

DATI PER LA QUALITÀ DEL FARMACO

di Giovanni Boccardi *

Il lavoro di approfondimento svolto all'interno della Associazione Euresis sul tema «[il dato nella ricerca scientifica](#)» sta offrendo molti elementi di riflessione e indicazioni preziose anche per chi deve affrontare il compito dell'educazione scientifica. L'interesse al dato non si limita all'ambito della ricerca ma si estende ad ogni contesto in cui è necessaria un'analisi quantitativa. Come nel caso della farmaceutica.

* Chimico, già ricercatore presso un grande gruppo farmaceutico

Prima di concedere l'autorizzazione all'immissione in commercio di un medicinale l'autorità sanitaria, EMA per le registrazioni in tutta Europa o AIFA per le registrazioni in Italia, deve esaminare un'enormità di dati chimici, tossicologici e clinici, contenuti nel dossier di registrazione sottoposto dall'azienda. Ogni medicinale deve essere efficace per una patologia, ma ha inevitabilmente effetti collaterali e indesiderati, quelli così temuti da chi legge diligentemente il "bugiardino": il compito dell'autorità al momento della registrazione è di valutare se i dati del dossier dimostrano un buon rapporto tra l'efficacia e gli effetti indesiderati. Questa valutazione viene effettuata in primo luogo sui dati clinici e tossicologici, ma una parte importante del dossier contiene i dati relativi alla qualità del medicinale.

Qualità significa che l'efficacia e la sicurezza devono essere garantite in ogni lotto, ma anche in ogni dose destinata a un paziente. Ogni dose contiene la giusta quantità di principio attivo? La sostanza attiva viene rilasciata correttamente? Il medicinale non contiene impurezze tossiche? Qui ci focalizzeremo, tra i tanti, su di un aspetto importante, legato alla natura chimica della sostanza attiva del medicinale: la presenza di impurezze, cioè di sostanze diverse dalla sostanza attiva che derivano dal processo di sintesi o dalla degradazione, e in particolare sulle impurezze della stessa natura chimica del principio attivo, le impurezze organiche.



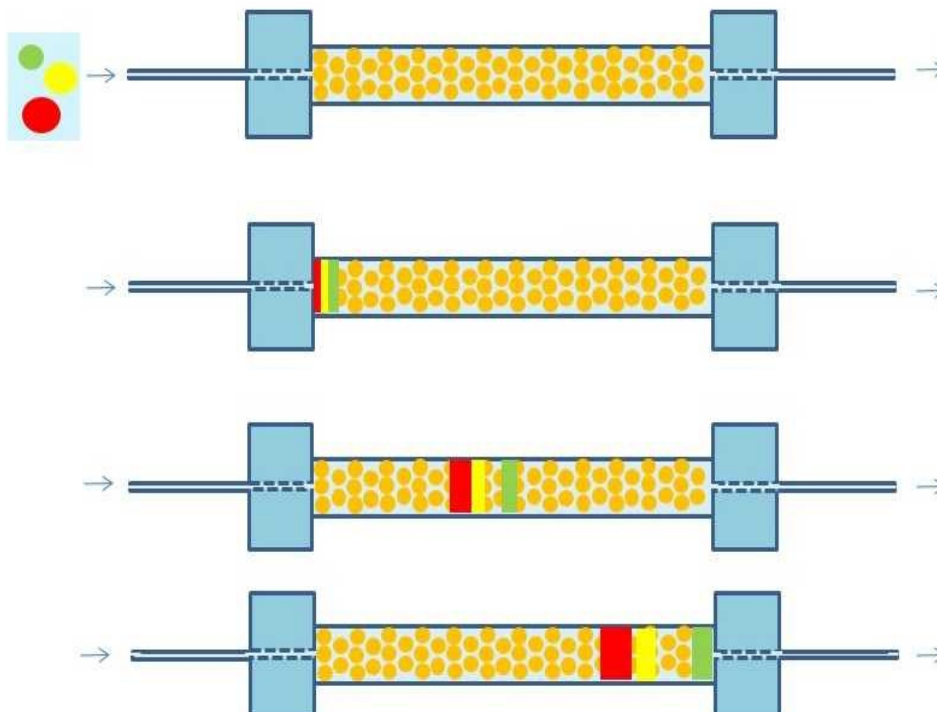
Arkopharma Laboratories, Control Lab, HPLC (Root66)

Un gravissimo caso spiega perché le autorità siano molto attente al tema delle impurezze. Nel 1989 negli Stati Uniti comparve improvvisamente una malattia grave di natura immunitaria, la sindrome eosinofilia-mialgia, il cui bilancio finale fu di 1543 casi, molti con esiti gravi, e 36 morti. I pazienti avevano tutti assunto alte quantità di triptofano come integratore alimentare per curare l'insonnia. La causa non poteva essere il triptofano in sé, che è un amminoacido indispensabile per l'uomo, inoltre si scoprì che il principio attivo di chi si ammalava veniva sempre da un solo produttore e che il fenomeno era insorto dopo un cambiamento della via di sintesi. Fino alla fine degli anni '80 le farmacopee chiedevano per il triptofano «purezza superiore al 98%», cioè un contenuto totale di impurezze non superiore al 2%, trattando quindi tutte le impurezze allo stesso modo e senza alcuna evidenza che questo 2% fosse una reale soglia di sicurezza per la salute del paziente. Approfondendo le indagini si scoprì che i lotti incriminati di triptofano contenevano alcune impurezze a livelli inferiori allo 0,1%, ma responsabili della tossicità anomala. Si capì che criteri come «impurezze totali non superiori al 2%» erano insufficienti a garantire la qualità, perché ogni impurezza è una sostanza con una sua tossicità e che anche quantità molto piccole di impurezze molto tossiche sono pericolose per il paziente.

L'analisi cromatografica

Il primo passo del nostro percorso riguarda il metodo con cui possiamo accorgerci della presenza di impurezze in una sostanza attiva e con cui possiamo quantificarle. La tecnica principale è la cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), che si basa su di un principio semplice (figura 1).

Figura 1 - Come avviene la separazione della miscela nella colonna cromatografica, osservata in quattro istanti successivi. I tre pallini colorati rappresentano tre sostanze che si trovano nella miscela da analizzare. La miscela viene iniettata rapidamente nel solvente che fluisce e tende a trascinare le sostanze verso l'uscita della colonna, ma le sferette di silice rivestite rallentano la corsa adsorbendole in modo reversibile. Come risultato le sostanze fluiscono a una velocità diversa tra di loro sino a che si separano, per poi uscire separatamente dalla colonna.



Una colonna di acciaio è riempita di particelle sferiche di silice di piccolo diametro, per esempio 3 mm, trattate chimicamente alla superficie in modo che adsorbano le sostanze organiche; le particelle sono trattenute all'interno della colonna da due dischi porosi posti alle due estremità. Nella colonna fluisce un liquido, tipicamente costituito da una miscela di un solvente organico e di una soluzione acquosa. La sostanza da analizzare, che contiene la sostanza attiva e le sue impurezze in miscela, viene sciolta a sua volta in un solvente ed iniettata rapidamente in testa alla colonna. Il solvente che attraversa la colonna trascina con sé le sostanze verso l'uscita della colonna, il fatto che le sostanze siano adsorbite sulle sferette di silice trattata non ne arresta il moto, ma lo rallenta in misura diversa secondo la natura chimica di ciascuna di esse, in particolare, per le colonne più comuni, in base ad una proprietà molecolare detta lipofilia. Alla fine le sostanze escono dalla colonna separatamente ed un rivelatore le registra misurando l'assorbimento della luce ultravioletta all'uscita della colonna. Il rivelatore manda il segnale al PC che controlla lo strumento ed alla fine viene prodotto un grafico, detto cromatogramma (come quello in fig. 2): ogni picco rappresenta una specie chimica separata.

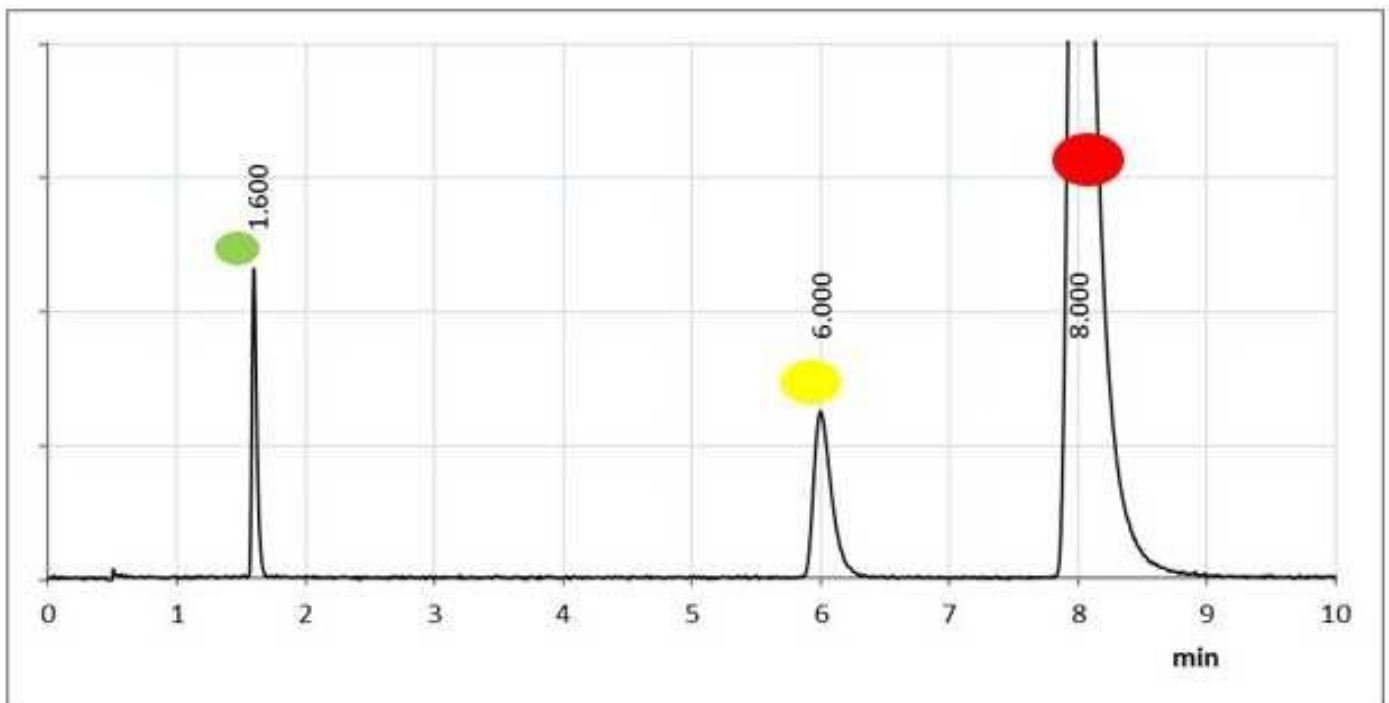


Figura 2 - Il risultato della separazione: un rivelatore misura l'assorbimento di luce UV all'uscita della colonna e "vede" uscire le tre sostanze ciascuna ad un tempo diverso. A ciascuna sostanza corrisponde sul grafico un picco, la cui area è proporzionale alla concentrazione nella miscela. Il tempo 0 è l'istante in cui viene iniettata la miscela. Il picco ad 8.00 min corrisponde alla sostanza attiva ed è fuori scala perché è molto più alto dei due picchi delle impurezze.

Il massimo di intensità del picco corrisponde ad un tempo che viene detto tempo di ritenzione. L'HPLC permette anche di quantificare le sostanze, perché l'area del picco corrispondente ad una sostanza dipende dalla sua concentrazione.

Semplice? Concettualmente sì, ma il cromatografo, l'apparecchio di cui stiamo parlando, è uno strumento sofisticato, che comprende pompe di alta precisione e un sistema di idraulica e di ottica che devono sopportare pressioni fino a 400 bar o, per una versione spinta della tecnica, anche 1000 bar. Inoltre, la tecnologia del riempimento è molto sofisticata, ci sono voluti decenni per imparare a produrre particelle di silice regolari e sferiche di diametro così piccole. Il rivelatore è un piccolo spettrofotometro UV o uno spettrometro di massa, tutto è poi controllato dal PC mediante un'elettronica sofisticata.

La separazione di una miscela richiede poi condizioni adatte: bisogna scegliere la silice con un rivestimento adatto, la composizione del solvente, la temperatura, il flusso del solvente ed altri parametri e proprio in questo lavoro si gioca la professionalità del chimico analitico, che deve mettere in gioco la conoscenza delle proprietà chimiche delle sostanze da separare, la conoscenza dello strumento e della teoria della cromatografia, l'esperienza e l'uso di strumenti statistici come la progettazione degli esperimenti (*Design of Experiments, DoE*).

Il risultato finale dell'analisi è però semplice: osservando il cromatogramma in fig. 3 possiamo dire che la sostanza attiva, a 8.00 min, contiene due impurezze, gli altri due picchi del cromatogramma. Per essere certi che uno dei picchi di impurezze sia l'impurezza X dobbiamo avere un campione dell'impurezza X pura e ottenerne un cromatogramma: il campione di impurezza pura mostrerà un picco ad un tempo di ritenzione, diciamo t_X , se nel cromatogramma ottenuto dalla sostanza attiva c'è un picco di tempo di ritenzione t_X significa che nella sostanza attiva c'è l'impurezza X, di dice che abbiamo identificato la presenza di X per confronto con lo standard X. Se abbiamo stabilito che la sostanza attiva contiene l'impurezza X ci resta la domanda "quanta ce n'è?", o meglio "qual è la percentuale di X nella sostanza attiva?", questa è la parte quantitativa.

Basterà misurare l'area del picco dell'impurezza e l'area del picco del principio attivo e risolvere la semplice proporzione: $A_{att} : A_X = 100 : X$ dove X è l'incognita, la concentrazione percentuale di X nella sostanza attiva. In molti casi le cose sono un po' più complicate, ma approfondire questo discorso ci porterebbe un po' troppo lontano. Un limite della tecnica è che i valori esatti dei tempi di ritenzione variano, seppure di poco, facendo l'analisi in una giornata diversa; quindi possiamo confrontare solo cromatogrammi ottenuti nella stessa giornata.

L'attendibilità dei risultati

L'analista che ha trovato delle condizioni (colonna, solvente, ecc.) per analizzare la sostanza attiva e le sue impurezze, ha trovato quello che chiamiamo «metodo di analisi» e fa parte in genere di un laboratorio di ricerca analitica. Una volta fatto questo lavoro di ricerca il lavoro è più semplice e consiste semplicemente nell'applicazione del metodo trovato.

Il prodotto del metodo di analisi sono dei numeri, la concentrazione di ciascuna impurezza e la capacità di discriminare se un'impurezza è presente o no. Poiché questi risultati ci serviranno per prendere delle decisioni importanti del tipo «la quantità di impurezze di un lotto è accettabile o no» dobbiamo conoscere l'attendibilità dei risultati e rispondere ad alcune domande. La prima domanda è relativa alla specificità del metodo: per esempio, un picco corrisponde ad una sola impurezza o a due che hanno casualmente lo stesso tempo di ritenzione? C'è poi una domanda ovvia: sapendo che qualunque misura è affetta da errori sperimentali, qual è l'incertezza delle misure di concentrazione ottenute dal metodo? Per un metodo analitico per il controllo delle impurezze è importantissimo anche stabilire qual è la concentrazione minima che possiamo rivelare e quantificare. Per rispondere a queste domande si programma una serie di esperimenti, la cosiddetta convalida del metodo analitico, e si analizzano i risultati con un po' di statistica. Le informazioni di questi studi saranno preziose per giudicare la significatività delle misure degli studi successivi e delle applicazioni al controllo qualità, per questo motivo le autorità che esaminano il dossier di registrazione sono molto attente a verificare che sia stata seguita la metodologia corretta e che le conclusioni degli studi di convalida siano valide.

Il caso del triptofano ci insegna però una lezione importante: ogni impurezza ha una sua diversa tossicità, che dipende dalla sua formula di struttura. Perciò le linee guida obbligano poi a conoscere la struttura chimica di tutte le impurezze che supera-

no lo 0,10% della sostanza attiva, cioè una parte di impurezza su 1000 di sostanza attiva. Questa soglia viene considerata importante, grazie ai dati storici, per evitare una tossicità grave dovuta all'impurezza. Il semplice cromatogramma non ci fornisce però informazioni sulla struttura chimica delle sostanze, l'identificazione della struttura chimica avviene isolando le singole impurezze e analizzandole con tecniche come la spettroscopia NMR e la spettrometria di massa; il chimico che svolge questo lavoro opera in laboratori di ricerca e sviluppo. Il dato chimico di questi studi non è un numero, ma è la formula di struttura della sostanza. Le autorità giudicano che un tossicologo sia in grado di prevedere la tossicità sulla base della struttura chimica, ma se il contenuto di un'impurezza supera un'altra soglia (in genere 0,15 %) questa fiducia non basta più e si deve passare a veri e propri studi tossicologici per escludere danni al paziente. Osservando la struttura chimica di un'impurezza il tossicologo può avere il dubbio che possa reagire con il DNA, cioè essere mutagena e potenzialmente cancerogena: se il sospetto viene confermato la soglia ammessa è molto più bassa di quelle di cui abbiamo parlato. Si vede già che il lavoro del chimico analitico si svolge con una collaborazione continua con altri professionisti e non sorprende che tra le qualità del chimico analitico la capacità di comunicazione viene giudicata essenziale.

Conoscere le impurezze

Abbiamo visto la tecnica più usata per analizzare campioni contenenti impurezze, ma dobbiamo fare un passo indietro: come facciamo ad essere sicuri di rivelare tutte le impurezze che potrebbero essere presenti nella sostanza attiva? Abbiamo detto che se vediamo il picco possiamo dedurre che c'è l'impurezza, la presenza del picco è una condizione sufficiente per la presenza dell'impurezza, ma per molti motivi un'impurezza potrebbe sfuggire all'analisi se il metodo analitico non fosse adeguato. Se il contenuto di un'impurezza è elevato in genere è facile anche vederla, ma quando parliamo di analisi di tracce, cioè di percentuali molto basse vale la legge, anche se un po' pessimistica, che troviamo solo quello che cerchiamo. Dobbiamo fare una ricerca sistematica in modo da non escluderne nessuna.

Le impurezze possono avere due origini: possono venire dal processo di sintesi, perché vengono da impurezze delle materie prime di partenza o da reazioni secondarie, oppure possono venire dalla degradazione della sostanza attiva, cioè dalla reazione con acqua (umidità), ossigeno (dall'aria), luce o temperatura troppo alta, tenendo conto che questi fattori agiscono insieme; per queste due vie ci sono due metodi di ricerca diversi. Prenderemo in considerazione solo le impurezze che provengono dalla degradazione, e in particolare dalla reazione della sostanza attiva con l'ossigeno atmosferico, la molecola O₂. Questa reazione è generalmente lentissima (altrimenti il nostro corpo, fatto di sostanze organiche, si ossiderebbe rapidamente!) ed è favorita, si dice catalizzata, dalla presenza di sostanze, dette iniziatori, in concentrazione infima e difficilissima da controllare. Per il medicinale questa è una buona

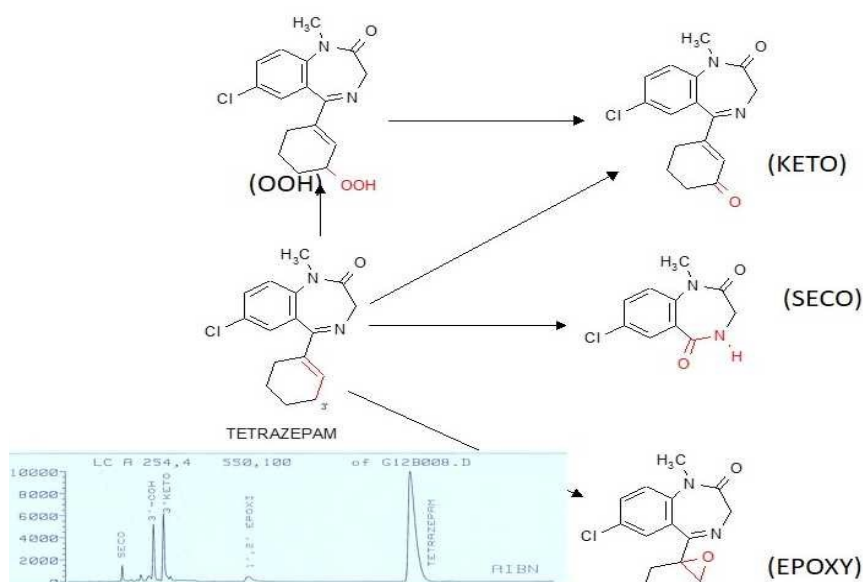


Figura 3 Sotto l'azione dell'ossigeno dell'aria, O₂, e di un iniziatore radicalico (AIBN, azo-isobutirronitrile) il tetrazepam, una sostanza attiva, si trasforma in quattro impurezze nel giro di 48 ore. Nel rettangolo in basso vediamo il cromatogramma della miscela ottenuta dalla reazione.

notizia: alla data di scadenza, 2 o 3 anni dopo la produzione, ci deve essere una quantità di impurezze molto piccola. Ma per l'analista significa che non può aspettare che un'impurezza compaia in un campione tenuto in condizioni normali, sia perché è un tempo troppo lungo, ma deve sapere in anticipo ciò che si potrà formare per la degradazione della sostanza attiva, sia perché - per quello che abbiamo detto - qualcuna potrebbe sfuggire alla nostra analisi. Abbiamo bisogno di fabbricare in poco tempo un campione con quantità importanti di impurezze e che permettano anche di isolarne dei campioni per l'analisi strutturale, che ci fornisce la formula chimica. Per fare questo mettiamo la sostanza attiva in presenza di ossigeno (facile: basta scioglierla ed esporla all'aria) ed aggiungiamo un catalizzatore (un iniziatore radicalico, perché l'ossidazione ha in genere in meccanismo radicalico) che acceleri la reazione per ottenere in un paio di giorni quello che potrebbe altrimenti avvenire in anni. Poi dovremo isolare le impurezze, e questo è il lavoro del chimico organico, per avere finalmente la struttura chimica di ogni impurezza e lo schema delle impurezze che si possono formare dalla nostra sostanza attiva per azione dell'ossigeno. La fig. 3 mostra i risultati di uno studio simile.

Il dato finale di questi studi è uno schema di reazioni, cioè un dato propriamente chimico: ciascun dato non ha un significato isolato, ma serve a conoscere il prodotto e i suoi processi.

Una volta che sono disponibili i dati clinici e che la loro analisi suggerisce che il medicinale può essere usato a vantaggio dei pazienti, e nel frattempo si conoscono bene il prodotto ed i suoi processi di fabbricazione, il medicinale può venire commercializzato dall'azienda, o, vedendo l'altra faccia della medaglia, viene messo a disposizione del mondo sanitario e dei pazienti per trattare le patologie a cui è indirizzato.

Da questa fase in poi entrano in gioco i laboratori chimici del Controllo di Qualità, il dipartimento che ha come scopo tenere sotto controllo la qualità di tutti i prodotti, non solo analizzando il medicinale finito, ma tenendo sotto controllo tutte le materie prime utilizzate ed i vari stadi della produzione, controllando i prodotti intermedi e persino l'ambiente di produzione. Accanto ai laboratori chimici entrano a far parte del Controllo Qualità anche un laboratorio microbiologico, particolarmente importante quando il medicinale deve essere sterile, ed il laboratorio per il controllo la qualità dei materiali di confezionamento. Nella concezione moderna i dati del Controllo Qualità non servono solo a giudicare che se un lotto è conforme o e quindi se può venire rilasciato per la vendita ed il consumo: tutti i dati di tutti i lotti, analizzati con un po' di statistica, ci dicono se il processo di produzione è realmente affidabile o se richiede di essere migliorato.

Diversi metodi analitici

Abbiamo fatto all'inizio del nostro percorso la scelta di concentrarci su di un aspetto critico della qualità, le impurezze della sostanza attiva, e sicuramente le autorità di tutela concentrano in questo aspetto molta attenzione per il significato che può avere sulla salute dei pazienti; ma ci sono altri aspetti molto importanti, come la garanzia che il medicinale contenga la giusta quantità di sostanza attiva e che questo valga per ogni unità farmaceutica, per esempio per ogni compressa o capsula o fiala (uniformità di contenuto), proprietà tutt'altro che scontata quando le dosi della sostanza sono molto basse. Sono importanti anche proprietà chimico-fisiche, tra cui citiamo il polimorfismo della sostanza attiva, che può influenzare la biodisponibilità.

Le sostanze attive di origine biologica o biotecnologica hanno poi degli aspetti critici di qualità particolari: le proteine hanno innanzitutto una struttura tridimensionale che deve rimanere intatta e quindi deve essere controllata. Le molecole biotecnologiche non sono costituite da una sola molecola, ma da diverse molecole (per esempio per

effetto della glicosilazione) che concorrono all'attività farmacologica, il rapporto tra le varie componenti deve però essere costante; inoltre le molecole biotecnologiche sono prodotte da cellule ed è essenziale garantire che eventuali proteine o acidi nucleici della cellula ospite siano sotto limiti bassissimi. La cromatografia è sempre una tecnica importante nell'analitica farmaceutica, ma soprattutto per le molecole biotecnologiche viene affiancata da spettrometria di massa, spettroscopia NMR, elettroforesi capillare e altre tecniche. Ogni metodo analitico messo a punto con qualsiasi tecnica deve essere convalidato come abbiamo detto sopra per dimostrare che è adatto allo scopo per cui viene proposto.

Da ultimo vorremmo ricordare che oggi si usano molto i medicinali generici: quando è scaduto il brevetto un'azienda concorrente può mettere in commercio un prodotto che contiene la stessa sostanza attiva nelle stesse quantità del prodotto di origine. Il vantaggio per il produttore del generico è che non deve fare test clinici, salvo i test di bioequivalenza che servono a dimostrare che il suo prodotto viene assorbito dall'organismo altrettanto bene di quello di origine. Il vantaggio per il paziente e per lo Stato è un prezzo molto ribassato del medicinale, perché vengono risparmiate al produttore le costosissime fasi cliniche. Ma come deve essere la qualità del prodotto generico? Esattamente uguale a quella del prodotto di origine, perché il paziente deve avere a disposizione in ogni caso un prodotto di efficacia e sicurezza costante.

Giovanni Boccardi (Chimico, già ricercatore presso un grande gruppo farmaceutico)