

Industrializzazione e regolamentazione

di prodotti biotecnologici

❖ **Obiettivi formativi**

Prospettiva industriale relativa ai requisiti di sviluppo e produzione di prodotti biotecnologici per la cura e la prevenzione di malattie, sia dal punto di vista tecnico che normativo.

❖ **Docente**

PhD Gabriele Meli

❖ **FOCUS**

Industrializzazione di processo

❖ **Orario lezioni**

Martedì e Mercoledì 17-19

❖ **Modalità di esame**

Orale by Teams

❖ **Contatto preferenziale**

gabriele.meli78@gmail.com

Questo corso contiene informazioni a scopo didattico, non correlate in alcun modo a dati rilevanti per Bracco Imaging S.p.A. e fa riferimento alla formazione personale ed all'esperienza professionale secondo il mio punto di vista.

GABRIELE MELI

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Procedure analitiche

1. Test di identificazione;
2. Test quantitativi per il contenuto delle impurezze;
3. Test limite per il controllo delle impurezze;
4. Prove quantitative dell'API in campioni di sostanze o prodotti farmaceutici.

Metodo d'analisi:

- Descrive il modo in cui deve essere effettuata un'analisi;
- Deve descrivere in dettaglio tutti i passaggi necessari all'esecuzione di ogni test analitico;
- Deve riportare il procedimento di preparazione del campione, dello standard di riferimento e dei reagenti, l'allestimento della sequenza analitica, le curve di calibrazione, le formule di calcolo ed i criteri di accettabilità di un risultato.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Test di identificazione

- I test di identificazione mirano a garantire l'identità di un'analita in un campione. Ciò è normalmente ottenuto confrontando una proprietà del campione (ad esempio spettro, comportamento cromatografico, reattività chimica, ecc.) a quella di uno standard di riferimento;
- Il test delle impurezze può essere un test quantitativo o un test limite per l'impurezza in un campione. Entrambi i test hanno lo scopo di rispecchiare accuratamente le caratteristiche di purezza del campione. Per un test quantitativo sono richieste caratteristiche di convalida diverse rispetto a un test limite;
- Le procedure di analisi hanno lo scopo di misurare l'analita presente in un dato campione. Il saggio rappresenta una misurazione quantitativa dei componenti principali nel prodotto farmaceutico. Le stesse caratteristiche di convalida possono anche applicarsi a saggi associati ad altre procedure analitiche (ad es. Dissoluzione).

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Scopo della convalida

La convalida di un metodo di analisi è il processo mediante il quale si stabilisce, attraverso studi di laboratorio, che le prestazioni caratteristiche del metodo rispondano ai requisiti richiesti per le applicazioni analitiche designate.

- Accuratezza;
- Precisione;
- Ripetibilità;
- Precisione intermedia;
- Specificità;
- Limite di rilevabilità;
- Limite di quantificazione;
- Linearità;
- Range.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Riconvalida

Inoltre, può essere necessaria una riconvalida nelle seguenti circostanze:

- cambiamenti nella sintesi della sostanza farmaceutica;
- cambiamenti nella composizione del prodotto finito;
- cambiamenti nella procedura analitica.

Il grado di riconvalida richiesto dipende dalla natura delle modifiche e nei casi più importanti potrebbe essere richiesta una convalida completa.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Specificità e Selettività

- La selettività (per metodi che forniscono risposte che possono essere più o meno distinte per un certo numero di sostanze chimiche, ad esempio appartenenti alla stessa classe) o la specificità (per metodi che producono una risposta per un solo analita) è la capacità di un metodo di determinare in modo univoco e specifico l'analita, anche in presenza di interferenze derivanti da altre specie chimiche.
- La mancanza di specificità o selettività in una singola procedura analitica può essere compensata da altre procedure analitiche di supporto;
- Test di purezza: serve a garantire che tutte le procedure analitiche eseguite consentano una valutazione accurata del contenuto di impurezze, cioè test per le sostanze correlate, metalli pesanti, contenuto di solventi residui, ecc.
- Analisi (contenuto o potenza): fornire un risultato esatto che consenta una quantificazione accurata sul contenuto o la potenza dell'analita in un campione.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Precisione

- La precisione esprime il grado di accordo di una serie di misure ottenute da campionamenti multipli effettuati su uno stesso campione omogeneo di prodotto da analizzare, qualora il metodo analitico sia applicato in modo ripetitivo nelle condizioni sperimentali prescritte dal metodo stesso;
- La precisione di un metodo analitico è solitamente espressa come deviazione standard relativa (RSD %) o coefficiente di variazione (CV %) di una serie di misurazioni;
- esprime la vicinanza dell'accordo (grado di dispersione) tra una serie di misurazioni ottenute dal campionamento multiplo dello stesso campione omogeneo nelle condizioni prescritte;
- dovrebbe essere studiata utilizzando campioni omogenei e reali; quando non è possibile può essere valutata utilizzando campioni preparati artificialmente o una soluzione campione;

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Precisione

La precisione può essere considerata su tre livelli: ripetibilità, precisione intermedia e riproducibilità.

1. Ripetibilità: esprime la precisione di un certo numero di prove condotte dallo stesso analista e con lo stesso strumento in un breve intervallo di tempo;
2. Precisione intermedia: esprime la variazione ottenuta all'interno dello stesso laboratorio. Si valutano, in giorni diversi, i risultati che distinti analisti hanno ottenuto, impiegando anche differenti strumentazioni;
3. Riproducibilità: esprime la precisione tra laboratori (viene solitamente valutata nel caso in cui vengano attuati studi in collaborazione con altri laboratori per la standardizzazione di metodi).

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Linearità

- La linearità di un metodo analitico corrisponde alla sua capacità di produrre risultati direttamente proporzionali alla concentrazione (quantità) di analita nel campione, entro un determinato intervallo di misura.
- La linearità è solitamente espressa in termini di variazione attorno alla pendenza della retta calcolata secondo una determinata relazione matematica ed ottenuta dai risultati dell'analisi di campioni a diverse concentrazioni di analita.

Accuratezza

- L'accuratezza di un metodo analitico esprime il grado di accordo tra il valore trovato e il valore che si è accettato convenzionalmente come vero. Dipende anche dall'errore sistematico proprio del metodo d'analisi utilizzato. In generale corrisponde alla quantità misurata di analita rispetto alla quantità nota aggiunta ad una matrice per valori di concentrazione che sono all'interno del campo di validità del metodo stesso.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Range

- Il range (campo di applicazione) di un metodo analitico è l'intervallo tra la più bassa e la più alta concentrazione (quantità) di analita (valori limite compresi) entro il quale la determinazione può essere effettuata con un idoneo livello di precisione, accuratezza e linearità, nelle condizioni sperimentali prescritte dal metodo.

Robustezza

- La robustezza è una misura della capacità di un metodo analitico di fornire risultati che rimangano inalterati in seguito a piccole, ma casuali, variazioni dei parametri sperimentali (pH, solventi, temperatura, ecc.) del metodo stesso e dà una indicazione della sua affidabilità durante le normali condizioni di utilizzo.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Limite di rilevabilità (Limit of Detection; LoD)

- Viene definito come la più piccola concentrazione o quantità di un analita che dà una risposta significativamente diversa da quella di un bianco, quindi corrisponde al più basso livello di concentrazione dell'analita nel campione in esame che riesce ad essere rilevato, ma non necessariamente determinato quantitativamente, nelle condizioni sperimentali prescritte dal metodo.

Limite di quantificazione (Limit of Quantification)

- Il limite di quantificazione corrisponde alla più bassa concentrazione di un analita in un campione che può essere determinata quantitativamente con accettabile precisione ed accuratezza, nelle condizioni sperimentali prescritte dal metodo.

Intervallo di confidenza

- Intervallo di valori che comprende il valore vero per un dato livello di probabilità. Il livello di probabilità è detto "livello di confidenza".

Limiti di confidenza

I limiti di confidenza sono i valori estremi di un intervallo di confidenza.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Test di idoneità del sistema (SST = System Suitability Test)

- Verifica di idoneità del sistema (strumento, reagenti, elettronica, operazioni e campioni) eseguita prima di un'analisi.

Bianco

- Un bianco corrisponde ad una analisi condotta utilizzando gli stessi reagenti o solventi e le stesse condizioni operative e strumentali, ma in assenza dell'analita da ricercare o quantificare.
- La funzione principale dell'analisi del bianco è quella di verificare che l'analista non ha introdotto contaminazioni durante le manipolazioni richieste dal metodo.
- In alcuni casi si può procedere con la sottrazione del bianco.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Procedura generale di convalida

- Si definisce convalida il processo mediante il quale si stabiliscono le caratteristiche peculiari di un metodo d'analisi e la sua idoneità a soddisfare le esigenze di una determinata applicazione analitica.
- I metodi analitici che devono essere sottoposti a convalida possono essere così riassunti:
 1. Metodi d'analisi per la determinazione quantitativa di materie prime, intermedi e prodotti finiti;
 2. Metodi d'analisi per la determinazione di impurezze o composti di degradazione (metodi quantitativi e/o saggi limite);
 3. Metodi d'analisi per la determinazione dell'identità di un analita all'interno del campione.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

| CARATTERISTICHE ANALITICHE | TITOLO | IMPUREZZE | | IDENTITÀ |
|----------------------------|--------|--------------|---------------|----------|
| | | Quantitativo | Saggio limite | |
| Specificità / Selettività | SI | SI | SI | SI |
| Linearità | SI | SI | NO | NO |
| Accuratezza | SI | SI | NO | NO |
| Precisione (Ripetibilità) | SI | SI | NO | NO |
| Precisione Intermedia | SI (1) | SI (1) | NO | NO |
| Limite di Rilevabilità | NO | NO (2) | SI | NO |
| Limite di Quantificazione | NO | SI | NO | NO |
| Range | SI | SI | NO | NO |

(1): non richiesta se disponibile la Precisione Inter-Laboratorio (Riproducibilità)

(2): richiesta in alcuni casi.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Concetti chiave

- **Standard di riferimento** (Reference Standard)

Sostanza di elevato grado di purezza, a titolo noto, utilizzabile come riferimento ufficiale per i saggi analitici nei quali è espressamente richiesto il loro utilizzo.

- **Sostanze standard** (Standard Substance)

Sostanze di elevato grado di purezza, che vengono utilizzate per l'effettuazione di saggi analitici routinari, ma che presentano impurezze reali o potenziali dei vari prodotti finiti o loro prodotti di degradazione in quantità nota.

- **Establishment Report**

Report firmato dalla PQ di sito che certifica l'idoneità all'uso come standard di riferimento primario del lotto di Reference Standard analizzato presso il CQ.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Documentazione

- Tutti gli standard di riferimento devono essere corredati di certificato di analisi.
1. Acquisto da banche di standard certificati o da fornitori di reagentario:
 - si considera idoneo il certificato fornito con il prodotto stesso, senza ulteriori accertamenti qualitativi. Se non specificato diversamente, si considera il titolo pari al 100 %.
 2. Acquisizione da banche di Standard private:
 - in aggiunta al certificato di analisi, deve essere fornito anche un Testing Standard in cui devono essere riportati la descrizione del prodotto, i test analitici effettuati e i riferimenti ai metodi utilizzati (il prodotto deve essere sottoposto ad una completa caratterizzazione ad es. analisi elementare, spettri NMR e/o MS, identità spettroscopiche IR e/o UV);
 - Deve essere inoltre fornita anche una scheda identificativa in cui siano riportate, oltre alle informazioni di identificazione dello standard stesso, anche le date delle prossime rianalisi del lotto.
 3. Banche dati appartenenti allo stesso gruppo.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Ricevimento e registrazione

- Il controllo dei movimenti di carico e scarico del reagentario degli standard utilizzati nel corso dell'attività analitica del Laboratorio Controllo Qualità è gestito da un denominato "Reagentario ad es.", tramite il quale ogni standard è catalogato e numerato progressivamente.
- Gli standard presenti in reagentario sono elencati nella lista contenuta nella scheda, creata utilizzando le funzioni di generazione di report del programma.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Concetti chiave

Le informazioni elencate nelle schede per gli standard di riferimento sono le seguenti:

- numero identificativo dello standard;
- descrizione dello standard;
- sigla dello standard;
- fornitore;
- codice, ove presente;
- data di arrivo;
- data di scadenza;
- validità del prodotto dopo apertura;
- posizione di stoccaggio;
- condizioni di conservazione.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)



Scheda di qualifica

Per ogni standard viene predisposta una "Scheda di Qualifica" riportante le seguenti informazioni:

- Numero di scheda;
- Nome del prodotto;
- Eventuale sigla;
- Tipo di standard (R.S. o S.S.);
- Purezza;
- Contenuto d'acqua;
- Peso molecolare;
- Fornitore;
- Codice prodotto, se disponibile;
- Numero di lotto del fornitore;

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Scheda di qualifica (segue...)

- Numero di bollettino o certificato di analisi del fornitore (se disponibile);
- Data di produzione, se nota;
- Data di analisi;
- Quantità unitaria iniziale del campione;
- Data di arrivo/consegna;
- Data di scadenza;
- Data apertura confezione;
- Data scadenza dopo apertura confezione;
- Data di sostituzione dello standard e relativa motivazione;

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Scheda di qualifica (segue...)

- Laboratorio di appartenenza e posizione di stoccaggio;
- Condizioni di conservazione;
- Tipo di standard di riferimento primario (R.S., EP, USP, etc.) e relativo numero di lotto utilizzato per la qualifica iniziale, se disponibile;
- Eventuali osservazioni;
- Data e firma del responsabile della gestione degli standard di riferimento;
- Data e firma per approvazione del responsabile di laboratorio CQ.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Concetti chiave

- Il prelievo deve essere effettuato seguendo la logica **FIFO** (First In - First Out), ovvero di ciascuno standard si devono utilizzare per prime le confezioni con Data di arrivo meno recente (contraddistinte, per lo stesso anno di arrivo, dal numero di confezione più basso).
- Il prelievo può anche seguire la logica **FEFO** (First Expired - First Out) ovvero di ciascuno standard si devono utilizzare per prime le confezioni con Data di scadenza più prossima (contraddistinte, per lo stesso anno di arrivo, dal numero di confezione più basso).

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Controllo soluzioni di riferimento cromatografiche

- La corretta preparazione delle soluzioni di riferimento cromatografiche deve essere verificata tramite inserimento, nelle sequenze analitiche, di una seconda preparazione delle stesse soluzioni eseguita da un differente analista, utilizzando se possibile la stessa confezione di reference standard;
- Tale controllo viene effettuato per le metodiche cromatografiche nelle quali la soluzione di riferimento viene utilizzata per la quantificazione degli analiti e specificatamente per ogni sostanza, in essa contenuta, utilizzata per la quantificazione;
- Ogni sequenza infatti contiene una serie di iniezioni di riferimento che svolgono il doppio compito di essere la base di calcolo per il *System Suitability Test* per quanto riguarda la ripetibilità e di essere la base di costruzione della curva di calibrazione che si utilizza per quantificare i campioni iniettati nella stessa sequenza;

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Controllo soluzioni di riferimento cromatografiche (segue....)

- Una volta verificata la corretta preparazione delle soluzioni, queste vengono considerate valide per tutto il periodo di tempo indicato nelle singole metodiche per cui ne è stata dimostrata la stabilità;
- Il principio su cui si basa la verifica è il confronto tra il fattore di risposta medio calcolato per le iniezioni della soluzione di riferimento effettuate per il *System Suitability Test* (SST) ed il fattore di risposta calcolato per l'iniezione di riferimento di controllo;

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Metodiche cromatografiche (caso 1)

- Nel caso di metodiche cromatografiche impiegate per la determinazione del titolo di un analita, viene calcolato il rapporto tra il fattore di risposta medio delle iniezioni di riferimento eseguite per il SST, ottenuto come descritto precedentemente, ed il fattore di risposta dell'iniezione di riferimento di controllo:
 - Se tale rapporto rientra nel range $99 \div 101$, la sequenza analitica viene ritenuta valida.
 - Nel caso contrario, la sequenza viene invalidata e viene ripetuta dopo ripreparazione della soluzione di riferimento e della soluzione di controllo.

Qualifica delle procedure analitiche (ICH Q2A)

Metodiche cromatografiche (caso 2)

- Nel caso di metodiche cromatografiche impiegate per la determinazione delle sostanze correlate, il criterio di valutazione utilizzato nel controllo è legato alle modalità previste nei singoli metodi relativamente alla verifica della stabilità del sistema.
- Il criterio di accettazione per la valutazione della preparazione della soluzione di riferimento è quindi quello riportato sulle singole metodiche nella sezione inerente la verifica della stabilità del sistema.
- Nel caso in cui esso venisse rispettato, la sequenza analitica viene ritenuta valida. Nel caso contrario, la sequenza viene invalidata e viene ripetuta dopo ripreparazione della soluzione di riferimento e della soluzione di controllo.