



BENEDETTA PASQUINI, SERENA ORLANDINI, SANDRA FURLANETTO
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA "UGO SCHIFF"
 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE
 BENEDETTA.PASQUINI@UNIFI.IT

QUALITY BY DESIGN IN ANALISI FARMACEUTICA

L'approccio Quality by Design è stato applicato allo sviluppo di un metodo CZE con aggiunta di ciclodestrina per la determinazione della purezza enantiomerica e delle impurezze del farmaco calcimimetico cinacalcet. L'uso combinato di varie tecniche analitiche ha consentito di studiare i meccanismi di separazione e di comprendere le interazioni intermolecolari coinvolte.

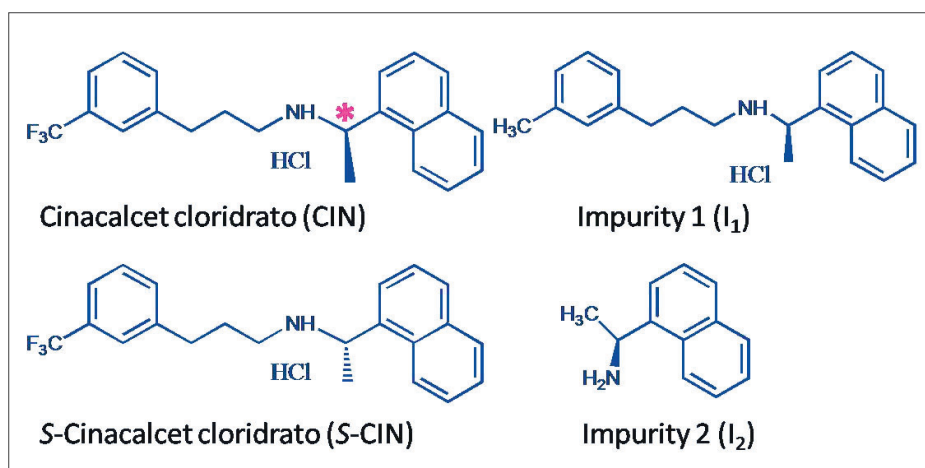


Fig. 1 - Formule di struttura del cinacalcet (CIN) e delle sue impurezze (I₁, I₂, S-CIN)

Il recente sviluppo di composti calcimimetici, capaci di diminuire la secrezione dell'ormone paratiroideo attivando i recettori del calcio, ha fornito una nuova classe di farmaci utile nel trattamento nell'insufficienza renale cronica, dove l'iperparatiroidismo è una complicazione comune. Il cinacalcet cloridrato (CIN), un calcimimetico di tipo II, è il primo agente di questa nuova classe, approvato nel 2004 dalla FDA americana e dall'EMA, e commercializzato in Europa nello stesso anno. CIN presenta un centro chirale e viene commercializzato come singolo enantiomero (*R*), in quanto presenta un'attività farmacologica 75 volte superiore al suo distomero. In questo articolo è illustrato lo sviluppo di un metodo di elettroforesi capillare

(CE) per la determinazione di CIN e delle sue tre potenziali impurezze, I₁, I₂ e l'impurezza enantiomerica S-CIN (Fig. 1), ai fini del controllo di qualità della specialità medicinale. In CE la separazione degli analiti avviene all'interno di un capillare di silice fusa riempito di un tampone, alle cui estremità viene applicato un campo elettrico. Questa tecnica presenta ottime prestazioni ai fini dell'analisi farmaceutica; in particolare, nel campo delle analisi chirali, la CE mostra una maggiore efficienza di separazione, minori consumi di campione e di reagenti e una più vasta varietà di selettori chirali a disposizione rispetto alla cromatografia, dimostrandosi molto più versatile, più eco-compatibile e meno costosa. I selettori chirali più comunemente usati sono le ciclodestrine, oligosaccaridi ciclici di struttura troncoconica, che possono essere utilizzate per separare enantiomeri attraverso la formazione di complessi di inclusione con gli analiti. La modalità operativa CE scelta per l'analisi è stata la CZE (Capillary Zone Electrophoresis) con aggiunta di (2-idrossipropil)- γ -ciclodestrina (HP γ CyD) come selettore chirale e di metanolo come additivo organico. Lo studio è stato comple-

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

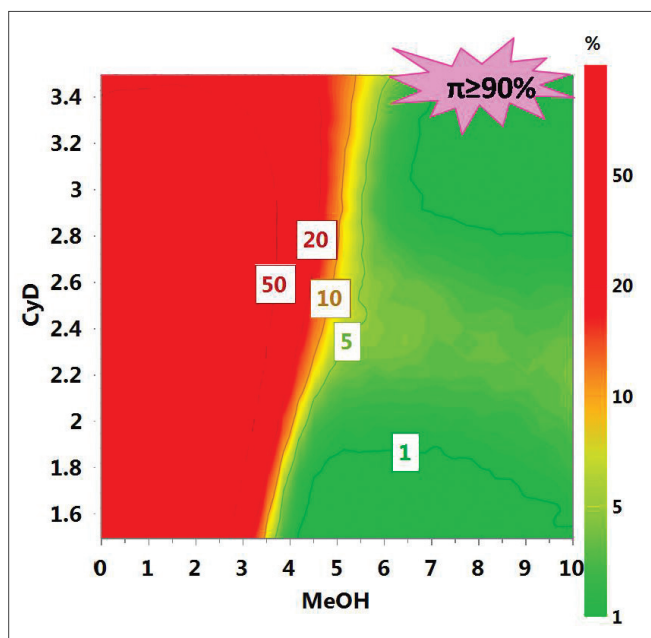


Fig. 2 - Mappa del rischio di fallimento ottenuta a pH 2,70 e differenza di potenziale 27 kV. Il Design Space, in verde, corrisponde ad un rischio di fallimento $\leq 10\%$. CyD, concentrazione di ciclodestrina; MeOH, concentrazione di metanolo

tato dall'utilizzo combinato di altre tecniche analitiche, come Molecular Modeling e spettroscopia NMR, per approfondire la conoscenza dei meccanismi di separazione e delle interazioni intermolecolari implicate nella formazione dei complessi di inclusione.

Quality by Design nello sviluppo del metodo analitico

Il Quality by Design (QbD) è un modello di qualità recentemente introdotto in campo farmaceutico, fortemente raccomandato dalla International Conference on Harmonization (ICH) [1]. L'obiettivo del QbD è una migliore comprensione dei processi e dei prodotti con conseguente miglioramento degli stessi e una maggiore flessibilità dal punto di vista regolatorio. Questa strategia si articola in fasi prestabilite che prevedono l'utilizzo integrato di strumenti, come valutazione dei rischi e strategie chemiometriche, e porta alla definizione del Design Space (DS), uno spazio in cui ogni combinazione dei valori delle variabili assicura la qualità dei processi e dei prodotti. Anche le procedure analitiche possono essere considerate dei processi, per

cui il QbD dovrebbe essere applicato anche nello sviluppo di metodi analitici, che sono componenti fondamentali nel processo globale per l'ottenimento di un prodotto farmaceutico di qualità [2]. Il metodo CZE è stato sviluppato applicando i principi del QbD, permettendo di ottenere importanti vantaggi quali l'esplorazione approfondita del modo in cui i diversi fattori elettroforetici influenzano le prestazioni analitiche e delle interazioni esistenti tra di essi. I parametri critici del metodo (CMP) erano rappresentati da differenza di potenziale applicata, pH del tampone, concentrazione della ciclodestrina e concentrazione di metanolo. Tutti i CMP potevano influenzare la risoluzione tra gli enantiomeri e il tempo di analisi, scelti come risposte per valutare la qualità dell'elettroferogramma. L'effetto dei CMP è stato quindi studiato attraverso la metodologia della superficie di risposta, calcolando un modello matematico che consentisse la predizione della risposta anche in punti all'interno del dominio sperimentale non esplorati. I modelli calcolati, insieme alle simulazioni Monte-Carlo, hanno permesso di giungere alla definizione del DS. Questo è rappresentato in Fig. 2 come la zona colorata in verde, ovvero la regione inclusa nella linea che definisce un rischio

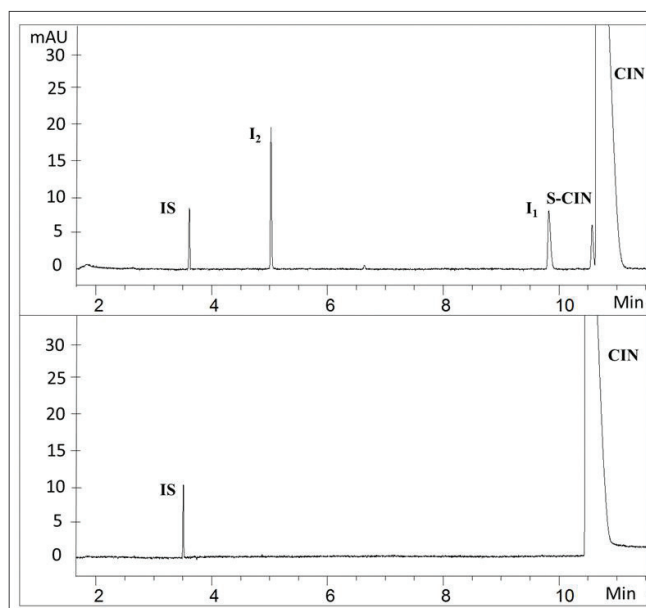


Fig. 3 - Elettroferogramma della soluzione standard e del campione reale nelle condizioni ottimizzate

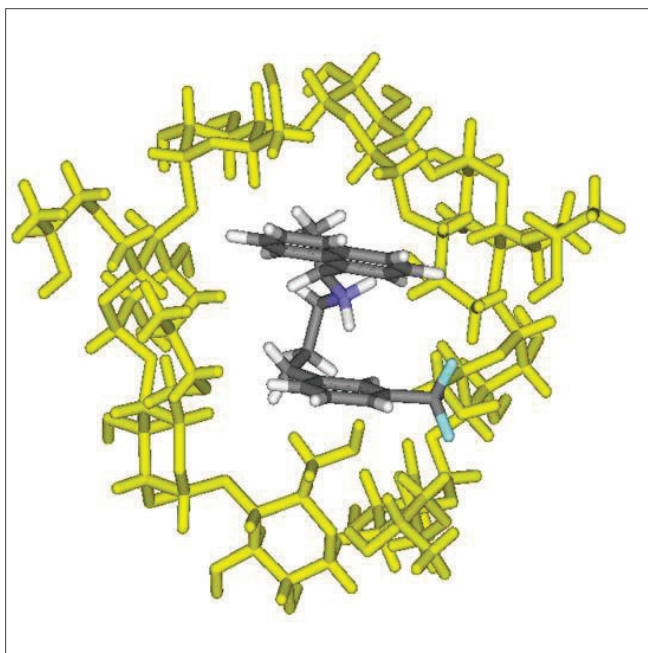


Fig. 4 - Struttura più probabile del complesso di inclusione tra CIN (in grigio) e HPyCyD (in giallo)

di fallimento pari al 10%. All'interno del DS si ha la garanzia di ottenere una risoluzione alla linea di base tra gli enantiomeri CIN e S-CIN (risoluzione $\geq 0,5$) ed un tempo di analisi ridotto (≤ 11 min, Fig. 3) ad un livello di probabilità selezionato pari al 90%. Con l'applicazione di questo approccio innovativo, il metodo analitico non è più definito da un singolo punto nello spazio dei suoi parametri, ma viene identificato da un intervallo di condizioni di lavoro; all'interno del DS tutte le combinazioni dei valori dei parametri critici del metodo possono essere scelte come condizioni operative. In questo caso gli intervalli erano i seguenti: differenza di potenziale 25-29 kV, tampone fosfato pH 2,54-2,86, concentrazione di HPyCyD 3,1-3,5 mM, concentrazione di metanolo 0,00-3,28 v/v%.

Tecniche combinate nello studio dei meccanismi di separazione

Il sistema CZE sviluppato comporta complessi meccanismi di separazione basati sulla diversa mobilità elettroforetica degli analiti e sulla formazione di complessi di inclusione. Con lo scopo di ottenere una migliore comprensione di tali meccanismi e delle interazioni molecolari coinvolte, sono stati

condotti studi di Molecular Modeling e di spettroscopia NMR. Il comportamento degli analiti è stato valutato mediante simulazioni di dinamica molecolare (DM), che hanno riguardato la stabilità dei complessi di inclusione tra CIN e diverse ciclodestrine. La stechiometria del complesso di CIN è stata calcolata sulla base delle variazioni negli spettri ^1H NMR del farmaco in complessi con diversi rapporti molari con ciclodestrina, usando il metodo di variazione continua (Job Plot). Sia le simulazioni di DM che gli studi NMR hanno messo in evidenza la tendenza di CIN ad essere incluso all'interno della cavità di HPyCyD con stechiometria 1:1, formando complessi altamente stabili. Sono state quindi calcolate l'energia di docking, l'energia potenziale e il momento dipolare dei complessi coinvolti nella separazione, mettendo in evidenza le differenti affinità tra molecole *host* (CIN e S-CIN) e *guest* (ciclodestrina). Infine, sono stati effettuati una serie di esperimenti NOESY, che hanno permesso di confermare la struttura più probabile dei complessi stessi, ipotizzata come in Fig. 4. L'uso integrato delle diverse tecniche ha quindi permesso di giustificare il comportamento degli analiti ed il pattern elettroforetico osservato sperimentalmente in CZE.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8(R2) (2009) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- [2] S. Orlandini *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 443.

Quality by Design in Pharmaceutical Analysis

Quality by Design approach has been applied to the development of a cyclodextrin-modified CZE method for the determination of the enantiomeric purity and of the impurities of the calcimimetic drug cinacalcet. The combined use of various analytical techniques has made it possible to investigate the mechanisms of separation and to understand the involved intermolecular interactions.