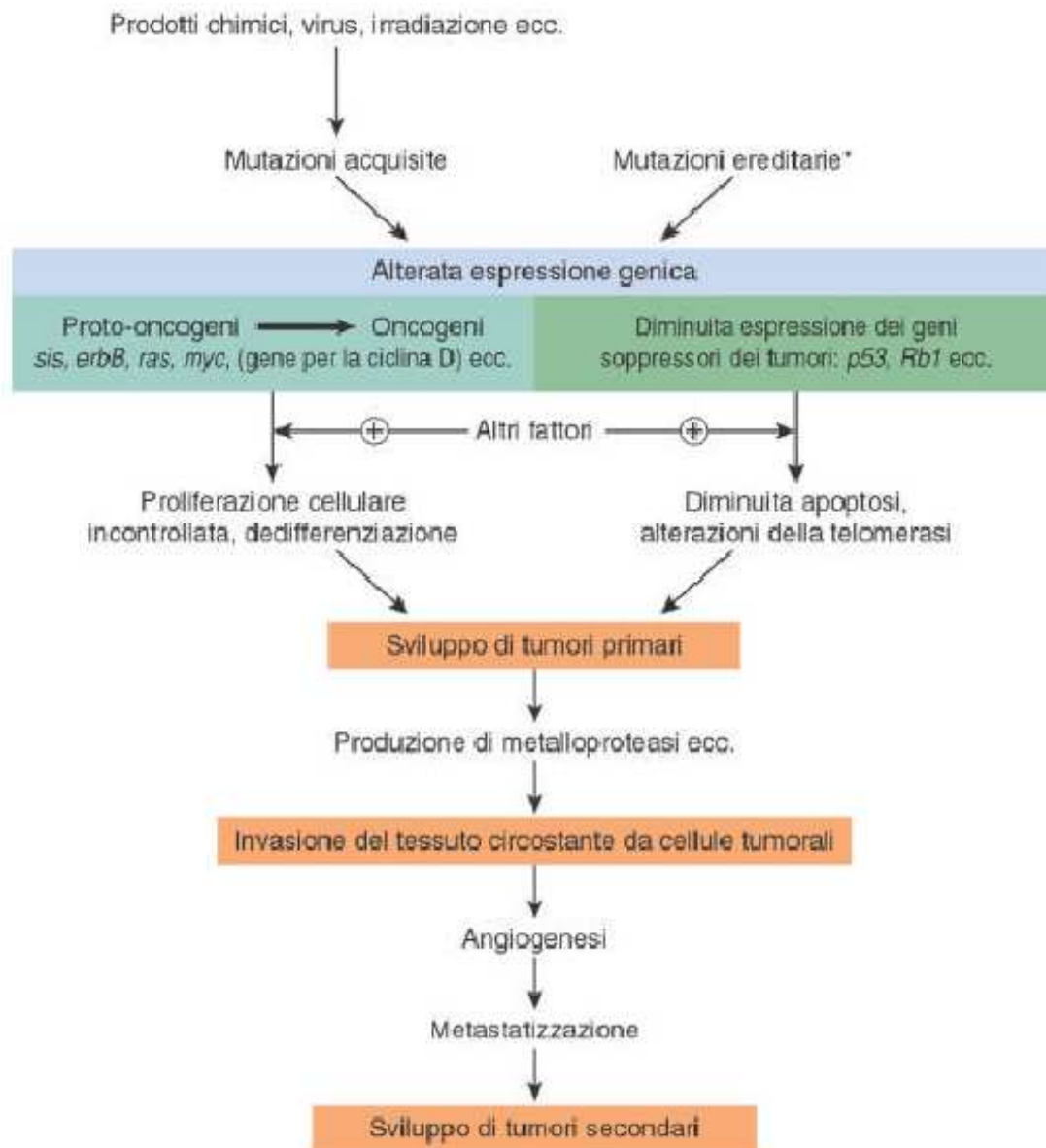
Anticorpi monoclonali



Terapie antitumorali

La chiara identificazione degli antigeni associati a un tumore faciliterebbe la produzione di anticorpi capaci di legarsi selettivamente al tessuto tumorale. Tali anticorpi possono essere usati per scoprire e/o distruggere le cellule tumorali.

Anticorpi monoclonali



- I tumori sono causati da una crescita incontrollata di cellule scarsamente differenziate, che hanno perso la capacità di andare incontro ad *apoptosi*.
- Come è noto, la trasformazione di una cellula nello stato canceroso è normalmente associata all'aumento dell'espressione di *antigeni di superficie* riconosciuti come estranei dal sistema immunitario dell'organismo ospite.
- La presenza di **antigeni tumore-specifici** implica che il sistema immunitario dovrebbe essere capace di riconoscere e distruggere le cellule trasformate (immunosorveglianza).
- Il sistema immunitario risponde alla presenza di alcuni tumori causando la loro parziale o completa regressione.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

I maggiori *immunoelementi antitumorali* includono:

- *Linfociti T*, capaci di riconoscere e lisare cellule maligne
- *Cellule natural killer* (NK) che, come alcune cellule T, possono indurre la lisi delle cellule tumorali
- *Macrofagi*, in grado di distruggere le cellule tumorali, prevalentemente mediante il rilascio di enzimi lisosomiali e metaboliti reattivi dell'ossigeno alla superficie della cellula tumorale.
- *Anticorpi* che, mediante il legame agli antigeni cellulari di superficie, *marcano le cellule tumorali per la distruzione*. Le cellule NK e i macrofagi esprimono recettori cellulari di superficie che si legano alla regione **Fc** dell'anticorpo. In questo modo l'anticorpo legato all'antigene tumorale dirige questi elementi del sistema immunitario direttamente alla superficie del tumore. Gli anticorpi attivano anche il complemento, che è capace di lisare direttamente le cellule tumorali.



Problema

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Diversi fattori hanno contribuito alla **scarsa performance terapeutica**, in particolare contro i tumori solidi. Molti di questi fattori sono direttamente o indirettamente collegati al fatto che la *prima generazione* di questi farmaci usava preparati di interi anticorpi monoclonali di origine *murina*.

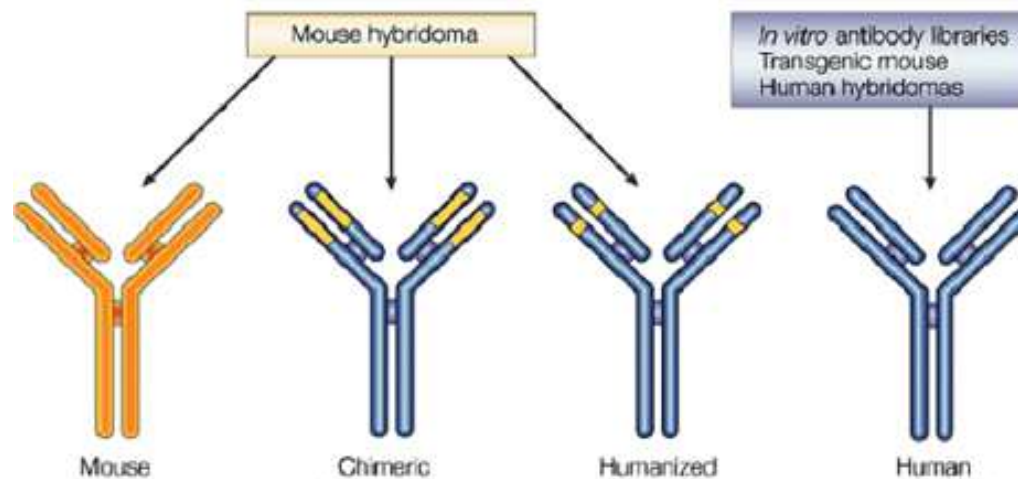
- Insufficiente informazione esistente sugli antigeni associati ai tumori
- Gli anticorpi monoclonali *murini* inducono una risposta immunitaria quando somministrati agli umani
- Gli anticorpi monoclonali *murini* mostrano un relativamente breve emivita quando sono somministrati all'uomo
- Gli anticorpi penetrano difficilmente all'interno delle masse tumorali
- Si ha uno scarso riconoscimento del dominio Fc degli anticorpi *murini* da parte dei meccanismi effettori umani

Anticorpi monoclonali

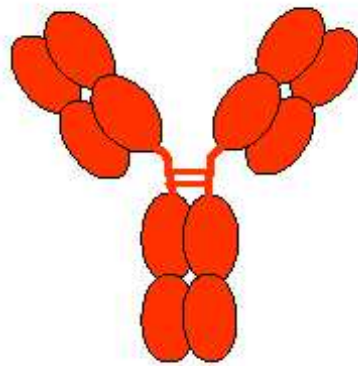
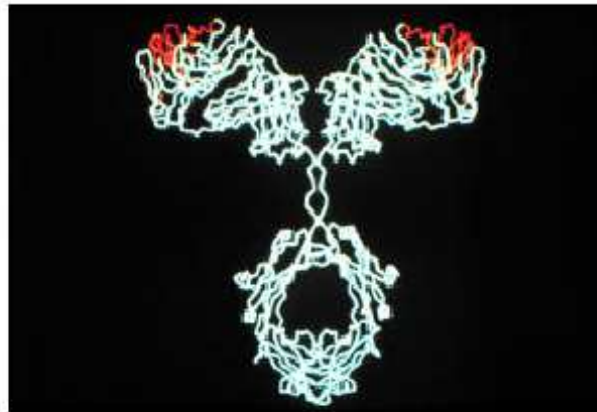
Terapie antitumorali

Le **tecnologie del DNA ricombinante e ingegneria genetica** hanno fornito un alternativo e riuscito metodo per ridurre l'immunogenicità innata degli anticorpi monoclonali murini. Sono stati clonati i geni di tutti i sottotipi di immunoglobuline umane, e questo ha permesso la produzione di vari anticorpi ibridi ad immunogenicità ridotta.

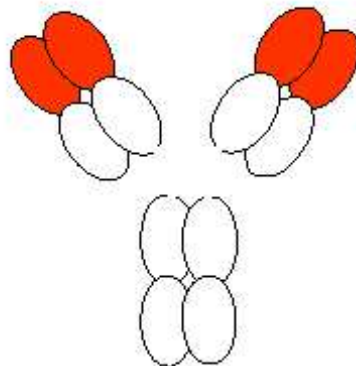
Il primo metodo impiegato per ridurre l'antigenicità di un anticorpo monoclonale murino è consistito nel costruire semplicemente dei **geni "chimerici"** che codificavano proteine in cui le regioni variabili degli anticorpi murini erano fuse con le regioni costanti di un anticorpo umano: l'anticorpo chimerico conservava la specificità di legame ma assomigliava maggiormente a un anticorpo umano naturale.



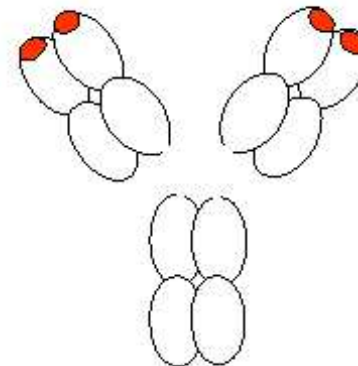
Anticorpi monoclonali



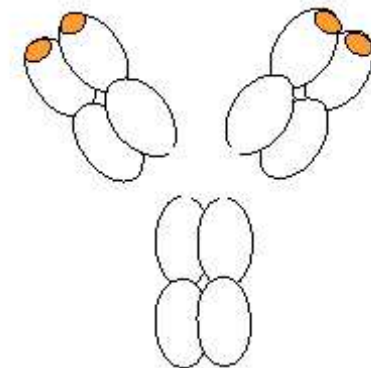
di topo 1975
...momab



Chimerici 1984
...ximab



Umanizzati 1988-1991
...zumab



umani 1994-1999
...mumab



Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Si è dunque osservato che gli anticorpi chimerici:

- Sono significativamente meno immunogenici
 - Hanno una prolungata emivita sierica
 - Permettono l'attivazione di varie funzioni mediate dalla regione **Fc**
 - **Gli anticorpi penetrano difficilmente all'interno delle masse tumorali**
- Il grado di risposta immunitaria osservata dopo la somministrazione di una singola dose è calato dall' **80%**, nel caso degli anticorpi murini, al **5%** per gli anticorpi chimerici. Resta comunque la possibilità che ripetute somministrazioni di anticorpi chimerici portino a risposta immunitaria nel ricevente.
- Con questa tecnica sono già stati umanizzati oltre 50 anticorpi monoclonali diversi; la tecnologia è senza dubbio efficace e diffusamente applicabile, tuttavia è costosa e lunga.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Scarsa penetrazione
nella massa tumorale



Frammentazione
dell'anticorpo

- Una limitazione al trattamento dei tumori solidi per mezzo di anticorpi sta nella loro scarsa capacità di penetrazione nella massa tumorale, a causa delle loro *dimensioni fisiche*. Di conseguenza, è stato posto l'interesse sull'uso di **frammenti di anticorpi**, che mantengano la capacità di legare l'antigene.
- Frammenti come Fab, F(ab)₂ e Fv possono essere prodotti facilmente per mezzo della *tecnologia del DNA ricombinante*, e sono stati legati, per esempio, a traccianti radioattivi per la **diagnostica**.
- Mentre la loro diminuita massa molecolare facilita la penetrazione del tumore, gli anticorpi chimerici o umanizzati interi si sono comunque dimostrati più efficaci, soprattutto se usati per *scopi terapeutici*.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Ulteriore sviluppo tecnologico (*coniugazione*)

- ❖ Un altro modo in cui gli anticorpi vengono attualmente manipolati è mediante modificazione dei loro *domini effettori*, ossia le regioni delle catene pesanti che definiscono la funzione anticorpale (**Fc**), quale l'uccisione delle cellule segnalata dall'anticorpo stesso: secondo tale via è possibile *riprogrammare* la modalità di azione di un anticorpo monoclonale.
- ❖ Una strategia promettente è quella di sostituire interamente il dominio effettore con una sequenza che codifica una **tossina**: una proteina di fusione anticorpo-tossina convoglierebbe la tossina specificamente alle cellule che hanno l'antigene bersaglio.
- ❖ L'ingegneria degli anticorpi viene impiegata anche per costruire **anticorpi bispecifici**, nei quali ognuno dei due bracci riconosce un antigene differente, consentendo così all'anticorpo di fare da ponte fra due antigeni; per esempio un anticorpo bispecifico potrebbe riconoscere una proteina di una cellula tumorale con un braccio e una proteina di superficie di un linfocita T con l'altro, mettendo così il linfocita killer a diretto contatto con la cellula tumorale.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Bersagli della terapia con anticorpi monoclonali

È stato studiato un certo numero di bersagli (antigeni) per la terapia con anticorpi monoclonali. Si tratta generalmente di antigeni che si sono dimostrati specifici per uno o più tipi di tumori e spesso coinvolgono la sovrapproduzione di un recettore.

Bersaglio	Tipo di tumore
Recettore del fattore di crescita-2	Mammella,ovaio,colon-retto
Antigene carcinoembrionico (CEA)	Colon-retto
MUC1	Colon-retto, mammella, ovaio
Gangliosidi	Melanoma
CD19,CD20, CD22	Linfoma di Hodgkin
CD5	Leucemia-leucocitaria-cronica linfoma cutaneo a cellule T

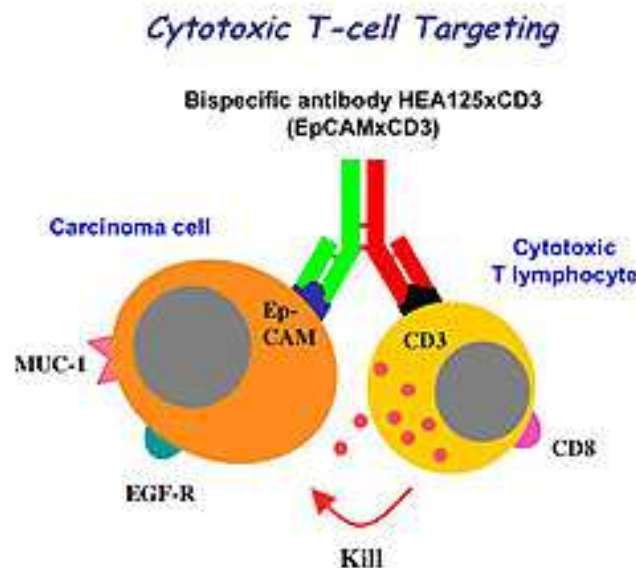
Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Gli approcci utilizzati per produrre terapie basate su anticorpi diretti a questi bersagli possono essere raggruppati come segue:

- approcci diretti basati su anticorpi monoclonali
- anticorpi immunoconiugati, che includono immunotossine e anticorpi radio-immunoconiugati
- anticorpi bispecifici.

Anticorpo bispecifico



Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi monoclonali

L'utilizzo di anticorpi monoclonali “naked” o non coniugati per colpire i tumori e provocare effetti diretti sulle cellule tumorali è il più semplice degli approcci anticorpo-mediati che sono stati studiati. L'efficacia di questo tipo di terapia dipende da:

- selezione di un appropriato antigene bersaglio, cioè un antigene che è anormalmente espresso dalle cellule tumorali ma non dalle cellule normali, è presente ad alti livelli sulla superficie della cellula tumorale, è stabile (non variabile a causa del grado di mutazioni nel gene) ed è attivo nello sviluppo del tumore e/o nel suo mantenimento
- anticorpo monoclonale, che deve avere un'alta affinità per l'antigene bersaglio e non avere effetti sui tessuti normali
- tipo di tumore, che comprende l'accessibilità da parte dell'anticorpo

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Queste caratteristiche assicurano che l'anticorpo monoclonale non colpisca o produca solo minimi effetti sulle cellule sane, ma sopprima o uccida effettivamente le cellule tumorali.

Alti livelli di espressione antigenica da parte delle cellule tumorali aumentano sia la specificita' di bersaglio dell'anticorpo sia la sua l'efficacia, mentre la stabilita' dell'antigene assicura che il bersaglio della terapia sia sempre presente.

L'alta affinita' dell'anticorpo monoclonale per il suo bersaglio migliora anche la specificita' tumorale.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Inizialmente si credeva che l'efficacia della terapia con anticorpi monoclonali fosse dovuta alla stimolazione di risposte immunitarie che comportano come risultato la morte della cellula tumorale. Ora invece si ritiene che l'attività antitumorale della terapia basata su anticorpi monoclonali si espliciti in molti modi, tra cui:

- sottoregolazione del bersaglio, che porta all'alterazione di funzioni;
- prevenzione dell'attivazione del bersaglio;
- inibizione di percorsi intracellulari controllati dal bersaglio, per esempio segnali di stimolazione della crescita prodotti da un fattore di crescita che lega il suo recettore;
- induzione delle risposte immunitarie;
- attività antitumorale diretta per mezzo della morte cellulare programmata (apoptosi), per esempio attivazione di fattori che inducono l'apoptosi come risultato di feedback da percorsi stimolatori di crescita intracellulari.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

La terapia con anticorpi monoclonali è diventata una realtà clinica grazie alla capacità di produrre anticorpi chimerici o umanizzati che mantengono la specificità antigenica dell'anticorpo originale murino ma che non sono neutralizzati dalla risposta immunitaria alla proteina estranea. Due esempi:

- **MabThera®**, anticorpo chimerico anti-CD20 che produce risposte in approssimativamente il 50% dei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin ed è ben tollerato
- **Herceptin®**, anticorpo monoclonale umanizzato anti HER2 che si è dimostrato in grado di produrre un incremento della durata totale della sopravvivenza in donne con tumore della mammella metastatico con HER2 positivo

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Entrambi questi anticorpi monoclonali hanno come bersaglio gli antigeni espressi ad alti livelli dalle cellule tumorali. Il CD20 è espresso da quasi tutte le cellule B dei linfomi, ma non dalle cellule staminali, dai primi precursori delle cellule B o da organi critici. Questa specificità di espressione unita alla sua localizzazione sulla membrana cellulare e all'assenza dal siero lo rendono un bersaglio ideale per la terapia con anticorpi monoclonali.

Sebbene espresso dalla grande maggioranza delle cellule epiteliali, l'HER2 è anche espresso ad alti livelli da approssimativamente il 20% dei tumori della mammella e da una parte di altri tumori, ed ha un ruolo dimostrato nell'oncogenesi del tumore della mammella. Tutte queste caratteristiche lo rendono un bersaglio ideale per la terapia con anticorpi monoclonali.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Gli effetti collaterali della terapia con anticorpi monoclonali tendono ad essere correlati alla somministrazione per via endovenosa e si verificano alla prima somministrazione. Più comunemente, il paziente sperimenta febbre e brividi (osservati in più del 40% dei pazienti). Tuttavia, questi sintomi possono essere gestiti con un'appropriata terapia sintomatica e la riduzione della velocità di infusione.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

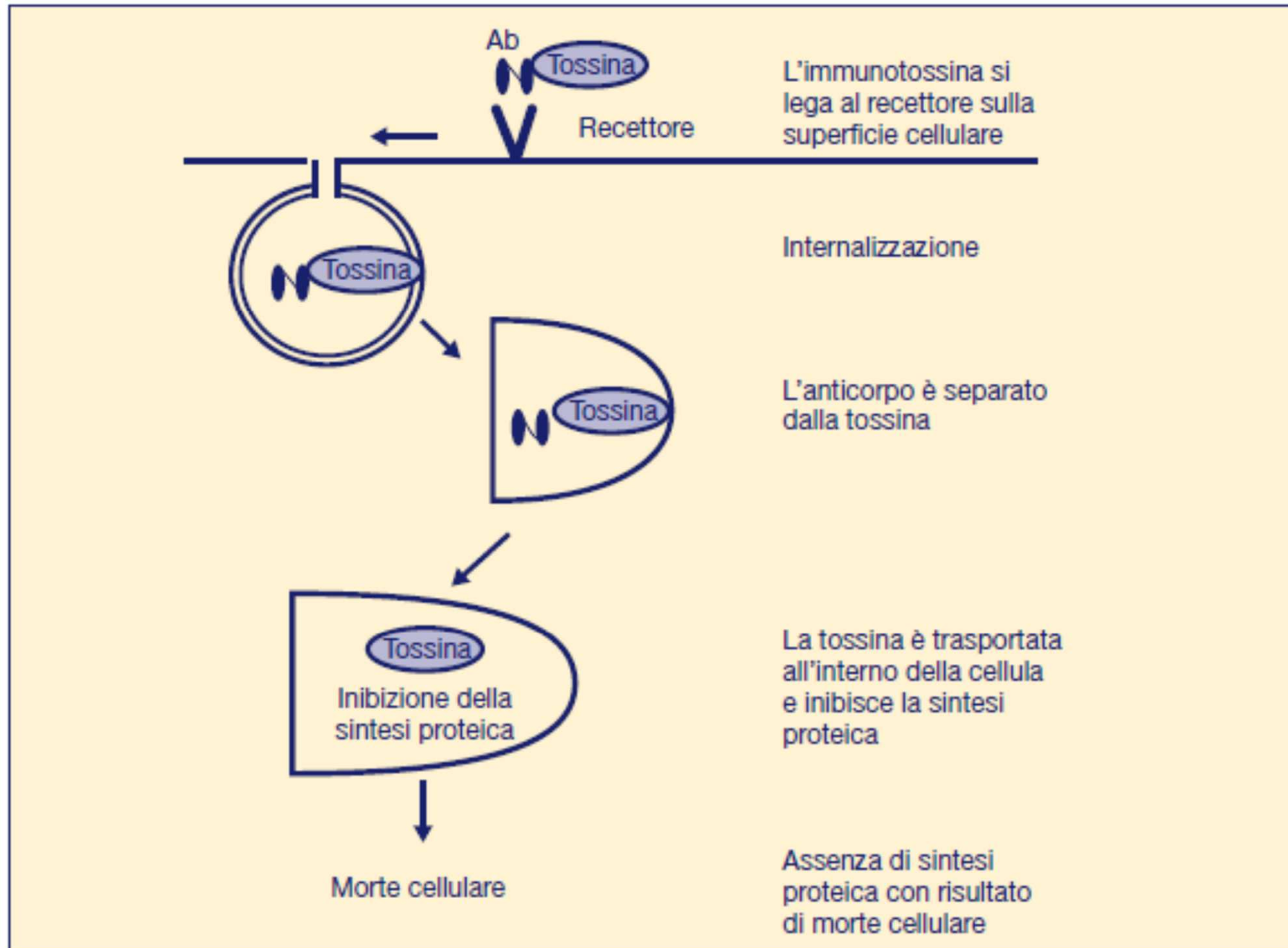
Anticorpi immunoconiugati

Il termine immunoconiugati è usato in riferimento ad anticorpi monoclonali accoppiati a tossine o a radionuclidi per formare, rispettivamente, immunotossine o radioimmunoconiugati.

Entrambi questi approcci hanno l'obiettivo di distribuire una molecola che ha effetto citotossico diretto specificamente alle cellule tumorali. Le tossine da utilizzare nelle immunotossine devono essere citotossine (in grado di indurre morte cellulare), che riconoscono un bersaglio cellulare ed esplicano la loro attività solo dopo essere state portate all'interno della cellula (internalizzate). Queste caratteristiche determinano che la tossina provochi la morte solo delle cellule che esprimono il bersaglio e non delle cellule che non internalizzano la tossina.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali



Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi immunoconiugati

Le più comuni tossine di questo tipo sono di origine batterica o vegetale, tra cui il ricino o la sottounità A del ricino (vegetale), e l'esotossina dello *Pseudomonas* e la tossina difterica (batterica). La coniugazione di queste tossine agli anticorpi può essere ottenuta sia chimicamente sia rimpiazzando le sequenze di legame della tossina con la porzione per il riconoscimento dell'antigene dell'anticorpo monoclonale. Quest'ultima è la tecnica che viene preferita perché produce un'immunotossina omogenea che è meno immunogenica e più attiva.

Le immunotossine prodotte in questo modo si legano al bersaglio appropriato sulle cellule tumorali, sono internalizzate e solo dopo esprimono l'attività citotossica attraverso effetti sul metabolismo cellulare. Sia l'internalizzazione che l'attività citotossica sono funzioni intrinseche delle tossine utilizzate nell'immunoterapia.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi immunoconiugati

Gli antigeni tumore-correlati che sono stati colpiti specificamente con l'utilizzo di immunotossine comprendono:

- CD5 nella leucemia linfocitica cronica
- recettore IL-2 nelle malattie ematologiche
- CD22 nel linfoma a cellule B e nella leucemia
- Antigene Lewis Y nel tumore del colon-retto, della mammella e altri
- HER2 nel tumore della mammella
- CD56 nel tumore del polmone.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi immunoconiugati

I primi studi clinici sulle immunotossine hanno prodotto tassi di risposta, cioè riduzione ed eliminazione della massa tumorale, di più del 40%. Tuttavia, studi preclinici indicavano che i tassi di efficacia avrebbero potuto essere più alti. Questa discrepanza è probabilmente dovuta in parte alla mancanza di penetrazione delle grandi masse tumorali, perché le immunotossine sono **grandi molecole con limiti di movimento**, e mancano di **specificità tumorale**. Si noti che l'incidenza della tossicità immunotossina correlata è relativamente alta, circa il 60% dei pazienti sperimentano effetti avversi.

La sindrome della permeabilità vasale, che comporta edema generalizzato e una gamma di effetti collaterali quali ipotensione e l'effusione pleurica, è il problema principale.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi immunoconiugati

Gli anticorpi **radio-immunoconiugati** rappresentano un interessante approccio terapeutico perché è noto che le radiazioni sono in grado di uccidere effettivamente le cellule. Infatti una delle sfide maggiori della radioterapia è assicurarsi che il tumore riceva dosi di radiazioni citotossiche pur risparmiando il tessuto sano. L'uso di anticorpi radioimmuno-coniugati è stato sviluppato proprio come mezzo per focalizzare la somministrazione di radiazioni ai tumori.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Anticorpi immunoconiugati

Per la produzione di radio-immunoconiugati sono disponibili i radio-isotopi: lo iodio-131 e l'ittrio-90; l'astatina-211 e l'actinio-225. I **beta emettitori** producono radiazioni di bassa intensità su distanze relativamente lunghe, e ciò significa che essi hanno effetti potenzialmente avversi sui tessuti sani circostanti. Inoltre, il loro uso è limitato alle situazioni in cui è possibile il trapianto di midollo o dove vi è un alto peso tumorale. Per contro, gli **alfa emettitori** producono alte dosi di radiazioni a breve distanza.

Anticorpi monoclonali

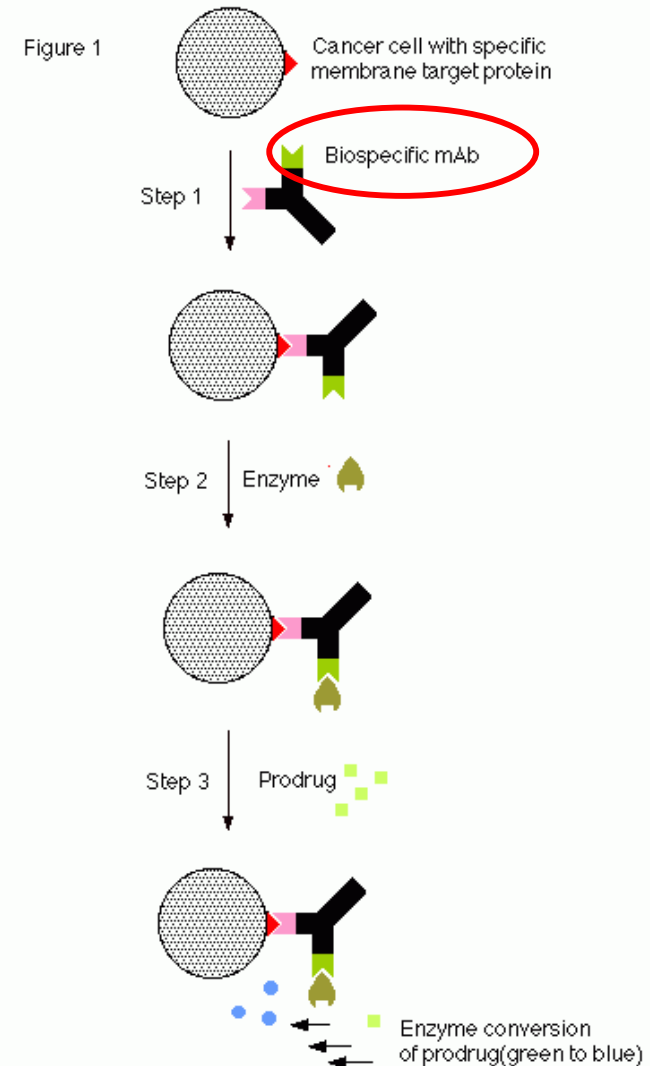
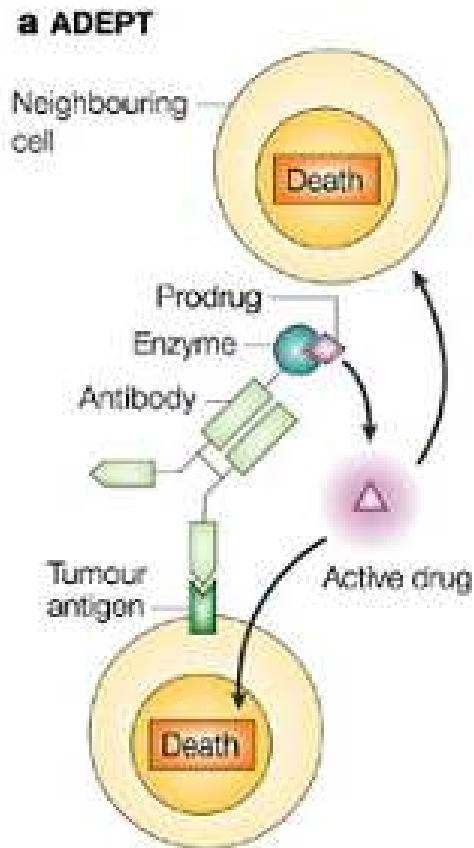
Terapie antitumorali

Anticorpi bispecifici

Normalmente, gli anticorpi hanno due siti di legame per lo stesso antigene. Gli anticorpi bispecifici sono nati dalla possibilità di utilizzare l'ingegneria genetica per progettare anticorpi con **siti di legame per due differenti antigeni**. I siti di legame degli anticorpi bispecifici sono specifici per l'antigene tumore-associato e per un auto-antigene su una cellula effettrice del sistema immunitario come le cellule T, le cellule natural killer, monociti e macrofagi. *Questo approccio promuove un contatto diretto delle cellule immuno-effettrici con le cellule maligne.* In aggiunta, il bersaglio della cellula effettrice per l'anticorpo è generalmente un recettore la cui attivazione attiva la lisi e/o la fagocitosi da parte della cellula effettrice, portando alla morte cellulare. Inoltre, le cellule effettrici rilasciano citochine che agiscono sulle cellule tumorali vicine e attraggono cellule effettrici nella sede tumorale.

Anticorpi monoclonali

ADEPT (*Antibody-directed enzyme prodrug therapy*) Profarmaci inattivi possono così essere somministrati, per esempio, per via iniettiva, ed essere attivati solo alla superficie del tumore.



Anticorpi monoclonali

ADEPT

- A causa della sua natura catalitica, ogni anticorpo-enzima coniugato attiverà molte molecole del profarmaco in questione, e molti degli agenti citotossico-attivi rilasciati alla superficie del tumore entreranno nelle cellule tumorali per *diffusione semplice*.
- I profarmaci usati per questa terapia dovrebbero essere poco costosi, prontamente biodisponibili e stabili alla degradazione chimica/enzimatica *in vivo*.
- Gli enzimi devono essere stabili in condizioni fisiologiche.
- Enzimi mammiferi sarebbero verosimilmente meno *immunogenici* di enzimi microbici.
- Tuttavia, l'uso di un profarmaco capace di essere attivato da un enzima mammifero potrebbe dare dei problemi nel caso in cui l'enzima endogeno (umano) fosse capace di attivare il farmaco in siti distanti dal tumore.

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Proprietà dell'antigene tumorale bersaglio

- ❖ Espressione tissutale selettiva
- ❖ Densità antigenica
- ❖ Espressione antigenica e affinità di legame
- ❖ Capacità di indurre i processi responsabili della morte cellulare

Anticorpi monoclonali

Terapie antitumorali

Differenti approcci nell'uso terapeutico degli anticorpi monoclonali

- ❖ Anticorpo immodificato o non coniugato
- ❖ Anticorpo monoclonale coniugato
- ❖ Frammenti di anticorpi monoclonali $F(ab')_2$
- ❖ Anticorpi monoclonali bispecifici

Anticorpi monoclonali

Scheda: La terapia anticorpale monoclonale con anti-HER2 umanizzato, un oncogene bersaglio biologico come agente Antitumorale

L'anticorpo monoclonale umanizzato anti-HER2 **Herceptin®** è stato sviluppato razionalmente per colpire specificamente l'oncogene HER2, che è noto per la sua attività nello sviluppo di diversi tumori.



Anticorpi monoclonali

Scheda: La terapia anticorpale monoclonale con anti-HER2 umanizzato, un oncogene bersaglio biologico come agente Antitumorale

Herceptin è un medicinale contenente il principio attivo **trastuzumab**. È disponibile in polvere, per la preparazione di una soluzione da somministrarsi per infusione (flebo) in vena, o come soluzione per iniezione sottocutanea.

Per che cosa si usa Herceptin?

Herceptin è usato nel trattamento dei seguenti tipi di tumore:

- carcinoma mammario **in fase iniziale** (quando il cancro è diffuso nella mammella o nelle ghiandole sotto il braccio ma non in altre parti del corpo) dopo intervento chirurgico, chemioterapia (medicinali per il trattamento del tumore) e radioterapia (trattamento mediante radiazioni) se del caso; può essere usato anche in uno stadio precedente del trattamento, in associazione a chemioterapia.

Anticorpi monoclonali

Scheda : La terapia anticorpale monoclonale con anti-HER2 umanizzato, un oncogene bersaglio biologico come agente Antitumorale

Per che cosa si usa Herceptin?

Herceptin è usato nel trattamento dei seguenti tipi di tumore:

Per tumori che sono avanzati localmente (compresi quelli infiammatori) o larghi più di 2 cm, Herceptin è usato prima di un intervento chirurgico assieme alla chemioterapia e poi ancora dopo l'intervento in monoterapia.

- carcinoma mammario metastatico (ossia che si è diffuso ad altre parti del corpo). Viene usato in monoterapia nei pazienti in cui i precedenti trattamenti non hanno avuto esito positivo. Viene anche somministrato in combinazione con altri medicinali antitumorali: con paclitaxel o docetaxel, o con un inibitore dell'aromatasi.

Anticorpi monoclonali

Scheda : La terapia anticorpale monoclonale con anti-HER2 umanizzato, un oncogene bersaglio biologico come agente Antitumorale

Per che cosa si usa Herceptin?

Quando usato come infusione endovenosa, Herceptin può anche essere usato per:

- tumore metastatico gastrico (dello stomaco), in associazione con cisplatino e capecitabina o 5-fluorouracile (altri medicinali antitumorali).

Herceptin può essere usato solo quando il tumore ha mostrato di “iper-esprimere” HER2: ciò significa che il tumore produce sulla superficie delle cellule tumorali elevate quantità di una proteina chiamata HER2, che fa crescere le cellule del tumore più velocemente.

Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

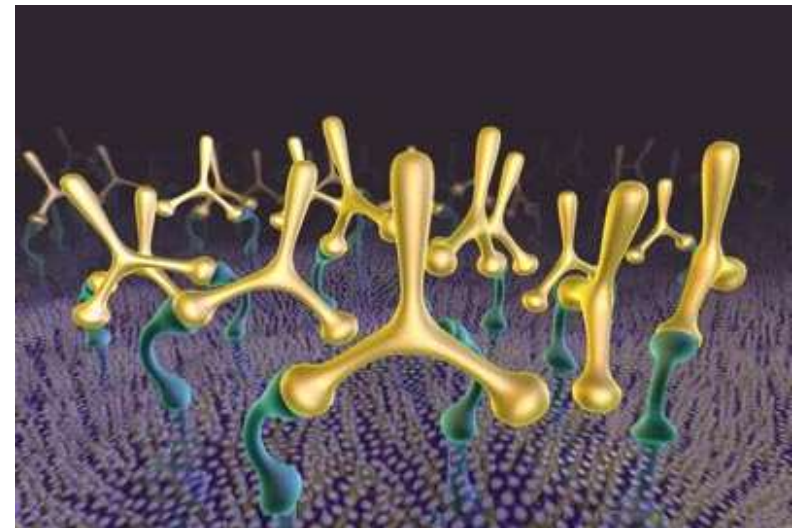
mAbs ottenuti per ingegneria genetica

Gene Her2 nel tumore al seno

- Il gene codifica per una proteina transmembrana di 185 kDa che è il sottotipo 2 del recettore per il fattore di crescita dell'epidermide umano (HER2).
- Recettore media la crescita cellulare.
- L'espressione del gene HER2 è aumentata del 40% nel tumore al seno.

❖ Herceptin (trastuzumab)

- Anticorpo monoclonale umanizzato
- Prodotto in cellule CHO
- Herceptin utilizzato con efficacia terapeutica nel tumore al seno
- Lega il dominio extracellulare del recettore EGF umano = recettore Her2 con una **Kd** = 5 nM



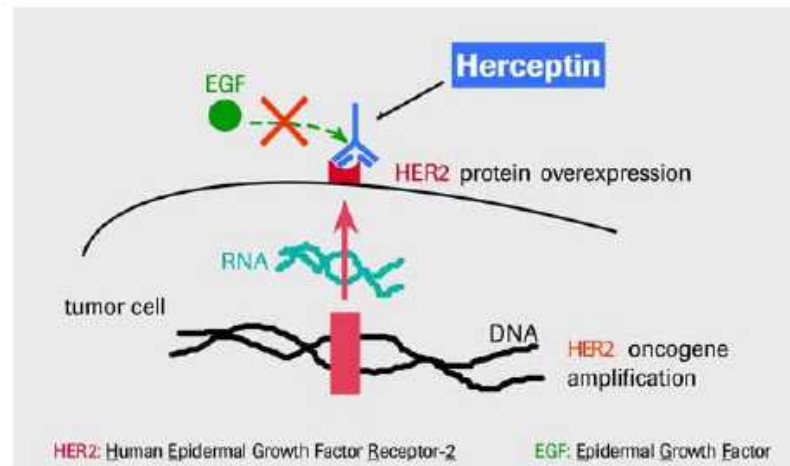
Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

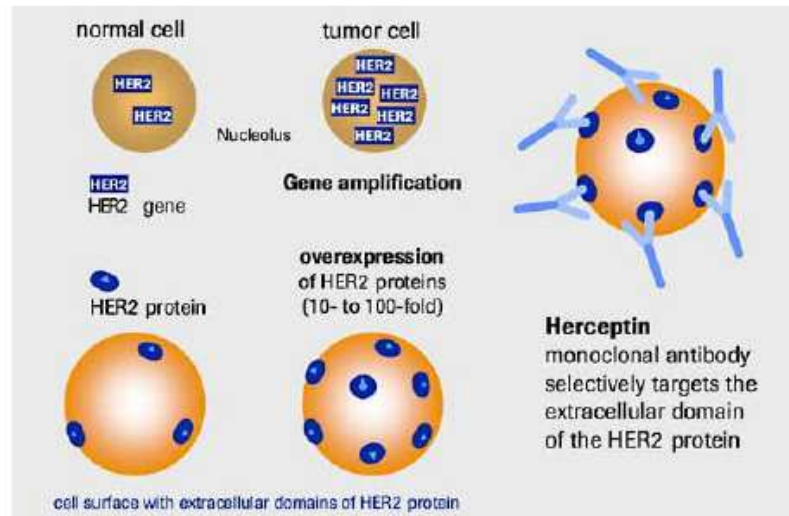
mAbs ottenuti per ingegneria genetica

❖ Herceptin (trastuzumab)

Legame selettivo al
recettore HER2



Azione selettiva
sulle cellule tumorali
a causa della elevata
espressione dei
recettori



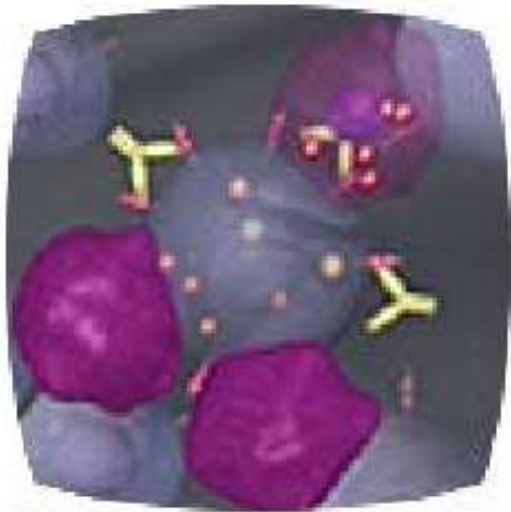
*I° meccanismo,
azione di
bloccaggio
della
propagazione*

Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

mAbs ottenuti per ingegneria genetica

❖ Herceptin (trastuzumab)



II° meccanismo d'azione, prevede l'attivazione di un meccanismo citotossico anticorpo-dipendente (ADCC) mediato dal reclutamento di cellule natural killer (NK) attratte dal complesso anticorpo-recettore HER2. Le cellule cancerose sono quindi distrutte da NK.

Anticorpi monoclonali

ALTRE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

Malattie cardiovascolari

Sono state sviluppate varie preparazioni di anticorpi che facilitano la *visualizzazione* di patologie cardiovascolari quali infarto del miocardio, trombosi, arteriosclerosi. Ad esempio, frammenti (Fab) di anticorpi monoclonali anti-miosina marcati con ¹¹¹In sono stati usati nella **diagnostica per immagini**, poiché l'anticorpo dimostra specificità per la miosina intracellulare cardiaca, che viene "esposta" solo in caso di infarto del miocardio.

Malattie infettive

Gli anticorpi monoclonali "per immagini" possono essere anche usati per *visualizzare* i siti o l'estensione di infezioni batteriche localizzate. Questo può essere fatto utilizzando anticorpi radiomarcanti che mostrino affinità di legame per specifici antigeni batterici di superficie. Un approccio indiretto prevede, invece, l'uso di anticorpi capaci di rivelare granulociti e vari altri leucociti che si concentrano al sito di infezione.

Anticorpi monoclonali

ALTRE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

Malattie autoimmuni

L'autoimmunità è la condizione in cui il sistema immunitario di un organismo *designa come bersaglio elementi di se stesso*, e questo deriva da errori di vari sistemi di controllo immunologici che sono normalmente responsabili del mantenimento dell'auto-tolleranza. E' stato stimato che circa il 2 % della popolazione degli Stati Uniti soffre di **malattie autoimmuni**, tra cui l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e alcune forme di diabete.

In molti casi la risposta autoimmune deriva dall'inappropriata attivazione di uno specifico sottoinsieme di linfociti B e/o T.

L'approccio immunoterapeutico più comune per trattare queste patologie consiste nel ridurre l'azione di una parte delle popolazioni cellulari T e B. Questo può essere fatto mediante la somministrazione di un anticorpo diretto contro un antigene di superficie di tali cellule.

I primi studi, per esempio, hanno dimostrato che l'iniezione di un anticorpo non coniugato anti CD-4 (glicoproteina di superficie presente su molti linfociti T) in sette giorni riduce significativamente i sintomi clinici dell'artrite reumatoide e l'effetto dura per diversi mesi.

Anticorpi monoclonali

ALTRE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

Prevenzione del rigetto nel trapianto di organi

Negli anni '70 si è ritornati a prendere in considerazione l'immunizzazione passiva come mezzo per prevenire il rigetto immunitario degli organi trapiantati. Il criterio logico era quello di somministrare ai pazienti un anticorpo specifico che si legasse a certi linfociti, diminuendo la risposta immunitaria diretta contro l'organo trapiantato. Il primo ad essere approvato dalla *Food and Drug Administration* americana come agente immunosoppressore per il trapianto nell'uomo fu l'anticorpo monoclonale del topo OKT-3. I linfociti che si differenziano nel timo si chiamano cellule T e vari membri della popolazione delle cellule T agiscono come cellule aiutanti immunitarie ed effettrici, per cui rispondono del rigetto dell'organo. L'anticorpo monoclonale OKT-3 si fissa su un recettore della superficie cellulare detto CD3, presente sulle cellule T, e **tale azione impedisce la piena risposta immunitaria e risparmia il rigetto all'organo trapiantato.** L'immunosoppressione effettuata con questi mezzi è stata accettabilmente efficace, anche se, come previsto, non sono mancati effetti secondari come febbre ed eruzione cutanea.

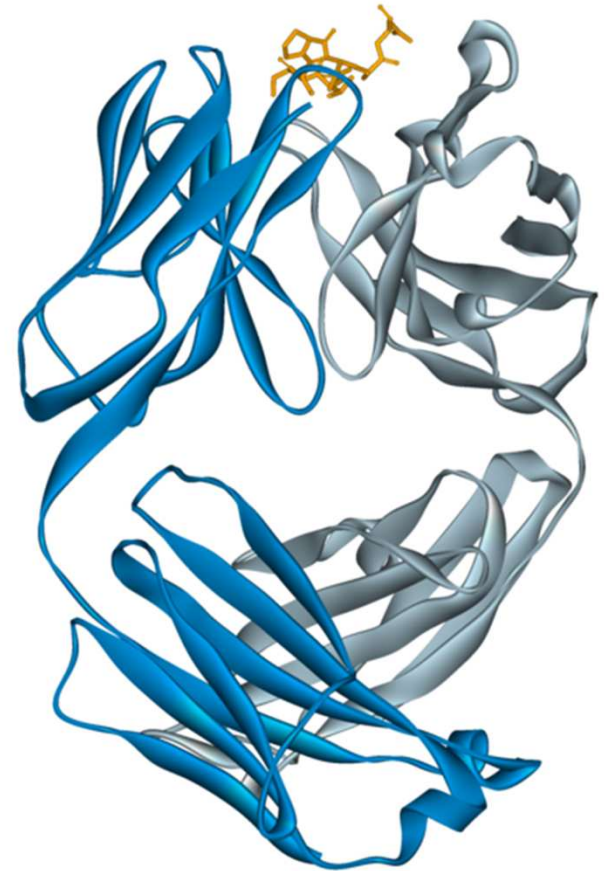
Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

mAbs ottenuti per ingegneria genetica

❖ Campath (alemtuzumab)

- Usato per il trattamento terapeutico delle leucemia cronica da linfociti B (B-CLL) in pazienti dove l'utilizzo di altri medicinali è risultato inefficace. Campath migliora notevolmente la sintomatologia della B-CLL e aumenta l'aspettativa di vita.
- Alemtuzumab lega in maniera specifica l'antigene *CD52* espresso sulla superficie dei linfociti ma non delle *cellule staminali* da cui questi linfociti derivano.
- Frammento Anticorpo monoclonale umanizzato (Fab)
- In fase di approvazione per la cura della Sclerosi Multipla.

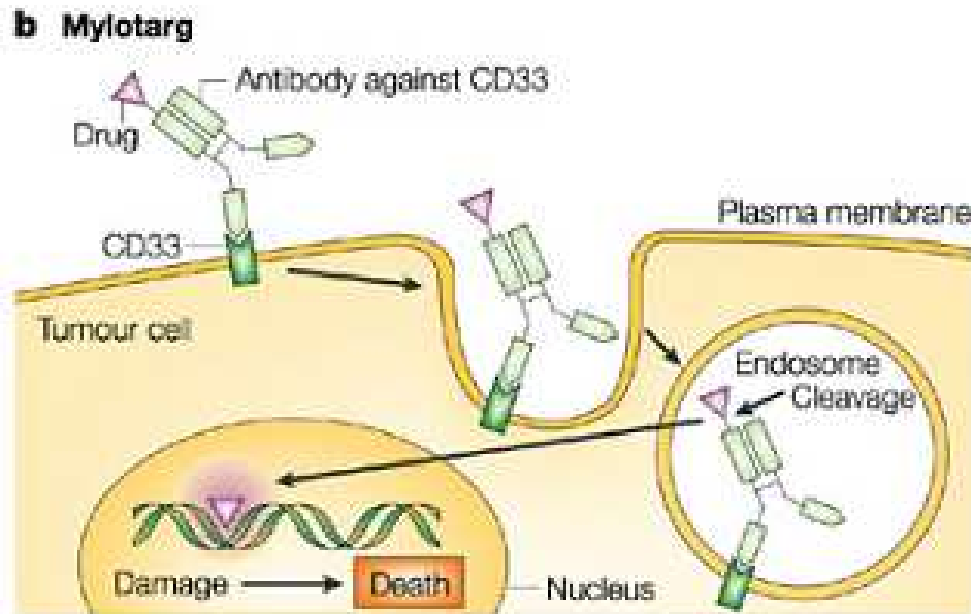


Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

Complesso anticorpo-farmaco

❖ Mylotarg (gemtuzumab)



➤ MAb + *Calicheamicina*

➤ La porzione anticorpale è diretta contro il CD33 (presente sulla superficie cellulare)

➤ CD33, è una proteina di adesione abbondante sulla superficie di cellule di **leucemia mieloide acuta**, ma assente nelle normali cellule staminali ematiche.

➤ Le cellule tumorali si accumulano nel midollo ed ne impediscono lo sviluppo e le normali funzioni: Tumore ad elevata frequenza di mortalità

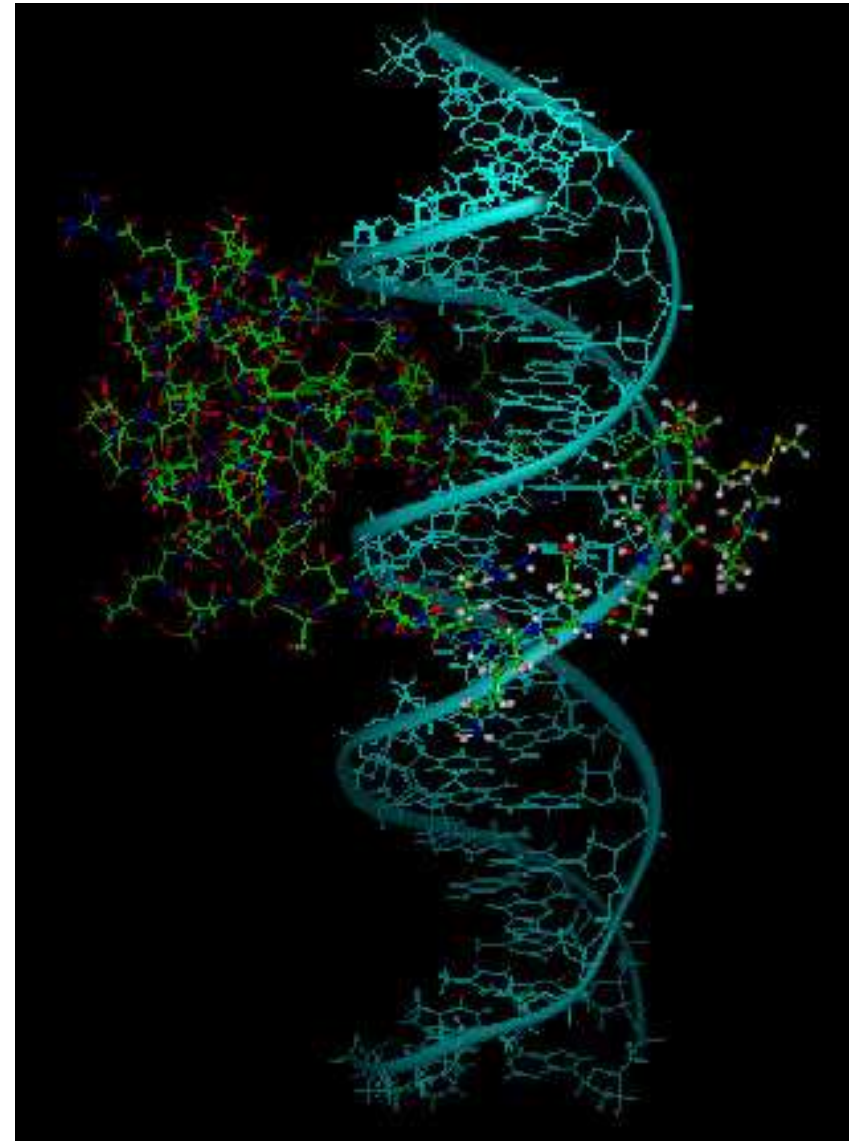
Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

Complesso anticorpo-farmaco

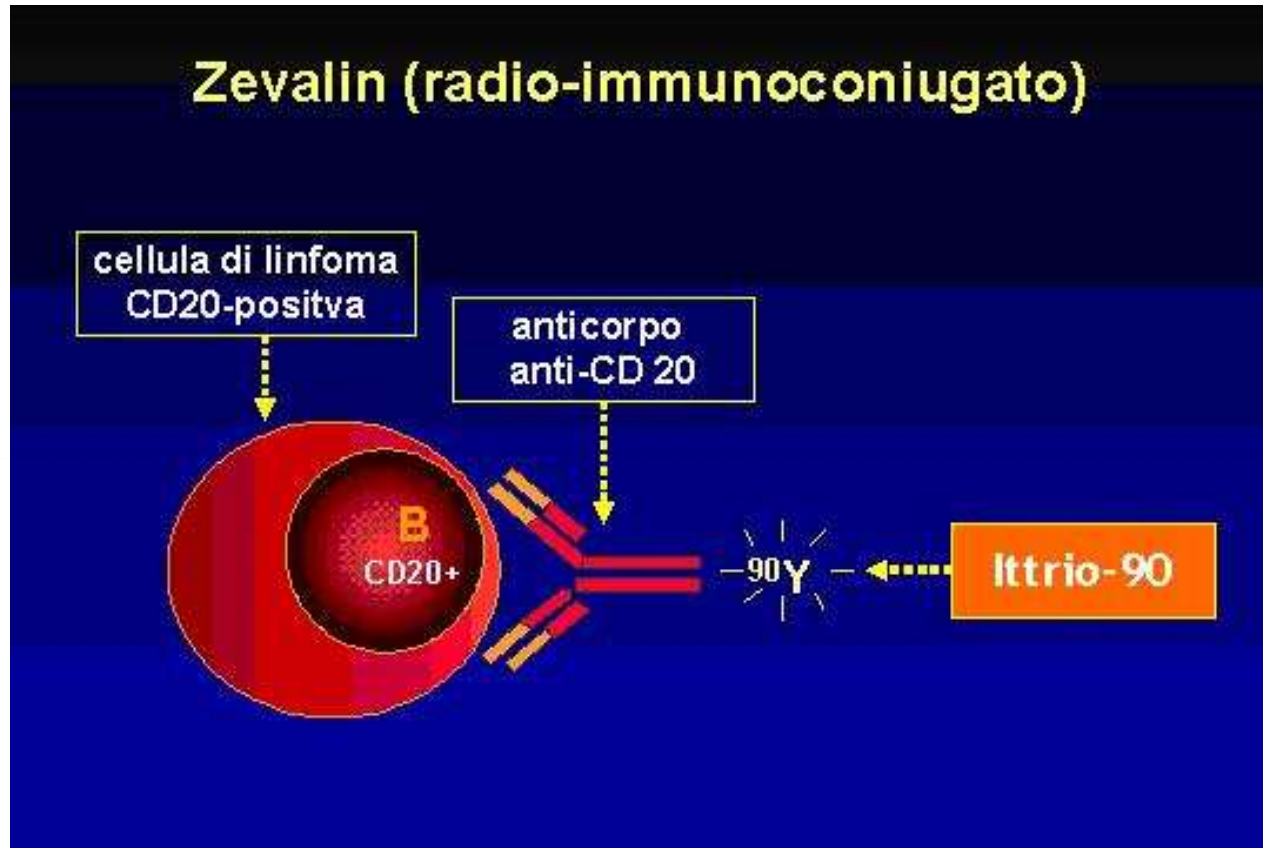
❖ Mylotarg (gemtuzumab)

- Calicheamicina è un potente farmaco anti-tumorale, provoca citotossicità mediante un *meccanismo di intercalazione* con il DNA
- La *Calicheamicina* causa rottura della doppia elica del DNA
- Il DNA non si replica e la cellula va incontro ad apoptosi
- La presenza di anticorpi contro il CD33 sulla superficie cellulare indirizza la *calicheamicina* in maniera selettiva alle cellule tumorali, provocandone la morte



Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo



❖ Zevalin (Ibritumomab)

Zevalin radiomarcato con [^{90}Y] è indicato come terapia di consolidamento dopo l'induzione della remissione in pazienti con linfoma follicolare non pretrattati, o trattamento di pazienti adulti affetti da linfoma non-Hodgkin (NHL) follicolare a cellule B CD20+ ricaduti o refrattari a rituximab.

Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

❖ **Malattie autoimmuni**

Le malattie autoimmuni sono quindi quel gruppo di patologie causate dall'alterazione del sistema immunitario, che reagisce contro i tessuti dell'organismo stesso.

Malattie su base autoimmunitaria

Artrite reumatoide

Lupus Eritematoso

Morbo di Chron

Malattie da risposta allergica-infiammatoria

Asma

Terapie anti-rigetto dopo trapianto d'organo

Alcuni Immunosoppressori presenti in commercio:

OKT-3

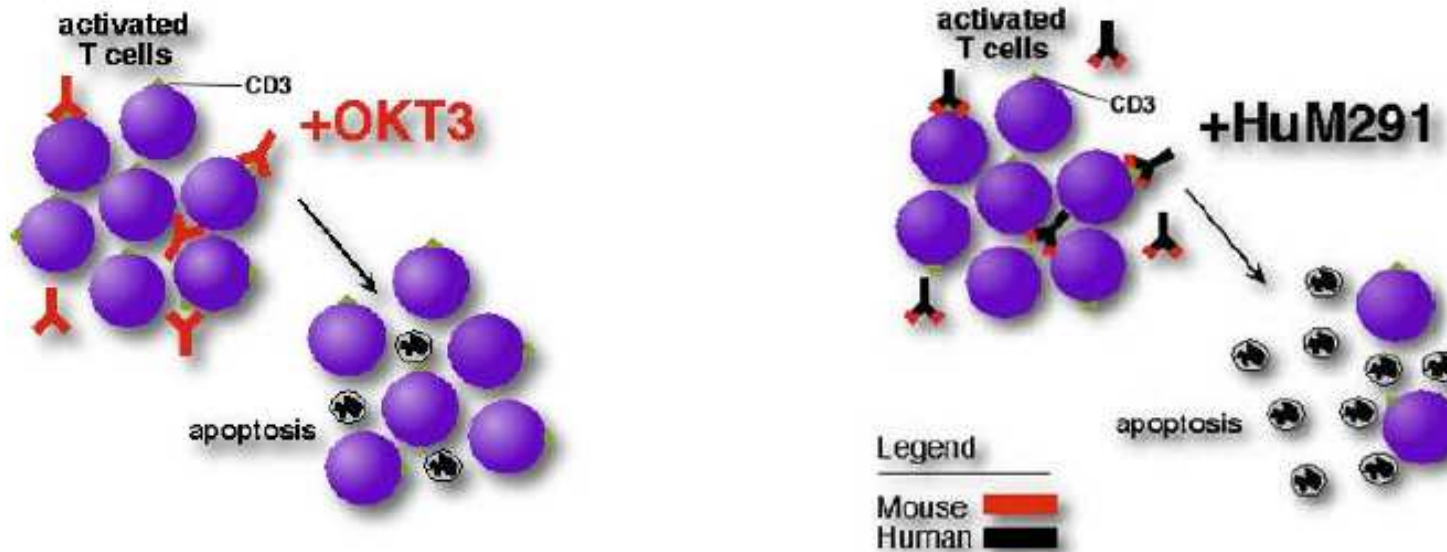
Remicade

Xolair

Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

❖ OKT-3 (muromonab)



Farmaco anti-rigetto

Anticorpo murino contro i recettori CD3 dei linfociti T attivati. Il legame ne determina apoptosi

Effetti collaterali: Rischio di infezioni severe (CMV)

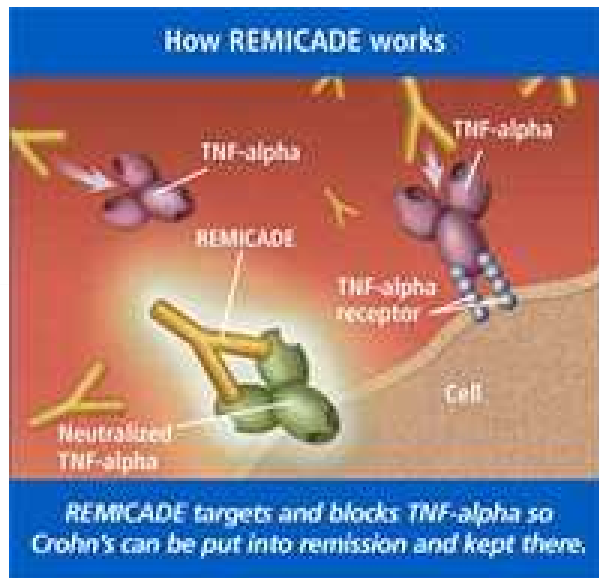
Risposta anticorpale che inattiva l'azione terapeutica

Anticorpi umanizzati, introdotti successivamente, riducono il rischio di risposta anticorpale

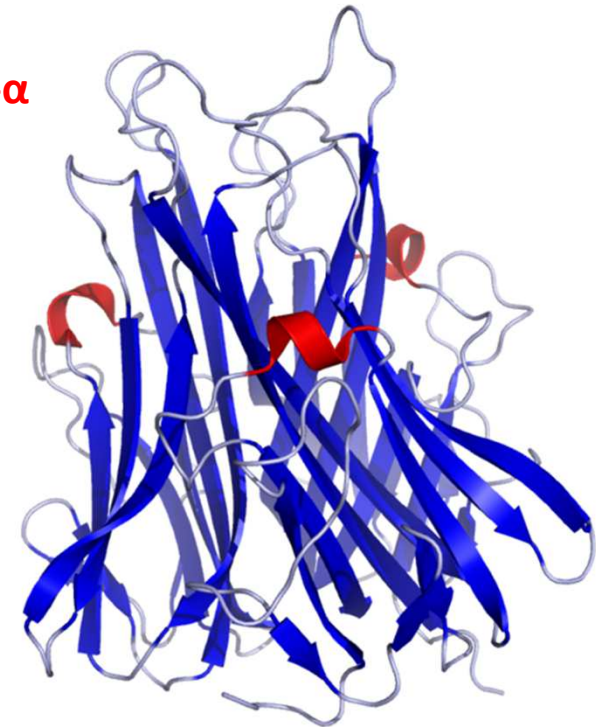
Anticorpi monoclonali

Prodotti in commercio e/o sviluppo

❖ Remicade (infliximab)

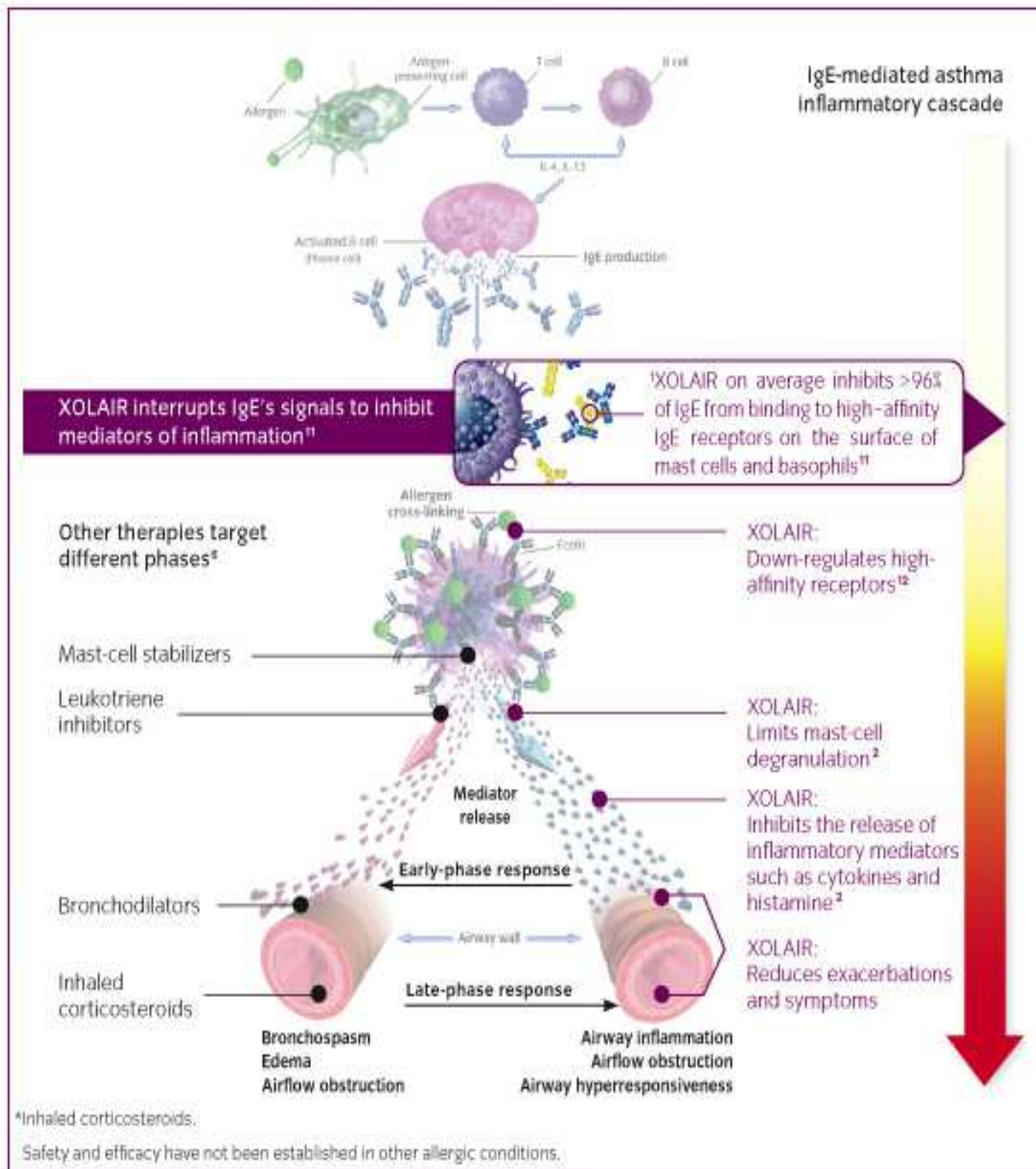


TNF- α



TNF- α

Il **fattore di necrosi tumorale** è una citochina coinvolta nella infiammazione sistemica ed è membro di un gruppo di citochine che stimolano la reazione della fase acuta. Il TNF è coinvolto in numerosissimi processi come la morte apoptotica delle cellule, la proliferazione, il differenziamento, la cencerogenesi e la replicazione virale. Il principale ruolo del TNF è nella regolazione delle cellule del sistema immunitario. Difetti nella regolazione, in particolare la **sovraproduzione di TNF**, sono implicati in numerose malattie umane, come il cancro.



❖ **Xolair (omalizumab)**

Anticorpo monoclonale

umanizzato, approvato da FDA

➤ Usato per trattare l'asma persistente (malattia ad ampia diffusione su base infiammatoria ed allergica)

➤ Asma allergica è scatenata dal legame IgE allergene-specifiche che innesca il rilascio di istamina.

➤ Xolair lega le molecole di IgE e previene l'attivazione del recettore e l'inizio della cascata infiammatoria

Produzione di proteine ricombinanti

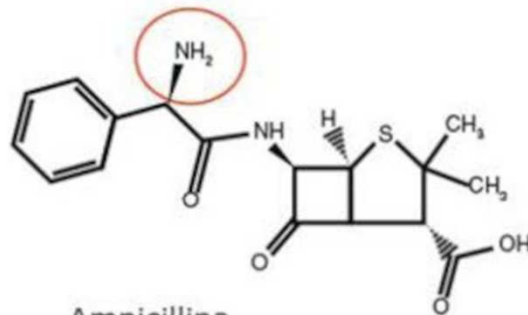
Piccole molecole (farmaci su base chimica)	Biologici (farmaci su base proteica)
Dimensioni piccole	Dimensioni grandi
Struttura semplice e ben definita	Struttura complessa con molte possibilità di modifiche post-trascrizionali
Produzione: processo chimico prevedibile. Possono essere fatte copie identiche: generici	Ogni produzione è effettuata in un'unica linea cellulare vitale. Possono essere fatte copie simili ma non identiche: biosimilari
Caratterizzazione facile e completa	Difficile caratterizzazione di una miscela di molecole correlate
Relativamente stabili	Sensibili alle condizioni di stoccaggio e manipolazione
Basso potenziale di immunogenicità	Alto potenziale di immunogenicità

Produzione di proteine ricombinanti

FARMACO SINTETIZZATO CHIMICAMENTE

Processo-struttura-funzione definiti

Completa conoscenza della chimica e della fisica

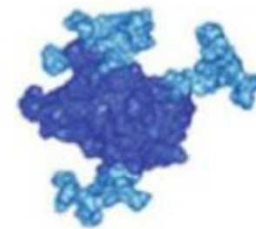


Ampicillina

BIOLOGICO

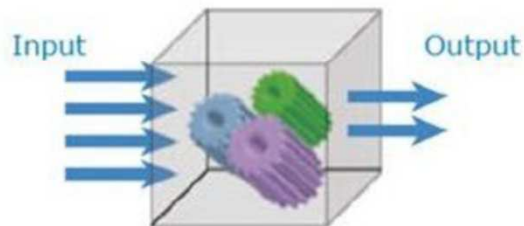
Processo-struttura-funzione correlati

Parziale conoscenza della chimica e della fisica



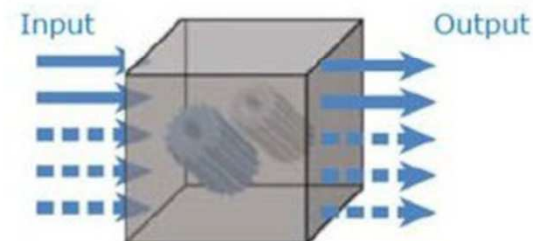
Eritropoietina >4.000 atomi

Conoscenza e misura di tutti gli input e output di rilievo



Un unico principio attivo definito la cui identità è correlata inequivocabilmente al suo profilo di efficacia e sicurezza (E&S)

Impossibilità di identificazione e misura di tutti gli input e output



Principio attivo eterogeneo e parzialmente definito correlato al profilo di efficacia e sicurezza - subordinato alla costanza del processo



- ① Processo chimico
- ② Struttura definita
- ③ Funzione (E&S definite)

Nella produzione di un principio attivo costituito da una piccola molecola

- ◆ il rapporto tra il processo chimico e l'ingrediente attivo risultante è ben noto
- ◆ i risultati inattesi sono relativamente rari
- ◆ i test di qualità di routine possono verificare la struttura del principio attivo di tutti i lotti e fornire un elevato livello di affidabilità che la funzione del prodotto (profilo di sicurezza e di efficacia) sarà esattamente come stabilito per il prodotto.

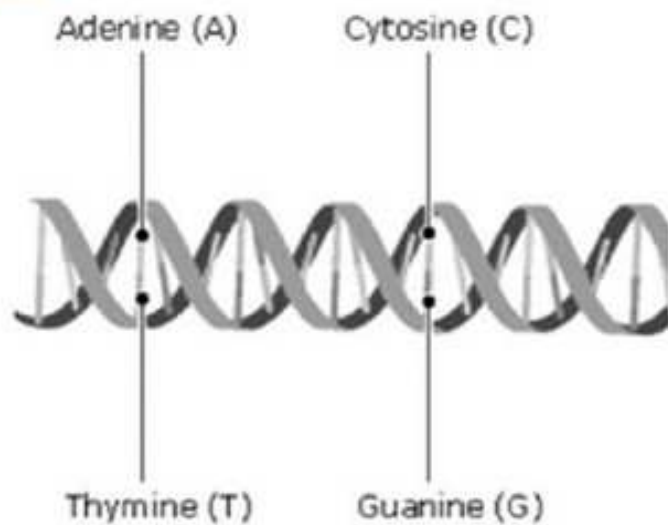


- ① Processo biologico
- ② Struttura complessa
- ③ Funzione

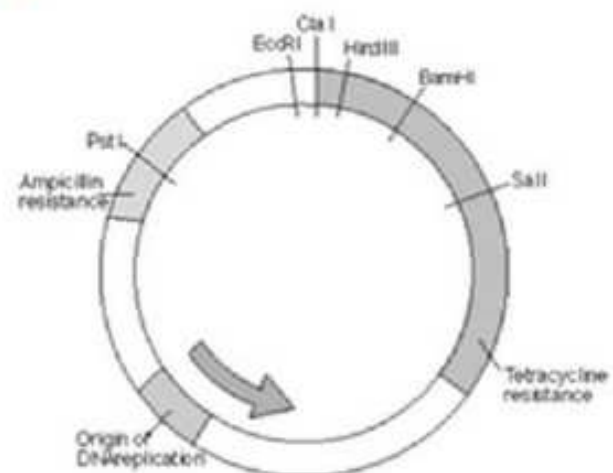
Nella produzione di un biologico mediante un processo biotecnologico:

- ◆ la relazione tra i parametri di processo e la struttura è solo parzialmente determinata
- ◆ esiste sempre la possibilità di imprevisti quando gli input di processo (materie prime, procedure e controlli) si allontanano un po' dai loro intervalli storici
- ◆ non è possibile definire, misurare o caratterizzare tutti gli input di processo o gli attributi strutturali
- ◆ i test di routine di qualità non possono inequivocabilmente confermare che la struttura di un biologico sia entro i valori storici
- ◆ le variazioni della struttura possono passare inosservate, ed avere impatto incognito sulla funzione del prodotto (profilo di sicurezza e di efficacia).

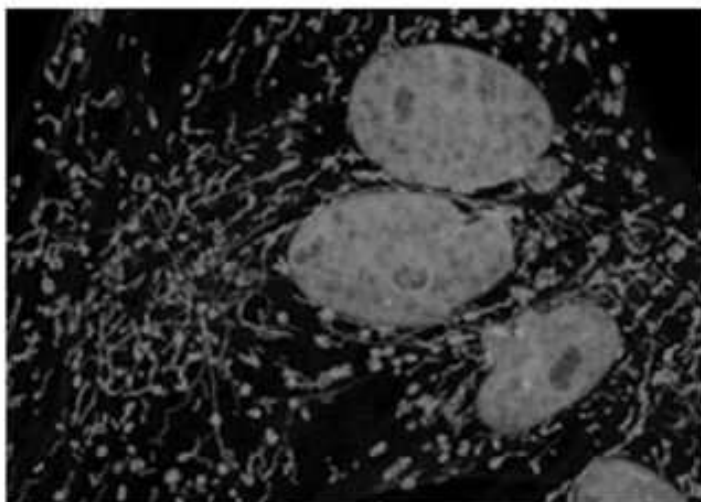
① Scelta della sequenza



② Clonazione



③ Espressione cellulare



④ Fermentazione



Produzione di anticorpi monoclonali mediante coltura di cellule animali

1. **Immunizzazione dell'animale con l'antigene specifico**
2. **Formazione e selezione degli ibridomi (mieloma cells/milza cells)**
 1. Terreno HAT
 2. Crescita 10-14 giorni (sopravvivenza dei soli ibridomi)
 3. Trasferimento in coltura –HAT
3. **Identificazione delle cellule ibride che producono l'anticorpo specifico**
 1. Immunodosaggio (ELISA assay)
 2. Isolamento degli ibridomi (feeder layer)
 3. Ottenimento dei cloni (immunodosaggio finale) e mantenimento dei cloni
4. **Fermentazione degli ibridomi**

Produzione di anticorpi monoclonali mediante coltura di cellule animali

Sistemi selettivi per l'isolamento di ibridomi: clonaggio su feeder layer

Scopo = ottenimento di colture cellulari provenienti dall'espansione clonale di una singola cellula.

Feeder layer: Cellule di supporto (es. macrofagi murini) con la funzione di condizionare il terreno di coltura e permettere la crescita di ibridomi in condizioni di bassa concentrazione.

- Clonaggio in agar
- Clonaggio in diluizione limite

Produzione di anticorpi monoclonali mediante coltura di cellule animali

Sistemi selettivi per l'isolamento di ibridomi: clonaggio su feeder layer in diluizione limite

Mediante microscopia in piastre a 96 pozzetti il clone madre è diluito (circa 60 cells per piastra ossia 1-5 cells per pozzetto) e distribuito. Dopo 3 giorni si osserva la presenza di piccoli cloni di cellule di ibridomi in ciascun singolo pozzetto (elevata possibilità di origine dei cloni da un'unica cellula).

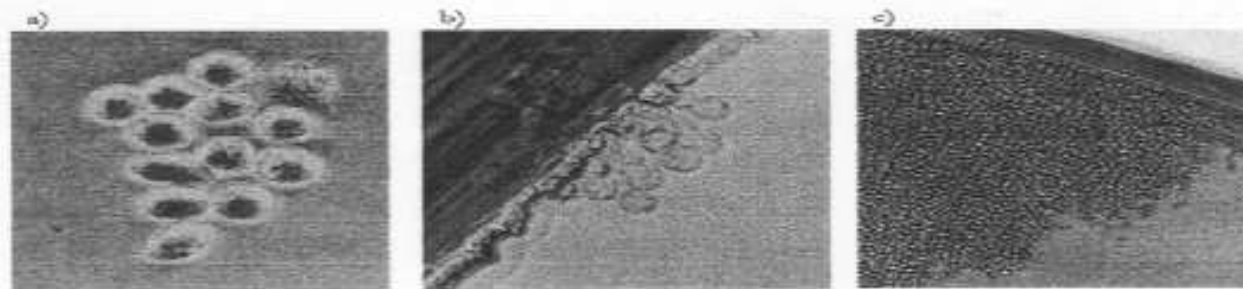


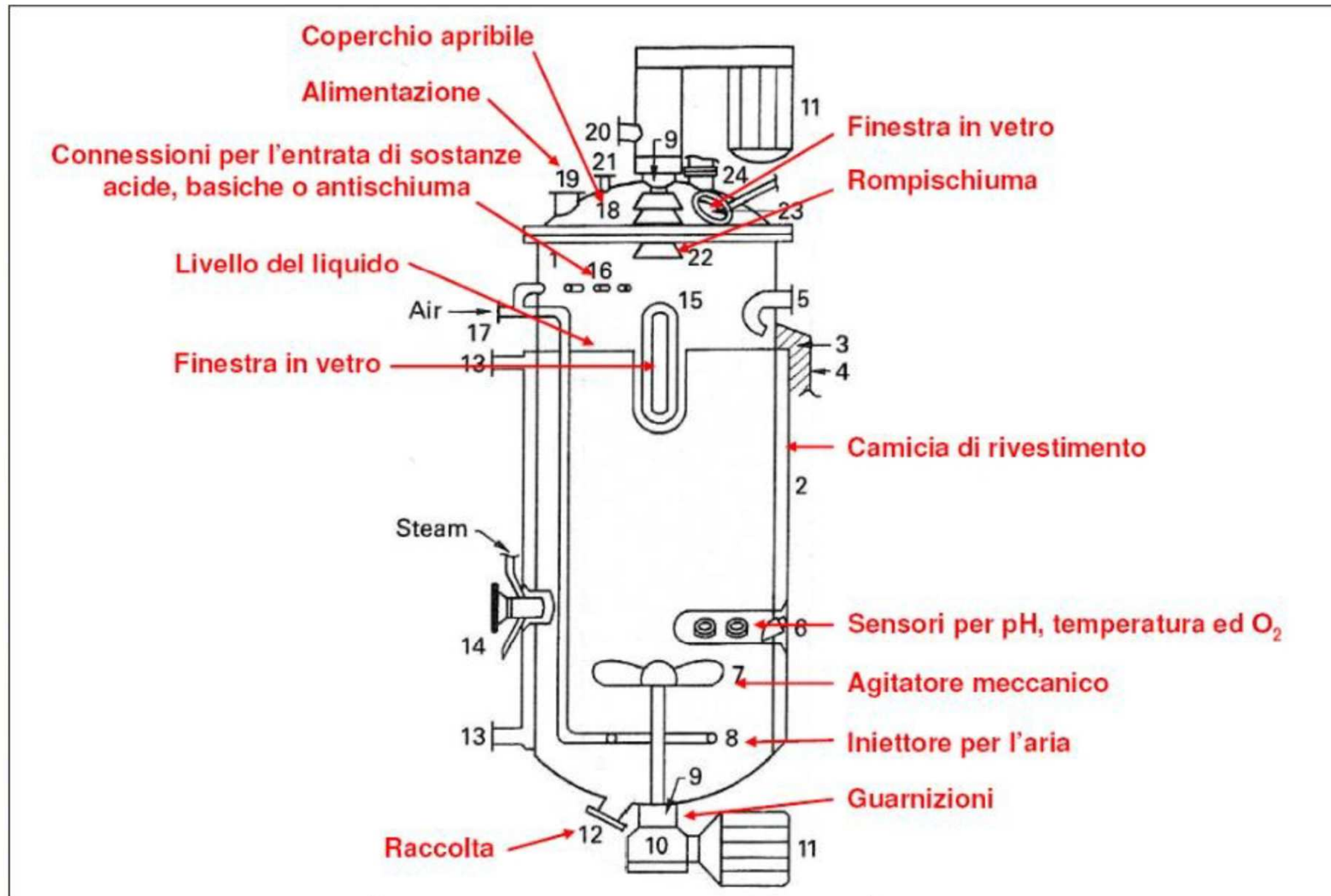
Figura 15. a) Cellule di ibridoma (clone 27D6) nelle prime fasi del clonaggio; b) Cellule di ibridoma (clone 27D6) addossate alla parete del pozzetto; c) Clone derivato dalle cellule in figura b) dopo 7 giorni.

Sistemi di coltivazione

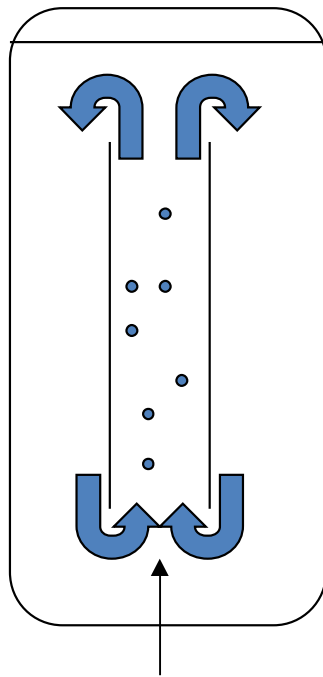
- La costruzione e l'utilizzo di un **bioreattore** non sono certamente operazioni banali. Per questo motivo, occorre un controllo costante delle concentrazioni di gas (come O_2 , N_2 , CO_2), della temperatura, del pH e della velocità di rimescolamento del contenuto del bioreattore.
- La maggior parte dei bioreattori industriali sono dotati di sensori per monitorare ogni parametro e di un software in grado di gestire tali informazioni per poterle fornire all'operatore.
- La presenza di *sporco* può danneggiare i dispositivi dello strumento, in particolare lo scambiatore di calore. Per evitare danni, il bioreattore deve essere facilmente pulibile e composto di superfici lisce (per questo, la forma più comune è quella cilindrica).
- Lo scambiatore di calore è necessario per mantenere il *bioprocesso* ad una temperatura costante. Spesso le fermentazioni biologiche sono una grande fonte di calore, motivo per cui è richiesta una fonte refrigerante. Tale dispositivo può consistere di una sorta di intercapedine isolante esterna oppure di una serpentina refrigerante interna.

Bioreattore ad agitazione meccanica

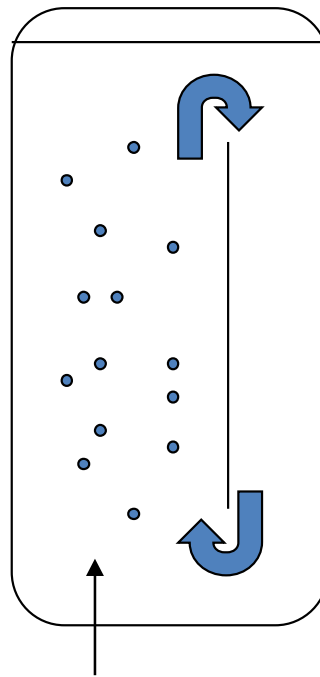
Bioreattori: caratteristiche generali



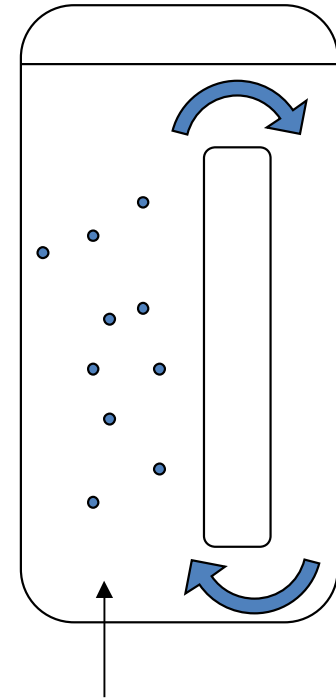
Bioreattori con agitazione pneumatica



Aria



Aria



Aria

Fermentazioni

Bioreattori **discontinui (a lotti)**:

- **Bioreattori Batch:** In questi sistemi chiusi, il substrato e i microrganismi vengono introdotti all'inizio del processo. La fermentazione procede senza ulteriori aggiunte fino al completamento. Questo metodo è comunemente utilizzato per la produzione di *antibiotici e altri metaboliti secondari*. Vengono sterilizzati prima dell'avviamento del processo, che può avere una durata variabile da uno-due giorni ad una settimana. In questo modo è necessario ripetere frequentemente l'operazione di pulizia e sterilizzazione del reattore, ma così facendo sono assicurate, d'altra parte, le *condizioni di asetticità* del processo per tutto il ciclo di lavorazione.
- **Bioreattori Fed-Batch:** Simili ai batch, ma con l'aggiunta graduale di nutrienti durante il processo. Questo approccio previene l'inibizione dovuta all'accumulo di prodotti tossici o all'esaurimento dei nutrienti, migliorando la resa e il controllo del metabolismo microbico. Adatti alla produzione di **mAb**.



- L'industria farmaceutica sta esplorando nuovi modi di produzione a causa delle mutevoli dinamiche del mercato, come piccoli lotti per la medicina di precisione. Anche i **bioreattori monouso (batch)** stanno guadagnando popolarità poiché riducono i tempi di fermo e aumentano la produttività. Questi bioreattori ottengono questo risultato eliminando fasi complesse come la **pulizia e la convalida tra fasi di produzione separate**. Nuovi tipi di sistemi di bioreattori e processi di produzione continua affrontano la crescente attenzione ai biofarmaci. Oltre a eliminare i tempi di fermo, la produzione ha un **basso fabbisogno energetico**, raggiunge **un'elevata produttività** e **riduce al minimo la quantità di rifiuti**.

Fermentazioni

Bioreattori **continui**:

- **Bioreattori Continui:** In questi sistemi, il substrato viene continuamente aggiunto e il prodotto rimosso, mantenendo la coltura in uno **stato stazionario**. Questo metodo è ideale per la *produzione di enzimi e biomolecole terapeutiche (mAb)*, offrendo una produzione costante e di elevata qualità. Il ciclo di lavorazione può durare parecchi giorni, ma può essere più difficile mantenere *le condizioni di asetticità* e la stabilità delle colture ed è necessario assicurare la sterilità dei materiali introdotti.
- **Bioreattori a letto Fluido:** Caratterizzati da particelle solide sospese nel mezzo liquido, questi bioreattori migliorano la miscelazione e il trasferimento di massa. Sono utilizzati in applicazioni avanzate, come la coltura di cellule vegetali o animali *per la produzione di biofarmaci (ad es. vaccini)*.

Fermentazioni

Bioreattori **continui**:

- **Bioreattori a membrana:** Dotati di sistemi di filtrazione che separano la biomassa dal prodotto finale, questi bioreattori garantiscono una maggiore purezza del prodotto. Sono particolarmente utili quando è necessaria la separazione di cellule da enzimi o metaboliti (ad es. vaccini).

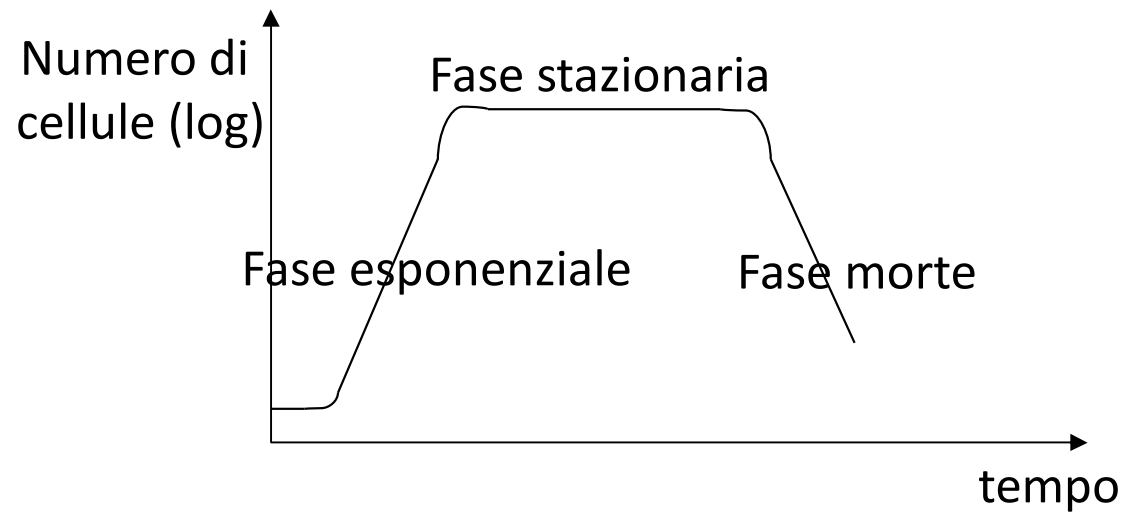
Fermentazioni

Protocolli fermentazioni discontinue:

1. **Inoculo:** Preparazione della coltura microbica in un ambiente controllato per garantire una crescita ottimale.
2. **Fase di crescita esponenziale:** Il microrganismo si moltiplica rapidamente, consumando i nutrienti e producendo il metabolita di interesse.
3. **Fase stazionaria:** L'accumulo del prodotto e il consumo dei nutrienti rallentano la crescita.
4. **Raccolta del prodotto:** Separazione della biomassa dal prodotto desiderato tramite centrifugazione, filtrazione o altre tecniche di purificazione.

Fermentazioni

Protocolli fermentazioni discontinue:



Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo I

- Nutrienti e biomassa in equilibrio: ciò che entra ed esce è costante. Il microrganismo è in crescita bilanciata, tutti i componenti aumentano in proporzione.
- Il prodotto è intracellulare (enzimi, cellule stesse) e viene raccolto insieme alla biomassa.
- La produzione avviene solo durante la crescita (nessuna produzione secondaria).
- **Nessuna fase stazionaria o di morte**, il sistema raggiunge uno **steady state** (stato stazionario \neq fase stazionaria)

Fermentazioni

Fermentazione di tipo I

Si raggiunge un equilibrio dinamico in cui:

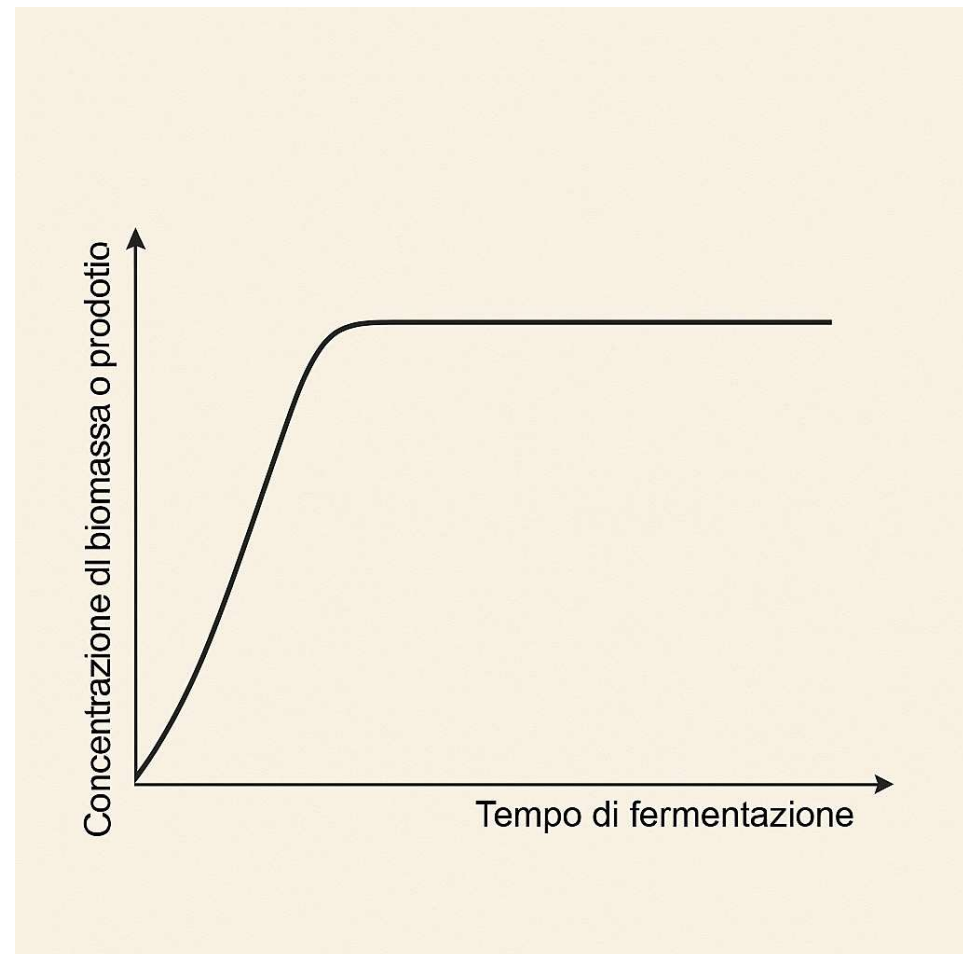
$$dX/dt=0,$$

$$dS/dt=0,$$

$$dP/dt=0,$$

(X = biomassa, S = substrato, P = prodotto).

•Le **concentrazioni restano costanti nel tempo**, ma il sistema non è fermo: materia e energia fluiscono continuamente.



Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo II

- Produzione di un metabolita associato alla crescita.
- La biomassa raggiunge lo steady-state, ma il prodotto può ancora accumularsi.
- È richiesta una regolazione fine del **tasso di diluizione (D)** per mantenere equilibrio tra crescita e produzione.
- Il sistema rimane dinamico, ma si cerca di massimizzare la resa del prodotto, non della biomassa.

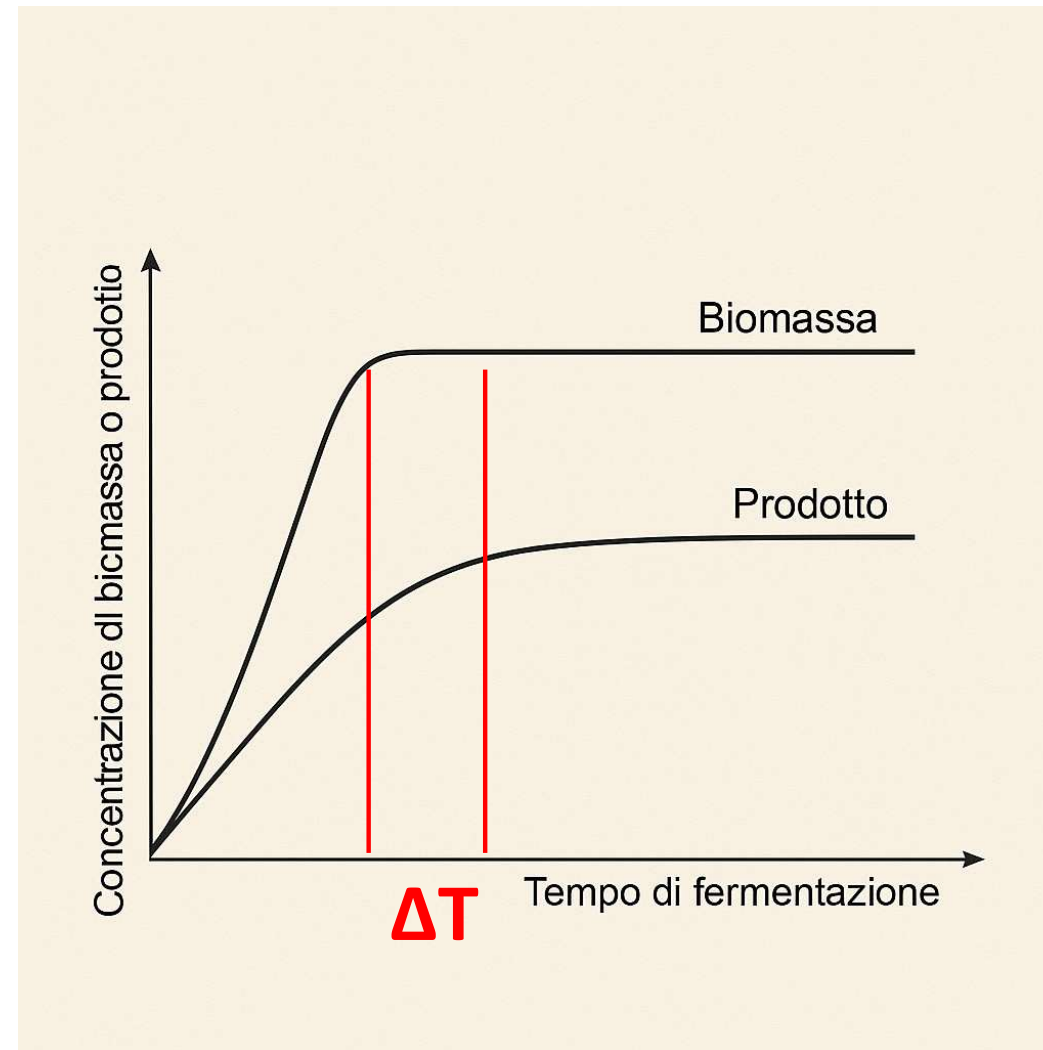
Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo II

ΔT (tempo di induzione metabolica) dovuto a:

- la biomassa attiva produca gli enzimi coinvolti nella sintesi del metabolita;
- la produzione entri nel regime di accumulo bilanciato, una volta stabilizzato lo steady-state;
- si raggiunga una concentrazione intracellulare di enzimi o precursori sufficiente a far comparire il prodotto nel flusso di uscita.



Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo II

- **Tasso di diluizione (D)** rappresenta la velocità con cui il mezzo fresco entra nel bioreattore (e viene rimosso il brodo di coltura) in rapporto al volume totale del reattore.

$$D = F / V$$

Dove

- F = portata volumetrica del flusso di alimentazione (L/h)
- V = volume del liquido nel bioreattore (L)
- D = tasso di diluizione (h^{-1})

Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo II

$$D = F / V$$

Se D è troppo basso → le cellule restano a lungo, ma i nutrienti si esauriscono → **crescita lenta**.

Se D è troppo alto → il mezzo viene sostituito troppo rapidamente → **le cellule vengono lavate via** (wash-out).

Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden): Fermentazione di tipo III

- Per la produzione di metaboliti non associati alla crescita. Il prodotto è sintetizzato dopo la fase di crescita attiva, quando la biomassa è ormai stabile.
- La **produzione è disaccoppiata dalla crescita**: la biomassa agisce come sistema cellulare attivo ma non proliferante, responsabile della sintesi del metabolita secondario.
- Il flusso di substrato viene regolato per mantenere le cellule in stato fisiologico *semi-stressato* (*la cellula smette di duplicarsi ma attiva vie secondarie per sopravvivere*), che stimola la produzione di metaboliti secondari. **Le condizioni nel bioreattore vengono regolate in modo da non essere ottimali per la crescita, ma ancora sufficienti per la vita cellulare.**
- Può richiedere un reattore multistadio (una sezione per la crescita, una per la produzione).

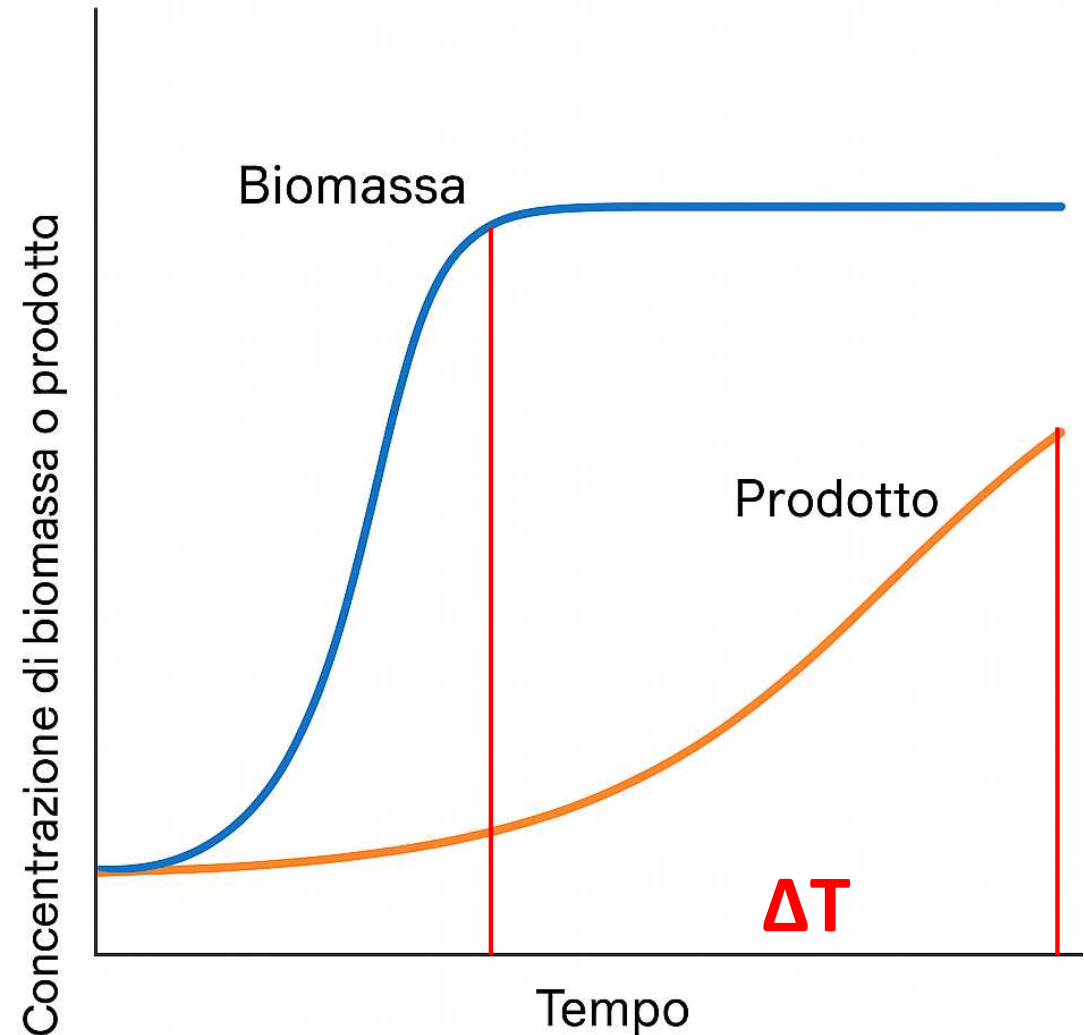
Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue (classificazione di Gaden):

Fermentazione di tipo III

ΔT (tempo di induzione metabolica) dovuto a:

- La biomassa cresce fino allo steady-state e poi rimane costante o cala lievemente.
- Il prodotto inizia ad accumularsi solo dopo che la biomassa è già stabile $\rightarrow \Delta T$ più ampio.
- Se il processo è a due stadi, la seconda sezione (reattore di produzione) mostra solo accumulo del prodotto.



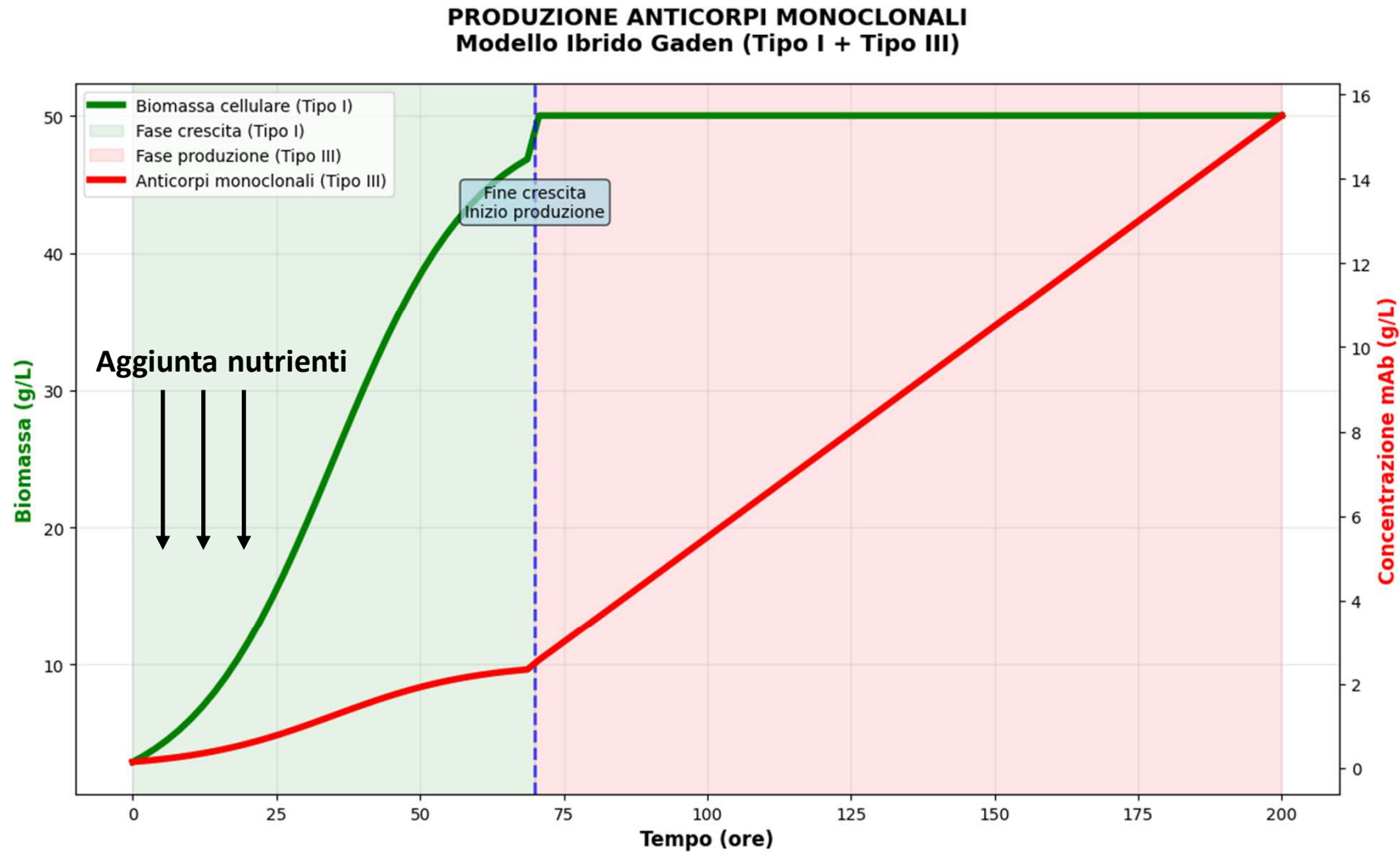
Fermentazioni

Protocolli fermentazioni continue :

Fermentazione ibrida (caso mAb)

- **Sistema biologico: Cellule mammiere** (es. CHO, NS0, HEK293) in coltura sospesa (cellule crescono libere nel mezzo). Crescita più lenta, metabolismo complesso, sensibilità a pH, ossigeno.
- **Obiettivo del processo:** Non la biomassa, ma la produzione del metabolita secondario complesso (anticorpo). Tuttavia, la produzione dipende da una **biomassa attiva e sana** → **legame con il tipo I**.
- **Modalità operativa:** Generalmente fed-batch prolungato o semi-continuo (per evitare accumulo di tossine e perdita di vitalità). Controllo stretto di nutrienti e metaboliti (glucosio, lattato, ammonio). Durata: da 7 a 21 giorni, con diverse fasi di crescita e produzione.
- **Dinamica biomassa/prodotto:** La biomassa cresce e poi si stabilizza (tipo I). **La produzione di anticorpo inizia dopo la crescita e continua anche in fase di mantenimento metabolico (tipo III)**. C'è un **ΔT marcato** tra il massimo di crescita e la fase di produzione efficace.
- **Stato fisiologico:** Le cellule entrano in una condizione metabolicamente attiva ma non proliferante, ottimale per la secrezione del prodotto.

Fermentazioni ibride (mAb)



FASE I (Tipo Gaden I): Crescita biomassa → Le cellule si moltiplicano rapidamente
FASE II (Tipo Gaden III): Produzione mAb → Le cellule smettono di crescere e producono anticorpi

Fermentazioni ibride (mAb)

Nelle fermentazioni ibride per mAb, le cellule non vengono stressate per produrre, ma delicatamente rallentate per concentrare il metabolismo sulla secrezione dell'anticorpo, mantenendo alta vitalità e qualità del prodotto. Si parla più propriamente di **controllo metabolico adattivo**, non di "semi-stress".

Metodi:

1. Riduzione graduale di glucosio e glutammina → Diminuisce il tasso di crescita → Meno energia per duplicarsi, più per sintetizzare mAb.
2. Controllo del pH ($\approx 7.0-7.2$) → Evita accumulo di ammonio → Stabilità del prodotto e vitalità.
3. Ossigeno leggermente limitato (non ipossia) → Bilancio energetico più efficiente → Riduce stress ossidativo.
4. Aggiunta controllata di nutrienti e precursori proteici → Supporta metabolismo secretorio → Massimizza la produttività specifica.
5. Rimozione parziale di sottoprodotti tossici (CO_2 , lattato) → Evita stress reale → Mantiene vitalità > 90 %

Crescita ottimale

Occorre regolare:

- Il mezzo
- Il pH
- La pressione di O_2
- La temperatura
- Impedire la contaminazione da parte di microorganismi estranei

Il mezzo

- Sono in genere miscele complesse di vari componenti in acqua depurata:
 1. Zuccheri (glucosio, lattosio, saccarosio, maltosio, destrine)
 2. Amminoacidi (glutamina)
 3. Elettroliti (calcio, sodio, potassio, fosfati)
 4. Vitamine (acido ascorbico, acido folico, riboflavina...)
 5. Siero fetale di vitello (albumina, transferrina)
 6. Miscele di Peptoni, Fattori di crescita, Ormoni, Proteine
 7. Grassi (acidi grassi, trigliceridi)

I contaminanti

- Per le applicazioni farmaceutiche si richiede una purezza $\geq 99\%$
- I contaminanti possono essere in relazione con:
 1. l'ospite (virus, batteri, proteine e DNA, varianti di glicosilazione, varianti ai C- ed N- terminali, endotossine)
 2. il prodotto (sostituzione o delezione di amminoacidi, denaturazione di proteine, isomeri conformazionali, dimeri e aggregati, varianti di appaiamento disolfuro, specie deamminate, frammenti di proteine)
 3. il processo (componenti del mezzo di crescita, reagenti di purificazione, metalli, materiali da colonna)

I virus

- Sono i contaminanti potenziali delle cellule animali.
- Ove siano presenti la loro concentrazione bassissima non consentirebbe la loro rivelazione.
- Vanno **validate a monte** le linee cellulari, i mezzi e le colonne per la purificazione.
- Metodi per l'inattivazione dei virus:
 1. Metodi fisici (calore, irraggiamento, sonicazione)
 2. Metodi chimici (valori estremi di pH, detergenti, solventi, disinfettanti)

I batteri

- Soprattutto i pirogeni sono molto pericolosi.
- Spesso si ricorre alla filtrazione e **sterilizzazione**
- Utile è la **cromatografia a scambio ionico** per le endotossine cariche negativamente
- A volte si ricorre all'uso di antibiotici
- *La cosa migliore è l'utilizzo di impianti produttivi appositamente progettati ed estesi sistemi di controllo qualità*

Elementi da considerare nella produzione e purificazione di proteine

- Eterogeneità N- e C terminale
- Modificazioni chimiche e alterazioni conformazionali
- La glicosilazione
- La modificazione proteolitica
- La formazione del corpo inclusivo proteico (agglomerati proteici)

L'eterogeneità N- e C- terminale

- Le estremità N- e C- delle proteine possono essere modificate rispetto alla proteina originale
- In particolare le estremità NH₂ sono le più suscettibili.
- Ci possono essere residui di metionina legate alla proteina
- Alcuni amminoacidi possono essere rimossi dalle proteasi
- Cio' provoca problemi nella **identificazione e purificazione** delle proteine

Modifiche chimiche e alterazioni conformazionali

- I trascritti che contengono la sequenza codificatrice potrebbero fornire **isomeri conformazionali** della proteina
- Possono esistere equilibri tra la proteina desiderata e dimeri
- Si possono verificare alterazioni chimiche durante il processo (proteolisi, ossidazione, deamminazione, denaturazione)

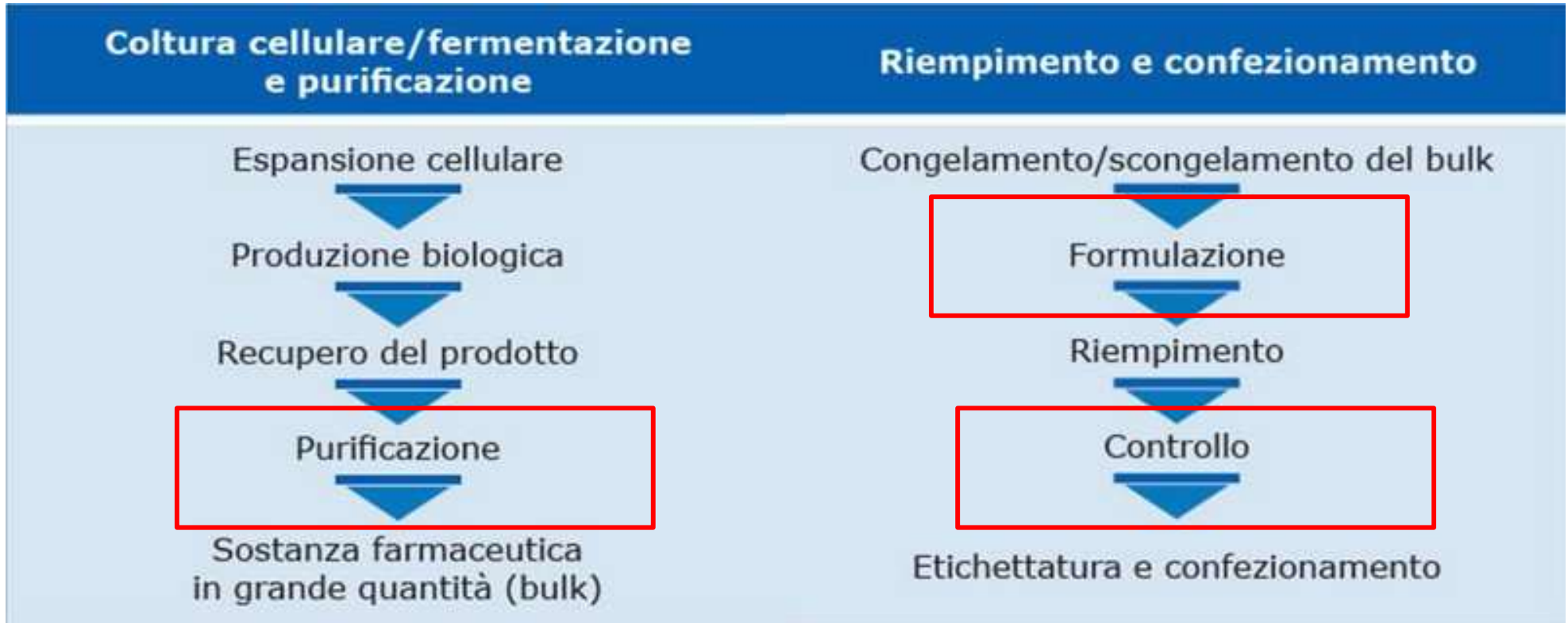
La modificazione proteolitica

- Le proteasi giocano un ruolo fondamentale nella maturazione delle proteine
- Possono derivare dall'ospite (fuoriuscire da cellule morte o che si rompono)
- Possono derivare dal mezzo (siero)
- Temperature elevate favoriscono i processi proteolitici

La glicosilazione

- La maggior parte delle proteine ricombinanti prodotte a scopo farmaceutico sono **glicoproteine**
- È un processo post-traduzionale
- Le cellule mammarie (**produzione mAb**) sono in grado di glicosilare ma è difficile controllare il processo
- La porzione zuccherina **può risultare diversa** da quella originale perché dipende dall'ospite

Produzione di proteine ricombinanti



Produzione di proteine ricombinanti

⑤ Purificazione



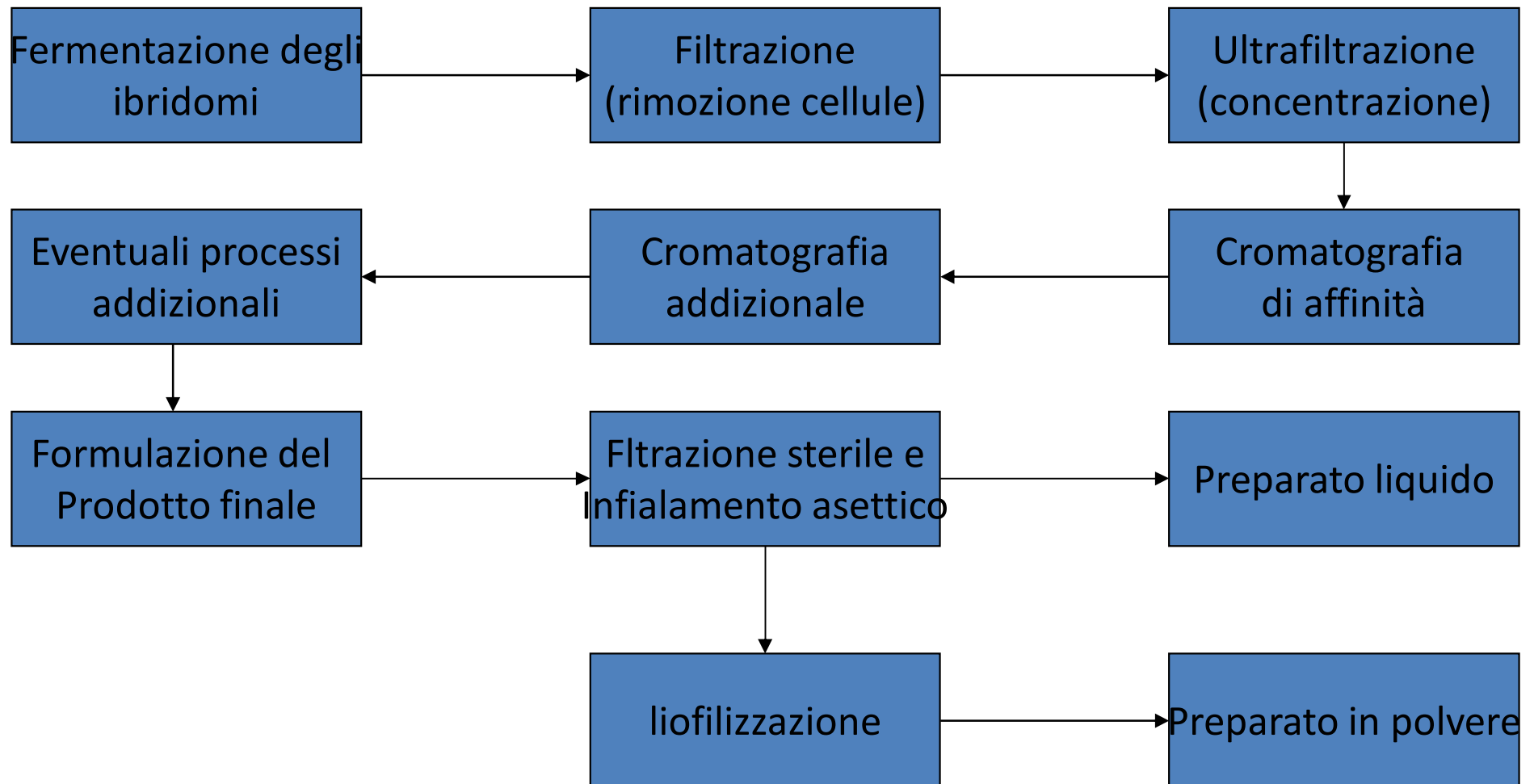
⑥ Formulazione



Processi successivi

1. Eliminazione del particolato
2. Concentrazione
3. Purificazione grossolana
4. Purificazione intermedia
5. Purificazione finale
6. Sterilizzazione e formulazione

Produzione di anticorpi monoclonali mediante coltura di cellule animali



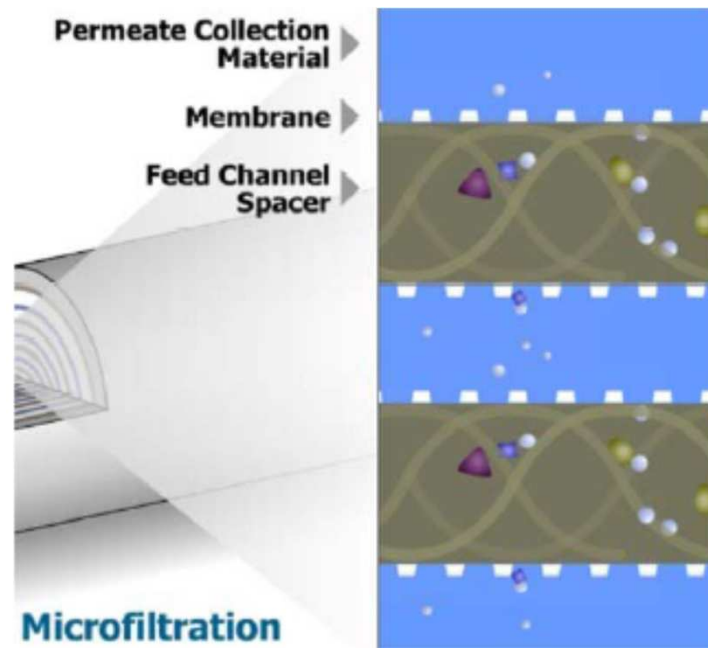
Filtrazione

Serve per concentrare la biomassa prima di purificarla ulteriormente

- **Filtrazione a flusso tangenziale**: le forze radenti intense lungo la superficie della membrana limitano l'occlusione dei pori
- **Ultrafiltrazione**: la massa passa sotto pressione attraverso una membrana di diverse dimensioni. Utile per eliminare macromolecole e virus.

Filtrazione a flusso tangenziale

- Filtrazione mediante passaggio con flusso parallelo alle membrane: attraverso l'elemento filtrante passa solo una parte del prodotto e il materiale ritenuto viene continuamente rimosso dal passaggio del liquido riducendo molto l'intasamento



- Le membrane polimeriche a flusso tangenziale sono disponibili con varie porosità:
 1. osmosi inversa,
 2. nanofiltrazione,
 3. ultrafiltrazione,
 4. microfiltrazione
- ed in varie configurazioni:
 1. tubolari,
 2. a fibra cava,
 3. piane
 4. a spirale avvolta.

Ognuna delle suddette forme porta vantaggi e svantaggi. La configurazione a spirale avvolta è scelta per la sua efficienza ed economia.

Ultrafiltrazione

- L'**ultrafiltrazione** è un processo di filtrazione operato su membrana caratterizzata da pori di dimensione dell'ordine di grandezza dei nm. La forza spingente del processo è rappresentata dalla differenza di pressione, applicata a monte e a valle del mezzo filtrante per ottenere il passaggio del fluido.
- La sospensione viene inviata contro un mezzo filtrante (la membrana); il fluido passa attraverso essa e viene raccolto a valle con il nome di filtrato o permeato. I solidi sospesi vengono trattenuti, tutti o in parte, sulla superficie della membrana. Essi costituiscono il retentato.

- L'ultrafiltrazione è usata per la rimozione di particelle fluttuanti, colloidi, batteri e virus. Tale tecnica sfrutta membrane fra 5 e 500 nm.

Esistono tre tipi di membrane:

1. Membrane a spirale, meno costose ma più sensibili all'inquinamento
2. Membrane tubolari/a cannuccia, le più utilizzate per il rapporto costo/efficacia, più difficili da inquinare
3. Membrane in ceramica, più costose ma estremamente resistenti agli inquinamenti pesanti.

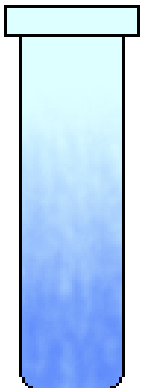
Centrifugazione

- Centrifugazione frazionata: centrifugando a diverse velocità si ottiene una separazione del particolato
- Ordine di separazione dei costituenti cellulari con le tecniche centrifugative:
 1. cellule intere
 2. frammenti cellulari
 3. nuclei
 4. cloroplasti
 5. mitocondri
 6. lisosomi
 7. microsomi (frammenti reticolo endoplasmatico rugoso)
 8. ribosomi

- **Centrifugazione a gradiente di densità** : si impiega un fluido viscoso con un gradiente continuo di densità lungo la provetta da centrifuga. Le particelle migrano fino a quando raggiungono la loro posizione isopicnica (densità all'equilibrio) e rimangono intrappolate nel fluido
 - **Il gradiente:**
 1. stabilizza la colonna di liquido all'interno della provetta
 2. previene il rimescolamento per moti convettivi
 3. migliora la risoluzione della separazione
 4. permette la separazione della maggior parte o, talora, di tutti i componenti di una miscela.
- I gradienti possono essere allestiti mediante due principali tipi di tecniche:
1. Gradiente discontinuo o a gradino
 2. Gradiente continuo

bassa densità CsCl

alta densità CsCl



Precipitazione

- Le proteine rimangono disciolte in soluzione a causa dei loro *residui amminoacidici di superficie* carichi che interagiscono con le molecole di solvente. Se tali interazioni vengono meno, le molecole proteiche interagiscono prevalentemente tra di loro formando **aggregati che precipitano**. La facilità o difficoltà con la quale la proteina viene impossibilitata a interagire col solvente dipende largamente dalla natura dei residui amminoacidici di superficie.
- Prove ed errori da parte dello sperimentatore serviranno a determinare il comportamento specifico della proteina.

Sono 5 gli agenti comunemente usati per far precipitare le proteine:

- sali inorganici
- pH e temperatura
- solventi organici
- proteine basiche
- polietilenglicole rimuovono acqua di idratazione dalle proteine

Frazionamento con sali

- Il metodo più usato per la precipitazione è l'aggiunta di sali come il **solfato d'ammonio** o il **fosfato di potassio**.
- La velocità alla quale viene aggiunto il sale alla soluzione è molto importante. Per molte proteine infatti l'aggiunta deve essere graduale. Questa velocità deve essere determinata sperimentalmente.
- Se è l'ammonio solfato il sale che viene aggiunto e il solvente non è tamponato o lo è debolmente, allora è importante *monitorare il pH*. Quando si rende necessario un aggiustamento del pH si può aggiungere una base debole come idrossido d'ammonio diluito o il Tris (tris(idrossimetil)amminometano cloridrato).
- Una volta raggiunta l'equilibratura il precipitato viene raccolto per centrifugazione.
- Col solfato d'ammonio si ottiene l'allontanamento fino al 75% delle proteine grezze; il grado della concentrazione dipende da quanta soluzione è stata usata per ridissolvere il campione.

pH e temperatura

- Le proteine possono essere cariche positivamente o negativamente a seconda se il pH viene portato sotto il loro punto isoelettrico o sopra rispettivamente. Queste forme cariche sono molto più solubili delle molecole elettricamente neutre. Di conseguenza, cambiare il pH può portare alla precipitazione di alcune molecole. La nostra proteina può precipitare o può restare in soluzione. Quanto si possa far variare il pH e quanto rapidamente deve essere determinato sperimentalmente per ciascuna proteina. Lo stesso vale per le variazioni di temperatura.

Solventi organici

- Essi fanno decrescere fortemente la solubilità proteica. Questo avviene a causa della diminuzione della costante dielettrica del mezzo e grazie alla "deidratazione" (viene cioè impedita l'interazione con le molecole d'acqua). Con la diminuzione della costante dielettrica di una soluzione le forze attrattive tra residui di superficie di carica opposta aumenta e questo comporta la formazione di aggregati che precipitano.
- I solventi organici che si usano più spesso sono **etanolo**, **metanolo**, **acetone**.
- La temperatura alla quale avviene la precipitazione è un fattore importante perché in presenza di solventi organici la solubilità diminuisce marcatamente insieme alla temperatura.

Cromatografia

La separazione avviene sfruttando la diversa affinità dei componenti la miscela verso le due fasi (stazionaria e mobile)

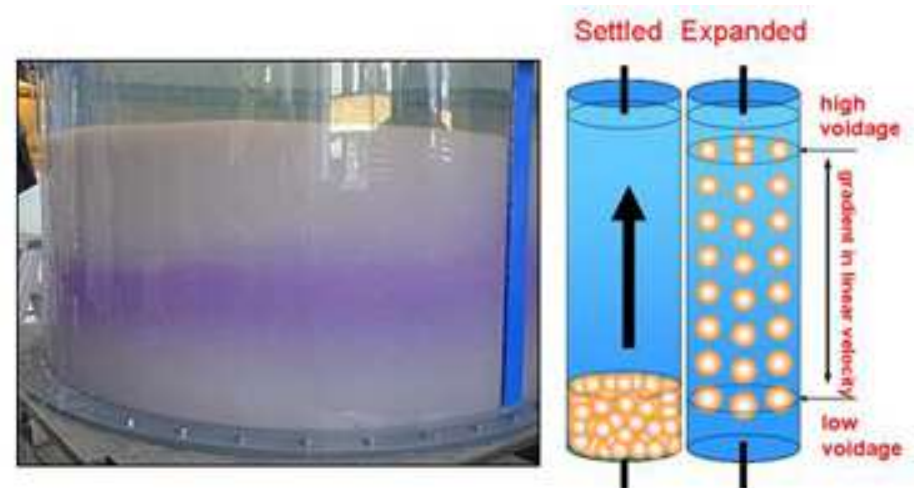
- La fase stazionaria è di solito solida ed impaccata in una colonna.
- La fase mobile può essere liquida o gassosa e scorre sulla fase stazionaria

Tecniche di purificazione

- Cromatografia:
- Di adsorbimento
- Liquida ad alta prestazione (RP-HPLC)
- Di esclusione
- Di interazione idrofoba
- A scambio ionico
- Cromatografia di immunoaffinità

Letti espansi

- Consentono di effettuare i processi di chiarificazione, concentrazione e purificazione in un solo tempo
- Si usa una fase stazionaria dentro un letto aperto con flusso di liquido verso l'alto
- Il liquido farà sollevare le particelle che saliranno in base alla densità e all'affinità verso la fase solida
- In questo modo si effettua la purificazione sulla miscela contenente ancora cellule e particolato



Formulazione del prodotto

Parametri che vanno considerati:

- La sterilità: proteine somministrate per via parenterale devono essere sterili, ma la sterilità non può essere raggiunta per riscaldamento poiché sono sensibili al calore.
 1. Si ricorre all'assemblaggio dei farmaci **in ambiente asettico** (camere in classe 100= 3500 particelle $\geq 0.5 \mu\text{M}$ per m^3)
 2. Eccipienti e apparato si sterilizzano separatamente in **autoclave o con calore secco o con trattamento chimico**.
 3. I contaminanti microbici si eliminano mediante filtrazione usando membrane di dimensioni idonee

Formulazione del prodotto

- Decontaminazione da virus
- Eliminazione dei pirogeni:
endotossine liberate dai Gram negativi
a carica negativa.

Si eliminano:

1. **Calore secco** (riscaldamento a 250 °C per 30 minuti)
2. Cromatografia a scambio ionico

ECCIPIENTI

- Sostanze presenti nel farmaco oltre al principio attivo
1. Principio attivo
 2. Solubilizzanti
 3. Agenti anti-adsorbimento e anti-aggregazione
 4. Conservanti e antiossidanti
 5. Lipoprotettori/agglomeranti
 6. Agenti osmotici
 7. Sistema vettore

solubilizzanti

- Le proteine specialmente quelle non glicosilate tendono ad aggregarsi
 1. Controllo pH
 2. Controllo forza ionica
 3. Aggiunta di amminoacidi come lisina e arginina (a.a. basici che salificano efficientemente alcune proteine insolubili in acqua)
 4. Aggiunta di tensioattivi

Tamponi

- La solubilità, la stabilità chimica e fisica dipendono dal pH
- Tampone fosfato, citrato e acetato
- Variazioni di pH si possono riscontrare durante la **liofilizzazione** se uno dei due componenti del tampone cristallizza più velocemente dell'altro

La conservabilità

1. In soluzione acquosa: l'acqua promuove processi di degradazione fisica e chimica
2. Liofilizzate
3. In forma anidra come compresse

La convalida

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

La **convalida** è nata e cresciuta insieme allo sviluppo delle **Buone Pratiche di Fabbricazione (BPF o GMP)** e che rappresenta la logica conseguenza della loro evoluzione.

Nel 1906 il libro «The Jungle» di U. Sinclair descrisse le condizioni igieniche in cui la carne veniva lavorata nei macelli di Chicago. Indagini governative confermarono quanto descritto nel libro, causando in poco tempo un crollo del consumo di carne di oltre il 50%.

T. Roosevelt si trovò nella necessità di promulgare una legge (*Food and Drug Act*) che darà in seguito i natali all'ente (*Food and Drug Administration*) che sovrintende al controllo della produzione di farmaci e alimenti in USA.

Per la prima volta veniva trasmesso il messaggio di come «**PREVENIRE LA CONTAMINAZIONE**».

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

Nel 1937 venne introdotto sul mercato un Elisir di Sulfanilamide, il veicolo per la sua produzione era il glicole dietilenico (estremamente tossico). Ci furono 100 morti prima che si riuscisse a capire quale fosse la causa dei decessi. Questo tragico evento determinò un'ulteriore evoluzione della legge che intendeva «**GARANTIRE LA SICUREZZA DEL PRODOTTO**»

Nel 1962 venne allo scoperto la tragedia del Talidomide, prodotto in forma di racemo, fu ritirato dal commercio in seguito alla scoperta della teratogenicità di uno dei suoi enantiomeri: le donne trattate con talidomide davano alla luce neonati con gravi alterazioni congenite dello sviluppo degli arti. Fu lo stesso J.F. Kennedy a convocare d'urgenza il Congresso per promulgare alcuni emendamenti alla legge del 1938. In particolare prese corpo la necessità di «**DIMOSTRARE L'ATTIVITA' DEL PRODOTTO**»

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

Questa breve introduzione storica ci insegna che dover produrre la documentazione di sicurezza ed efficacia di un farmaco e sottoporla alla valutazione di un'agenzia regolatoria (FDA, EMA) prima che possa essere usato nell'uomo non è inutile e sciocca burocrazia. Purtroppo, l'assenza di regole può comportare seri rischi per la salute di chi i farmaci si trova a doverli utilizzare.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

Arriviamo al 1976 per vedere apportate, da parte dell'FDA, delle modifiche alle GMP che semplificavano la loro applicazione. In queste procedure compare il termine «*validated*» per la prima volta.

In seguito le pratiche di convalida dei processi assumevano una connotazione diversa: i processi stessi per l'ottenimento di un prodotto sterile **venivano sviluppate e tradotte in una scienza precisa**.

Negli anni ottanta vi fu poi una estensione delle validazioni anche per processi che non richiedevano fasi di sterilizzazione.

Inizia a comparire un lessico vero e proprio dei processi di convalida:

- Quality Function, Quality Control, Quality Assurance
- Installation Qualification, Operational Qualification, Performance Qualification
- Validation protocol, Prospective Validation,

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

Nel 1983 viene scritta una guida per la convalida dei **sistemi informatici**.

Nel 1987 viene pubblicato un documento che presenta la necessità di convalidare i **metodi analitici**. Inoltre viene introdotto il protocollo di convalida che coordina tutti i documenti per una corretta programmazione e pianificazione delle attività necessarie (**Piano generale di Convalida**).

Ulteriore documento datato 1992 al quale fare riferimento per la definizione di:

Convalida: *Azione consistente nel provare, conformemente alle norme di Buona fabbricazione, che una procedura, un determinato processo, un'attrezzatura, un materiale, un'attività o un sistema producono effettivamente i risultati specificati.*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Breve introduzione storica

Ulteriore documento datato 1992 al quale fare riferimento per la definizione di:

Qualificazione: *Azione consistente nel dimostrare che una data attrezzatura funziona correttamente e dà effettivamente i risultati previsti.* Infine ultimo (per ora) documento redatto per le GMP europee è del 2001 dal titolo «*EC guide to GMP. The rules Governing Medicinal Products in the European Community. Vol IV- Annex XV – 2001*».

PS critiche a questo dispendioso ed, in alcuni casi, eccessivo controllo normativo di tutti i processi industriali iniziano a manifestarsi:
John Sharp- Validation-How valid? **2004**, *European Journal of Parenteral Sciences* 9(2):37-48.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Riassumendo

Differenza tra qualifica e convalida

“qualifichi un sistema e/o strumenti e convalidi un processo”.

La convalida

Per convalida si intende l'evidenza documentale che lo specifico **processo** sia in grado di dar luogo in modo riproducibile (e quindi con elevato grado di sicurezza) ad un prodotto conforme alle specifiche e alle caratteristiche di qualità stabilite.

La qualifica

La qualifica è l'evidenza documentale, che tutti i locali, sistemi e le apparecchiature siano adeguatamente installati e che funzionino correttamente fornendo i risultati attesi (spesso è una fase di un processo di convalida).

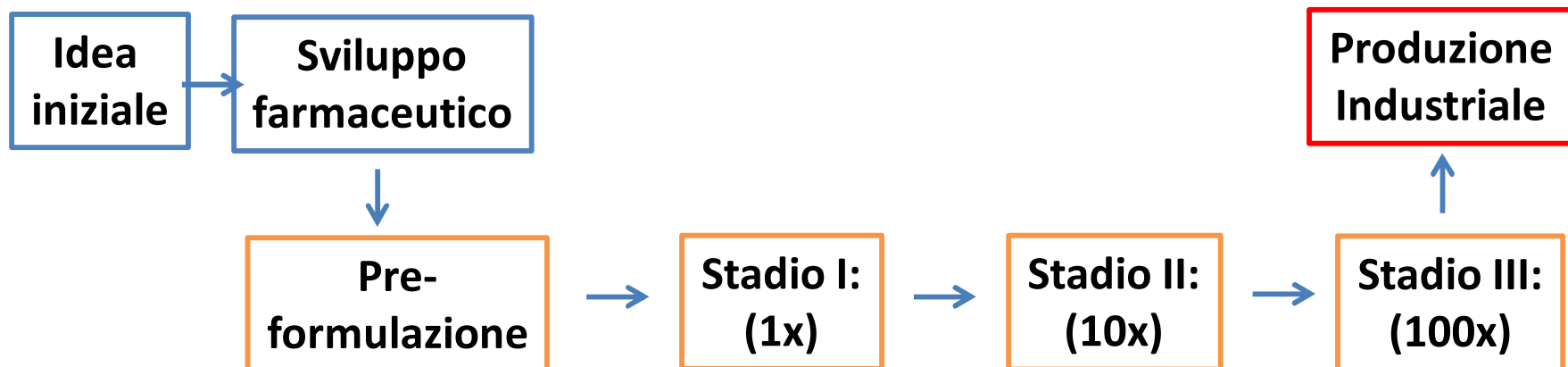
Per esempio: “qualifichi un autoclave mentre convalidi un processo di sterilizzazione”.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

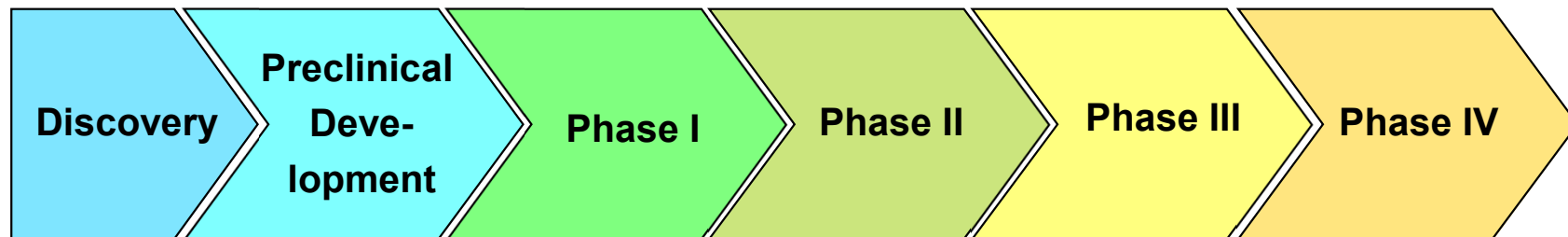
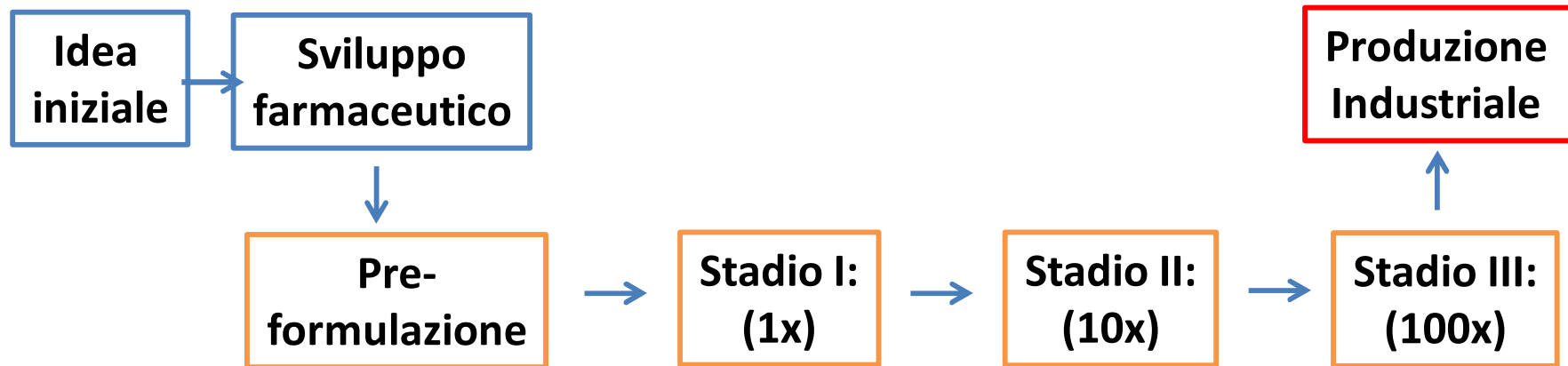
➤ Come convalidare un processo

«Se per processo si intendono tutte le vie e i mezzi utilizzati per trasformare le materie prime in un prodotto finito, convalidare un processo significa dimostrare che questo è in grado, in condizioni operative ben determinate, di produrre **regolarmente** un prodotto conforme alle sue caratteristiche e specifiche predefinite.»

Ma nella realtà come si procede? Qual è il punto di partenza per convalidare un processo?

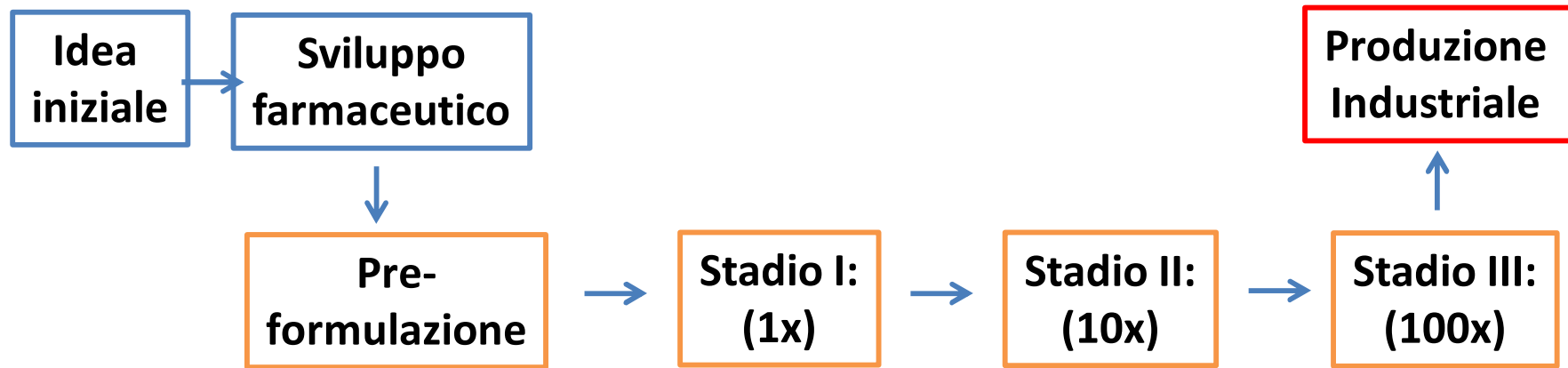


Impianti dell'Industria Farmaceutica



Nuovo prodotto - dalla sua nascita alla produzione industriale (vedi Schema).
Come per lo sviluppo di un nuovo farmaco partiamo dall'idea e il suo sviluppo farmaceutico mediante la messa a punto della lavorazione con i primi studi di preformulazione. Successivamente si passa al **primo stadio** in scala di laboratorio (1X) e quindi con lo **stadio II** (10x) in cui si preparano i campioni per le prove cliniche e si procede all'ottimizzazione del prodotto e agli studi di caratterizzazione del processo.

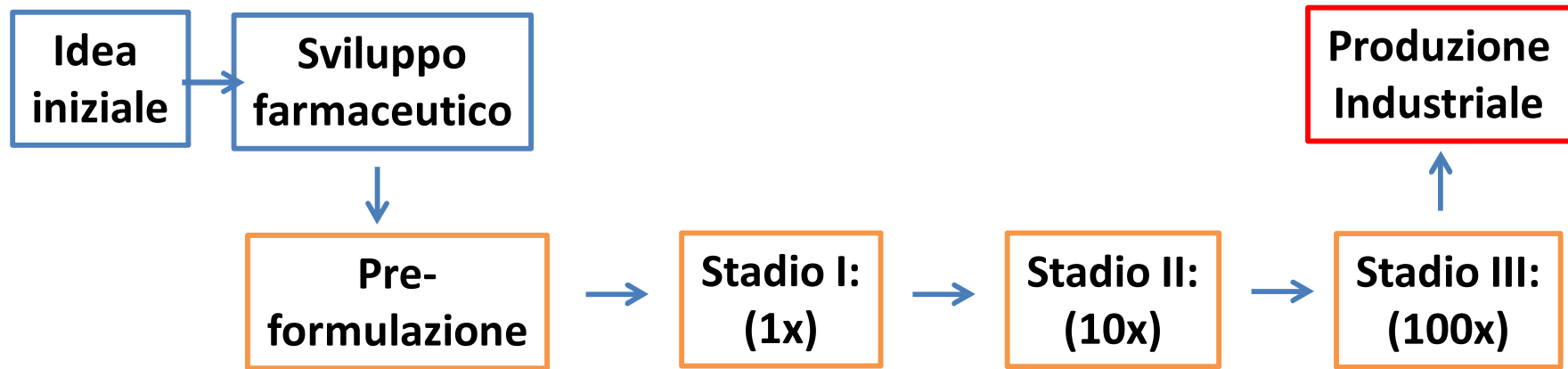
Impianti dell'Industria Farmaceutica



Nuovo prodotto – Lo **stadio II** rappresenta il cuore della **convalida prospettiva**, dove il tempo e lo sforzo spesi per qualificarlo semplificano il lavoro che dovrà essere svolto negli stadi successivi. Quindi in questa fase non si può parlare di convalida di processo, ma di preparazione alla stessa con l'individuazione dei **parametri critici**. La convalida deve essere pianificata prima della fabbricazione di nuovo prodotto o prima dell'accettazione definitiva di una **modifica ad un processo esistente**. Il numero di lotti previsti per questo tipo di convalida è generalmente di almeno 3 lotti consecutivi.

Esiste anche la **convalida concomitante**: in condizioni eccezionali (ad es. Covid-19) può essere accettabile non completare un programma di convalida prima dell'inizio della produzione di routine. La decisione deve essere GIUSTIFICATA, DOCUMENTATA e APPROVATA da personale autorizzato.

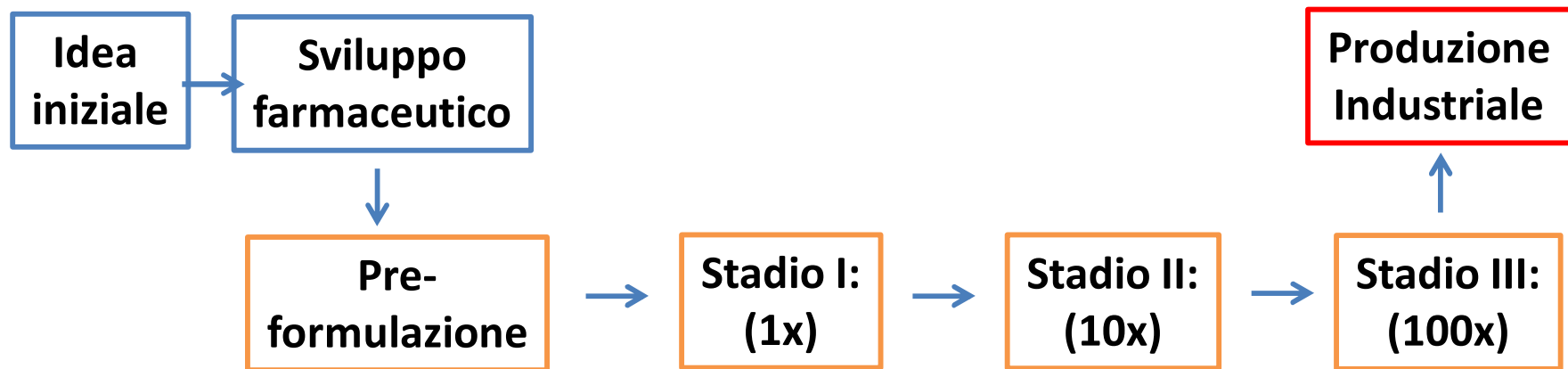
Impianti dell'Industria Farmaceutica



Nuovo prodotto

Infine con la **terza fase** (100x) che spesso è realizzata con gli impianti della produzione veri e propri e che spesso ha già la dimensione della produzione standard, è richiesta la **convalida formale**.

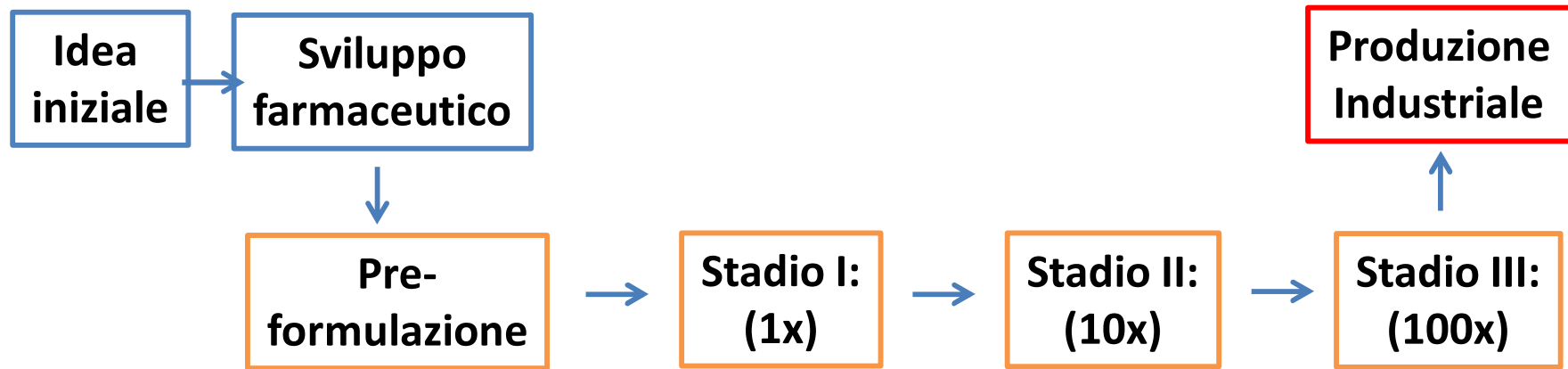
Impianti dell'Industria Farmaceutica



Nuovo prodotto – Ma per ottenere dati attendibili, occorre che i metodi analitici siano convalidati **anche durante lo sviluppo farmaceutico**, ovviamente ai livelli adeguati ai vari stadi. Inoltre, quando si vuole **effettuare la convalida**, le attrezzature devono essere qualificate, i sistemi informatici e automatici convalidati, così come le procedure di pulizia dei locali e delle macchine di processo. Il tutto deve svolgersi in un ambiente in cui esistono *programmi di taratura periodica, di manutenzione preventiva, di qualificazione dei fornitori, di formazione ed addestramento del personale, di riconvalida* ed infine, una *procedura di controllo dei cambiamenti*.

Uno schema che rappresenti quanto elencato è il **VMP**.

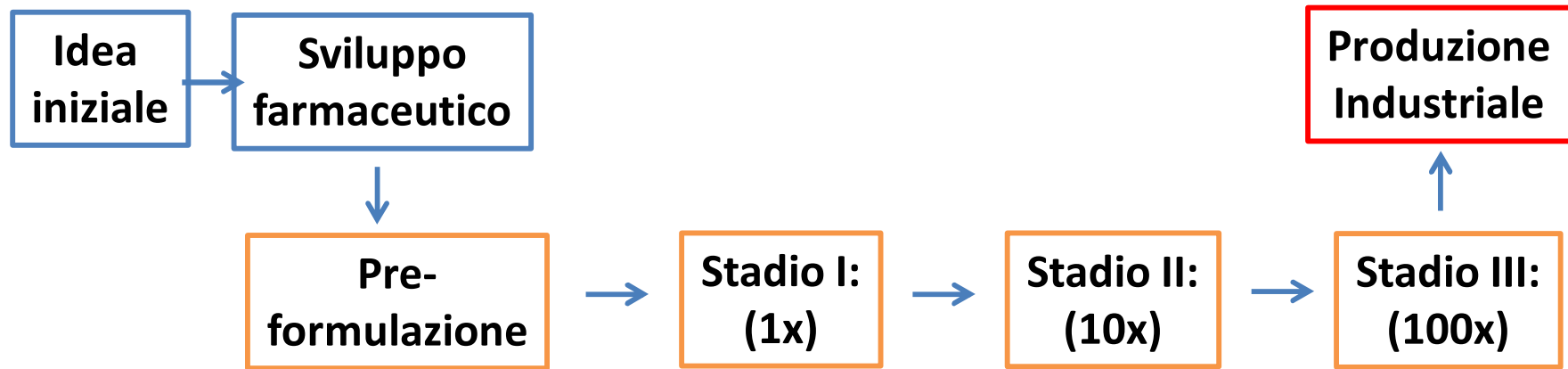
Impianti dell'Industria Farmaceutica



Nel caso di cambiamenti nel processo di produzione:

Esiste la possibilità della **convalida retrospettiva**, che è accettabile soltanto per **processi consolidati**. Si basa su dati storici. I lotti utilizzati devono essere rappresentativi di tutti i lotti prodotti durante il periodo in esame, compresi tutti i lotti risultati non conformi alle specifiche, e in numero sufficiente a dimostrare la coerenza del processo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica



Controlli periodici:

Riconvalida:

Gli impianti, i sistemi, le attrezzature e i processi, incluse le procedure di pulizia, dovrebbero essere oggetto di una **valutazione periodica** al fine di confermare che essi siano ancora validi.

Ad esempio..

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio

Per la produzione di una formulazione per iniettabili il processo convalidato (tre steps, preparazione, filtrazione, riempimento) viene modificato a seguito di introduzione di una nuova ripartitrice (macchina per riempire le fiale)

E' necessaria la riconvalida del processo:

- 1) Completo
- 2) Solo ripartizione
- 3) Solo preparazione

2) Solo ripartizione. Perché le altre due fasi non subiscono modifiche.

Come si può effettuare la sostituzione della macchina ripartitrice senza bloccare la produzione?

Si mette la nuova macchina in funzione **in parallelo** con quella da sostituire e si iniziano ad effettuare i **test di qualifica** QUALIFICA DI INSTALLAZIONE: (IQ) da effettuare su impianti, sistemi e attrezzature, nuovi o modificati. QUALIFICA DI OPERATIVITÀ: (OQ) segue la (IQ). La conclusione positiva dell'OQ dovrebbe permettere un'approvazione formale degli impianti, dei sistemi e delle attrezzature. QUALIFICA DI PRESTAZIONE: (PQ) segue la conclusione con esito positivo dell'IQ e dell'OQ. Al termine avviene la vera e propria sostituzione **senza aver interrotto il ciclo di produzione**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio

Qualificazione di un'autoclave

Mapping della temperatura:

Posizionamento di sensori di temperatura (termocoppie) in diverse zone della camera.

Conferma che la temperatura sia uniforme in tutte le aree.

Ciclo di prova con carichi simulati:

Test con carichi rappresentativi (minimo, massimo, tipico) per verificare che il vapore penetri ovunque.

Uso di indicatori biologici nei punti più critici (es. interni di tubi o contenitori).

Ciclo ripetitivo:

Ripetizione di almeno tre cicli per confermare la riproducibilità del processo.

Strumenti di validazione

Indicatori biologici (BI): Microorganismi estremamente resistenti (es. *Geobacillus stearothermophilus* per vapore) vengono posizionati nei punti critici per verificare l'efficacia della sterilizzazione.

Indicatori chimici (vedi test Bowie&Dick): Cambiamenti di colore confermano il raggiungimento di specifici parametri (es. temperatura, tempo).

Registrazione dei dati: Strumenti come termocoppie o registratori elettronici monitorano in tempo reale i parametri critici.

Piano generale di convalida (VMP, Validation Master Plan)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

«Il VMP dovrebbe essere un documento di sintesi, breve, conciso e chiaro»

Al di là della forma, l'utilità del documento consiste nella pianificazione delle attività, trovando traccia per il coordinamento delle operazioni inerenti. **E' il punto di partenza e meta finale**, conterrà le indicazioni di come tutte queste attività devono essere svolte e poi la descrizione di come si sono svolte e che servirà anche agli **ispettori GMP nel corso delle loro visite**.

Se da un punto di vista formale sia la forma che l'estensione del singolo documento possono essere estremamente variabili, da un certo punto di vista concettuale il documento deve contenere alcuni **elementi indispensabili**.

Tale documento può inoltre essere limitato a un singolo prodotto, ad una linea di produzione, ad un settore produttivo, oppure estendersi a tutte le linee di produzione, le attrezzature, gli impianti ed i servizi fino ad abbracciare tutti i settori produttivi e le funzioni coinvolte in occasione dell'apertura di una nuova officina farmaceutica.

Altra caratteristica del documento è la sua **natura multidisciplinare** che coinvolge esperti come farmacisti, metrologi, tecnici farmaceutici, analisti, microbiologi, ingegneri, esperti in QA e in convalide.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

- **Frontespizio** – logo, ragione sociale, titolo del documento, eventuale codice, edizione, num. totale pagine. Se non è la prima edizione, indicare quali sono le modifiche apportate rispetto edizione precedente.
- **Indice dei contenuti**
- **Introduzione**
- **Riferimenti**
- **Glossario**
- **Obiettivi** – qui sarà introdotta la definizione della pianificazione di tutte le attività di qualificazione e di convalida con cenni alle logiche delle responsabilità, definizione risorse, ai criteri di riferimento per tutta la documentazione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

- **Scopo, campo di applicazione** – vengono indicati gli ambiti di applicazione di quanto espresso negli obiettivi. Essa è di particolare importanza perchè riporta chiaramente tutte le macchine, le strumentazioni e i processi coinvolti, compresi gli eventuali sistemi di supporto, che necessitano di operazioni di qualificazione, in particolare quelle di strutture e servizi inerenti alla produzione.
- **Organizzazione e responsabilità** – devono essere indicate le persone designate a far parte di un gruppo di lavoro incaricato di coordinare le attività di convalida (Comitato di Convalida) specificando gli argomenti della convalida. Fanno parte di tale gruppo il responsabile dell'Assicurazione Qualità (QA), della Produzione e dell'Ingegneria.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

- Criteri di ricerca dei punti critici – E' questa un'importantissima chiave per evitare di disperdere preziose risorse umane ed economiche in approfondite e non indispensabili attività di convalida. È quindi fondamentale, in base alla strategia aziendale e al livello di qualità definito nelle proprie linee guida, condurre un'accurata analisi di rischio del sistema da convalidare.

Partiamo da una regola generale e una constatazione:

*«Un processo, una procedura, una attrezzatura, un materiale, un sistema deve essere convalidato se influenza, direttamente, la qualità del prodotto, e la sua criticità va valutata secondo criteri di **pericolo** (gravità del possibile danno), **rischio** (probabilità che il pericolo si verifichi) e **controllo** (cioè probabilità di rilevare il fenomeno negativo appena si verifichi e apporre adeguate azioni correttive)».*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

➤ Criteri di ricerca dei punti critici –

Nel calcolo del **Livello di rischio** vanno considerati i seguenti aspetti:

Gravità: la Gravità del rischio connesso ad uno step produttivo deve essere valutata rispetto al danno potenziale sul paziente. Se l'accadimento di un certo evento potrebbe portare alla morte del paziente, va da sé che la Gravità del rischio è alta, quindi con valore numerico il più alto possibile nella scala stabilita.

Probabilità di accadimento; questo valore deve essere calcolato anche sulla base dei controlli/azioni messi in atto durante le attività produttive prima del passaggio critico in esame, per **prevenire** l'accadimento dell'evento. Più questi controlli/azioni sono considerati efficaci, minore è la probabilità che l'evento avvenga.

<div>Probabilità di accadimento</div> <div>Gravità</div>	Bassa	Media	Alta
Alta	Livello 2	Livello 1	Livello 1
Media	Livello 3	Livello 2	Livello 1
Bassa	Livello 3	Livello 3	Livello 2

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio valutazione parametro critico:

Abbiamo tre diversi parametri:

- 1) Temperatura di dissoluzione PA;
- 2) Titolo del principio attivo nella formulazione finale
- 3) Contenuto di impurezze nella materia prima

Quali di questi tre parametri rappresenta un **parametro critico** di processo?

- 1) Temperatura di dissoluzione.

Perché una variazione potrebbe modificare le caratteristiche della formulazione finale.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

- Criteri di ricerca dei punti critici – Di conseguenza possiamo ritenere che le macchine di processo siano sempre da considerare parametri critici se impattano su uno dei seguenti punti caratterizzanti la qualità del prodotto.
- **Purezza** – il prodotto finito non deve presentare contaminazioni dal punto di vista microbiologico, particellare o chimico oltre i limiti imposti dalle Farmacopee.
- **Integrità** – mantenere nel tempo, pressochè costanti (**nei limiti di quanto previsto dalle prove di stabilità**) le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche che ha al momento della fabbricazione.
- **Identità** – il prodotto finito deve corrispondere esattamente a quanto dichiarato in etichetta, essere esente quindi da errori nell'identificazione ad ogni livello di produzione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

➤ Criteri di ricerca dei punti critici –

- **Attività/efficacia** – deve essere quella prevista all'atto della sua formulazione: deve perciò essere garantito che il **corretto quantitativo** di componenti sia stato introdotto in **formulazione**, che il **corretto quantitativo** sia stato ripartito nei **contenitori finali** e che le fasi produttive non provochino la degradazione del prodotto stesso rendendolo meno efficace (ad es. sterilizzazione)
- **Riproducibilità** – uno dei requisiti fondamentali richiesti dalle GMP è che il processo produttivo fornisca un **prodotto costante nel tempo**, sempre uguale a se stesso. Quindi le variabili che possono variare la qualità devono essere tenute sotto controllo.
- **Rintracciabilità** – in ogni momento del ciclo produttivo bisogna assicurare l'identità e garantire la conformità di tutte le sue caratteristiche.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

➤ Criteri di ricerca dei punti critici –

- **Sicurezza d'uso** – non si intende la sicurezza per il paziente in quanto i punti precedenti sono garanzia di questo requisito, ma sicurezza del processo produttivo (per gli addetti ai lavori).
- **Buona conservazione** – devono essere sotto controllo i parametri ambientali critici e le modalità di conservazione del prodotto.
- **Correttezza di analisi** – le metodiche analitiche, apparecchiature di laboratorio e personale che effettua l'analisi siano sottoposte a convalida.
- **Correttezza di acquisizione e trattamento dati inerenti al prodotto** – garanzia di della sicurezza ed inviolabilità di questi dati.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Struttura del piano generale di convalida

➤ Criteri di ricerca dei punti critici –

- **Sistemi informatici** – sia software che hardware sono critici nella fabbricazione di un farmaco se influenzano direttamente il processo (es. gestione distinte, ricette, attribuzione del numero dei lotti).
- **Servizi generali di fabbrica**

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

- Le preparazioni farmaceutiche sono complesse miscele di composti reattivi dal punto di vista fisico e chimico.
- Le suddette caratteristiche possono modificarsi in seguito al contatto tra i diversi ingredienti (incompatibilità) o con il contenitore, o per effetto di agenti esterni.
- È molto probabile che un principio attivo (eccipiente, forma farmaceutica) perda nel tempo la qualità posseduta al momento della fabbricazione.

Cambiamenti fisico-chimici del medicinale che ne compromettono *l'utilizzo*,
l'attività terapeutica e perfino la *sicurezza*

- Tutte le Farmacopee dedicano particolare attenzione al problema della **stabilità** e della **corretta conservazione** delle materie prime e dei prodotti finiti.
- La stabilità conduce al concetto di **validità** che può essere definita come l'intervallo di tempo durante il quale un prodotto mantiene, entro limiti definiti e fino alla sua data di scadenza, le medesime caratteristiche che esso possiede al momento della produzione. Normalmente il *limite di degradazione* del principio attivo è **posto al 10%**.

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

➤ La Farmacopea statunitense riconosce cinque tipi di stabilità:

Tipo di stabilità	Condizioni da mantenere fino alla scadenza prodotto
Chimica	Ciascun principio attivo mantiene la sua <i>integrità chimica</i> e l'attività dichiarata in etichetta, entro limiti definiti
Fisica	Il preparato mantiene le proprietà fisiche originarie (aspetto, sapore, odore, uniformità e dissoluzione)
Microbiologica	La sterilità o la resistenza allo sviluppo microbico (agenti antimicrobici aggiunti) sono mantenute entro limiti di tempo definiti
Terapeutica	L'effetto terapeutico rimane immutato
Tossicologica	Non si registra alcun aumento significativo di tossicità

Degradazione dei medicinali

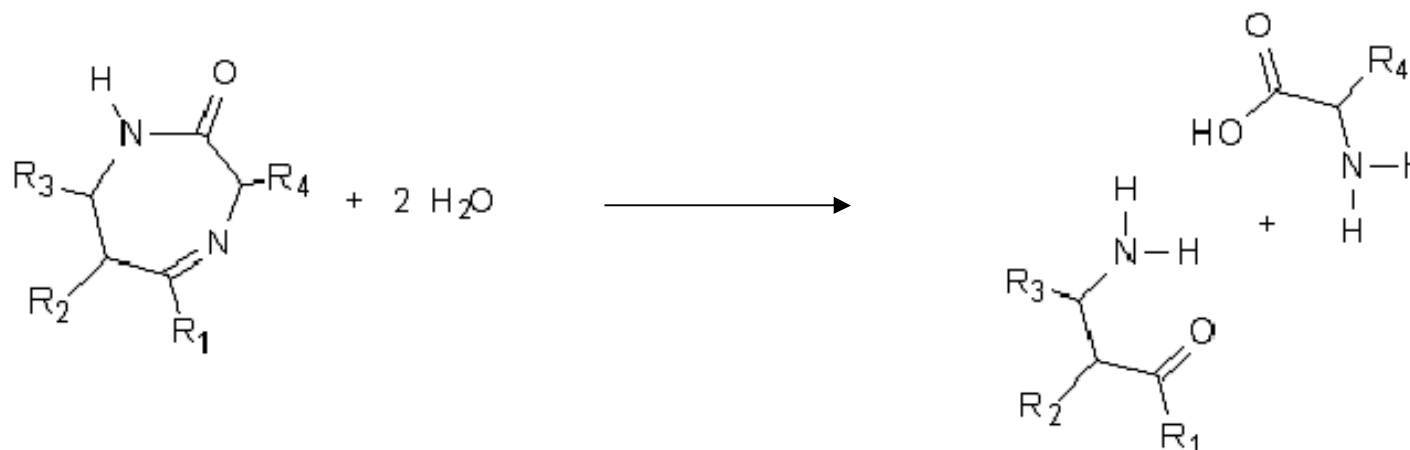
- Molti principi attivi ed eccipienti che entrano nella costituzione di forme farmaceutiche sono soggetti a processi di decomposizione di varia natura.
- Le **conseguenze principali** dei processi di degradazione sono:
 - Dopo un periodo di tempo, la preparazione non contiene più la dose attiva di farmaco dichiarata
 - I prodotti subiscono decolorazione, cambiamento colore e delle caratteristiche organolettiche della formulazione
 - Formazione di prodotti secondari di degradazione che possono risultare particolarmente nocivi e/o tossici
 - Decomposizione catalizzata da enzimi o la crescita di microrganismi (muffe, lieviti, funghi)

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Idrolisi

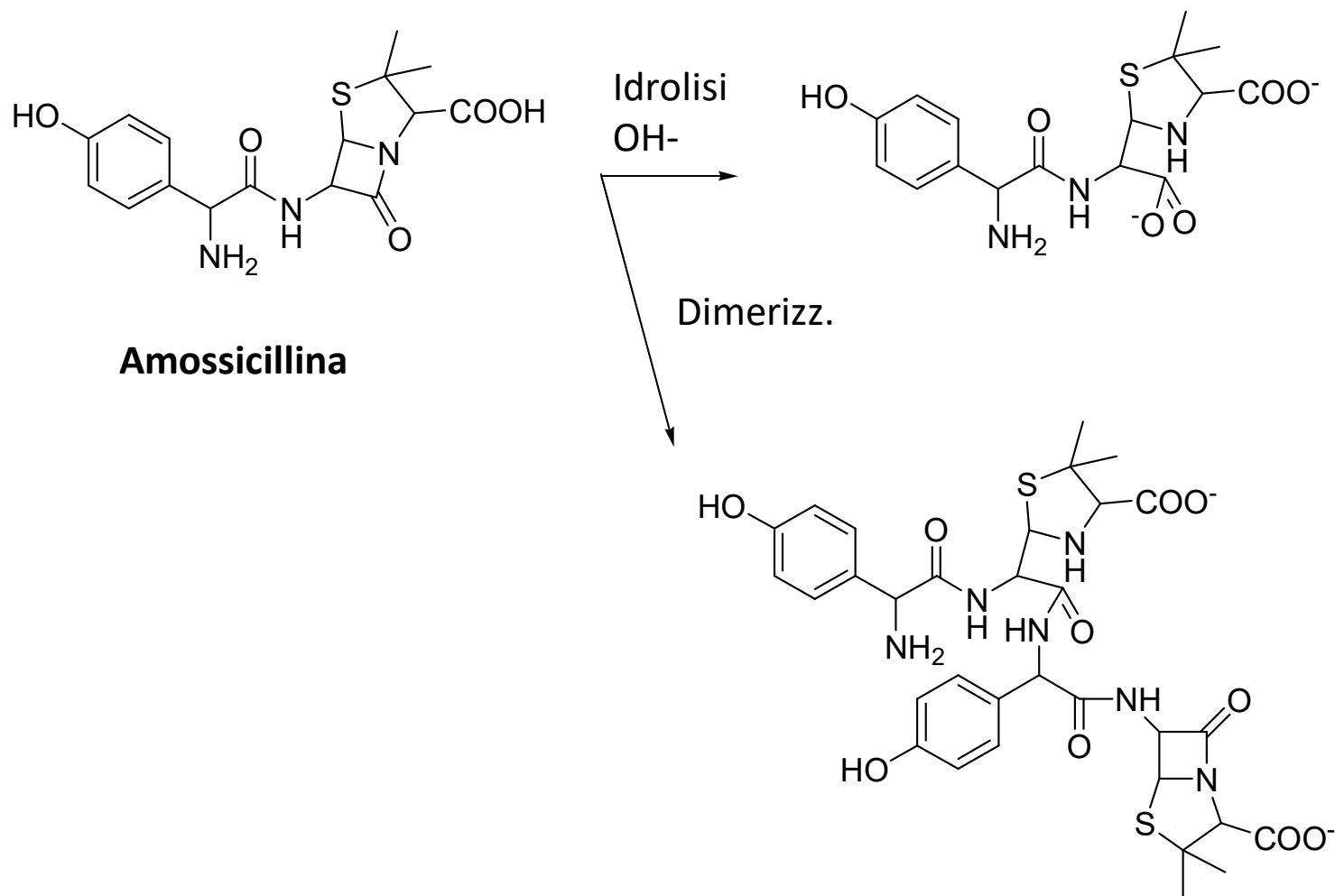
- **Idrolisi ionica:** reazione tra acqua e composti di natura salina (da acidi e basi deboli), stato di equilibrio reversibile
- **Idrolisi molecolare:** reazioni irreversibili e cineticamente più lento, scissione della molecola (importante per preparazioni acquose e solide)
- I principali gruppi funzionali che sono degradati a seguito di idrolisi sono gli esteri, ammidi, nitrili, lattami.



Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

- L'idrolisi dell'anello β -lattamico delle penicilline avviene per **catalisi basica**
- La velocità di idrolisi (a T e pH costanti) segue una cinetica di primo ordine



Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Ossidazioni

- Insieme ai processi idrolitici, sono la più importante via di degradazione dei medicinali
- Coinvolgono forme farmaceutiche che recano gruppi funzionali quali: alcoli, fenoli, ammine, sistemi insaturi che spesso reagiscono con *l'ossigeno atmosferico*
- I processi ossidativi possono essere influenzati da: valori di pH, presenza di sostanze o ioni che fungono da catalizzatori, esposizione a radiazioni elettromagnetiche, temperatura

La tendenza di un composto a dare reazioni di ossidazione può essere valutata attraverso il suo **potenziale standard di ossidazione (o riduzione) E**

$$E = E_0 + \frac{0.052}{n} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

Forma ridotta \rightarrow Forma ossidata + $n e^-$

Eq. di Nernst

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

$$E = E_0 + \frac{0.052}{n} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

E_0 Potenziale *referimento* elettrodo all'idrogeno

- Per alti valori (positivi) di **E**: il composto risulta facilmente ossidabile
- Per bassi valori (negativi) di **E**: il composto può essere ossidato difficilmente (buon ossidante)
- In una formulazione farmaceutica viene valutato il potenziale E del composto costituente la formulazione più alto.
- Questo composto è quello che ha maggiori possibilità di andare incontro a fenomeni ossidativi
- Si possono aggiungere sostanze con valore di E ancora maggiore, come particolari eccipienti chiamati *antiossidanti*, allo scopo di preservare e stabilizzare il medicamento vero e proprio

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Reazioni radicaliche a catena

- Spesso le reazioni di ossidazione avvengono per rimozione di un atomo elettropositivo, di un **radicale** o di un elettrone (*scissione omolitica*)
- L'ossidazione dei composti farmaceutici coinvolge in genere reazioni di tipo radicalico a catena

➤ I stadio: inizio

- Formazione di specie radicaliche mediata direttamente dall'ossigeno o da agenti fisici (calore, luce) o chimici (metalli di transizione, sostanze presenti nella formulazione stessa)



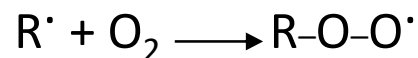
In agente fisico o chimico che catalizza l'iniziazione

Degradazione dei medicinali

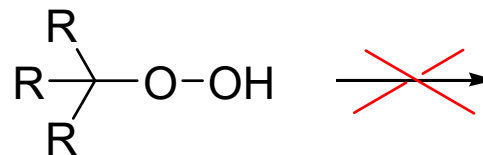
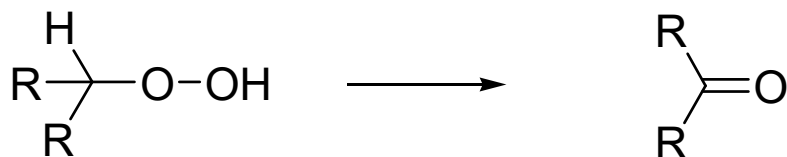
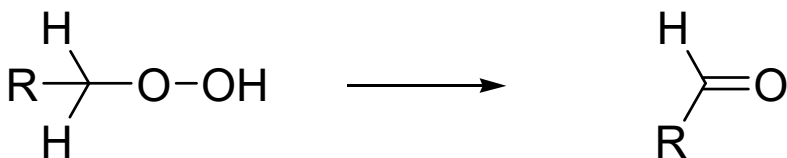
Decomposizione chimica

Il stadio: propagazione

➤ La vera e propria propagazione delle reazioni radicaliche



Radicale perossidico



Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Il stadio: propagazione

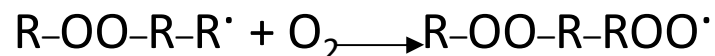
- Perché una reazione tra un radicale perossidico e un composto organico avvenga:
 - Occorre che *l'energia di dissociazione* del legame R-H sia inferiore a quella del legame ROO-H (377 KJ/mole)

Tipo di legame	E dissociazione omolitica (KJ/mol)
$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{H}$	356
$(\text{CH}_2=\text{CH})_2\text{CH}-\text{H}$	335
PhCH_2-H	350
$\text{PhS}-\text{H}$	340
$\text{MeNH}-\text{H}$	368

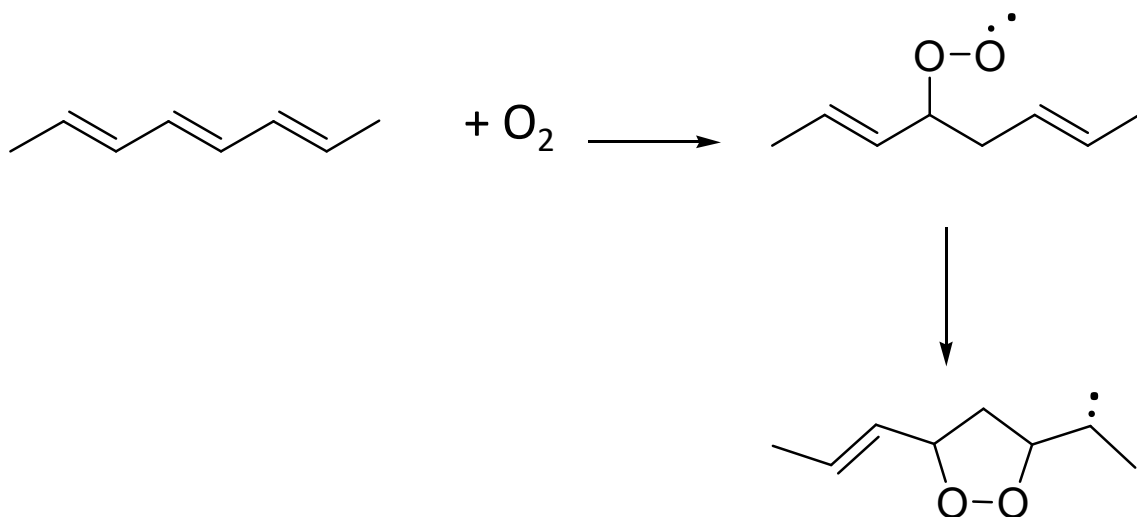
Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Il stadio: propagazione



Reazioni di addizione
intermolecolari (prodotti
polimerici)



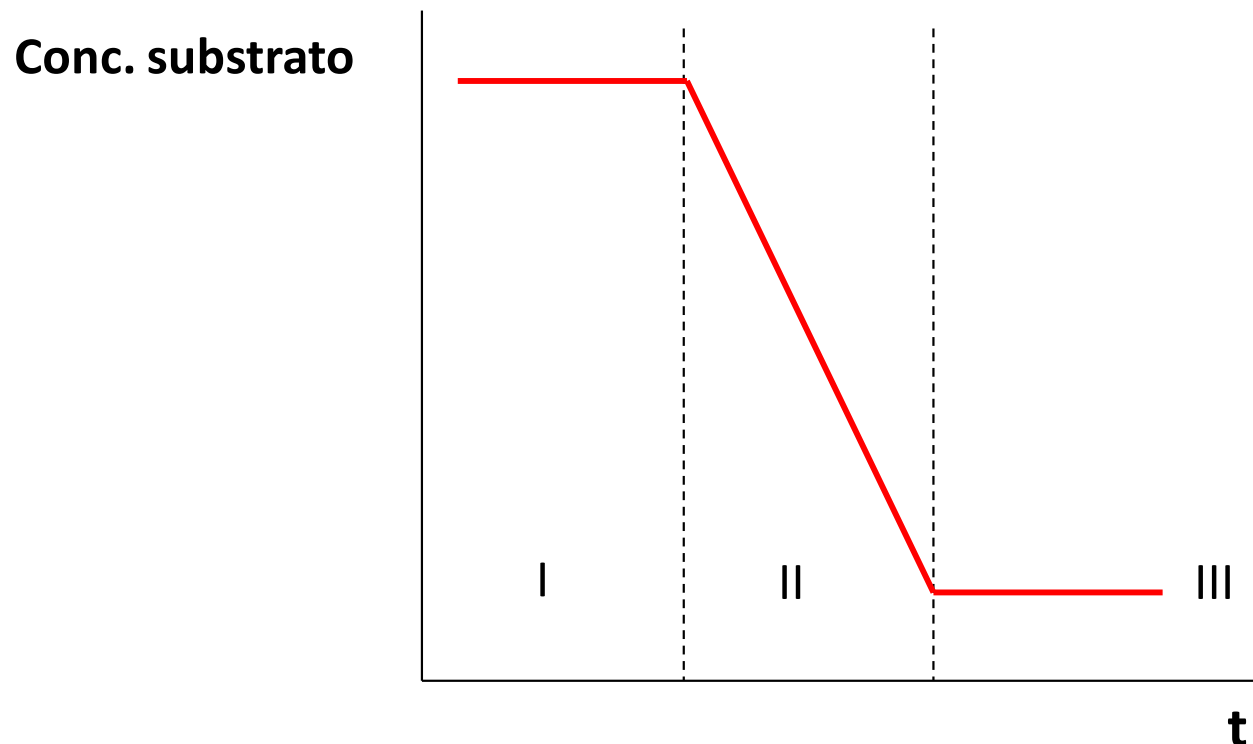
Reazioni di addizione
intramolecolari
(endoperossidi che ridotti
danno aldeidi o alcoli)

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

III stadio: terminazione

- In questo stadio si hanno reazioni bimolecolari tra specie radicaliche, che portano alla formazione di prodotti non reattivi, oppure specie radicaliche incapaci di dare origine a processi di propagazione
- Anche la minor concentrazione del substrato è causa della terminazione del processo

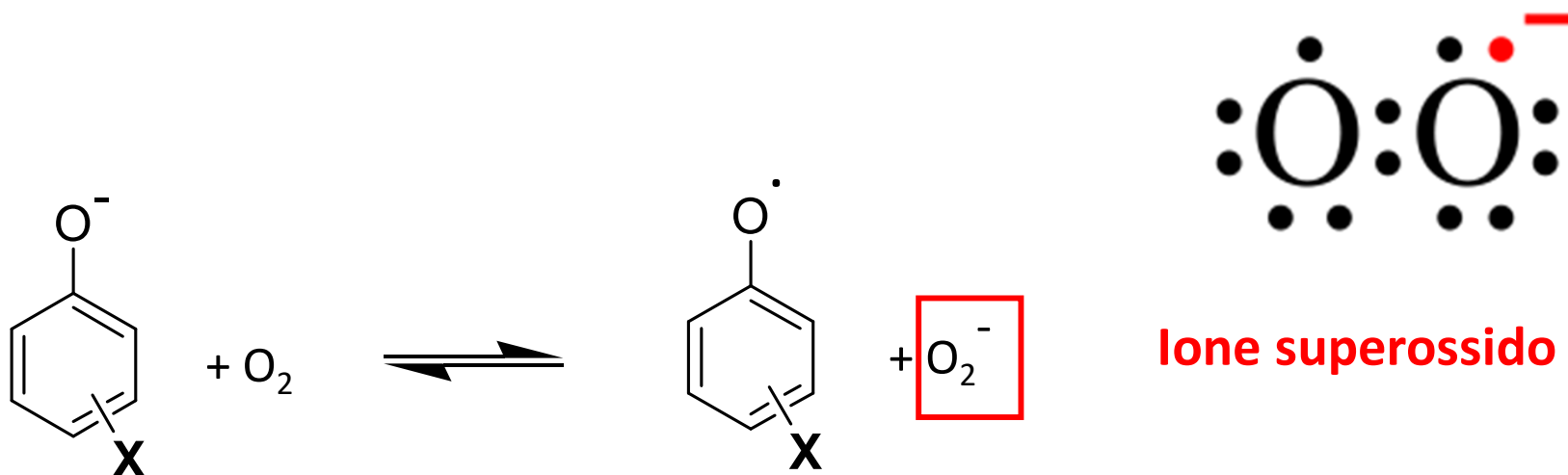


Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Auto-ossidazione dei medicinali

- Reazioni non catalizzate che avvengono tra un composto e l'ossigeno.
- Generalmente avvengono per *trasferimento elettronico* tra ossigeno e gruppi fenolici differentemente sostituiti (o molecole organiche *elettron-ricche* come olefine, ammine terziarie, alcheni, alchini)
- Formazione dello **ione superossido**, specie altamente reattiva che può portare a fenomeni di propagazione a catena

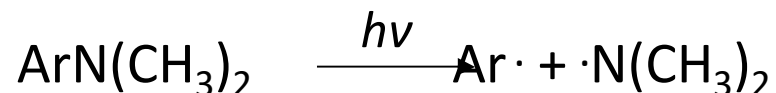


Degradazione dei medicinali

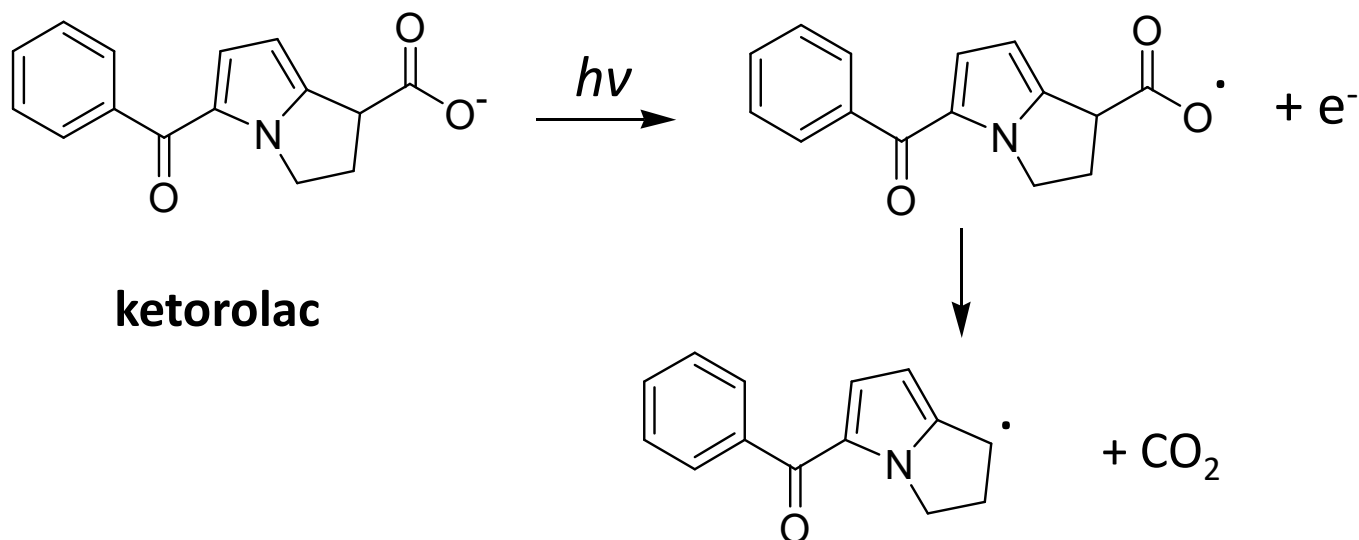
Decomposizione chimica

Ossidazione catalizzata dalla luce

- Reazioni di ossidazione catalizzate dalla luce UV-visibile, che promuove lo stadio di iniziazione del processo radicalico
- In particolare, i gruppi amminici legati a sistemi insaturi sono molto *fotosensibili*



- Anche reazioni di *decarbossilazione fotoindotta* possono avvenire per rottura diretta del legame C-C o previa eliminazione di un elettrone e successiva decarbossilazione



Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Ossidazione catalizzata dal calore

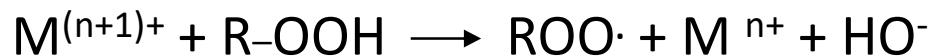
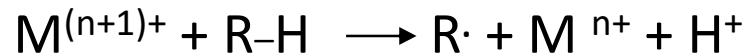
- La rottura omolitica di composti organici causata o catalizzata dal calore, è favorita nel caso di deboli legami chimici
- Lo studio di reazioni *thermo-catalizzate* deve essere effettuata con estrema cautela poiché **l'equazione di Arrhenius** (relazione tra la temperatura e la velocità di reazione) non può essere sempre applicata per i seguenti motivi:
 - Assenza di linearità nell'equazione dovuta a diversi meccanismi, che possono subentrare a diverse temperature
 - I perossidi sono molto più stabili a basse temperature
 - La solubilità dell'ossigeno molecolare diminuisce all'aumentare della temperatura

Degradazione dei medicinali

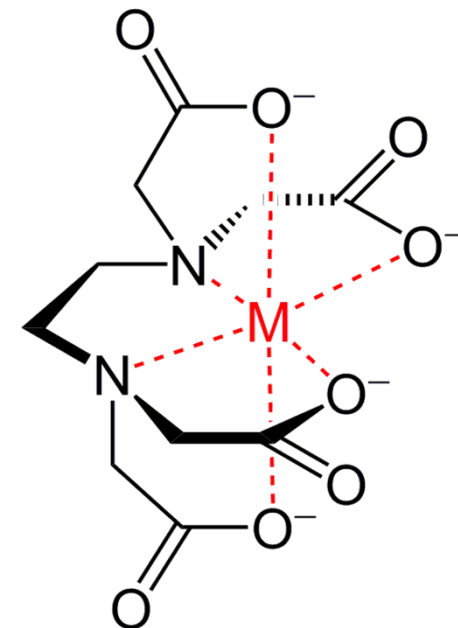
Decomposizione chimica

Ossidazione catalizzata da metalli

- I metalli di transizione, come il rame e il ferro, sono presenti (anche se in piccole tracce) in molti tamponi utilizzati per la preparazione di formulazioni farmaceutiche liquide
- Questi metalli pesanti sono in grado di dare origine a specie radicaliche, interagendo con molecole organiche e inorganiche, ossigeno molecolare e idroperossidi



Per ridurre l'azione catalitica dei metalli, vengono addizionati *agenti chelanti*, come **l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA)**, dando origine a complessi inerti o allontanando il metallo da substrati più instabili.



Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Strategie per inibire i processi ossidativi

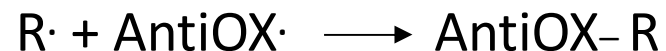
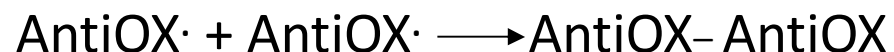
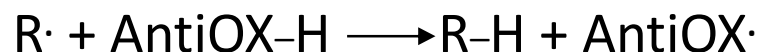
- Ridurre la degradazione ossidativa attraverso l'inibizione delle fasi di propagazione o promuovere i processi di terminazione
- Nel caso di processo ossidativo indotto dalla luce, mediante l'utilizzo di particolari contenitori di vetro ambrato, in grado di bloccare le radiazioni UV-visibili (attenzione alla presenza di metalli pesanti che possono fungere da catalizzatori) o l'utilizzo di particolari molecole in grado di proteggere il prodotto dalla luce (CD, film di rivestimento per compresse)
- Controllo del pH della soluzione contenente composti che hanno una maggiore stabilità a determinati valori di pH (es. adrenalina che a pH 4 è due volte più stabile rispetto a pH 6)
- Nel caso di composti che vanno incontro a processi di auto-ossidazione, la rimozione dell'ossigeno dalla formulazione può portare a miglioramenti della stabilità (es. azoto e anidride carbonica)

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Strategie per inibire i processi ossidativi

➤ Utilizzo di sostanze *antiossidanti*:



➤ Gli agenti antiossidanti hanno un potenziale riduttivo più basso rispetto ai substrati ossidabili, devono essere in grado di reagire con le specie radicaliche già formate per ripristinare il composto di partenza

➤ La complessità dei formulati farmaceutici non permette sempre una corretta scelta dell'antiox. più idoneo, si ricorre sempre ad una verifica sperimentale dell'efficacia di un antiossidante

Degradazione dei medicinali

Decomposizione chimica

Strategie per inibire i processi ossidativi

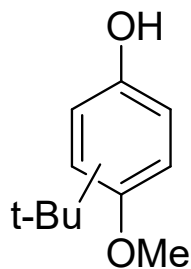
- Caratteristiche di un buon *antiossidante*:
 - Stabile e attivo in un ampio intervallo di pH
 - Solubile nella sua forma ossidata alle concentrazioni d'impiego
 - Incolore sia nella forma ossidata, che nei suoi prodotti di reazione
 - Non tossico e non irritante
 - Stabile durante i processi di preparazione della formulazione farmaceutica
 - Compatibile con i contenitori e con gli eccipienti che costituiscono il formulato
 - Attivo a bassa concentrazione
 - Chimicamente inerte con gli altri costituenti della preparazione
 - Non volatile

Degradazione dei medicinali

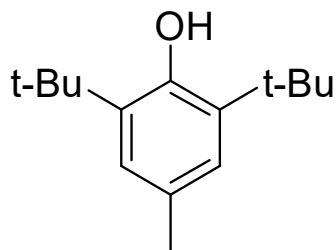
Decomposizione chimica

Strategie per inibire i processi ossidativi

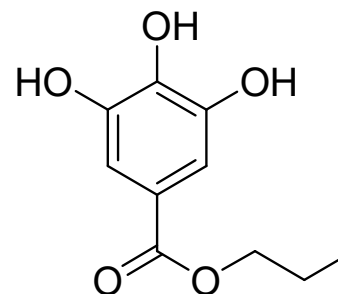
➤ Esempi :



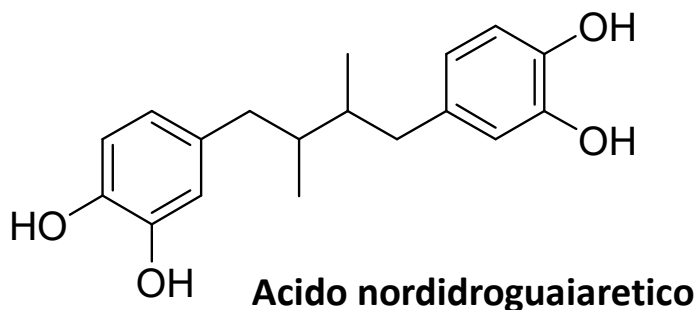
BHA
butildrossianisolo



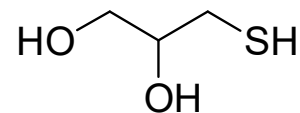
BHT
butildrossitoluene



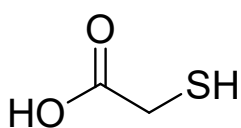
Propil gallato



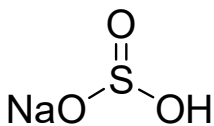
Acido nordidroguaiaietico



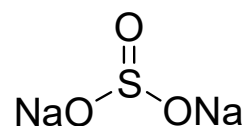
tioglicerolo



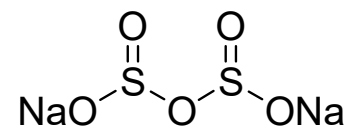
Acido tioglicolico



Sodio bisolfito



Sodio solfito



Sodio metabisolfito

Degradazione dei medicinali

Decomposizione fotochimica

➤ Molte molecole di interesse farmaceutico sono in grado di assorbire le radiazioni elettromagnetiche con lunghezze d'onda che vanno dal visibile all'UV.

➤ Ad ogni lunghezza d'onda è accoppiato un *quanto di energia*, secondo la relazione:

$$E = h\nu$$

h costante di Plank

➤ Nel caso di lunghezze d'onda UV-vis, i valori di energia sono compresi tra 10 e 200 Kcal/mol, risultando in grado di rompere un legame chimico (10-100 Kcal/mol)

➤ Molte molecole di interesse farmaceutico sono *fotosensibili* come alcuni tranquillanti, l'idrocortisone, la riboflavina, l'acido ascorbico, l'acido folico.

➤ I meccanismi di *fotodegradazione* sono spesso molto complessi e solamente alcuni sono stati del tutto elucidati



Degradazione dei medicinali

Fattori che influenzano la cinetica decomposizione in soluzione

- Per i prodotti farmaceutici non è importante la stabilità assoluta della sostanza quanto la sua *stabilità nel tempo* (limite massimo di 5 anni)
- Definizione del *limite di degradazione* del principio attivo (**posto in genere al 10%**)
- Il tempo di vita di un farmaco è strettamente legato alla velocità con cui procedono le reazioni di decomposizione a carico dei vari componenti
- È molto importante valutare i **parametri cinetici** coinvolti nel processo di degradazione (*ordine e velocità di decomposizione*)

Reazioni ordine 0

Reazioni ordine misto

Reazioni primo ordine

Reazioni complesse

- Molti **fattori** possono avere un effetto catalitico su determinate reazioni, accelerandone la velocità di decomposizione
- Fra essi, l'aggiunta di un eccipiente “apparentemente” inerte, parametri ambientali (***temperatura***), il *pH*, la *forza ionica*

Degradazione dei medicinali

Temperatura

- La velocità di reazione è proporzionale al numero di urti tra le molecole nell'unità di tempo.
- Il numero di collisioni aumenta all'aumentare della temperatura possiamo aspettarci che la velocità delle reazioni di decomposizione subisca un incremento con l'aumentare della temperatura.

$$k = Z e^{-E_a/RT}$$

Eq. di Arrhenius

Dove: k è la costante cinetica di generico ordine

Z e R costanti

E_a energia di attivazione

T temperatura assoluta

- Il fattore esponenziale di Boltzmann ha esponente negativo, quindi risulta tanto più piccolo quanto maggiore è l'energia di attivazione e quanto minore è la temperatura
- Reazioni caratterizzate da una elevata E_a possono svolgersi con velocità apprezzabile solo a temperature sufficientemente alte

Degradazione dei medicinali

Temperatura

$$k = Z e^{-E_a/RT}$$

→

$$\ln k = \ln Z - E_a/RT$$

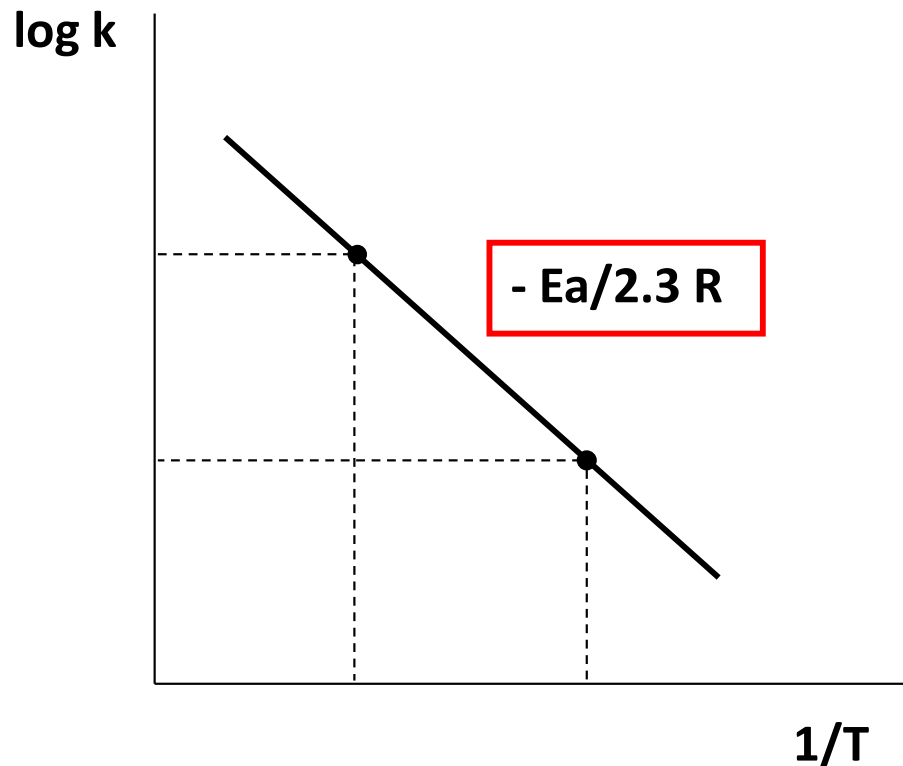
→

$$\ln k = \text{cost.} - E_a/RT$$

$$\log_{10} k = \text{cost.} - E_a/2.3 RT$$

$$\log k_2/k_1 = - E_a/2.3 R (1/T_2 - 1/T_1)$$

$$\ln x = 2.303 \log x$$



- Dal grafico risulta evidente che **E_a** è essenzialmente *costante ed indipendente* da **T** .
- Questo fatto ci permette di condurre esperimenti di cinetica ad *elevate T* , e per estrapolazione determinare le costanti di velocità a temperature più basse
- Tale procedura è utile nei **test di stabilità accelerati**, dove le reazioni a più basse T sono molto lente e difficilmente monitorabili (reaz. *idrolisi*)

Degradazione dei medicinali

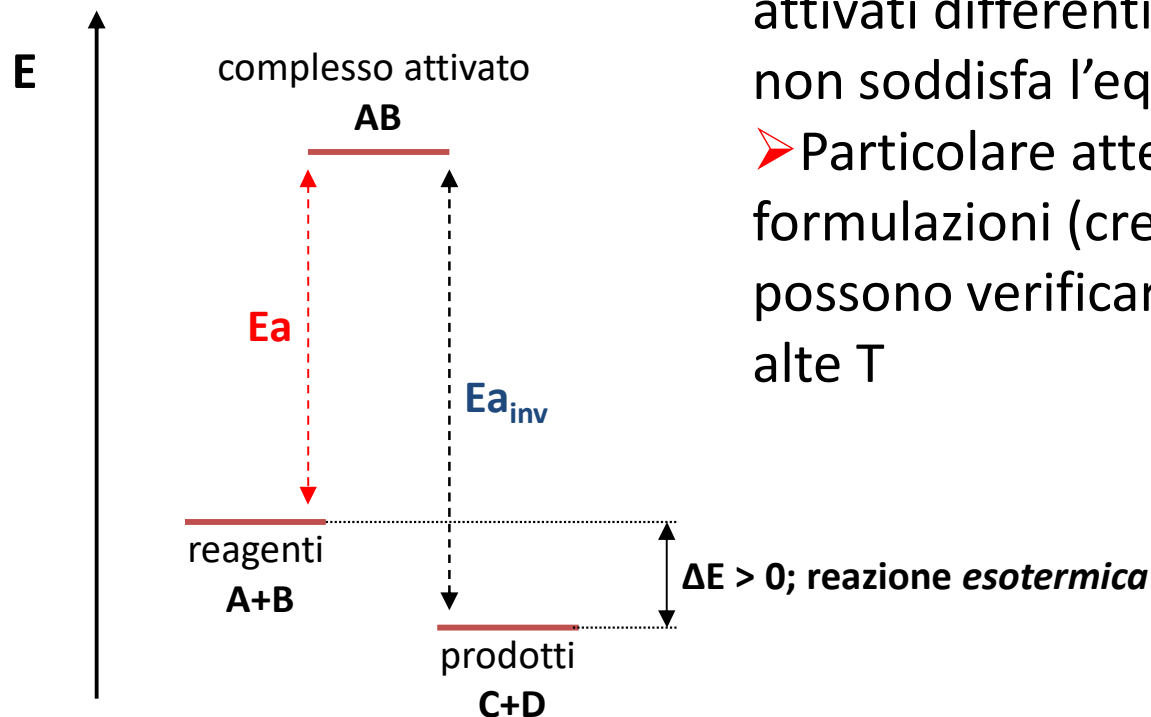
Temperatura

$$k = Z e^{-E_a/RT}$$



➤ L'eq. di Arrhenius è valida solo per processi elementari, reazioni con meccanismi che coinvolgono vari *stadi concorrenti* (complessi attivati differenti) la velocità globale dei processi non soddisfa l'equazione di Arrhenius

➤ Particolare attenzione allo studio di certe formulazioni (creme, unguenti, emulsioni) dove possono verificarsi variazioni dello *stato fisico* ad alte T



Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

Previsione di stabilità

- Lo scopo dei **test di stabilità** è di ottenere informazioni che permettano di proporre il *periodo di validità del preparato e le condizioni di conservazione*.
- La progettazione del test di stabilità varia da prodotto a prodotto.
- Il *formulatore* determina per prima cosa l'effetto sul principio attivo di temperatura, aria, luce, pH, umidità, tracce di metalli e di eccipienti o veicoli utilizzati nella tecnologia farmaceutica.
- Vengono preparate *varie formulazioni* di ciascuna forma farmaceutica che vengono poste nei contenitori previsti per la commercializzazione a varie condizioni ambientali, sia **normali** che **estreme**.
- A *intervalli di tempo* opportuni si verifica l'integrità chimica, fisica, microbiologica valutando i parametri che possono influire sulla sicurezza e l'efficacia del preparato.
- I dati relativi a studi di stabilità devono essere raccolti da almeno tre lotti di prodotto, scelti in modo tale da risultare rappresentativi della successiva *produzione su scala industriale*.
- Le procedure analitiche adottate devono essere totalmente *convalidate*.

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

Previsione di stabilità

➤ Test di stabilità in condizioni normali (*real time*)

➤ Si tratta di test a lunga durata (almeno 12 mesi), condotti a determinate temperature e condizioni di umidità relativa, corrispondenti alle condizioni ambientali osservate nella *zona climatica* della regione nella quale il prodotto verrà conservato, distribuito e utilizzato.

Zona climatica	°C	%UR	mbar
I. <i>Temperata</i> Nord e Centro Europa, Canada, Russia	20	42	9.9
II. <i>Mediterranea</i> Europa meridionale, USA, Giappone	22	52	13.5
III. <i>Caldo secco</i> Nord Africa, Medio oriente	26.4	35	11.9
IV. <i>Caldo umido</i> America meridionale, Estremo Oriente	26.7	76	26.6

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

Previsione di stabilità

➤ Test di stabilità accelerati

- Per alcune formulazioni farmaceutiche il *limite di degradazione* può richiedere diversi *anni* prima di essere raggiunto.
- Per valutare la sensibilità di un prodotto in tempi più ragionevoli, può essere necessario sottoporlo a condizioni di stress elevato.
- I test accelerati permettono di raccogliere *più dati in un tempo più breve*.

Programmi accelerati di stabilità (PAS)

- I campioni da valutare vengono termostatati a temperature prefissate (30 °C, 40 °C, 50 °C) e si valuta il tempo occorrente perché il prodotto subisca una perdita di titolo pari al 10%.
- Dall'analisi di questi tempi, mediante metodo grafico o valutazione matematica di regressione lineare, è possibile estrapolare il tempo necessario perché il prodotto si degradi del 10% a temperatura ambiente (25 °C).

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

Previsione di stabilità

Programmi limitati di stabilità (PLS)

- I campioni da valutare vengono tenuti a temperature superiori (70-100 °C)
- Malgrado l'estrapolazione della stabilità a 25 °C sia più rapida da ottenere (poche ore) rispetto ai PAS il rischio di accelerare artificialmente la degradazione del medicinale è notevole
- Questi risultati vanno considerati come una indicazione generica di instabilità e necessitano di essere confermati da test meno drastici.

Programmi *dinamici* di previsione di stabilità

- È una evoluzione dei PLS, nei quali l'estrapolazione del tempo di degradazione di un prodotto a 25 °C viene ottenuta sottoponendo lo stesso a temperature progressivamente decrescenti di 10 °C, a partire da 90 °C.
- Il valore di estrapolazione viene continuamente corretto mediante applicazioni matematiche, al fine di aumentare la predittività del risultato, cioè restringere i limiti di confidenza dei valori ottenuti.

Stabilità delle preparazioni farmaceutiche

Previsione di stabilità

Obiettivi dei test accelerati

- Individuare rapidamente la degradazione dello stesso prodotto in differenti condizioni iniziali, così da scegliere la formulazione migliore per le successive fasi dello sviluppo e le condizioni di conservazione più opportune.
- Stimare la data di validità del medicinale, cioè il tempo entro il quale il preparato conserva la sua qualità
- Identificare un rapido test di controllo, da applicare ai successivi lotti di prodotto per verificarne eventuali alterazioni.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

Attività di convalida rivolte agli ambienti, alle macchine, agli impianti e agli strumenti.

Riferimento a ***Buona Prassi di Fabbricazione*** sia statunitense che europea.

Con il termine «qualificazione» si intende *l'azione consistente nel dimostrare che una data attrezzatura funziona correttamente e dà effettivamente i risultati previsti.*

Suddivisione della qualificazione dei sistemi operativi:

- Necessità dell'Utente (U.R.)
- Qualificazione del progetto (Design Qualification D.Q.)
- Qualificazione dell'Installazione (Installation Qualification I.Q.)
- Qualificazione dell'Operatività (Operational Qualification O.Q.)
- Qualificazione delle Prestazioni (Performance Qualification P.Q.)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ **Necessità dell'Utente (U.R.)**

Documento spesso sottovalutato ma fondamentale, in quanto dal suo studio partono tutte le altre attività di qualificazione.

In questo documento il responsabile dovrà definire quello che vuole fare in quegli ambienti, che cosa vuole ottenere, quanti pezzi dovrà produrre e in quanto tempo, la macchina che vuole acquistare, o quale dovrà essere la qualità e quantità dell'aria dell'impianto di condizionamento, quanta e di che qualità dovrà essere l'acqua fornita dall'impianto di trattamento e distribuzione dello stabilimento ecc.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ Qualificazione del progetto (D.Q.)

Documento che verifica che le fasi di progettazione , ordine e costruzione siano svolte nel rispetto dei requisiti quali-quantitativi del processo, delle necessità dell'utente, delle norme di qualità, di sicurezza ecc.

Saranno riportati i risultati delle verifiche effettuate, le modalità adottate per le specifiche tecniche e le normative di riferimento.

Se prendiamo in esame una macchina o impianto destinati alla produzione di un farmaco, i relativi documenti sono:

- **Produzione** – quantità da produrre, le tipologie del processo produttivo, eventuali approcci particolari, le specifiche del prodotto, gli spazi a disposizione, eventuali ipotesi di macchinari.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ Qualificazione del progetto (D.Q.)

- **Tecnica farmaceutica e sviluppo** – aspetti critici legati alle caratteristiche e specifiche del prodotto e al processo di fabbricazione
- **Controllo qualità (Q.C.) e assicurazione qualità (Q.A.)** -
L'assicurazione qualità (*quality assurance*) ha finalità preventive. Il suo fine è quello di assicurare che i processi di produzione di ciò che viene consegnato (prodotto, impianto ecc.) di un progetto rispettino gli standard qualitativi concordati con il cliente finale. Il controllo qualità (*quality control*) ha invece finalità ispettive. Il suo fine è controllare che il prodotto di un progetto sia conforme alle specifiche ed ai requisiti predefiniti. Importante che il tutto sia documentato mediante le procedure interne dell'azienda.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ Qualificazione del progetto (D.Q.)

- **Ingegneria e sicurezza** – caratteristiche principali che dovrà possedere la macchina o l'impianto perché siano soddisfatte le esigenze delle altre funzioni, compresi i requisiti di sicurezza
- **Costruttore della macchina** – deve proporre una macchina con caratteristiche rispondenti alle richieste dell'utente

I documenti di riferimento devono essere elencati, tra questi molto importanti sono i codici delle procedure (SOP):

*«La **Standard Operating Procedures (SOP)** è una procedura operativa che riporta una serie di istruzioni scritte che documentano un'attività di routine o ripetitiva seguita dai dipendenti in un'organizzazione/azienda. Lo sviluppo e l'utilizzo di SOP sono parte integrante di un ottimo e verificabile standard di qualità.»*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ Qualificazione delle prestazioni (P.Q.)

Prevede l'effettuazione di controlli sul sistema (ambiente, impianto o macchina) con lo scopo di verificare:

- Se le prestazioni del sistema sono rispondenti alle specifiche di progetto
- Se il sistema è in grado di assicurare la qualità del prodotto
- Se le prestazioni sono riproducibili ed affidabili nel tempo
- Come si comporta il sistema in presenza di anomalie e quali sono i possibili effetti sulla qualità del prodotto

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Qualificazione dei sistemi produttivi

➤ Qualificazione delle prestazioni (P.Q.)

Anche la PQ dovrà essere realizzata in tre tempi:

- Predisposizione e approvazione di un protocollo PQ realizzato secondo l'impostazione del VMP
- Attuazione delle verifiche e registrazione dei risultati sulle schede appositamente predisposte
- Redazione del rapporto conclusivo e approvazione del protocollo completato

Il PQ è redatto generalmente dal gruppo di ingegneria con la collaborazione della produzione e assicurazione di qualità (QA).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Specifiche del Controllo Qualità

- Il produttore istituisce e mantiene un sistema di controllo della qualità posto sotto la responsabilità di una **persona adeguatamente qualificata** e indipendente dalla produzione. Tale persona dispone o può accedere a uno o più laboratori di controllo della qualità dotati di personale adeguato e di strumenti idonei ad analizzare e testare le **materie prime, i materiali da imballaggio e i prodotti intermedi e finali**.
- Durante il controllo finale del **prodotto finito**, prima della distribuzione o dell'immissione in commercio o dell'utilizzazione per sperimentazione clinica, il sistema di controllo della qualità tiene conto, oltre che dei risultati delle analisi, anche di informazioni essenziali come le condizioni di produzione, i controlli nel corso del processo, l'esame dei documenti di produzione, la conformità del prodotto alle specifiche e dell'imballaggio definitivo.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Specifiche del Controllo Qualità

- I campioni di ogni lotto di medicinale finito sono conservati per almeno **un anno dalla data di scadenza**. Per i **medicinali sperimentali**, campioni sufficienti di ogni lotto di prodotto sfuso e delle principali componenti d'imballaggio usate per ogni lotto di prodotto finito sono conservati, per almeno **due anni** dal completamento o dalla sospensione formale dell'ultima sperimentazione clinica in cui il lotto è stato usato, qualunque sia il periodo più lungo. I campioni delle **materie prime** usate nel processo di produzione, esclusi solventi, gas o acqua, sono conservati per almeno **due anni** dal rilascio del lotto del medicinale.

Tale periodo può essere abbreviato se il periodo di stabilità della materia prima, indicato nella specifica che la riguarda, è più breve. Tutti i campioni sono tenuti a disposizione delle autorità competenti. Con l'approvazione dell'AIFA possono essere definite altre condizioni di campionamento e di conservazione delle materie prime e di taluni medicinali quando sono prodotti singolarmente o in piccola quantità, o il loro immagazzinamento solleva particolari problemi.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Convalida delle attività di pulizia

La convalida delle attività di pulizia delle attrezzature dedicate alle produzioni farmaceutiche deve dimostrare l'efficacia di una determinata procedura operativa ad ottenere una pulizia «adeguata».

Ed è proprio nello stabilire cosa si intenda per «pulizia adeguata» e stabilire i suoi limiti il problema, considerando che un'apparecchiatura deve essere pulita da residui di sostanze farmaceutiche, da detersivi, da polvere, da lubrificanti e microrganismi.

Pulizia per cambio prodotto – richiede una completa convalida

Pulizia per cambio lotto – basta che le attrezzature siano visivamente pulite a meno di problemi di degradazione prodotti per il lavaggio o residui da detersivi nel prodotto finito.

Generalmente la convalida va effettuata solo sulle superfici che vengono a contatto con il prodotto, mentre per altre parti sulle quali il prodotto può «migrare» non è necessaria una convalida ma una semplice pulizia.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Convalida delle attività di pulizia

Secondo le PIC (procedure pulizia macchine) è ritenuto accettabile scegliere una gamma rappresentativa di prodotti e processi simili e giustificare un programma di convalida che raccolga i risultati critici riferiti ai prodotti e processi prescelti. Come tutte le procedure di convalida occorre definire la frequenza con cui le varie procedure vanno riconvalidate tenendo conto che le procedure «manuali» vanno riesaminate più frequentemente di quelle per sistemi automatizzati (ad es. CIP).

Aspetti microbiologici: per prevenire contaminazioni batteriche, tutte le attrezzature devono essere conservate asciutte e non si deve permettere che in loro, dopo le pulizie, resti acqua stagnante. Anche in questo caso, determinare in funzione di condizioni favorevoli (umidità relativa, fessure, superfici ruvide) alla proliferazione di m.o., l'intervallo di tempo tra una pulizia e l'altra e l'entità del trattamento.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Bibliografia

EMA:

*Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice :
“Qualification and Validation” – October 2015*

FDA:

*Guidance for Industry “Process Validation: General Principles
and Practices” - January 2011
Current Good Manufacturing Practices (CGMP) Revision 1*

SOP:

SOP 0102-006 Validation Master Plan

Impianti dell'Industria Farmaceutica

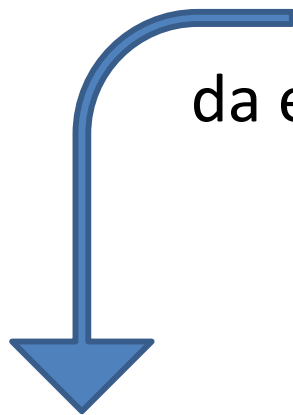
Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Validation Master Plan

documento aziendale che pianifica le attività di

qualifica e/o convalida

da eseguire presso lo stabilimento
di produzione



assicura che tutti i **locali**,
sistemi e le apparecchiature siano
adeguatamente installati e che
funzionino
correttamente fornendo i risultati attesi

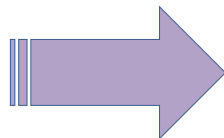
assicura che il **processo specifico**
produrrà **in modo consistente** un
prodotto conforme alle sue
predeterminate specifiche e
caratteristiche di qualità.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

ATTIVITA' DI CONVALIDA e QUALIFICA

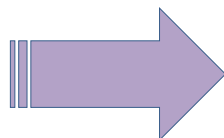
Definita



Direttive, linee guida, leggi

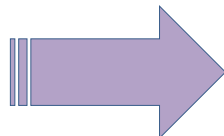
- EMA: Annex 15 GMP
- FDA: Guidance for Industry "Process Validation: General Principles and Practices" - January 2011
Current Good Manufacturing Practices (CGMP)
Revision 1

Pianificata



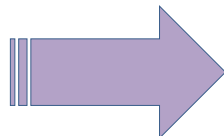
Validation Master Plan

Eseguita



Protocolli, test, verifiche, report

Tenuta sotto controllo



Revisioni, riconvalide, change control

Impianti dell'Industria Farmaceutica

VMP e Annex 15

Principi:

- ✓ Il **VMP** dovrebbe essere un ***documento di sintesi***, breve, conciso e chiaro.
- ✓ Il **VMP** dovrebbe contenere, come minimo, dati in merito a:
 - (a) *filosofia di convalida*
 - (b) *struttura organizzativa delle attività di convalida*
 - (c) *elenco degli impianti, dei sistemi, delle apparecchiature e dei processi da convalidare*
 - (d) *formato della documentazione: il formato da utilizzare per protocolli e report*
 - (e) *pianificazione e calendario delle attività*
 - (f) *controllo dei cambiamenti*
 - (g) *riferimenti a documenti esistenti (SOP, etc.)*

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

VMP in MIT

1. Processi di produzione
2. Qualifica dell'impianto HVAC dell'area a contaminazione controllata (Clean room)
3. Convalida del processo di riempimento in asepsi
4. Qualifica attrezzature
5. Contratti di manutenzione preventiva
6. Piano di taratura
7. Qualifica degli operatori di clean room
8. Qualifica degli operatori di sperlatura
9. Convalida Metodi analitici

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Sperlatura: Le fiale prodotte nel reparto sterile attraversano il reparto di sperlatura dove viene verificata e certificata l'assenza di impurità all'interno del farmaco grazie a macchinari ad altissima tecnologia e telecamere ad alta definizione che riescono ad individuare possibili *difetti o la presenza di corpi estranei nella fiala*, garantendo così la qualità e la sicurezza dei farmaci.

Può essere effettuata anche manualmente mediante l'utilizzo di un **tavolo per la sperlatura manuale** da banco, che è composto da una struttura metallica, supportata da quattro piedi di appoggio.

Il piano di lavoro è composto da un piano rivestito con pannelli in melammina ed i pannelli verticali hanno alternanza di colore bianco e nero.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

1. Processi di produzione

➤ **caratteristica** fondamentale del **processo produttivo** in questione:

farmaco sperimentale (*Anticorpo monoclonale per Artrite Reumatoide*) per sua natura può portare ad un continuo variare delle specifiche quindi deve essere a maggior ragione controllato ed ogni cambiamento tracciato (vedi produzione farmaci biologici).

➤ **spiegazione del processo**, costituito da:

- preparazione delle banche cellulari (Master Cell Bank e Working Cell Bank);
- semina della Working Cell Bank e amplificazione della coltura cellulare (Upstream A);
- fermentazione della coltura cellulare (Upstream B);
- purificazione multistep dell'anticorpo prodotto (Downstream 1 e 2);
- riempimento **asettico** in vials (Filling).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

2. Qualifica dell'impianto HVAC

HVAC è una sigla inglese, molto usata in tutti i campi dell'industria, che sta per *Heating, Ventilation and Air Conditioning*, ovvero "riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria"

- **Qualificata per la prima volta** nel 2011 da **XYZ S.p.A**
- **Riqualificata** annualmente da **XYZ S.p.A:**
 - ✓ Effettua le attività di **manutenzione** (sostituzione filtri, etc.)
 - ✓ verifica la **calibrazione** dei manometri differenziali
 - ✓ ripete le attività di qualifica (**PQ** (*Qualifica Prestazioni*) limitatamente alla contaminazione **particellare**)

Il Laboratorio Microbiologico di MIT:

- ✓ esegue la qualifica **at rest** (**PQ**) per la contaminazione **microbiologica** (**annuale**)
- ✓ esegue la qualifica **at rest** (**PQ**) per la contaminazione **particellare** (**annuale**)
- ✓ Le condizioni **operational** vengono verificate routinariamente con cadenza temporale prestabilita

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

3. Convalida del riempimento in asepsi (Media Fill)

E' eseguito dal **Laboratorio Microbiologico** di MIT

- ✓ Cadenza semestrale
- ✓ Simulazione del riempimento con un terreno di coltura al posto del Purified Bulk
- ✓ Monitoraggio particellare contemporaneo in classe A e classe B
- ✓ Monitoraggio microbiologico aria attivo (campionatori) e passivo (piastre da esposizione)
- ✓ Monitoraggio microbiologico superfici e operatori a fine lavorazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

4. Qualifica attrezzature (es. Autoclavi Fedegari PH 078 e PH 089)

- ✓ Ripetizione **PQ** da parte di ditta specializzata in convalide (es. *CTP, Techniconsult*) con cadenza **annuale**
- ✓ Esecuzione di **3 run** di verifica penetrazione calore **per ciascun carico** standard utilizzando almeno **6 termocoppie** connesse ad un acquisitore dati ed altrettanti **indicatori biologici**.
- ✓ Al termine della sterilizzazione, per ogni termocoppia si dovrà avere un **valore minimo di F_0 di 15 minuti (rif. 121°C)**.

Significa che in ogni punto del carico e della camera, **l'effetto letale termico complessivo** deve essere equivalente ad almeno 15 minuti a 121 °C.

Se una termocoppia registra, ad esempio, 122,5 °C per 10 min, il suo F_0 sarà circa 20 min (perché 122,5 è più caldo di 121 °C → effetto moltiplicativo).

Se un'altra registra 119,5 °C per 20 min, l' F_0 sarà inferiore a 15 min e il punto non sarà accettabile → il ciclo va rivisto (tempi, penetrazione vapore, carico, ecc.).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

4. Qualifica attrezzature (es. Autoclavi Fedegari PH 078 e PH 089)

- ✓ Tutti gli ***indicatori biologici*** dovranno dare esito ***negativo***

Serve per confermare biologicamente l'efficacia del ciclo su una popolazione nota di spore batteriche altamente resistenti, che unita al test termico precedente (F_0) dà garanzie sull'efficacia della sterilizzazione.

- **Su richiesta dell'AlFA, vengono effettuate anche i seguenti test:**

- incondensabili - vapore surriscaldato - bowie & dick

Controlli interni

Ogni tre mesi il Laboratorio Microbiologico verifica la corretta funzionalità dell'autoclave, eseguendo dei cicli di sterilizzazione con diversi carichi in cui vengono posti degli indicatori biologici

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Test «Bowie&Dick»

Il test verifica la **corretta penetrazione del vapore saturo nei carichi** porosi sottoposti al ciclo di classe B e nelle **confezioni imbustate**. Inoltre, il test Bowie & Dick controlla la presenza e la qualità del vapore, la temperatura e il tempo di esposizione.

Al termine del ciclo di controllo è sufficiente aprire il pacco ed estrarre il foglio indicatore contenuto all'interno: un viraggio uniforme al colore nero indica il superamento del test.

Il test può essere eseguito in autoclavi, per strumenti imbustati e carichi porosi.

Il test di Bowie & Dick va eseguito quotidianamente, al mattino, prima dell'utilizzo dell'autoclave (D.lgs 81:2008), salvo diverse indicazioni specificate da disposizioni regionali.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

5. Contratti di Manutenzione Preventiva

- ✓ I contratti di ***Manutenzione Preventiva vengono stipulati*** con:
 - le ***aziende fornitrici*** delle apparecchiature;
 - ***centri di assistenza*** autorizzati.
- ✓ La tipologia degli interventi può variare in funzione dello strumento:
 - ***manutenzione*** e controllo dello stato dell'apparecchiatura;
 - attività di ***calibrazione/taratura***;
 - ***qualifica*** dell'operatività.
- ✓ La tempistica degli interventi varia da ***sei mesi*** a ***due anni***

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Contratti di Manutenzione Preventiva

(es. Bilancia Mettler AT 201 –PH 021)

*Contratto di manutenzione con il centro assistenza autorizzato della ditta
Mettler Toledo S.p.A*

Il contratto prevede ***una visita all'anno*** in cui l'apparecchio è sottoposto a ***manutenzione e calibrazione***. E' previsto il ***controllo metrologico*** con pesi certificati prima e dopo la manutenzione, con l'esecuzione dei test di:

- eccentricità;
- linearità;
- ripetibilità;
- incertezza

Impianti dell'Industria Farmaceutica

6. Piano di Taratura

- ✓ Tutta la **strumentazione**, singola o facente parte di **impianti più complessi**, coinvolta direttamente o indirettamente nei processi di produzione, controllo e stoccaggio dei prodotti (**strumenti critici**)
- ✓ Gli strumenti sottoposti a taratura sono essenzialmente:
 - **Catene termometriche** (*apparecchiatura per la misura della temperatura, costituita da un sensore ed un dispositivo di visualizzazione*)
 - **Catene di misura della pressione**
 - **Sonde CO₂**
- ✓ Viene eseguita da una **ditta specializzata** (es. CTP, Techniconsult), che prepara anche la relativa documentazione, con cadenza **biennale**
- ✓ Elenco degli strumenti sottoposti a taratura

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

7. Qualifica degli operatori di clean room

- Gli operatori di produzione / controllo qualità e gli operatori di pulizia che lavorano in **clean room** (classi A/B) vengono **qualificati**.
- Gli operatori eseguono la **vestizione** secondo **SOP 0606-002 Vestizione per clean room**, e vengono immediatamente **campionati** dal personale del Laboratorio Microbiologico con **piastre da contatto** (guanti e tuta nelle posizioni: fronte, petto, gomiti)
- La procedura è **ripetuta per tre volte** nel caso della prima qualifica. Nelle qualifiche successive è eseguita **una sola volta**.
- I risultati sono descritti in un **report**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

8. Qualifica degli operatori di sperlatura

- La qualifica degli operatori che eseguono la sperlatura viene effettuata, secondo la **SOP 0201-004** *Addestramento e Qualifica per l'Ispezione visiva di vials di prodotto finito (sperlatura)*, utilizzando dei kit di flaconi liquidi.
- kit di vial è composto da 100 unità, di cui:
 - tra 85 e 90 vials idonee;
 - tra 10 e 15 vials non idonee (difetti generalmente riscontrati durante la produzione) tra i quali ci sono 4 **difetti critici**.
- I risultati vengono riportati su una scheda e applicati a delle formule per ottenere le percentuali che ci attestano l'idoneità dell'operatore (qualificato o non qualificato).
- **Qualifica:** 3 prove per kit
- **Riqualifica biennale:** 1 prova per kit

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

9. Convalida di metodi analitici

- La convalida dei metodi analitici è gestita in MIT secondo la **SOP 0503-001** *Validazione dei metodi analitici* (la SOP ha carattere generale)
- è necessario considerare che **ogni metodo analitico ha caratteristiche proprie**, alle quali si devono adattare le indicazioni di seguito riportate:
 - ✓ Specificità
 - ✓ Accuratezza
 - ✓ Linearità
 - ✓ Precisione
 - ✓ Riproducibilità
 - ✓ Limite di rilevabilità (LOD)
 - ✓ Limite di quantificazione (LOQ)
 - ✓ Robustezza

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Esempio di VMP - ditta MIT (Media Impresa Toscana)

Documenti correlati al VMP in MIT?

Riporta i concetti dell'Annex 15 per VMP e attività di convalida in genere

Elenco attrezzature dalla quale si estrapola la **tabella VMP**

MIT

Processo...

Titolo: VALIDATION MASTER PLAN

AREA DI APPLICAZIONE: QUALITY ASSURANCE

SETTORE: GESTIONE D'

Revisione n. 3

DATA di EMISSIONE 0

SOSTITUISCE SOP n 0102-006 del 05/09/2007

di SCADENZA 03/08/2013

fino al 03/08/2015

Elenco attrezzature

Verificata

Approvata

Qualificata

QUESTA PROCEDURA E' DI PROPRIETA' MIT

NON PUO' ESSERE ASPORTATA O FOTOCOPIATA

Riporta i concetti dell'Annex 15 per VMP e attività di convalida in genere

Elenco attrezzature dalla quale si estrapola la **tabella VMP**

Impianti di lavoro

(Clean Room)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Principi generali

Locali ed attrezzature devono essere **localizzati, progettati, costruiti, adattati e sottoposti a manutenzione per poter realizzare le operazioni che devono eseguire**. La concezione e progettazione devono mirare a minimizzare il rischio di errori e consentire un'efficace pulizia e manutenzione al fine di evitare il fenomeno della ***cross-contamination***, accumulo di polvere o sporcizia e in generale ogni danno alla qualità del prodotto.

Le attrezzature produttive devono essere inserite in un ambiente che presenti il rischio minimo di contaminazione dei materiali o dei prodotti.

Illuminazione, temperatura, umidità e ventilazione non devono, direttamente o indirettamente, danneggiare né i prodotti medicinali durante la loro produzione e deposito, né il corretto funzionamento degli impianti.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Principi generali

Deve essere evitato l'ingresso dei non addetti ai lavori e le aree di produzione, deposito e controllo qualità non devono essere usate come passaggio da personale che non vi lavori.

Aree produttive

Per minimizzare il rischio medico dovuto a ***cross-contamination***, le aree di produzione di particolari prodotti medicinali ad alta attività (derivati delle penicilline, preparazioni biologiche da macro-organismi vivi) devono essere dedicate e separate dalle altre produzioni. Analogamente la produzione di altri particolari prodotti come antibiotici, ormoni, citotossici e prodotti non-medicinali non dovrebbe essere condotta nella stessa area. Per tali prodotti si opta per la produzione «a **campagna**» nella stessa area, purchè siano prese precauzioni specifiche e decontaminazioni tra una campagna e l'altra.

I locali dovrebbero essere disposti in modo da permettere che le varie fasi successive della produzione si svolgano in aree contigue, in un ordine logico corrispondente alla sequenza delle operazioni.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Principi generali

Aree produttive

Gli spazi destinati al deposito dei materiali devono permettere l'ordinato e logico posizionamento delle attrezzature, minimizzare il rischio di confusione tra prodotti diversi, e cross-contamination.

Dove le materie prime, i prodotti e materiali di confezionamento sono esposti all'ambiente, le superfici del locale (muri, pavimenti e soffitti) devono essere lisce, libere da fessure, giunti o crepe, per permettere pulizie facili ed efficaci.

Le tubazioni di servizio, i canali dell'aria e in generale le condutture degli impianti e dei servizi devono essere progettati e posizionati in modo da evitare la creazione di spazi difficili da pulire.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Principi generali

Aree di deposito

Nelle aree di ricezione e di spedizione i prodotti devono essere protetti dalle intemperie: devono essere inoltre disponibili degli spazi dove i materiali ricevuti dall'esterno possano essere puliti prima del loro stoccaggio.

Le zone dedicate alla quarantena devono essere separate fisicamente e ben segnalate: accesso limitato solo al personale autorizzato.

I locali di deposito devono essere puliti e asciutti, con valori di temperatura e umidità mantenuti entro limiti accettabili.

Aree per il Controllo Qualità

Il laboratorio QC è separato dalle aree di produzione. I laboratori devono avere spazio sufficiente ad evitare frammischiamenti dei materiali e cross-contamination. Devono essere disponibili spazi per il deposito campioni e per l'archivio.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Principi generali

Aree di servizio

I locali di pausa per il riposo o il rinfresco devono essere separati dalle aree lavorative. Gli spogliatoi ed i servizi igienici devono essere facilmente accessibili ed adatti per il numero di utenti previsto. Le officine di manutenzione devono essere ubicate lontano dalle aree di produzione.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Criteri di realizzazione degli ambienti di lavoro

Il progetto-organizzazione degli ambienti dell'officina farmaceutica deve essere pensato in modo da ottimizzare i flussi produttivi, nel rispetto delle Norme di Buona Fabbricazione, mediante:

- Il raggruppamento delle aree operative omogenee
- La razionalizzazione dei flussi di materiali e personale
- Il trattamento dell'aria diversificato ed idoneo alle esigenze delle zone servite
- Prevenzione della cross-contamination
- Realizzare zone idonee per il campionamento, pesata
- Impianti di trattamento dell'aria in relazione all'attività svolta
- Definire le aree di magazzino, distinguendo i materiali di diversa tipologia

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Classificazione delle aree operative

Classe	Tipo di area	Esempi
I	Ambienti in cui m/p, materiali di confezionamento e prodotti finiti sono assenti o in transito chiusi nei loro imballi commerciali	<ul style="list-style-type: none">-aree di ricezione materiali-aree di decontaminazione dei materiali-aree tecniche per la produzione di servizi-locali per i servizi tecnici
II	Ambienti in cui m/p, materiali di confezionamento e prodotti finiti sono assenti o in transito chiusi nei loro imballi commerciali	<ul style="list-style-type: none">-aree di quarantena per i materiali-aree di deposito delle materie prime (principi attivi ed eccipienti)-aree di deposito dei materiali di confezionamento-aree uffici-servizi igienici personale

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Classificazione delle aree operative

Classe	Tipo di area	Esempi
III	Ambienti in cui si effettua lavorazione e manipolazione di prodotti farmaceutici a ciclo chiuso (prodotti nei confezionamenti primari o in recipienti chiusi)	-aree di confezionamento terminale di prodotti farmaceutici -spogliatoi del personale
IV	Ambienti in cui si effettua lavorazione o manipolazione di prodotti farmaceutici a ciclo aperto	-aree di campionamento delle materie prime -aree di pesata delle materie prime -aree di formulazione delle forme farmaceutiche -aree di ripartizione dei prodotti farmaceutici -aree destinate al QC chimico-fisico -aree destinate al QC microbiologico -locali barriera tra aree a diversa destinazione (SAS) -locali per lavaggio attrezzature

Impianti dell'Industria Farmaceutica

➤ Classificazione delle aree operative

Classe	Tipo di area	Esempi
V	Ambienti in cui si effettua lavorazione e manipolazione di prodotti farmaceutici a ciclo aperto e in asepsi	-blocchi sterili (Classi A, B, C, D)

Cross-contamination

La **contaminazione incrociata** costituisce per l'industria farmaceutica una problematica di fondamentale importanza. Se in una industria farmaceutica vengono lavorati due prodotti (A e B) viene definita c.i. il fenomeno per il quale **il prodotto A risulta contaminato da B, oppure dalle rispettive materie prime o intermedi**. Per minimizzare il rischio di c.i. occorre mettere in atto i seguenti interventi:

- Adeguate accorgimenti nelle caratteristiche costruttive di impianti, macchine e aree di lavoro

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Cross-contamination

- Idonei sistemi di trattamento dell'aria (climatizzazione, ricambi e filtrazioni dell'aria)
- Procedure dettagliate relative ai sistemi di pulizia
- Corretta gestione dei flussi di personale e di materiali

Quando può verificarsi la contaminazione incrociata?

- Ricevimento materie prime

Occorre quindi:

- Effettuare un controllo della documentazione tecnica di fornitura
- Controllare tutti i colli per verificarne l'integrità
- Pulire adeguatamente i colli
- Etichettare adeguatamente ogni collo

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Cross-contamination

Quando può verificarsi la contaminazione incrociata?

➤ Immagazzinamento

Occorre quindi:

- Evitare rotture accidentali adottando particolari cautele
- Addestrare in modo specifico gli operatori
- Predisporre chiare procedure per la gestione materiali

➤ Campionamento e pesata delle materie prime

- Devono essere effettuate in aree dedicate
- Aree realizzate per agevolare le pulizie
- Corretto trattamento e filtrazione dell'aria
- Addestramento specifico operatori
- Utilizzo di un abbigliamento protettivo e monouso
- Adottare sistemi di protezione e contenimento nel caso di sostanze pericolose
- Predisporre chiare procedure per le fasi operative

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Cross-contamination

Quando può verificarsi la contaminazione incrociata?

➤ Produzione

- Operare in aree dedicate
- Utilizzare sistemi di trattamento aria con idonea filtrazione
- Creare pressioni differenziali tra i locali e **air-locks** in modo da evitare transiti di aria tra locali in cui vengono lavorati prodotti diversi
- Evitare il ricircolo di aria contaminata
- Installare sistemi di captazione localizzata dell'aria nei punti in cui si possa sviluppare polvere
- Organizzare la vestizione degli operatori in modo che non debbano uscire dai locali di lavoro con abiti contaminati
- Se possibile utilizzare sistemi produttivi a circuito chiuso
- Procedure pulizia efficaci e convalidate
- Controllare analiticamente i prodotti
- Etichettare i prodotti in modo consono al suo status

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)



[https://www.youtube.com
/watch?v=ilS6u1qh1z8](https://www.youtube.com/watch?v=ilS6u1qh1z8)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)



Cleanroom modulare

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

Una classe di locali di estremo interesse per l'industria farmaceutica. In questi locali vengono manipolati e ripartiti nei loro contenitori d'uso (fiale, flaconi, tubetti) tutti quei prodotti che debbono essere confezionati **sterili, ma che non possono essere sterilizzati nei loro definitivi contenitori perché termolabili o sensibili ad altri agenti sterilizzanti.**

I locali appartenenti al blocco sterile devono essere costruiti in maniera particolare effettuando un controllo accurato riguardante le particelle trasportate con l'aria, la temperatura, l'umidità relativa, la pressione, il percorso e il movimento dell'aria stessa.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Requisiti costruttivi

Nelle aree pulite tutte le superfici esposte dovrebbero essere lisce, impervie e senza soluzione di continuità per poter minimizzare lo spargimento o accumulo di particelle o microrganismi e permettere l'applicazione ripetuta di agenti di pulizia e disinfettanti dove necessario. Niente fessurazione o interruzioni non pulibili ed un minimo di sporgenze, mensole, piani d'appoggio e attrezzature. Niente porte scorrevoli, i controsoffitti devono essere sigillati per prevenire la contaminazione dello spazio sovrastante.

Lavandini devono essere eliminati dalle aree A/B usate per produzioni asettiche. Nelle altre aree devono essere inseriti sifoni tra i lavandini e le fognature.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Requisiti costruttivi

Gli spogliatoi devono essere progettati come **air-locks** ed utilizzati per realizzare una separazione fisica tra le diverse fasi della vestizione in modo da minimizzare la contaminazione microbica e particellare dell'abbigliamento protettivo.

Devono essere flussati efficacemente da aria filtrata. Il locale terminale dello spogliatoio deve avere (*at rest*) lo stesso grado di dell'area cui esso accede. È preferibile l'uso di locali separati per entrare nello spogliatoio o per abbandonare le aree pulite. Un punto di lavaggio delle mani deve essere disponibile nel primo locale dello spogliatoio.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

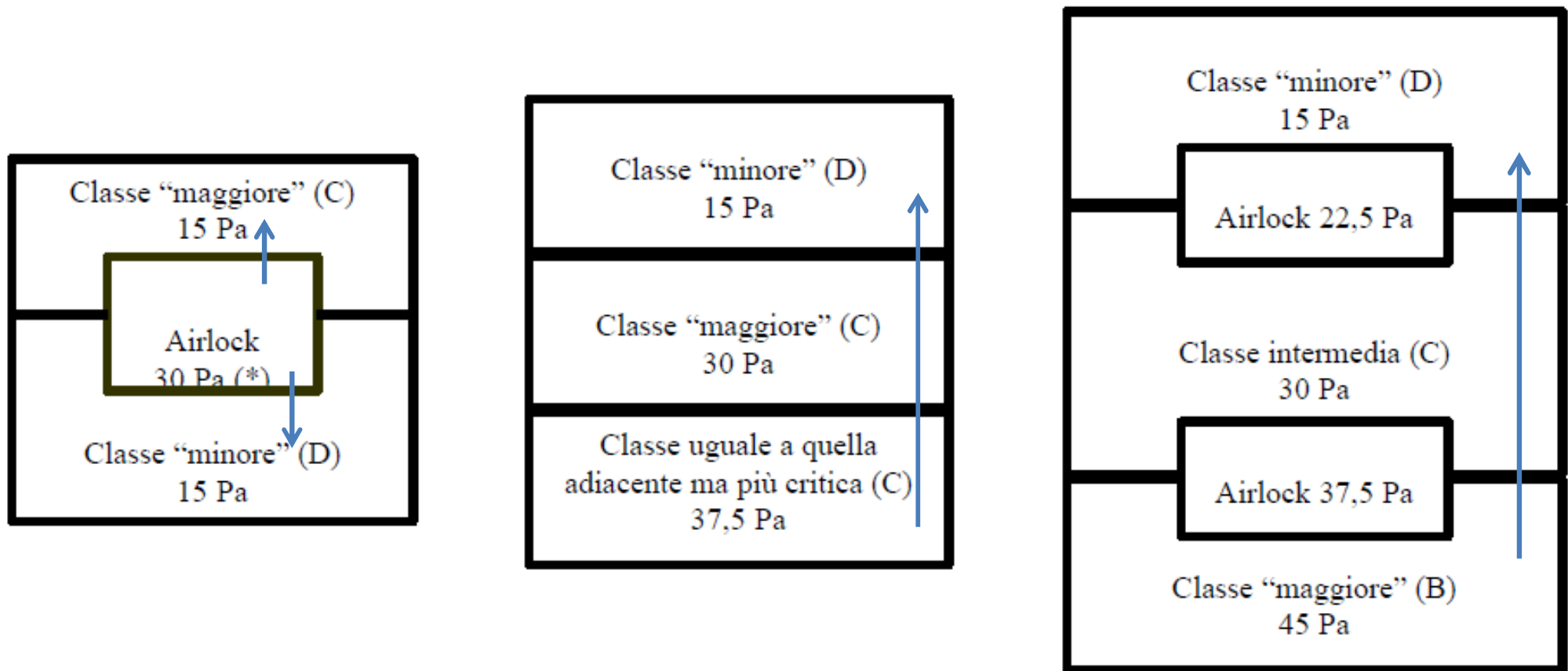
Locali sterili (Clean-room)

➤ Requisiti costruttivi

Le porte **air-locks** non dovrebbero essere aperte simultaneamente. Il flusso dell'aria filtrata deve mantenere una pressione positiva ed un efficace flusso d'aria verso le aree circostanti di grado più basso in tutte le condizioni operative. Stanze adiacenti di gradi diversi devono avere una *pressione differenziale* di 10-15 pascal. Tali raccomandazioni per i flussi d'aria possono essere modificati a seconda del tipo di materiali da contenere, ad esempio patogeni, prodotti molto tossici, radioattivi, agenti virali vivi, materiali batterici. Deve essere installato un sistema di allarme per segnalare la mancanza di flusso d'aria, analogamente sono installati degli indicatori di pressione differenziale nei punti critici.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)



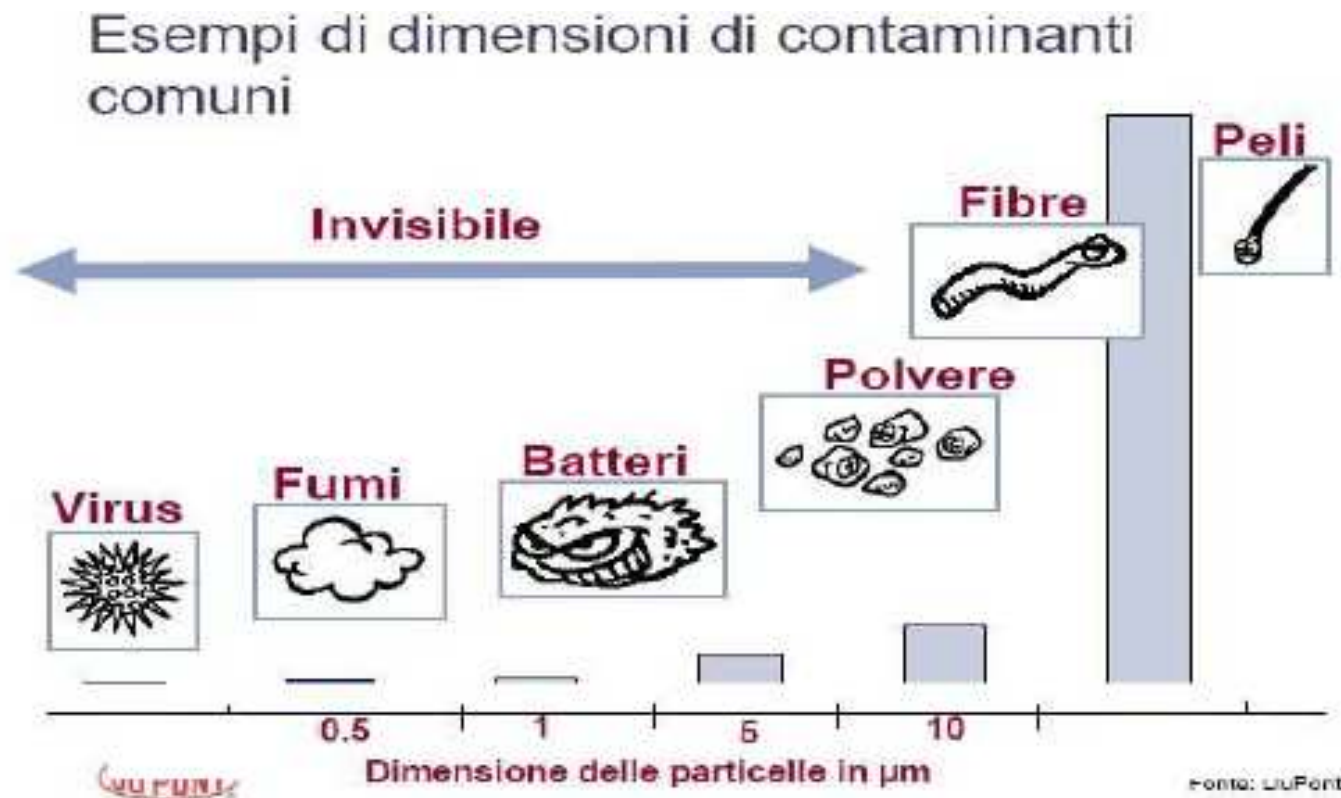
Esempi di pressioni differenziali tra locali di diversa classe (non classe A)

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

La **sterilizzazione fisica per azione meccanica** è una tecnica atta a fornire nell'ambiente quantità abbondante di aria praticamente esente da microrganismi e con un numero di particelle al di sotto di determinate dimensioni.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

La filtrazione dell'aria avviene attraverso filtri che trattengono le particelle e i microrganismi sia per vera e propria filtrazione (*setacciatura*) che per assorbimento, per fissazione, per adesione ed infine per attrazione elettrostatica. La sovrapposizione di questi effetti fa sì che il potere di captazione delle singole fibre vari in funzione della velocità con cui l'aria attraversa i filtri, delle dimensioni delle particelle e delle fibre.

Si definisce come efficienza di un filtro il rapporto percentuale tra la massa di particelle captate e quelle arrivate sul filtro.

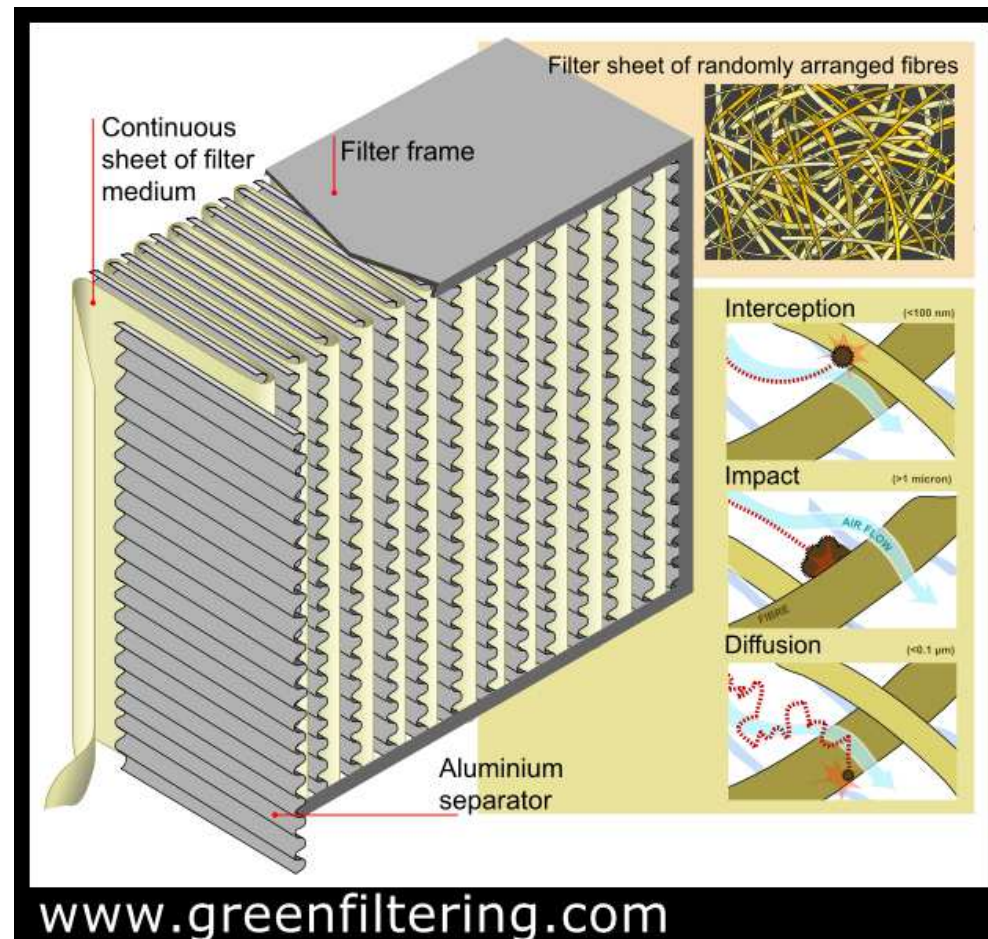
I filtri per aria ad elevata efficienza vengono chiamati filtri assoluti o HEPA (High Efficiency Particulate Air-filter) o U-HEPA (Ultra-HEPA) con efficienza di 99,97% e 99,99% per particelle da 0.3 micron rispettivamente.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

I filtri HEPA sono costruiti con **fibra di vetro** resistente al fuoco ed all'umidità e sono disposti a fisarmonica per aumentare la superficie di filtrazione.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

dal punto di vista meccanico i filtri sono insensibili all'umidità , ma occorre evitare il formarsi di condensa che diminuirebbe rapidamente l'efficacia di filtrazione per **annullamento dell'effetto elettrostatico**.

La velocità ottimale dell'aria attraverso i filtri è dell'ordine di 0.25 m/sec. Durante il funzionamento i filtri assoluti vanno incontro ad una perdita di carico dovuta ad ostruzione, il ricambio diventa necessario quando si riscontra una perdita doppia o tripla del valore iniziale. Con normale funzionamento delle camere, la durata è di circa 1 anno.

Lo schema generale di un sistema di filtrazione è:

- Prefiltri sulla presa d'aria esterna
- Unione del canale di aria di rinnovo con quella di ricircolo
- Ventilatore
- Prefiltri
- Batterie di deumidificazione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

Lo schema generale di un sistema di filtrazione è:

- Batterie di riscaldamento
- Filtri assoluti HEPA

Nei blocchi sterili a flusso convenzionale l'aria viene introdotta dal soffitto mediante più bocchette di mandata (*anemostati*) e quindi ripresa dal basso a velocità ridotta in modo da non creare fenomeni di induzione. Il blocco sterile deve essere mantenuto in sovrappressione rispetto ai locali adiacenti.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

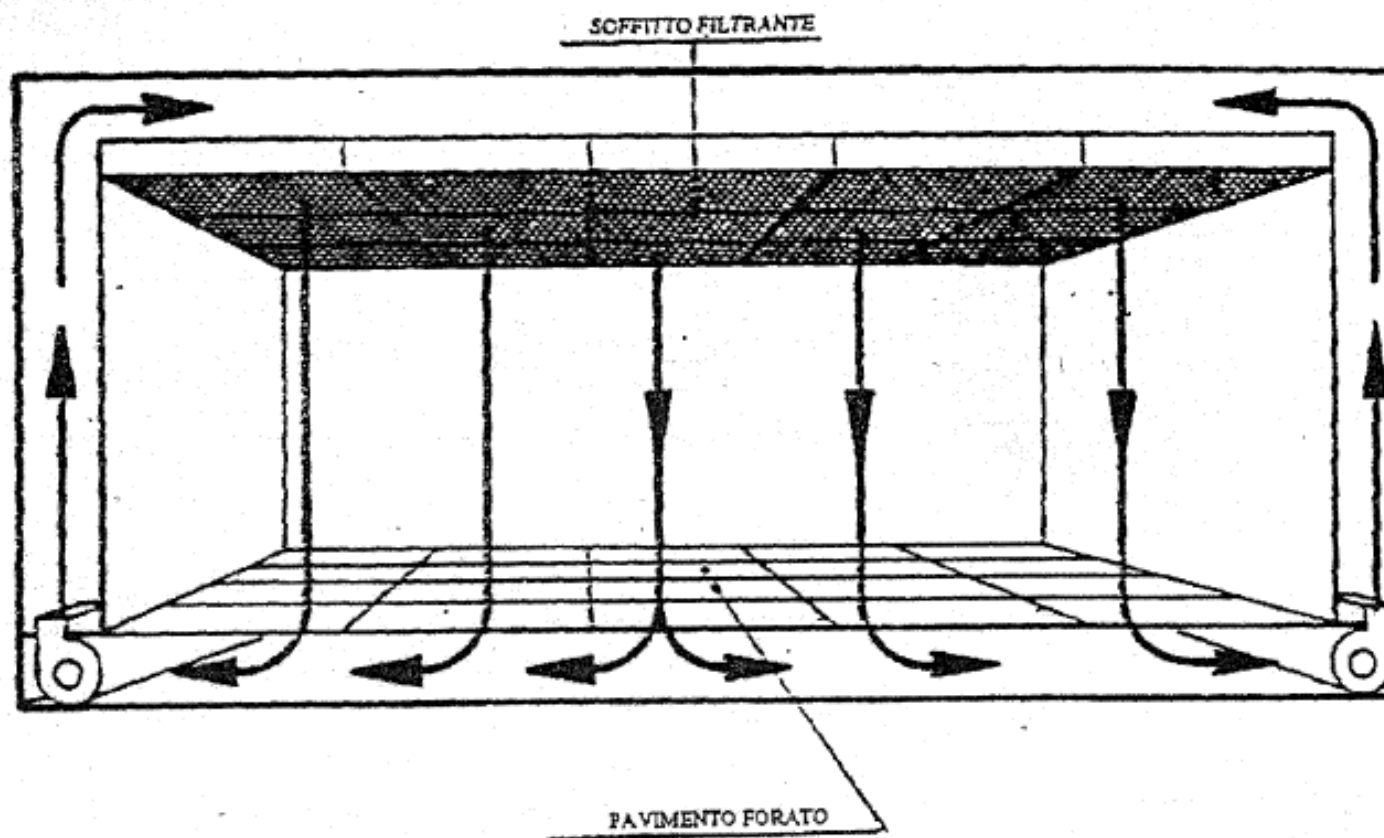
Flusso laminare dell'aria

È un sistema per ottenere una circolazione dell'aria nel blocco sterile in modo da **muovere il meno possibile le particelle**, e quindi i microrganismi. Il flusso laminare è un flusso d'aria per il quale tutta l'aria contenuta in un dato ambiente si muove **a velocità uniforme e con il minimo di turbolenza** per cui le particelle non si disperdono nel locale e non si depositano su pareti o spigoli. Poiché il sistema è inoltre fornito di filtri assoluti le particelle non vengono reimmessi nuovamente in sospensione determinando un bassissimo contenuto di particelle inquinanti.

La velocità di flusso è di circa 0.5 m/sec, a questa velocità l'aria si muove su traiettorie parallele **con totale assenza di vortici**.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

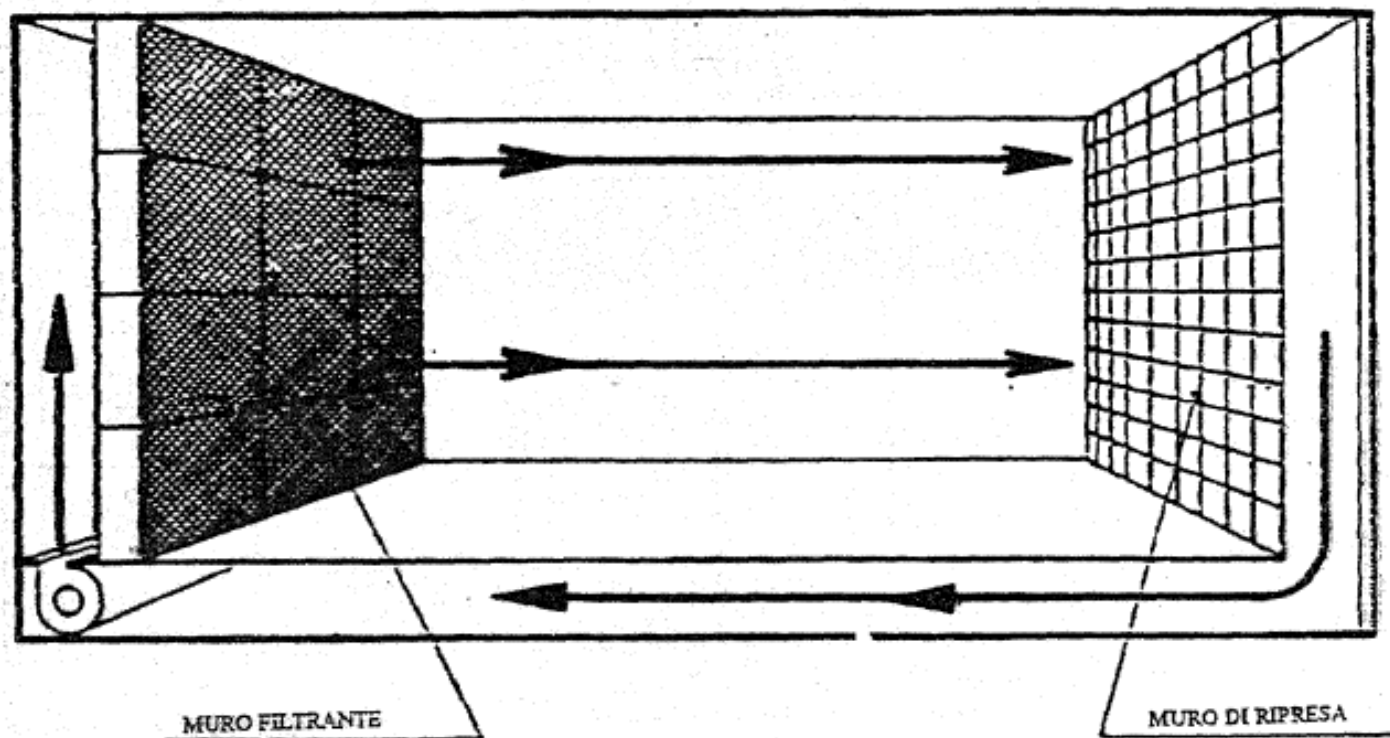
Locali sterili (Clean-room)



Flusso laminare verticale, adatto per i locali di produzione

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

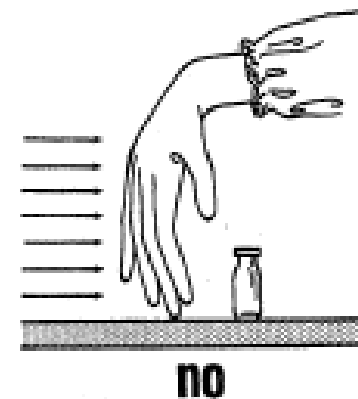
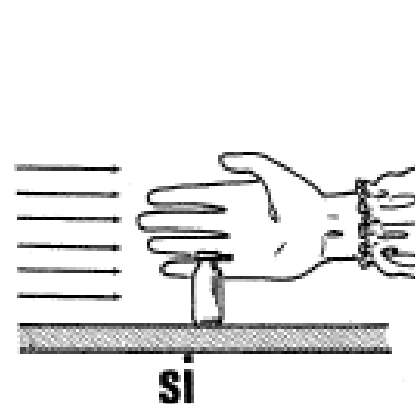
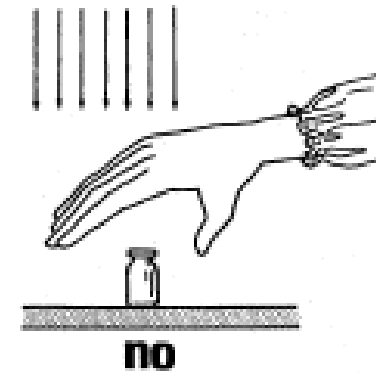
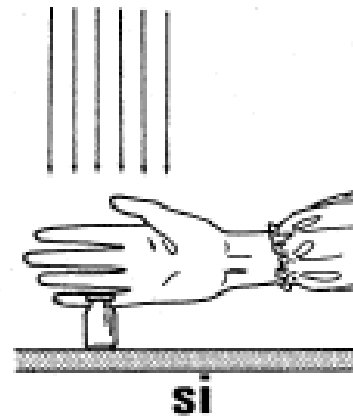
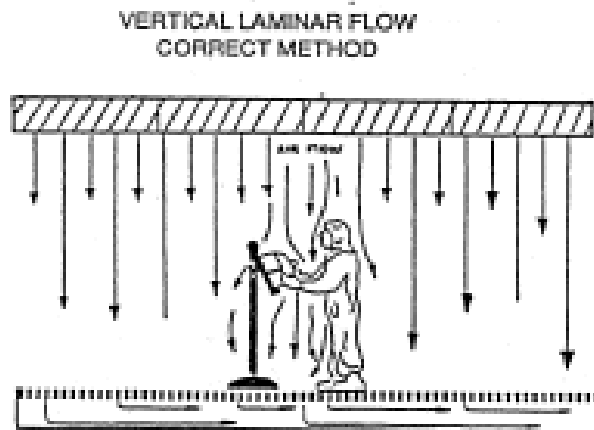
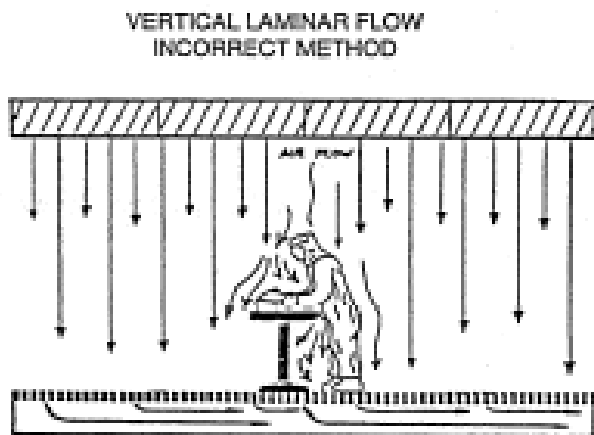


Flusso laminare orizzontale, adatto per i laboratori

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

Gli operatori devono muoversi con cautela ed eseguire la manipolazione dei prodotti in funzione del tipo di flusso laminare presente nella camera.



Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

Flusso laminare dell'aria

Vantaggi del flusso laminare:

- Immissione dell'aria attraverso la sezione più ampia possibile , cioè alte portate a bassa velocità
- Assenza di moti turbolenti o vortici d'aria nell'ambiente grazie alla possibilità di ottenere una velocità ottimale per l'aria corrispondente al suo moto laminare
- Lavaggio continuo ed efficiente degli oggetti e del personale dovuto al movimento laminare dell'aria
- Creazione di una massa d'aria sterile e pulita, continuamente rinnovata attorno ad ogni possibile fonte di inquinamento
- Trasporto rapido al pavimento di eventuali inquinanti presenti nell'ambiente

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Sterilizzazione dell'aria

Flusso laminare dell'aria

Purtroppo gli alti costi di installazione delle camere a flusso laminare e del trattamento di elevate quantità d'aria rallentano le installazioni nel campo farmaceutico. Si stanno però diffondendo le unità mobili (cappe sterili) di modeste dimensioni, le quali permettono di ottenere zone bianche capaci di contenere un operatore e la relativa attrezzatura.

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Classificazione dei locali sterili (*contaminazione particellare*)

	At rest		In operation	
Massimo numero di particelle/m³ consentito				
Grado	0.5 mm	5 mm	0.5 mm	5 mm
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	350000	2000
C	350000	2000	3500000	20000
D	3500000	20000	Non definito	Non definito

Classificazione in base alle Norme Europee

Non definito: i limiti per questa area dipendono dalle operazioni eseguite

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

- Controlli su superfici e personale dopo svolgimento operazioni critiche in Clean room (*contaminazione microbica*)

Limiti raccomandati di contaminazione microbica nelle aree pulite durante il lavoro

Limiti raccomandati di contaminazione microbica

Grado	Campionamento d'aria Cfu/m ³	Piastre di semina (diam. 90 mm), Cfu/4 h	Piastre a contatto (diam. 55mm), cfu/piatto	Glove print 5 finger Cfu/glove
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Cfu: colony-forming units

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Normative per il controllo del personale

Nelle aree pulite dovrebbe essere presente solo il numero minimo di personale richiesto, particolarmente importante durante la lavorazione asettica. Tutto il personale (incluso quello addetto alle pulizie e manutenzione) impiegato in tali aree deve ricevere un adeguato addestramento in materia di corretta produzione di prodotti sterili (con riferimento all'igiene e elementi di base di microbiologia).

Sono essenziali elevati standard di igiene e pulizia personale.

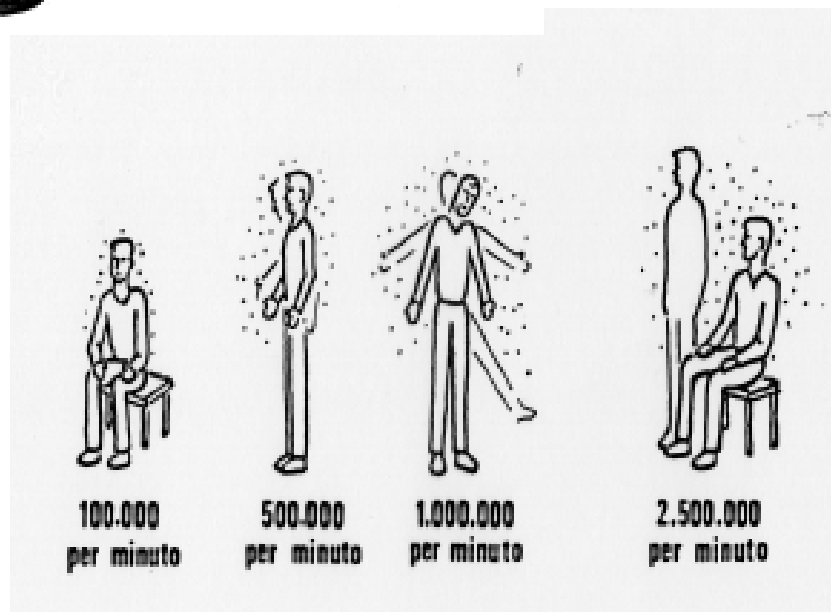
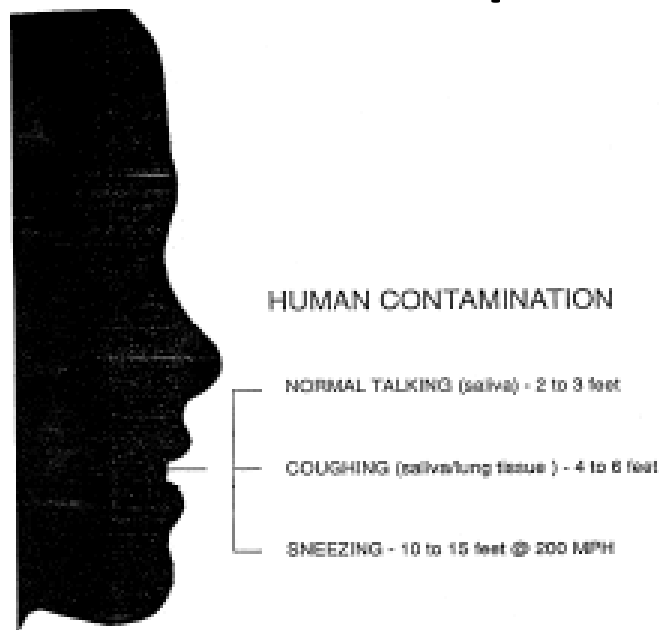
Il personale che opera in tali ambienti deve essere istruito a riferire ogni condizione che possa causare la proliferazione di contaminanti, effettuando **controlli periodici della salute**.

I turni di lavoro in camera bianca sono **normalmente** due per la durata di 2-3h ciascuna con pause di 1h (quindi per 8h di lavoro al massimo 6h in clean room).

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

➤ Contaminazione personale



NUMERO APPROSSIMATIVO DI BATTERI PRESENTI NELLE VARIE PARTI DEL CORPO UMANO

PELLE	cuoio capelluto	1-2 milioni/cm ²
	ascelle	2-3 milioni/cm ²
	avambraccio	da 100 a 5000/cm ²
	schiena	300/cm ²
	fronte	200.000/cm ²
SALIVA		100 milioni/ml
NASO (secrezione nasale)		da 1 a 10 milioni/ml
ORECCHIO (cerume)		da 10 a 100 milioni/g

Impianti dell'Industria Farmaceutica

Locali sterili (Clean-room)

Abbigliamento del personale operativo

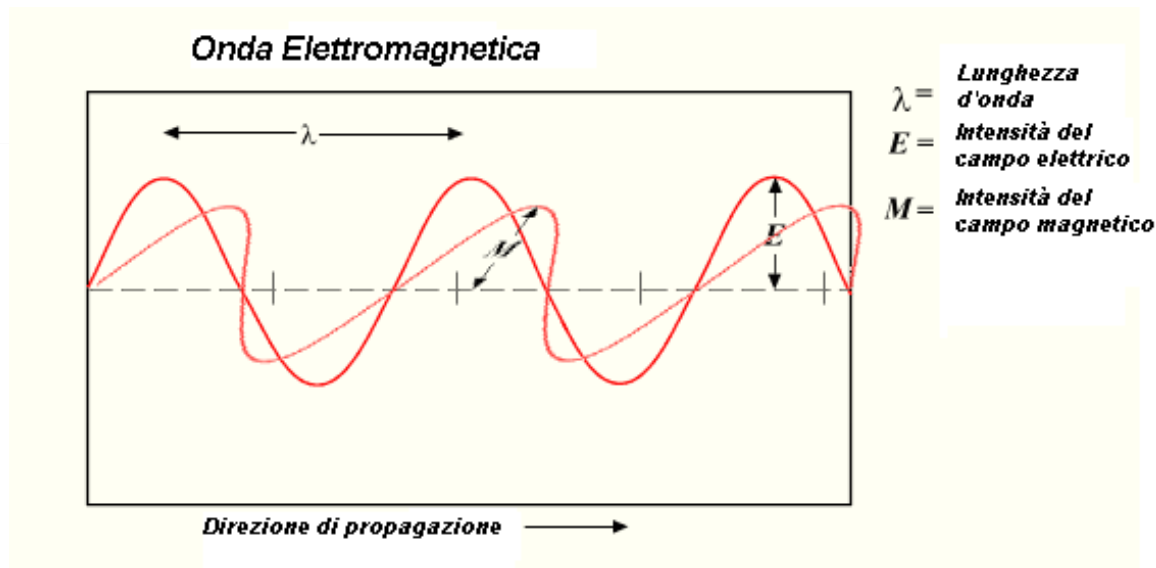


Applicazioni Chemi- Bioluminescenza

Bioluminescenza e Nanotecnologie

LUCE

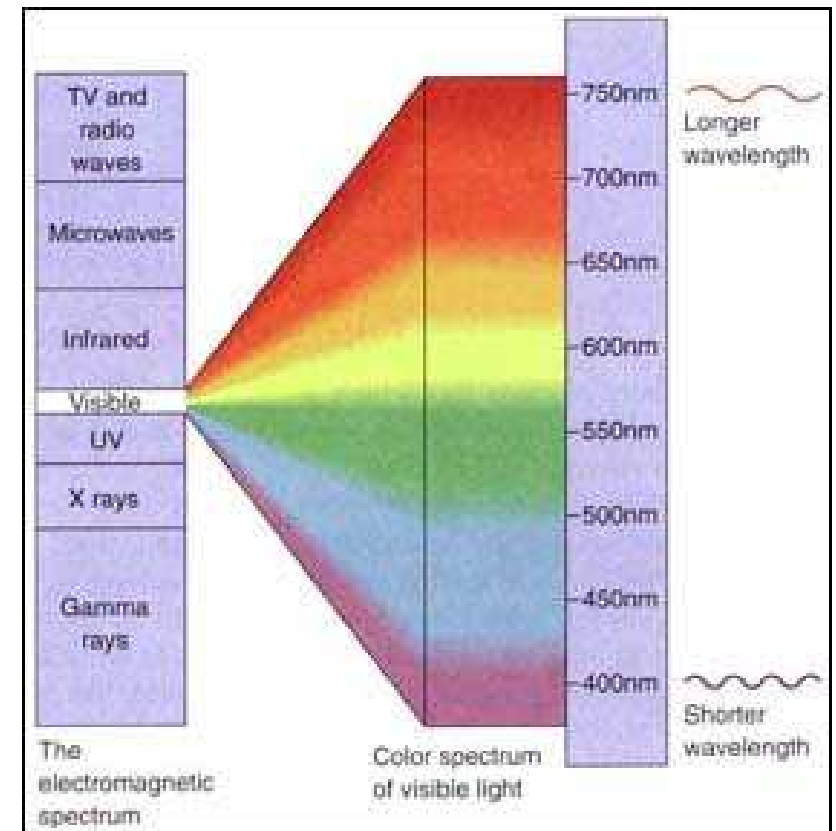
La **radiazione elettromagnetica** è, dal punto di vista dell'elettromagnetismo classico, un fenomeno ondulatorio dovuto alla contemporanea propagazione di perturbazioni periodiche di un *campo elettrico* e di un *campo magnetico*, oscillanti in piani tra di loro ortogonali.



$$E = h \nu$$

$$c = \lambda \nu$$

$$E = hc / \lambda$$



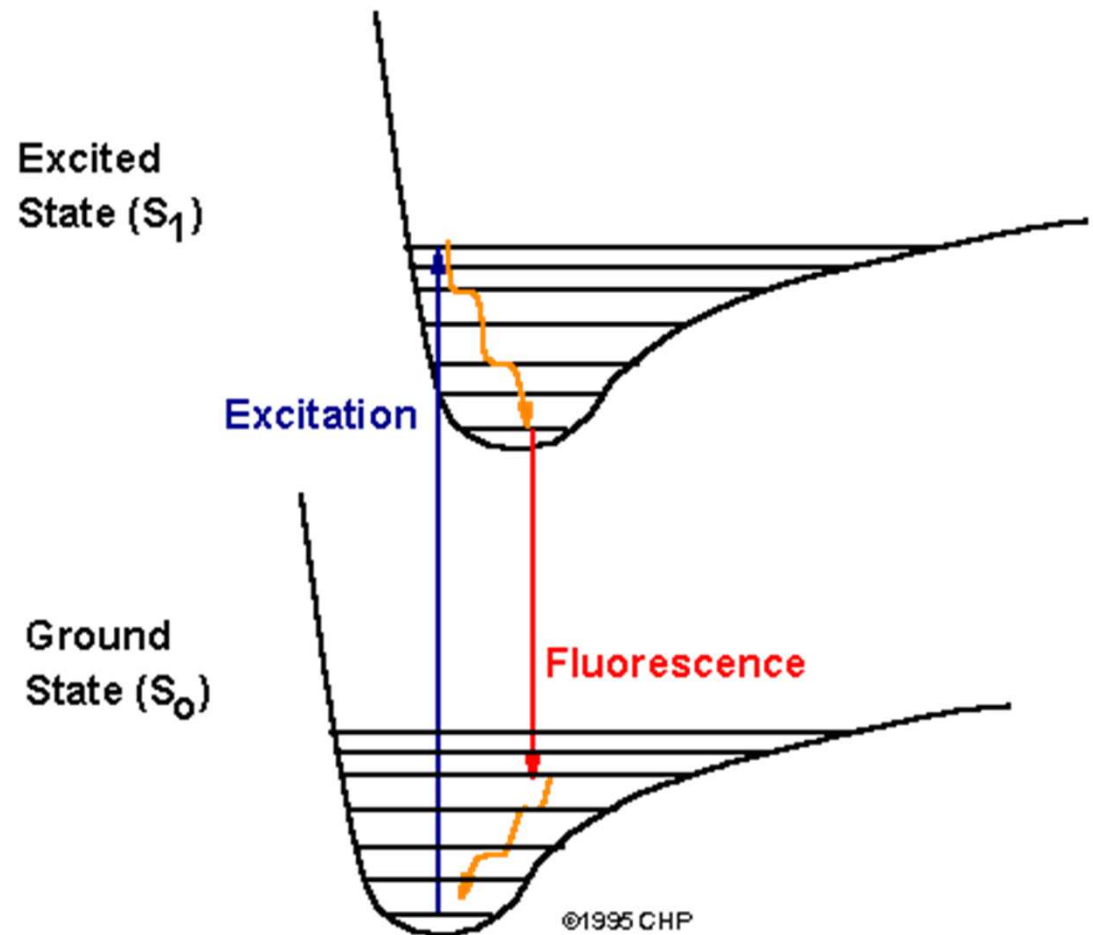
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Fluorescenza

La fluorescenza è uno dei due *processi radiativi*, insieme alla fosforescenza, con cui si può verificare il **rilassamento di una molecola eccitata**.

La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di rimettere a frequenza più bassa le radiazioni ricevute, in particolare di assorbire luce ultravioletta ed emetterla visibile, (es. negli evidenziatori).

Semplificando il processo, la *radiazione elettromagnetica incidente* eccita gli atomi della sostanza fluorescente, facendo **saltare gli elettroni in un'orbita più esterna**. Subito dopo gli elettroni tornano al livello precedente ma a *stati vibrazionali eccitati* emettendo **luce visibile**, a lunghezza d'onda più lunga rispetto alla radiazione incidente.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Fluorescenza

Conversione interna ed esterna

L'eccitazione di un elettrone non sempre determina la fluorescenza. L'eccesso di energia può essere dissipata (calore) per mezzo della Conversione interna (intramolecolare) e/o Conversione esterna (intermolecolare- ad opera di altre molecole quali ad es. il solvente)

VR= vibrational relaxation

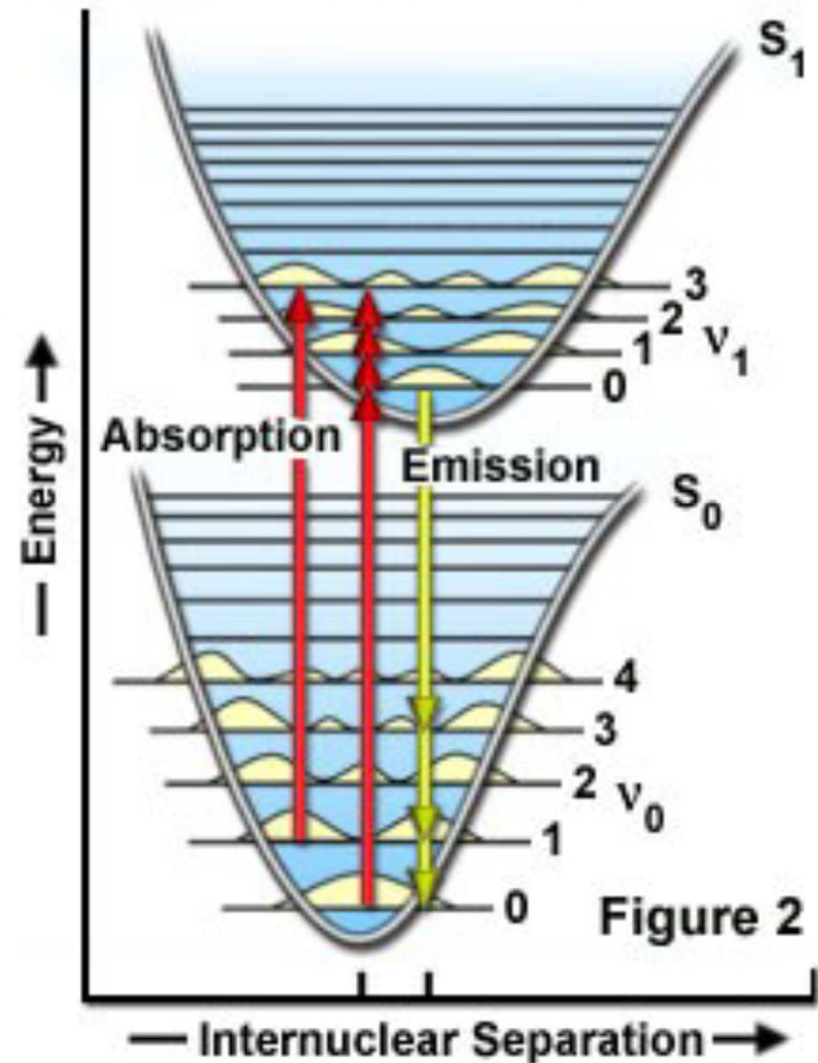
Sono importanti le cinetiche per capire la sequenza dei processi durante la fluorescenza:

Assorbimento istantaneo 10^{-15} sec;

Conversione interna/esterna 10^{-12} sec;

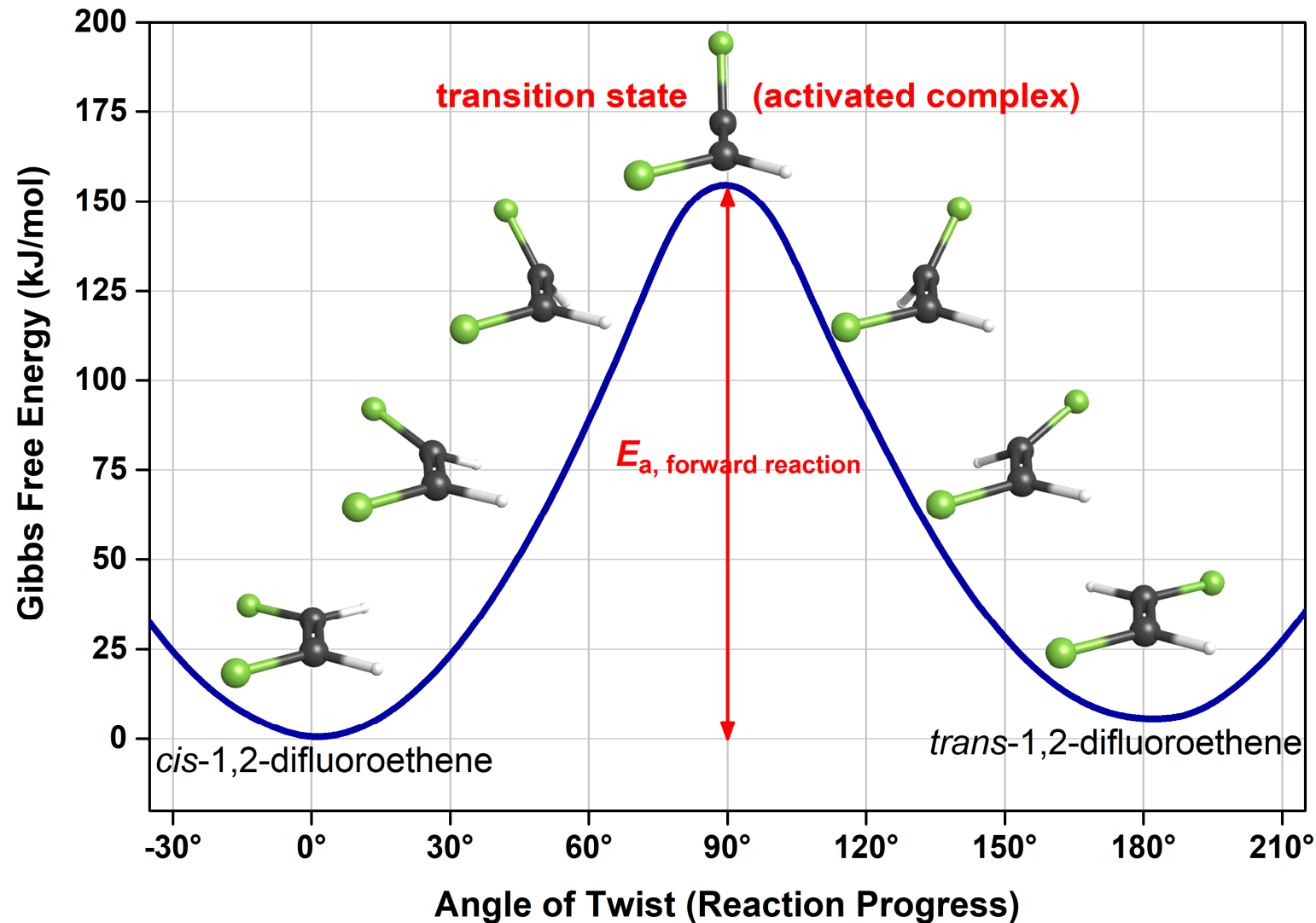
Fluorescenza 10^{-8} sec.

Franck-Condon Energy Diagram



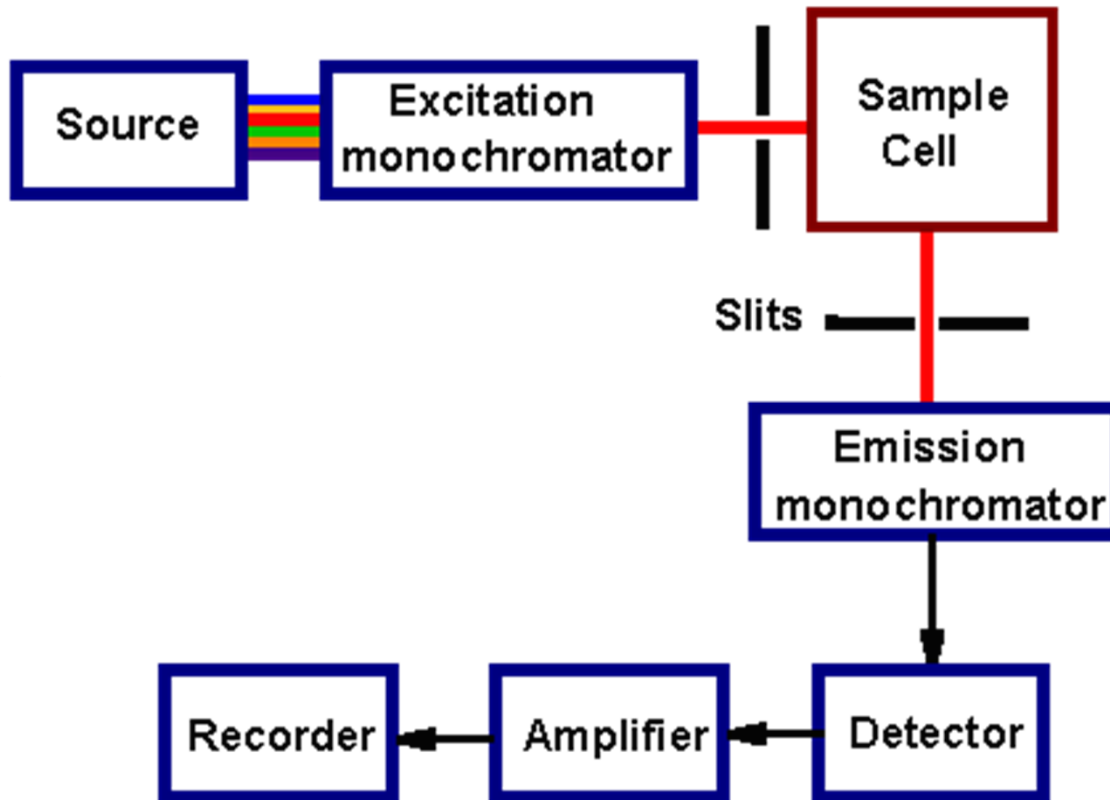
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Profilo energetico per isomeria cis/trans

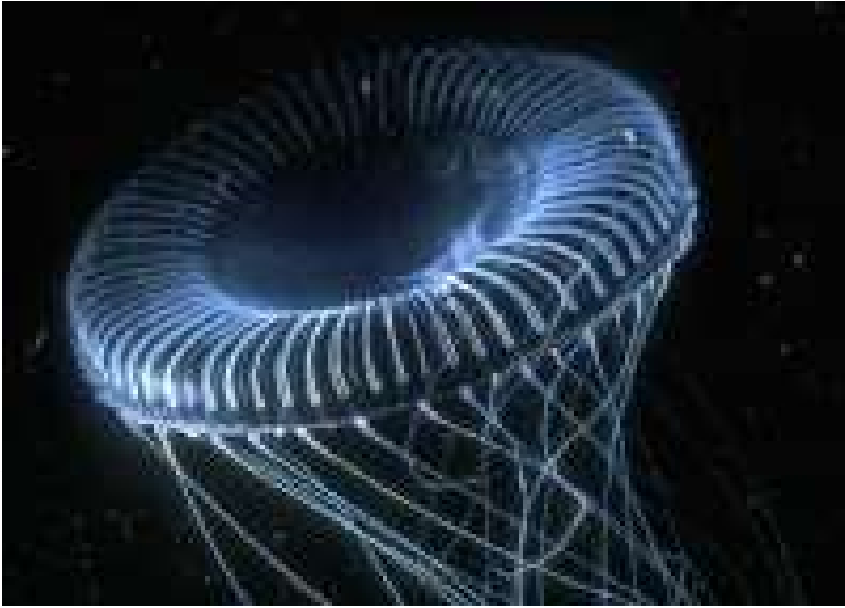


Bioluminescenza e Nanotecnologie

Fluorimetri

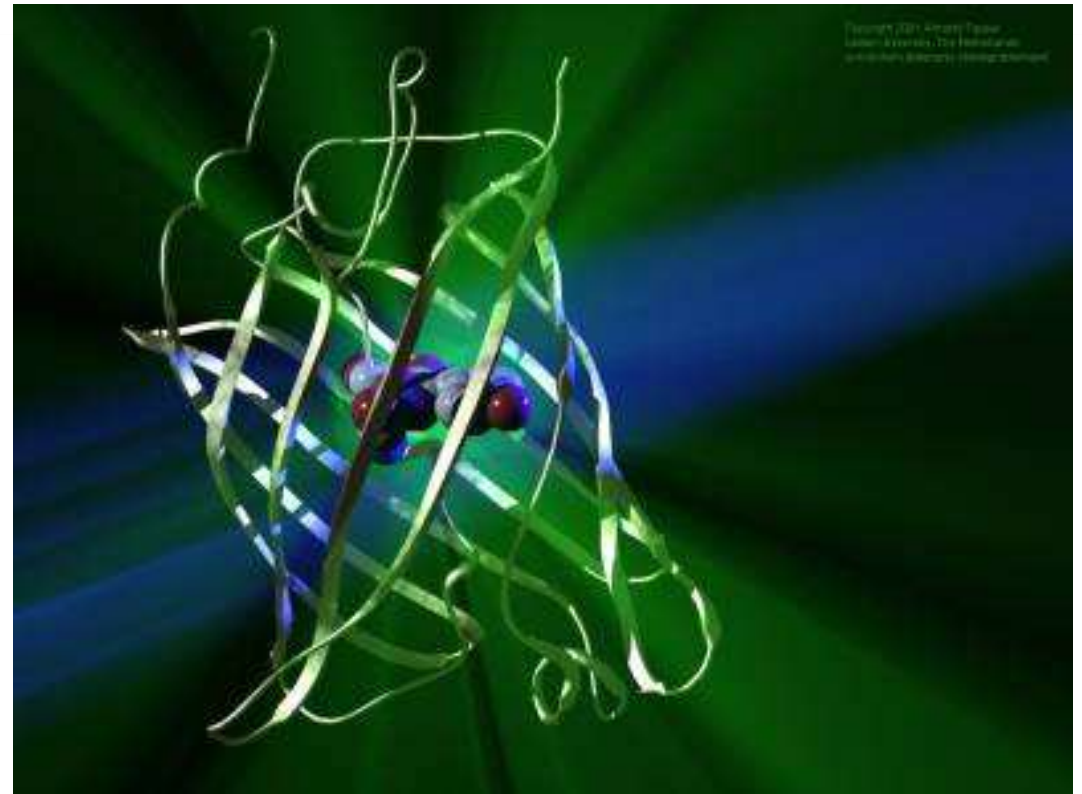


Bioluminescenza e Nanotecnologie

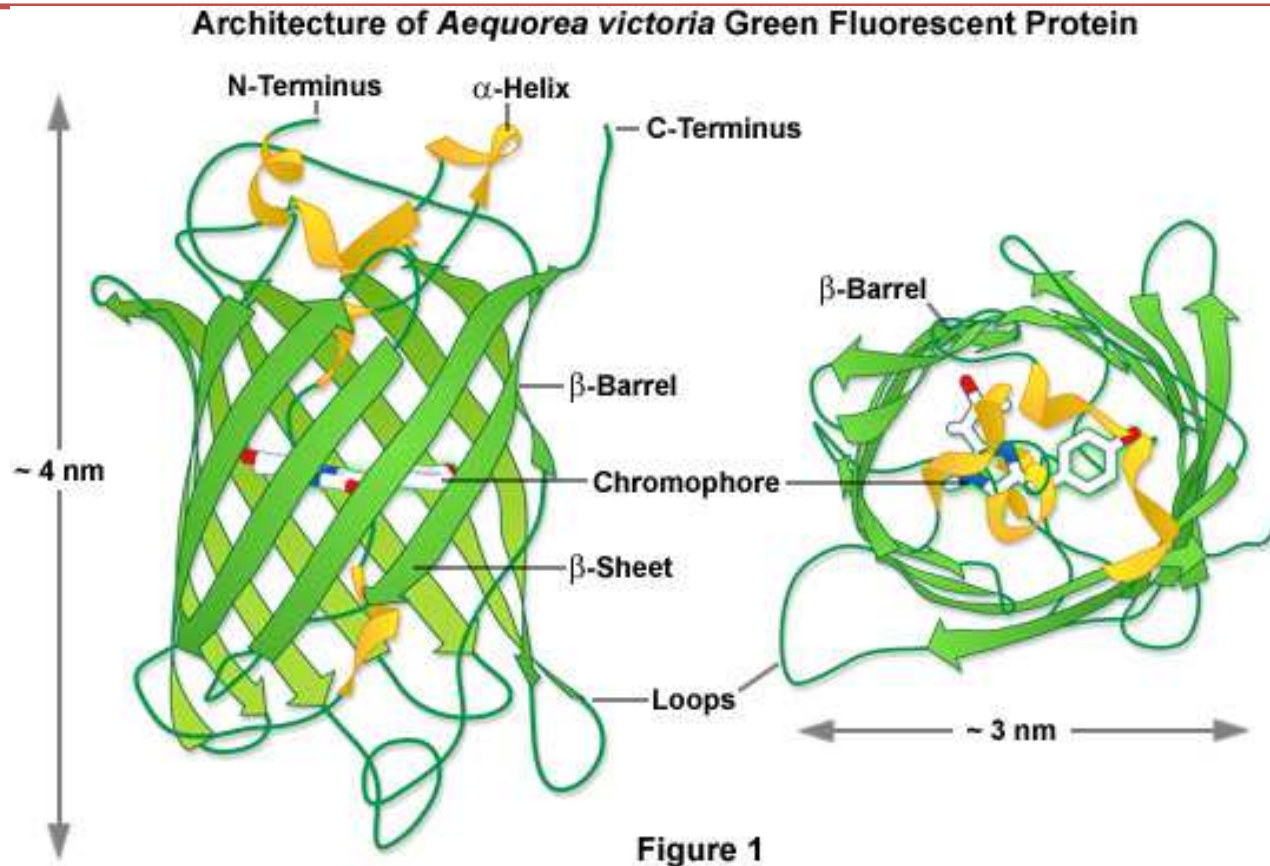


Green Fluorescent Protein (GFP) è una proteina espressa nella medusa *Aequorea victoria*. Grazie alla sua proprietà di fluorescenza, alle sue modeste dimensioni e alla possibilità di modificarne entro certi limiti le sue caratteristiche spettroscopiche, la GFP è diventata un diffuso strumento per esperimenti e tecniche di biologia molecolare (*Premio Nobel per la chimica 2008*)

Aequorea victoria è una medusa bioluminescente reperibile sulle coste ad ovest del Nord America.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

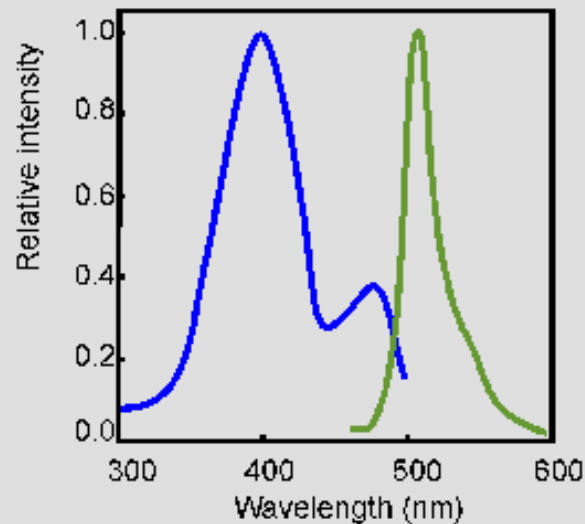
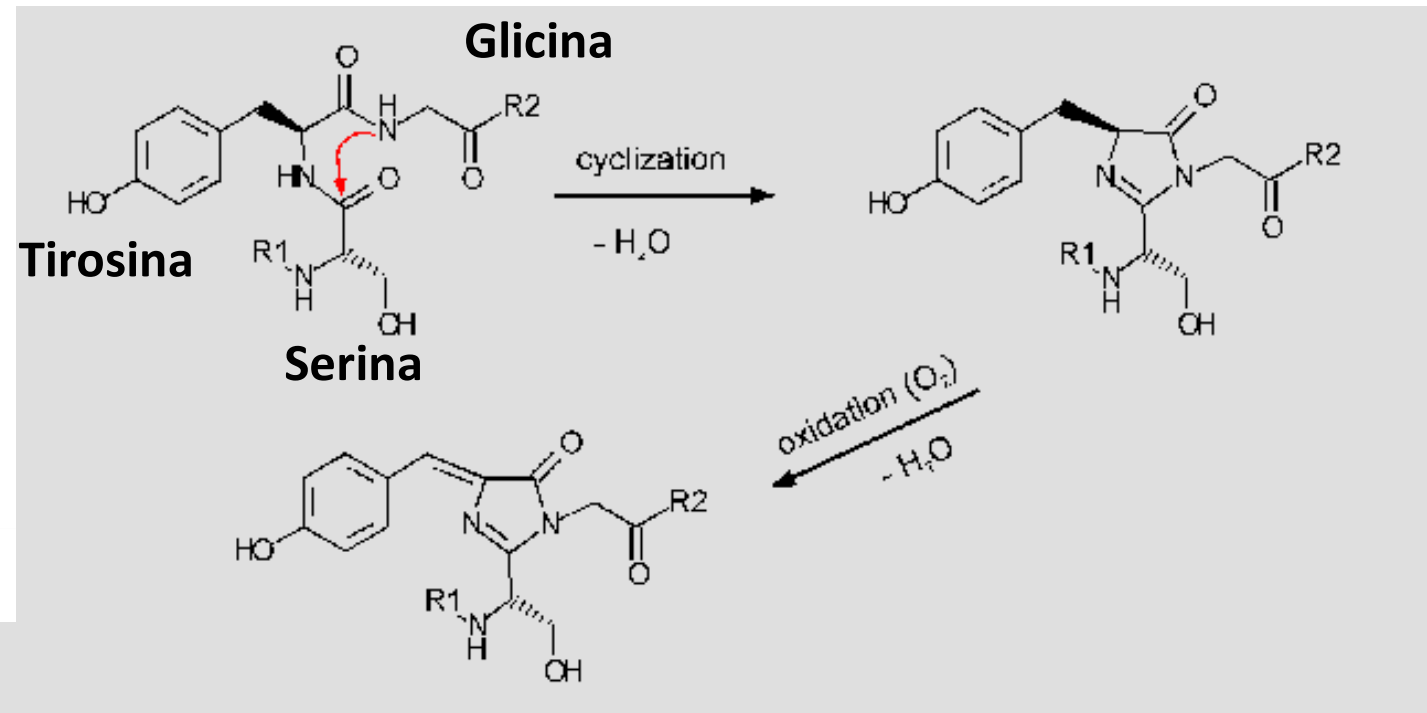


Caratteristiche:

➤ La GFP è costituita da 238 amminoacidi e ha un peso molecolare di 27K Dalton. È costituita da 11 foglietti beta disposti in circolo a formare una struttura denominata barile- β . Sono poi presenti due segmenti ad alfa elica, uno alla base del barile, l'altro lungo il suo asse centrale. Quest'ultima elica contiene il **fluoroforo** (ovvero la *porzione in grado di emettere fluorescenza*), formato a partire dal tripeptide Ser 65-Tyr 66-Gly 67. La struttura, nel complesso, è molto compatta, in modo *da proteggere* il fluoroforo da reazioni con altre molecole che lo potrebbero inattivare.

Bioluminescenza e Nanotecnologie

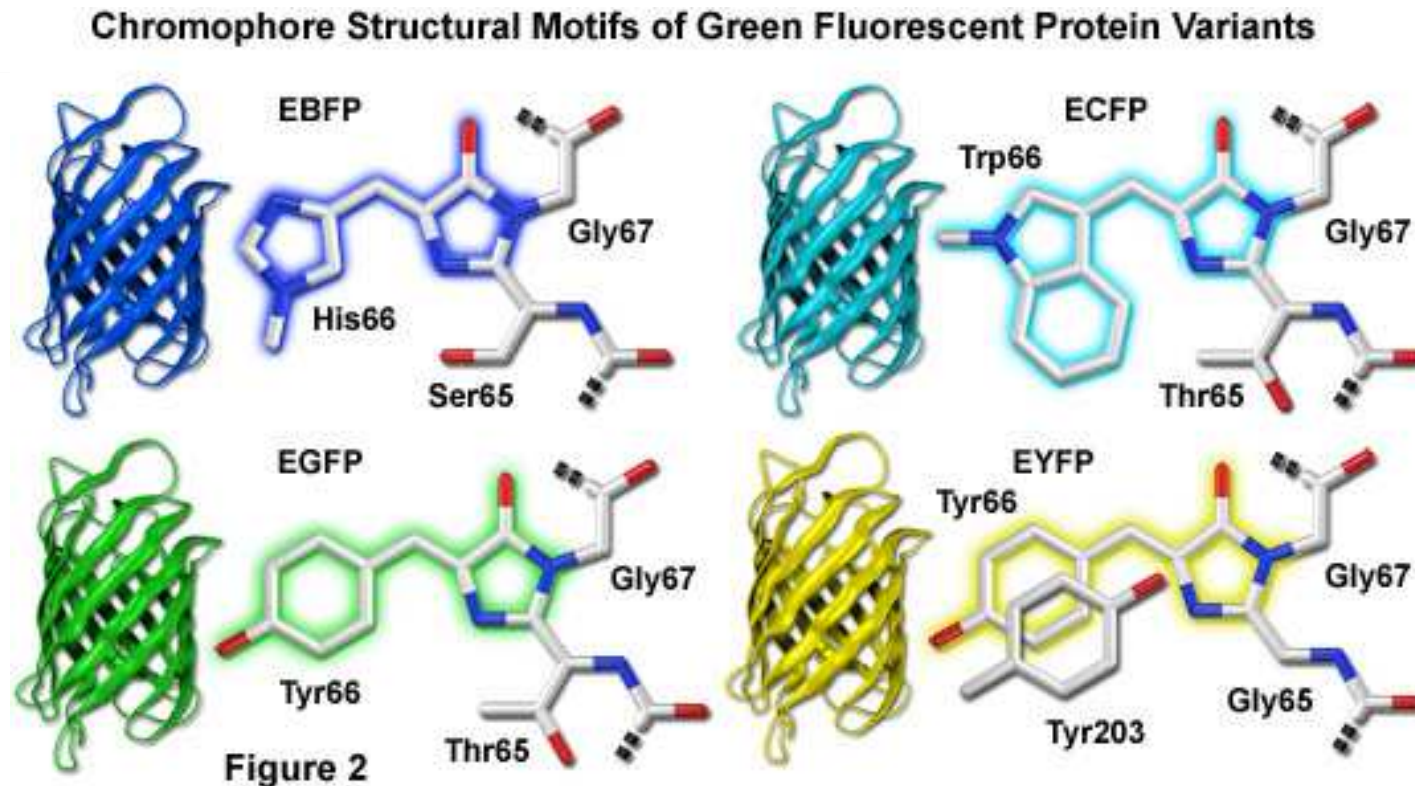
Fluoroforo:



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Caratteristiche:

➤ Sono ormai molte comunque le forme di GFP modificate, in grado di assorbire e emettere radiazione diverse da quelle della proteina originaria.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

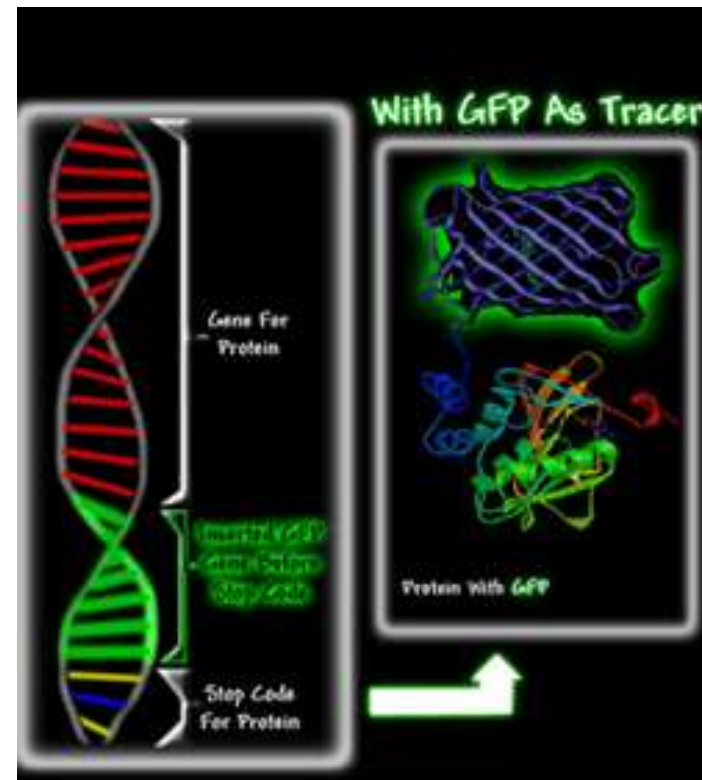
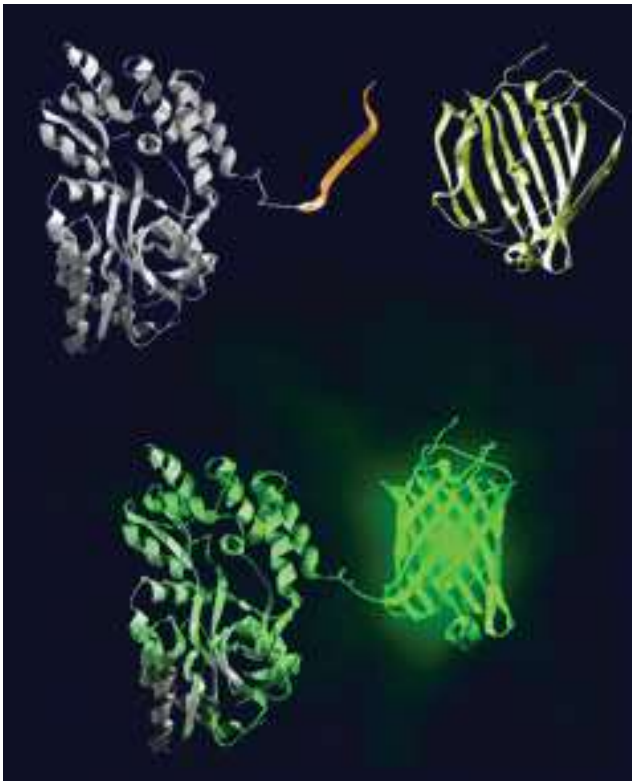
Caratteristiche:

- Come ogni proteina fluorescente, anche la GFP deve prima **essere colpita** da una radiazione, con lunghezza d'onda e quindi energia, che permetta ad alcuni suoi elettroni di passare nello stato eccitato (*fase di assorbimento*); dopo un breve istante di tempo, gli elettroni ritornano nello stato fondamentale (*stato iniziale*) e riemettono un'altra radiazione, con energia però inferiore a quella iniziale (*fase di emissione*).
- Nel caso della GFP, l'assorbimento ha dei picchi con radiazioni a lunghezze d'onda di 395 nm e 475 nm. L'emissione avrà un picco massimo intorno a 505 nm. Questo significa che può essere utilizzata, per eccitare la proteina, sia una radiazione ultravioletta (395 nm), sia una radiazione nello spettro visibile (475 nm), in particolare di colore blu. In entrambi i casi la GFP emetterà una radiazione di colore verde (505 nm).
- In genere sono utilizzate per l'assorbimento radiazioni blu, per evitare i rischi legati all'uso di raggi UV.

Bioluminescenza e Nanotecnologie

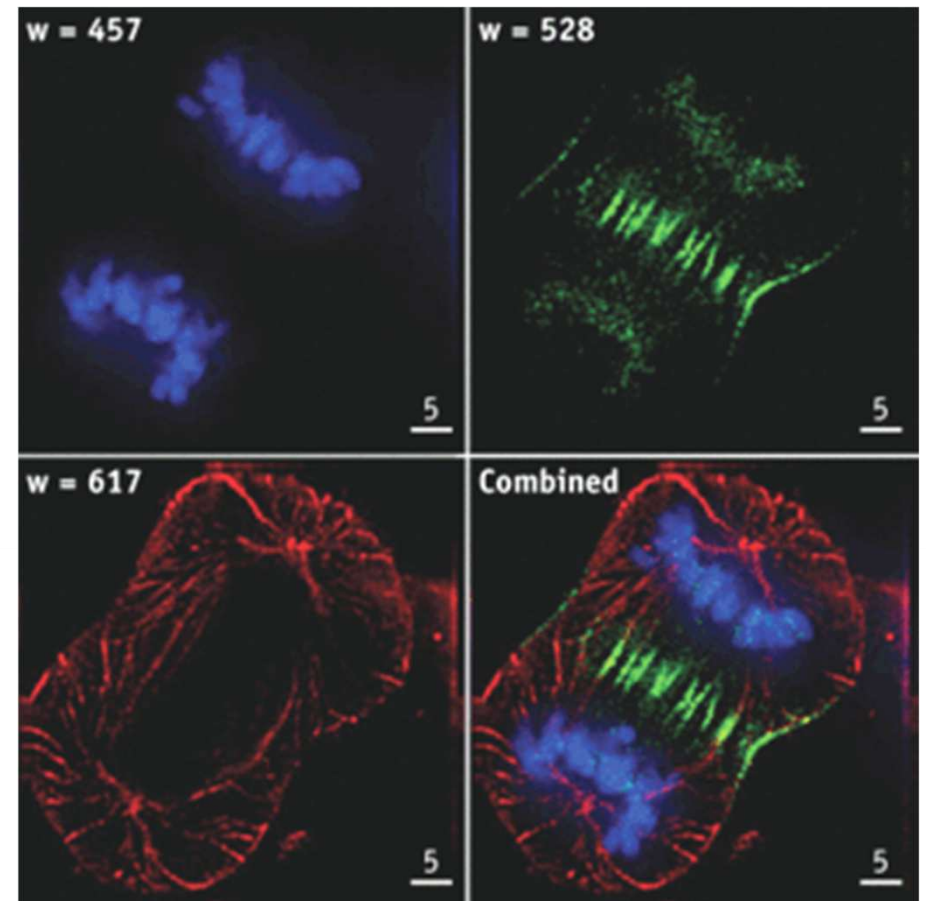
La luminescenza di GFP è un fenomeno intrinseco alla stessa proteina e non richiede substrati né enzimi, quindi questa è molto usata come **marcatore** nelle indagini di identificazione e localizzazione subcellulare delle proteine.

In questi saggi la sequenza nucleotidica della proteina X da identificare viene *fusa con la sequenza nucleotidica di GFP* in un vettore di espressione che solitamente è un plasmide. Questa tecnica è molto potente in quanto la localizzazione della proteina studiata viene *rivelata in vivo* (**microscopi a fluorescenza**) ed è possibile seguirla anche nel tempo.

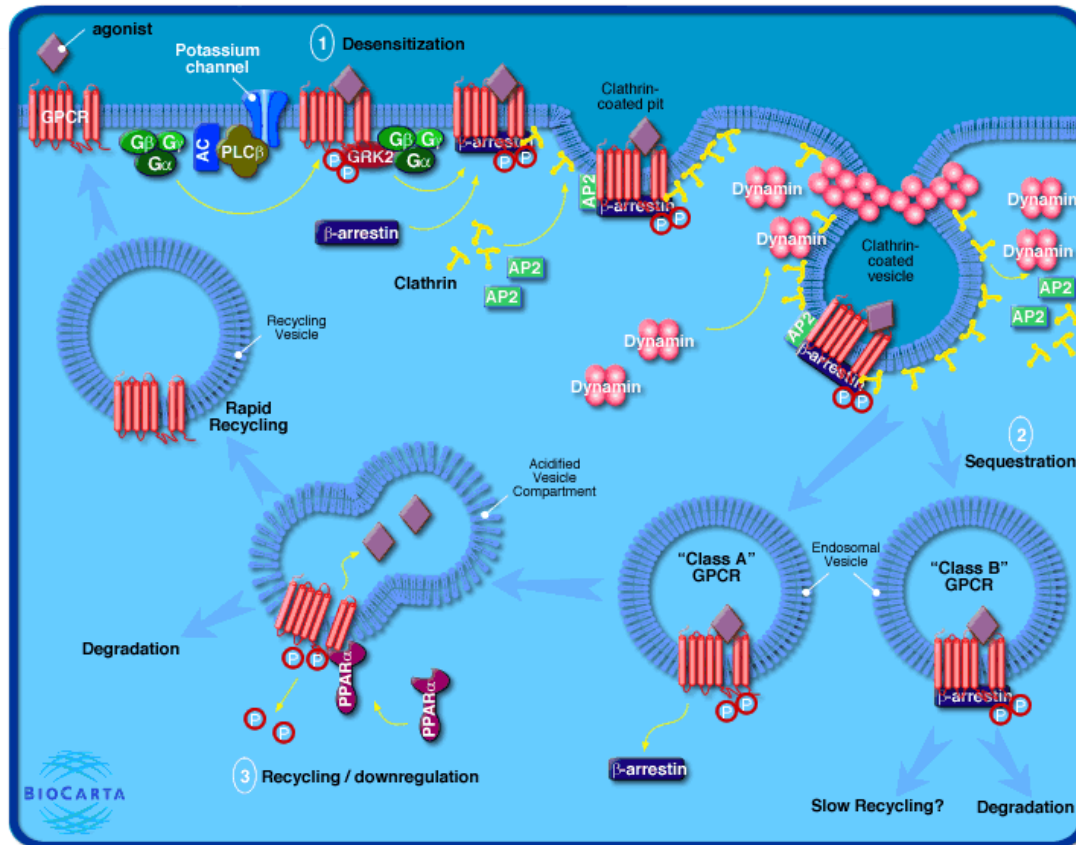


Bioluminescenza e Nanotecnologie

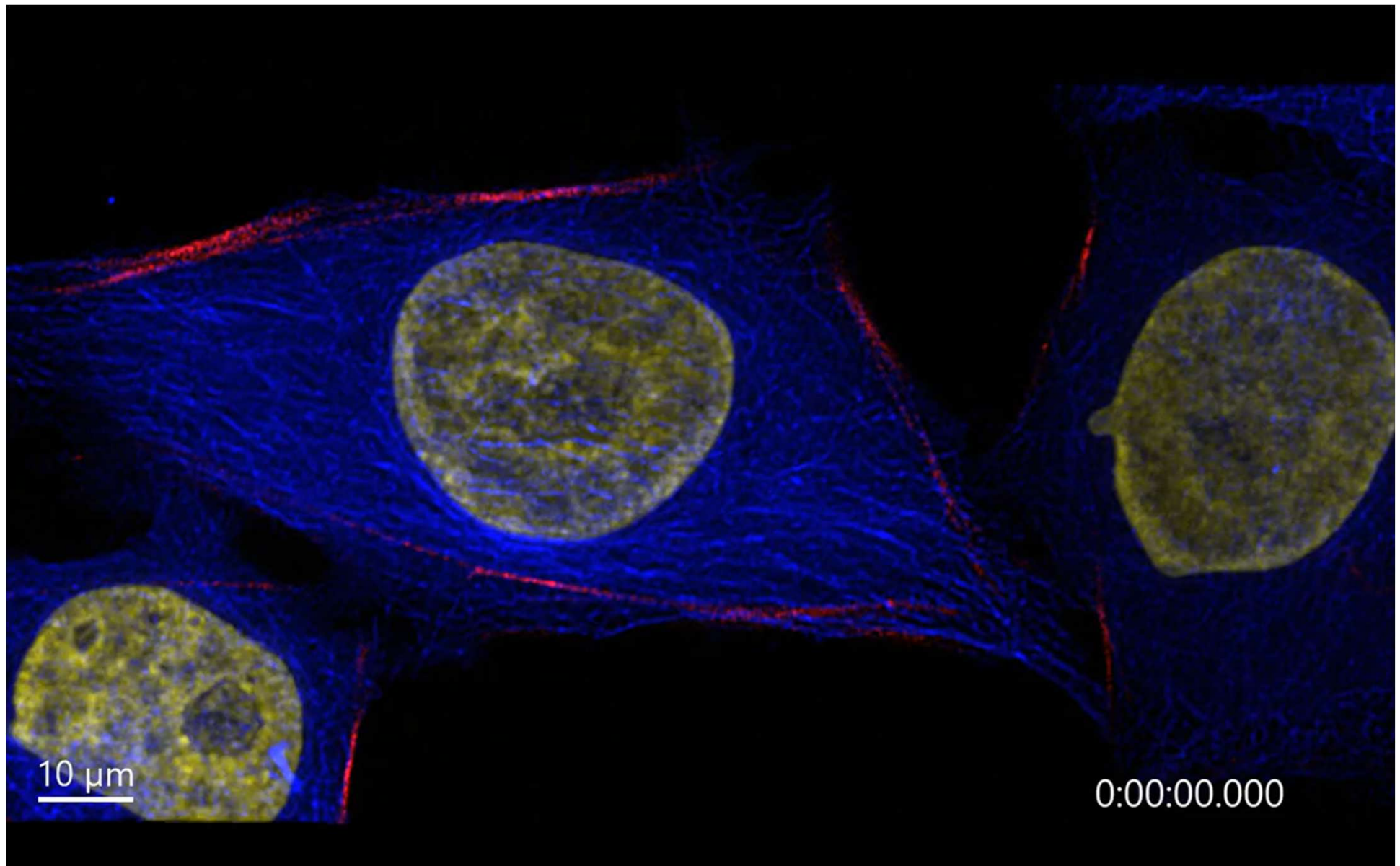
Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule tumorali umane nel momento della divisione cellulare (Cell Imaging)



Studi funzionali *in vivo* su ciclo della Beta arrestina



Bioluminescenza e Nanotecnologie



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Chemiluminescenza

La chemiluminescenza è l'emissione di radiazione elettromagnetica, in particolare nel visibile e nel vicino infrarosso, che può *accompagnare una reazione chimica*. Considerando una reazione tra i reagenti A e B a dare il prodotto P:



In pratica la reazione porta al *prodotto P in uno stato eccitato* ed il decadimento allo stato fondamentale non porta alla formazione di calore ma di un fotone ($h\nu$). È quindi necessario che i **meccanismi di decadimento radiativi siano più competitivi rispetto a quelli non radiativi**.

Bioluminescenza

La bioluminescenza è un fenomeno per cui **organismi viventi** emettono luce attraverso particolari reazioni chimiche, nel corso delle quali l'energia chimica viene convertita in energia luminosa.

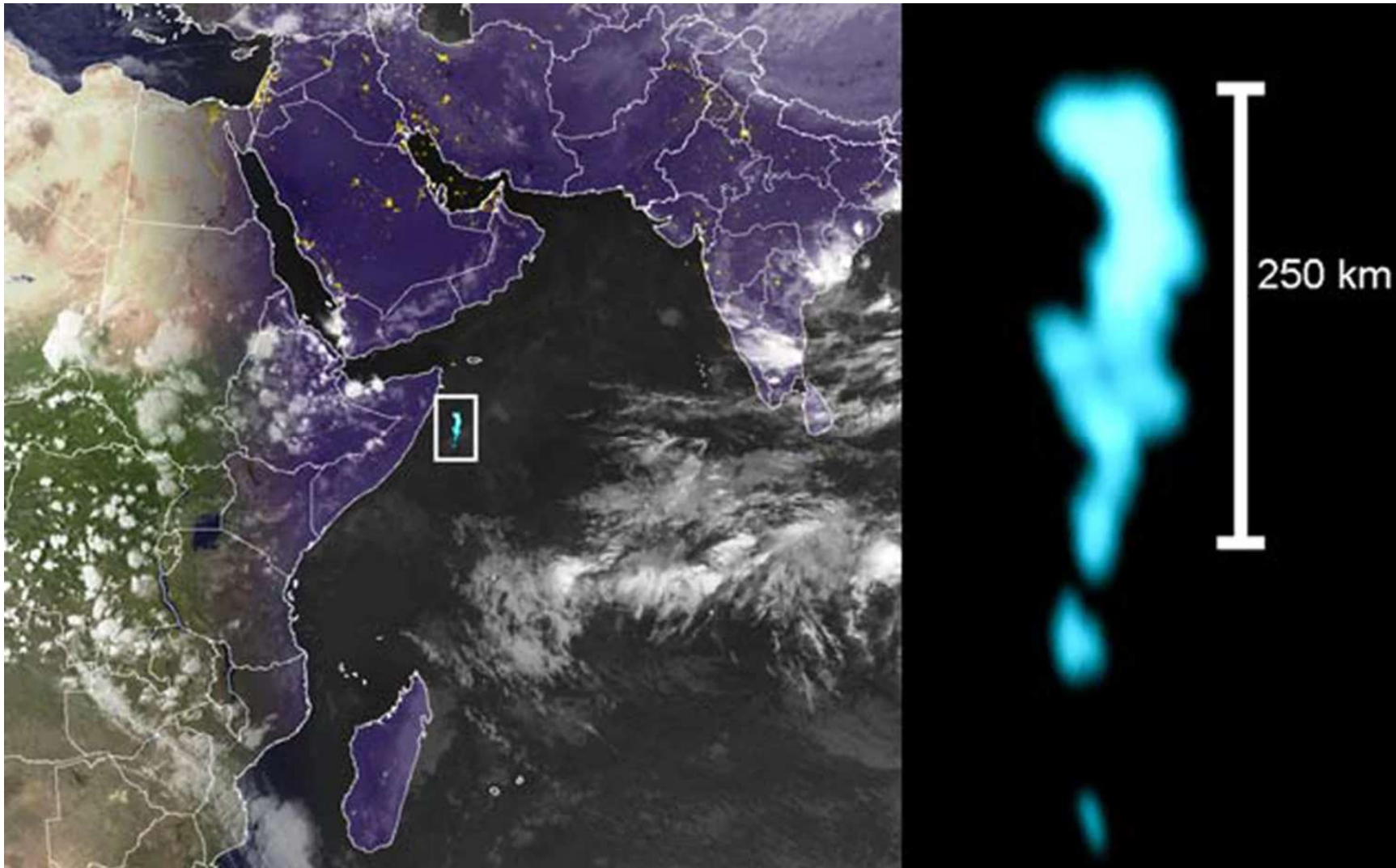
La bioluminescenza è un fenomeno comune tra gli organismi marini quali crostacei, meduse e calamari, ma se ne trovano esempi anche tra gli insetti e funghi.

I principali scopi dell'emissione di fotoni sono:

- attrarre le prede
- nascondersi
- riprodursi.

Bioluminescenza e Nanotecnologie

Bioluminescenza



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Fluorescenza e chemiluminescenza

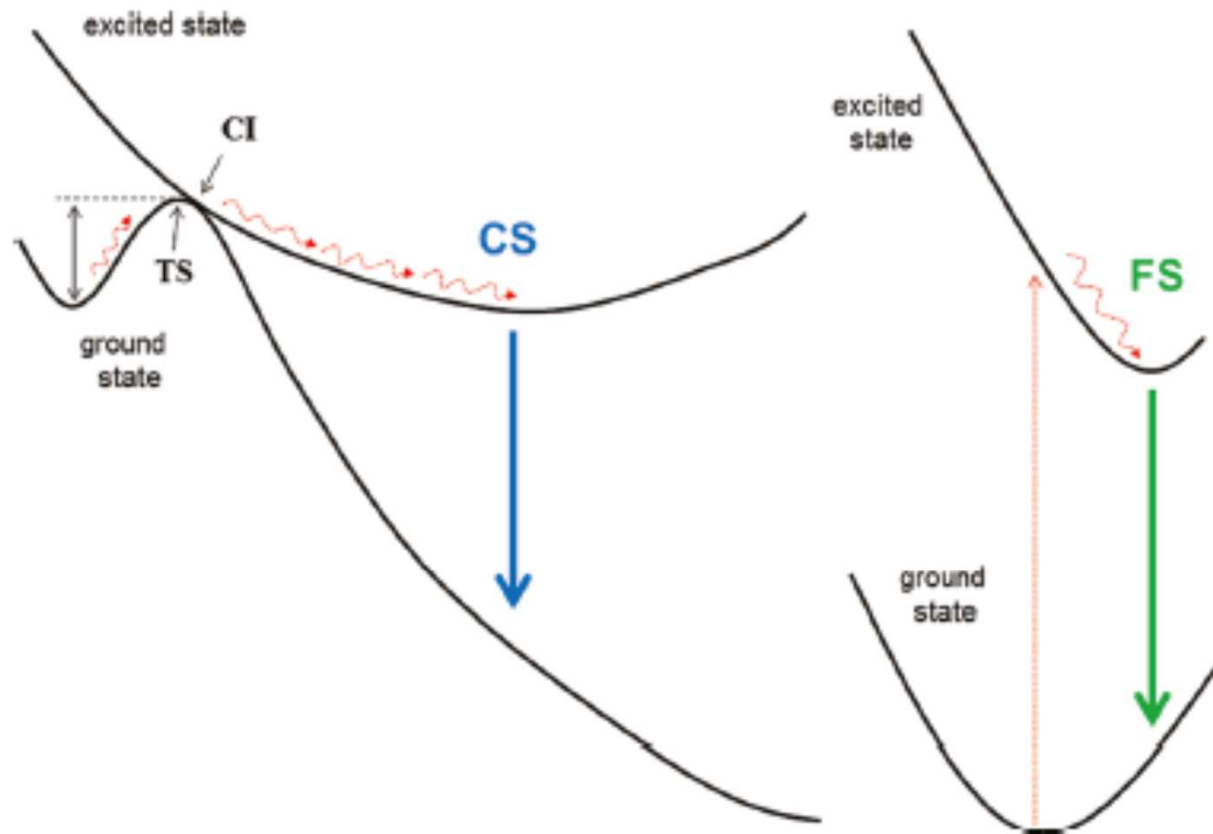
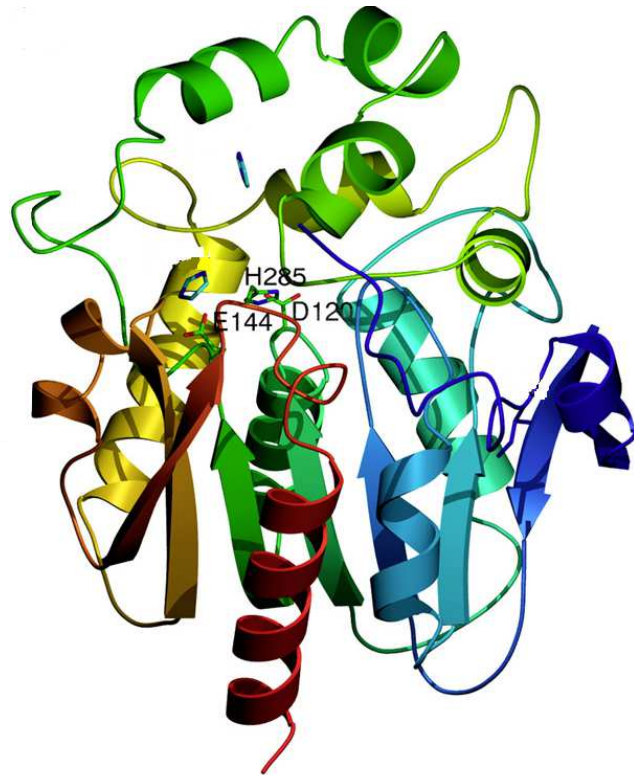


Figure 1. General scheme of the chemiluminescence (left) and fluorescence (right) processes. The chemiluminescence (CS) and fluorescence (FS) states are illustrated. The transition state (TS) and conical intersection (CI) points related to the former phenomenon are also shown.

Bioluminescenza e Nanotecnologie

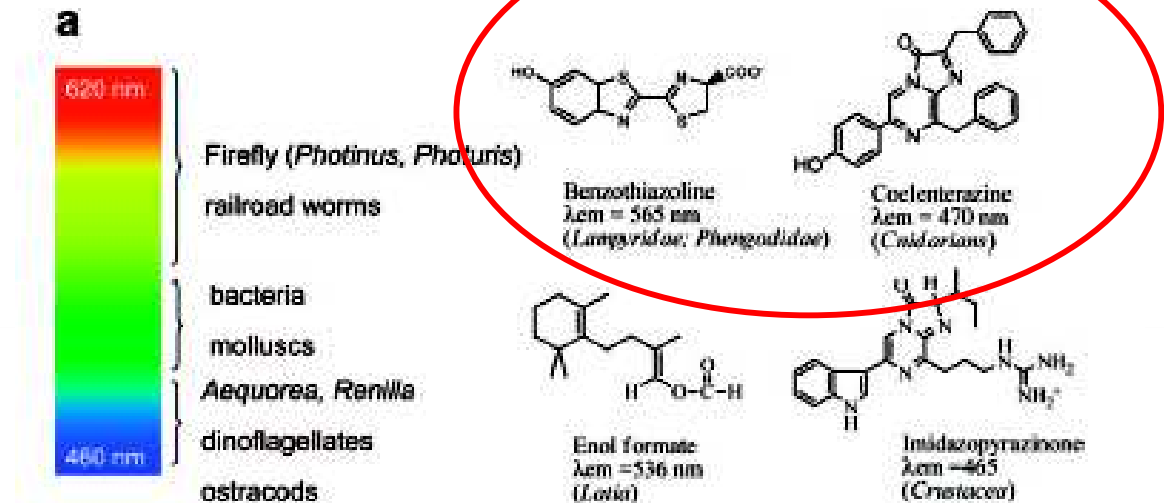
Esempi di applicazioni



Renilla Luciferasi (Rluc)

Luciferasi

Enzima che catalizza la reazione di bioluminescenza

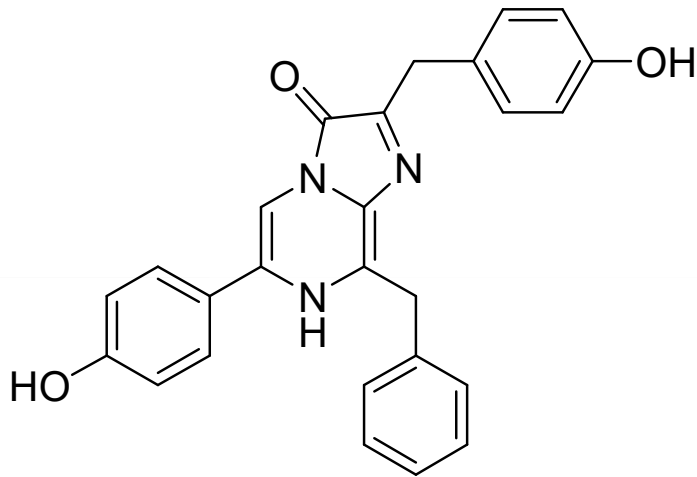


Luciferina

Substrato chemiluminescente che viene degradata dall'enzima Luciferasi opportuno

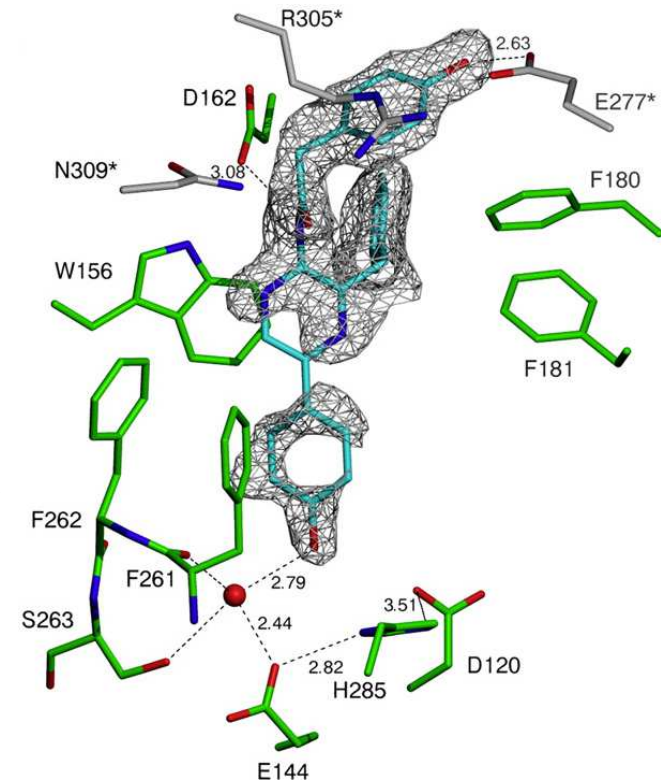
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Degradazione enzimatica



Celenterazina

struttura imidazo[1,2-a]pirazin-3(7H)-onica

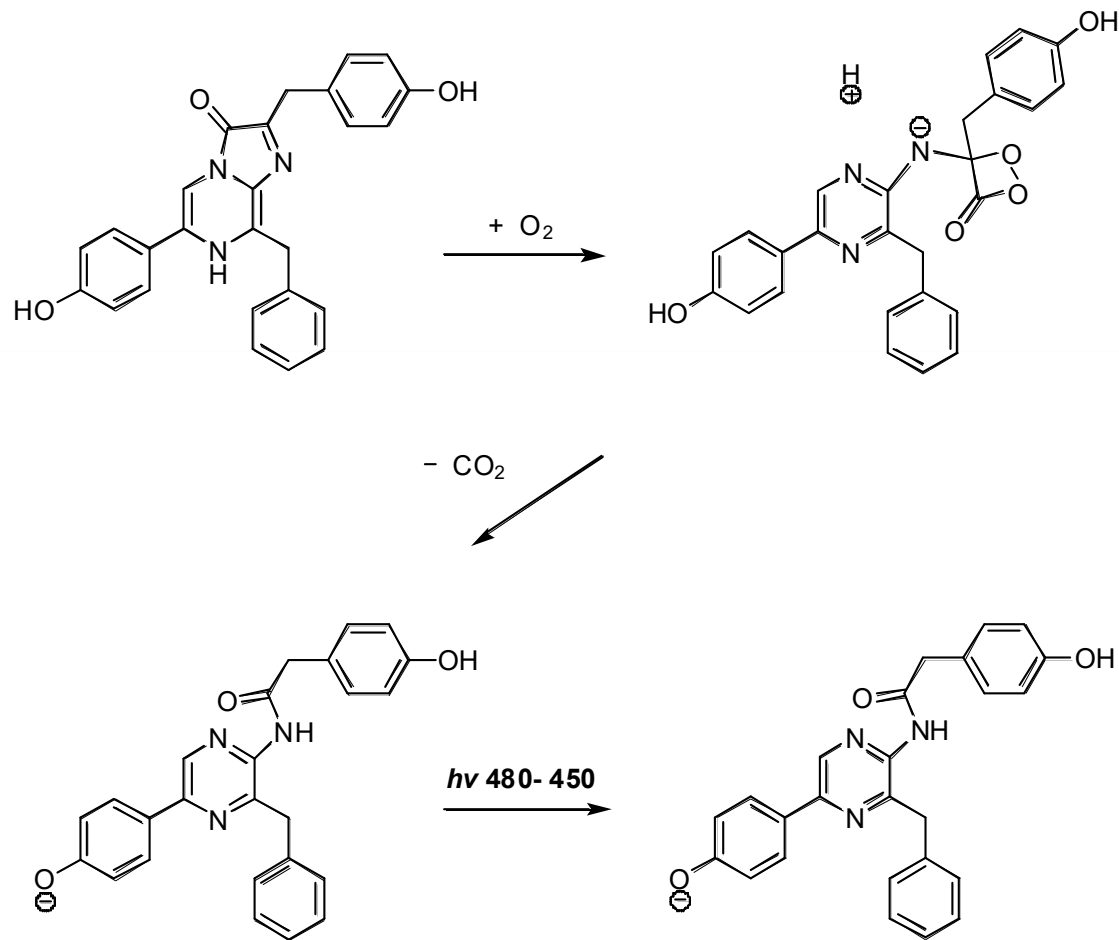


Tasca enzimatica RLuc



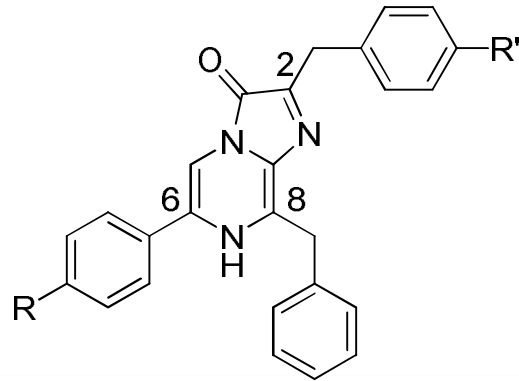
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Degradazione enzimatica

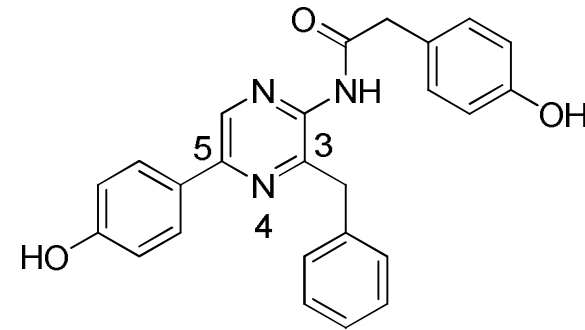


Bioluminescenza e Nanotecnologie

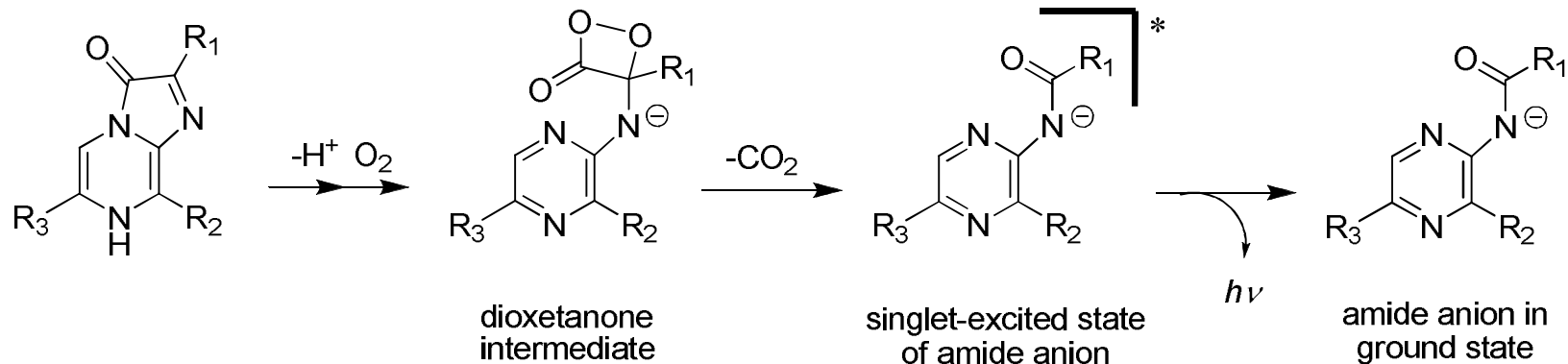
Degradazione enzimatica



- 1 coelenterazine: $R' = \text{OH}$, $R = \text{OH}$
 2 h-coelenterazine: $R' = \text{H}$, $R = \text{OH}$
 3 bis-deoxy-coelenterazine: $R' = \text{H}$, $R = \text{H}$

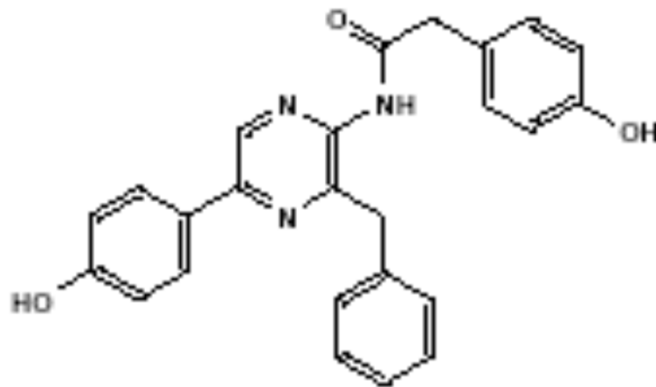


4 coelenteramide

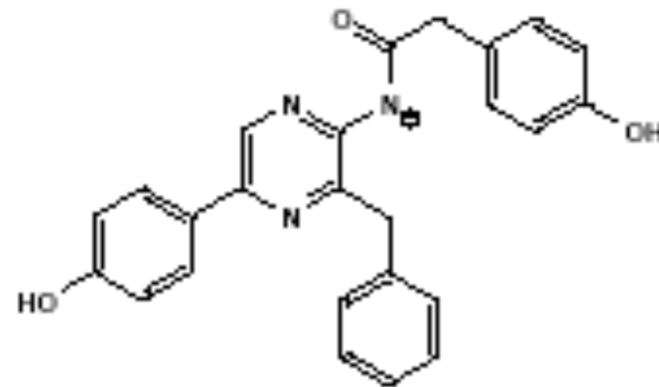


Bioluminescenza e Nanotecnologie

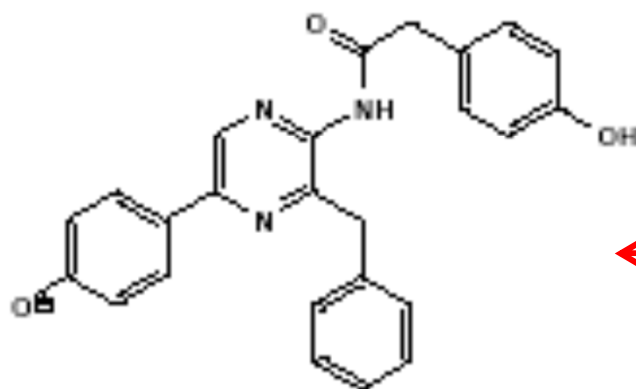
Forme emittenti delle celenterazine



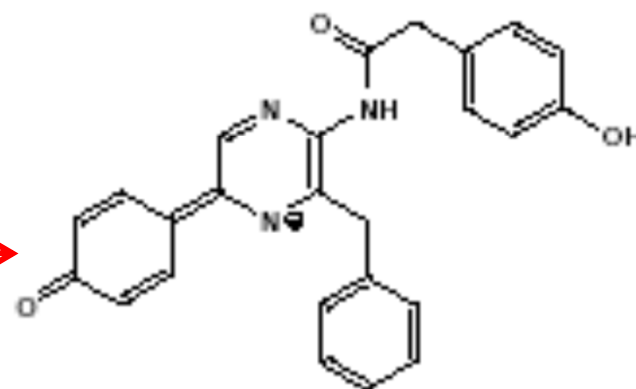
Neutral Species (400 nm)



Amide Anion (435–458 nm)



Phenolate Anion (480–490 nm)



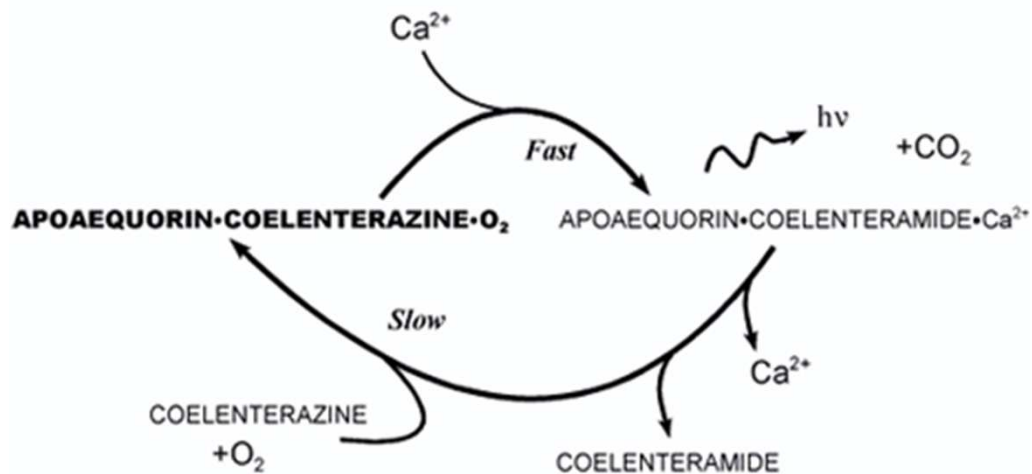
Pyrazine Anion (535–550 nm)



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

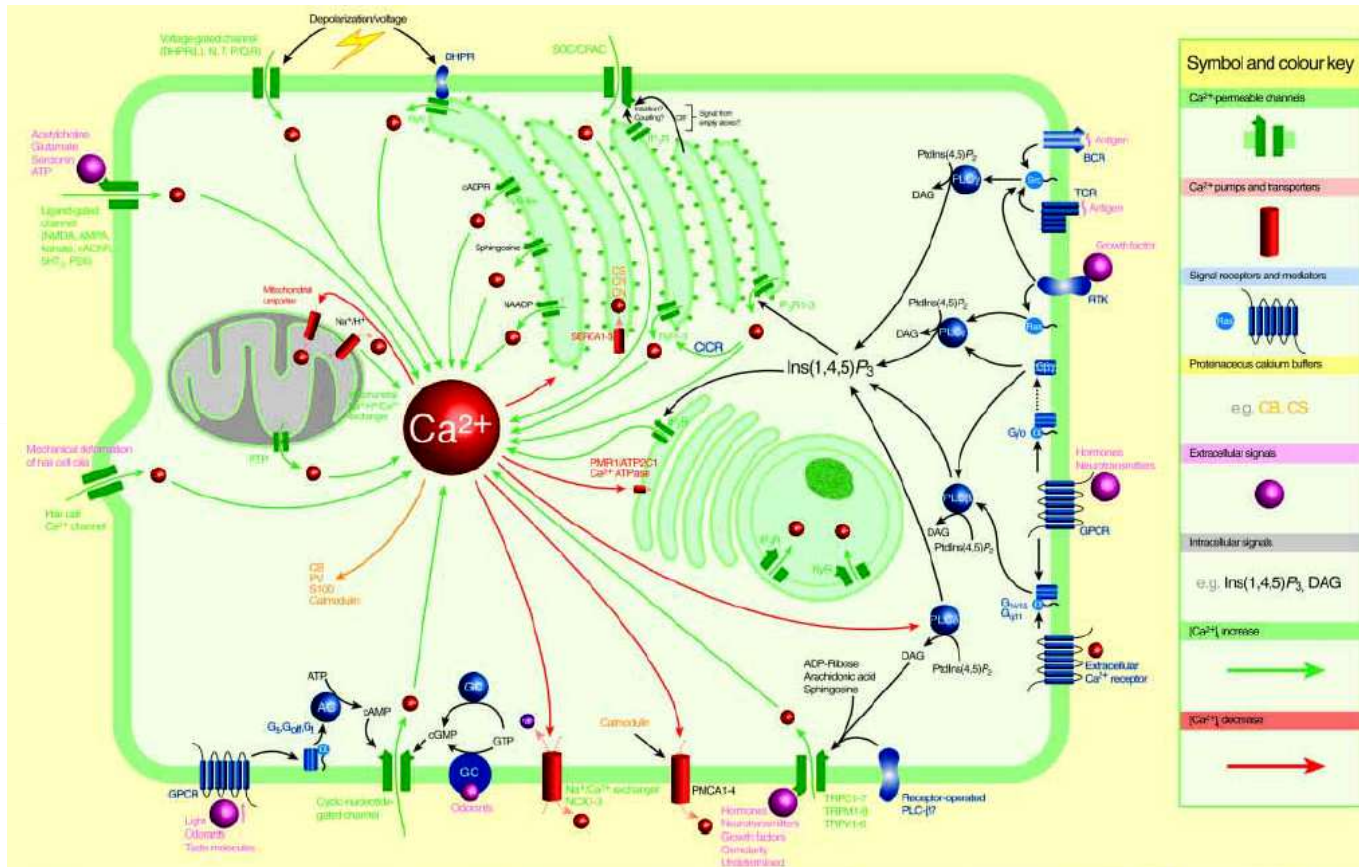
Ulteriore sviluppo tecnologico: utilizzo di particolari fotoproteine *sensibili alle variazioni intracellulari del Ca^{2+}*



A seguito di un aumento o diminuzione (rispetto ad uno standard) della concentrazione intracellulare (*in vivo*) dello ione Ca^{2+} , si ottiene un'aumento **dell'intensità di picco** dell'emissione della fotoproteina legata al substrato (celenterazina)

Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni



Il calcio è coinvolto come secondo messaggero in numerosi processi cellulari, inoltre è cruciale nei processi di trasduzione del segnale a seguito dell'interazione ligando-recettore per una numerosa classe di recettori di membrana, i GPCRs (oltre il 60% dei farmaci in commercio appartengono a questa classe)

Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

Mediante l'utilizzo di innovative apparecchiature (**FLIPR- *Fluorometric Imaging Plate Reader***) è possibile effettuare lo screening industriale (**HTS- *High Throughput Screening***) di nuovi farmaci per la **determinazione quantitativa** dell'affinità e attività dei nuovi ligandi in oggetto di studio, in modo veloce, affidabile, riproducibile e sicuro. Inoltre l'automazione di questo strumento permette l'analisi di un grande numero di ligandi (fino a 384 composti) in pochissimo tempo.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

- Confronto della **tecnica** rispetto all'utilizzo dei classici **probes radiomarcati**:
- La preparazione del radioisotopo, richiede laboratori attrezzati, operatori specializzati.
- Esistono in commercio dei kit già preparati con cellule marcate con fotoproteine e pronte all'utilizzo.
- Pericolosità delle radiazioni emesse quindi particolari attrezzature nel maneggiare i composti.
- Nessuna pericolosità o particolari attrezzature di sicurezza.
- Stoccaggio e smaltimento dei rifiuti.
- Sensibilità e velocità di analisi, considerare che il radioisotopo più ha una emivita breve più il suo limite di rivelabilità (LOD) è basso.
- Utilizzo di apparati semplici e non eccessivamente costosi che permettono di rivelare concentrazioni nell'ordine atto-femto molar (10^{-18} , 10^{-21} mol)

Bioluminescenza e Nanotecnologie

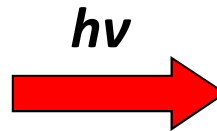
Esempi di applicazioni

- Confronto della tecnica rispetto all'utilizzo dei classici *probes* radiomarcati:
- Molte molecole biologiche, tipo proteine sono suscettibili a danni radiolitici.
- Nessun tipo di danno viene riscontrato sulle molecole biologiche marcate con le fotoproteine.
- La necessità di effettuare dei lunghi e laboriosi processi di separazione e purificazione sulla matrice cellulare per il conteggio radioattivo.
- Rivelazione immediata senza nessuna particolare operazione

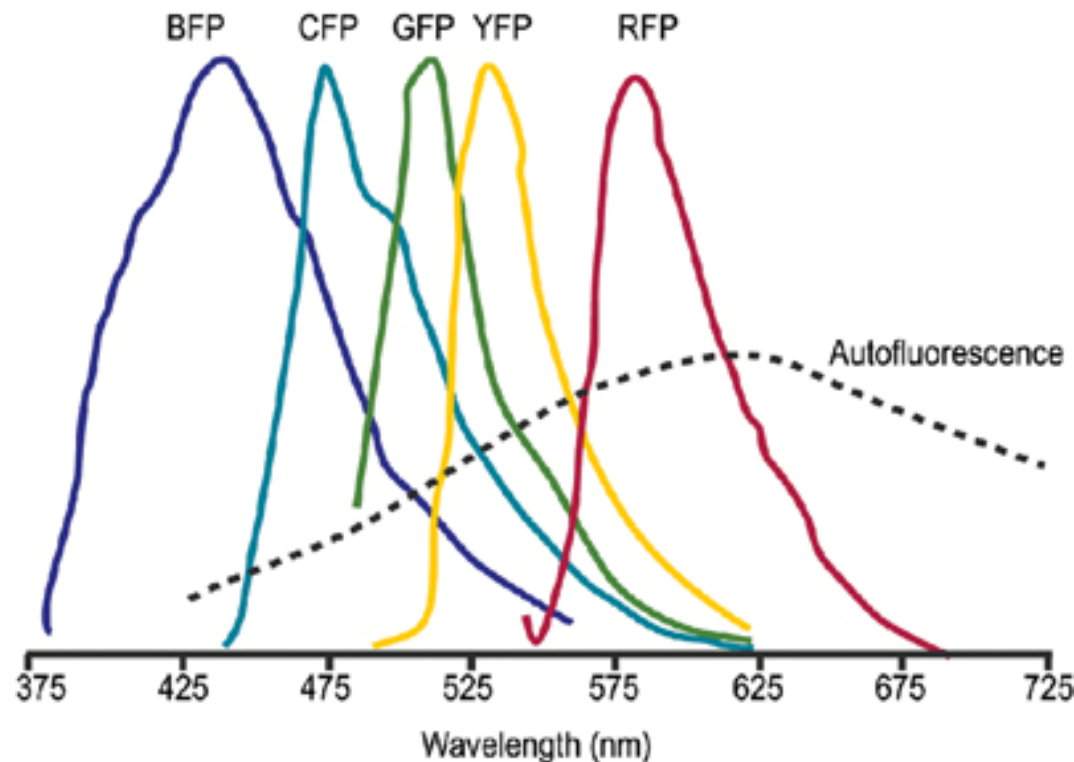
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

Enzima (+ substrato)
Donatore



GFP
Accettore (fluorescente)



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

Considerando che:

- Sia il donatore (es. Rluc) che l'accettore (es. GFP) possono essere legati a *complessi biologici macromolecolari* delle cellule (es. intracellulari β -arrestina, di membrana GPCRs) mediante particolari tecniche biotecnologiche
- Fenomeni biologici implicano che le macromolecole coinvolte siano ad una *distanza inferiore ai 100 Å* (**studi di interazione proteina-proteina PPI**).
- L'interazione donatore/accettore avviene solo a queste distanze
- Il substrato penetra senza particolare difficoltà le membrane cellulari (lipofilo)

fenomeno

Trasferimento non radiativo di energia (resonance energy transfer)

applicazioni

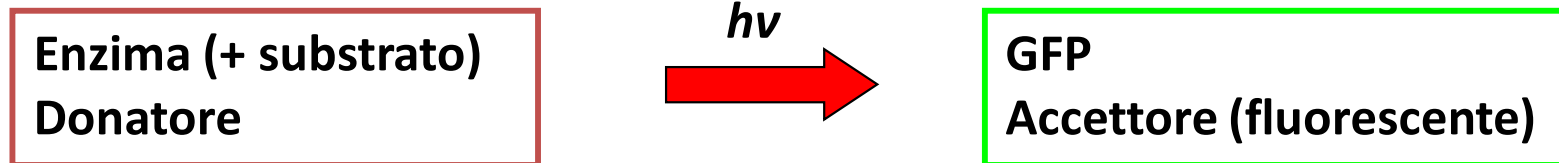
BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

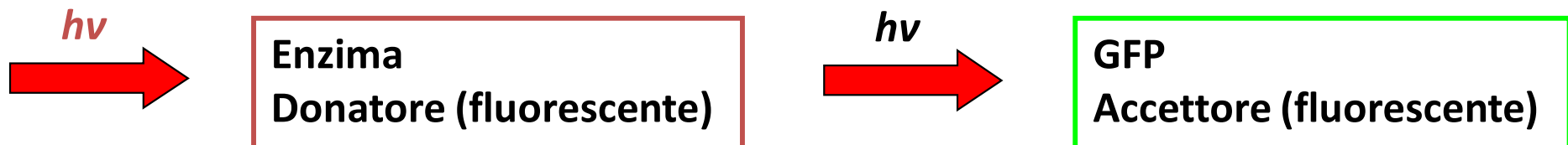
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Esempi di applicazioni

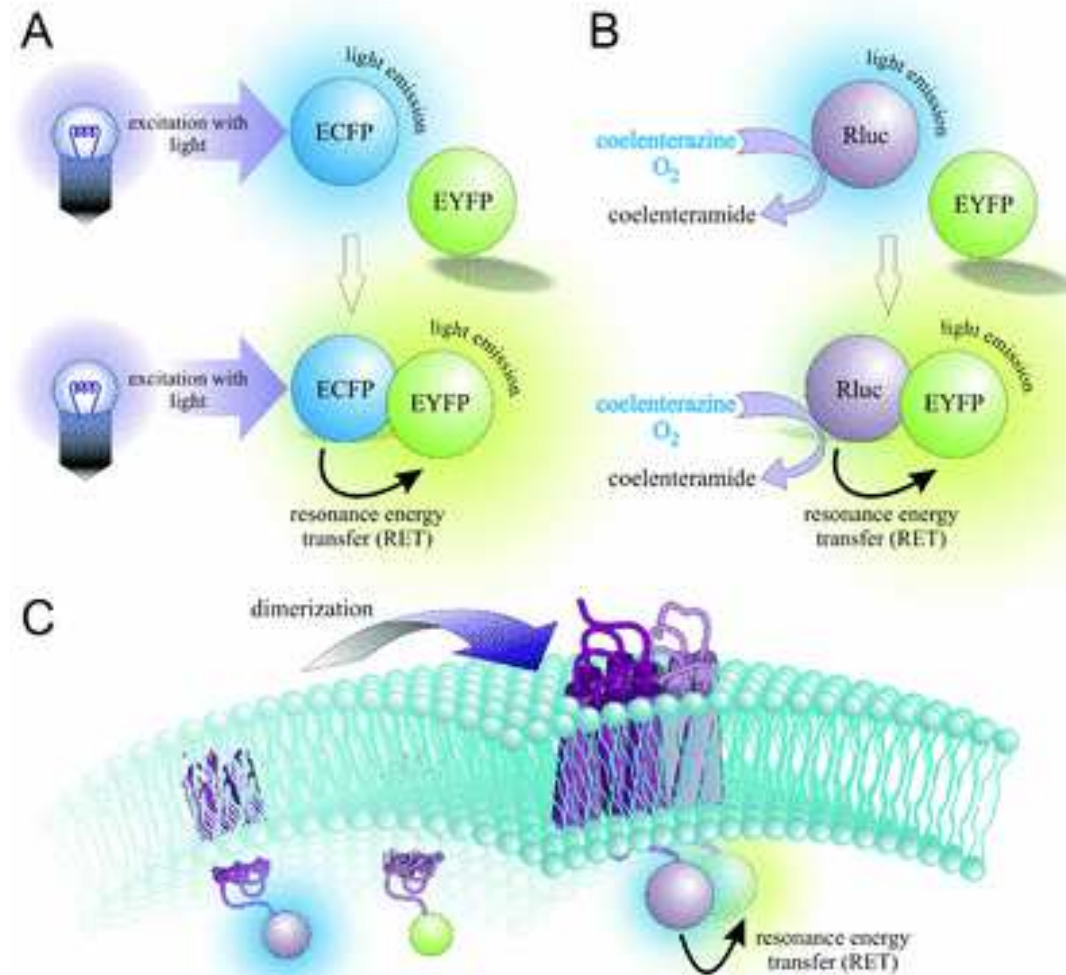
BRET



FRET

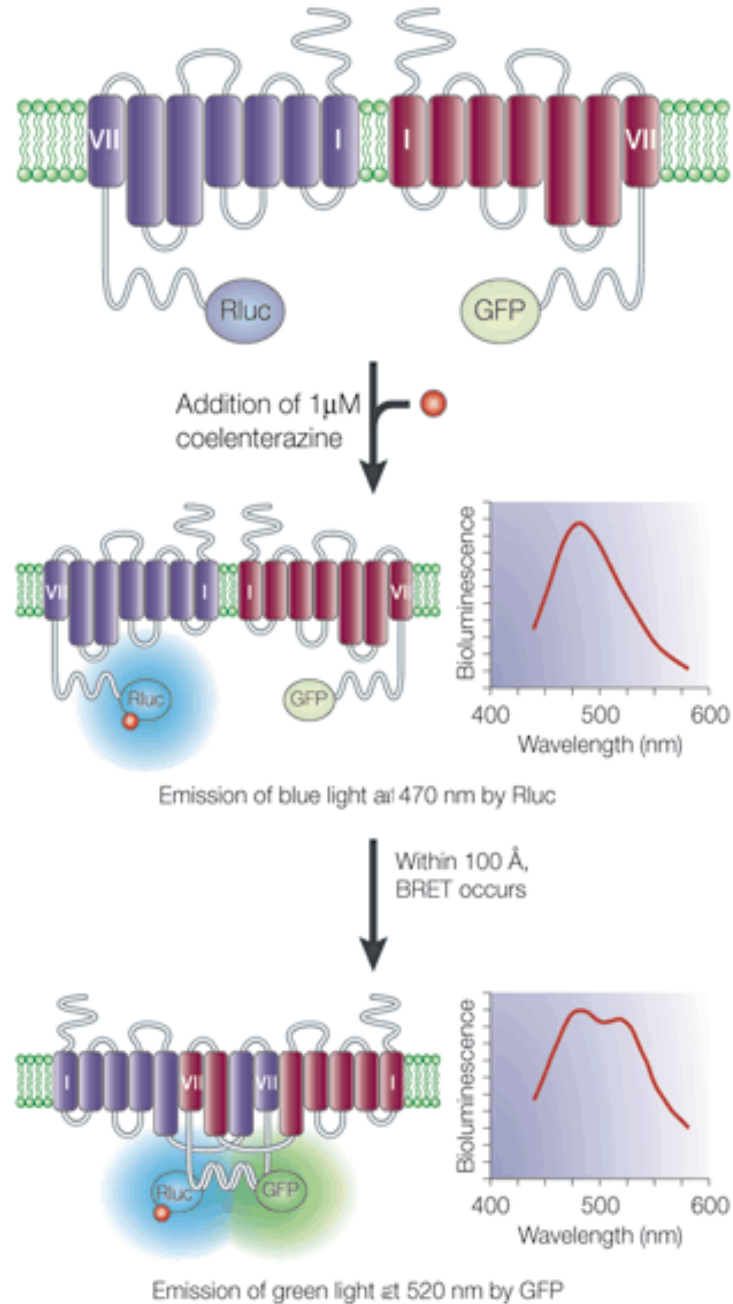


Bioluminescenza e Nanotecnologie



A. FRET; B. BRET; C. Applicazione

Bioluminescenza e Nanotecnologie



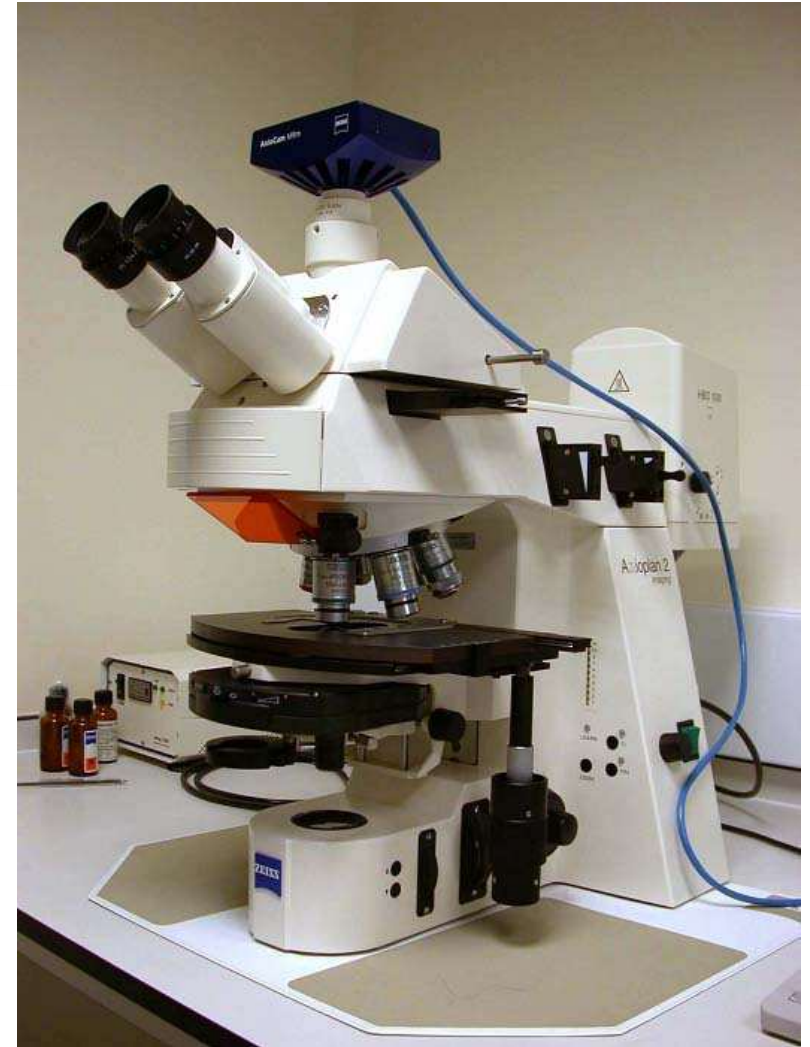
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Le caratteristiche della **microscopia a fluorescenza** possono essere così riassunte:

Specificità. Le molecole con cui sono costituite le etichette emettono luce ad una lunghezza d'onda che le caratterizza. Etichette differenti possono quindi essere eccitate in modo specifico.

Sensibilità. È un punto di forza di questa tecnica ed in continuo miglioramento grazie all'introduzione di sempre migliori marcatori e fotorivelatori. Oggi è possibile arrivare a rivelare concentrazioni molecolari dell'ordine di decine di attomoli.

Risoluzione temporale. Il limite è dato dal tempo che intercorre tra l'assorbimento dello stimolo luminoso e la riemissione. Questo tempo vale circa s; gran parte dei processi biologici avvengono con tempi ben superiori.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

Problematiche relative a tecniche di *Resonance Energy Transfer*

- Processi biologici richiedono tempi maggiori di qualche secondo
- Assorbimento/Emissione a lunghezze d'onda nella regione del violetto/blu del Vis
- Attenuazione tissutale di queste radiazioni, sarebbe necessario ottenere sistemi in grado di generare radiazioni ad energie più basse (**shift verso il rosso**)
- L'ottenimento di un sistema con queste caratteristiche modificherebbe anche i tempi di rilassamento
- Mantenere comunque le caratteristiche di alta versatilità delle fotoproteine e le caratteristiche chimico-fisiche delle celenterazine

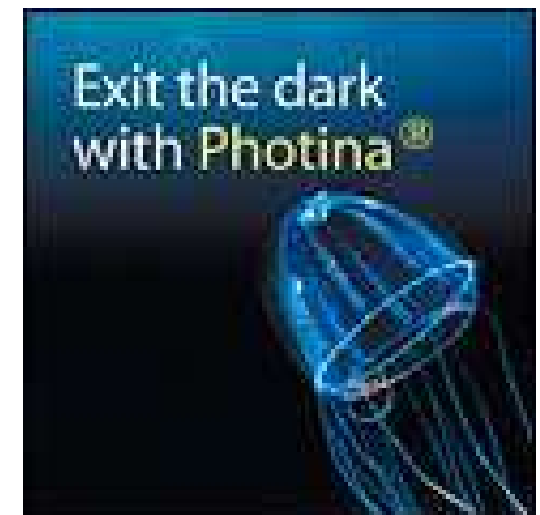


Ricerca

Bioluminescenza e Nanotecnologie

Problematiche relative a tecniche di *Resonance Energy Transfer*

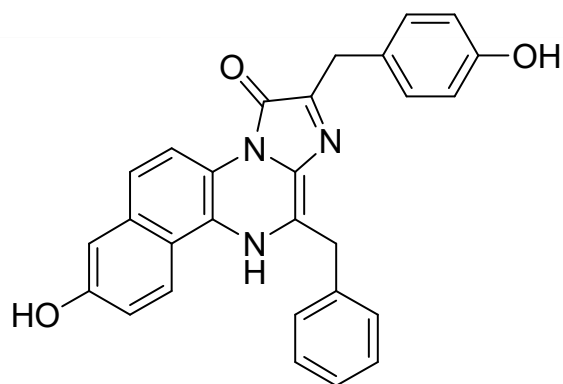
- Ricerca orientata verso l'ottenimento di fotoproteine mutate che emettano a diverse lunghezze d'onda.
- Photina™ fotoproteina che presenta una maggiore emissione di luce, con cinetiche di rilassamento più lente (Patent italiana)
- Varianti di fotoproteine naturali ottenute per *mutagenesi* che hanno mostrato emissione spostata verso il rosso (da 481 a 534 nm)



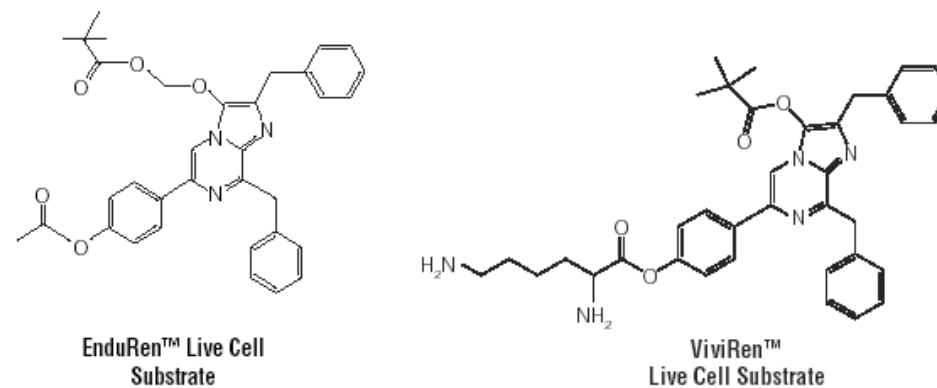
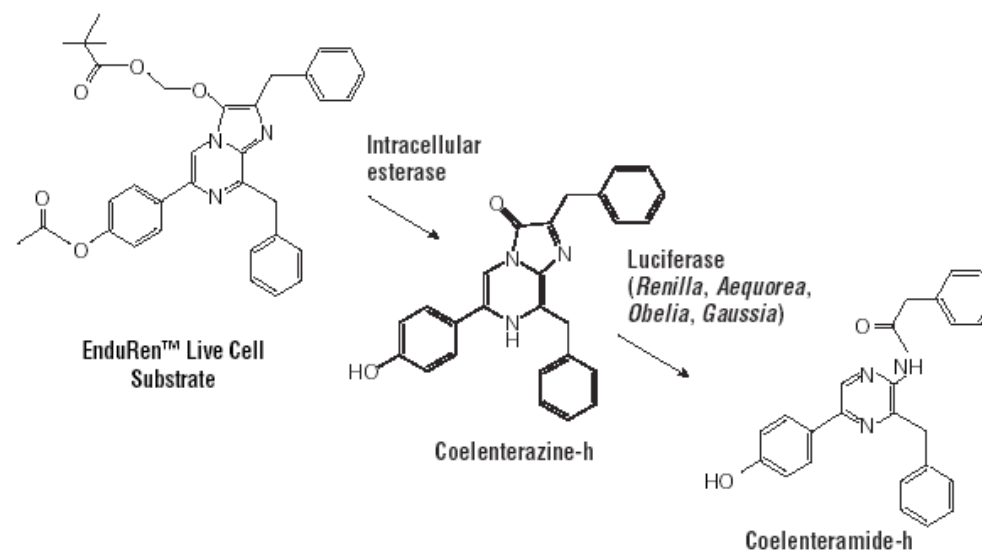
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Problematiche relative a tecniche di *Resonance Energy Transfer*

➤ Ricerca orientata verso l'ottenimento di analoghi della celenterazina nativa che presentino un'emissione differente (sia lunghezza d'onda che cinetiche più lente)



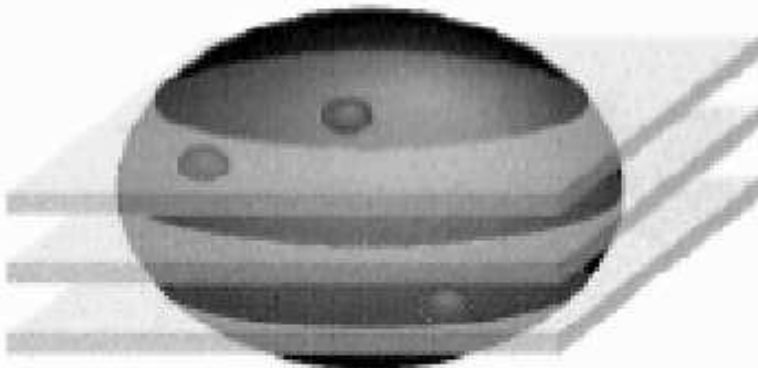
e-coelenterazine (510 nm)



Bioluminescenza e Nanotecnologie

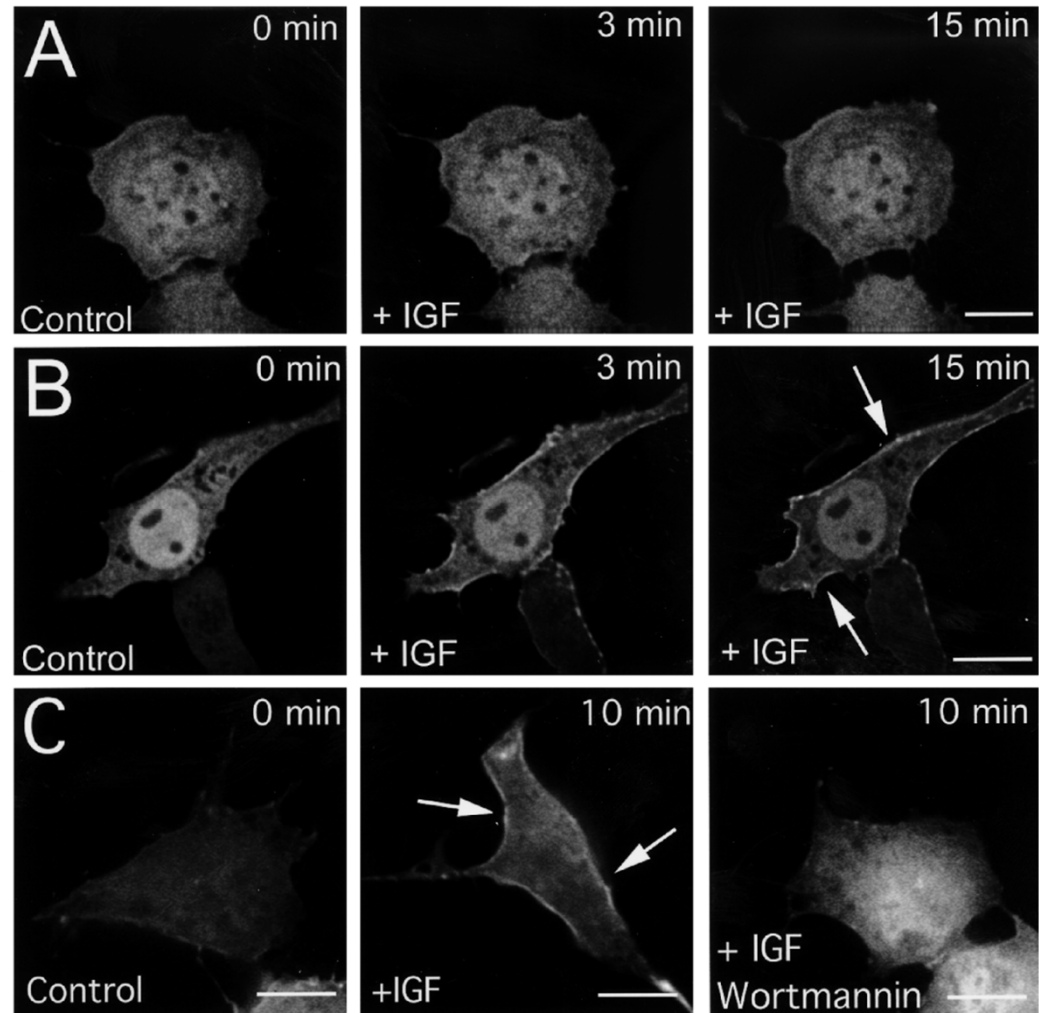
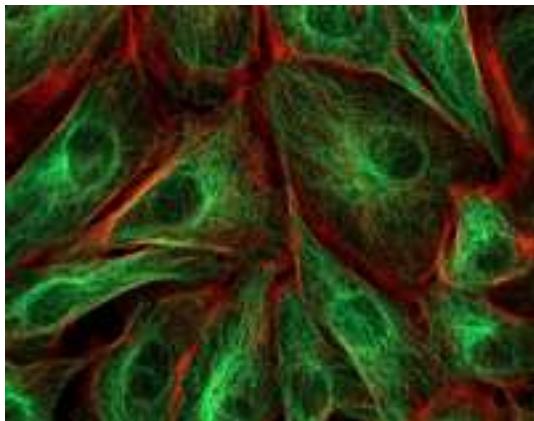
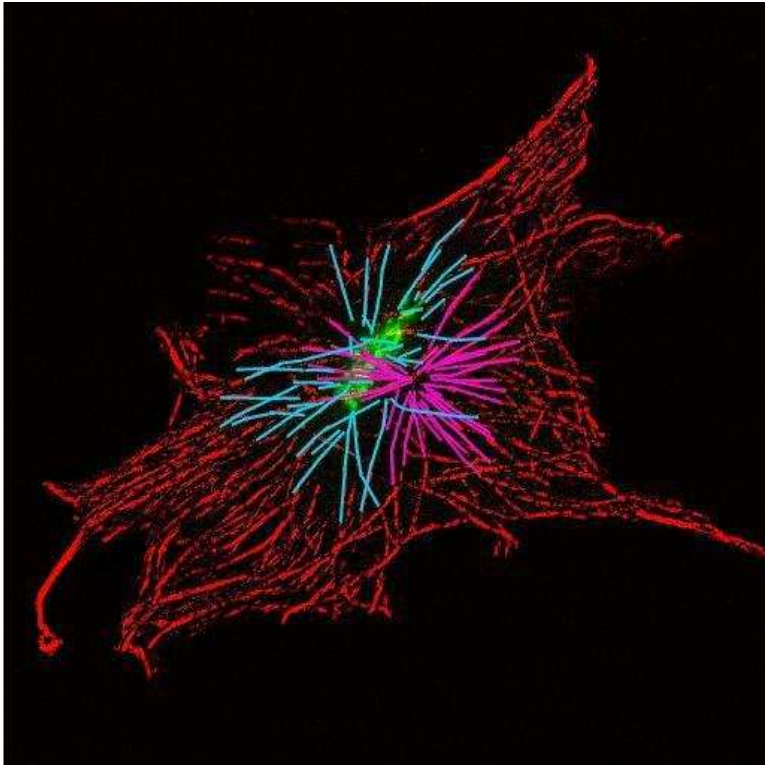
Epifluorescenza (microscopia a fluorescenza confocale)

Sezioni ottiche diverse
permettono di
ricostruire l'informazione
tridimensionale



Il *microscopio confocale* focalizza la luce su una zona molto piccola del campione, alla profondità desiderata: solo quella zona riceve l'illuminazione (questo riduce la luce diffusa dalle altre zone del campione). Per eliminare la luce che viene comunque riflessa anche dagli strati del campione sopra e sotto il fuoco dell'illuminazione viene inserito un diaframma che permette di raccogliere solo la luce proveniente dalla zona illuminata del campione. Con la *microscopia confocale laser a scansione*, si possono effettuare delle sezioni ottiche di un campione trasparente. Sovrapponendo le varie sezioni si ottiene un'immagine tridimensionale.

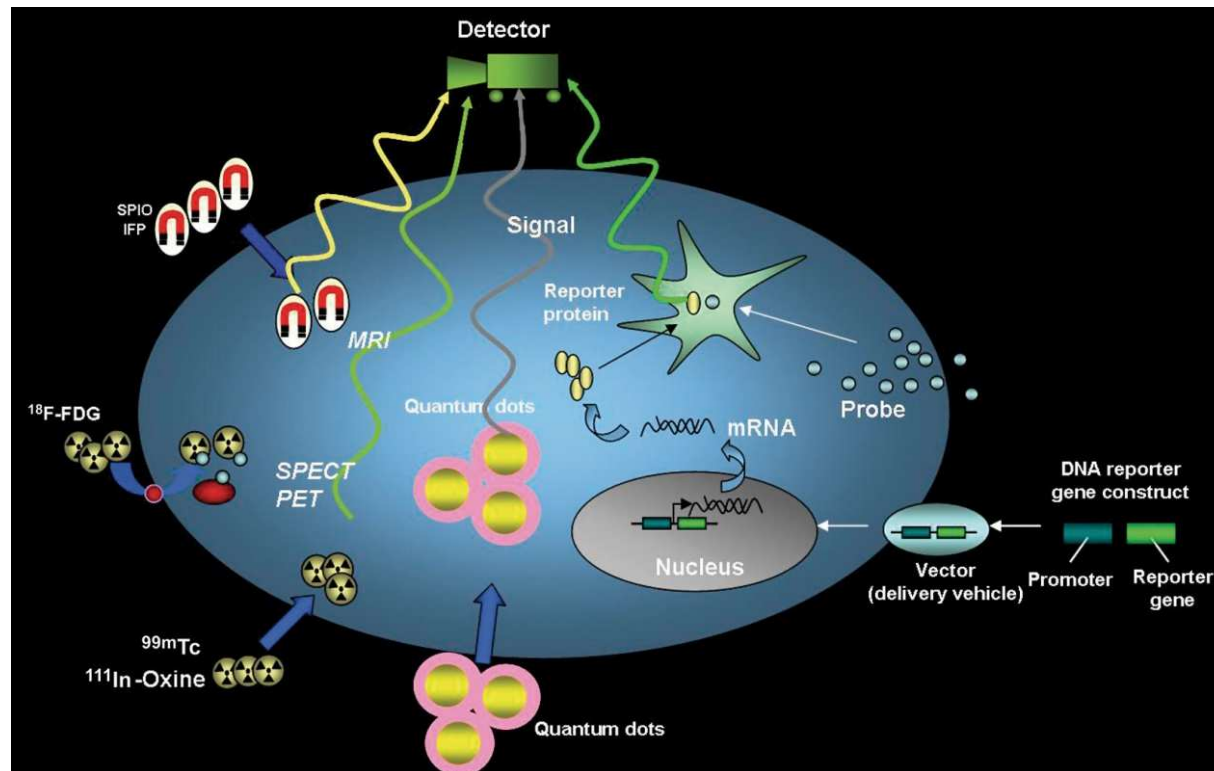
Bioluminescenza e Nanotecnologie



Cell imaging (in vivo)

Bioluminescenza di Immagine

Grazie al recente sviluppo di detector ottici ad alta sensibilità e il rapido perfezionamento di numerose procedure di biologia molecolare, le tecniche di bioluminescenza di immagine stanno concretamente ampliando le prospettive di utilizzo in campo clinico per la diagnosi di patologie in modo del tutto non invasivo. Le principali metodologie, che mostrano i più ampi margini di sviluppo sono la **Bioluminescence Imaging (BLI)** e la **Light Emission Tomography System (LETS)**. Queste metodiche combinate ad altre tecniche diagnostiche di immagine (TAC, MRI) permettono di monitorare in vivo lo sviluppo e la propagazione di alcune forme tumorali.



Bioluminescenza e Nanotecnologie

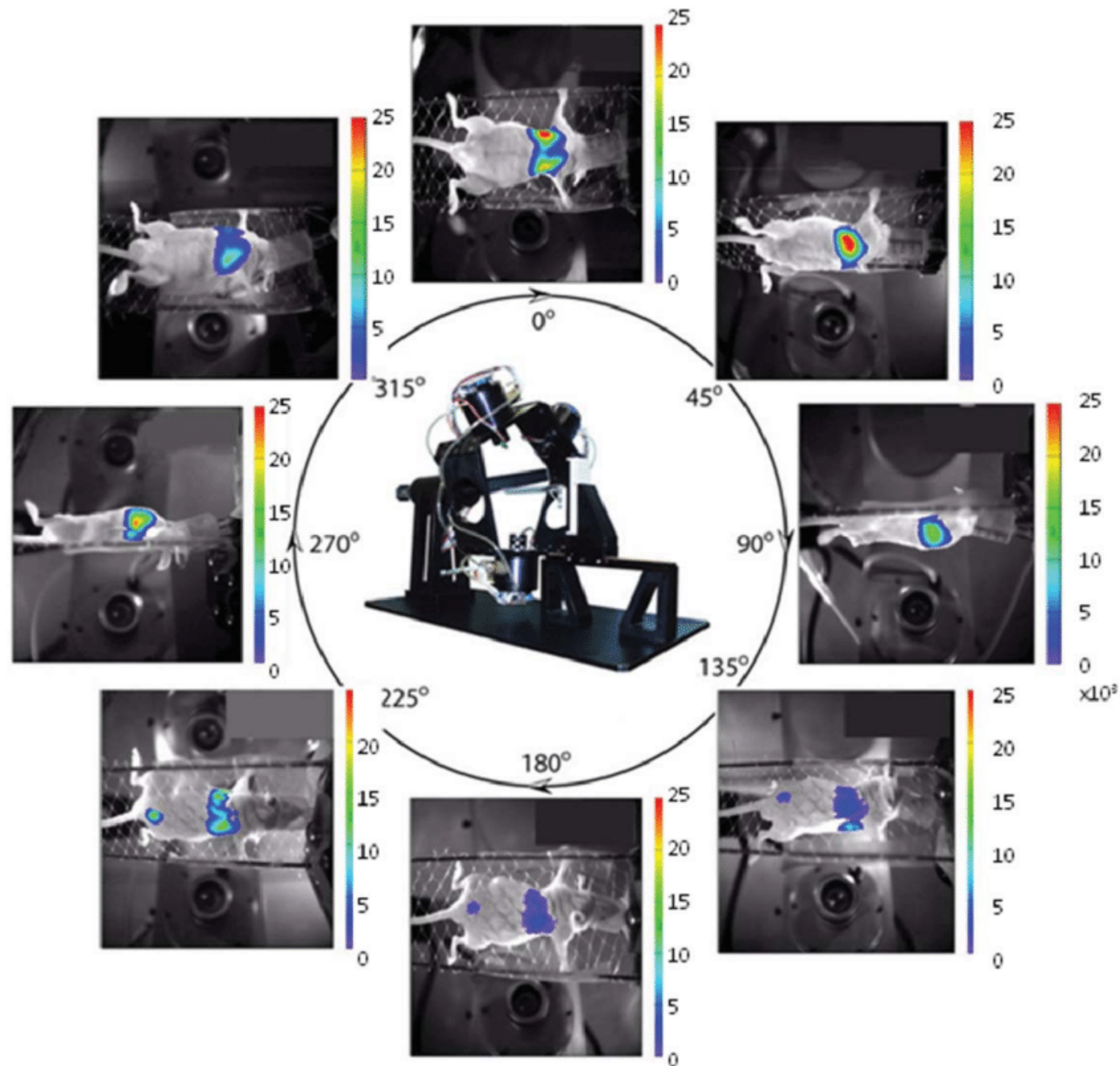
Bioluminescenza di Immagine

Le immagini vengono fornite da uno strumento tomografico che individua l'emissione di luce attraverso detector ottici ad alta sensibilità chiamati “**charge coupled cameras**” (CCD). Diverse CCD registrano simultaneamente le immagini ed un computer controlla il meccanismo di rotazione che permette l'acquisizione da diverse angolature al fine di ottenere immagini tridimensionali. Questa tecnica rende possibile studi di imaging multipli e sequenziali sullo stesso animale e, alle concentrazioni necessarie all'ottenimento della bioluminescenza, la luciferina non risulta nè tossica né immunogenica. Una importante caratteristica della BLI è la proporzionalità tra l'intensità della luce registrata dal dispositivo e quella della luce emessa.



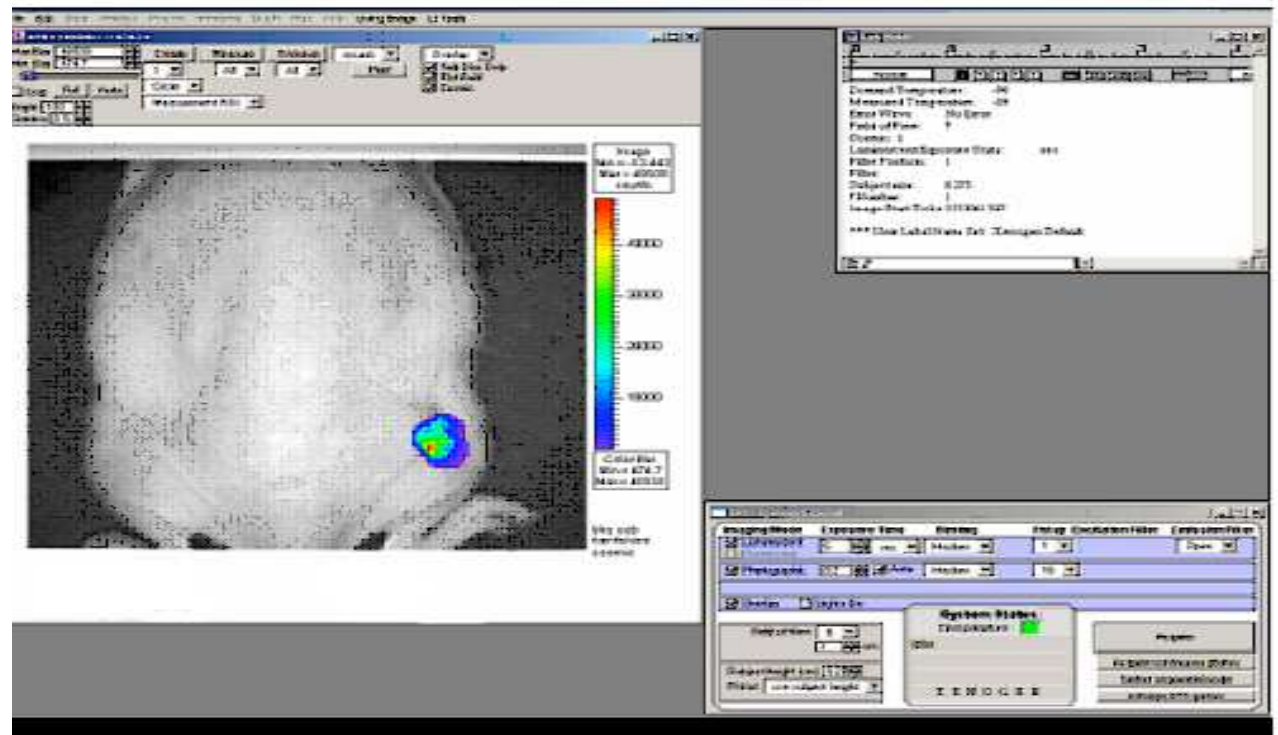
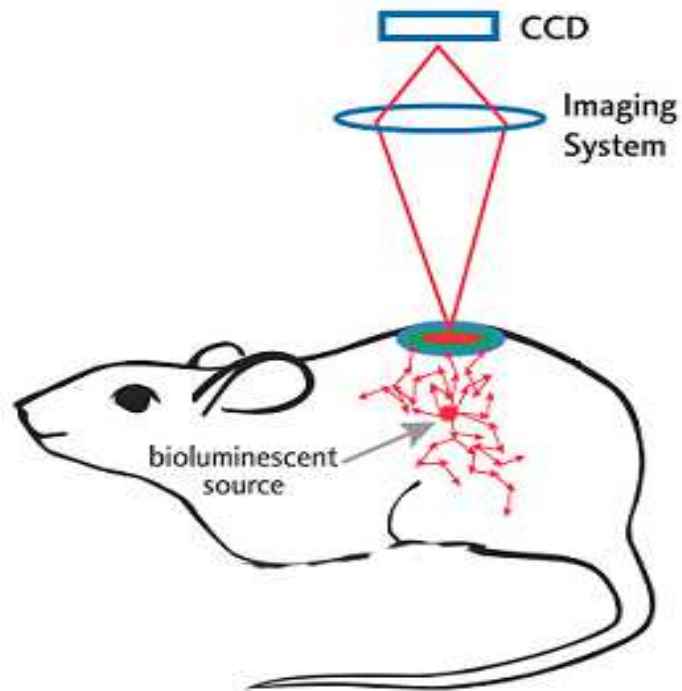
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Bioluminescenza di Immagine



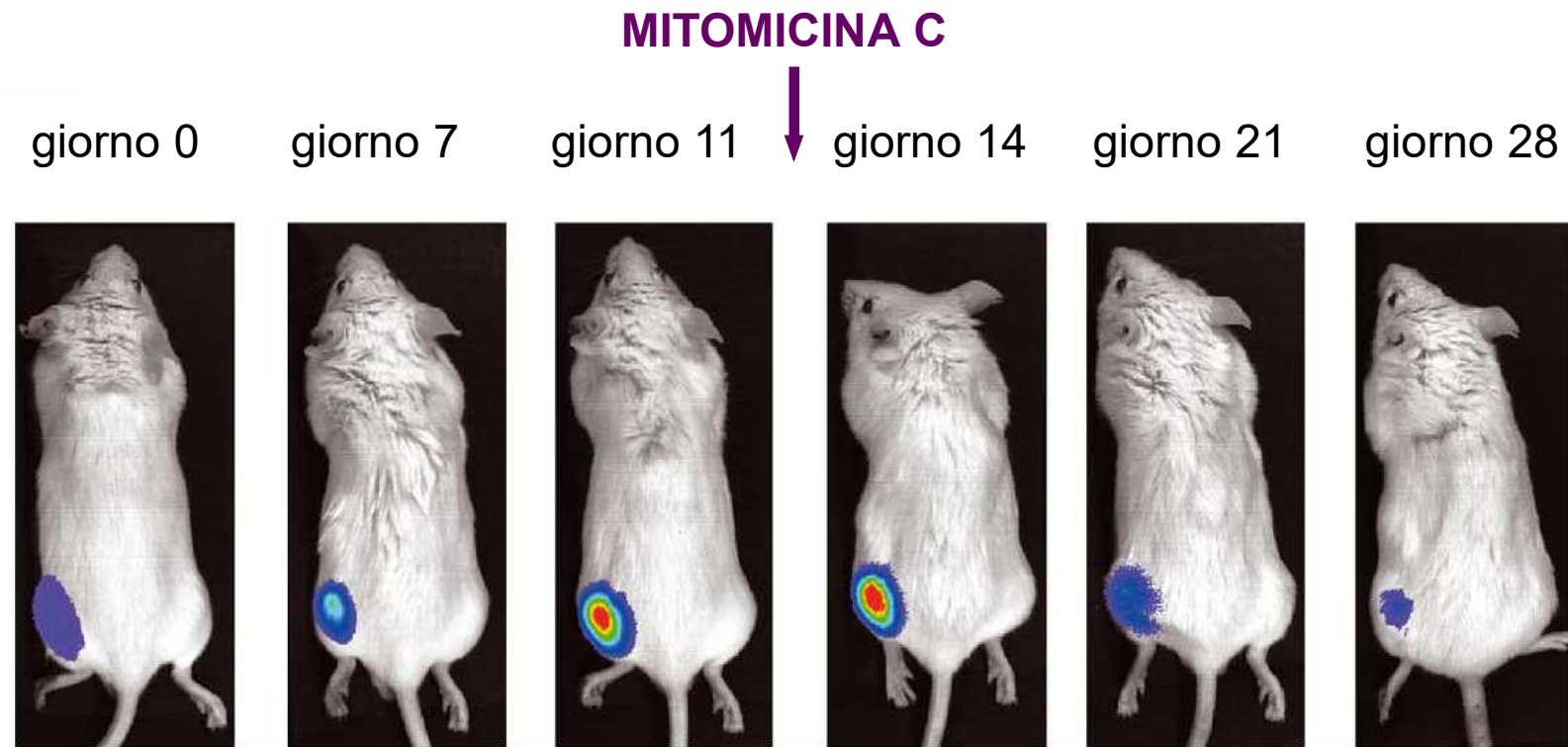
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Replicazione di cellule tumorali e remissione in seguito a trattamento con antineoplastici



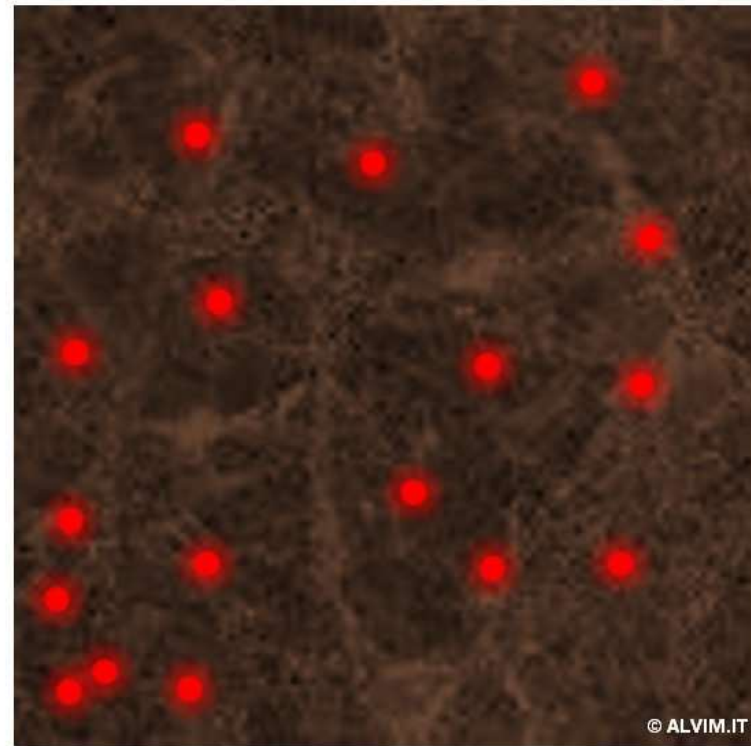
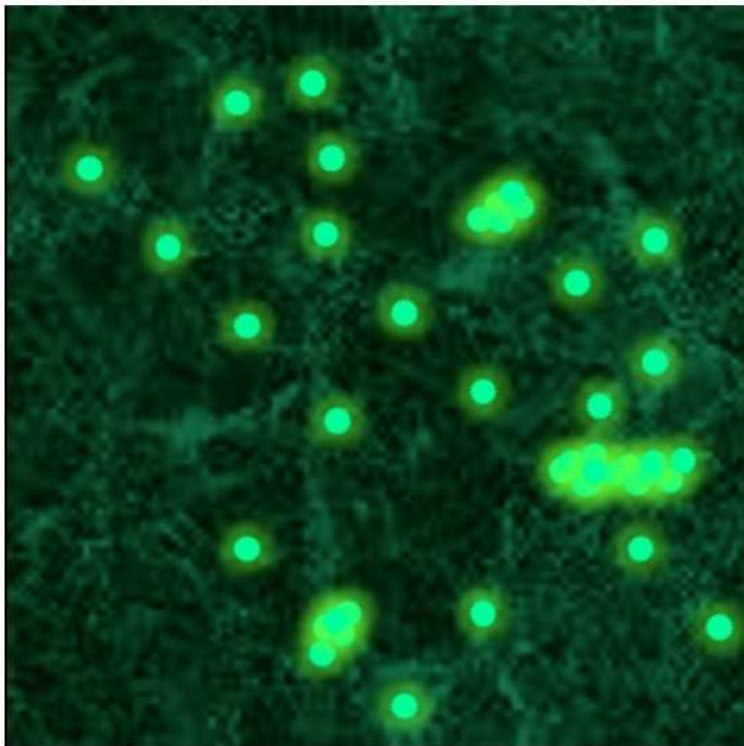
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Replicazione di cellule tumorali e remissione in seguito a trattamento con antineoplastici



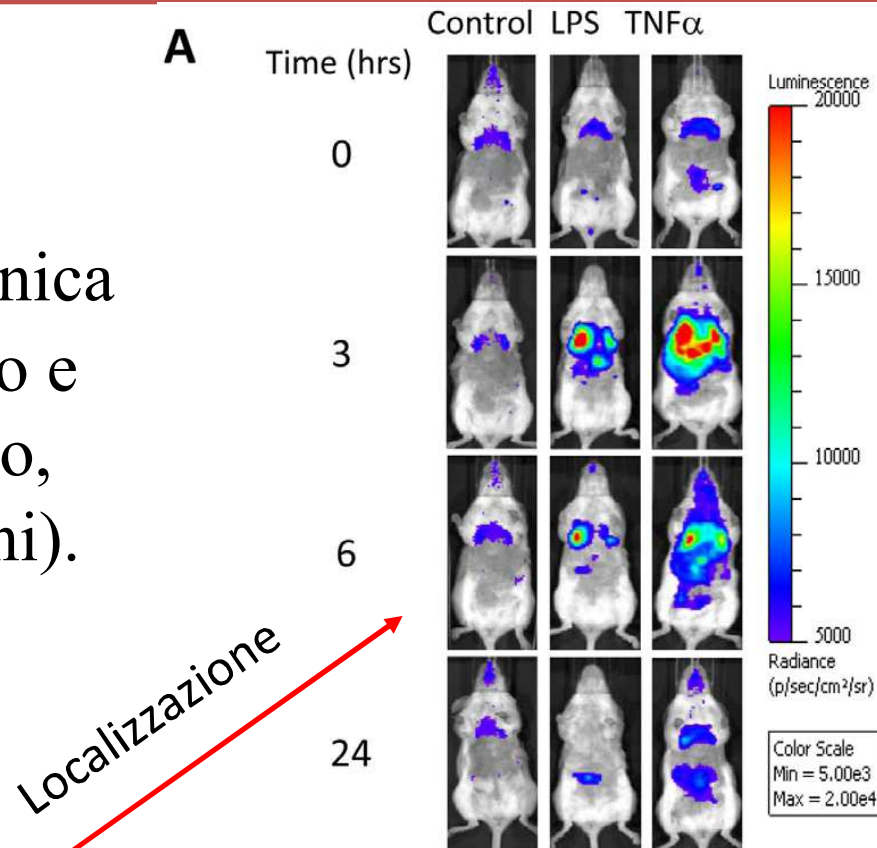
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Tracciamento di infezioni batteriche o virali (permette di seguire la dinamica dell'infezione e la risposta ai trattamenti antibiotici).

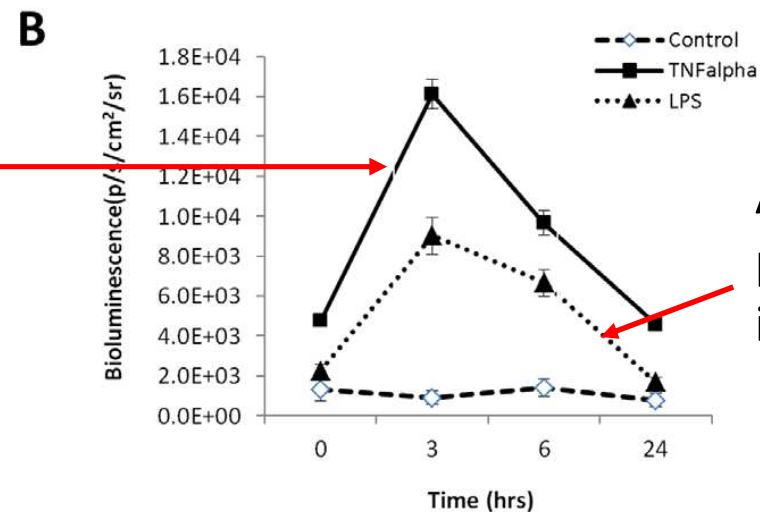


Bioluminescenza e Nanotecnologie

Studio di espressione genica
(la luce indica quando e
dove un gene è attivo,
anche in organi interni).



Risposta
infiammatoria (TNF- α
mediated)

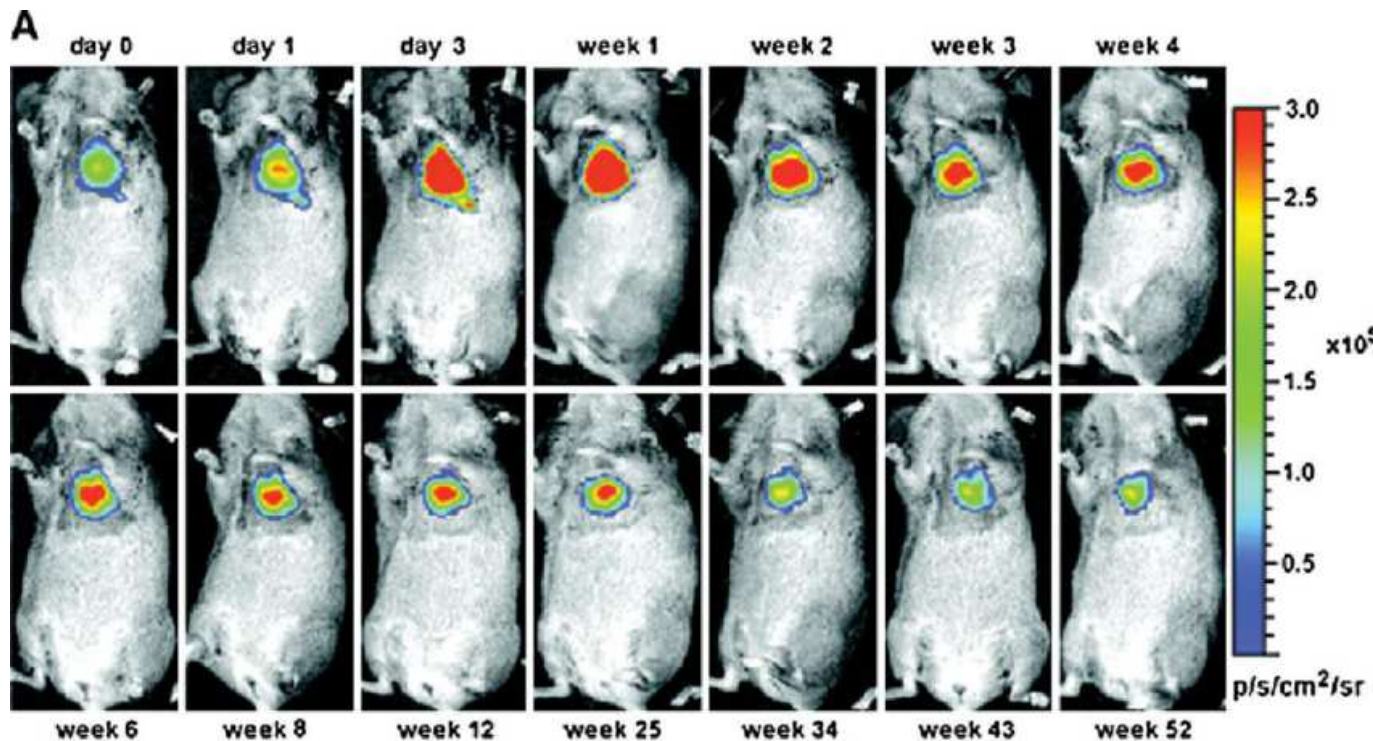


Agente che induce
processo
infiammatorio

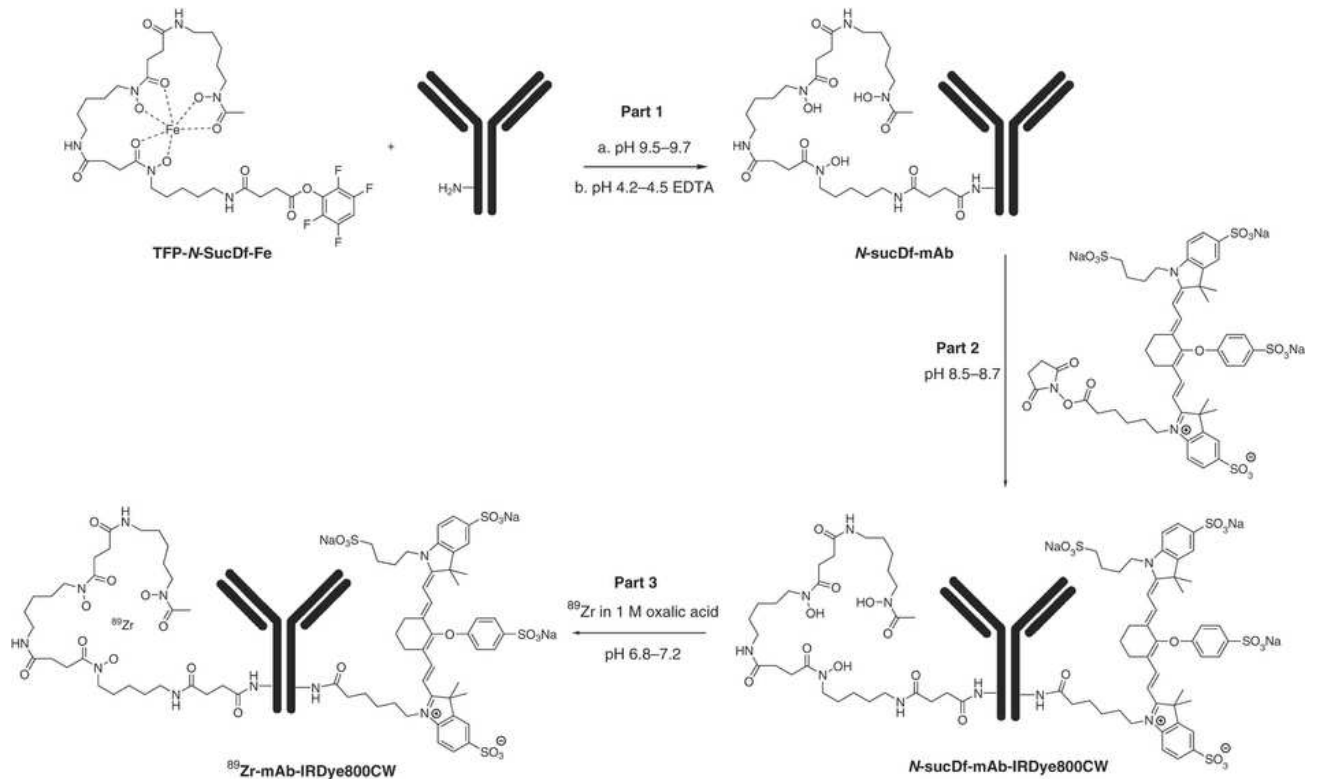
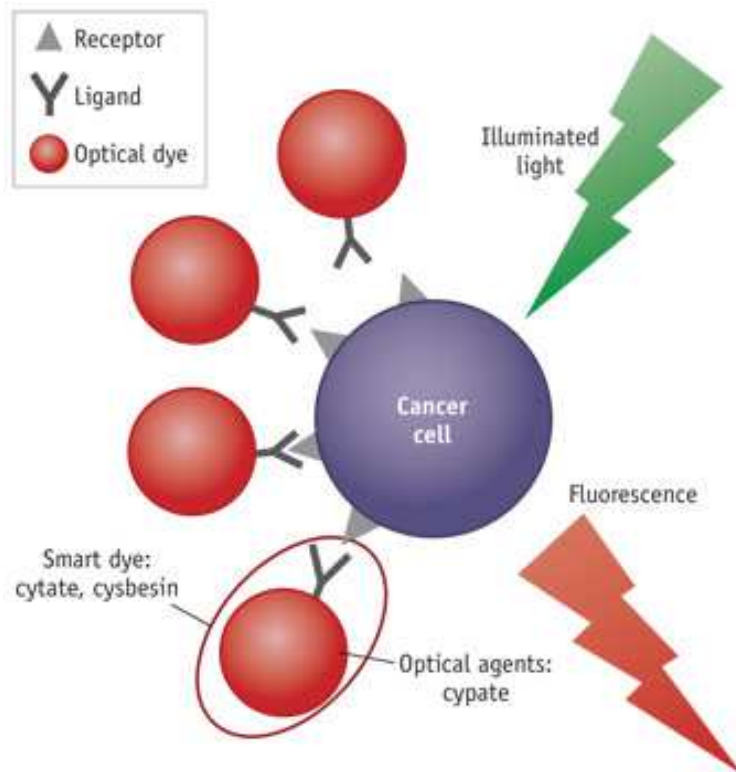
Bioluminescenza e Nanotecnologie

Tracciamento di cellule staminali o immunitarie (seguire la migrazione e l'accumulo nei tessuti in tempo reale).

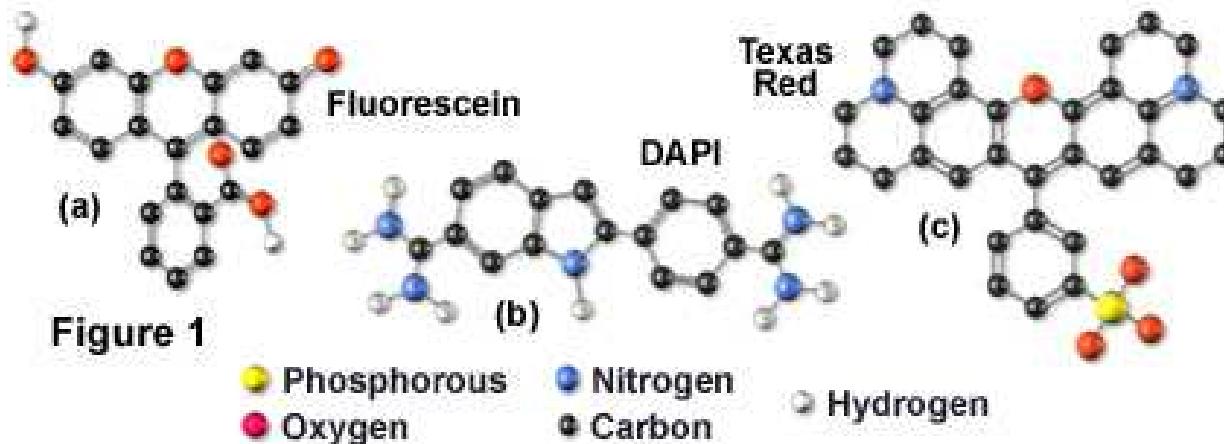
E' stato possibile valutare la *riparazione* del miocardio a seguito di infarto, la luce prodotta da cellule staminali vive persiste per lungo tempo e, integrata da test funzionali, può dare utili informazioni sulle dinamiche e sito di azione **in tempo reale**. Molto utili per, ad es, per ottimizzare protocolli prima di passare a trial clinici sugli esseri umani.



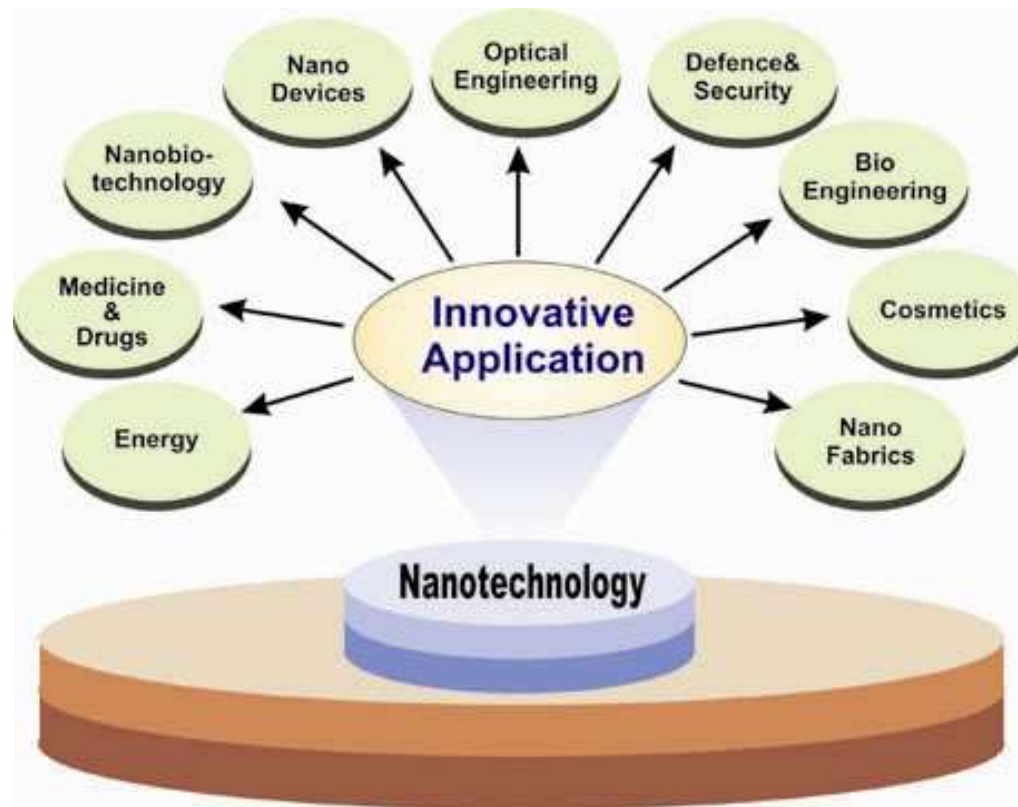
Bioluminescenza e Nanotecnologie



Common Fluorophores in Widefield and Confocal Microscopy



Bioluminescenza e Nanotecnologie



La **nanotecnologia** è un ramo della *scienza applicata* e della *tecnologia* che si occupa del controllo della materia su scala dimensionale inferiore al micrometro, normalmente tra 1 e 100 nanometri, e della progettazione e realizzazione di dispositivi in tale scala.

La **nanotecnologia** costituisce un ambito d'investigazione altamente *multidisciplinare*, coinvolgendo molteplici indirizzi di ricerca che vanno dalla biologia molecolare alla chimica, scienza dei materiali e ovviamente fisica, sia applicata che di base, fino all'ingegneria meccanica ed elettronica.