



Case study Agilent

Intervista: valutare una innovativa strategia di test di identificazione analitica per gli oligonucleotidi

Ci parli della sua azienda.

Vetter è una Organizzazione di sviluppo e produzione a contratto (CDMO, Contract Development and Manufacturing Organization) a conduzione familiare con sede a Ravensburg, in Germania, e impianti di produzione in Germania, Austria e Stati Uniti. L'azienda, che attualmente ha più di 5.700 dipendenti in tutto il mondo, è specializzata in prodotti iniettabili sterili in un'ampia gamma di formati (siringhe, cartucce, vial e sistemi a doppia camera). I servizi principali includono fabbricazione per uso clinico e commerciale, confezionamento secondario e assemblaggio di dispositivi per medicazioni parenterali.

Vetter ha acquisito una profonda esperienza nel supporto ai processi di produzione dei propri clienti del settore biotecnologico e farmaceutico mediante servizi analitici come i test di controllo qualità (QC) per materie in ingresso, processi e prodotti farmaceutici per cui è stato completato il riempimento, gli studi di stabilità e l'analitica di sviluppo.

Maggiori informazioni su Vetter sono disponibili alla pagina vetter-pharma.com.

Quale tipo di lavoro svolge il suo laboratorio?

Il Laboratorio di scienza analitica (ASL, Analytical Science Laboratory) all'interno del Servizio di sviluppo di Vetter (VDS, Vetter's Development Service) è specializzato in analitica a scopo di sviluppo e caratterizzazione dei processi secondo i requisiti di cGMP (current Good Manufacturing Practice, attuale prassi di buona fabbricazione). VDS offre supporto per lo sviluppo dei prodotti dei clienti, specialmente per i processi di produzione o confezionamento.

L'ASL fornisce supporto analitico per lo sviluppo e l'implementazione di processi di produzione e riempimento, per esempio misurando l'umidità residua in studi di liofilizzazione in fase di sviluppo, determinando la concentrazione e la stabilità delle proteine in studi di miscelazione o pompaggio in fase di sviluppo, oppure offrendo supporto per lo sviluppo di processi per la sanificazione di camere bianche con il "Centro di eccellenza per la determinazione dell'H₂O₂" del nostro ASL.



Alexandra Heussner, PhD

Responsabile di laboratorio
Laboratorio di scienza analitica (ASL),
Servizio di sviluppo,
Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG,
Ravensburg, Germania



Melanie Zerulla-Wernitz, Ph.D

Direttore del Laboratorio di scienza analitica
(ASL), Servizio di sviluppo
Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG,
Ravensburg, Germania

Vetter è tra le aziende più esperte nel campo del riempimento di prodotti farmaceutici per uso parenterale, inclusi prodotti oftalmici; una parte notevole delle nostre competenze di laboratorio copre pertanto l'analisi di particelle sub-visibili nel "Centro di eccellenza per il particolato" del nostro ASL.

Inoltre, offriamo supporto per il trasferimento di metodi analitici dai nostri clienti, sia verso Vetter che all'interno di Vetter, tramite studi di fattibilità e qualificazione del laboratorio o validazione della procedura.

Infine, offriamo supporto per l'implementazione nell'intera azienda di nuove procedure e tecnologie analitiche per modernizzare e aggiornare i nostri sistemi analitici e fornire tecnologie all'avanguardia per nuovi prodotti.

Può descrivere alcune delle difficoltà che incontrate?

Gli oligonucleotidi sono una classe emergente di prodotti biofarmaceutici che non dispone di una strategia di riempimento all'avanguardia per l'approvazione del prodotto dal punto di vista delle tecniche analitiche. In quanto CDMO, Vetter ha bisogno di soluzioni analitiche intelligenti per soddisfare le esigenze di molti clienti con molti prodotti differenti. Dobbiamo saper prevedere quale siano i candidati più probabili per sistemi e procedure che soddisfino le future esigenze dei nostri clienti in termini di sviluppo e di produzione commerciale, in modo da essere in grado di offrire i dati analitici essenziali per garantire la sicurezza del paziente e soddisfare i requisiti normativi, a fronte di un ragionevole dispendio di tempo e impegno.

Un'altra difficoltà risiede nel fatto che, negli ambienti cGMP, gli interventi innovativi su sistemi analitici o procedure, oppure gli aggiornamenti dei sistemi, sono impegnativi dal punto di vista normativo e spesso complessi dal punto di vista tecnico. È necessario un approccio completo che includa specialisti di tecnologia analitica, esperti di assicurazione qualità e professionisti di IT. Trovare una soluzione che soddisfi i requisiti di integrità dei dati, consentendo al contempo un uso efficace del sistema analitico senza la perdita di funzioni necessarie, può essere particolarmente problematico. Cerchiamo di prevedere le esigenze future nostre e dei nostri clienti, specialmente per quanto riguarda la conformità alle normative, il prima possibile.

In che modo lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 3500 vi ha aiutato a superare queste difficoltà?

Uno dei nostri attuali progetti mira a ottimizzare l'analitica di prodotti farmaceutici a base di oligonucleotidi. Per esempio, i test standard di conferma dell'identità (ID), come le procedure basate su HPLC o UPLC, tipicamente non riescono a confermare l'identità di questi prodotti.

Vi è la tendenza a usare la temperatura di fusione (T_m , melting temperature) in combinazione con la misurazione della massa intatta, combinando sequenza e massa per ottenere un'identificazione inequivocabile. Sebbene differenti tecniche analitiche siano state attentamente esaminate, questa strategia basata sulla T_m è stata discussa in conferenze specializzate ed è sostenuta da molte aziende farmaceutiche che sviluppano e producono oligonucleotidi.

Per questo approccio, il sistema Cary 3500 UV-Vis offre una tecnologia all'avanguardia. La temperatura può essere configurata accuratamente mediante l'elemento Peltier integrato e controllata mediante le sonde interne alle cuvette. Il design dello strumento multizona con quattro coppie di cuvette consente di misurare campioni e riferimenti in parallelo, impiegando fino a quattro zone di temperatura differenti.

Come mai usate la tecnica UV-Vis come test di identificazione degli oligonucleotidi?

Un obiettivo principale di qualsiasi processo di fabbricazione farmaceutica è garantire che ogni unità prodotta contenga il prodotto farmaceutico designato nella quantità e con la qualità corrette. Ciò si ottiene con processi di fabbricazione di alta qualità e test di QC.

Le attuali prassi di QC nei test di ID includono tecnologie altamente sofisticate come la conferma *de novo* della sequenza mediante sequenziamento MS/MS o l'analisi delle sequenze fallite. Specialmente nel caso di oligonucleotidi a singolo filamento, la misurazione della massa intatta può essere accoppiata a una seconda tecnica sensibile alla sequenza, come pattern di frammentazione MS, T_m o l'analisi NMR, e confrontata con uno standard di riferimento completamente caratterizzato. Per gli oligonucleotidi a doppio filamento, il test di ID può persino essere ridotto a una misurazione della massa intatta accoppiata alla conferma della formazione del doppio filamento, in caso le masse intatte dei singoli filamenti vengano anch'esse misurate prima dell'annealing.¹

Sebbene esistano altre possibilità, siamo convinti che una combinazione delle misurazioni di T_m e massa sia destinata a essere in futuro la strategia analitica standard per i test di ID di QC. Ciò risulta ben fondato sia dal punto di vista scientifico che da quello normativo e imprenditoriale: implementare sistemi e procedure per T_m basati su UV in laboratori di QC è relativamente semplice e ha un basso costo di esercizio.

I metodi sono meno complessi rispetto ad altri approcci, come il sequenziamento MS/MS o la tecnica NMR, ed è spesso disponibile personale specializzato che può essere formato rapidamente sui nuovi strumenti e le nuove procedure, piuttosto che dover assumere esperti altamente specializzati.

Questi strumenti sono anche in grado di svolgere metodi UV-Vis standard, per cui possono essere integrati nella dotazione di strumenti esistente e sono in grado di offrire fin dall'inizio un elevato grado di utilizzazione delle capacità. Noi di Vetter abbiamo implementato ciò con successo sia nell'ASL che nel laboratorio di QC.

Come avete usato la tecnica UV-Vis impiegando il sistema Cary 3500 in un test di identificazione di oligonucleotidi?

Per conoscere in modo approfondito lo strumento e la sua applicazione per la T_m, abbiamo effettuato svariati studi. Un'indagine sulle prestazioni dello strumento utilizzando differenti configurazioni di parametri ha confermato prestazioni molto solide. Questo lavoro è stato discusso con un pubblico esperto ed è descritto nel dettaglio in un recente white paper.²⁻⁴

In un altro studio mirato a determinare la sensibilità delle misurazioni della T_m per i test di ID, abbiamo indagato la specificità della procedura rispetto a varie sequenze di oligonucleotidi. Sequenze modello di oligonucleotidi e varianti sono state progettate, sintetizzate e analizzate: abbiamo riscontrato che anche lo scambio di una singola base oppure delezioni o inserzioni di singoli nucleotidi portano a modifiche significative della T_m misurata dei duplex di oligonucleotidi. La specificità generalmente elevata del metodo nei confronti di lievi cambiamenti delle sequenze di oligonucleotidi ne conferma l'idoneità per i test di ID di oligonucleotidi nell'ambito del QC farmaceutico. Questa procedura è sufficientemente solida e sensibile da soddisfare i requisiti interni come anche quelli imposti dai clienti di Vetter e dagli enti normativi.⁵

Questi e altri studi in corso hanno arricchito l'esperienza di Vetter nel campo degli oligonucleotidi e dell'analitica speciale.

Quanto tempo richiede una misurazione? Presenta difficoltà?

Un'analisi di un campione in un ambiente GMP può richiedere meno di un'ora, a seconda dei parametri scelti. La velocità di rampa di temperatura è cruciale per determinare il tempo necessario. Le nostre opzioni preferite includono una velocità di rampa di temperatura di 10 °C/min, che dà come risultato una misurazione di 10 minuti.

Il sistema UV-Vis Cary 3500 è di per sé facile da usare. Qualsiasi tecnico di laboratorio o ricercatore esperto è in grado di utilizzare il sistema e la procedura dopo una breve formazione.

Può descrivere la vostra esperienza di lavoro con Agilent?

Nella scelta di uno strumento per l'analisi della T_m in ambito di ASL e QC, abbiamo optato per Agilent e siamo stati tra i primi a utilizzare il sistema UV-Vis Cary 3500. Siamo stati inoltre, a quanto ci risulta, i primissimi a utilizzare il software per ambienti regolamentati secondo le linee guida per la conformità alla normativa CFR 21 Parte 11 della FDA.

La nostra esperienza di lavoro con Agilent sul lungo termine è stata positiva. Abbiamo impiegato vari strumenti Agilent per il QC, tra cui sistemi HPLC Agilent, come anche nell'ASL, che impiega il sistema ICP-MS Agilent 7800. Agilent ha dimostrato di essere un partner affidabile e professionale per quanto riguarda assistenza e domande: anche nel caso di problematiche complesse, i tecnici Agilent si sono resi disponibili in poco tempo e hanno offerto un supporto completo.

Cosa pensa che il futuro abbia in serbo per questa tecnologia?

Continueremo a studiare le prestazioni di questo test di ID, in quanto sono emerse nuove opportunità. Il nostro obiettivo è stabilire e validare una procedura per piattaforma analitica basata sulle attuali conoscenze che potrebbe consentire una rapida implementazione di una misurazione di ID, specialmente per nuovi prodotti o clienti che non dispongono di una procedura analitica idonea per il trasferimento dei metodi.

Questo obiettivo include un aggiornamento dei nostri strumenti, che migliorerebbe ulteriormente la precisione dell'analisi dei dati. Abbiamo implementato e qualificato il sistema immediatamente dopo la sua introduzione sul mercato alla fine del 2019 e utilizziamo ancora la prima versione del software, che presenta le caratteristiche necessarie per la normativa CFR 21 Parte 11 in ambienti regolamentati.

Il software aggiornato offre ora nuovi calcoli integrati per l'analisi dei dati, come la funzione di livellamento e miglioramenti della funzione derivata. Tali funzioni possono essere salvate all'interno di un metodo e applicate automaticamente al termine della raccolta dei dati. Attualmente stiamo collaborando con Agilent per valutare come tali funzioni possano essere qualificate a livello di sistema anziché in validazioni di procedura per uno specifico prodotto.

Informazioni sugli autori

La D.ssa Alexandra Heussner è un'esperta scienziata interdisciplinare e responsabile di laboratorio del Servizio di sviluppo di Vetter a Ravensburg, in Germania. La D.ssa Heussner ha contribuito alla nostra comprensione della tossicologia delle tossine naturali e dei prodotti farmaceutici e ha offerto supporto per lo sviluppo e l'implementazione di metodi, integrando scienze biologiche, tecnologia dell'informazione e statistica. Ha conseguito un PhD in scienze applicate presso l'Università di Sunderland, nel Regno Unito, e, dopo molti anni di ricerca accademica, è entrata a far parte di Vetter nel 2016. Attualmente è impegnata in implementazione, sviluppo e validazione di procedure analitiche con il proprio team del Laboratorio di scienza analitica. È membro della Parenteral Drug Association (PDA).

La D.ssa Melanie Zerulla-Wernitz è a capo del Laboratorio di scienza analitica, dove guida un team eterogeneo di scienziati in una combinazione di scienze naturali e applicate. Ha conseguito un PhD in scienze naturali presso l'Università di Costanza, in Germania. Dopo molti anni di sviluppo pre-clinico, La D.ssa. Zerulla-Wernitz è entrata a far parte di Vetter nel 2004. La sua carriera ha avuto inizio nel reparto di controllo qualità ed è proseguita nel Servizio di sviluppo. Con un trasferimento di un anno nel Servizio di sviluppo di Vetter di Chicago, continua a guidare il Laboratorio di scienza analitica adoperandosi per espanderne l'offerta di servizi e soluzioni analitiche.

Bibliografia

1. Capaldi, D. *et al.* Strategies for Identity Testing of Therapeutic Oligonucleotide Drug Substances and Drug Products. *Nucleic Acid Therapeutics* **2020**, 30(5), 249–264. doi: 10.1089/nat.2020.0878.
2. Schuler, S. *et al.* Challenging Oligonucleotide ID Testing. *8th Annual Oligo Networking Event*, 23–25 Mar **2021**.
3. Schuler, S. *et al.* Emerging Therapeutic Oligonucleotides – ID Testing. *PDA UPS Conference*, 05–06 Oct **2021**.
4. Heussner A. H. Emerging Therapeutic Oligonucleotides – Analytical Challenges Accepted. *PDA UPS Conference* 05–06 Oct **2021**.
5. Heussner, A. H. *et al.* Investigating Tm Method Specificity Using Oligonucleotide Sequence Variants. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2022**, (presentato).

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

RA44813.3348032407

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Pubblicato negli Stati Uniti, 30 settembre 2022
5994-5144ITE