



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biotecnologie Avanzate

Convalida di un Metodo Analitico di Cleaning per la
Determinazione dei Residui di Colesterolo su Impianti
Farmaceutici

Relatore:

Prof. Gianni Francesco Guidetti

Correlatrice:

Dott.ssa Alice Collina

Tesi Sperimentale di
Lorenzo Gelosa

Anno Accademico 2024/2025

Indice

1. RIASSUNTO	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 CONVALIDA DI UNA PROCEDURA ANALITICA SECONDO ICH	3
2.2 TEST E METODOLOGIE PER LA CONVALIDA	4
2.2.1 SPECIFICITÀ	4
2.2.2 RANGE	5
2.2.3 LINEARITÀ	5
2.2.4 LIMITE DI RILEVABILITÀ	5
2.2.5 LIMITE DI QUANTIFICAZIONE	5
2.2.6 ACCURATEZZA	5
2.2.7 PRECISIONE	6
2.2.7.1 Ripetibilità	6
2.2.7.2 Precisione Intermedia	6
2.2.7.3 Riproducibilità	7
2.2.8 ROBUSTEZZA	7
2.2.9 SYSTEM SUITABILITY TEST	7
2.3 IL PRODOTTO FARMACEUTICO PTH-425	7
2.3.1 LEIOMIOSARCOMA UTERINO	8
2.4 VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO DI CLEANING	9
2.4.1 TECNICHE DI CAMPIONAMENTO	11
2.4.1.1 Tecnica Swab	11
2.4.1.2 Tecnica Rinse	12
2.5 ORIGINI DELLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA	13
2.5.1 HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	13
3. SCOPO DEL LAVORO	16
4. MATERIALI E METODI	17
4.1 CLEANING VALIDATION MASTER PLAN	17
4.2 UHPLC CON DETECTOR CAD	19
4.3 METODO ANALITICO	21
4.4 PLATFORM METHOD	27
4.4.1 SPECIFICITÀ	27
4.4.2 STABILITÀ DELLE SOLUZIONI	29
4.4.3 LINEARITÀ	30
4.4.4 LIMITE DI QUANTIFICAZIONE	31
4.4.5 RIPETIBILITÀ	32
4.4.6 PRECISIONE INTERMEDIA	33
4.4.7 ACCURATEZZA	34
4.4.8 ROBUSTEZZA	34
4.5 CONVALIDA DEL METODO DI RECUPERO PER LA TECNICA SWAB	35
4.5.1 CALCOLI TECNICA SWAB	37

4.5.2 CRITERI DI ACCETTAZIONE TECNICA SWAB	38
4.6 RECOVERY RATE PER LA TECNICA SWAB	38
4.7 CONVALIDA DEL METODO DI RECUPERO PER LA TECNICA RINSE	39
4.7.1 CALCOLI TECNICA RINSE	40
4.7.2 CRITERI DI ACCETTAZIONE TECNICA SWAB	41
4.8 RECOVERY RATE PER LA TECNICA RINSE	42
4.9 STABILITÀ DELL'ATTIVO SULLE SUPERFICI	42
4.10 STABILITÀ DEI CAMPIONI SULLO SWAB	44
5. <u>RISULTATI</u>	47
5.1 RISULTATI DEI PARAMETRI ANALITICI PER LA CONVALIDA	47
5.1.1 SPECIFICITÀ	47
5.1.2 STABILITÀ DELLE SOLUZIONI	48
5.1.3 LINEARITÀ	49
5.1.4 LIMITE DI QUANTIFICAZIONE	50
5.1.5 RIPETIBILITÀ	52
5.1.6 PRECISIONE INTERMEDIA	53
5.1.7 ACCURATEZZA	54
5.1.8 ROBUSTEZZA	55
5.2 RISULTATI DELLA CONVALIDA DEL METODO DI RECUPERO CON TECNICA SWAB	57
5.3 RISULTATI RECOVERY RATE PER LA TECNICA SWAB	60
5.4 RISULTATI DELLA CONVALIDA DEL METODO DI RECUPERO CON TECNICA RINSE	60
5.5 RISULTATI RECOVERY RATE PER LA TECNICA RINSE	64
5.6 RISULTATI DELLA STABILITÀ DELL'ATTIVO SULLE SUPERFICI	64
5.7 RISULTATI DELLA STABILITÀ DEI CAMPIONI SWAB	68
6. <u>CONCLUSIONI</u>	70
7. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	74

Indice delle Sigle

Sigla	Significato
ACN	<i>Acetonitrile</i>
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredients</i>
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i>
Conc.	<i>Concentrazione</i>
DNA	<i>Deoxy Ribonucleic Acid</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EPDM	<i>Etilene-Propilene-Diene Monomero</i>
EtOH	<i>Etanolo</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IPA	<i>Idrossi Propil Alcol</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectroscopy</i>
LMS	<i>Leiomiosarcoma</i>
LNPs	<i>Lipid Nanoparticles</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
MeOH	<i>Metanolo</i>
MQW	<i>Milli -Q Water</i>
mRNA	<i>messenger -Ribonucleic Acid</i>

Sigla	Significato
N ₂	<i>Azoto (gas)</i>
NH ₄ Ac	<i>Ammonio acetato</i>
PDS	<i>Pharmaceutical Development Services</i>
QC	<i>Quality Control</i>
RCD	<i>Relative Cleaning Difficulty</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SOP	<i>Standard Operating Procedures</i>
SST	<i>System Suitability Test</i>
STD	<i>Standard</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV-Vis	<i>Ultravioletto -Visibile</i>

1. Riassunto

Il progetto descritto nella tesi è stato svolto presso il laboratorio di controllo qualità e sviluppo analitico del reparto PDS (*Pharmaceutical Development Services*) dell'azienda farmaceutica Thermo Fisher Scientific del sito di Monza.

Il farmaco PTH-425 è un vaccino terapeutico antitumorale, composto da due frammenti di mRNA (PTH-01 e PTH-02) incapsulati in nanoparticelle lipidiche (LNPs). Il prodotto farmaceutico viene somministrato mediante infusione intramuscolare ed è progettato per trattare il leiomiomasarcoma uterino (LMS), un tumore maligno la cui diagnosi è resa complicata da sintomi comparabili ai più comuni fibromi benigni.

Allo scopo di valutare l'impatto di un nuovo prodotto farmaceutico sull'impianto, viene redatto un documento volto a valutare le caratteristiche e le proprietà dei suoi singoli componenti, al fine di valutare se i metodi di lavaggio (*cleaning*) validati per la specifica linea produttiva siano in grado di rimuovere qualsiasi residuo del prodotto. La valutazione inclusa nel documento tecnico individua il componente *worst-case* (attivo o eccipiente della formulazione) su cui eseguire la convalida dell'attività di *cleaning*, che nel prodotto farmaceutico PTH-425 viene identificato nel colesterolo costitutivo delle nanoparticelle lipidiche (LNPs).

L'obiettivo della presente tesi è delineare ed esporre i risultati ottenuti dall'attività di convalida del metodo analitico di *cleaning* per la determinazione dei residui di colesterolo su impianti farmaceutici. Le procedure di *cleaning verification*, adottate dal sito produttivo, devono garantire la rimozione di residui indesiderati al di sotto di un determinato livello di concentrazione prestabilito. In questo modo viene ridotto il rischio di cross-contaminazione tra prodotti farmaceutici differenti durante la produzione.

Per il campionamento delle superfici sulla linea produttiva vengono utilizzate due tecniche di campionamento: la tecnica *swab* e la tecnica *rinse*.

Come stabilito dalle linee guida ICH, i parametri analitici da valutare durante l'attività di convalida di un metodo analitico sono: accuratezza, precisione (ripetibilità e precisione intermedia), specificità, limite di quantificazione (LOQ), linearità, range e robustezza. Nell'ambito della convalida di un metodo analitico di *cleaning* è necessario anche verificare e convalidare le tecniche di campionamento (*swab* e/o *rinse* dove applicabile).

La tecnica analitica scelta per la convalida è una tecnica UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) equipaggiata con rilevatore CAD. La tecnica consente di separare e quantificare i residui di colesterolo nelle soluzioni analizzate tramite il cromatogramma ottenuto.

Come riportato nell'elaborato, i risultati ottenuti durante la convalida del metodo analitico di *cleaning* soddisfano i criteri di accettazione stabiliti per tutti i test eseguiti rispettando i requisiti ICH e la procedura viene ritenuta idonea per l'utilizzo GMP nel laboratorio QC PDS presso il sito di Thermo Fisher Scientific di Monza.

2. Introduzione

2.1 Convalida di una Procedura Analitica secondo ICH

L'*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) è un'iniziativa internazionale che ha come principale obiettivo l'armonizzazione dell'interpretazione e dell'applicazione delle linee guida per la valutazione dei farmaci ad uso umano, affinché siano sicuri, efficaci e di alta qualità dallo sviluppo alla manifattura e all'uso.

Il Consiglio viene fondato nel 1990 a Bruxelles dalle associazioni del settore regolatorio di Europa, Giappone e Stati Uniti. In questa prima riunione vengono decisi gli argomenti fondamentali per l'armonizzazione, che vengono suddivisi in Sicurezza (S), Qualità (Q) ed Efficacia (E), ossia i criteri alla base per l'approvazione e l'autorizzazione di nuovi farmaci.

All'interno delle ICH Q2(R2) sono contenute le regole per la selezione e la valutazione dei parametri che sono necessari alla convalida di un metodo analitico. Il documento è condiviso tra i paesi d'Europa, Stati Uniti e Giappone e rappresenta un comune riferimento per le autorità regolatorie internazionali poiché fornisce piena armonizzazione dei parametri scelti ed eseguiti adatti allo scopo previsto.

Gli studi di convalida devono essere concordati con il richiedente e documentati all'interno di un protocollo che contenga le seguenti informazioni: lo scopo della convalida, la descrizione della procedura analitica, i parametri da sfidare e i criteri di accettazione associati.

I risultati ottenuti dallo studio di convalida dovranno essere poi riassunti ed inseriti in un report di validazione che include: conferma della procedura analitica applicata nel corso della convalida, descrizione puntuale del lavoro analitico eseguito, i risultati ottenuti, la conformità ai criteri di accettazione, eventuali deviazioni al protocollo di convalida, conclusioni e chiusura dei lavori. Il *workflow* della convalida di un metodo analitico è rappresentato in Figura 1 [1].

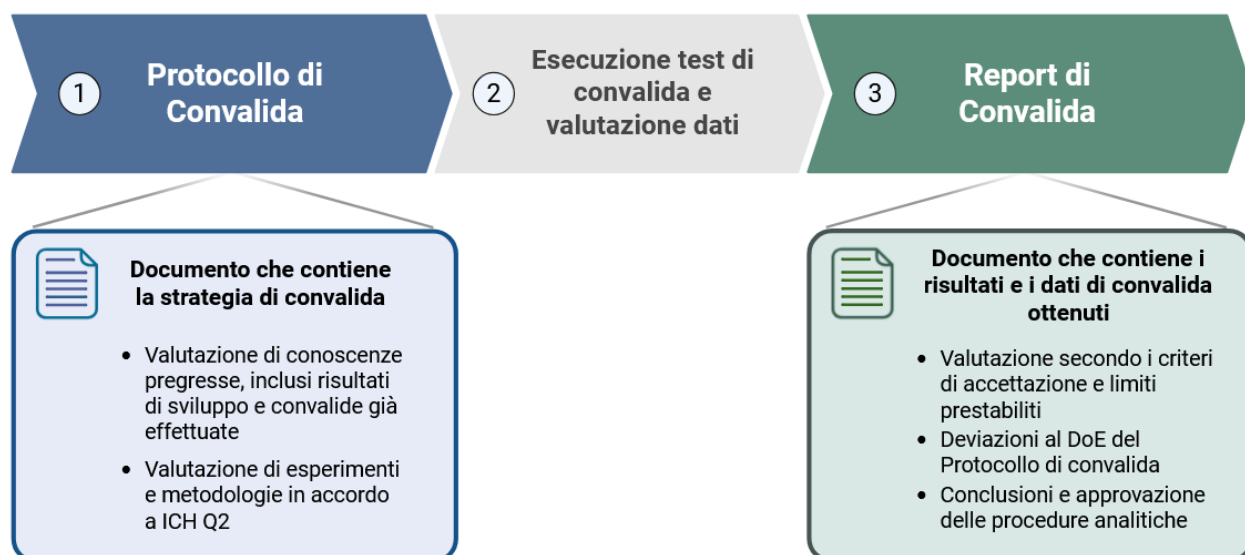


Figura 1 - Flusso di lavoro per la convalida di un metodo analitico secondo ICH

2.2 Test e Metodologie per la Convalida

Le metodologie e gli attributi da sfidare per effettuare la convalida di un metodo analitico sono le seguenti [1]:

- Specificità;
- Range;
- Linearità;
- Limite di Rilevabilità (LOD);
- Limite di Quantificazione (LOQ);
- Accuratezza;
- Precisione:
 1. Ripetibilità;
 2. Riproducibilità;
 3. Precisione Intermedia;
- Robustezza.

2.2.1 Specificità

La specificità è l'abilità di riconoscere inequivocabilmente l'analita in presenza di altri componenti, come impurezze o eccipienti che costituiscono la matrice del campione. Per le separazioni cromatografiche, la specificità viene sfidata confrontando gli spettri di diversi componenti che

contribuiscono alla risposta dell'analita per valutare la possibilità di interferenze con lo spettro dello stesso.

2.2.2 Range

Il range di una procedura analitica è l'intervallo tra la più bassa e la più alta concentrazione di analita all'interno del quale la procedura analitica risulta essere precisa, accurata e lineare.

2.2.3 Linearità

La linearità è l'abilità di ottenere risultati, all'interno di un certo range, che sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita nella soluzione campione. Questa può essere dimostrata utilizzando diluizioni a partire da una soluzione a concentrazione nota di analita oppure attraverso pesate separate dei diversi componenti presenti nel prodotto.

La risposta lineare viene valutata tramite valutazione statistica appropriata, quale il calcolo di una retta di regressione mediante il metodo dei minimi quadrati costruita mettendo in relazione la risposta strumentale (asse delle y) con la concentrazione teorica dell'analita (asse delle x). Oltre all'equazione della retta, in accordo alle ICH Q2(R2), i parametri estrapolati includono il coefficiente di determinazione (R^2), l'intercetta sull'asse y e la pendenza della retta (*slope*, m). Inoltre, si raccomanda l'utilizzo di non meno di cinque livelli di concentrazione che siano opportunamente distribuite nell'intervallo considerato.

2.2.4 Limite di Rilevabilità

Il limite di rilevabilità o LOD (*Limit Of Detection*) è la quantità più bassa di analita che può essere rilevata, non quantificata, da una tecnica analitica.

2.2.5 Limite di Quantificazione

Il limite di quantificazione o LOQ (*Limit Of Quantification*) è la quantità più bassa di analita che può essere quantificata con adeguata precisione e accuratezza. Questo parametro viene utilizzato principalmente per la determinazione di impurezze o prodotti di degradazione.

2.2.6 Accuratezza

L'accuratezza viene dimostrata attraverso il confronto dei risultati misurati (valori sperimentali) e dei risultati attesi (valori teorici), che dovranno avere dei valori simili e ravvicinati. Per effettuare il test e convalidare questo parametro è consigliabile utilizzare soluzioni di analita a concentrazione note, come per esempio standard di riferimento, a cui si aggiungono *spikes* di matrice della soluzione campione al fine di mimare esattamente le condizioni routinarie di recupero quantitativo. I risultati

ottenuti verranno confrontati con quelli teorici attesi per confermare l'accuratezza del metodo analitico.

È necessario utilizzare un numero corretto di determinazioni e livelli di concentrazione che coprano l'intero range, per questo motivo il test viene eseguito a partire da non meno di tre soluzioni *stock* indipendenti, su almeno tre differenti livelli di concentrazione e collettando almeno tre repliche ciascuno. L'accuratezza deve essere riportata come la media percentuale di recupero della quantità nota di analita nel campione rispetto alla quantità ottenuta sperimentalmente, oppure come la differenza tra il valore medio misurato e il valore teorico con un intervallo di confidenza appropriato.

L'accuratezza inoltre può essere dedotta nel caso in cui sono state precedentemente valutate altri parametri analitici come precisione, linearità e specificità.

2.2.7 Precisione

La precisione di una procedura analitica è la vicinanza di una serie di misurazioni, avvenute in condizioni prestabilite, di differenti campionamenti dello stesso campione omogeneo. Nel caso in cui i campioni autentici e omogenei non fossero disponibili, è possibile prepararli artificialmente utilizzando miscele o campioni a cui è stata aggiunta una quantità nota di analita.

Per esprimere correttamente il parametro di precisione dovranno essere valutati la deviazione standard, il coefficiente di variazione e un appropriato intervallo di confidenza di una serie di misurazioni.

La precisione viene valutata in tre differenti livelli: ripetibilità, precisione intermedia e riproducibilità.

2.2.7.1 Ripetibilità

La ripetibilità esprime la precisione presente in misurazioni avvenute in un breve intervallo di tempo alle stesse condizioni operative (stesso giorno, stesso operatore e attrezzatura).

Questo parametro è fondamentale che venga valutato con un minimo di nove determinazioni che coprono l'intero range della procedura analitica (sfida dell'accuratezza) oppure con sei determinazioni al 100% della concentrazione del campione.

2.2.7.2 Precisione Intermedia

La precisione intermedia esprime l'abilità della procedura analitica di ottenere risultati validi a seguito di variazioni interne al laboratorio (giorni diversi, operatori diversi e attrezzature diverse). Le differenze analitiche attuate nell'analisi vengono scelte sulla base dallo sviluppo e dalla valutazione

del rischio della procedura analitica, vengono scelti dunque i fattori che possono influenzare maggiormente il risultato.

Solitamente l'approccio più utilizzato per valutare il parametro della precisione intermedia è quello di confrontare i risultati di due differenti sessioni di ripetibilità e la distribuzione statistica dei due set di dati.

2.2.7.3 Riproducibilità

La riproducibilità esprime la precisione presente tra diversi laboratori. Questo parametro viene richiesto in caso di standardizzazione di procedure analitiche per l'inclusione in farmacopea oppure nel caso in cui la procedura analitica viene condotta su diversi siti.

2.2.8 Robustezza

La robustezza esprime l'affidabilità di una procedura analitica in risposta a determinate variazioni dei parametri analitici (materiali, processi, strumenti o ambienti) che potrebbero influenzare negativamente la procedura. Le fonti di variabilità possono essere identificate da conoscenze pregresse o da valutazione del rischio e vengono scelte tramite strumenti statistici [2].

2.2.9 System Suitability Test

Il *System Suitability Test* (SST) è parte integrante e fondamentale delle procedure analitiche, questo viene condotto analizzando uno o più materiali predefiniti (compresi controlli positivi o negativi) in maniera tale da verificare la correttezza delle proprietà della procedura analitica. Gli elementi dell'SST vengono selezionati mediante una valutazione del rischio e da conoscenze pregresse derivanti da dati di sviluppo.

Il Test di Idoneità del Sistema permette di assicurarsi che prima e/o durante l'analisi lo strumento e la procedura analitica funzionino in maniera corretta rispetto a quanto previsto, per questo motivo l'SST risulta fondamentale rappresentando una mitigazione del rischio. Infine, la validità dei risultati dell'analisi dipende strettamente dall'esito conforme del *System Suitability Test* [2].

2.3 Il Prodotto Farmaceutico PTH-425

Il prodotto farmaceutico soprannominato in questo lavoro di tesi PTH-425 è un vaccino terapeutico composto da due frammenti di mRNA (rispettivamente PTH-01 e PTH-02) incapsulati in nanoparticelle lipidiche (LNPs) destinato all'infusione intramuscolare (IM).

I vaccini a base di LNPs-mRNA risultano essere una alternativa migliore rispetto ai vaccini tradizionali grazie alla loro elevata potenza, sicurezza ed efficacia [3].

Una molecola di mRNA permette di trasferire in maniera efficiente l'informazione genetica contenuta nel DNA, consentendo ai ribosomi, presenti nel citoplasma cellulare, di produrre la proteina desiderata mediante il processo noto come "traduzione proteica".

Dopo la somministrazione, questi frammenti di mRNA sono in grado di codificare, nel paziente, neoantigeni tumorali che vengono riconosciuti come elementi estranei da parte del sistema immunitario. I neoantigeni (antigeni neoplastici) sono antigeni (frammenti proteici cellulari di superficie) mutati espressi esclusivamente dalle cellule tumorali e vengono identificati tramite tecniche di sequenziamento e bioinformatica. Questi antigeni sono altamente specifici per ciascun individuo e la localizzazione permette lo sviluppo di un trattamento oncologico personalizzato e preciso: se riconosciuti infatti dai linfociti T, questi si attivano e inducono una reazione infiammatoria contro le cellule tumorali, che producono i medesimi antigeni codificati dai frammenti PTH-01 e PTH-02. L'effetto farmacologico atteso è dunque un potenziamento della risposta immunitaria, ed insieme una maggiore ritenzione, grazie alla capacità dei sistemi di dimensioni nano-particellari di essere trattenuti dalla rete dei vasi sanguigni.

Questi sistemi sono ancora in fase di valutazione clinica poiché la loro principale limitazione è dovuta ai meccanismi di evasione immunitaria delle cellule tumorali che non permettono l'effetto citotossico atteso. Una comprensione più approfondita di questi meccanismi contribuirà allo sviluppo di prodotti terapeutici più efficaci. [4]

2.3.1 Leiomiosarcoma Uterino

Il leiomiosarcoma uterino (LMS) è un tumore maligno raro e molto aggressivo che colpisce soprattutto donne in età premenopausale. La diagnosi di questo tumore è difficoltosa poiché imita i sintomi di un tumore benigno uterino; per questo motivo solitamente l'individuazione avviene in maniera accidentale durante analisi di routine o analisi di tessuti asportati, come sarcomi uterini [5].

I fibromi uterini sono i più comuni tumori benigni genitali nelle donne; circa 20–50% delle donne in età riproduttiva ha fibromi uterini e, dal momento che possono rivelarsi asintomatici, studi più ampi stimano che circa il 70% della popolazione femminile globale possa sviluppare un fibroma uterino nel corso della propria vita. La patogenesi ad oggi non è stata ancora totalmente compresa, le cause principali sono l'utilizzo di terapie farmacologiche e interventi di radiologia preventiva. I sintomi più comuni sono un eccessivo sanguinamento uterino, dolore pelvico e minzione frequente. I trattamenti per questo tumore benigno sono molteplici e il più comune è la morcellazione, ossia una tecnica chirurgica in cui l'utero viene frammentato in tessuti di dimensione minore per poterlo rimuovere attraverso piccole incisioni addominali meno invasive. Nel 2014 la *Food and Drug Administration*

(FDA) ha lanciato un allarme e richiesto maggiore attenzione nell'utilizzo di questa tecnica poiché pur essendo efficace per la rimozione dei fibromi uterini, può comportare un rischio nei casi di leiomiosarcoma uterino (LMS) non diagnosticato. In questi casi, l'uso della morcellazione comporta una disseminazione di cellule tumorali nell'addome, con conseguente peggioramento della prognosi [5].

2.4 Validazione di un Metodo analitico di Cleaning

Il processo di *cleaning* di un impianto farmaceutico permette di evitare il rischio di cross-contaminazione che può avvenire durante la manifattura, dato che sulla stessa linea produttiva possono susseguirsi diversi farmaci con eccipienti e principi attivi differenti [6]. Questa attività include lo sviluppo di una tecnica analitica il cui scopo è garantire la quantificazione di tracce di prodotto farmaceutico o eccipienti (se a bassa solubilità) considerati critici sulla base delle tecniche di lavaggio e pulizia validate della linea di produzione. Le procedure di *cleaning* sono fondamentali per confermare che i residui di materiali sulle linee di produzione vengano rimossi (o comunque al di sotto di un livello minimo accettabile) al fine di minimizzare fenomeni di contaminazione che possano essere un rischio per l'attività dell'API (*Active Pharmaceutical Ingredient*) e la qualità del Prodotto finito, comportando sia un rischio *business* per il sito produttivo e, in ultimo, la salute del paziente.

Tra gli scopi della validazione di un metodo di *cleaning* vi è garantire la conformità alle normative standard e federali, in modo da individuare e correggere potenziali problemi che potrebbero compromettere la sicurezza, l'efficacia e la qualità dei prodotti farmaceutici che entrano con le attrezzature della linea produttiva.

La convalida delle procedure di *cleaning* deve riflettere le modalità di utilizzo delle linee produttive, dunque se diversi API o intermedi vengono prodotti sulla stessa linea è possibile selezionare solo uno di questi (approccio *worst-case*) che sarà quello scelto per la convalida di *cleaning*. La selezione si basa sulla solubilità e sulla difficoltà di pulizia del residuo di prodotto farmaceutico.

Per eseguire correttamente il processo di convalida di un metodo di *cleaning* è necessario rispettare i seguenti passaggi:

- a. Raccolta preliminare di informazioni: vengono raccolti dati riguardanti il prodotto e le attrezzature (materiale e dimensioni superficiali) da campionare, in maniera tale da definire precisamente la concentrazione di prodotto che deve essere misurata. Queste informazioni vengono fornite tramite un *Technical Assesment*, emesso da dipartimenti dedicati dell'azienda.

- b. Sviluppo e ottimizzazione del metodo analitico: fase finalizzata a verificare che ogni limite impostato sia adeguato, che la tecnica analitica sia la migliore per la misurazione del prodotto e che i risultati ottenuti nelle condizioni previste (*worst-case*) siano conformi. [6]
- c. Convalida del metodo analitico: attività eseguita secondo ICH e SOP (*Standard Operating Procedures*) aziendali.
- d. Mantenimento della validazione: le procedure di *cleaning* devono essere monitorate ed eseguite a intervalli di tempo adeguati affinché rimangano efficaci durante la produzione di routine. Viene richiesta inoltre una continua revisione di tutta la documentazione relativa alla procedura per assicurarsi che non ci siano modifiche, cambiamenti di processo produttivi o di procedure operative standard (SOP).

Il protocollo di convalida di *cleaning* deve contenere le seguenti informazioni:

- Apparecchiature da pulire;
- Procedure di pulizia;
- Modalità di raccolta;
- Materiali;
- Livelli di pulizia accettabili.

Se sostenibile, i componenti a diretto contatto con il prodotto sono usa e getta (*single use* o *disposable*) per minimizzare il rischio di contaminazione; per essi, non è quindi richiesta la convalida di un metodo analitico di *cleaning*. Esistono inoltre superfici a contatto indiretto con il prodotto, che vengono classificate in due categorie: *High Probability Equipment Surfaces*, ossia porzioni di attrezzature situate in prossimità dell'esposizione con il prodotto e soggette ad una elevata probabilità di cross-contaminazione, e *Low Probability Equipment Surfaces*, che si trovano anch'esse vicino all'area di esposizione con il prodotto farmaceutico ma in posizioni in cui la probabilità di contaminazione è inferiore. Per entrambe queste categorie di superfici indirettamente a contatto con il prodotto, è necessario effettuare una valutazione del rischio al fine di determinare l'eventuale necessità di convalidare un metodo di *cleaning* adeguato. Se non è possibile convalidare un metodo per la superficie a contatto indiretto, sarà necessario optare per componenti *disposable* come per quelli a contatto diretto.

I metodi analitici utilizzati per convalida dei protocolli di *cleaning* devono avere una sensibilità adeguata a rilevare residui o contaminanti, per questo motivo il limite di rilevabilità di ciascun metodo deve essere sufficientemente basso da rilevare il livello accettabile di residuo stabilito.

Infine per validare un metodo di *cleaning* è fondamentale la valutazione dell'*impact assesment*, ossia la valutazione dei requisiti di convalida, la verifica della linea produttiva in cui verrà eseguita l'attività di *cleaning* e il calcolo dei limiti da applicare e le superfici di campionamento.

2.4.1 Tecniche di Campionamento

I metodi di campionamento devono essere in grado di misurare quantitativamente i livelli di residui rimasti sulle superfici delle apparecchiature dopo la pulizia. Per questo motivo la tecnica di campionamento da adottare deve essere quella che garantisce il più elevato *recovery rate*, ossia il fattore di correzione che indica la percentuale di prodotto recuperabile su una superficie di uno specifico materiale.

Ulteriori criteri di selezione delle tecniche di campionamento includono la facilità di applicazione sull'impianto, il rischio di contaminazione della superficie durante il campionamento e l'efficacia della tecnica in base all'accessibilità e alla locazione del punto di campionamento.

Prima della quantificazione del principio attivo o intermedio del prodotto farmaceutico sulle apparecchiature sarà necessario svolgere un'ispezione visiva e olfattiva del sito. Si tratta di un criterio di valutazione che prende in considerazione le condizioni generali dell'impianto e dipende dal giudizio dell'operatore.

L'ispezione visiva e olfattiva infatti consente di individuare evidenti contaminazioni che sono concentrate in piccole zone, che però potrebbero non essere rilevate dal campionamento e successivamente dall'analisi. Per procedere all'attività di campionamento, nessun residuo di principio attivo e nessun aroma devono essere rilevati sulle attrezzature sottoposte ad ispezione.

2.4.1.1 Tecnica Swab

Il campionamento tramite la tecnica *swab* viene utilizzato solitamente su superfici accessibili e facilmente raggiungibili con il tampone, che consiste in un piccolo bastoncino di plastica con all'estremità una porzione di tela. Questa estremità viene inizialmente inumidita in un solvente idoneo e successivamente strofinata sulla superficie di prelievo seguendo un determinato schema. Entrambi i lati dello *swab* vengono passati orizzontalmente e verticalmente un numero di volte consono per coprire l'intera area di prelievo, l'ultimo movimento è essenziale che venga fatto perpendicolarmente rispetto ai precedenti in maniera tale da raccogliere l'accumulo di contaminante formatosi.

Una volta terminato il campionamento sull'attrezzatura lo *swab* verrà introdotto in una provetta in cui si aggiungerà un solvente in grado di estrarre il principio attivo dalla porzione di tela. Durante l'analisi si determina la concentrazione della soluzione ottenuta e la si rapporta a quella di una

soluzione standard a concentrazione nota, in modo tale da calcolare il fattore di *recovery rate* ottenuto dal campionamento.

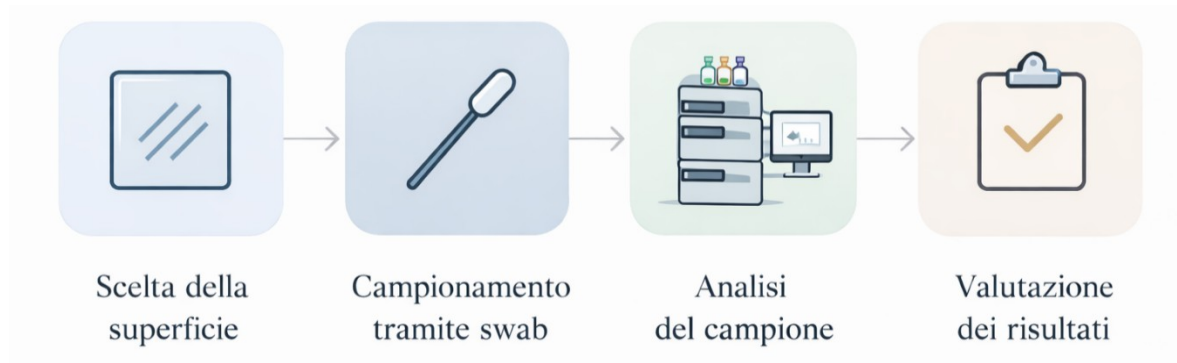


Figura 2 - Attività di campionamento mediante tecnica swab

2.4.1.2 Tecnica Rinse

La tecnica *rinse* è un metodo indiretto che viene solitamente scelto per campionare una superficie più ampia e difficilmente raggiungibile (per esempio grossi *tanks* di contenimento, tubazioni, valvole, snodi dell'impianto). In questa tecnica viene utilizzato un solvente che è in grado di solubilizzare il contaminante scelto in maniera tale che, una volta riversato sulla superficie di campionamento, questo possa rimuovere eventuali residui di prodotto. La stessa aliquota di solvente (che diventa la soluzione campione *rinse*) verrà raccolta e analizzata. Il volume di solvente da utilizzare viene individuato in base al valore di *recovery rate* e corrisponde solitamente al minor volume possibile associato alla più alta *recovery*.

I principali svantaggi includono la scelta di un solvente idoneo adeguato all'uso nei reparti produttivi (l'attività di *cleaning* deve essere meno invasiva possibile) ma in cui i residui di prodotto farmaceutico siano solubili e la possibilità che tali residui rimangano occlusi nell'attrezzatura [7].

Il campionamento, inoltre, va eseguito nella maniera più precisa e accurata possibile, in particolare nelle porzioni di attrezzatura difficili da campionare, in modo da evitare eventuali contaminazioni dovute al solvente.

2.4.2 Tecniche Analitiche

La scelta della tecnica analitica da utilizzare viene decisa sulla base di diversi fattori, come la tipologia di prodotto da recuperare, il tipo di campionamento e la rilevabilità delle concentrazioni limite dei contaminanti.

Per la validazione di un metodo di *cleaning* solitamente vengono scelte le seguenti tipologie di tecniche:

- Tecniche analitiche specifiche: sono metodi in grado di individuare una specifica molecola in maniera precisa, eliminando eventuali interferenze. Si distinguono in tecniche specifiche cromatografiche, come L'*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) o *Gas Chromatography* (GC), e in tecniche specifiche non cromatografiche, come la spettroscopia UV-Vis o *Atomic Absorption* (AA). Vengono preferite le tecniche di separazione cromatografica poiché modificando alcuni parametri, come ad esempio le condizioni della colonna in HPLC, è possibile andare ad isolare accuratamente il residuo bersaglio.
- Tecniche analitiche non specifiche: misurano un valore di *recovery* totale risultante dal contributo di diverse specie chimiche, queste tecniche quindi non individuano la quantità di contaminante prestabilito. Esempi di tecniche non specifiche sono la conducibilità e il Carbonio Organico Totale (TOC). Questi metodi forniscono una misura complessiva e non danno informazioni sulla natura chimica della fonte di conducibilità o di carbonio organico. La scelta di questa tipologia di metodi analitici non intacca in alcun modo l'accuratezza dell'analisi, dato che il metodo analitico convalidato è dedicato e studiato su un determinato prodotto [8].

2.5 Origini della Cromatografia Liquida

All'inizio del '900 la principale tecnica di cromatografia liquida era composta da un cilindro di vetro riempito con una polvere finemente suddivisa, come il gesso, in cui veniva versato il campione unito ad un solvente alla sommità del cilindro. Per gravità il solvente era in grado di scorrere attraverso la polvere e ciò permetteva la separazione dei componenti del campione che si muovevano a velocità differenti, in base alla loro natura. Le varie porzioni di solvente e componenti in uscita dalla colonna venivano raccolte e, dopo evaporazione del solvente, era possibile analizzare i composti separati. Gli svantaggi di questa tecnica sono che per ogni campione era necessario utilizzare una nuova colonna e l'intero processo viene eseguito manualmente.

2.5.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

L'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è una tecnica analitica sviluppatasi alla fine degli anni '60 e rappresenta il culmine moderno dello sviluppo della cromatografia liquida. La maggior parte dei meccanismi sono automatizzati, tranne il posizionamento dei campioni.

I principali componenti strutturali e funzionali di un sistema HPLC sono:

- Fasi mobili: sono generalmente una miscela di uno o più solventi che dovranno essere privi di impurità per non inficiare le analisi. Le separazioni con HPLC possono essere eseguite con eluizioni isocratiche, usando un eluente la cui composizione non varia durante l'analisi, oppure con un'eluizione a gradiente, in cui la natura dell'eluente varia durante l'analisi.
- Pompa con valvola mixer: è capace di prelevare le fasi mobili, miscelarle in accordo al programma impostato all'interno della ricetta strumentale e spingerle all'interno della colonna cromatografica. Le pompe moderne forniscono una elevata pressione e un flusso di solvente preciso senza pulsazioni.
- Autocampionatore: alloggiamento a temperatura controllata dei tubi da saggio che contengono la soluzione campione.
- Sistema di iniezione: ago calibrato/siringa in grado di prelevare il campione presente in una vial nel vassoio ed introdurre un determinato volume nel flusso della fase mobile.
- Colonna cromatografica: contiene la fase stazionaria ed è responsabile della separazione dei composti. Le colonne possono avere lunghezze e diametro interno o gruppi funzionali (impaccamento) differenti in base alle esigenze analitiche. La colonna cromatografica viene alloggiata in uno specifico comparto a temperatura controllata.
- Rilevatore (*Detector*): identifica e misura i composti separati all'uscita della colonna. I rilevatori più utilizzati sono quelli ad assorbimento UV-Vis, a fluorescenza o a indice di rifrazione.
- Software di programmazione ed elaborazione dati: è la componente informatica del sistema; permette all'operatore di fornire qualsiasi input strumentale ed elabora il segnale del rilevatore generando un grafico (il cromatogramma) che mette in relazione il segnale con il tempo di analisi (tempo di ritenzione).
- Scarico: poiché l'HPLC è un sistema idraulico a flusso continuo, la fase mobile che trasporta il campione, dopo aver attraversato il *detector*, viene convogliata verso una linea di scarico. Qui i solventi e i campioni vengono raccolti in un apposito contenitore di rifiuto, che permette uno smaltimento sicuro.

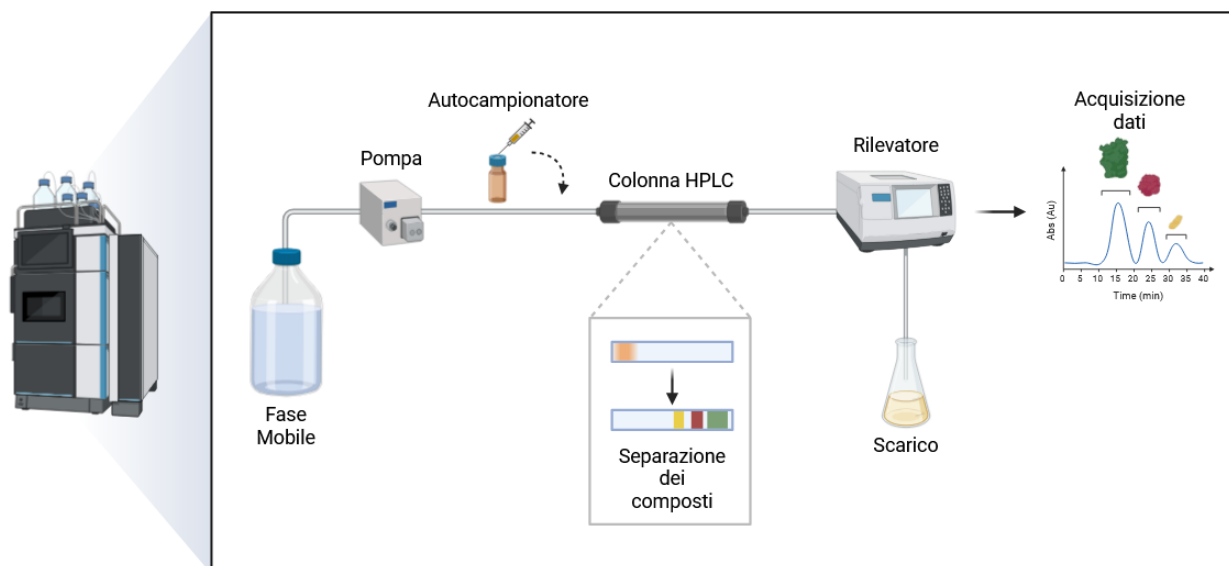


Figura 3 - Componenti della tecnica HPLC e Cromatogramma

L'utente avvia l'analisi posizionando i campioni su un vassoio per l'iniezione automatica in colonna, nel mentre il solvente (fase mobile) viene continuamente pompato attraverso la colonna (fase stazionaria) insieme ai composti che una volta separati ed usciti dalla colonna verranno raccolti da un rivelatore. Il segnale generato da questo rivelatore permette di ottenere un cromatogramma, dove verranno mostrati diversi picchi che corrispondono ai diversi componenti del campione analizzato in funzione del tempo di eluizione. La tecnica HPLC consente di analizzare più campioni in una stessa sessione analitica, fornisce risultati precisi e riproducibili ed infine grazie ad una elevata pressione sostenuta dalle pompe permette una veloce separazione [9].

La tecnica HPLC trova ampia applicazione in campo farmaceutico, dove assume un ruolo cruciale nelle fasi di scoperta di nuove molecole, per identificare ed isolare potenziali farmaci candidati e per determinare la stabilità di questi. Inoltre, questa tecnica è molto utilizzata nelle fasi di controllo di qualità dei farmaci in ambito industriale, dato che è possibile identificare e analizzare la purezza del campione, identificare le impurezze e determinarne la concentrazione.

3. Scopo del Lavoro

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso il laboratorio di controllo qualità e sviluppo analitico del reparto PDS (*Pharmaceutical Development Services*) dell'azienda farmaceutica Thermo Fisher Scientific, sito di manifattura di Monza.

Lo scopo della tesi è convalidare un metodo analitico di *cleaning* per determinare la quantità dei residui di colesterolo presente sulle attrezzature della linea produttiva del reparto PDS al termine della manifattura del prodotto farmaceutico PTH-425.

All'inizio della manifattura di un nuovo farmaco sulle linee produttive, viene redatto il documento *Cleaning Validation Master Plan*. In questo documento vengono valutate le caratteristiche e le proprietà dei componenti del farmaco, in modo tale da trovare l'elemento *worst-case* su cui eseguire la convalida dell'attività di *cleaning*.

Le procedure di *cleaning* nell'impianto sono essenziali per ridurre il rischio di cross-contaminazione dei prodotti farmaceutici che vengono manifatturati a valle del prodotto identificato come *worst-case* di reparto.

Il farmaco PTH-425 è un vaccino antitumorale, composto da due frammenti di mRNA (PTH-01 e PTH-02) incapsulati in nanoparticelle lipidiche (LNPs). Come elemento *worst-case* per l'attività di *cleaning* viene selezionato il lipide colesterolo.

La convalida di un metodo analitico ha lo scopo di verificare che le prestazioni della procedura analitica siano conformi e rispettino i requisiti richiesti per le applicazioni previste, in modo da assicurarsi la qualità del farmaco.

La tecnica analitica utilizzata per convalidare il metodo di *cleaning* è una tecnica UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*), una tecnica cromatografica su fase liquida ad alte prestazioni capace di tollerare pressioni maggiori rispetto alla comune HPLC, equipaggiato con un particolare rilevatore CAD. Questa tecnica tramite separazione cromatografica permette di rilevare i residui di colesterolo presenti nelle soluzioni analizzate. Dall'analisi HPLC si ricava un cromatogramma, da cui è possibile valutare la presenza e la concentrazione del lipide. Tutti i risultati ottenuti dalle diverse analisi devono soddisfare i criteri di accettazione stabiliti precedentemente all'interno del protocollo di convalida.

4. Materiali e Metodi

4.1 Cleaning Validation Master Plan

Il *Cleaning Validation Master Plan* è il documento che descrive i criteri per la valutazione della procedura di *cleaning* eseguita negli impianti del dipartimento PDS del sito di Thermo Fisher Scientific di Monza.

Quando un prodotto farmaceutico presenta diversi principi attivi, è possibile individuare dei limiti specifici per ogni principio attivo e verificare il processo di *cleaning*. Un altro approccio utilizzato è quello di identificare uno dei principi attivi ed utilizzarlo come marcatore di riferimento, è fondamentale che questo risulti essere l'elemento peggiorativo della formulazione (elemento *worst-case*).

Per definire l'elemento *worst-case* viene eseguita una valutazione delle caratteristiche dei costituenti del prodotto, andando a considerare le seguenti proprietà:

- Solubilità
- Colore della Formulazione
- Tossicità (*potency*)
- Concentrazione

Ad ognuna di queste caratteristiche viene attribuito un fattore numerico, che viene moltiplicato in modo da ottenere il valore di *Relative Cleaning Difficulty* (RCD). Il componente con il risultato di RCD più alto sarà utilizzato come marcatore di riferimento del prodotto per l'attività di *cleaning*.

Per l'identificazione dell'elemento *worst-case* presente nel prodotto PTH-425 vengono valutati solo la solubilità e la concentrazione poiché la *potency* e la colorazione della formulazione sono proprietà comuni all'intero prodotto farmaceutico e non variano nei diversi componenti.

Nella Tabella 1 vengono riportate le caratteristiche dei vari componenti presenti nella formulazione del prodotto PTH-425.

Tabella 1 - Determinazione elementi worst-case di PTH-425

Componente	Solubilità (mL/g)		Concentrazione% (w/w)		RCD
DSPC	>10000	5	0.06 %	1	5
Colesterolo	>10000	5	0.12 %	1	5
DMG-PEG200	>10000	5	0.05 %	1	5
SM-102	>10000	5	0.29 %	1	5
PTH-01	100	2	0.01 %	1	2
PTH-02	100	2	0.01 %	1	2

Sulla base dei valori RCD ottenuti, vengono selezionati i quattro lipidi presenti nella formulazione per la convalida del metodo analitico di *cleaning*. I componenti mRNA invece, hanno un valore RCD basso e possono essere definiti non critici per l'attività di *cleaning* poiché sono facilmente degradabili quando non sono combinati con le nanoparticelle lipidiche.

Tra i diversi lipidi contenuti nel prodotto PTH-425, viene individuato il colesterolo come marcatore di riferimento per verificare l'efficacia della procedura di *cleaning*. Il colesterolo viene selezionato considerando il valore RCD, la concentrazione nella formulazione e la natura idrofobica e non ionizzabile, che sono caratteristiche che lo rendono l'elemento *worst-case* della formulazione.

Il documento *Cleaning Validation Master Plan* inoltre specifica i punti di campionamenti da eseguire, le superfici e il valore del residuo massimo ammesso (espresso in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$):

Tabella 2 - Superfici da valutare per la convalida di *cleaning*

Superficie	Punto di campionamento	Limite di residuo ammesso	Tecnica di campionamento
Acciaio inossidabile	Holder dell'ago di riempimento	4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Tecnica Swab
Acciaio inossidabile	Porzione della <i>filling machine</i> sottostante ai due aghi	0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Tecnica Swab
EPDM (Etilene-Propilene-Diene Monomero)	Alle estremità delle dita del guanto / sul palmo del guanto	0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Tecnica Swab

Per le superfici in acciaio inossidabile sono stati stimati due limiti differenti, poiché i punti di campionamento sull'impianto sono diversi. Come descritto in Sezione 2.4, esistono due tipologie di superfici a contatto indiretto con il prodotto. In questo caso, l'*holder* dell'ago ha una probabilità maggiore di entrare a contatto con il colesterolo; per questo motivo il limite associato risulta più elevato ($4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Al contrario, la porzione sottostante i due aghi della *filling machine* presenta una probabilità minore di contatto con l'agente inquinante e, di conseguenza, è stato definito un limite più restrittivo ($0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Dato che le due superfici di acciaio inossidabile presentano differenti limiti, si decide di considerare unicamente il limite più basso ($0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) come *worst-case*. Una volta conclusa la validazione del processo di *cleaning* il valore di *recovery* ottenuto sarà utilizzato per entrambe le superfici di acciaio inossidabile.

4.2 UHPLC con Detector CAD

Lo strumento utilizzato per l'attività di *cleaning* del prodotto PTH-425 è un *ThermoFisher Vanquish* UHPLC equipaggiato con il rilevatore CAD (*Charged Aerosol Detector*). Questo sistema opera a pressioni molto più elevate rispetto ad un normale HPLC, consentendo di essere equipaggiato con colonne cromatografiche a minore lunghezza e minore diametro delle particelle impaccate; il che permette di ottenere una separazione delle sostanze eluite con maggiore efficienza e in minor tempo.

Il detector CAD è un rilevatore di massa, è quindi sensibile alla quantità di sostanza e non alle proprietà spettroscopiche del campione. Questa tipologia viene solitamente preferita in caso di composti o sostanze non volatili come i lipidi. Il CAD nebulizza l'eluato proveniente dalla colonna miscelandolo con un gas nebulizzante (azoto) e trasformandolo in particelle uniformi, che attraversano un tubo riscaldato che permette la completa evaporazione della fase mobile. L'aerosol secco ottenuto, contenente esclusivamente l'analita, riceve una carica entrando in contatto con un flusso di gas azoto ionizzato. Queste particelle cariche vengono rilevate da un elettrometro altamente sensibile che misura la corrente elettrica generata (espressa in pA). Infine, si ottiene un grafico che mette in relazione la corrente elettrica generata dalle particelle, espressa in pA (asse Y), e il tempo di analisi, espresso in minuti (asse X) [10].

Nella Tabella 3 vengono illustrate le condizioni strumentali d'analisi.

Tabella 3 - Parametri cromatografici

Strumentazione	Parametro	Valore
HPLC	Flusso	0.9 mL/min
	Volume di Iniezione	25 µL
	Temperatura Colonna	40°C
	Tempo di Analisi	30 minuti
	Temperatura Autocampionatore	12°C
	Modalità di iniezione	Normale
CAD	Temperatura Nebulizzatore	50.0°C
	Gas	N ₂
	Modalità regolatore Gas	Analitica
	Frequenza di acquisizione dati	10 Hz
	Funzione di Potenza	1.10
	Costante del Filtro	3.6

Di seguito vengono descritte tutte le preparative:

- **Preparazione 100 mM Buffer di Ammonio Acetato, pH 4.2 (Buffer Stock Solution):**

Pesato accuratamente 3.85 ± 0.1 g di acetato di ammonio in una navicella da pesata, trasferito in un matraccio da 500 mL, aggiunto circa 250 mL di Acqua Milli-Q e 7.5 mL di acido acetico. Portato a volume finale di 500 mL. Disciolto su agitatore con ancoretta magnetica e regolato il pH a 4.2 ± 0.1 , se necessario utilizzare una soluzione di ammonio al 25% oppure di acido acetico. Infine, filtrato la soluzione con un filtro in acetato di cellulosa da 0.22 µm e degassato.

- **Preparazione Fase Mobile A (soluzione tampone di acetato di ammonio 5 mM, pH 4.2):**

Trasferito accuratamente 950 mL di Acqua Milli-Q e 50 mL di Buffer Stock Solution in un matraccio tarato. Mescolato bene e degassato.

- **Preparazione Fase Mobile B (acetato di ammonio 5 mM/IPA/Acetonitrile 5:62:33):**

Trasferito accuratamente 100 mL di Buffer Stock Solution, 1240 mL di IPA e 660 mL di acetonitrile in un matraccio tarato. Mescolato bene e degassato.

La separazione dello strumento UHPLC avviene mediante una eluizione a gradiente, quindi la percentuale di volume di fase A e fase B che attraversa la colonna varia nel tempo (Tabella 4).

Tabella 4 - Composizione del gradiente di analisi

Tempo (min)	% Fase Mobile A	% Fase Mobile B
0	15.0	85.0
2.0	15.0	85.0
2.1	11.0	89.0
15.0	8.0	92.0
19.0	0.0	100.0
24.0	0.0	100.0
26.0	15.0	85.0
30.0	15.0	85.0

4.3 Metodo Analitico

L'analisi HPLC viene condotta per identificare e quantificare i residui di colesterolo recuperati dalle superfici dopo la pulizia. Se dopo la pulizia della linea produttiva la quantità di colesterolo rilevata, sulle superfici campionate, è inferiore rispetto ai limiti stabiliti dal documento *Cleaning Validation Master Plan* descritto alla Sezione 4.1, la linea può essere considerata idonea per un successivo processo di produzione.

I residui di colesterolo, con cui il metodo di *cleaning* verrà convalidato, hanno le seguenti concentrazioni:

1. Acciaio Inossidabile:

- a. Residuo massimo accettabile in 100 cm² in acciaio inossidabile con limite di 4 µg/cm², ricostituito con 20 mL di solvente:

$$\text{Residuo/Swab: } 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 100 \text{ cm}^2 = 400 \mu\text{g}$$

$$\text{Concentrazione/Swab: } \frac{400 \mu\text{g}}{20 \text{ mL}} = 20 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.020 \text{ mg}/\text{mL}$$

- b. Residuo massimo accettabile in 200 cm² in acciaio inossidabile con limite di 0.2 µg/cm², ricostituito con 2.5 mL di solvente:

$$\text{Residuo/Swab: } 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 200 \text{ cm}^2 = 40 \mu\text{g}$$

$$\text{Concentrazione/Swab: } \frac{40 \mu\text{g}}{2.5 \text{ mL}} = 16 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.016 \text{ mg}/\text{mL}$$

2. Etilene-Propilene-Diene Monomero (EPDM):

- a. Residuo massimo accettabile in 600 cm² in EPDM con limite di 0.2 µg/cm², recuperato con 5 mL di solvente:

$$\text{Residuo/Rinse: } 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 600 \text{ cm}^2 = 120 \mu\text{g}$$

$$\text{Concentrazione/Rinse: } \frac{120 \mu\text{g}}{5 \text{ mL}} = 24 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.024 \text{ mg}/\text{mL}$$

Nel documento *Cleaning Validation Master Plan*, descritto alla Sezione 4.1, viene indicata la tecnica *swab* come tecnica di campionamento per la superficie in EPDM. Tuttavia, i risultati ottenuti applicando tale approccio non rispettano i criteri di accettazione, pertanto, come riportato nelle Sezioni 4.7 e 5.4, la tecnica *swab* viene sostituita con la tecnica *rinse*.

La strumentazione necessaria per attuare la convalida dell'attività di *cleaning* del prodotto farmaceutico PTH-425 è la seguente:

- Thermofisher Vanquish UHPLC equipaggiato con rilevatore CAD o equivalente
- Colonna cromatografica: XSelect CSH C18 3.5 µm, 4.6 x 150 mm
- Pre-colonna: XSelect CSH VanGuard Cartridge 130 A, 3.5 µm x 5 mm
- Tipo di Swab: Texwipe TX714K Low TOC Large Alpha Swabs
- Supporto VanGuard Cartridge
- Bagno ad ultrasuoni
- Dispenser automatico
- Bilancia analitica
- Agitatore magnetico
- Vetreria di classe A
- pHmetro
- Filtri in acetato di cellulosa da 0.22 µm

I materiali e i reagenti utilizzati per la convalida sono:

- Acqua Milli-Q
- Metanolo grado LC-MS

- Acetonitrile grado LC-MS
- Ammonio Acetato grado LC-MS
- Alcol Isopropilico (IPA) grado LC-MS
- Soluzione di ammonio 25%

Il materiale di riferimento è il “Colesterolo USP Reference Standard”.

Il Metanolo viene scelto come Bianco (Diluente) per l’analisi HPLC, mentre come solvente di campionamento viene preparata una miscela di etanolo e alcol isopropilico con un rapporto di 1:1.

Di seguito vengono descritte le preparazioni delle Soluzioni Standard di colesterolo:

- **Preparazione Soluzione Standard Stock (200 µg/mL):**
Pesato 40 mg di colesterolo in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato fino a circa metà del volume con metanolo, chiuso il matraccio e immerso in un bagno a ultrasuoni per circa un minuto, fino a completa dissoluzione. Lasciato raffreddare la soluzione a temperatura ambiente e portato a volume con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard di Lavoro (20 µg/mL):**
Diluito 10 mL di Soluzione Standard Stock ad un volume finale di 100 mL con metanolo.

Dopo aver preparato le Soluzioni Standard, vengono preparati i vari campioni e controlli negativi di *swab* per tutte le superfici e limiti di residuo:

- **Preparazione Bianco Swab (Acciaio Inossidabile, limite 4 µg/cm²):**
Trasferito uno *swab* pulito in una provetta Falcon. Aggiunti 20 mL di diluente e sonicato per 30 minuti. Rimosso lo *swab*, trasferita la soluzione in una vial HPLC e analizzata.
- **Preparazione Campione Swab (Acciaio Inossidabile, limite 4 µg/cm²):**
Lo *swab* utilizzato per il campionamento viene trasferito in una provetta Falcon. Aggiunti 20 mL di diluente e sonicato per 30 minuti. Rimosso lo *swab*, trasferita la soluzione in una vial HPLC e analizzata.
- **Preparazione Bianco Swab (Acciaio Inossidabile, limite 0.2 µg/cm²):**
Trasferito uno *swab* pulito in una provetta Falcon. Aggiunti 2.5 mL di diluente e sonicato per 30 minuti. Rimosso lo *swab*, trasferita la soluzione in una vial HPLC e analizzata.

- **Preparazione Campione Swab (Acciaio Inossidabile, limite 0.2 µg/cm²):**

Lo *swab* utilizzato per il campionamento viene trasferito in una provetta Falcon. Aggiunti 2.5 mL di diluente e sonicato per 30 minuti. Rimosso lo *swab*, trasferita la soluzione in una vial HPLC e analizzata.

- **Preparazione Bianco Rinse (EPDM, limite 0.2 µg/cm²):**

Aggiunti 5 mL di metanolo all'interno del guanto. Con un morsetto si chiude l'estremità del guanto all'altezza del polso e si agita manualmente per 10 minuti. La soluzione viene trasferita in una vial HPLC e analizzata.

- **Preparazione Campione Rinse (EPDM, limite 0.2 µg/cm²)**

Il guanto viene rivoltato e vengono depositati 0.15 mL di Soluzione Standard Stock (800 µg/mL) all'interno della porzione di mano del guanto in EPDM (600 cm²). Il guanto viene rivoltato nuovamente, portando l'esterno all'interno, e vengono aggiunti all'interno 5 mL di metanolo. Il guanto viene chiuso con un morsetto all'altezza del polso e si agita manualmente per 10 minuti. La soluzione finale viene trasferita in una vial HPLC e analizzata.

La soluzione standard di lavoro (20 µg/mL) e il bianco (diluente) compongono il *System Suitability Test*, ossia iniezioni che dovranno essere valutate secondo diversi criteri di accettazione e la loro conformità permetterà il continuo dell'analisi HPLC. Nella Tabella 5 viene illustrata un esempio di sequenza HPLC.

Tabella 5 - Esempio di sequenza di analisi HPLC

Soluzione	Numero di Iniezioni
Bianco (Diluente)	Almeno 1
Soluzione Standard di Lavoro	5
Pausa Valutazione SST	
V0	
Soluzione Standard di Lavoro	1
Bianco <i>Swab</i>	1
Campione <i>Swab</i>	1
Bianco <i>Rinse</i>	1
Campione <i>Rinse</i>	1
Soluzione Standard di Lavoro di <i>Bracketing</i> *	1

*L'iniezione di Soluzione Standard di Lavoro di *Bracketing* deve avvenire ogni 5 iniezioni

I criteri di Accettazione del *System Suitability Test* sono i seguenti:

- Bianco (Diluente): se presente un picco interferente questo deve avere una area percentuale minore dello 0.1% rispetto al picco principale del colesterolo.

$$\%Area = \left(\frac{Area\ picco\ interferente\ iniezione\ bianco}{Media\ area\ picco\ colesterolo\ iniezioni\ STD\ (n = 5)} \right) \times 100$$

- Soluzione Standard di Lavoro:
 - a. %RSD Area colesterolo (n=5): $\leq 5.0\%$;

$$\%RSD\ Area = \left(\frac{Deviazione\ standard\ aree\ picco\ colesterolo}{Media\ aree\ picco\ colesterolo} \right) \times 100$$

- b. *Tailing Factor*: è un valore che descrive quanto il picco è simmetrico. Il valore del fattore deve essere compreso nell'intervallo 0.8÷1.5.

$$Tailing\ Factor = \frac{a + b}{2a}$$

a = distanza dal centro del picco al lato frontale, al 5% dell'altezza

b = distanza dal centro del picco al lato di coda, al 5% dell'altezza

- Soluzione Standard di Lavoro di *Bracketing*: la differenza percentuale (%Drift) deve avere un valore compreso nell'intervallo $\pm 5.0\%$.

$$\%Drift = \left| \frac{\text{Area picco principale}_{STD\ Bracketing} - \text{Media aree picco principale}_{Working\ STD}}{\text{Media aree picco principale}_{Working\ STD}} \right| \times 100$$

Il contenuto di colesterolo nella soluzione campione viene calcolato come segue:

$$\text{Colesterolo (mg/mL)} = \frac{A_{Cmp} \times W_{Std} \times P_{Std}}{A_{Std} \times Dil_{Std} \times 100}$$

con:

A_{Cmp} = Area del colesterolo nella soluzione Campione

A_{Std} = Area media aree picco colesterolo *Working STD*

W_{Std} = Peso in mg del colesterolo Reference Standard

P_{Std} = Purezza (in %) del colesterolo Reference Standard

Dil_{Std} = Fattore di diluizione della soluzione Working Standard di colesterolo

$$\text{Colesterolo } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Colesterolo (mg/mL)} \times 1000}{\text{Recovery Rate } \left(\frac{1}{100}\right)}$$

con:

Recovery rate Acciaio inossidabile = 0.681

Recovery rate EPDM = 0.363

Si calcola infine il residuo di colesterolo in $\mu\text{g/cm}^2$ come segue:

$$\text{Residuo colesterolo porzione X di impianto } (\mu\text{g/cm}^2) = \frac{\text{Colesterolo conc } (\mu\text{g/mL}) \times Dil\ Cmp}{\text{Superficie } (\text{cm}^2)}$$

con:

$Dil_{Cmp}\ Swab$ = 20 mL (limite $4\ \mu\text{g/cm}^2$) o 2.5 mL (limite $0.2\ \mu\text{g/cm}^2$)

$Dil_{Cmp}\ Rinse$ = 5 mL

Superficie Swab (cm^2) = 100 (limite $4\ \mu\text{g/cm}^2$) o 200 (limite $0.2\ \mu\text{g/cm}^2$)

Superficie Rinse (cm^2) = 600

I criteri di accettazione di ciascuna soluzione campione sono descritti di seguito:

- A seconda dell'area trattata il residuo calcolato come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del Campione *Swab* su acciaio inossidabile deve essere $\leq 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ o $\leq 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; il residuo calcolato come $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ del Campione *Rinse* su EPDM deve essere $\leq 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

4.4 Platform Method

Il metodo analitico basato sulla quantificazione HPLC - CAD del colesterolo è un considerato un *Platform Method* (metodo piattaforma) presso il sito di Monza, ossia un metodo base validato e standardizzato per il colesterolo, la cui convalida è stata ampliata nel tempo sulla base delle esigenze analitiche specifiche (ampliamento del range, utilizzo del metodo a scopo *cleaning* con implementazione delle sfide di recupero). Questo metodo è dunque applicabile a più prodotti o matrici simili ed è facilmente trasferibile tra laboratori. Tutti i parametri indipendenti dallo scopo della tecnica analitica vengono mantenuti dalla precedente attività di convalida svolta sul marcatore di riferimento, che in questo caso è il colesterolo.

L'utilizzo di un *Platform Method* permette di rendere la convalida di un metodo analitico più efficiente, coerente e consente di ridurre notevolmente le tempistiche.

4.4.1 Specificità

Le linee guida ICH definiscono la specificità come l'abilità di un metodo analitico di valutare univocamente l'analita, indipendentemente dalla presenza di altri composti come impurità, eccipienti e prodotti di degradazione.

Per verificare e dimostrare la specificità del metodo analitico vengono analizzate le seguenti soluzioni (Tabella 6):

Tabella 6 - Soluzioni testate per analisi Specificità

Soluzione	Concentrazione
DMG PEG2000	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
DSPC	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
SM-102	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tutte le soluzioni standard di lavoro dei vari lipidi, sono state analizzate in condizioni standard e iniettate due volte.

- **Preparazione Soluzione Standard Stock DMG-PEG2000 (199.70 µg/mL):**
Pesati 39.940 mg e trasferiti in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato con circa 100 mL di metanolo, chiuso con un apposito tappo e inserito in un bagno ad ultrasuoni per un minuto. Portato a volume con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard di Lavoro DMG-PEG2000 (19.97 µg/mL):**
Diluito 10 mL di Soluzione Standard Stock DMG-PEG2000 ad un volume finale di 100 mL con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard Stock DSPC (197.39 µg/mL):**
Pesati 39.477 mg e trasferiti in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato con circa 100 mL di metanolo, chiuso con un apposito tappo e inserito in un bagno ad ultrasuoni per un minuto. Portato a volume con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard di Lavoro DSPC (19.74 µg/mL):**
Diluito 10 mL di Soluzione Standard Stock DSPC ad un volume finale di 100 mL con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard Stock SM-102 (202.515 µg/mL):**
Pesati 40.503 mg e trasferiti in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato con circa 100 mL di metanolo, chiuso con un apposito tappo e inserito in un bagno ad ultrasuoni per un minuto. Portato a volume con metanolo.
- **Preparazione Soluzione Standard di Lavoro SM-102 (20.25 µg/mL):**
Diluito 10 mL di Soluzione Standard Stock SM-102 ad un volume finale di 100 mL con metanolo.

Il parametro di specificità è conforme quando viene confermata l'assenza di picchi interferenti con il picco del colesterolo, vale a dire che al tempo di ritenzione del picco del colesterolo non devono essere presenti i picchi degli altri lipidi analizzati.

4.4.2 Stabilità delle Soluzioni

Lo scopo di questo test è valutare la stabilità delle Soluzioni Standard Stock e di Lavoro del colesterolo conservate ad una temperatura controllata tra i 2-8°C. Entrambe le soluzioni vengono analizzate subito dopo la preparazione, e successivamente conservate a 2-8°C per essere poi testate giornalmente fino a 7 giorni dalla loro preparazione.

- **Preparazione Soluzione Standard Stock (200 µg/mL):**

Pesati 39.546 mg di colesterolo in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato fino a circa metà del volume con metanolo, chiuso il matraccio e immerso in un bagno a ultrasuoni per circa un minuto. Portato a volume con metanolo. Conc. finale: 197.73 µg/mL.

- **Preparazione Soluzione Standard di Lavoro (20 µg/mL):**

Diluiti 10 mL di Soluzione Standard Stock (200 µg/mL) in 100 mL di metanolo. Conc. finale: 19.77 µg/mL.

Ad ogni *timepoint* di analisi vengono eseguite la seguente procedure:

- La Soluzione Standard di Lavoro: viene rimossa dalla condizione di conservazione 2-8°C e analizzata tal quale;
- La Soluzione Standard Stock: viene rimossa dalla condizione di conservazione 2-8°C, diluita fino ad ottenere una concentrazione pari a 20 µg/mL e analizzata.

Per valutare la stabilità delle soluzioni, è necessario calcolare la %Recovery dei vari *timepoint* utilizzando la seguente formula:

$$\%Recovery\ soluzione = \frac{Concentrazione\ sperimentale\ colesterolo\ (\mu g/mL)}{Concentrazione\ teorica\ colesterolo\ (\mu g/mL)} \times 100$$

La %Recovery della stabilità delle soluzioni viene confrontata con la %Recovery delle soluzioni ottenuta immediatamente dopo la preparazione (*timepoint* zero, T0):

$$\%Recovery\ Tx = \frac{\%Recovery\ soluzione\ ad\ un\ determinato\ timepoint\ (Tx)}{\%Recovery\ timepoint\ zero\ (T0)} \times 100$$

Il valore ottenuto dal rapporto tra la %Recovery della soluzione ad uno specifico *timepoint* e la %Recovery ottenuta al *timepoint* zero, deve essere compreso nell'intervallo di valori 90% - 110%.

4.4.3 Linearità

La linearità di un metodo analitico rappresenta la capacità di fornire risultati proporzionali alla concentrazione dell'analita, all'interno di un determinato intervallo di concentrazione. Viene valutata attraverso la costruzione di una retta di calibrazione, ottenuta applicando la regressione lineare standard, che descrive la relazione tra la risposta strumentale e la concentrazione dell'analita.

La linearità del metodo di *cleaning* del prodotto PTH-425 viene convalidata da 5 µg/mL a 40 µg/mL, in modo da coprire il range di concentrazioni delle soluzioni campioni che verranno analizzate (rispettivamente 16 e 20 µg/mL).

Partendo dalla Soluzione Standard di Lavoro descritta alla Sezione 4.3, le soluzioni di linearità vengono preparate in triplicato per ciascun livello. Ogni soluzione viene portata a volume con metanolo LC-MS in un matraccio tarato. (Tabella 7).

Tabella 7 - Preparazione soluzioni di Linearità

Livello	Soluzione Standard Stock (200 µg/mL)	Volume Finale	Concentrazione Teorica Colesterolo
25%	253 µL	10 mL	5 µg/mL
40%	405 µL	10 mL	8 µg/mL
50%	506 µL	10 mL	10 µg/mL
75%	759 µL	10 mL	15 µg/mL
100%	1,011 mL	10 mL	20 µg/mL
150%	1,517 mL	10 mL	30 µg/mL
200%	2,022 mL	10 mL	40 µg/mL

Tutte le soluzioni ottenute vengono trasferite in una vial HPLC e analizzate.

I dati ottenuti vengono rappresentati in un grafico che mette in relazione l'assorbanza (asse Y) e la concentrazione teorica di colesterolo delle soluzioni di linearità (asse X). In questo modo è possibile ottenere una retta di regressione da cui si estrapolano i valori di pendenza e il Coefficiente R², che sono utili per confermare la conformità del test.

Il criterio di accettazione affinché il parametro della linearità risulti conforme è il valore del coefficiente R², che deve essere ≥ 0.99 .

4.4.4 Limite di Quantificazione

Il limite di quantificazione, o LOQ, è la minima quantità di analita, presente nel campione, che il metodo analitico riesce a quantificare con precisione e accuratezza. Il valore teorico LOQ viene calcolato grazie alla retta di regressione di linearità (Sezione 5.1.3) attraverso la seguente formula:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} = \frac{10 \times 8739138}{11632246} = 7.5129 \mu\text{g/mL}$$

con:

$$\sigma = \text{Errore Standard} = 8739138 \text{ (Sezione 5.1.3)}$$

$$S = \text{Pendenza della Retta di Regressione} = 11632246 \text{ (Sezione 5.1.3)}$$

Il valore LOQ calcolato viene poi confermato sperimentalmente.

- **Soluzione LOQ:**

Utilizzando la Soluzione Standard di Lavoro (Sezione 4.3), vengono preparate tre diluizioni al fine di ottenere tre campioni indipendenti. Tutte le diluizioni sono effettuate aggiungendo 10 mL di metanolo LC-MS.

La seguente formula permette di calcolare il volume di Soluzione Standard di Lavoro (V_i) necessario, conoscendo la concentrazione iniziale della Soluzione Standard di Lavoro (C_i), il volume di diluizione finale di metanolo (V_f) e la concentrazione teorica LOQ calcolata (C_f):

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$$19.77 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times V_i = 7.5129 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_i = \frac{7.5129 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \text{ mL}}{19.77 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 3.80 \text{ mL}$$

Vale a dire che 3.80 mL della soluzione a 19.77 $\mu\text{g/mL}$ verranno diluiti a 10 mL. Il valore LOQ è conforme se la differenza tra la media delle concentrazioni delle soluzioni LOQ ottenute e la concentrazione teorica LOQ è inferiore al 20% della concentrazione teorica LOQ.

$$|\text{Media valore LOQ sperimentale} - \text{Valore LOQ teorico}| < \text{Valore LOQ Teorico} \times \frac{20}{100}$$

Inoltre, in accordo alla SOP interna aziendale, il valore di LOQ deve essere $\leq 80\%$ della concentrazione teorica della Soluzione Standard di Lavoro, corretta per la *recovery* percentuale (ottenuta durante l'attività di *cleaning*).

$$\text{Media valore LOQ sperimentale} < \text{Concentrazione analitica pi\`u bassa} \times \frac{80}{100} \times RR \left(\frac{1}{100} \right)$$

4.4.5 Ripetibilit\`a

La ripetibilit\`a di un metodo analitico valuta la precisione dei dati ottenuti da procedure analitiche eseguite con la stessa tipologia di preparazione del campione, nelle medesime condizioni di lavoro e in un breve intervallo di tempo.

La ripetibilit\`a viene valutata analizzando sei iniezioni HPLC della stessa soluzione ad una concentrazione di 10 $\mu\text{g/mL}$, preparata dall'Analista 1 al Giorno 1. Questa soluzione viene ottenuta partendo dalla Soluzione Stock di colesterolo con concentrazione di 498.3411 $\mu\text{g/mL}$.

- **Preparazione Soluzione Stock di Colesterolo (498.3411 $\mu\text{g/mL}$):**

Tenendo in considerazione la *purity* (99.2%) del colesterolo vengono pesati 50.236 mg di lipide e trasferiti in un matraccio tarato da 100 mL. Aggiunto metanolo e sonicato fino a completa dissoluzione della soluzione. Portato a volume con metanolo.

La concentrazione della Soluzione Stock di colesterolo viene calcolata grazie alla seguente formula:

$$\text{Concentrazione soluzione} = 50.236 \text{ mg} \times \left(\frac{1}{100 \text{ mL}} \right) \times 0.992 \times 1000 = 498.3411 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

- **Soluzione di Lavoro Colesterolo (9.9668 $\mu\text{g/mL}$):**

Trasferiti 2 mL di Soluzione Stock di colesterolo in un matraccio tarato da 100 mL. Portato a volume con metanolo.

Per calcolare la concentrazione sperimentale di colesterolo, ottenuta dall'analisi delle 6 iniezioni HPLC di Soluzione di Lavoro, \`e necessario conoscere il valore dell'intercetta-y e della pendenza della retta di regressione di Linearit\`a (Sezione 2.1.3):

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo} = \left(\frac{\text{Area picco colesterolo} - \text{Intercetta } y}{\text{Pendenza}} \right)$$

Dopodich\`e viene calcolata la media, deviazione standard e %RSD delle 6 concentrazioni sperimentali ottenute delle Soluzioni di Lavoro di colesterolo.

$$\%RSD = \frac{\text{Media deviazione standard } (n = 6)}{\text{Media concentrazioni sperimentali colesterolo } (n = 6)} \times 100$$

Altro valore utile per confermare la conformit\`a del test di ripetibilit\`a \`e la differenza percentuale, che viene calcolata utilizzando la media delle concentrazioni sperimentali di colesterolo e la concentrazione teorica della Soluzione Standard di Lavoro:

$$\%Drift = \left| \frac{\text{Media concentrazione sperimentale} - \text{Concentrazione teorica}}{\text{Concentrazione teorica}} \right| \times 100$$

I criteri di accettazione della ripetibilità sono:

- %RSD delle sei iniezioni HPLC di Soluzione di Lavoro di colesterolo deve essere $\leq 15\%$;
- La differenza percentuale (%Drift) tra il valore sperimentale ottenuto e il valore teorico deve essere $\pm 20\%$.

4.4.6 Precisione Intermedia

La precisione intermedia esprime la capacità di un metodo analitico di ottenere risultati che sono consistenti anche a seguito di variazioni all'interno del laboratorio. La precisione intermedia viene valutata sulla base dei risultati ottenuti da un secondo analista che eseguirà, in un giorno diverso, la stessa analisi con le stesse procedure seguite durante l'analisi di ripetibilità (Sezione 4.4.5).

Per la precisione intermedia vengono preparate, con la medesima preparazione vista alla Sezione 4.4.5, la Soluzione Stock di colesterolo (498.3411 $\mu\text{g/mL}$) e Soluzione di Lavoro di colesterolo (9.9668 $\mu\text{g/mL}$). Queste soluzioni vengono realizzate dall'Analista 2 al Giorno 2 e la Soluzione di Lavoro viene analizzata tramite 6 iniezioni HPLC.

Al pari della ripetibilità, anche nella valutazione della precisione intermedia è necessario calcolare il valore della concentrazione sperimentale di colesterolo e il valore della differenza percentuale tra la media delle 6 concentrazioni misurate e quella teorica.

Per convalidare la precisione intermedia, è inoltre necessario calcolare la differenza percentuale tra l'Analista 1 e l'Analista 2. Questo valore si ottiene determinando il rapporto tra la differenza delle medie delle concentrazioni sperimentali ottenute dai due operatori diversi e la concentrazione teorica, espresso in percentuale:

$$\%Drift (\text{Analista 1/Analista 2}) = \frac{|C_{\text{Analista 1}} - C_{\text{Analista 2}}|}{\text{Concentrazione teorica}} \times 100$$

con:

$C_{\text{Analista 1}} = \text{media delle concentrazioni sperimentali Analista 1}$

$C_{\text{Analista 2}} = \text{media delle concentrazioni sperimentali Analista 2}$

I criteri di accettazione della precisione intermedia sono:

- %RSD delle sei iniezioni HPLC di Soluzione di Lavoro di colesterolo deve essere $\leq 15\%$

- La differenza percentuale (%Drift) tra il valore sperimentale ottenuto e il valore teorico deve essere $\pm 20\%$
- La differenza percentuale (%Drift Op1/Op2) del valore sperimentale ottenuto dai due operatori rispetto alla concentrazione teorica deve essere $\pm 20\%$

4.4.7 Accuratezza

L'accuratezza di un metodo analitico è il grado di concordanza tra il valore teorico e il valore sperimentale. Questo parametro viene valutato tramite nove iniezioni HPLC su tre livelli di concentrazione diversi che coprono l'intervallo di lavoro. Dalla Soluzione Standard Stock, descritta alla Sezione 4.4.5, vengono preparate tre soluzioni per ogni livello di concentrazione (bassa, media e alta) in triplicato:

- Livello basso (LOQ): trasferiti 2 mL di Soluzione Standard Stock in un matraccio tarato da 100 mL, portato a volume con metanolo. Trasferita soluzione in vial HPLC e analizzata.
- Livello target (100%): trasferiti 4 mL di Soluzione Standard Stock in un matraccio tarato da 50 mL, portato a volume con metanolo. Trasferita soluzione in vial HPLC e analizzata.
- Livello alto (200%): trasferiti 4 mL di Soluzione Standard Stock in un matraccio tarato da 25 mL, portato a volume con metanolo. Trasferita soluzione in vial HPLC e analizzata.

Utilizzando i valori ricavati dalla retta di regressione di linearità (Sezione 5.1.3), viene calcolata la concentrazione delle tre iniezioni di ogni singola soluzione di accuratezza preparata:

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo} = \left(\frac{\text{Area picco colesterolo} - \text{Intercetta } y}{\text{Pendenza}} \right)$$

Una volta ottenuto il valore delle concentrazioni sperimentali di colesterolo di tutte le iniezioni, viene calcolato il parametro di accuratezza per ogni singola soluzione:

$$\% \text{Accuratezza} = \left(\frac{\text{Media conc. sperimentali colesterolo ad uno specifico livello}}{\text{Conc. teorica colesterolo ad uno specifico livello}} \right) \times 100$$

Il range di accettazione del valore di accuratezza percentuale, per tutte e tre le soluzioni, è 80% - 120%. Quindi se l'accuratezza percentuale di tutte le soluzioni è all'interno di questo range il parametro può essere definito conforme e convalidato per il metodo analitico.

4.4.8 Robustezza

Le linee guida ICH definiscono come "robustezza" la capacità di un metodo analitico di rimanere affidabile durante il normale utilizzo anche se con "fisiologiche" variazioni dei parametri critici. La

robustezza viene testata andando ad effettuare piccole, ma deliberate, variazioni dei parametri del metodo analitico.

Vengono eseguiti diversi *System Suitability Test* (SST) e ad ognuno viene modificato un parametro preciso come:

- a. Colonna cromatografica differente;
- b. Aumento e diminuzione del flusso di lavoro di 0.1 mL/min;
- c. Aumento e diminuzione della temperatura del comparto colonna di 1°C;
- d. Modifica delle concentrazioni dei reagenti presenti all'interno delle fasi mobili;
- e. Differente pH del buffer utilizzato per la preparazione della Fase Mobile A.

In tutti questi test è necessario valutare %RSD delle aree del picco di colesterolo, il *tailing factor* del picco di colesterolo e la presenza di picco interferenti nel cromatogramma per confermare la conformità del parametro di robustezza del metodo analitico.

4.5 Convalida del Metodo di Recupero per la Tecnica Swab

Il campionamento di superfici mediante tecnica *swab* consiste nell'utilizzo di un tampone costituito da materiale polimerico che una volta inumidito con solvente idoneo permette di raccogliere il prodotto farmaceutico o i residui presenti sulla superficie.

Il recupero dei residui presenti su una superficie difficilmente è totale, nella pratica è impossibile raggiungere una %Recovery del 100% poiché esistono diversi fattori di recupero che sono caratteristici dell'analita, della sua concentrazione e della superficie di campionamento.

Per il metodo analitico del prodotto PTH-425, la *recovery* tramite tecnica *swab* viene convalidata solo sulla superficie in acciaio inossidabile con residuo di 0.2 µg/cm². Infatti, come già visto alla Sezione 4.1, dei due limiti per l'acciaio inossidabile si decide di convalidare il metodo di recupero considerando unicamente il limite più basso usando una strategia *worst-case* (elemento peggiorativo).

Nell'attività di convalida vengono utilizzate piastre rappresentative di acciaio inossidabile con dimensioni 20 cm × 10 cm = 200 cm². Tutte le piastre, esclusi i controlli negativi, vengono sporcate tramite la semina di una quantità nota di colesterolo in modo tale da raggiungere un valore di residuo che è pari al limite stabilito (0.2 µg/cm²). Utilizzando la tecnica *swab* verranno effettuati campionamenti in laboratorio in modo da definire la %Recovery rappresentativa della combinazione tecnica-analita-residuo-metodo, che verrà applicata poi durante l'analisi di routine di *cleaning* sugli impianti di produzione. Questo fattore di recupero consente di ottenere il valore del residuo di analita

sulla superficie campionata sulla base della concentrazione sperimentale ottenuta durante l'analisi dei campioni.

Per la convalida del metodo di recupero tramite tecnica *swab* viene preparata una Soluzione Standard Stock con concentrazione 200 µg/mL.

- **Preparazione Soluzione Standard Stock Swab (200 µg/mL):**

Pesati 40.27 mg di colesterolo, tenendo in considerazione la *purity* (99.1%), e trasferiti in un matraccio tarato da 200 mL. Riempito il matraccio tarato fino a circa metà del volume con metanolo, chiuso il matraccio e immerso in un bagno a ultrasuoni per circa un minuto fino a completa dissoluzione. Lasciato raffreddare la soluzione a temperatura ambiente e portata a volume con metanolo. La concentrazione teorica della soluzione è 0.199538 mg/mL.

Come diluente viene utilizzato il metanolo, mentre il solvente di recupero è una miscela 1:1 di etanolo e alcol isopropilico (IPA).

Di seguito viene descritta la procedura seguita per ottenere controlli negativi e campioni *swab*.

- **Preparazione Soluzione Recovery Bianco Swab:**

L'operazione viene eseguita da due analisti diversi.

Si pulisce la superficie di campionamento in acciaio inossidabile, di dimensione 200 cm², con acqua Milli-Q e Alcol Etilico poi lasciato asciugare sotto cappa aspirante. Inumidito lo *swab* nel solvente di recupero ed eseguita la procedura descritta alla Sezione 2.4.1.1. Inserito lo *swab* in una provetta Falcon, aggiunto 2.5 mL di diluente e sonicato per 30 minuti. Rimosso lo *swab* e trasferita la soluzione finale in una vial HPLC per essere analizzata.

La soluzione *recovery* bianco *swab* è un controllo negativo, per questo motivo la piastra di acciaio inossidabile non viene sporcata seminando la Soluzione Standard Stock di colesterolo (200 µg/mL). Questi controlli sono fondamentali per dimostrare che il campionamento non introduce residui o interferenze dovuti al solvente di recupero, allo *swab* o alla superficie.

- **Preparazione Soluzione Recovery Campione Swab Superficie Acciaio Inossidabile:**

L'operazione viene eseguita sei volte da entrambi gli analisti.

Pulita la superficie di campionamento di ciascuna piastra in acciaio inossidabile, di dimensione 200 cm², con acqua Milli-Q e alcol etilico poi lasciate asciugare sotto cappa aspirante. Utilizzando una pipetta Eppendorf depositati omogeneamente 0.2 mL di Soluzione Standard Stock (200 µg/mL) sulla superficie e lasciata asciugare sotto cappa.

Prima di procedere al campionamento viene effettuata un'accurata ispezione visiva per confermare che la superficie sia completamente asciutta.

Si inumidisce lo *swab* con il solvente di recupero (EtOH:IPA, 1:1) e si procede con il prelievo sulla superficie, come descritto nella Sezione 2.4.1.1. Dopodiché, lo *swab* viene inserito in una provetta Falcon, dove vengono aggiunti 2.5 mL di diluente (MeOH) e viene sonicato per 30 minuti. Infine, si rimuove lo *swab* e si trasferisce la soluzione ottenuta in un vial HPLC per essere analizzata (concentrazione finale 16 µg/mL).

4.5.1 Calcoli Tecnica Swab

Per ogni soluzione testata (12 soluzioni campioni e due soluzioni di bianco), viene calcolata la concentrazione sperimentale di colesterolo mediante la formula seguente:

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Std}}} \times C_{\text{Std}} \times \frac{\text{Diluizione}}{\text{Volume depositato}}$$

con:

A_{Sample} = Area del picco di colesterolo nelle iniezioni del campione

A_{Std} = Media aree picco di colesterolo nelle iniezioni di Standard di Lavoro ($n = 5$)

C_{Std} = Concentrazione colesterolo (mg/mL)

Diluizione = 2.5 mL

Volume depositato = 0.2 mL

Una volta ottenuto il valore di concentrazione sperimentale del colesterolo è possibile calcolare la %Recovery per la tecnica *swab*:

$$\% \text{Recovery tecnica swab} = \frac{\text{Concentrazione sperimentale colesterolo } (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentrazione teorica colesterolo } (\mu\text{g/mL})} \times 100$$

La differenza percentuale viene calcolata utilizzando le formule che seguono:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

con:

\bar{x} = Media %Recovery ottenuta dai due analisti ($n = 12$)

x_1 = Media %Recovery analista 1 ($n = 6$)

$x_2 = \text{Media \%Recovery analista 2 (n = 6)}$

$$\text{Differenza\%} = \frac{(x_{1/2} - \bar{x})}{x_{1/2}} \times 100$$

con:

$x_{1/2} = \text{Media \%Recovery rispettivamente per analista 1 (n = 6) o per analista 2 (n = 6)}$

4.5.2 Criteri di Accettazione Tecnica Swab

I criteri di accettazione per completare la convalida dell'attività di *cleaning* su acciaio inossidabile tramite tecnica *swab* sono:

- %RSD delle sei %Recovery di ciascun analista deve avere un valore $\leq 20\%$;
- La media minima del valore di %Recovery per convalidare la tecnica è 50% ;
- La differenza percentuale della media %Recovery ottenuta da due operatori diversi deve essere $\pm 15\%$.

4.6 Recovery Rate per la Tecnica Swab

Basandosi sui risultati della %Recovery per la tecnica *swab* viene calcolato il *recovery rate* per la superficie in acciaio inossidabile utilizzando l'equazione che segue:

$$\text{Recovery Rate tecnica swab} = \bar{x} - (3 \times SD)$$

con:

$\bar{x} = \text{Media \%Recovery ottenuta dai due analisti (n = 12)}$

$SD = \text{Deviazione Standard \%Recovery ottenuta dai due analisti (n = 12)}$

Il calcolo della *recovery rate* tiene in considerazione la variabilità analitica e sperimentale associati all'operazione di campionamento. L'impatto di questi viene considerato riducendo il fattore di recupero di un valore pari a tre volte la deviazione standard ottenuta sperimentalmente dai due analisti. Il risultato che ne deriva viene adottato nei calcoli di routine del residuo di analita, così da garantire una valutazione dei residui in condizioni di *worst-case*.

Il fattore di recupero ottenuto viene utilizzato per entrambi i limiti presenti sulla superficie in acciaio inossidabile, dato che l'analisi è stata eseguita sul limite *worst-case* ossia il più basso dei due ($0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

4.7 Convalida del Metodo di Recupero per la Tecnica Rinse

La tecnica *rinse* viene eseguita mettendo a contatto la superficie di uno strumento o apparecchiatura con un solvente di estrazione che risulta idoneo al recupero della sostanza farmaceutica, di cui si deve valutare la concentrazione residua.

Così come per la tecnica *swab*, descritta alla Sezione 4.5, anche per la tecnica *rinse* è necessario calcolare il fattore di recupero poiché la recovery del materiale depositato sulla superficie non potrà essere del 100%. Per questo motivo esistono diversi fattori di recupero che sono caratteristici per la tipologia di superficie di campionamento, la concentrazione di residuo e l'analista che effettua l'attività.

La recovery tramite tecnica *swab* viene convalidata sulla superficie in EPDM per un residuo di 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Come descritto nel documento *Cleaning Validation Master Plan*, per la superficie EPDM inizialmente era stata valutata come tecnica di recupero la tecnica *swab* ma le %Recovery ottenute in fase di *method assessment* (valutazione preliminare di applicabilità del metodo) non rispettavano i criteri di accettazione. Per questo motivo si è deciso di attuare dei test di fattibilità andando a modificare il solvente di recupero o il numero di tamponi utilizzati per raschiare la stessa unità di superficie. Nonostante i diversi *trials*, la tecnica *swab* ha dimostrato di essere inadeguata per la configurazione colesterolo - EPDM e *trials* aggiuntivi con tecnica *rinse* sono stati eseguiti, permettendo di ottenere risultati che rispettassero i limiti predefiniti dal protocollo di convalida.

Durante l'esercizio di convalida è stata utilizzata la sezione della mano (il palmo in particolare) di diversi guanti in EPDM con dimensione di circa 600 cm^2 . Ogni porzione viene sporcata mediante semina con una quantità conosciuta di colesterolo in modo tale da raggiungere un valore di residuo pari al limite stabilito (0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Attraverso dei campionamenti simulati in laboratorio, si riesce a ottenere la *recovery* che è un valore rappresentativo della combinazione di tecnica-analita-residuo-materiale. Questo fattore di recupero viene applicato durante le analisi di *cleaning* di routine e permette di ottenere il valore di residuo di analita presente sulla superficie, in base alla concentrazione sperimentale ottenuta dall'analisi dei campioni.

Per effettuare la convalida del metodo di recupero mediante tecnica *rinse* viene preparata una Soluzione Standard Stock con concentrazione 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Preparazione Soluzione Standard Stock Rinse (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$):**

Tenendo in considerazione la *purity* (99.1%) del colesterolo, vengono pesati 40.10 mg in un matraccio tarato da 50 mL. Riempito il matraccio tarato fino a circa metà del volume con metanolo, chiuso il matraccio e immerso in un bagno a ultrasuoni per circa un minuto fino a

completa dissoluzione. Lasciato raffreddare la soluzione a temperatura ambiente e portata a volume con metanolo. La concentrazione teorica della soluzione è di 0.794782 mg/mL.

Come diluente per la convalida della recovery viene utilizzato il Metanolo.

Per ottenere i controlli negativi e i campioni tramite rinse vengono eseguite le seguenti procedure.

- **Preparazione Soluzione Recovery Bianco Rinse:**

L'operazione viene eseguita da due analisti diversi.

Il guanto viene rivoltato, portando l'interno all'esterno, e la superficie viene pulita con acqua Milli-Q, Alcol Etilico e viene lasciata asciugare sotto cappa aspirante. Il guanto viene nuovamente rivoltato, portando l'esterno all'interno, e si aggiungono 5 mL di metanolo. Con un morsetto si chiude l'estremità del guanto all'altezza del polso e si agita manualmente per 10 minuti. La soluzione viene trasferita in una vial HPLC e analizzata.

Il guanto non essendo contaminato viene considerato come bianco o campione negativo, il quale permette di dimostrare che il tipo di solvente e campionamento non introducono residui o interferenze.

- **Preparazione Soluzione Recovery Campione Rinse Superficie EPDM:**

Operazione eseguita per sei volte da entrambi gli operatori.

Il guanto viene rivoltato, portando l'interno all'esterno, e viene pulita la superficie con acqua Milli-Q e Alcol Etilico poi viene lasciato asciugare sotto cappa aspirante. Depositati 0.15 mL di Soluzione Standard Stock (800 µg/mL) all'interno della porzione di mano del guanto in EPDM (superficie 600 µg/cm²), infine viene lasciato asciugare sotto cappa. Per confermare che la superficie sia completamente asciutta viene effettuata una accurata ispezione visiva prima di procedere al campionamento.

Il guanto viene rivoltato nuovamente, portando l'esterno all'interno, e vengono aggiunti all'interno 5 mL di metanolo. Il guanto viene chiuso con un morsetto all'altezza del polso e si agita manualmente per 10 minuti. La soluzione finale viene trasferita in una vial HPLC e analizzata (concentrazione finale 24 µg/mL).

4.7.1 Calcoli Tecnica Rinse

Per ogni soluzione testata (12 soluzioni campioni e due soluzioni di bianco), viene calcolata la concentrazione sperimentale di colesterolo mediante la formula seguente:

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Std}}} \times C_{\text{Std}} \times \frac{\text{Diluizione}}{\text{Volume depositato}}$$

con:

A_{Sample} = Area del picco di colesterolo nelle iniezioni del Campione

A_{Std} = Media aree picco di colesterolo nelle iniezioni di Standard di Lavoro ($n = 5$)

C_{Std} = Concentrazione colesterolo (mg/mL)

Diluzione = 2.5 mL

Volume depositato = 0.2 mL

Una volta ottenuto il valore di concentrazione sperimentale del colesterolo è possibile calcolare la %Recovery per la tecnica *rinse*:

$$\%Recovery\ tecnica\ rinse = \frac{Concentrazione\ sperimentale\ colesterolo\ (\mu g/mL)}{Concentrazione\ teorica\ colesterolo\ (\mu g/mL)} \times 100$$

La differenza percentuale viene calcolata utilizzando le formule che seguono:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2}{2}$$

con:

\bar{x} = Media %Recovery ottenuta dai due analisti ($n = 12$)

x_1 = Media %Recovery analista 1 ($n = 6$)

x_2 = Media %Recovery analista 2 ($n = 6$)

$$Differenza\% = \frac{(x_{1/2} - \bar{x})}{x_{1/2}} \times 100$$

con:

$x_{1/2}$ = Media %Recovery rispettivamente per analista 1 ($n = 6$) o per analista 2 ($n = 6$)

4.7.2 Criteri di Accettazione Tecnica Swab

I criteri di accettazione per convalidare la *recovery* per la tecnica *rinse* sono:

- %RSD delle sei %Recovery di ciascun analista deve avere un valore $\leq 20\%$;
- La media minima di %Recovery per convalidare la tecnica è 50% ;
- La differenza percentuale della media %Recovery ottenuta da due operatori diversi deve essere $\pm 15\%$.

4.8 Recovery Rate per la Tecnica Rinse

Il recovery rate per la tecnica *rinse* viene calcolato a partire dai risultati della %Recovery ottenuti sperimentalmente.

$$\text{Recovery Rate tecnica rinse} = \bar{x} - (3 \times SD)$$

con:

\bar{x} = Media %Recovery ottenuta dai due analisti ($n = 12$)

SD = Deviazione Standard %Recovery ottenuta dai due analisti ($n = 12$)

Al pari di quello calcolato per la tecnica *swab*, il fattore di recupero sperimentale prende in considerazione la variabilità analitica e sperimentale che sono presenti nell'operazioni di campionamento: l'equazione, infatti, sottrae tre volte la deviazione standard sperimentale alla media delle %Recovery dei due analisti. Tale valore viene utilizzato nei calcoli di routine del residuo di analita, così da garantirne una valutazione in condizioni di *worst-case*.

4.9 Stabilità dell'Attivo sulle Superfici

Durante gli studi di convalida di *recovery* tramite le tecniche *swab* e *rinse*, viene determinata anche la stabilità dell'attivo sulle superfici. Per fare ciò viene depositata una quantità target da recuperare sull'unità di superficie, poi lasciata a temperatura ambiente per un tempo superiore alle 24 ore. Per avere ripetibilità dei risultati ottenuti, la raccolta dei residui viene eseguita in triplicato per ciascun *timepoint* (tre piastre seminate), a cui si aggiunge il controllo negativo (*Blank* non seminato). Nel caso del prodotto farmaceutico PTH-425, procedendo in linea con il resto della convalida, la stabilità viene stabilita depositando il colesterolo, che non è il principio attivo ma un lipide contenuto nelle nanoparticelle lipidiche che avvolgono i frammenti di mRNA.

La stabilità del colesterolo viene testata utilizzando la tecnica *swab* per le superfici in acciaio inossidabile e la tecnica *rinse* per le superfici in EPDM.

Ad ogni *timepoint*, vengono analizzati i seguenti campioni:

- 1 bianco per entrambe le superfici (campione negativo);
- 3 campioni per entrambe le superfici.

Per la preparazione della Soluzione Standard Stock Swab (200 µg/mL) e la Soluzione Standard Stock Rinse (800 µg/mL), utili per la stabilità su acciaio inossidabile con limite 0.2 µg/cm² e EPDM con limite 4 µg/cm² rispettivamente, vengono utilizzate le preparazioni di Soluzione Standard Stock Swab

e Soluzione Standard Stock Rinse, descritte nella Sezione 4.5 e 4.7. Per valutare la stabilità su acciaio inossidabile con limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, viene utilizzata la Soluzione Stock di colesterolo ($498.3411 \mu\text{g}/\text{mL}$) preparata nella Sezione 4.4.5.

Per valutare la stabilità del colesterolo sulle superfici vengono eseguite le seguenti preparazione dei campioni e dei controlli negativi.

- **Preparazione Bianco Swab (limite $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione di bianco *swab* viene preparata come descritto nella Sezione 4.5.

- **Preparazione Campione Swab (limite $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione campione *swab* viene ottenuta da tre superfici in acciaio inossidabile diverse e segue la procedura descritta nella Sezione 4.5.

- **Preparazione Bianco Swab (limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione di bianco *swab* viene preparata come descritto nella Sezione 4.5.

- **Preparazione Campione Swab (limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione campione *swab* viene ottenuta da tre superfici in acciaio inossidabile diverse e segue la procedura illustrata nella Sezione 4.5. Per il limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ viene depositata sulle piastre la Soluzione Stock di colesterolo ($498.3411 \mu\text{g}/\text{mL}$).

- **Preparazione Bianco Rinse (limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione di bianco *rinse* è stata preparata come indicato nella Sezione 4.7.

- **Preparazione Campione Rinse (limite $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$):**

La soluzione campione *rinse* viene preparata su tre superfici in EPDM, seguendo la procedura descritta nella Sezione 4.7.

Una volta effettuata l'analisi, si calcola la concentrazione di colesterolo ottenuta sperimentalmente e la %Recovery per ogni iniezione di ogni *timepoint*:

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Std}}} \times C_{\text{Std}} \times \frac{\text{Diluizione}}{\text{Volume depositato}}$$

con:

A_{Sample} = Area del picco di colesterolo nelle iniezioni del Campione

A_{Std} = Media aree picco di colesterolo nelle iniezioni di Standard di Lavoro ($n = 5$)

C_{Std} = Concentrazione colesterolo (mg/mL)

Diluizione = 2.5 mL

Volume depositato = 0.2 mL

Ottenuta la concentrazione sperimentale, si calcola la %Recovery per ciascun *timepoint*:

$$\%Recovery\ timepoint\ x = \frac{Concentrazione\ sperimentale\ colesterolo\ (\mu g/mL)}{Concentrazione\ teorica\ colesterolo\ (\mu g/mL)} \times 100$$

A questo punto è necessario calcolare la media della %Recovery ottenuta dai campioni, ad un determinato *timepoint*, rispetto alla media della %Recovery ottenuta durante la convalida del metodo analitico con tecnica *swab* e tecnica *rinse*, descritti alla Sezione 4.5.1 e 4.7.1.

$$\%Recovery\ vs\ T0 = \frac{\%Recovery\ timepoint\ x}{\%Recovery\ timepoint\ iniziale} \times 100$$

La stabilità dell'attivo sulle superficie risulta conforme quando il rapporto tra la media %Recovery dei tre campioni ad un *timepoint* x e la %Recovery dei campioni al *timepoint* iniziale (T0), espressa in percentuale, è compreso nell'intervallo 90% - 110%.

4.10 Stabilità dei Campioni sullo Swab

La valutazione della stabilità del campione direttamente seminato sul tampone ha lo scopo di verificarne l'eventuale degradazione nel caso in cui non venissero analizzati immediatamente a causa di imprevisti o esigenze analitiche. L'analisi viene eseguita su campioni *swab* che sono stati utilizzati per recuperare i residui sulle superfici, ma non ancora ricostituiti. Questi campioni vengono conservati in frigorifero al riparo dalla luce, ad una temperatura compresa tra i 2 – 8°C.

Nella convalida vengono sfidati i parametri considerando i campioni *swab* utilizzati per recuperare sulle superfici di 200 cm² in acciaio inossidabile con limite inferiore (0.2 µg/cm²) in accordo alla strategia *worst-case*. Inoltre, la stabilità al limite di 4 µg/cm² su acciaio inossidabile era già stata sfidata e descritta nel *platform method* validato per il recupero di colesterolo descritto nella Sezione 4.4.

Ad ogni *timepoint*, vengono sfidati quattro *swab*:

- 1 bianco *swab* (controllo negativo);
- 3 Campioni tecnica *swab*.

La preparazione della Soluzione Standard Stock (200 µg/mL), utilizzata per valutare la stabilità dei campioni *swab* con limite 0.2 µg/cm², è descritta nella Sezione 4.5.

I campioni e i controlli negativi, utili per valutare la stabilità degli *swab*, vengono preparati seguendo le procedure descritte di seguito.

- **Preparazione Bianco Swab:**

Selezionato uno *swab* pulito e inumidito nella soluzione di recupero, poi inserito in una provetta Falcon. Lo *swab* viene conservato, al riparo dalla luce, ad una temperatura di 2-8°C. Ad ogni *timepoint* vengono aggiunti 2.3 mL di metanolo ($V_{tot} = 2.5$ mL) e viene sonicato per 30 minuti, dopodiché si rimuove lo *swab* e la soluzione finale viene trasferita in una vial HPLC per essere analizzata.

- **Preparazione Campione Swab (limite 0.2 µg/cm²):**

L'operazione viene ripetuta per tre volte, per ogni *timepoint*.

Selezionato uno *swab* pulito e inserito in una provetta Falcon. Con una pipetta Eppendorf vengono depositati accuratamente 0.2 mL della Soluzione Standard Stock (200 µg/mL). La provetta Falcon, contenente il campione *swab*, viene conservata ad una temperatura di 2-8°C al riparo dalla luce. Ad ogni *timepoint* vengono aggiunti 2.3 mL di metanolo ($V_{tot} = 2.5$ mL) e viene sonicato per 30 minuti, dopodiché si rimuove lo *swab* e la soluzione finale viene trasferita in una vial HPLC per essere analizzata (concentrazione finale 16 µg/mL).

Viene calcolata la concentrazione sperimentale di colesterolo per ogni soluzione testata:

$$\text{Concentrazione sperimentale colesterolo } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Std}}} \times C_{\text{Std}} \times \frac{\text{Diluizione}}{\text{Volume depositato}}$$

con:

A_{Sample} = Area del picco di colesterolo nelle iniezioni del Campione

A_{Std} = Media aree picco di colesterolo nelle iniezioni di Standard di Lavoro ($n = 5$)

C_{Std} = Concentrazione colesterolo (mg/mL)

Diluizione = 2.5 mL

Volume depositato = 0.2 mL

Dopo aver ricavato la concentrazione sperimentale è possibile calcolare la %Recovery di ogni soluzione ai diversi *timepoint* (*swab* bianco e campione *swab*).

$$\%Recovery\ swab\ timepoint\ x = \frac{Media\ concentrazione\ sperimentale\ colesterolo\ (\mu g/mL)}{Concentrazione\ teorica\ colesterolo\ (\mu g/mL)} \times 100$$

Per ogni *timepoint* di stabilità *swab*, viene calcolato il rapporto tra la %Recovery ottenuta ad un determinato *timepoint*, delle tre soluzioni campioni, e la media della %Recovery ottenuta al *timepoint* zero (*timepoint* iniziale).

$$\%Recovery\ vs\ T0 = \frac{\%Recovery\ timepoint\ x}{\%Recovery\ timepoint\ iniziale} \times 100$$

Il campione *swab* viene considerato stabile fino a che il valore percentuale della %Recovery vs T0 rientra nell'intervallo di accettazione compreso tra 90% - 110%.

5. Risultati

5.1 Risultati dei Parametri Analitici per la Convalida

5.1.1 Specificità

Nei cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC dei diversi lipidi (SM-102, DMG-PEG2000 e DSPC) non si osservano picchi presenti al tempo di ritenzione del picco principale del colesterolo, che è circa a 11.4 minuti. L'assenza di picchi interferenti con il picco dell'analita conferma la specificità del metodo analitico. Nella Figura 4 viene mostrata il confronto di tutti i cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC dei quattro lipidi che compongono le nanoparticelle lipidiche (LNPs) del prodotto farmaceutico PTH-425:

- a. DMG-PEG2000;
- b. Colesterolo;
- c. SM-102;
- d. DSPC.

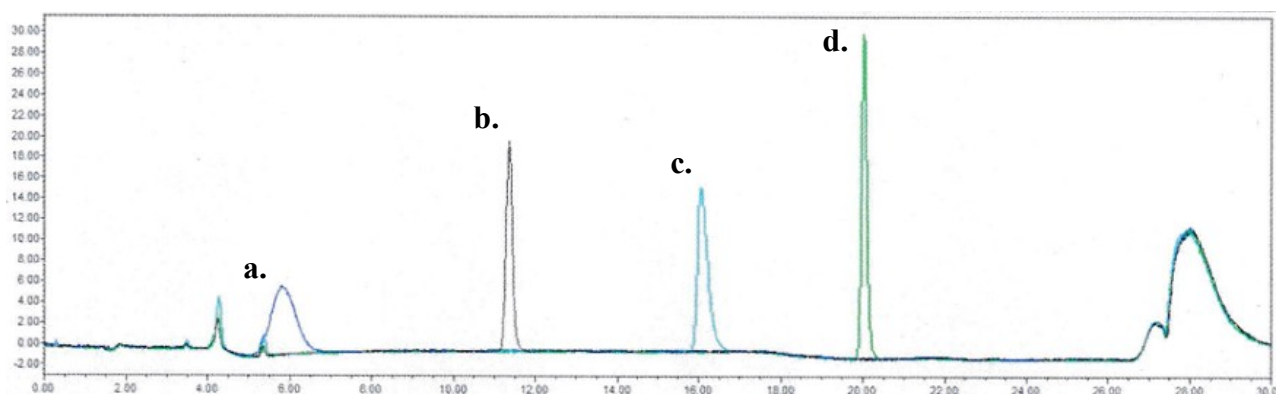


Figura 4 - Confronto dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC

Nella Tabella 8 vengono elencati i risultati e l'esito dell'analisi per il parametro di specificità.

Tabella 8 - Risultati analisi Specificità

Lipide	Tempo di Ritenzione	Criterio di Accettazione	Esito
DMG-PEG2000	5.9 minuti	Nessun picco interferente al tempo di ritenzione del picco del colesterolo	Conforme
SM-102	16.0 minuti	Nessun picco interferente al tempo di ritenzione del picco del colesterolo	Conforme
DSPC	20.1 minuti	Nessun picco interferente al tempo di ritenzione del picco del colesterolo	Conforme

5.1.2 Stabilità delle Soluzioni

I risultati ottenuti per la stabilità della Soluzione Standard di Lavoro (20 µg/mL) e della Soluzione Standard Stock (200 µg/mL) soddisfano i criteri di accettazione fino ad un massimo di 7 giorni dopo la loro preparazione. Le due soluzioni sono state conservate ad una temperatura controllata di 2-8°C e sono state analizzate a differenti *timepoint*.

La Soluzione Standard Stock, diluita ad una concentrazione 20 µg/mL, viene analizzata subito dopo la preparazione (T0) e dopo 7 giorni di conservazione a 2-8°C (Tabella 9).

Tabella 9 - Analisi stabilità Soluzione Standard Stock

Timepoint (Giorni)	Media area colesterolo (n = 3)	%Recovery vs T0	Criterio di Accettazione	Esito
T = 0	237519274			
T = 7	216675125	91%	90% - 110%	Conforme

La Soluzione Standard di Lavoro (20 µg/mL) viene analizzata a tre diversi *timepoint* descritti in Tabella 10.

Tabella 10 - Analisi stabilità Soluzione Standard di Lavoro

Timepoint (Giorni)	Media area colesterolo (n = 3)	%Recovery vs T0	Criterio di Accettazione	Esito
T = 0	237519274			
T = 1	226069159	95%	90% - 110%	Conforme
T = 3	216353671	91%		Conforme
T = 7	220718279	93%		Conforme

5.1.3 Linearità

I dati ottenuti durante l'attività di convalida di linearità vengono rappresentati attraverso una retta di regressione. Questo grafico mette in relazione la concentrazione teorica delle soluzioni preparate (asse X) con la media delle aree del picco di colesterolo di ogni livello analizzato (asse Y).

Tabella 11 - Aree del picco di colesterolo ottenute per ogni livello di Linearità

Livello	Concentrazione Teorica di Colesterolo (µg/mL)	Media area picco Colesterolo
25%	5	62087396
40%	8	96237207
50%	10	108795951
75%	15	189765244
100%	20	243875579
150%	30	344693080
200%	40	470057599

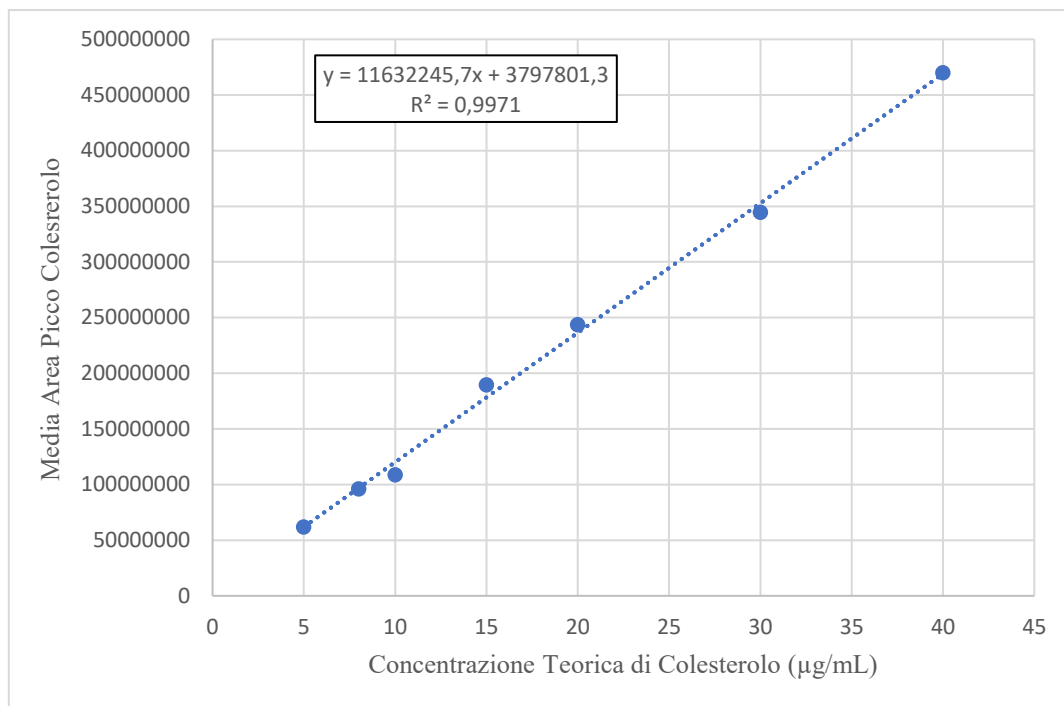


Figura 5 - Retta di Regressione della Linearità

Dalla retta di regressione (Figura 5) vengono estrapolati i valori di pendenza e coefficiente R^2 . Dall'equazione della retta di regressione, riportata sul grafico, si ricava la pendenza come coefficiente angolare.

Tabella 12 - Risultati parametro di Linearità

Parametro	Risultato	Criterio di Accettazione	Esito
R^2	0.997	≥ 0.99	Conforme
Pendenza della retta	11632246		
Errore Standard	8739138		

I risultati ottenuti rispettano i criteri di accettazione prestabiliti, dunque il metodo analitico è lineare da una concentrazione di colesterolo pari a 5 µg/mL ad una concentrazione di 40 µg/mL.

5.1.4 Limite di Quantificazione

Per calcolare il limite di quantificazione (LOQ) sono necessari i risultati ottenuti dalla retta di regressione della linearità (Sezione 5.1.3), in particolare i valori della pendenza e l'errore standard. Una volta ricavati è possibile calcolare il limite attraverso la seguente equazione:

$$LOQ \text{ Teorico} = \frac{10 \times \sigma}{S} = \frac{10 \times 8739138}{11632246} = 7.5129 \mu\text{g/mL}$$

con:

$$\sigma = \text{Errore Standard} = 8739138 \text{ (Sezione 5.1.3)}$$

$$S = \text{Pendenza della retta di regressione} = 11632246 \text{ (Sezione 5.1.3)}$$

Una soluzione avente concentrazione comparabile alla concentrazione teorica del LOQ viene preparata ed analizzata in triplicato. Nella Tabella 13 vengono riportati i valori delle concentrazioni sperimentali di colesterolo ottenute durante la convalida del limite di quantificazione.

Tabella 13 - Risultati LOQ

Soluzione	Concentrazione Sperimentale Colesterolo ($\mu\text{g/mL}$)
Soluzione LOQ 1	7.372
Soluzione LOQ 2	7.271
Soluzione LOQ 3	7.306
Media	7.317
Deviazione Standard	0.051287
%RSD	0.570

Come già visto nella Sezione 4.4.4, il valore medio di concentrazione sperimentale LOQ sottratto al valore teorico deve essere inferiore al 20% del valore teorico LOQ.

$$|7.317 \mu\text{g/mL} - 7.5129 \mu\text{g/mL}| < 7.5129 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{20}{100}$$

$$|0.1959 \mu\text{g/mL}| < 1.5026 \mu\text{g/mL}$$

Inoltre, il valore di LOQ deve essere minore rispetto all'80% del limite di concentrazione stabilito per i campioni, corretto per la recovery percentuale.

$$7.317 \mu\text{g/mL} < 16 \mu\text{g/mL} \times \frac{80}{100} \times RR \left(\frac{1}{100} \right)$$

$$7.317 \mu\text{g/mL} < 8.7168$$

con:

$$RR \left(\frac{1}{100} \right) = \text{Recovery Rate acciaio inossidabile a } 0.2 \mu\text{g/cm}^2 = 0.681$$

Dai risultati ottenuti è possibile affermare la conformità del parametro di limite di quantificazione (LOQ) del metodo analitico per l'acciaio inossidabile.

Come anticipato alla Sezione 4.4, per la convalida di questo parametro viene sfruttato un *platform method*, si utilizza perciò un valore LOQ precedentemente convalidato ma valutato come applicabile anche alla convalida del metodo analitico di PTH-425, in quanto inferiore al valore della concentrazione di Soluzione Standard di Lavoro più bassa utilizzata.

5.1.5 Ripetibilità

Per valutare il parametro di ripetibilità del metodo analitico vengono analizzate sei iniezioni HPLC, della stessa Soluzione di colesterolo (9.9668 µg/mL) preparata dall'Analista 1 nel Giorno 1.

Tabella 14 - Aree e concentrazione colesterolo sperimentale analisi Ripetibilità

Campione	Concentrazione Colesterolo Teorica (µg/mL)	Area Picco Colesterolo	Concentrazione Colesterolo Sperimentale (µg/mL)
1	9.9668	135023742.8547	9.5951
2		134552784.3614	9.5560
3		135125027.1791	9.6035
4		134486865.3849	9.5505
5		136629590.4553	9.7285
6		135291528.6501	9.6174

Dalla concentrazione sperimentale di colesterolo viene calcolato %RSD dei risultati analitici e la differenza percentuale rispetto alla concentrazione teorica. (Tabella 15).

Tabella 15 - Risultati del parametro di Ripetibilità

Media (µg/mL)	Deviazione Standard	%RSD	%Differenza vs Concentrazione Teorica	Criteri di Accettazione	Esito
9.6085	0.0644	0.6711% → 1%	3.5947% → 4%	%RSD ≤ 15% Differenza%: ± 20%	Conforme

Il parametro di ripetibilità risulta conforme e convalidato per il metodo analitico del prodotto farmaceutico PTH-425.

5.1.6 Precisione Intermedia

Per la validazione del parametro di precisione intermedia vengono comparati i risultati ottenuti da due sessioni indipendenti di analisi di ripetibilità. Il procedimento descritto nella Sezione 4.4.5, viene ripetuto da un altro analista il secondo giorno.

Tabella 16 - Aree e concentrazione colesterolo sperimentale analisi di Precisione Intermedia

Campione	Concentrazione Colesterolo Teorica (µg/mL)	Area Picco Colesterolo	Concentrazione Colesterolo Sperimentale (µg/mL)
1	9.9668	133725723.5498	9.4873
2		134583720.1220	9.5586
3		133764368.5492	9.4905
4		132903360.7429	9.4190
5		132562549.3389	9.3907
6		132162820.7004	9.3575

Come per il parametro di ripetibilità, anche per il parametro di precisione intermedia viene calcolato %RSD della media della concentrazione sperimentale di colesterolo e la differenza percentuale rispetto alla concentrazione teorica.

Tabella 17 - Risultati del parametro di Precisione Intermedia

Media (µg/mL)	Deviazione Standard	%RSD	%Differenza vs concentrazione Teorica	Criteri di Accettazione	Esito
9.4506	0.0746	0.7896% → 1%	5.1789% → 5%	%RSD ≤ 15% Differenza%: ± 20%	Conforme

La Tabella 18 riassume i dati ottenuti dalle analisi dei parametri di ripetibilità e precisione intermedia.

Tabella 18 - Risultati dei parametri di Ripetibilità e Precisione Intermedia

Campione	Risultati Analista 1 Giorno 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Risultati Analista 2 Giorno 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Media ($\mu\text{g/mL}$)	%Differenza	Criteri di Accettazione	Esito
1	9.5951	9.4873	9.5296	- 4.3868% \rightarrow - 4%	%Differenza: $\pm 20\%$	Conforme
2	9.5560	9.5586				
3	9.6035	9.4905				
4	9.5505	9.4190				
5	9.7285	9.3907				
6	9.6174	9.3575				

I risultati ottenuti rispettano i criteri di accettazione, dunque la precisione intermedia risulta convalidata per il metodo analitico.

5.1.7 Accuratezza

La convalida del parametro di accuratezza viene eseguita andando ad analizzare in triplicato i tre livelli di concentrazione, che coprono l'intero intervallo di lavoro. I livelli di concentrazione di colesterolo scelti per valutare l'accuratezza sono:

- Livello colesterolo LOQ (9.9668 $\mu\text{g/mL}$)
- Livello colesterolo 100% (39.8672 $\mu\text{g/mL}$)
- Livello colesterolo 200% (79.7345 $\mu\text{g/mL}$)

Tabella 19 - Aree e concentrazione colesterolo sperimentale analisi di Accuratezza

Livello Accuratezza	Area Picco Colesterolo	Concentrazione Colesterolo Sperimentale (µg/mL)	Media Concentrazione Sperimentale (µg/mL)
Livello LOQ_1	132086325.0292	9.3511	9.3606
Livello LOQ_2	131289047.4280	9.2849	
Livello LOQ_3	133225727.6864	9.4458	
Livello 100%_1	509215786.8940	40.6721	40.9777
Livello 100%_2	517527679.6621	41.3624	
Livello 100%_3	511945130.6413	40.8987	
Livello 200%_1	979199461.4089	79.7046	79.9488
Livello 200%_2	996193435.9543	81.1160	
Livello 200%_3	971026408.1497	79.0258	

Tabella 20 - Risultati del parametro di Accuratezza

Livello Accuratezza	Accuratezza	Criteri di Accettazione	Esito
Livello LOQ	93.9183% → 94%	Valore %Accuratezza compreso nell'intervallo 80% - 120%	Conforme
Livello 100%	102.7856% → 103%		
Livello 200%	100.2688% → 100%		

Il valore di accuratezza percentuale di tutte e tre i livelli rispetta il limite prestabilito ed il parametro è convalidato per il metodo analitico.

5.1.8 Robustezza

Durante il test della robustezza vengono eseguiti diversi *System Suitability Test* (SST), con piccole differenze nei parametri o nell'attrezzatura utilizzata. L'obiettivo è confermare la robustezza del metodo analitico, ossia la capacità del metodo di ottenere dei risultati consistenti anche in presenza di piccole variazioni.

Come descritto nella Sezione 4.4, per la convalida dei parametri analitici viene sfruttato un *platform method*. I risultati ottenuti dalla convalida della robustezza, di un altro metodo analitico, possono

essere impiegati anche per convalidare la robustezza del metodo analitico di PTH-425, poiché le variazioni applicate risultano comparabili tra i due metodi analitici.

Tabella 21 - Risultati del parametro di Robustezza

Parametri	%RSD Colesterolo	Tailing Factor Colesterolo	Criteri di Accettazione	Esito		
Differente Colonna Cromatografica	0.4	1.0	Bianco: %Area picco interferente ≤ 0.1%	Conforme		
Flusso: - 0.1 mL/min	0.4	1.0		Conforme		
Flusso: + 0.1 mL/min	0.7	1.0		Conforme		
Temperatura colonna: + 1°C	0.4	1.0		Conforme		
Temperatura colonna: - 1°C	0.4	1.0		Conforme		
Fase Mobile A	MQW: NH4Ac (97:3)			Soluzione Standard: %RSD ≤ 5.0%	Conforme	
Target: MQW: NH4Ac (95:5)	0.3	1.0				
	MQW: NH4Ac (93:7)				Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme
	0.6	1.0				
Fase Mobile B	NH4Ac: IPA: ACN (5:60:35)			Soluzione Standard: %RSD ≤ 5.0%	Conforme	
		0.2	1.0			
		NH4Ac: IPA: ACN (5:64:31)		Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme	
		0.2	1.0			
	Target: NH4Ac: IPA: ACN (5:62:33)	NH4Ac: IPA: ACN (7:62:31)		Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme	
		0.5	1.1			
		NH4Ac: IPA: ACN (3:62:35)		Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme	
		0.4	1.0			
		NH4Ac: IPA: ACN (3:64:33)		Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme	
		0.7	1.0			
	NH4Ac: IPA: ACN (7:60:33)		Tailing factor: 0.8÷1.5	Conforme		
	0.6	1.0				

Tabella 22 - Continua

Parametri	%RSD Colesterolo	Tailing Factor Colesterolo	Criteri di Accettazione	Esito
pH del Buffer (4.0 vs 4.2)	0.7	1.0		Conforme
pH del Buffer (4.4 vs. 4.2)	0.5	1.0		Conforme

Tutti i risultati ottenuti dalle diverse analisi SST con delle leggere variazioni rispettano i criteri di accettazione, ciò ha permesso di confermare il parametro di robustezza del metodo analitico.

5.2 Risultati della Convalida del Metodo di Recupero con Tecnica Swab

Durante la convalida, le piastre rappresentative in acciaio inossidabile di dimensione 200 cm² vengono seminate con una quantità nota di colesterolo in modo tale da raggiungere il valore di residuo prestabilito *worst-case* (0.2 µg/cm²).

Inizialmente il campionamento viene eseguito utilizzando una soluzione di Alcol Isopropilico (IPA) 100%, come descritto nella Sezione 2.4.1.1. La scelta del solvente di campionamento viene eseguita tenendo in considerazione i risultati positivi ottenuti in altre convalide di *cleaning*, eseguite utilizzando il medesimo *platform method*. In questo caso però, i risultati ottenuti non rispettano i criteri di accettazione imposti, avendo un valore di recovery inferiore al 50% (Tabella 22).

Tabella 23 - %Recovery tecnica swab su acciaio inossidabile

Campione	Concentrazione (µg/mL)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	15.832	5.3769	34.0
2		5.482	34.6
3		5.160	32.6
4		4.176	26.4
5		5.253	33.2
6		5.181	32.4

Tabella 23 - Risultati tecnica swab su acciaio inossidabile

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
32.2	3.0	9.2	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Non Conforme

Per ottenere dei risultati che rispettino i criteri di accettazione si è deciso di effettuare dei test di fattibilità seguendo due strategie diverse:

- Differente solvente di campionamento: vengono fatti dei test utilizzando una soluzione 100% di etanolo e una miscela di etanolo e alcol isopropilico 50:50.
- Differente numero di *swab* utilizzati: il recupero sulla superficie viene eseguito due volte utilizzando due *swab* diversi con IPA 100% come solvente di campionamento.

Tabella 24 - Risultati %Recovery test di fattibilità

Solvente di Campionamento	Tecnica	%Recovery
EtOH 100%	1 swab	32.6
IPA:EtOH 50:50	1 swab	53.3
IPA 100%	2 swab	41.0

La %Recovery più alta ottenuta risulta essere quella del test eseguito con un solo *swab* e una soluzione 50:50 di IPA e EtOH, per questo motivo si decide di utilizzare questa miscela come solvente di campionamento per la convalida del metodo di *recovery* con tecnica *swab*.

Le piastre in acciaio inossidabile da 200 cm² vengono seminate nuovamente con una quantità nota di colesterolo e si eseguono i campionamenti utilizzando il nuovo solvente di campionamento, da due analisti diversi.

Tabella 25 - %Recovery swab - Analista 1

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	15.963	12.773	80.0
2		11.427	71.6
3		13.644	85.5
4		12.443	77.9
5		12.136	76.0
6		12.539	78.6

Tabella 26 - Risultati %Recovery swab - Analista 1

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
78.3	4.6	5.9	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Conforme

Tabella 27 - %Recovery swab - Analista 2

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	15.963	12.925	81.0
2		13.100	82.1
3		12.597	78.9
4		12.975	81.3
5		11.960	74.9
6		13.009	81.5

Tabella 28 - Risultati %Recovery swab - Analista 2

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
79.9	2.7	3.4	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Conforme

Tabella 29 - Risultati %Differenza Analista 1 e Analista 2

%Recovery Analista 1	%Recovery Analista 2	Media %Recovery (n=12)	%Differenza	Criteri di Accettazione	Esito
78.3	79.9	79.1	1.1	%Differenza: \pm 15%	Conforme

I criteri di accettazioni prestabiliti vengono rispettati da tutti i risultati ottenuti; dunque, viene convalidato il metodo di *recovery* tramite tecnica *swab* su superficie di 200 cm² in acciaio inossidabile.

5.3 Risultati Recovery Rate per la Tecnica Swab

Il *recovery rate* viene calcolato utilizzando la media e la deviazione standard dei valori di %Recovery ottenuti dall'analista 1 e analista 2, descritti nella Sezione 5.2.

$$\text{Recovery Rate tecnica swab} = \bar{x} - (3 \times SD) = 79.1 - (3 * 3.68) = 0.6805 = 68.1\%$$

con:

$$\bar{x} = \text{Media \%Recovery ottenuta dai due analisti (79.1\%)}$$

$$SD = \text{Deviazione Standard \%Recovery ottenuta dai due analisti (3.68)}$$

Il *recovery rate* ottenuto dall'attività di *cleaning* tramite tecnica *swab* è pari a 68,1%, questo valore verrà utilizzato per entrambi i limiti di residuo (0.2 µg/cm² e 4 µg/cm²) sulle superfici in acciaio inossidabile.

5.4 Risultati della Convalida del Metodo di Recupero con Tecnica Rinse

Nel documento *Cleaning Validation Master Plan* viene descritto il campionamento su superficie EPDM di dimensione 200 cm² tramite la tecnica *swab*. I risultati ottenuti però non rispettano i criteri di accettazione (Tabella 31) e si decide quindi di eseguire dei test di fattibilità.

Tabella 30 - %Recovery tecnica swab su EPDM

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	15.832	0.639	4.0
2		1.044	6.6
3		0.682	4.3
4		0.912	0.6
5		0.699	4.4
6		0.727	4.6

Tabella 31 - Risultati tecnica swab su EPDM

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
4.1	1.9	47.7	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Non Conforme

I test di fattibilità, o *feasibility*, vengono eseguiti andando a modificare alcuni parametri dell'analisi in modo tale da ottenere dei risultati che siano conformi e rispettino i limiti. In questo caso vengono intraprese due strategie diverse:

- a. Differente solvente di campionamento: vengono eseguiti diversi test utilizzando miscele con diversi reagenti a diverse concentrazioni.
- b. Differente numero di *swab*: la superficie EPDM viene campionata due volte da due differenti *swab*.

Tabella 32 - Risultati %Recovery test di fattibilità tecnica swab

Solvente di Campionamento	Tecnica	%Recovery
EtOH:MQW (80:20)	1 swab	3.1
EtOH (100%)	1 swab	6.5
IPA:EtOH (50:50)	1 swab	6.8
IPA (100%)	2 swab	13.0
MeOH (100%)	1 swab	2.3
MeOH (100%)	2 swab	2.5
IPA (100%)	1 swab	9.1
IPA (100%)	2 swab	17.3

Dai risultati ottenute si evince che la tecnica *swab* non è efficace sulla superficie EPDM, poiché si ottengono valori di %Recovery bassi.

Vengono eseguiti ulteriori test di fattibilità andando a sostituire la tecnica di campionamento *swab* con la tecnica *rinse*. Si eseguono i campionamenti, come descritto nella Sezione 2.4.1.2, utilizzando le soluzioni illustrate nella Sezione 4.7.

Tabella 33 - Risultati %Recovery test di fattibilità tecnica rinse

Diluyente	Tecnica	%Recovery
MeOH	Rinse	97.2
MeOH	Rinse	98.5

I valori di %Recovery ottenuti per entrambi i test soddisfano il criterio di accettazione (%Recovery $\geq 50\%$), per questo motivo la tecnica *rinse* viene scelto per la convalida del metodo di recupero sulla superficie EPDM.

Durante l'esercizio di convalida vengono selezionate le porzioni del palmo dei guanti in EPDM, di dimensione 600 cm². Queste vengono seminate con un quantitativo noto di colesterolo in modo da raggiungere un valore di residuo pari a 4 µg/cm². I campionamenti tramite tecnica *rinse* vengono eseguiti come descritto nella Sezione 2.4.1.2, utilizzando le soluzioni preparate nella Sezione 4.7.

Tabella 34 - %Recovery rinse - Analista 1

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	23.843	10.389	43.6
2		11.670	48.9
3		13.716	57.5
4		13.620	57.1
5		11.480	48.1
6		11.585	48.6

Tabella 35 - Risultati %Recovery rinse - Analista 1

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
50.6	5.5	10.9	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Conforme

Tabella 36 - %Recovery rinse - Analista 2

Campione	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)		%Recovery
	Teorica	Sperimentale	
1	23.843	11.558	48.5
2		13.862	58.1
3		11.626	48.8
4		13.670	57.3
5		12.857	53.9
6		11.155	46.8

Tabella 37 - Risultati %Recovery rinse - Analista 2

Media %Recovery	Deviazione Standard	%RSD	Criteri di Accettazione	Esito
52.2	4.9	9.4	Recovery \geq 50% %RSD \leq 20%	Conforme

Tabella 38 - Risultati %Differenza Analista 1 e Analista 2 rinse

%Recovery Analista 1	%Recovery Analista 2	Media %Recovery (n=12)	%Differenza	Criteri di Accettazione	Esito
50.6	52.2	51.4	2	%Differenza: \pm 15%	Conforme

I dati ottenuti dall'attività di convalida risultano tutti conformi in quanto rispettano i criteri di accettazione, il metodo di recupero tramite tecnica *rinse* su superficie di 600 cm² in EPDM viene dunque convalidato.

5.5 Risultati Recovery Rate per la Tecnica Rinse

Per effettuare il calcolo del *recovery rate* sono necessarie la media e la deviazione standard dei valori di %Recovery ottenuti dall'analista 1 e analista 2, descritti nella Sezione 5.4.

$$\text{Recovery Rate Tecnica Swab} = \bar{x} - (3 \times SD) = 51.4 - (3 \times 5.04) = 0.3631 = 36.3\%$$

con:

$$\bar{x} = \text{Media \%Recovery ottenuta dai due analisti (51.4\%)}$$

$$SD = \text{Deviazione Standard \%Recovery ottenuta dai due analisti (5.04)}$$

Il *recovery rate* ottenuto dall'attività di convalida mediante tecnica *rinse* è pari a 36,3% e verrà utilizzato nelle analisi di routine per i calcoli del residuo di analita.

5.6 Risultati della Stabilità dell'Attivo sulle Superfici

La stabilità del colesterolo su acciaio inossidabile e EPDM viene testata rispettivamente con tecnica *swab* e tecnica *rinse*. La stabilità viene determinata andando a depositare una quantità nota di colesterolo su tre superfici uguali che vengono poi lasciate a temperatura ambiente per un periodo superiore alle 24 ore. Trascorso un periodo di tempo prestabilito il residuo verrà campionato con tecnica *swab* (acciaio inossidabile) o *rinse* (EPDM) e analizzato. Per valutare la stabilità del

colesterolo sulle superfici, viene utilizzato il valore medio delle dodici repliche della %Recovery come valore al *timepoint* zero, ottenuto durante la convalida dei metodi di recupero per i limiti corrispondenti su entrambi le superfici.

Tabella 39 - Risultati stabilità del colesterolo su acciaio inossidabile limite 0.2 µg/cm²

Campione	Concentrazione Sperimentale (µg/mL)	Media Concentrazione (µg/mL)	%Recovery vs T0	Criteri di Accettazione	Esito
Swab T0_1	12.773	12.627			
Swab T0_2	11.427				
Swab T0_3	13.644				
Swab T0_4	12.443				
Swab T0_5	12.136				
Swab T0_6	12.539				
Swab T0_7	12.925				
Swab T0_8	13.100				
Swab T0_9	12.597				
Swab T0_10	12.975				
Swab T0_11	11.960				
Swab T0_12	13.009				
Swab T24h_1	9.243	9.370	74.2%	%Recovery vs T0: 90 – 110%	Non Conforme
Swab T24h_2	8.990				
Swab T24_3	9.877				

I risultati della stabilità del colesterolo su acciaio inossidabile con limite 0.2 µg/cm², dopo 24 ore dalla preparazione, non rispettano i criteri di accettazione imposti. Per questo motivo, la stabilità viene considerata pari a 4 ore che, in accordo alle procedure interne aziendali, è considerato il minimo quantitativo di tempo necessario per concludere la manifattura ed eseguire la procedura di campionamento tramite *swab*.

Tabella 40 - Risultati stabilità del colesterolo su acciaio inossidabile limite 4 µg/cm²

Campione	Concentrazione Sperimentale (µg/mL)	Media Concentrazione (µg/mL)	%Recovery vs T0	Criteri di Accettazione	Esito
Swab T0_1	460.342	412.853			
Swab T0_2	451.603				
Swab T0_3	448.474				
Swab T0_4	433.860				
Swab T0_5	421.616				
Swab T0_6	437.500				
Swab T0_7	387.830				
Swab T0_8	363.030				
Swab T0_9	388.593				
Swab T0_10	413.382				
Swab T0_11	381.519				
Swab T0_12	377.488				
Swab T72h_1	443.156	444.805	107.7%	%Recovery vs T0: 90 – 110%	Conforme
Swab T72h_2	450.534				
Swab T72h_3	440.726				

Per la stabilità del colesterolo su acciaio inossidabile con limite 4 µg/cm² vengono ottenuti risultati conformi che soddisfano il criterio di accettazione. La Soluzione Standard di colesterolo (498.3411 µg/mL) rimane stabile sulla superficie per 72 ore (3 giorni).

Tabella 41 - Risultati stabilità del colesterolo su EPDM Limite 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Campione	Concentrazione Sperimentale ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Media Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%Recovery vs T0	Criteri di Accettazione	Esito
Rinse T0_1	10.389	12.266			
Rinse T0_2	11.670				
Rinse T0_3	13.716				
Rinse T0_4	13.620				
Rinse T0_5	11.480				
Rinse T0_6	11.585				
Rinse T0_7	11.558				
Rinse T0_8	13.862				
Rinse T0_9	11.626				
Rinse T0_10	13.670				
Rinse T0_11	12.857				
Rinse T0_12	11.155				
Rinse T24h_1	3.998	1.380	11.3%	%Recovery vs T0: 90 – 110%	Non Conforme
Rinse T24h_2	0.089				
Rinse T24h_3	0.053				

I risultati ottenuti dalla stabilità del colesterolo su EPDM con limite 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, dopo 24 ore dalla preparazione, non rispettano i criteri di accettazione. Dunque, la stabilità viene considerata pari a 4 ore, che è il tempo necessario per concludere la manifattura ed eseguire la procedura di campionamento tramite *rinse*.

Tabella 42 - Sommario delle stabilità del colesterolo sulle superfici

Superficie	Limite	Stabilità
Acciaio Inossidabile	4 µg/cm ²	72 ore
	0.2 µg/cm ²	4 ore
EPDM	0.2 µg/cm ²	4 ore

5.7 Risultati della Stabilità dei Campioni Swab

I campioni *swab*, non ancora ricostituiti, vengono conservati in un frigorifero a temperatura controllata di 2-8°C. Ad ogni *timepoint* gli *swab* verranno ricostituiti e analizzati.

Lo scopo dell'analisi è quello di verificare l'integrità del residuo presente sugli *swab* dopo il campionamento, in modo da verificarne la stabilità nel caso in cui non possano essere immediatamente analizzati.

Tabella 43 - Risultati campioni swab limite 0.2 µg/cm²

Campione	Concentrazione Sperimentale (µg/mL)	Media Concentrazione (µg/mL)	%Recovery vs T0	Criteri di Accettazione	Esito
Swab T0_1	16.376	16.353			
Swab T0_2	16.291				
Swab T0_3	16.393				
Swab T24h_1	16.118	16.157	98.8%	%Recovery vs T0: 90-110%	Conforme
Swab T24h_2	16.089				
Swab T24h_3	16.265				
Swab T48h_1	15.273	15.167	92.7%	%Recovery vs T0: 90-110%	Conforme
Swab T48h_2	15.193				
Swab T48h_3	15.037				

Dai risultati ottenuti si evince che il campione *swab*, con limite di residuo 0.2 µg/cm², è stabile per 48 ore ad una temperatura compresa tra i 2°C e gli 8°C.

Tabella 44 - Risultati campioni *swab* limite 4 µg/cm²

Campione	%Recovery	Media %Recovery	%Recovery vs T0	Criteri di Accettazione	Esito
Swab T0_1	454.830	456.342			
Swab T0_2	448.610				
Swab T0_3	465.919				
Swab T24h_1	467.864	468.360	97.4%	%Recovery vs T0: 90-110%	Conforme
Swab T24h_2	464.491				
Swab T24h_3	472.854				
Swab T48h_1	466.559	463.011	98.6%	%Recovery vs T0: 90-110%	Conforme
Swab T48h_2	460.336				
Swab T48h_3	462.126				

I risultati ottenuti mostrano che la stabilità del campione *swab* con limite 4 µg/cm² è pari a 48 ore: i risultati ottenuti, infatti, sui campioni analizzati 2 giorni dopo la preparazione rispettano i criteri di accettazione prestabiliti.

Tabella 45 - Sommario risultati stabilità campioni *swab*

Materiale	Limite	Stabilità
Acciaio Inossidabile	4 µg/mL	72 h a 2-8°C
	0.2 µg/mL	48 h a 2-8°C

6. Conclusioni

Nell'ambito del presente progetto di tesi, è stato convalidato un metodo di *cleaning* delle linee produttive seguendo le linee guide ICH e le procedure operative standard aziendali (SOP).

Durante il tirocinio ho partecipato alla preparazione e all'esecuzione dei test di convalida del metodo di *recovery* tramite tecnica *swab* e *rinse*, affiancando analisti e scientist dedicati al progetto. Inoltre ho contribuito all'attività di stesura dei protocolli e dei report relativi.

Nell'esercizio di convalida del metodo analitico di *cleaning* sono stati eseguiti i test richiesti da linee guida ICH, in modo tale da poter validare il metodo all'uso GMP. I risultati ottenuti nei test sui parametri analitici, campionamento su superfici e stabilità soddisfano i criteri di accettazione stabiliti.

Nella Tabella 46 vengono riportati tutti i parametri analitici valutati durante la convalida del metodo analitico di *cleaning*.

Tabella 46 - Sommario dei risultati ottenuti durante la convalida del metodo analitico di *cleaning*

Test Analitici	Criteri di Accettazione	Esito
Specificità	Nessun picco interferente al tempo di ritenzione del picco del colesterolo.	Conforme
Stabilità delle Soluzioni	La %Recovery vs T0 deve essere compresa nell'intervallo 90% - 110%.	Soluzioni stabili fino a 7 giorni dalla preparazione
Linearità	Il coefficiente R ² deve essere ≥ 0.99.	Conforme
Limite di Quantificazione (LOQ)	<ul style="list-style-type: none"> La sottrazione tra la media del valore LOQ sperimentale e LOQ teorico deve essere minore del 20% del valore LOQ teorico. $ Media\ valore\ LOQ\ sperimentale - Valore\ LOQ\ teorico < Valore\ LOQ\ teorico \times \frac{20}{100}$ <ul style="list-style-type: none"> La media del valore LOQ sperimentale deve essere minore dell'80% della concentrazione del campione, corretta per la %Recovery. $Media\ valore\ LOQ\ sperimentale < 20 \frac{\mu g}{mL} \times \frac{80}{100} \times \%Recovery$	Conforme

Tabella 46 - Continua

Test Analitici	Criteri di Accettazione	Esito
Ripetibilità	<ul style="list-style-type: none"> • Il valore di %RSD delle concentrazioni di colesterolo ottenute sperimentalmente deve essere $\leq 15\%$; • La Differenza% della media delle concentrazioni di colesterolo ottenute sperimentalmente rispetto alla concentrazione di colesterolo teorica deve essere compresa nell'intervallo $\pm 20\%$. 	Conforme
Precisione Intermedia	<ul style="list-style-type: none"> • Il valore di %RSD delle concentrazioni di colesterolo ottenute sperimentalmente deve essere $\leq 15\%$; • La Differenza% della media delle concentrazioni di colesterolo ottenute sperimentalmente rispetto alla concentrazione di colesterolo teorica deve essere compresa nell'intervallo $\pm 20\%$. 	Conforme
Accuratezza	<ul style="list-style-type: none"> • Il valore %Accuratezza deve essere compreso nell'intervallo $80\% - 120\%$. 	Conforme
Robustezza	<ul style="list-style-type: none"> • Bianco: No picchi interferenti; • Standard di Lavoro: %RSD $\leq 5.0\%$; • Tailing Factor: $0.8 \div 1.5$. 	Conforme (per tutte le combinazioni sfidate)
Metodo di Recupero Tecnica Swab	<ul style="list-style-type: none"> • La %RSD dei sei valori di %Recovery ottenuti dall'analista 1 e dall'analista 2 deve essere $\leq 20\%$; • La media del valore di %Recovery dei campioni deve essere $\geq 50\%$; • La Differenza Percentuale della media del valore di %Recovery ottenuta da entrambi gli analisti deve essere compresa nell'intervallo $\pm 15\%$. 	Conforme
Metodo di Recupero Tecnica Rinse	<ul style="list-style-type: none"> • La %RSD dei sei valori di %Recovery ottenuti dall'analista 1 e dall'analista 2 deve essere $\leq 20\%$; • La media del valore di %Recovery dei campioni deve essere $\geq 50\%$; • La Differenza Percentuale della media del valore di %Recovery ottenuta da entrambi gli analisti deve essere compresa nell'intervallo $\pm 15\%$. 	Conforme

Tabella 46 - Continua

Test Analitici	Criteri di Accettazione	Esito
Stabilità dell'Attivo sulle Superfici	La %Recovery vs T0 deve essere compresa nell'intervallo 90% - 110%.	Stabilità su acciaio inossidabile limite 4 µg/cm ² : 72 ore Stabilità su acciaio inossidabile limite 0.2 µg/cm ² : 4 ore Stabilità su EPDM limite 0.2 µg/cm ² : 4 ore
Stabilità dei Campioni Swab	La %Recovery vs T0 deve essere compresa nell'intervallo 90% - 110%.	Stabilità swab limite 4 µg/cm ² : 72 ore Stabilità swab limite 0.2 µg/cm ² : 48 ore

I risultati ottenuti da tutti i test eseguiti per ogni parametro analitico rientrano nei criteri di accettazione definiti, dunque conformi. I risultati degli studi per valutare la stabilità della soluzione soddisfano i criteri di accettazione fino ad un massimo di 7 giorni. I risultati ottenuti dall'analisi di stabilità del colesterolo sulle superfici confermano che il lipide rimane stabile per 72 ore su acciaio inossidabile con limite 4 µg/cm², per 4 ore su acciaio inossidabile con limite 0.2 µg/cm² e su EPDM con limite 0.2 µg/cm².

I risultati della convalida del metodo di *recovery* tramite metodo *swab* e metodo *rinse* soddisfano i limiti e sono quindi conformi. Perciò come metodo di recupero, su acciaio inossidabile con limite 4

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e limite $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ viene convalidata la tecnica *swab* mentre su EPDM con limite $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ viene convalidata la tecnica *rinse*.

Dato che tutti i risultati dei test eseguiti sono conformi, è possibile concludere positivamente la convalida del metodo analitico di *cleaning* del prodotto farmaceutico PTH-425. Il metodo viene ritenuto idoneo e qualificato all'utilizzo cGMP nel Laboratorio QC PDS presso il sito di Thermo Fisher Scientific Monza.

7. Bibliografia

- [1] ICH Harmonised Guideline, “Validation of Analytical Procedures Q2(R2) Final version, (adopted on 1 November 2023)
- [2] ICH Harmonised Guideline, “Analytical Procedure Development Q14” Final Version, (Adopted on 1 November 2023)
- [3] Gote, V.; Bolla, P.K.; Kommineni, N.; Butreddy, A.; Nukala, P.K.; Palakurthi, S.S.; Khan, W. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* (2023), 24, 2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
- [4] Peng, M., Mo, Y., Wang, Y. et al. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy. *Mol Cancer* 18, 128 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1055-6>
- [5] Sparić, R.; Andjić, M.; Babović, I.; Nejković, L.; Mitrović, M.; Štulić, J.; Pupovac, M.; Tinelli, A. Molecular Insights in Uterine Leiomyosarcoma: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* (2022), 23, 9728. <https://doi.org/10.3390/ijms23179728>
- [6] ICH Harmonised Tripartite Guideline “Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients Q7” Current Step 4 version, (dated 10 November 2000)
- [7] Lamei Ramandi S, Asgharian R. Evaluation of Swab and Rinse Sampling Procedures and Recovery Rate Determination in Cleaning Validation Considering Various Surfaces, Amount and Nature of the Residues and Contaminants. *Iran J Pharm Res.* (2020) Summer;19(3):383-390. doi: 10.22037/ijpr.2020.1101173
- [8] Analytical Methods for Cleaning Validation, Zahid Zaheer and Rana Zainuddin, *Der Pharmacia Lettre*, (2011), 3 (6): 232-239. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- [9] Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan: Introduction to modern liquid chromatography, 3rd ed. (2010), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4483-0>
- [10] Scott, Brandon & Zhang, Kelly & Wigman, Larry. (2013). Material Identification by HPLC with Charged Aerosol Detection. *Lc Gc North America*. 31. 564-569.