

# La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 77 | Avril 2023  
Trimestriel

Développement d'une nouvelle approche préventive pour réduire les infections microbiennes avec les nanoparticules d'oxydes métalliques

Overcoming Challenges in the development of lentiviral vector Manufacturing Platforms.

Overcoming obstacles in downstream bioprocessing of AAV based gene Therapy Products.

Le pouvoir magnétique des nanoparticules : triage magnétique cellulaire, dépollution des milieux & nanocatalyseurs réutilisables.

## Thérapie Cellulaire

www.a3p.org

ISSN 1298-0471



# Sommaire

N°77 // Avril 2023

Édito   Stratégie d'accélération : Biothérapies innovantes & Bioproduction .....	3
Ils ont participé à ce numéro   Nos contributeurs .....	4
Billet d'humeur   Crise de l'énergie, impacts sur nos industries. ....	5
Actualités A3P   A3P Technologie Barrière .....	6
Actualités A3P   A3P Single Use .....	9
Réglementaire   .....	10
Synthèse événement A3P   A3P Transformation Digitale 4.0 .....	12
Gene Therapy   Gene therapy manufacturing comes of age: Commercial-scale manufacturing is imminent. Are gene therapy innovators ready? .....	15
Gene Therapy   Overcoming obstacles in downstream bioprocessing of AAV based gene Therapy Products .....	20
Gene Therapy   Overcoming Challenges in the development of lentiviral vector Manufacturing Platforms .....	24
Gene & Cell Therapy   Are modern scalable bioreactors the Cell Culture Strategy needed for Gene & Cell Therapy success? .....	30
Gene Therapy   Le pouvoir magnétique des nanoparticules : triage magnétique cellulaire, dépollution des milieux et nanocatalyseurs réutilisables .....	33
Nanoparticule   Développement d'une nouvelle approche préventive pour réduire les infections microbiennes avec les nanoparticules d'oxydes métalliques .....	39
Contamination   Surveillance numérique de l'environnement : détecter les défaillances avant qu'elles ne se produisent .....	44
Sterile   Maximizing Sterility Assurance: Sterile Hold Time Testing for Sterilized Items Used in Parenteral Drug Manufacturing .....	47

## La Vague

Revue trimestrielle N° 77 -Avril 2023  
Numéro offert aux adhérents de l'Association (valeur 10€)

• Directeur de la Publication  
Didier MEYER, Vice-Président A3P  
dgastonmeyer@gmail.com

• Rédactrice en chef  
Anne RIGOULOT

• Comité de lecture  
Frédéric BAR, Frédéric ESTASSY, Arnaud HUC, Hervé TASSERY, Lauriane ZUCHUAT

• Coordination & DA-conception  
Sophie TORGUE  
storgue@a3pservices.com

• Impression  
VL développement  
42000 Saint-Just-Saint-Rambert

• Editeur  
A3P Association  
30, rue Pré Gaudry - 69007 Lyon

• Dépôt légal à parution  
N° d'ISSN : 1298-0471

Tous droits réservés. Les articles publiés n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs.

Imprimé sur du papier issu de forêts durables.



## Les avantages de l'adhésion A3P

### Inscrivez le site\* de votre entreprise & faites bénéficier de toute la base documentaire, à vos collaborateurs



Faire partie du **réseau A3P**, recevoir tous les trimestres sur votre bureau la version papier du magazine, et depuis votre espace personnalisé sur le site A3P, bénéficier de tous les **contenus techniques, scientifiques et réglementaires**, accéder aux **annuaires adhérents et sociétés**, participer à des **événements privilégiés**, utiliser l'**application mobile**, ...

<p><b>Tout le contenu des événements A3P</b> conférences, ateliers, ...</p>	<p><b>Réglementaire</b> veille, warning letter, ...</p>	<p><b>Tous les Guides Techniques &amp; scientifiques</b></p>	<p><b>Annuaire des membres du réseau</b></p>
---	---	--	--

Toutes les infos sur [www.a3p.org/adhesion/](http://www.a3p.org/adhesion/)

\*La cotisation Site fait référence à une adresse postale d'un laboratoire de production d'une société prestataire / fournisseur ou d'un siège social. Le montant est défini selon le nombre de salariés attachés au site. Cotisation valable 1 an de date à date et dans tous les pays où l'Association A3P est représentée.

## Edito

Par Alain RACHON - Membre du Conseil d'Administration A3P

# Stratégie d'accélération : Biothérapies innovantes & Bioproduction

Depuis les années 80 et la mise sur le marché de l'insuline recombinante, nous sommes les témoins d'une véritable **révolution pharmacologique** ! En à peine 40 ans, l'essor des biotechnologies a permis le développement de substances biologiques hautement actives et sélectives apportant une réponse thérapeutique éprouvée dans de multiples indications telles que l'oncologie, l'immunologie ou l'infectiologie... Plus récemment, la pandémie Covid 19 a permis au grand public de se familiariser avec des termes nouveaux (Vaccins ARN messenger, Nano particules virales, Vecteurs viraux, Anticorps monoclonaux, ...) ainsi qu'avec les noms de nouveaux acteurs (BioNtech, Moderna, CureVac, NovaVax...) jusqu'ici réservés aux initiés. Parallèlement et malheureusement, les maladies génétiques rares demeurent toujours incurables par manque de solution thérapeutique. Cependant depuis 2007 et les travaux de Yamanaka couronnés par le Prix Nobel de Médecine en 2012 sur la reprogrammation génétique des cellules somatiques, les médicaments de thérapie avancée (ou ATMP) offrent désormais des espoirs immenses grâce à **la thérapie génique**, qui consiste à réparer un gène défectueux ou à réintroduire un gène fonctionnel dans l'organisme et à **la thérapie cellulaire**, qui consiste à injecter des cellules ou un patch cellulaire pour réparer les organes et restaurer une fonction. Mais quel est le dénominateur commun entre toutes ces technologies et solutions thérapeutiques ? Elles sont à 100%, développées et produites par des sociétés exploitant les capacités des sciences du vivant et du génie génétique afin de générer la substance active. S'il en est encore besoin, 2 chiffres supplémentaires permettent de se convaincre de l'importance capitale prises par les biothérapies en 2021 : 7 médicaments d'origine biologique sont classés dans le Top 10 des blockbusters pharmaceutiques et 50% des candidats médicament en développement préclinique ou clinique (Phase 1 / 2), sont issus des biotechnologies. Tout semble donc aller au mieux dans l'univers des biotechnologies...

**Oui mais au fait, où se positionne la France dans ce secteur mondialisé ?** Sans sombrer dans un pessimisme et un French bashing propre à notre pays, force est de constater que la situation est plus nuancée. En effet, le développement et la production des médicaments biologiques constituent un défi technique & économique majeur pour la France afin d'assurer la pérennité de notre système de soins et notre souveraineté sanitaire quand on sait que nous importons 95% de ces produits. En termes de capacité de bioproduction, la position de la France se dégrade et nous nous classons aujourd'hui au quatrième rang européens après l'Angleterre, l'Allemagne et la Suisse. Pour s'en convaincre, seulement 5 biothérapies sont produites en France contre 21 en Allemagne et même 12 en Italie sur les 76 autorisées et commercialisées en Europe. Par ailleurs, la faible offre en matière de prestataires CDMO biologiques poussent les sociétés innovantes à délocaliser le développement et la production des lots de phases cliniques initiales et à poursuivre ensuite par la fourniture des lots commerciaux. Dans ce contexte, les ambitions du plan Innovation Santé 2030 doté de 7,5 milliards d'Euros, annoncé par le président de la République en juin 2021 sont à saluer. Partie intégrante de ce plan, la Stratégie d'Accélération "Biothérapies et Bioproduction de thérapies innovantes" doté de 800 millions d'Euros, a pour objectif de positionner la France comme un leader des thérapies innovantes et relocaliser au maximum le développement et la production.

**D'ici 2025, c'est-à-dire dans 24 mois ! Les objectifs sont ambitieux : doubler le nombre d'emplois du secteur, produire 10 biomédicaments en oncologie et thérapie cellulaire et enfin faire émerger 1 licorne.**

Est-ce que tout ceci est réaliste compte tenu de la complexité et des durées requises avant mise sur le marché ? Après avoir manqué le boom des anticorps monoclonaux dans les années 2000, la diversité des nouvelles modalités biologiques et la complexité des développements cliniques constituent paradoxalement une seconde chance à saisir immédiatement tant les planètes semblent alignées. Reconnue aux travers de ses différents Prix Nobel, la France possède une expertise mondialement reconnue dans les Sciences de la vie et des systèmes biologiques complexes. Notre écosystème Health Tech est riche de plus de 600 entreprises innovantes et diversifiées. Les différents dispositifs de financements publics anciens (BPI France, Crédit d'Impôt Recherche, Jeune Entreprise Innovante, Programme d'Investissements d'Avenir) ou plus récents, sont en place et ont démontré leur efficacité même si nous avons toujours du mal à faire face à la puissance capitaliste américaine et à faire émerger des leaders internationaux. Il faut donc enclencher un cercle vertueux et établir les bases d'une collaboration public/privé en s'adaptant aux meilleures pratiques internationales pour concilier le développement des start-ups et la protection de la propriété intellectuelle des structures publiques. Il est impératif d'attirer, valoriser et renforcer les formations en bioproduction et l'alternance pour les élèves chercheurs, ingénieurs, techniciens, régulateurs, évaluateurs et encourager les interactions entre professeurs, académiques et industriels afin de faciliter l'émergence de technologies de rupture. Rien que ce dernier point prendra entre 3 et 5 ans et nous sommes déjà en 2023...

**Alors pour paraphraser Jean-Pierre Raffarin : "Accélérer, oui mais la route est droite mais la pente est raide !!!"**



Merci à nos Contributeurs

## Ils ont participé à ce numéro



**Devin HERSEY**  
CRB GROUP



**Peter WALTERS**  
CRB GROUP

Rédacteurs de "Gene therapy manufacturing comes of age: Commercial-scale manufacturing is imminent. Are gene therapy innovators ready?"



**Rabah AZOUANI**  
EBI

Rédacteur de "Développement d'une nouvelle approche préventive pour réduire les infections microbiennes avec les nanoparticules d'oxydes métalliques."

AZOUANI Rabah-PhD-HDR, docteur ingénieur en génie des procédés, et HDR en sciences & ingénierie, avec une forte expertise en procédés industriels, analyse des risques et matériaux/nanomatériaux/couches minces. Je suis responsable de l'axe de compétences industrie à l'École de Biologie Industrielle (EBI). Je développe actuellement deux thématiques de recherche : les nanomatériaux biocides (projet EBiocide) et les biopolymères biosourcés (EBioplast).



**Quentin BAZOT**  
ABL EUROPE

Rédacteur de "Overcoming obstacles in downstream bioprocessing of AAV based gene therapy products."



**Chloé GERVASONI**  
SON SAS

Rédacteurs de "Le pouvoir magnétique des nanoparticules : triage magnétique cellulaire, dépollution des milieux et nanocatalyseurs réutilisables."

Chloé GERVASONI est la responsable R&D et Production de la start-up SON SAS. Elle est diplômée de l'ESIREM (Ecole supérieure d'ingénierie numérique et matériaux) depuis 2022. Elle a réalisé une classe préparatoire aux grandes écoles en Physique-Chimie, à Troyes, avant d'intégrer son école d'ingénierie en 2019. Elle a développé son expertise des nanomatériaux notamment durant son stage de 4<sup>ème</sup> année d'école d'ingénieur et sa 5<sup>ème</sup> année de contrat de professionnalisation avec SON. Elle gère au quotidien l'équipe R&D et contribue à la mise en place du pôle production tout en continuant d'affiner ses connaissances sur les nanoparticules d'oxyde de fer, d'or et de silice développées au sein de la start-up.



**Jérémy PARIS**  
SON SAS

Dr Jérémy PARIS est le fondateur et le CEO de la start-up SON. Il est diplômé d'un double cursus scientifique - master en administration de l'université de Bourgogne. Il a notamment fait ses armes en conception et fabrication de nanoparticules durant son doctorat intitulé « Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse ».



**Émilie GATEAU**  
EXOTHERA

Rédacteurs de "Are modern scalable bioreactors the Cell Culture Strategy needed for Gene & Cell Therapy success?"

Emilie is innovation manager at Exothera, a Belgium-based contract development and manufacturing organization (CDMO). She is leading a portfolio of several internal development and innovation projects aiming to create future manufacturing solutions for viral vectors.

Emilie has 9 years of experience in process and cell line development. Prior to Exothera, she has contributed to multiple projects, developing cost-effective and robust manufacturing processes, for recombinant proteins and viral vectors. Emilie holds a Master degree in biotechnology and bioengineering from Oniris Engineering School (Nantes, France).



**Hanna P. LESCH**  
EXOTHERA

Hanna P. Lesch is a Chief technology Officer at Exothera, Belgium. Her main responsibilities are technology development and innovation in bioproduction platforms. Hanna has made her whole career in the gene therapy field. Over the years she has been in several directors' positions leading research and development at FKD Therapies, Finvector, and Kuopio Center for Gene and Cell Therapy. Her research interest has focused on gene therapy and translational development, including early-stage analytics and the development of scalable, robust manufacturing processes operating under current regulatory guidelines. Her Ph.D. was in Molecular Medicine, obtained from the University of Kuopio. She followed up her Ph.D. with post-doc work at the University of California San Diego UCSD, CA, the USA, and the University of Eastern Finland, Kuopio, Finland. She has several patents related to vector manufacturing.



**Michele MARINI**  
EXOTHERA

Michele Marini is scientific MarCom Associate at Exothera with a background as DSP Bioprocess Engineer in the field of monoclonal antibodies, vaccines, and gene therapies. He is part of Exothera's editorial board and he is the editor of all the marketing and scientific content generated in the company.

Billet d'Humeur

Par Jean-Louis BELMON, membre du Conseil d'Administration A3P

## Crise de l'énergie, impacts sur nos industries.



Depuis un an, le monde se trouve impacté par le conflit en Ukraine. Celui-ci a accentué la dynamique inflationniste déjà enclenchée en 2021 avec la reprise de l'activité économique au sortir de la période COVID19.

Que ce soit au niveau mondial ou à l'échelle nationale, cette situation a eu pour conséquence de générer une tension sur les prix des matières premières, et tout particulièrement sur ceux de l'énergie.

En parallèle, nous devons faire face au risque "potentiel" de coupure électrique, l'électricité que nous consommons est produite pour presque 70% à partir des centrales nucléaires. Il se trouve que le parc de centrales est arrivé en limite de capacité obligeant les entreprises à mettre en place des plans de secours complexes pour pallier les périodes de délestage très impactantes pour nos activités dans le domaine pharmaceutique.

Par ailleurs, pour faire face à cette augmentation des coûts de l'énergie et au risque de rupture d'approvisionnement dans ce domaine, les entreprises ont dû sécuriser leur activité, seul moyen de rester compétitif et de préserver leurs ressources communes.

Des initiatives au sein des entreprises ont vu le jour pour identifier l'ensemble des actions à mettre en œuvre afin de réduire leurs consommations. Outre les actions menées sur les outils de production, des actions citoyennes quotidiennes ont également vu le jour : allumer les lumières sur le lieu de travail quand cela est nécessaire, éteindre systématiquement toutes les lumières dans les lieux vides, régler la température autour de 19°C, ...

Finalement la crise de l'énergie aura au moins permis de forcer la mise en place de ces petites actions simples, comme on dit c'est un mal pour un bien !!

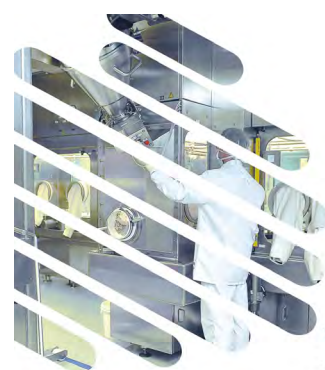
Dans le domaine des projets aussi, depuis la conception, le développement et l'industrialisation des nouveaux produits pharmaceutiques, la composante énergétique fait partie des drivers importants des projets avec une prise en compte à toutes les étapes des procédés de fabrication.

Au quotidien, nous devons ainsi tous être acteurs et responsables face à une nécessaire réduction de notre consommation d'énergie, tant sur le plan économique pour notre entreprise, que pour la préservation de notre planète.

Vous aussi, vous souhaitez participer aux prochains numéros ? Faites-nous parvenir vos propositions d'articles qui seront étudiées par le comité de lecture pour approbation. => Coordonnées des contacts page 2

Actualité

# A3P Technologie Barrière



**A3P Technologie Barrière**  
Tours // France  
June, 14 & 15 2023

**VHP**  
Glove management  
Industrial performance  
Technological innovations

## Conférences

### Aperçu du programme ...

🔗 Analyse des exigences de l'Annexe 1 révisée pour les chapitres consacrés aux Technologies Barrières. Retour d'expérience concret de mise en œuvre des nouvelles exigences de l'Annexe 1	<b>Marc BESSON</b> AXYS NETWORK
🔗 Éléments en contact direct et indirect produit : comment les stériliser ? Et comment s'assurer de leur maintien sous contrôle ? Cas pratique sur site de biotechnologie	<b>Stéphane CHABANON</b> LFB
🔗 Transformation d'une ligne de remplissage temps pression. Comment améliorer la performance industrielle d'une ligne RABS en passant d'un circuit produit CIP/SIP à COP/SOP ?	<b>Etienne HEMBERT</b> LILLY
🔗 Dans le cadre d'un revamping, mise en place d'une solution de convoyage et d'aiguillage sous RABS de flacons entre une nouvelle ligne de remplissage et un lyophilisateur existant en conformité avec les prescriptions de l'Annexe 1 nouvelle version	<b>Paul MARNAT</b> SANOFI & <b>Yoann VANEL</b> AVN
🔗 No Touch Transfer Technology : avantages, inconvénients, design et requis utilisateur	<b>Guillaume MOLLANDIN</b> LONZA BIOLOGICS
🔗 Improving efficiency of the filling isolator by replacing the agar plates with a rapid EM method (biofluorescent particle counting – BioTrak)	<b>Caroline DREYER</b> NOVONORDISK
🔗 Benefits of robotics in a CDMO environment. A case study at PSM GmbH about using a gloveless robotic filling system	<b>Thorsten HAFNER</b> PSM GmbH
🔗 Développement d'un cycle VHP pour un isolateur de production. Cas pratique	<b>Patrick VANHECKE</b> VHP CONSULTING SCOM
🔗 Gestion des trous dans les gants sous isolateurs / détection et innovations techniques	<b>Cécile MAURIN</b> BOEHRINGER INGELHEIM & Membres du <b>GIC A3P</b> Technologie Barrière
🔗 Intégrité de la barrière d'utilisation : quelle est l'incidence microbienne des trous de gants sur les isolateurs de production ?	<b>Julien TRIQUET</b> CSL BEHRING & <b>Vincent ROCHETTE</b> LABORATOIRE ICARE
🔗 Construire vous-même une formation aux technologies barrières en réalité virtuelle ? Une option dorénavant à la portée de tous	<b>Romain JORCIN</b> BOEHRINGER INGELHEIM
🔗 Comment les caméras peuvent aider aux investigations ? Retour d'expérience sur une ligne de remplissage aseptique équipée d'un dispositif d'enregistrement vidéo	<b>Laurent DIETMANN</b> OCTAPHARMA
🔗 Annex1 considérations for closed Robotic filler	<b>John HARMER</b> CYTIVA & <b>Jérôme DETREILLE</b> PCI



ECOLAB

bioquell  
An Aseptik Solution

JCE BIOTECHNOLOGY

PIERCAN

skan

STERIGENE  
Ingénierie des procédés propres et stérilesSTERIS  
Life Sciences

## Sessions partenaires / 4 sessions

🗨️ ECOLAB

**Contamination Control Strategies for cleaning and loading an isolator system**

🗨️ Eric GOHIER &amp; Thibault DEVULDER - JCE BIOTECHNOLOGY

**Solutions personnalisées en isotechnie & accessoires**

🗨️ Franck ARETHUSE &amp; Thomas QUELFIER - PIERCAN

**Les critères de choix d'un gant pour isolateur**

🗨️ Franck ARETHUSE & Thomas QUELFIER - PIERCAN **Nouveauté !**

**Manchette rétractable avec connexion sécurisée, identification et traçabilité numérique d'un gant**

🗨️ Florian TROMMER &amp; Laurent FLUHR - SKAN

**Life Cycle Support : Cycle de vie d'un isolateur / digitalisation - support virtuel**

🗨️ Theresa LADWIG &amp; Laurent FLUHR - SKAN

**SKANalytix : Process, Product and Operator Safety scored by analytical Data**

🗨️ Florian TROMMER, Vincent BROM &amp; Laurent FLUHR - SKAN

**System transfert - Technologie E-Beam**

🗨️ Vincent BROM &amp; Laurent FLUHR - SKAN

**System intégré / Robotisé au sein d'un isolateur**

🗨️ STERIGENE

**Dans le cadre de la nouvelle Annexe 1, quel isolateur choisir et quel protocole de nettoyage mettre en place ?**

🗨️ STERIGENE

**Retour d'expérience concret de mise en œuvre d'un isolateur : quels ont été les tenants et les aboutissants dans le choix de la machine ? Quels ont été les pièges et les facteurs clés de réussite ?**

🗨️ STERIGENE

**Dans le cadre de la nouvelle Annexe 1, quel isolateur choisir et quel protocole de nettoyage mettre en place ?**

🗨️ STERIS

**A venir**

## Exposition

ABC TRANSFER / AVN / AZBIL TELSTAR FRANCE / BD / CARSO LSEHL / CONFORMAT / DEVEA / ECOLAB / EREA / FPS FOOD AND PHARMA SYSTEMS / GROUPE ICARE / ISOTEC'XEL / JCE BIOTECHNOLOGY / MK VERSUCHSANLAGEN UND LABORBEDARF / OPTIMA PHARMA / PHARMTEC / PIERCAN / PROSYS TECHNOLOGY / SKAN / SOLIDFOG / STAXS / STERIGENE / STERIS / SYMBIOSE ENVIRONNEMENT / TEMA SINERGIE / TERANGA GROUPE

Programme & inscription  
[www.a3p.org](http://www.a3p.org)

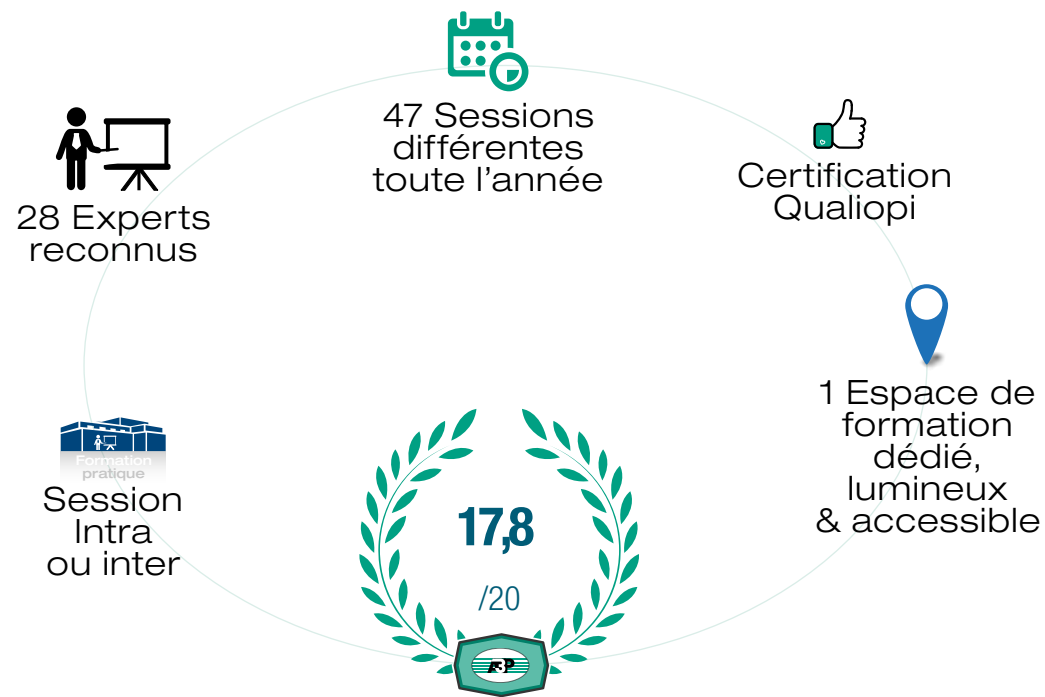






## 5 domaines spécifiques au "Propre et Stérile"

- Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)
- Maîtrise de la contamination
- Systèmes informatisés
- Qualification
- Process



Note moyenne donnée par les stagiaires des sessions en 2022

Toutes les infos en flashant ce code



Actualité

# A3P Single Use



Supply Integrity  
PUPSIT  
Sustainability

PARTENAIRE



Les systèmes à usage unique (SUS : Single Use Systems) se développent de façon considérable afin de répondre aux besoins de l'industrie : flexibilité, rapidité, coûts d'infrastructures réduits ... **Les experts membres du GIC A3P Single Use Systems souhaitent partager de façon pérenne les résultats de leurs travaux dans le cadre d'un évènement biennal de référence à destination des professionnels des secteurs Pharmaceutique & Bioproduction.**

En 2021, une restitution dans le cadre du Congrès Annuel A3P aura permis d'apporter des réponses sur les sujets comme les problématiques d'approvisionnement (Supply), de développement durable (Sustainability) et d'initier de nouvelles réflexions pour 2023 autour de l'Annex1 GMP Eu, de l'USP665, l'analyse de risques E&R et la gestion du cycle de vie des produits SUS.

**Ces 2 journées de conférences, d'ateliers partenaires et une exposition de sociétés fournisseurs, les 20 & 21 septembre à Tours ont pour objectifs de partager les bonnes pratiques et les points de vigilances sur des sujets stratégiques majeurs comme la gestion de l'intégrité, le « PUPSIT », la stratégie de sécurisation des approvisionnements et la mise en place des politiques éco-responsables.**

Au plaisir de vous accueillir nombreux à Tours !

## Conférences / Sessions partenaires / Exposition

### Aperçu du programme ...

RRR - Système à usage unique "VERT" une démarche écoresponsable	<b>Eric DEVRETON</b> BOEHRINGER INGELHEIM
L'analyse de risque comme outil d'aide à la mise place d'une stratégie de sécurisation : retour d'expérience	<b>Marie-Agnès BOL</b> LFB & <b>Jean-Yves DUVAL</b> SANOFI
Sécurisation des approvisionnements par l'interchangeabilité. Quelle approche pour les filtres ?	<b>Membres du</b> GIC A3P Single Use Systems
Sécurisation des approvisionnements par l'interchangeabilité. Quelle approche pour les poches ?	<b>Membres du</b> GIC A3P Single Use Systems
Study Case – Assemblies standardization at Henogen	<b>Julien CANON</b> THERMO FISHER SCIENTIFIC
Validation XRay. Retour d'expérience utilisateur	<b>Charlotte MASY</b> GSK
USP 665 Vs BPOG / impact / AdR E&L	
Maintien de l'intégrité des assemblages à usage unique : bonne pratique & partage d'expérience	

... Voir l'intégralité du programme sur [www.a3p.org](http://www.a3p.org)

Rejoignez la communauté A3P  
[Linked in](#)

Programme & inscription  
[www.a3p.org](http://www.a3p.org)



# Réglementaire

## À ne pas manquer !

Ce point réglementaire trimestriel proposé par la société AKTEHOM, présente les récentes évolutions réglementaires au regard du cycle de vie du produit. Cette sélection des parutions intervenues depuis la précédente édition se focalise sur les grandes thématiques impactant les métiers pharmaceutiques.

*This quarterly regulatory point presents recent regulatory developments in terms of product lifecycle. Since the previous edition, this selection of publications focuses on the major themes impacting the pharmaceutical professions.*

### Analytique - Analytical

Origine	Titre	Type	Date
EMA	<b>ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis - Questions and Answers</b> Ce document de questions et réponses (Q&A) est destiné à fournir des éclaircissements supplémentaires et à améliorer l'harmonisation de la validation des méthodes bioanalytiques. La portée et l'organisation de ce document de questions-réponses suivent celles de l'ICH M10	Q&A	13/01/2023
EDQM	<b>Publication de Pharmeuropa 35.1</b> Tous les nouveaux textes et les textes révisés pour des raisons techniques sont publiés dans Pharmeuropa pour enquête publique. Parmi les 80 projets de textes publiés, on trouve notamment les chapitres généraux 5.1.10. Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes et 5.1.13. Pyrogénicité	Draft	03/01/2023
USP	<b>&lt;661.1&gt; Plastic Materials of Construction</b> Le but de ce chapitre est de fournir des méthodes d'essai pour déterminer l'adéquation des matériaux plastiques utilisés dans les systèmes d'emballage pour les produits pharmaceutiques.	Final	27/01/2023

### Développement - Development

Origine	Titre	Type	Date
ICH	<b>M13A Bioequivalence for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms - Presentation</b> Support de présentation du passage en step 2 du guideline M13A sur la Bioéquivalence pour les formes posologiques orales solides à libération immédiate	Présentation	26/01/2023

### Dispositifs Médicaux - Produits Combinés

Origine	Titre	Type	Date
FDA	<b>Projet d'harmonisation du 21CFR820 avec l'ISO 13485</b> La FDA a l'intention d'harmoniser et de moderniser la réglementation du système qualité pour les dispositifs médicaux. Les révisions mettront à jour les exigences existantes avec les spécifications d'une norme consensuelle internationale pour les fabricants de dispositifs médicaux, l'ISO 13485:2016.	Info	24/02/2023

### Inspection – Inspection

Origine	Titre	Type	Date
PIC/S	<b>Aide – memoire: Inspection of Good Distribution Practice (GDP) for Medicinal Products in the Supply Chain PI044-1</b> Le but de ce document est de fournir des conseils aux inspecteurs pour les aider à la préparation des inspections relatives aux Bonnes Pratiques de Distribution	Final	01/02/2023

En collaboration avec  
AKTEHOM

# Réglementaire

### Système Qualité - Quality

Origine	Titre	Type	Date
ICH	<b>Quality Risk Management – Q9 (R1)</b> Passage en step 4 du guideline ICH Q9 (R1) sur la gestion du risque qualité. Cette ligne directrice vise à fournir des orientations sur les principes et exemples d'outils de gestion du risque qualité pouvant être appliqués à différents aspects de la qualité pharmaceutique. Ces aspects comprennent le développement, la fabrication, la distribution et les processus d'inspection et de soumission/examen tout au long du cycle de vie des substances médicamenteuses, des médicaments, et des produits biologiques et biotechnologiques	Final	20/01/2023

### Conditionnement/Distribution - Packaging/Distribution

Origine	Titre	Type	Date
PIC/S	<b>Questions &amp; Answers document regarding the PIC/S GDP Guide (PE 011-1) – PS INF 22 2017</b> Ce document apporte des précisions sur différents points traités dans le guide des bonnes pratiques de distribution	Q&A	01/02/2023

### Fabrication – Manufacturing

Origine	Titre	Type	Date
FDA	<b>Artificial Intelligence in Drug Manufacturing</b> Publication d'un document de travail fournissant des informations aux parties prenantes et sollicitant les commentaires du public sur un domaine spécifique des technologies de fabrication émergentes et avancées. Le document présente les domaines identifiés par le CDER associés à l'application de l'intelligence artificielle (IA) à la fabrication pharmaceutique. Il comprend une série de questions pour stimuler les commentaires du public et fournit également des définitions pour les termes clés liés à l'IA.	Discussion Paper	01/03/2023
ICH	<b>Q13: Continuous Manufacturing of Drug Substances and Drug Products - Presentation</b> La directive ICH Q13 sur la fabrication continue de substances médicamenteuses et de produits médicamenteux a atteint l'étape 4 du processus ICH en novembre 2022. Suite à l'adoption de cette ligne directrice, une présentation de formation a été élaborée par le groupe de travail d'experts Q13.	Present.	26/01/2023
WHO	<b>Good Manufacturing Practices for excipients used in pharmaceutical products QAS/23.921</b> Le but de ce document est de fournir des conseils pour la production, le contrôle, le stockage et la distribution des excipients utilisés dans les produits pharmaceutiques, en se concentrant sur les bonnes pratiques de fabrication (BPF) dans le cadre d'un système approprié de gestion de la qualité. Il est également destiné à aider à garantir que ces excipients répondent aux exigences de qualité et de pureté qu'ils prétendent ou sont censés posséder.	Draft	24/03/2023

En collaboration avec  
AKTEHOM



## Synthèse Évènement

L'essentiel des prises de position exposées (scientifiques, techniques, méthodologiques)



\* Enquête de satisfaction réalisée du 9 au 18 mars 2023 - 20% répondants

La transformation numérique est en route... Nos industries réglementées mettent en œuvre de façon progressive et raisonnée des technologies toujours plus sophistiquées en matière de production, de contrôle de la qualité et de distribution des médicaments : EBR, Objets connectés, Robots/Cobots, Edge et Cloud computing, Intelligence artificielle, CSA, CSV...  
**Quelles sont les motivations, les difficultés et les retours de mise en œuvre de ces technologies ?**  
**Comment la réglementation favorise-t-elle leur adoption ? Comment les valider ?**

Durant 14 conférences, A3P a fait découvrir des cas de mise en œuvre et des retours d'expérience uniques et concrets.  
 Accès aux présentations • [www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/](http://www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/)

### 1. Comment cohabitent réglementation et évolution des nouvelles technologies liées à la digitalisation ?

#### **Digitalisation et réglementation : la quadrature du cercle ?** par Jean-Louis JOUVE, COETIC

Aperçu de l'évolution de la réglementation relative aux systèmes informatisés et de la difficulté à adapter les exigences, en particulier celles liées à la validation, à l'exploitation de nouvelles technologies et aux besoins utilisateurs. Introduction aux nouveaux concepts de Computerised Software Assurance et de Critical Thinking. Projection vers les futurs besoins d'adaptation aux technologies émergentes (Développement low-code/no code, Intelligence Artificielle, ...)

#### **Software sensors: from development to GMP** par Thibault HELLEPUTTE, DNALYTICS

Introduction aux capteurs logiciels (Software Sensors), améliorant l'efficacité et la fiabilité des opérations de biofabrication. Retour sur plusieurs exemples concrets d'application sur des lignes de production. Présentation du volet des possibilités techniques modernes et notamment le Machine Learning, et du chemin à parcourir pour permettre leur utilisation dans un contexte GMP (GMLP).

#### **Intégration de la Validation SI dans le développement agile d'un produit GXP** par Pascale MOSNIER & Philippe

LENGLET, LABORATOIRE SERVIER

L'industrie pharmaceutique travaille d'arrache-pied pour exploiter le plein potentiel de la transformation digitale, porteuse d'innovations plus rapides au profit des patients. Cette transformation digitale passe par une transformation agile impactant la façon de mettre à disposition des SI. Pour autant, la réglementation n'a pas changé et les applications en support de processus réglementés nécessitent toujours d'être qualifiées. Cette présentation a pour objectif d'aborder les différents scénarii d'intégration de la Validation SI au sein d'un cadre agile en tenant compte de leurs avantages et inconvénients.

#### **Le rôle d'une DSI dans la transformation digitale** par Frédéric RIOU, BIOGARAN

Partage d'expériences de transformation digitale, d'un point de vue d'une DSI. On ne peut pas penser digital pour le patient si l'entreprise n'est pas digital driven nativement. La DSI doit fournir à ses collaborateurs le bon outil, qui doit chasser les irritants, limiter le travail répétitif et permettre aux collaborateurs de mettre tout leur talent au profit de leur mission (Easy Work). La culture digitale doit également servir l'entreprise pour le bénéfice de ses clients (Easy Services) et trouver de nouveaux business models (Easy Model).

#### **Les enjeux et les étapes d'implémentation d'un LIMS dans l'industrie de la Santé** par Johanne LECLERCQ, FORTIL

Le Laboratory Information Management System (LIMS) est devenu un outil informatique indispensable aux laboratoires quel que soit leur domaine. Il permet notamment la gestion des tests, de l'assurance qualité, des ressources et de gagner en performance. Présentation des enjeux liés à l'implémentation et à la validation d'un LIMS, des difficultés rencontrées mais également les réussites et les perspectives permettant de mieux appréhender les différentes phases d'un tel projet.

### 2. Les multiples bénéfices apportés par la digitalisation (optimisation du développement, performance, gain de temps, ergonomie, traçabilité, réduction des erreurs humaines, ...)

#### **De nouvelles méthodes de pilotage des procédés pour maîtriser et accélérer la bioproduction** par Eric CALVOSA, SANOFI

Vue de synthèse sur l'implémentation du digital en bioproduction USP/DSP/F&S, soulignant les opportunités et les verrous à lever. La mise en place de base de données structurées permet de déployer les différentes méthodes de modélisation ainsi que l'acquisition des données des nouveaux capteurs. Le travail conjoint des data scientists, data ingénieurs, biologistes, modélisateurs... et l'utilité de ne mettre dans les bases de données que ce qui est nécessaire, va permettre d'accélérer la bioproduction.

#### **Sample tracking in RFID - Make your process faster and safer for your employees and your company with RFID**

par Antony HIRTZLIN, UCB FARCHIM SA & Frédéric ALIMI, SOLID SOLUTIONS EN IDENTIFICATION

Retour sur un cas d'implémentation d'une solution digitale de suivi d'échantillons qui utilise les technologies RFID et codes-barres. Elle peut être soit utilisée comme solution autonome, soit intégrée dans des systèmes existants tels que les MES ou LIMS. Comme les solutions de type Code-barres ou Datamatrix, ce type de solution permet une diminution des manipulations et des saisies manuelles, une amélioration de la traçabilité, ainsi que la prévention des erreurs de stockage. La technologie RFID apporte également un plus dans certaines situations : une lecture de masse, ou une lecture à distance (cas de localisation dans un environnement de stockage).

#### **Amélioration de l'intégrité des données et de l'enregistrement en temps réel dans les opérations de contrôle**

qualité pharmaceutiques par Mike COLLODORO, PDC LINE PHARMA

Présentation de la mise en place d'un eBR pour les opérations d'analyse dans le cadre du contrôle qualité d'un produit. Présentation des exigences d'enregistrement des données GMP en temps réel et des défis liés. Illustration de la problématique par un cas d'usage où la digitalisation des opérations de contrôle qualité est en cours, concluant sur les exigences ALCOA+ et le bénéfice apporté pour chaque partie prenante (Opérateurs et QA) par la numérisation de l'information.

#### **La transformation digitale des processus qualité : les avantages** par Antoine HALAIS, NEMERA

Apport de la transformation digitale des systèmes qualité en termes d'harmonisation des processus et de limitation des erreurs humaines, et démarche suivie dans le cadre d'une organisation multi-sites et internationale. Avantage de la validation d'un Core Model et sensibilisation à la résistance au changement et à la nécessité d'impliquer les utilisateurs locaux.

#### **Implémentation d'un dossier digitalisé "paper on glass" pilote et de sa revue par exception** par Adrien SIMARD,

OCTAPHARMA

Présentation de la mise en place d'un dossier de lot digitalisé. L'implémentation a été l'opportunité d'identifier les différents champs à cibler pour les revues en se basant sur les risques engendrés et d'intégrer une revue de lot par exception. Cette solution a permis de réduire le temps et les erreurs de saisie des opérateurs, d'harmoniser le remplissage des dossiers de lots ainsi que le temps de revue. Le retour d'expérience montre que le système a bien été accepté par les opérateurs mais nécessite plus de temps à présenter en inspection qu'un dossier papier.

#### **Partage d'un retour d'expérience de robotisation de culture cellulaire** par Yohann BRILLIER LAVERDURE, BIOMERIEUX

Présentation du projet de robotisation d'une étape de procédé de culture cellulaire, depuis l'initiation jusqu'à la réalisation ayant permis sa réussite : analyse de risques, essais de mises au point, ramp up, rôle du fabricant du robot, intégrateur orientés autour de l'automatisation de la production de culture cellulaire en roller. Impact de cette transformation sur le personnel dont le principal driver initial était l'ergonomie.

#### **Cas pratique : mise en place de la solution electronic Batch Record (eBR) et Quality Management System (QMS) de l'outil MasterControl au sein de l'entreprise Doran International** par Brice FIORE, DORAN INTERNATIONAL & Clément

LACAPE - APSALYS

Illustration des enjeux et gains ayant motivé la mise en place d'un eBR et d'un eQMS et des avantages apportés par leur interconnectivité. Retour d'expérience sur le déroulement du projet et les lessons learned en incluant l'intérêt et la nécessité d'être accompagné de manière efficace pour la réussite d'un tel projet.

#### **Retour d'expérience sur la digitalisation du contrôle de volume de remplissage** par Didier FERBU, CENEXI & Enzo

GIOVINAZZO, RT2I

Illustration de la mise en place de la digitalisation d'une opération de contrôle du volume de remplissage. Est présentée la valeur ajoutée de cette digitalisation par rapport aux erreurs ou inconvénients que le processus manuel et papier pouvait générer. Partage des gains constatés (temps des revues, temps d'investigation) ainsi que les bonus d'un outil apportant une solution digitale (tendance, statistique, ...). Un aspect tout particulier a été apporté sur la manière dont a été dispensé la formation du personnel.

### 3. Le revers de la médaille : les cyber-attaques.

Ainsi, l'industrie de la Santé accélère sa transformation digitale sans perdre de vue qu'elle se doit de maintenir sa compliance aux exigences réglementaires et ce afin d'assurer la sécurité des patients. Elle doit faire face à de nouveaux risques associés au monde de l'informatique, dont certains peuvent mettre à rude épreuve son organisation.

#### **Cyberattaque : causes et conséquences** par Sandrine PAITREULT & Vincent JOCHENBEIN, ARROW

Retour d'expérience d'une cyberattaque. Quelles leçons en tirer ? Comment la situation a-t-elle été gérée ? Quel a été le plan de prévention ? Quels ont été les modes dégradés mis en place pour assurer la continuité de l'activité ? Quel plan de remédiation à mettre en place pour anticiper de telles attaques ? Et surtout nécessité de toujours être préparé en testant régulièrement les dispositifs en place.



A3P continue de vous accompagner.  
 Découvrez les thèmes abordés  
 au second semestre



PROGRAMMES & INSCRIPTION

Rejoignez la communauté A3P  
[LinkedIn](#)

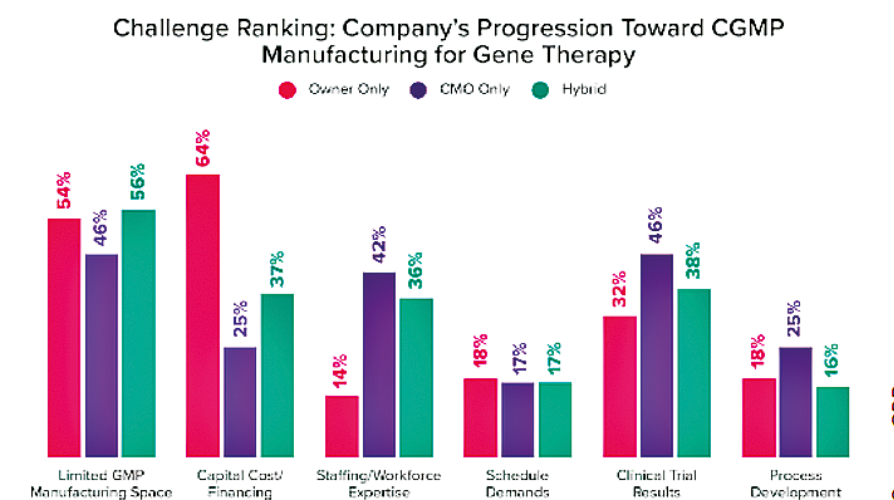
# Gene therapy manufacturing comes of age: Commercial-scale manufacturing is imminent. Are gene therapy innovators ready?

By Devin HERSEY & Peter WALTERS - CRB GROUP  
 Devin.hersey@crbgroup.com - Peter.walters@crbgroup.com

Gradually, and then suddenly. When Ernest Hemingway wrote those words in *The Sun Also Rises*, he couldn't have known about the gene therapy revolution that would follow nearly a century later and yet he described it perfectly. Sixteen years gradually elapsed between the first draft of the human genome and the first FDA-approved in vivo gene therapy. And now—suddenly—the FDA expects to approve 10 to 20 cell and gene therapy products a year. Decades of research have brought us to this moment, and very soon gene therapies will be a mainstay of commercial-scale biotech manufacturing.

FIGURE 4.1

Rank the following potential challenges in order of the most substantial to least substantial challenge for your company's progression toward CGMP manufacturing for gene therapy. (Rank order)



How are today's gene therapy manufacturers preparing for this step change, and what barriers stand between their breakthrough work at the bench and the patients who need their products at the bedside? Nearly half of all the Horizons survey respondents are at work in this field, so we asked them. Their answers paint the picture of a submarket that's rapidly maturing as researchers get comfortable pushing boundaries, developing and integrating new technologies, and laying the groundwork for future scalability.

### Capital cost/financing

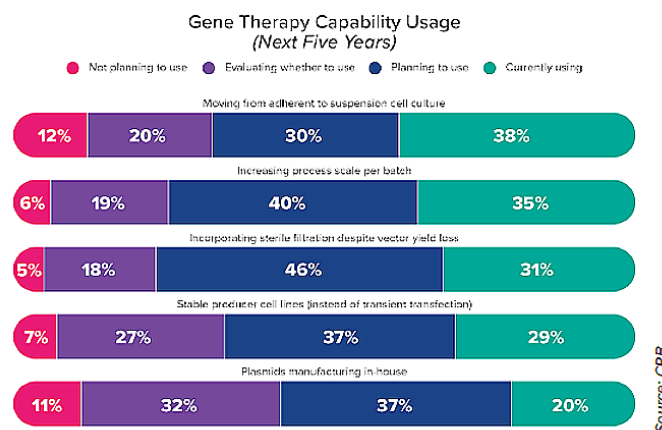
As a whole, the gene therapy submarket raised \$10.6B in venture funding last year, marking a 14% year-over-year increase. And yet as *Figure 4.1* shows, project owners see financing as a much greater challenge than CMOs. Perhaps this is because CMOs generally operate under a different business framework. They have their own facilities but not their own products; instead of facing pressure to finance clinical trials, build infrastructure, and prepare for commercial launch, they're focused on delivering scheduled batches and maintaining a full backlog of manufacturing.

### Clinical trial results

We were surprised that this challenge didn't rank higher. Strong trial results generate funding, which pays for manufacturing space, which in turn enables larger production volumes to supply further trials—and so the wheel of gene therapy turns, with clinical trials at its hub. It makes sense that CMOs would worry more than anyone else about this variable, because their manufacturing backlog depends on producing escalating volumes of an owner's product—which in turn depends on the outcome of clinical trials. Of course, owners are impacted the most, especially in a climate in which regulators approach gene therapies with appropriate caution. To edge toward commercial approval, owners need clinical trial results that will persuade regulators of their product's safety and



**FIGURE 4.3**  
Is your company currently using or planning on using the following gene therapy capabilities in the next five years? (Multiple choice)



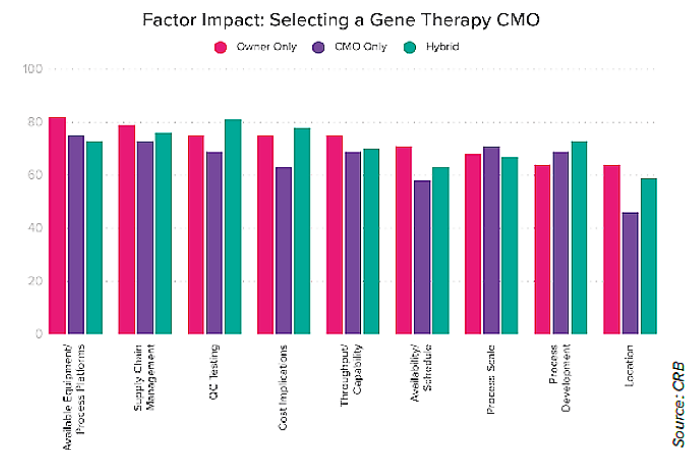
unique therapeutic efficacy; if the market already offers a comparable product, approval is unlikely. Perhaps owners consider this such an obvious factor in their success that they chose to focus on other concerns when responding to this question.

Though CMOs and owners experience many of these challenges differently, they do share one thing: a dependence on each other. Across the life science industry, but particularly in the nascent space of gene therapy manufacturing, the CMO-owner relationship is often a key to future success—which means it warrants a close examination.

**1. How gene therapy manufacturers evaluate potential CMOs**

We asked both owners and third-party manufacturers in the gene therapy submarket about the factors they consider most important when selecting or acting as a CMO. As it turns out, nearly everything is important; these “flat” results indicate an intensity of competition at play in today’s gene therapy manufacturing environment (Figure 4.2).

**FIGURE 4.2**  
How impactful are the following factors for selecting a gene therapy CMO or acting as a CMO? (Multiple choice)



CMOs may find it useful to mine these results for opportunities to differentiate their service offering. In particular:

**• Available equipment/process platforms**

As the research pipeline matures and owners move closer to product launch, standardized manufacturing platforms with the potential to support rapid gene therapy production at the commercial scale are maturing, too. Contract manufacturers should proactively align their process capabilities with these emerging technologies; this will attract owners who need a manufacturing partner who can accelerate them to market with an effective and scalable platform.

**• Supply chain management**

This is a shared pain point for everyone. CMOs could distinguish themselves by, say, stocking several months’ worth of single-use components, or by expanding their manufacturing capabilities to include plasmids (more on that later).

**• QC testing**

Of all the operations along the manufacturing lifecycle, owners very often seek to outsource this one. By expanding their QC testing capabilities, CMOs may find themselves in an advantageous position both as a resource and as a potential turnkey partner for companies.

**2. The keys to commercialization: scalable, Next-Gen capabilities**

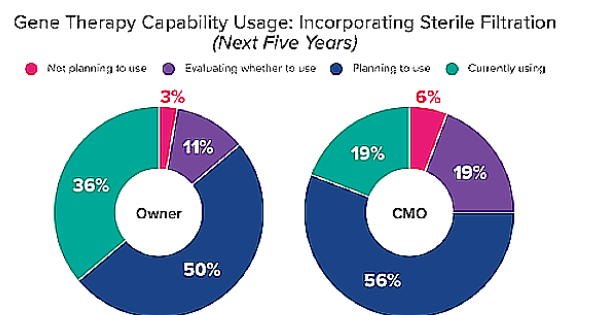
Whether CMO or owner, what are gene therapy innovators doing right now to prepare for the larger scales they’ll need to meet commercial demand in the future? To answer that question, we showed respondents a set of promising capabilities and asked them which ones they’re currently using or planning to use in the near future (Figure 4.3).

Each of these capabilities has the potential to dramatically improve the efficiency and scalability of gene therapy manufacturing. To make them work, companies will need to invest heavily in R&D, and they will need to investigate the facility and regulatory implications of integrating these forthcoming capabilities. Despite these hurdles, our survey data shows strong momentum behind each of these capabilities—an encouraging sight for a submarket that’s only just outgrowing its infancy and learning to run.

**3. Sterile Filtration**

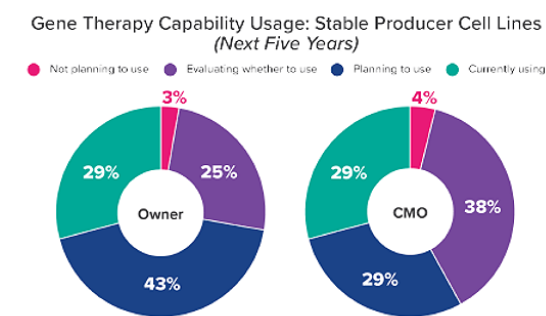
Sterile filtration, a well-established tool in drug substance manufacturing, could unlock huge advantages for gene therapy manufacturers such as smaller and more efficient facilities, lower operating costs, and opportunities for process closure. There’s a significant potential drawback, though: lentiviral and retroviral vectors typically sustain significant yield loss when exposed to a sterile filter.

**FIGURE 4.4**  
Is your company currently using or planning on using the following gene therapy capabilities in the next five years? (Multiple choice)



This is likely why only about a third of owners and even fewer CMOs in our survey are currently using a sterile filter. As long as they’re manufacturing small batches of viral vectors to support pre-clinical or early clinical research, a biosafety cabinet can maintain the necessary sterile processing boundary—without impacting yield. Companies would have to meet the regulatory requirements for aseptic processing. That means taking the level of aseptic processing that’s typically reserved for a fill finish step and applying it across the entire process train—an onerous prospect from the perspective of

**FIGURE 4.6**  
Is your company currently using or planning on using the following gene therapy capabilities in the next five years? (Multiple choice)

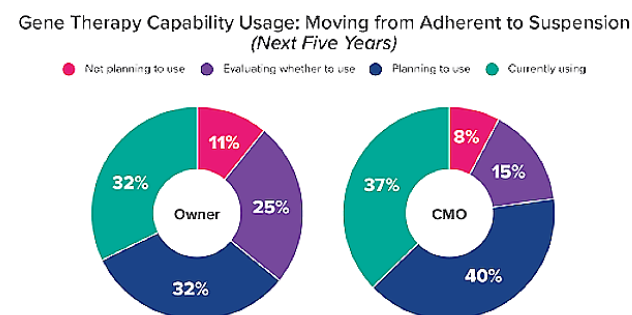


validation, equipment selection, and cost. Even if a manufacturer could somehow justify this approach in the boardroom, they may find it impossible in the plant; many of the technologies used for larger-scale manufacturing, like chromatography systems, were not designed to support aseptic processing. This is likely driving the large segment of owners and CMOs who are planning to incorporate sterile filtration in the future. To make it work, they’ll have to either optimize the process to minimize loss or build that yield loss into their scalability strategy and plan their product train around it.

It’s interesting to note that CMOs are less likely than owners to use sterile filtration in their current approach, but slightly more likely to be planning for (or evaluating) its adoption. It could be that CMOs have historically avoided sterile filtration because they’re focused on maximizing their small-batch yields; meanwhile, they’ve seen owners jump ahead with adoption, which may have recently incentivized them to catch up.

**4. Moving From Adherent To Suspension Cell Lines**

**FIGURE 4.5**  
Is your company currently using or planning on using the following gene therapy capabilities in the next five years? (Multiple choice)



Adherent cell lines, which use an anchor point like tissue or a mesh surface to reproduce, require substantial surface area, a lot of operators to perform cell washing and expansion operations, and the potential for extensive open processing. Many of our respondents have moved away from these challenges by transitioning to suspension cell cultures, which allow for a denser use of operational space while paving the way for closed and automated processing. There is also the advantage of familiarity: gene therapy manufacturers can borrow from the playbook of therapeutic protein manufacturers, who leveraged this approach to leap from benchtop to commercial production 30 years ago.

**5. Stable producer cell lines (instead of transient transfection)**

Though it’s currently a more established technology than stable producer cell lines, transient transfection is a tricky approach to maintain as production quantities grow. It requires large volumes

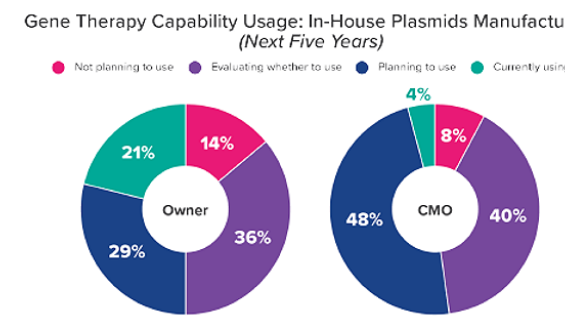
of raw transgene material, which drives up costs, and it depends on complex chemical dynamics within the bioreactor. If manufacturers pursue transient transfection all the way into commercial production, they’ll find themselves stuck with limited efficiency and high production costs, and they’ll be handcuffed to a transgene supply chain that’s struggling to meet demands.

In contrast, a highly productive bank of stable producer cells offers the potential for a more efficient, cost-effective, and scalable process. We haven’t yet seen this technology fully deployed, but the general concept looks a lot like classic biotech: as manufacturers grow a cell line, they can grow the transgene element at the same time. Before this approach becomes a mainstay of gene therapy manufacturing, though, companies need to work out how to engineer cells capable of making the vector without being transfected at scale. CMOs appear to be leading this R&D effort; although owners are currently more likely to have stable cell lines in place already, nearly 90% of CMOs are either planning to adopt this approach or are actively evaluating its potential as a gateway to greater scalability. The small number of CMOs with a stable cell line currently available are ahead of the curve; this is likely a strategic component of their position as a commercial-ready turnkey partner.

**6. Plasmids Manufacturing In-House**

Only a handful of companies around the world are capable of manufacturing this critical raw material, which has led to a chronic bottleneck in the supply chain.

**FIGURE 4.7**  
Is your company currently using or planning on using the following gene therapy capabilities in the next five years? (Multiple choice)



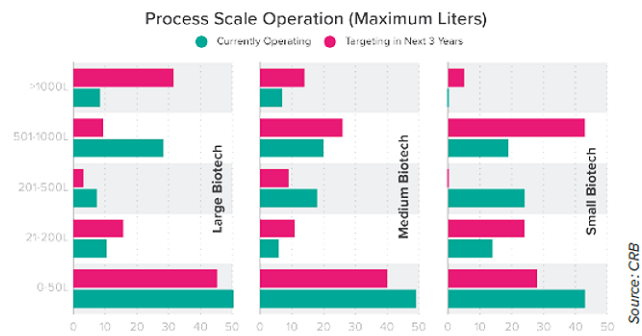
This is likely why our respondents are showing keen interest in bringing their plasmids source in-house. It’s a complex proposition that will take a lot of R&D to pull off, but the promise of controlling the availability, quality, and cost of such critical materials is a strong incentive.

For CMOs, this trend could be game-changing. As the data shows, few are currently manufacturing plasmids, though interest is high. Those who add this capability in the future could find themselves at a great competitive advantage.



FIGURE 4.8

What process scale (i.e., maximum bioreactor size) does your company currently operate for gene therapy manufacturing? What process scale is your company targeting in the next three years? (Open entry)



### 7. What does process scalability look like for Gene Therapy Manufacturers?

There's a reason why the emerging capabilities described above are attracting so much attention among our survey respondents. Change is coming rapidly to this submarket, and gene therapy researchers are under pressure to change with it.

Whether well-established or just starting up, most companies with their hand in gene therapy research today are producing the small-scale batches necessary to support pre-clinical or early clinical trials; even early phase cell therapy studies that rely on a gene therapy component aren't likely to require large batches of critical material. This picture of small-scale benchtop manufacturing speaks to the infancy of the gene therapy industry. But as we can see in Figure 4.8, most respondents expect to increase their production volumes sharply within the next three years. Large biotech companies are especially aspirational in their processing goals, perhaps because they can leverage existing infrastructure to accelerate scale-up—or perhaps they're more likely to target indications with a large patient population, as opposed to rare or orphan diseases with a smaller market attached.

Some of the respondents represented in Figure 4.8 will force their way up that Y-axis using established approaches such as transient transfection, but those who invest early in more innovative and scalable capabilities will find themselves better prepared to enter the commercial marketplace.

### 8. Compliance with science: how Gene Therapy Manufacturers approach risk?

Commercial-scale gene therapy manufacturing requires careful risk assessment and a production approach that balances efficiency with quality and control. Finding that balance isn't easy—and maintaining it to the satisfaction of a cautious regulatory body can be even more difficult. From that point of view, we were surprised to see that most respondents reported relatively high comfort with vector production. This could reflect the makeup of our survey audience: as we've noted, most respondents are in early R&D and process development roles, which means they're operating upstream of the stringent quality programs that govern CGMP manufacturing. It's possible that such high levels of comfort could survive a shift out of the lab and into the commercial-scale plant, though it's unlikely to happen quickly; manufacturing viral vectors for different products in the same room, while perhaps scientifically possible and ideal in terms of efficient throughput, may be difficult to justify from a regulatory perspective without prohibitively rigorous risk management and a matching quality program in place.

Within this big picture, we found two interesting nuances worth noting:

• **Isolators are slightly more attractive than single-use technologies (SUTs)**

This may come down to the attitude that single-use components mean elevated risk; manufacturers may worry that plastic components could wear down, for example, or that a faulty connection could precipitate a leak. Isolators, on the other hand, are a validated containment system. For high-risk operations, respondents may choose to take on the extra expense of isolator technology. This attitude will likely shift over the coming decade as manufacturers and regulators grow more accustomed to SUTs in gene therapy production, which will enable greater flexibility and faster product changeovers.

• **CMOs have a higher risk tolerance than owners.**

Because they are familiar with the practice of managing multiple clients within the same facility, CMOs may already have the controls and validation in place to comfortably mitigate the risks of switching between products. This could explain why, on the whole, they responded more favorably than owners in terms of risk tolerance. For patients awaiting a cure and for manufacturers racing to reach the market, the journey to effective and accessible gene therapies may have felt long. In the background, though, a momentous shift is taking place, and quickly.

Scalable technologies like stable producer cell lines are emerging; attitudes toward the risks and rewards of efficient gene therapy manufacturing are shifting; innovators are laying the groundwork for tailored commercial approaches that will help them succeed in the marketplace. As a result, today's gene therapy manufacturers are set to transform the lives of millions of patients—gradually, and then suddenly.

# TECHNOLOGIE DE BIO-DÉCONTAMINATION PAR VAPEUR DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE

Dossier BPR conforme pour le peroxyde d'hydrogène Bioquell

RÉGLEMENTATION BIOCIDE (EU) 528/2012



- Isolateur avec système intégré de bio-décontamination
- Systèmes mobiles et fixes de bio-décontamination
- Service sur-mesure de bio-décontamination
- Réduction sporicide de 6-log sur toutes les surfaces exposées
- Solutions intégrées pour les SAS de transfert et équipements

En savoir plus sur [bioquell.com](http://bioquell.com)



Utilisez les systèmes Bioquell en toute sécurité. Prenez connaissance des informations d'usage avant toute utilisation.



# Overcoming obstacles in downstream bioprocessing of AAV based gene Therapy Products.

Par Quentin BAZOT - ABL Europe  
qbazot@ableurope.com



Adeno-associated virus (AAV) is a small virus used in gene therapy applications. The demand for AAV clinical trials and approved therapeutic applications is increasing due to this vector's overall success and potential. With the shift beyond ultra rare indications and the use of new engineered synthetic AAV capsids, there is a need for new, productive, scalable and easy-to-implement AAV platform processes compatible with different AAV serotypes. However, the establishment of such productions and

purifications platforms comes with obstacles that the manufacturers need to overcome. This article will focus on the challenges faced during the purification step of AAV manufacturing also called the downstream processing (DSP).

AAV is a DNA virus surrounded by proteins that we call capsid proteins. Different AAV serotypes have been identified, differing in their capsids component and thus displaying different tissue tropism. AAVs are used as vectors, meaning they can carry therapeutic genes into human cells, where the therapeutic genes can then be expressed and used to treat genetic diseases. Over the past decade gene therapy has been rapidly growing, with numerous companies developing AAV-based treatments for a variety of genetic disorders<sup>(1)</sup>. Some of the most promising AAV gene therapies include treatments for inherited retinal diseases, spinal muscular atrophy, Parkinson's disease and hemophilia. To help the industry and tackle the different AAV manufacturing challenges, ABL, a CDMO specialized in the development and GMP manufacturing of viral vectors, is working on the establishment of an AAV Platform.

AAV manufacturing processes can be split into two major steps, the upstream and the downstream processing (Figure 1).

## 1. The upstream processing (USP)

The USP is where AAV is going to be produced. It is the cell culture stage from the cell thaw to the production in bioreactor. For AAV production there are different production systems available based on different cell types (adherent, suspension) from transient AAV production using DNA plasmid transfection to the stable

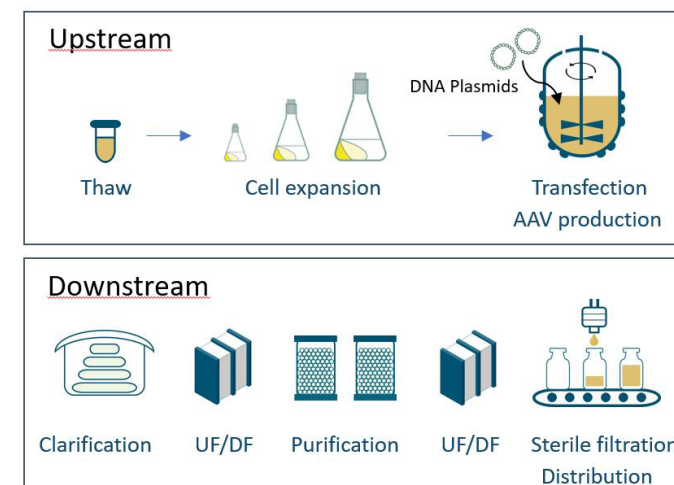


Figure 1: Schematic of AAV manufacturing process

production using stable cell lines. The transient production system using DNA transfection is the most used system (as seen in Figure 1) as it offers flexibility and a large room for optimization. Each of these approaches for AAV production will use different reagents leading to different challenges for the purification of the vectors at the DSP step.

## 2. The downstream processing (DSP)

The DSP is the purification process that aims at separating the viral vector of interest from the impurities produced during the manufacturing process. They are two types of impurities, the process and product related impurities:

- The process related impurities arise from the manufacturing process (USP and DSP). The main impurities are composed for the upstream processing of the cell debris, cell culture media component, the transfection reagent, the DNA plasmids as well as host cell DNA and proteins. In addition to upstream process related impurities the downstream process related impurities that are going to be introduced while trying to remove the upstream process related impurities will also need to be cleaned. Those DSP impurities are related to the different buffers and chromatography media used during the purification steps.

The product related impurities are directly correlated to the product of interest, here AAV (See Figure 2). Indeed, the particle of interest at the end of the manufacturing process will be an active AAV particle, not damaged and containing the therapeutic gene (AAV Full capsids). However, most of the AAV produced during the manufacturing process will be composed of damaged particles, AAV proteins, AAV aggregates and what is called "empty capsids" where no genome has been encapsidated.

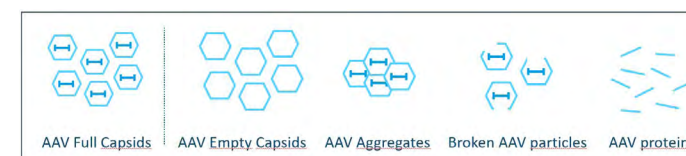


Figure 2: AAV product and related impurities

The downstream processing will also depend on the AAV serotypes with all AAV serotypes behaving differently during their production and purification. One good example is their distribution after production, some AAV serotypes being mostly secreted (extracellular) while other serotypes being mostly intracellular requiring a lyse step to get all the AAV produced.

As discussed earlier the downstream processes will be different depending on the AAV production system used and the AAV serotypes. However, all DSP have a similar workflow composed of three main

steps (see figure 1).

- A Harvest and Clarification Step where AAV is going to be released (lysis step when needed) and where the bulk will be clarified through filtration (clarification step). This step aims at removing the process related impurities that are the cell debris and organelles.
- A purification step that can be divided into two main stages which are the capture and the polishing. Purification techniques such as ultracentrifugation and chromatography are used. The capture step aims at removing the process related impurities that are the host cell DNA, RNA, proteins and transfected DNA, while the polishing aims at removing the product related impurities such as the defective AAV forms (damaged & empty) and AAV proteins.
- A concentration / formulation and final filtration step to get the virus into its appropriate state for storage and patient administration.

In addition to those main steps an ultrafiltration (UF) and/or Diafiltration (DF) step to concentrate or exchange the buffer of the product can be used after clarification and/or between the chromatography steps.

## 3. What are then the manufacturing challenges of the AAV downstream processing?

The manufacturing requirement is for a robust removal of product and process related impurities (complying to the regulatory requirements on safety) while retaining high titer of infectious AAV particles. One other challenge is to have a streamlined process leading to a cost-effective and secure supply of GMP material.

The first challenge is the legacy based on centrifugation steps for clarification and purification. Indeed, a few years ago most AAV processes were coming from academic laboratories using centrifugation strategies for AAV purification. While the centrifugation technique works well at small scale, it is not ideal at large scale and in a GMP environment. Ultracentrifugation can be used as a great example. Ultracentrifugation is used a lot as a polishing step to separate the two closely related AAV species that are the empty and full AAV particles. This technique works well at the lab-scale, but the scalability is difficult leading to long processing time and potential manufacturability and safety issues. The industry is now using depth filtration for the clarification step and chromatography techniques for the purification steps. Those are much more scalable and cost effective than centrifugations. Furthermore, chromatography is now a well-recognized technique for AAV purification.

Another challenge is the number of process steps along the downstream processing. Indeed, the more steps there are, the less



overall viral vector recovery will be. If we take the number of DSP steps shown in the figure 1, there are a total of 6 steps that are the clarification, UF/DF, Capture, Polishing, UF/DF, and final filtration steps. If each step leads to 70% recovery, the overall recovery for the downstream processing will only be 17%. This means more than 80% of the product is lost during the purification. There is an urge to reduce the number of processing steps in a classic AAV downstream process while increasing the efficiency of each step individually.

Technical downstream processing challenges are seen at each DSP step of an AAV purification process. For the clarification steps, the choice of filter to be used must be carefully selected depending on the AAV feed (from the upstream processing). Indeed, different filters will give different results depending on the nature of the clarification membrane and the pore size selected. The goal of the clarification step is to ensure a high viral genome recovery while reducing host cell debris and contaminants.

**3a. Filtration screening Study**

Based on suppliers' data we chose and screened different filters for the clarification of AAV products. Lysed cell culture bulk (treated with nuclease) was used to screen a total of six clarification trains with the aim of finding the best filters based on AAV recovery (viral genome - vg), filter capacity and turbidity reduction. We decided to test six clarification trains (using the same flow rate) with either one or two filters during what is called a pressure max study where the concept is to filter the product, here AAV lysate, and stop the filtration when the pressure reaches the maximum pressure set up. Our pressure target in this screening was set to 0,8 bars.

The results can be seen in table 1. The AAV recoveries obtained from the six runs were very different from 40 to 90% recovery. Interestingly, the turbidity reduction was high for all filters tested with less than 20 Nephelometric turbidity units (NTU) at the end of the clarification (the starting material was 500 NTU).

Table 1: Key results from the filtration screening study

Clarification	Filters Tested - pore sizes (µm)	Capacity L/m2	Turbidity (NTU)	Vg Recovery (%)	Step recovery (%)
Run 1	30-6 µm	286	45	100%	90%
	0,4-0,2 µm	156	19	90%	
Run 2	15-0,5 µm	105	12	51%	40%
	0,4-0,2 µm	118	3	86%	
Run 3	10-2 µm	270	62	75%	69%
	3-0,2 µm	280	12	84%	
Run 4	20-0,6 µm	314	38	93%	80%
	0,8-0,2 µm	36	13	83%	
Run 5	9-0,6 µm	322	43	92%	90%
	0,5-0,2 µm	329	17	100%	
Run 6	2-0,2 µm	303	12	80%	80%

It is striking that the filter capacity ranges from 100 to more than 300 L per square meter of filters. It is important to note that the second filter used for the run 4 was ten times bigger in surface compared to all filters which explains the low filter capacity of 36 L/m<sup>2</sup>. This filter capacity is a very important parameter when choosing its filter train as it will be crucial for the process scale up.

**B- Chromatography technique for AAV Capture and Polishing**

After the clarification step, the AAV particles need to be purified and selectively removed from the host cell DNA/protein and empty AAV particles. For these purification steps, chromatography has become over the years the method of choice. Different types of chromatography exist and can be used for AAV purification based on either affinity to a ligand, net charge, hydrophobicity, or size. All chromatography can be used for AAV purification however two types of chromatography are principally used for each of the two AAV purification steps, the affinity chromatography for the Capture step and the Anion Exchange (AEX) for the polishing step. Furthermore, most AAV purification processes are serotypes specific, requiring the design of a new process for each serotype used. There is then a clear need to establish an AAV purification process serotypes independent.

**Affinity chromatography** is used for the AAV Capture step and relies on the interaction of AAV with a ligand. Interestingly, over the years, a lot of suppliers have worked and developed different affinity resins for AAV purification, each of them having their pros and cons. If we focus on the challenges here, which is the development of a purification process working for various serotypes, one resin stands out from the others, the POROS™ CaptureSelect™ AAVX Affinity Resin. This resin is a pan-serotype affinity resin that binds wild type and novel or engineered AAV capsids. Using this resin, we were able to recover more than 95% of AAV for AAV2 and AAV8 serotypes using the same process with the same elution buffer. ABL is currently assessing this resin for a few other serotypes.

The use of affinity resin for AAV purification is very promising but also comes with potential challenges which are the possible leakage of ligands and the high cost of the resin. Affinity resin can be re-used however this re-use should be well documented and validated in order to use this strategy in AAV GMP manufacturing.

**Anion Exchange chromatography** is largely used for the polishing step in order to separate the "full" from the "empty" AAV capsids. The polishing is then a crucial step aiming at enriching the final product with the "full" active AAV particles. Indeed, if high levels of empty capsids contaminate the final product this would lead to a decrease of the therapy efficacy. In addition to the empty capsids, the partially filled capsids containing truncated genome or process related impurities packed into the genome should be removed at this step. The AEX chromatography is based on net charge of the particle of interest, net charge that will be different from the Empty and Full AAV particles due to the presence or absence of genomic DNA (leading to a difference in their Isoelectric point). The isoelectric points of empty and full AAV capsids are around 6,3 and 5,9 respectively.

Mixed with a high pH Buffer (usually around pH 9) the AAV capsids net charge is negative, with the full capsids being more charged than the empty capsids. The closely related AAV species can then be eluted using a salt gradient, where the empty capsids will elute first as less negatively charged compared to the full capsids (see figure 3). Initial assessment of this separation can be seen on the chromatogram level when comparing the ultraviolet (UV) wavelength at 280 nm, for Protein, with the UV at 260 nm, for DNA. When the peak in the chromatogram shows a UV 280 nm signal bigger than the UV 260 nm signal this indicates that the peak is predominately empty. On the other end when the UV 260 nm signal is higher than the UV 280 nm the AAV capsids are predominantly full (compare the peaks on the chromatogram – Figure 3).

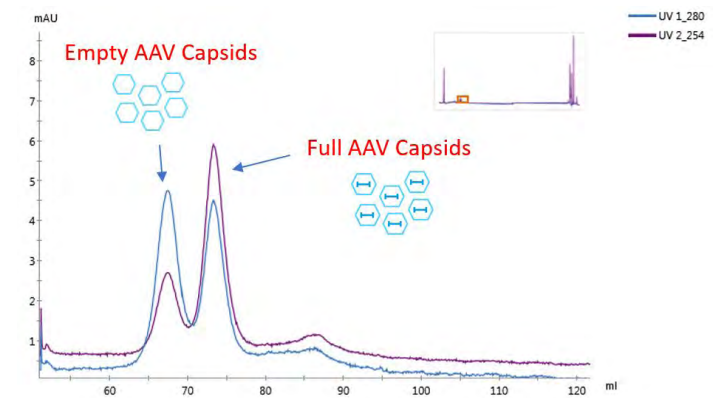


Figure 3: Chromatogram showing the separation of Empty and Full AAV Capsids

Interestingly, there exists different chromatography media that can be used for AEX chromatography, the conventional resins and the membrane and monolith media. AEX chromatography is an easily scalable and cost-effective technology. The overall challenge with the polishing step is that it requires optimization for each serotype, gene of interest, production system used.

**4. Conclusion**

The main challenge in AAV manufacturing is to purify a high volume of AAV with the key requirements that are high purity, high titer and high potency. If we focus on the overall AAV downstream manufacturing, there is an urge to move away from poorly scalable centrifugation-based techniques. We also need a simplification of the process design, reducing the number of DSP steps leading to an improvement of the overall yield. There is also a need to drive down the cost of goods of AAV processes.

Interestingly, a lot of new technologies are emerging for viral vector purification<sup>(2)</sup> which should help us tackle the main challenges we faced in the AAV downstream manufacturing.

One clear area of improvement in AAV downstream processing is the chromatography steps where new bead-based affinity chromatography resins have been recently launched for AAV capture step (AVIPure®-AAV Affinity Resins). These new resins are serotype specific but have the great advantages of being easily cleanable with NaOH helping the reuse strategy of the resin. New chromatography media were also developed offering a good alternative to the standard resins. Those media (membrane & monolith) offer a fast mass transfer

**References**

- 1- Ringer J, Fennell A, Schoukroun-Barnes L, Peterson C & Speidel J. (2019). Capacity Analysis for Viral Vector Manufacturing: Is There Enough. Bioprocess International
- 2- Sylvestre J & Conti-Permane P. (2022). Emerging technologies & companies in cell & gene therapy manufacturing. Cell & Gene Therapy Insights. 8(11), 1601-1649.
- 3- Haley J, Jones JB, Petraki S, Callander M, Shrestha S, Springfield E, Adamson L, Chilkoti A, Dzuricky MJ & Luginbuhl KM. (2022). IsoTagTMAAV: an innovative, scalable & non-chromatographic method for streamlined AAV manufacturing. Cell & Gene Therapy Insights. 8(10), 1287-1300.

allowing high flow rate (compared to low flow rate using resins) and a quick process. However, the downside of those new chromatography media is that they offer a reduced surface area compared to resins. It is then a delicate balance to find between surface area and flow rate, but one can imagine that in the near future new technologies will emerge allowing high surface area and high flow rate.

New technologies as alternatives to Capture chromatography are also developed and are promising. This is the case for the IsoTagTM-AAV, a new method to capture AAV using a fusion protein. Under the right condition the protein will bind AAV and aggregate to form big complexes that can be easily separated from the impurities in the lysed harvest using a Tangential Flow Filtration (TFF) device. After the AAV capture using the IsoTagTM-AAV, the complexes are re-solubilized and the AAV eluted and recovered. This AAV purification process is quick, cost effective, works for different serotypes and is easily scalable. We are now entering a very exciting time where new technologies are being developed to tackle the AAV downstream processing challenges. ABL is already assessing and optimizing these new technologies to provide new solutions for AAV manufacturing.

**Glossary**

- AAV: Adeno-Associated Virus
- AEX: Anion Exchange Chromatography
- CDMO: Contract and Development Manufacturing Organization
- DF: Diafiltration
- DNA: Deoxyribonucleic Acid
- DSP: Downstream Processing
- GMP: Good Manufacturing Practices
- NTU: Nephelometric turbidity units
- TFF: Tangential Flow Filtration
- UF: Ultrafiltration
- USP: Upstream Processing
- UV: Ultraviolet
- VG: Vector Genome

skan

ASEPTIC TECHNOLOGIES

**Key steps to achieve best process quality in Cell & Gene Therapy**

Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) are fast-growing fields in modern medicine. ATMPs comprise innovative and sophisticated medicines to treat a variety of human disorders and genetic diseases. It's critical to invest in manufacturing processes for these products to be compliant with cGMP regulations for the preparation and aseptic filling of sterile therapeutics for clinical and commercial use.

SKANs process experts can guide you through the development of a high quality, robust and custom isolator design solution, customized consumables, and dedicated services for autologous and allogeneic therapies.



skan.com

Contact us for more information



# Overcoming Challenges in the development of lentiviral vector Manufacturing Platforms.

By Manuela COTA & Luca CRIPPA - AGC Biologics  
 crippa@agcbio.com

Gene therapy has become increasingly promising in recent years, with the use of viral vectors to deliver genetically modified cells that can correct genetic defects or treat diseases. Lentiviral vectors in particular received significant attention in the gene therapy space thanks to their ability to stably integrate into the genome of the host cell and allow for long-term gene expression. They have shown great promise in gene therapy, with several clinical trials demonstrating their



efficacy in treating diseases, and their demand is constantly rising to support advanced clinical phases and commercial applications. However, their production is still a challenge due to limitations in large scale manufacturing platforms. To address the limitations, there is a need for improved processes that can produce lentiviral vectors at scale, cost-effectively and consistently, while adhering to GMP regulations. In this article, we will explore the state of the art, the need for improved manufacturing platforms for lentiviral vectors and recent advances in this area.

## 1. Lentiviral vectors: a safer and more versatile option for gene therapy

Over the course of the years viral vector-based gene therapy shifted from the use of  $\gamma$ -retroviral vectors derived from murine leukemia viruses (MLV) to lentiviral vectors (LV) mainly derived from HIV-1. While both retroviral vectors are able to stably integrate the transgene of interest, lentiviral vectors have the ability to transduce both dividing and nondividing cells and offer a safer genome integration profile, reducing the risks of insertional mutagenesis. At the same time, LV vectors can generally deliver higher infectious titres. The most common approach for the manufacturing of the LV vectors is the four plasmids system, each of which plays a specific role in the production of the vector. This system is widely used because it allows for precise control over the viral genome and ensures that the viral particles are replication-defective, meaning they cannot reproduce and cause disease in the target cells.

The first plasmid contains the lentiviral genome, which includes the gene of interest that will be delivered to the target cells. The second plasmid contains the genes encoding for the structural proteins of the viral

particle, which include the capsid, envelope, and accessory proteins. The third plasmid contains the packaging genes, which encode for the enzymes necessary for packaging the viral genome into the viral particle. The fourth plasmid contains the Rev gene, which is necessary for the transport of the viral RNA from the nucleus to the cytoplasm.

The four plasmids are transfected into a producer cell line, where the lentiviral genome, structural proteins, packaging genes, and Rev gene are all expressed. This leads to the production of lentiviral particles, which can then be harvested and purified for use in gene therapy applications.

## 2. Current Manufacturing Platforms and their limitations. Adherent systems – the CellFactory model.

One of the key considerations for lentiviral vector manufacturing is the choice of cell type and culture system. Adherent cell culture systems (HEK293T or HEK293 cells) are the most commonly used for lentiviral vector production. They require solid adhesion surfaces on which cells can grow up to optimal confluence, when they are transfected to prompt LV vector production.

From small scale productions in Petri dishes, this system can be scaled up on larger supports, such as T-flasks or multitrays systems like CellFactories (10-trays, 40-trays). By increasing the number of CellFactories processed in parallel (scale-out approach) this setup can lead to LV production processes that result in volumes of 20 -50L of bulk supernatant. This approach is widely known and proved effective in producing high-titre LV vector bulks.

The harvested supernatant containing the LV vectors is then processed into the downstream phase, with the aim to concentrate the LV vector to high-titres and to get rid as much as possible of impurities to guarantee the safety of the product and maximize the transducing capability of the LV vectors.

To this aim the harvested bulk is processed through multiple steps that include clarification, chromatographic steps for separation of the LV vector from impurities, concentration with tangential flow filtration (TFF), diafiltration or size exclusion chromatography for final formulation and a final sterilizing filtration.

This multi-step purification/concentration approach has a significant cost in terms of LV recovery, with fractions of LV vectors lost at each step. Purification steps aimed at separating the LV from impurities most of the time result in non-negligible losses. Ion Exchange Chromatography is the most widely used approach, leveraging the net negative charge of the LV to separate it from BSA, residual host cell proteins, DNA and other impurities. Negatively charged molecules however tend to be bound by the resin and then eluted together with the LV vector, requiring a fine tuning of elution conditions to obtain the desired balance between purity and LV vector recovery. Moreover, the sensitivity of LV vectors to moderately high salt concentrations must be taken into account when defining elution strategies, to preserve infectivity.

Resuspension of the purified LVs in the desired formulation medium can be carried out both via chromatographic approach – such as Size Exclusion Chromatography (SEC) – or via tangential flow filtration.

The chromatographic approach with SEC can however be applied up to a certain scale, as the processing of larger volumes would require the use of increasingly taller columns, with the related resin packing issues and space requirements. The TFF approach consists in a diafiltration step that can often be coupled to a previous concentration phase. While LV vectors are sensitive to shear forces and could be damaged by harsh conditions, it is possible to tune the concentration and diafiltration parameters to ensure excellent recoveries while maintaining high infectivity.

Finally, the sterilizing filtration can be considered the most critical step during the DSP phase. Due to their large size (approximately 100 nm), close to that of the pores of sterilizing membranes, filterability and throughput are major concerns for this step. Aggregation of LV vectors in larger complexes, or the presence of DNA fragments or proteins bound to their capsid, can increase their size, further hindering their filtration. This often results in overall poor performances of these steps, with recoveries of LV vectors across sterilizing membranes as low as 20 – 30%.

Despite these challenges, processes based on the use of adherent cells grown in cell factories were developed in the last years and proved to be a reliable and effective approach for the production and purification of high quality, high potency lentiviral vectors.

AGC Biologics proprietary adherent process, based on the culture of HEK293T cells on 24 x 10-trays CellFactories is able to produce 48L of clarified harvested bulks containing an average of  $4.1 \times 10^7$  TU/mL that are purified and concentrated in the downstream phase to ~ 500 mL of high quality, high purity sterile filtered LV vectors with infectious titres of average  $6.5 \times 10^8$  TU/mL. At the same time >99% removal of residual Host Cell Proteins, residual total DNA and BSA is achieved.

In consideration of their manufacturing scale, Cell Factory based processes can support preclinical studies or early stages of therapeutic development. This approach is applied by cGMP facilities to produce clinical-grade vector preparations and are adequate for Phase I/II trials, which usually involve only a few patients.

As the number of patients receiving regenerative medicines increases, both through clinical trials and approved products that have come to market, companies across the clinical development timeline are implementing strategies to deal with manufacturing and scale up.

However, scaling up using cell factory and roller bottle processes can lead to significant scaling issues, where the number of supports required can result in lengthy manufacturing times, high labor costs, and increased risk due to the number of manipulations required.

The scale out of these systems leads to an increase in the number of supports which determines an increase in the spaces in the laboratory and in the incubators, in the manual handling and risk of contamination from open manipulations, particularly problematic as batches are often pooled for downstream processing.

Furthermore, the transfection step is multiplied for all the different supports, increasing the chance of variable vector production.

In order to overcome these challenges, one alternative is to scale up the adherent cell process in a fixed-bed bioreactor.

Our team at AGC Biologics has worked in the last few years to address this issue and developed a new process in bioreactor that have been successfully transferred in GMP unit, starting from our current GMP process, that foresees the transient quadri-transfection of adherent HEK293T in CFs.

### 3. Fixed-bed bioreactors

The fixed-bed bioreactor technology is based on the use of a compact fixed-bed filled with microfiber microcarriers with an integrated perfusion system. Primary advantages of employing a fixed-bed bioreactor technology include direct transfer of the 2D reference process which minimizes risk and saves time. Large scale fixed-bed bioreactors can reach surfaces up to 500 m<sup>2</sup>, corresponding to the growth area of approximately 800 CF10 (Cell Factory) 2D culture vessels. Moreover they allow scaling of adherent production in a controlled environment, and the highly integrated single-use equipment can be adapted to meet current good manufacturing practices requirements.

The availability of representative scaled-down bioreactor models helps the development of new processes, minimizing costs and time needed to explore and optimize production parameters.

In order to develop AGC 200L adherent process different parameters have been investigated such as number of cells/cm<sup>2</sup> to be seeded, days of expansion before production, timing and number of harvest, volume of harvest, and several batches have been performed in development in order to optimized productivity and contaminants profile in a 0.5 m<sup>2</sup> scale down model. Once the main process parameters were set, the process was scaled-up to an intermediate 1 m<sup>2</sup> size bioreactor model, with the aim to establish a robust and reliable process for cGMP LV viral vector at 133 m<sup>2</sup> scale, providing 200 L of bulk supernatant per batch.

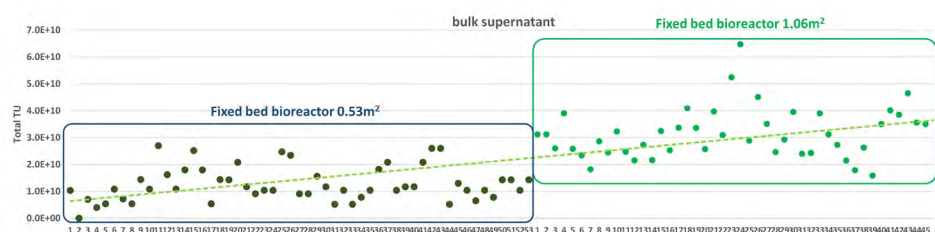


Figure 1 shows the improvements in productivity during development batches.

The scale up has been challenging due to the large volumes of culture medium and viral vector involved and the resulting increase in time for operations such as media change.

In parallel, the increased batch size in comparison to the CellFactory setting (200L instead of 48L) poses a number of challenges to the downstream steps as well.

First, such larger volumes often require new, dedicated spaces and equipment such as mixers, totes, 3D-bags. The DSP equipment as well need to be capable to accommodate the increased batch size, both for TFF and chromatographic steps.

For this reason, downstream processing flows applied to CellFactory-based processes often need adjustments or a complete redesign. Concentration with TFF strategy can be included as a starting step to help reduce the volumes to be further processed.

While IEX chromatographic columns properly sized for full scale bioreactor processes can be easily packed or sourced from vendors offering pre-packed columns, the use of Size Exclusion Chromatography is hardly applicable at this scale. Further TFF ultrafiltration steps are thus coupled with diafiltration to formulate the LV vectors in the desired medium.

Although all these challenges in scaling up the process, data obtained in the full-scale fixed-bed bioreactor system confirmed good scalability and equivalent performance of the process developed at a smaller scale as shown in Figure 2.

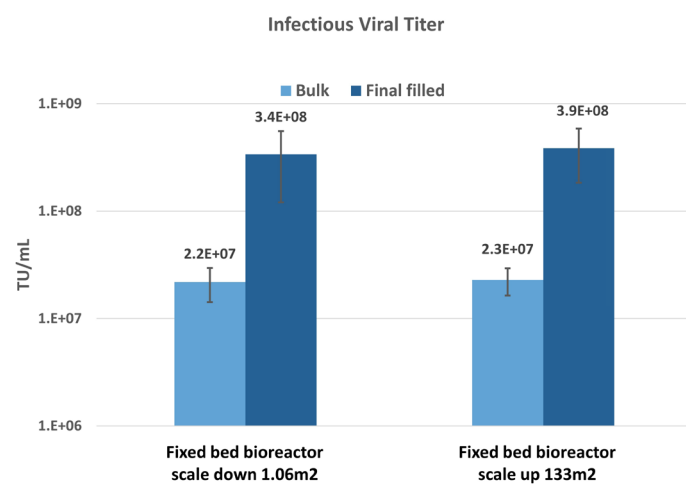


Figure 2: LVV Infectious viral titer data obtained in scaled-down and full-scale fixed-bed bioreactor systems (bulk vector and final filled vector)

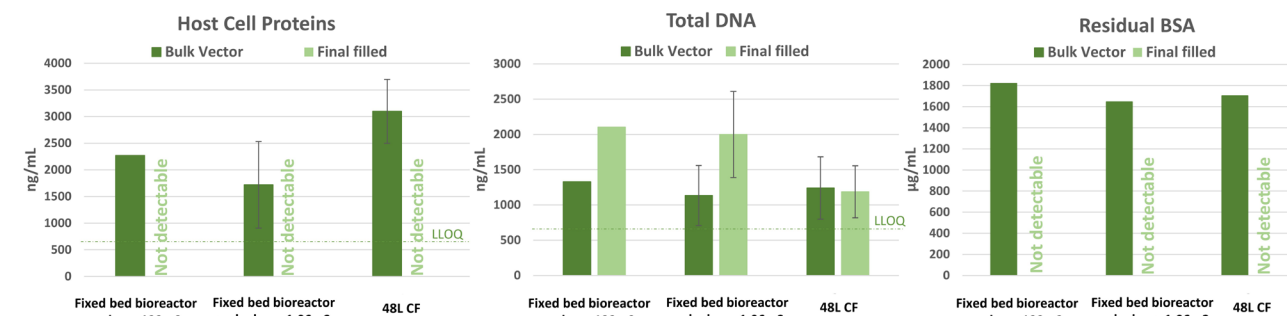


Figure 3: Impurities profile in fixed-bed bioreactors compared to 48L vector in CF

Furthermore, we demonstrated that the quality of the vector manufactured with 200L process is comparable to 48L process in terms of TU/mL and residuals as well as the transduction efficiency on target cells (CD34 hematopoietic stem cells and Lymphocytes T cells), guaranteeing an increase in the batch size (from 48L to 200L) and consequently in the total TUs of about 4 times. Data are shown in Figure 3 and Figure 4.

In AGC biologics we have also worked on a further scale up by increasing the surface of the bioreactor in order to achieve at full scale up to 1000 L of bulk vector. We are also evaluating the possibility of a further concentration of the vector in case a higher titer is needed.

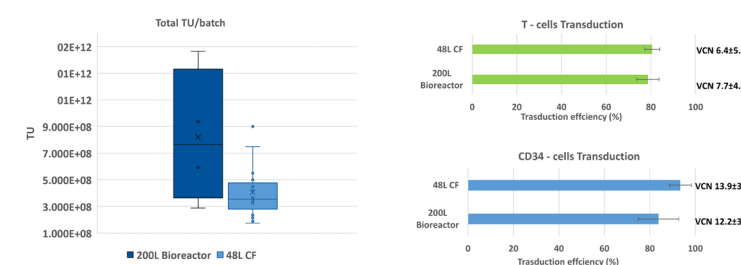


Figure 4: Total TU/batch of final purified vector and Transduction efficiency on CD34 and T cells

### 4. Suspension cell culture and Stirred-Tank (STR) Bioreactors

Although the most used platform for the production of lentiviral vectors is the one based on cells in adhesion, the system based on cells in suspension is becoming more and more interesting due to its greater simplicity in scale up.

Suspension cell cultures show several advantages compared to adherent ones. Among these the greatest ease in handling the cells that do not require a tissue-culture-treated vessel to be cultured, only agitation for adequate gas exchange, can be cultivated to much higher densities in systems such as stirred tank and wave bioreactors, but above all most suspension cell lines grow in serum-free media, which reduces costs, makes the downstream purification process easier and reduces the risk of contamination with adventitious agents thus favoring the move towards a clinical grade product.

In AGC Biologics we have established a proprietary cell line by adapting adherent HEK293T cells to grow in suspension in chemically defined medium and we have developed a process for LV vector production with these cells by optimizing the culture and transfection conditions first in small scale in shaking flask, and then in STR bioreactor at 3L scale. The process was then scaled up to 50 L in pilot scale and we are now in the process of moving the process into GMP by scaling up to 200L and 1000L.

Working on different process parameters, both on a small scale (for example cell density at transfection, time point for harvest, DNA/PEI ratio) and in bioreactor (stirring speed, set point of gas and pH) we managed to obtain a good yield of productivity in the bulk supernatant, even higher than with adherent system. Physical and infectious viral titers are shown in Figure 5.

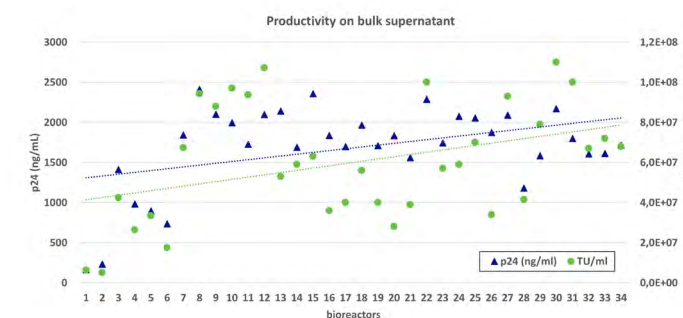


Figure 5: LVV USP: Physical and infectious viral titre improvement obtained during the development in 3L bioreactors



After the production and harvesting of LV supernatants, the obtained product underwent a series of purification processing steps for impurities removal and concentration. The first critical step in the downstream process is clarification of the bulk vector, to physically remove cells and cell debris from the LV-containing cell culture medium. The presence of the producer cells in suspension requires different approaches, aimed both at removing cells and cell debris and at the same time minimizing cell breakage. The use of depth filters or recently-available inline centrifugation systems can help in this regard, however clarified bulks from suspension cell systems tend to be richer in impurities such as Host Cell Proteins (HCPs) or Host Cell DNA. This poses a burden on the downstream steps that need to be tailored to the different quality of the starting material. Productivity data obtained with AGC suspension process at pilot 50L scale compared to adherent 48L process are shown in Figure 6.

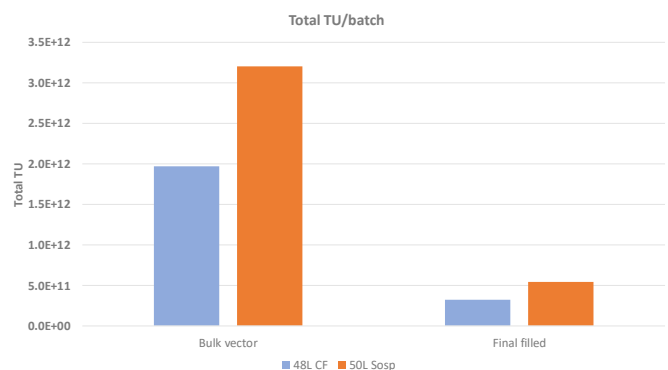


Figure 6: LV vector productivity in adherent and suspension systems

One of the key advantages of suspension cell-based lentiviral vector production systems is the easier scale-up and theoretical much larger batch volumes that can be reached. To fully exploit this potential, downstream processes must be designed in a way that allows for easy scalability and application at vastly different scales, ranging from 50 to 200, and up to 1000 and 2000 liters. At such large scales laboratory and overall facility design becomes a relevant challenge, requiring extensive overhauling of the spaces used for smaller scale LV vector processes.

### 5. Common challenges

Regardless of the scale and the choice of adherent vs. suspension cell systems, the establishment of LV vectors manufacturing platforms is bound to face a number of obstacles intrinsic with the specific nature and application of this kind of “advanced therapy medicinal product”.

- **Representative scale-down models**

The development of representative scale-down models in parallel to the definition of the full-scale process is critical for establishing robust and reliable lentiviral vector production platforms. By using these models, manufacturers can identify and address potential process issues early in the development process, thereby minimizing the risk of product failure or delay in clinical development. Additionally, at later stages, scale-down models can be used to support process validation, as they can provide evidence of the consistency and reproducibility of the manufacturing process across different scales.

Constraints in the availability of equipment and consumables limit the minimum scale at which a LV vector production scale-down process can be executed, thus representing a major difficulty during development that can cause cost and project timelines to increase.

- **Improving process performance**

When trying to optimize LV vector productivity in the upstream phase the complex and variable nature of the starting materials, such as the host cells and culture media, must be carefully taken into consideration. Changes in the parameters or materials used in the upstream production phase can have a significant impact on the quality and consistency of the product, and in turn affect the performance of the following downstream steps. A careful balance must be reached to optimize the final product titres and recoveries.

Moreover, the multi-step nature of the purification processes represents a significant challenge in terms of yield optimization, that plays on a thin balance between high yields and purity, while maintaining the stability and functionality of the lentiviral vector.

New affinity chromatography resins currently under development by different manufacturers might help in this regard, possibly combining high purity with higher step LV vector recoveries. On the other hand, the substantial cost of these resins needs to be considered in the overall economy of the manufacturing process.

As previously mentioned, the final sterilizing filtration represents a major burden on LV production processes yields. The introduction of larger pore size membranes as pre-filter to ease the load on the sterilizing step or the optimization of the buffer composition can be applied, even though in general this can result in only limited improvements. Moreover different lentiviral vectors might need different conditions or filter combinations resulting in longer and more expensive development work.

- **Unique Analytics**

Analytical testing is a crucial aspect of the production of lentiviral vectors as ATMPs, as it is necessary to ensure the safety and quality of the final product. The regulatory authorities require extensive analytical testing to be conducted throughout the manufacturing process to evaluate the identity, purity, potency, and safety of the lentiviral vectors. These tests typically include assays for determining the viral titer, transduction efficiency, residual host cell proteins and DNA contamination or any other process-related contamination. AGC LV manufacturing platforms rely on more than 100 in-house QC tests for the characterization and release of LV with orthogonal strategies. This represents a major workload and needs to be carefully considered when defining project timelines.

- **Regulatory compliance**

Despite there are already established guidelines and regulations in place for the use of lentiviral vectors as ATMPs, regulatory authorities continue to refine and update these guidelines as new information and experience is gained, with the aim to ensure the safety and efficacy of lentiviral vectors as ATMPs. These changes may require manufacturers to implement new or modified procedures to ensure compliance with the updated

regulations. For example, changes in the required testing for safety or quality control may require additional steps in the manufacturing process or modifications to existing equipment. Additionally, changes in the regulatory environment may necessitate the development of new analytical methods or the refinement of existing ones.

- **Process changes during the product life-cycle**

Any change made to the manufacturing process can have a significant impact on product quality, yield, cost and acceptance by regulatory agencies. These factors can ultimately impact project timelines and time to market. Therefore, a comparability study is required to transition from one system to another, and it is crucial to consider all the potential ramifications of any changes made to the manufacturing process.

- **In vivo application**

Regulatory requirements for in vivo use of LV vectors are more stringent in terms of residuals levels allowed in each vector dose. This opens for the field two major challenges: from a process point of view there is the need to increase the grade of purification of lentiviral vectors, evaluating new approaches like affinity resins and membranes. In parallel, the development of analytical methods with sufficient sensitivity to detect very low concentrations of host cell proteins and host cell DNA becomes crucial.

### Conclusion

Cell and gene therapies have emerged as promising treatments for previously untreatable diseases, and viral vectors are currently the preferred gene-delivery vehicle for most of these advanced therapies. As a result, safe, robust, and cost-effective manufacturing processes are necessary to meet the demands of the patient population. However, the complexity involved in developing and scaling viral vector processes to commercial manufacturing scale, as well as the lack of standardized approaches, remain as challenges that can impact therapy development timelines and productivity. Therefore, the selection of an appropriate production platform plays a key role in the successful implementation of a process that meets commercialization timelines and manufacturing costs, ultimately making these therapies accessible to patients.

### Glossary

BSA Bovine Serum Albumin  
 CF Cell Factories  
 DSP Downstream Process  
 GMP Good Manufacturing Practices  
 HEK Human Embryonic Kidney  
 IEX Ionic Exchange Chromatography

LV Lentiviral  
 MLV Murine Leukemia Viruses  
 SEC Size Exclusion Chromatography  
 TFF Tangential Flow Filtration  
 USP Upstream Process

### References

- Large-Scale Production of Lentiviral Vectors: Current Perspectives and Challenges; *Pharmaceutics* 2020, 12, 1051
- Lentiviral Vector Bioprocessing; *Viruses* 2021, 13, 268.
- Production of lentiviral vectors; *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* (2016) 16017

**BWT LOOPOLine**  
 La solution compacte tout-en-un pour la production d'eau purifiée ou EPPI de petite capacité

**PLUG AND PLAY**

Dernier-né de notre gamme de systèmes dédiés aux acteurs des biotechnologies, BWT LOOPOLine regroupe désinfection, adoucissement, osmose, électro-déionisation et skid de distribution dans un seul et même équipement ultra-compact, idéal pour les espaces réduits.

Ne reste plus qu'à le connecter à la boucle pour obtenir une eau purifiée de qualité ou une eau pour préparations injectables, prête à l'emploi.

POUR EN SAVOIR PLUS

bwt-pharma.com

# Are modern scalable bioreactors the Cell Culture Strategy needed for Gene & Cell Therapy success?

By *Émilie GATEAU, Hanna P. LESCH & Michele MARINI - EXOTHERA*  
 info@exothera.word

Gene and cell therapies are innovative biological therapeutics developed especially for cancer and inherited monogenetic diseases. They represent an alternative to chronic therapies making a “one-shot” cure for many diseases and conditions a reality. However, process development time and manufacturing costs issues are slowing down the spread of gene and cell therapies.



The standard strategy is to encapsulate the therapeutic gene in a carrier, usually a viral vector, then produce this in cell culture. However, the viral vector production industry still partially uses open and manual processes, while gene and cell therapy require closed, automated, and scalable platforms, which should speed up development and reduce manufacturing costs.

Modern scalable bioreactors allow rapid scale-up from development to production scale. They ensure a high degree of automation and monitoring which reduces costs, manpower, and contamination risks. They can be easily paired with continuous processing steps – like tangential flow filtration - to increase cell density and viability. Many solutions are available on the market for both adherent and suspension cell culture and in disposable formats.

## 1. Cell culture method: adherent vs suspension

The selection of the bioreactor depends on the cell culture method: adherent, where cells need a solid substrate to grow as a monolayer, or suspension, where the cells can grow free-floating in the medium. Most mammalian and insect cell lines are naturally anchorage-dependent with only a few exceptions, like hematopoietic cells. The yield, footprint and scalability will therefore be limited by the available growth surface. The use of flatware flasks allows easy cell monitoring under an inverted microscope, but periodic subculture steps are required. In addition, dissociation from the substrate, for manipulation or harvesting, requires a mechanical or enzymatic action.

The use of microcarriers as a substrate avoids having to adapt adherent cells for suspension but has some disadvantages. Microcarriers are difficult to handle, and their removal requires a dedicated purification step. Moreover, high shear stress and turbulence generated in stirred-tank bioreactors (see next section) might jeopardize adherent cells' capacity to grow and survive. →

Table 1 - Summary of cell culture method characteristics and most commonly used commercial platform

		Avantages	Disavantages	Commercial Platform
Cell Culture Method	Adherent	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fit most of commercial cell lines (adherent or suspension)</li> <li>Easy harvesting</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surface-dependent yield</li> <li>Dissociation from surface through mechanical or enzymatic step</li> <li>Cell recovery might be complex or impossible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ascent™ (Corning)</li> <li>iCELLis® (Pall)</li> <li>TideXcell® (VacciXcell)</li> <li>scale-XTM (Univercells Technologies)</li> </ul>
	Suspension	<ul style="list-style-type: none"> <li>High yield and scalability</li> <li>Growth depends only on cell concentration and feeding strategy</li> <li>Floating microcarriers for adherent cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adaptation of adherent cell lines time and cost demanding</li> <li>Additional equipments required for high-cell density or perfusion cultures.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Allegro™ (Pall)</li> <li>Biostat® RM (Sartorius)</li> <li>HyPerforma™ (Thermo Fisher Scientific)</li> <li>ReadyToProcess WAVE Bioreactor™ (Cytiva)</li> <li>Xcellerex™ (Cytiva)</li> </ul>

Suspension cells float in the medium where growth is limited only by cell concentration and the feeding strategy. Subculture is easier and cell monitoring is possible through daily sampling or using a cell monitoring probe, available for most bioreactor setups. Even if no dissociation step is needed, some cell lines could present a tendency to aggregate requiring the use of cell strainers or the addition of anti-clumping reagents which are often incompatible with the transfection reagent. Most adherent cell lines can be adapted to grow in suspension, but adaptation can be an expensive and time-consuming process. The market provides some ready-to-use adapted suspension cells that often come with royalties and/or license fees.

## 2. Scalable and high-capacity cell and gene therapy manufacturing

Gene and cell therapy manufacturing presents several challenges regarding capacity, footprint, and costs. As a result, there is a need for flexible technologies that can accommodate different processes and scales. Currently, the technology landscape for cell and gene therapy production can be classified into adherent (e.g., flatware and packed bed reactors [PBRs]) and suspension technologies (e.g., stirred tank reactors [STRs]) as described above.

The scale-X™ bioreactor systems offer scalable bioprocessing solutions for high demand applications. The technology comprises a fabric matrix that offers a large surface area packed into a small bioreactor volume, which embodies the concept of process intensification and significantly reduces the process volume, footprint, and the shear stress on the cells, all while drastically increasing the capacity. It features a unique structured fixed bed, enabling homogeneous cell distribution and media flow. This novel design promotes high cell densities without aggregation while maintaining a low shear stress, resulting in higher specific cell productivity (2- to 4-fold) and product quality (functional/physical titers) for both adherent and suspension cell lines.

The cell immobilization inside the scale-X bioreactor fixed-bed also allows for easy implementation of perfusion processes, in-line product concentration and reduction of impurities for a low-volume, concentrated bulk product harvest.

The scalable portfolio offer solutions from research (2.4 m² of growth surface) to R&D (10 and 30 m² of growth surface) and manufacturing-scale (200 and 600 m² of growth surface), enabling to reach high-capacity production of cell and gene therapies for suspension and adherent cell lines.

## 3. Conclusion

Gene and cell therapies based on viral vectors are promising life changing treatments, but their success requires a change in paradigm from the traditional biopharma industry approach, starting with cell culture strategy and scalability. Modern scalable bioreactors can fast track the design of new, closed, secure, and automated platforms for the development and production of gene and cell therapy both in adherent and suspension cell culture. Adherent-based bioreactors can host most of the cell lines on the market, with easy perfusion and harvesting, but scalability is surface-dependent. Suspension bioreactors allow high yield and better scalability, but they present more challenges when implementing perfusion and not all commercially available cell types can be adapted to suspension conditions.

New structured fixed-bed of scale-X bioreactor portfolio offer manufacturing solutions to limitations in capacity, reliability and scalability with an easy implementation of perfusion process for both adherent and suspension cell lines and can address the limitations of traditional methods used in cell and gene therapy manufacturing.



# FAITES RIMER CONFORMITÉ AVEC SANG-FROID



## L'Annexe 1 entre en vigueur. Nous espérons que vous gardez votre sang-froid !

Nous accordons nous aussi beaucoup d'importance à la conformité, c'est pourquoi nous sommes là pour vous aider à comprendre et à mettre en œuvre les changements qui s'appliquent à vos protocoles de nettoyage et de désinfection.

Contec dispose d'une large gamme de produits sporicides à action rapide, de désinfectants sans rinçage, ainsi que d'un détergent à faible résidu, qui répondent à ces nouvelles exigences. Notre équipe d'experts microbiologistes et techniques vous accompagne tout au long de votre stratégie de contrôle de la contamination, la sélection et la validation des désinfectants ou la gestion des résidus.

Pour plus d'informations sur l'Annexe 1, votre stratégie de contrôle de la contamination ou notre gamme de produits pour salles blanches, rendez-vous sur [contecinc.com/fr/annex-1-update](https://contecinc.com/fr/annex-1-update)

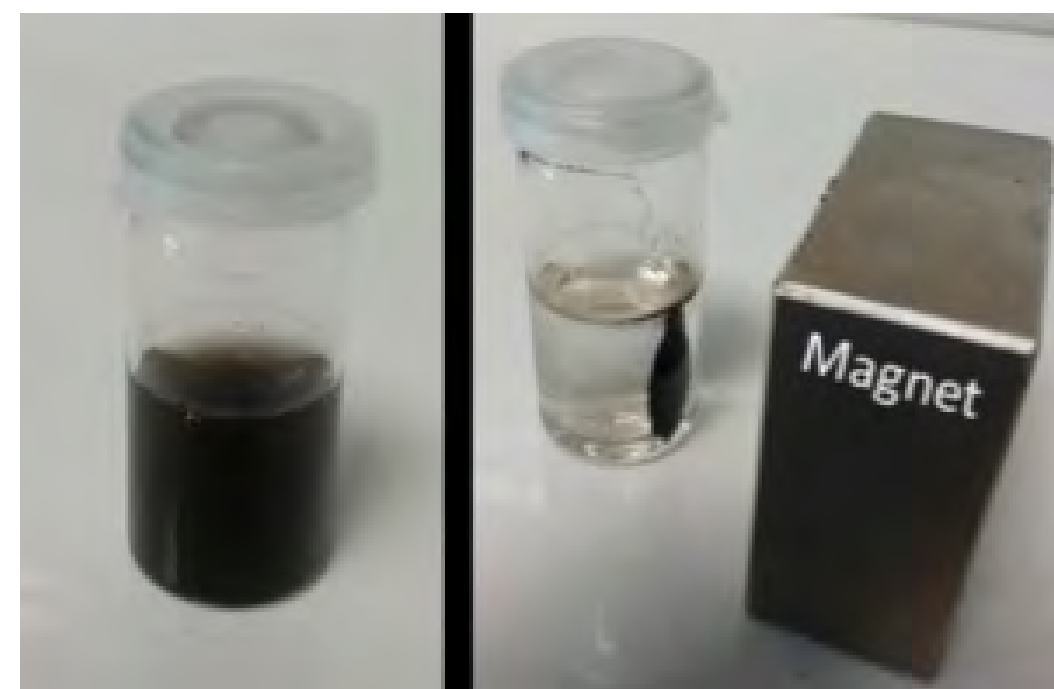
*Quand le nettoyage est primordial*



## Le pouvoir magnétique des nanoparticules : triage magnétique cellulaire, dépollution des milieux & nanocatalyseurs réutilisables..

Par Chloé GERVASONI & Jérémy PARIS – SON SAS  
c.gervasoni@sonsas.com

Les nanotechnologies reposent sur la connaissance de l'infiniment petit permettant la création de nouvelles propriétés et fonctions fondamentalement innovantes. Le monde des nanoparticules représente ainsi un champ de recherche et développement multidisciplinaire avec des perspectives d'applications considérables<sup>(1)(2)</sup>.



Les nanoparticules sont des matériaux composés de grains dont au moins une des trois dimensions externes mesurent entre 1 et 100 nm<sup>(1)</sup>. Leur petite taille leur confère des propriétés révolutionnaires en termes de réactivité : plus leur taille est petite, plus leur surface spécifique est élevée par rapport à son volume et plus la réactivité de la surface augmente. Or, plus une particule est réactive plus son utilité en termes d'applications sera importante.

Ainsi, les nanoparticules sont utilisées dans un large panel d'applications innovantes telles que l'industrie agroalimentaire, le domaine du bâtiment et des travaux publics, la cosmétique, les produits d'hygiène, l'énergie, l'environnement, les peintures, les médicaments, la plasturgie ou le textile par exemple<sup>(3)</sup>.

Grâce à leurs diverses propriétés physiques et chimiques (grande surface spécifique, propriétés magnétiques...), les SPIO ou "Superparamagnetic Iron Oxide", sont des nanoparticules d'oxyde de fer utilisées pour des applications industrielles ou biologiques, telles que la catalyse, la nanomédecine ou la dépollution.

Ces nanoparticules magnétiques sont préparées par la startup SON, spécialisée dans le développement et la fabrication de nano-objets (nanoparticules avec ou sans fonctionnalisation). Elles sont ainsi biocompatibles, reproductibles et hautement caractérisées par de nombreuses techniques (Diffraction des Rayons X (DRX), Microscopie Electronique à Transmission (MET), Spectroscopie de photoélectrons X (XPS), analyse infrarouge, fluorescence X, Diffusion dynamique de la lumière (DLS), zétamétrie, mesure de surface spécifique par BET, analyse thermogravimétrique ...).

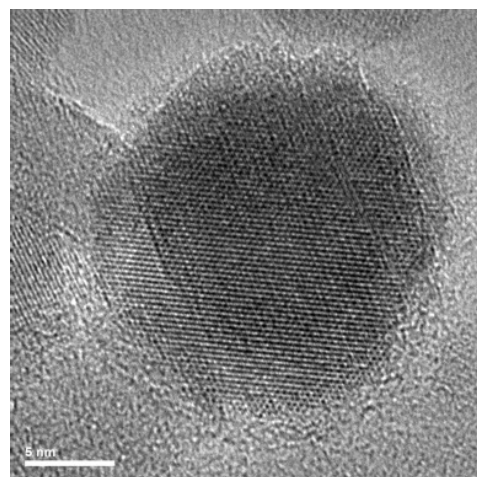


Figure 1 : Cliché d'un SPIO au microscope électronique à transmission

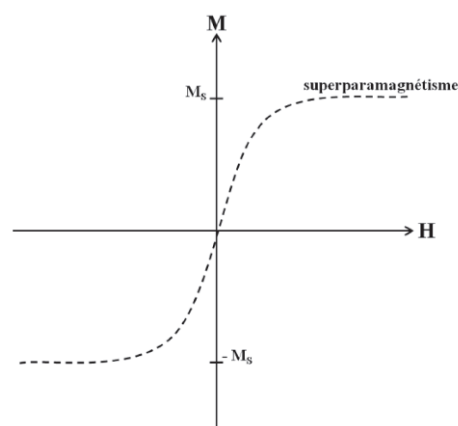


Figure 2 : Représentation schématique d'une courbe d'aimantation de nanoparticules d'oxyde de fer ayant une taille inférieure à 20 nm

### 1. Le magnétisme des nanoparticules d'oxyde de fer

Les SPIO sont des nanoparticules d'oxyde de fer ayant des propriétés particulièrement intéressantes. Leur structure spécifique ainsi que la taille de leurs cristallites, inférieure à 20 nm (Figure 1), leur confèrent une propriété superparamagnétique à température ambiante<sup>[4]</sup>. Autrement dit, lorsqu'un champ magnétique est appliqué, une aimantation des nanoparticules se produit. Cependant, lorsque le champ magnétique est nul, l'aimantation de ces nanoparticules disparaît, comme illustré en Figure 2. De plus, plus le champ est intense, plus l'aimantation l'est également. Ce superparamagnétisme est ainsi une propriété qui peut se révéler pertinente dans certaines applications et primordiale notamment pour des applications biologiques car une aimantation rémanente (lorsque le champ magnétique est nul, l'objet conserve ses propriétés magnétiques) est responsable de l'agglomération des particules entraînant le blocage de la circulation du sang dans les vaisseaux<sup>[5]</sup>.

#### 1. La structure cristallographique des SPIO

Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques possèdent une structure spinelle inverse  $(Fe^{3+})_A(Fe^{3+}Fe^{2+})_B O_4$  qui s'organise de la manière suivante :

- Les 32 anions  $O^{2-}$  constituent un réseau cubique faces centrées (O) ;
- Les ions ferriques  $Fe^{3+}$  qui sont logés dans les sites tétraédriques (A) du réseau en occupant 8 sites tétraédriques sur 64 ;
- Les ions ferriques  $Fe^{3+}$ , les ions ferreux  $Fe^{2+}$  et les lacunes  $\blacksquare$  qui viennent se loger dans les sites octaédriques du réseau (B) en occupant 16 sites octaédriques parmi les 32 disponibles.

Deux types d'oxydes de fer possèdent une telle structure : la magnétite  $((Fe^{3+})_A(Fe^{3+}Fe^{2+})_B O_4)$  et la maghémite (obtenue par oxydation de la magnétite)  $((Fe^{3+})_A(Fe^{3+}\blacksquare)_B O_4)$ .

Les SPIO possèdent une structure intermédiaire entre ces deux oxydes mais tend fortement vers la magnétite.

Il s'agit ainsi de cette structure particulière qui confère aux nanoparticules d'oxyde de fer ses propriétés magnétiques particulières.

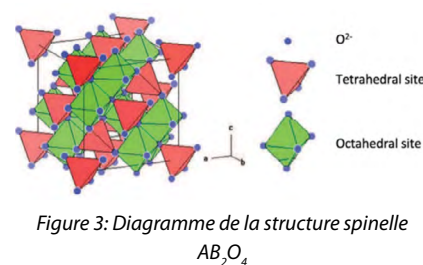


Figure 3: Diagramme de la structure spinelle  $AB_2O_4$

### 2. La toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

Afin d'étudier la viabilité cellulaire en présence des nanoparticules d'oxyde de fer, des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été traitées avec des solutions de diverses concentrations de SPIO pendant 24h à 37°C. A l'issue de ces 24h de traitement, un test MTT a été réalisé. Il a ainsi été démontré que les SPIO n'impactent pas de manière statistiquement significative la viabilité des cellules. Cependant à des concentrations plus élevées (100 µg/mL), une diminution de la viabilité est observée.

### 2. Quelques exemples d'applications du magnétisme des nanoparticules à travers différents domaines

#### a. Triage magnétique de matériel biologique

Le tri magnétique cellulaire permet la sélection ou la suppression de différents types de composants biologiques tels que les types cellulaires, les organites intracellulaires, les protéines, ou encore les acides nucléiques par exemple. Cette technique possède de nombreux avantages tels que l'isolation de cellules directement issus d'échantillons non traités, comme le sang ou la moelle osseuse. Elle sélectionne des molécules simplement et rapidement, notamment avec l'automatisation récente de celle-ci. Comparativement au tri par cytométrie en flux, autre technique utilisée pour sélectionner des sous-populations de cellules, le tri magnétique élimine la problématique d'interférences avec les mouvements d'ions et effectue une sélection d'une population de cellules viables en grande quantité plus rapidement<sup>[6]</sup>.

Il existe deux types de tri magnétique cellulaire, illustrés en Figure 3. Le premier consiste en la séparation de cellules contenant préalablement des substances magnétiques (ex : les érythrocytes qui contiennent une substance magnétique au sein de l'hémoglobine) : ces cellules peuvent ainsi être directement attirées par un aimant. Le deuxième concerne le couplage de particules magnétiques avec un ligand capable de reconnaître spécifiquement une structure cellulaire de surface : une bille magnétique couplée à un anticorps par exemple, pourra se lier avec une cellule

présentant des marqueurs spécifiques que pourra reconnaître l'anticorps pour ainsi former un ensemble capable d'être attiré par un aimant. Ensuite, deux types de sélection sont possibles. La sélection positive consiste à récupérer de manière magnétique les cellules d'intérêt. Cependant, dans le cas du deuxième type de tri présenté ci-dessus, lorsque le ligand utilisé risque de modifier la fonction cellulaire de la cellule visée ou bien qu'il n'existe pas de ligand pour reconnaître cette dernière, il est possible de procéder à la sélection négative : les cellules récupérées par méthode magnétique sont les cellules non désirées.

Différentes méthodes sont utilisées pour effectuer le tri magnétique cellulaire, tel que le tri sur colonne<sup>[6]</sup> ou le tri qui s'effectue directement à l'aide d'un aimant. Ce dernier sera présenté dans la suite de l'article et illustré par la Figure 4 pour le cas d'une sélection positive.

Tout d'abord, des particules magnétiques sont couplées à un ligand capable de reconnaître le type cellulaire à sélectionner. Ensuite, le mélange biologique est mis en solution avec les particules magnétiques couplées<sup>[1]</sup>.

Le ligand reconnaît spécifiquement le type cellulaire à isoler et se fixe sur ces dernières<sup>[2]</sup>.

Lorsqu'un aimant est appliqué, les cellules auxquelles sont accrochées les particules magnétiques vont être attirées vers l'aimant. Il est alors possible de pipeter le surnageant contenant les sous-populations de cellules non désirées<sup>[3]</sup>. Une fois le pipetage réalisé, les cellules isolées peuvent être redispersées<sup>[4]</sup>. Les cellules peuvent ainsi être directement analysées et utilisées<sup>[5]</sup>, malgré la présence de particules magnétiques à leur surface. En effet, ces particules sont beaucoup plus petites que les cellules eucaryotes, leur permettant de limiter le stress cellulaire. Plus la taille des particules est petite, plus le stress cellulaire est diminué, d'où l'utilisation de nanoparticules qui minimisent cet effet. De plus, dans la

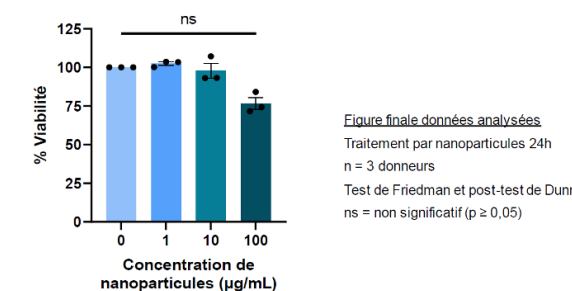


Figure 4 : Viabilité des cellules PBMC en fonction de la concentration des nanoparticules d'oxyde de fer (µg/mL)

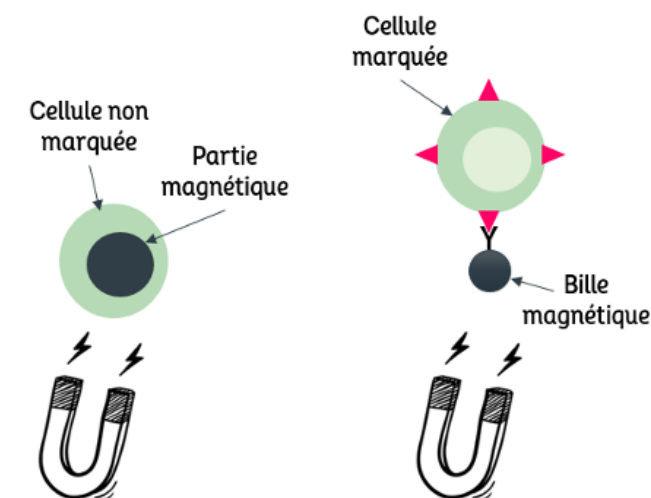


Figure 5 : Représentation schématique des deux types de tri magnétique



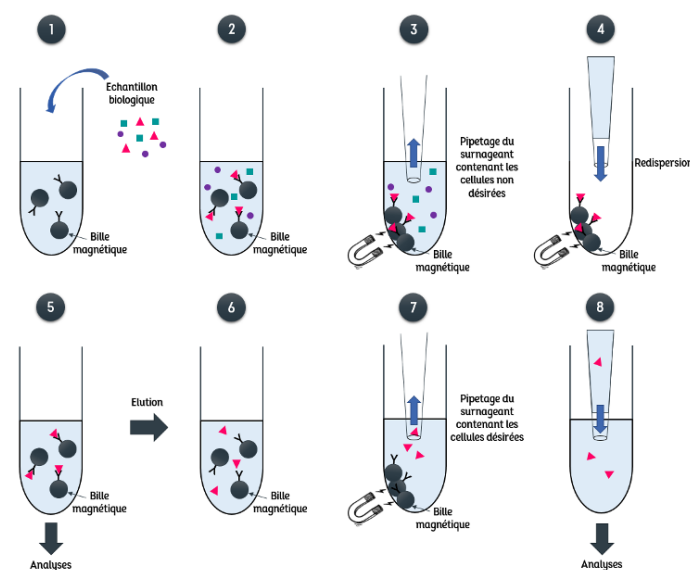


Figure 6 : Représentation schématique d'un tri à sélection positive avec un aimant

plupart des cas, ni la fonction, ni la viabilité et ni l'usage des cellules ne sont affectés par les particules magnétiques<sup>[6]</sup>. Toutefois, il est possible d'éluier ces cellules marquées par un agent magnétique et séparer ces deniers par méthode enzymatique ou physique. Enfin, pour isoler les cellules des particules magnétiques, il suffit d'effectuer une purification magnétique, comme préalablement décrit, avec la présence d'un aimant<sup>(6 à 8)</sup>. Cette technique de tri magnétique cellulaire permet ainsi d'obtenir une pureté cellulaire de plus de 95%<sup>[6]</sup>.

**b. Dépolluer les eaux usées des métaux lourds**

De nombreux métaux lourds tels que le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), mais également, le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le chrome (Cr), l'arsenic (As), le cobalt (Co), le zinc (Zn) ou encore le manganèse (Mn) par exemple sont rejetés continuellement dans l'environnement essentiellement par le biais des activités humaines (rejets d'usines métallurgiques, textiles ou papeteries par exemple, épandages sur les sols, incinérations de déchets ou d'essence, ...). Cependant, ces métaux lourds, qui ne sont pas biodégradables, induisent une toxicité certaine pour l'environnement et les êtres vivants.

Plusieurs méthodes ont été développées afin de dépolluer les milieux. L'une d'entre elles concerne l'utilisation d'agents chélatants. Des agents chélatant ou appelé plus couramment "chélateurs" sont capables de capter des métaux lourds présents dans les eaux usées par un mécanisme de complexation. Ces chélateurs possèdent une affinité spécifique avec chaque métal. Autrement dit, chaque chélateur possède une affinité plus au moins grande pour chélater un métal en particulier.

L'intérêt de greffer ces molécules à la surface d'un SPIO est de pouvoir récupérer l'ensemble des nanoparticules fonctionnalisées par des chélateurs, qui ont eux-mêmes piégé le métal à retirer, par aimantation. Ainsi, comme illustré en Figure 5, il suffit d'insérer les nanoparticules fonctionnalisées avec des chélateurs dans un milieu pollué par des métaux lourds. Ensuite, les chélateurs à la surface des nanoparticules sont capables de piéger un ou plusieurs métaux. Puis, il suffit de disposer d'un aimant afin de récupérer le tout, puisque les nanoparticules ayant un cœur d'oxyde de fer sont magnétiques. Les métaux sont ainsi récupérés en une seule opération, rapidement et facilement.

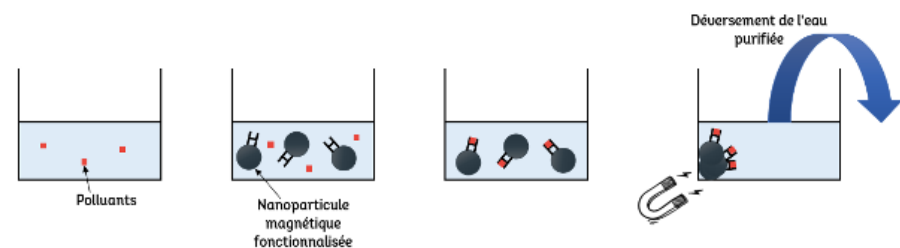


Figure 7 : Représentation schématique d'un mécanisme de dépollution d'eaux usées avec des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec un agent chélateur

**c. Des nanocatalyseurs réutilisables**

Un catalyseur est un ingrédient clé pour de nombreuses réactions chimiques. Il facilite la transformation d'une molécule en une autre molécule, sans être lui-même transformé. 90 % des transformations chimiques en milieu industriel font appel à des catalyseurs métalliques pour la synthèse de produits chimiques en grande quantité. Cependant, de nombreux catalyseurs sont fabriqués à partir de métaux précieux, ce qui les rend extrêmement coûteux et potentiellement dangereux pour l'environnement. Parallèlement, comme démontré dans la Figure 6, suite à une réaction avec un catalyseur, les industriels sont amenés à effectuer des étapes de purification lourdes énergétiquement et économiquement afin d'obtenir leur produit final. Il est également difficile dans les processus classiques de récupérer le catalyseur, ce qui soulève la problématique du recyclage et de la non-réutilisation des métaux critiques qui pourraient encore théoriquement être réengagés dans une nouvelle réaction catalytique.

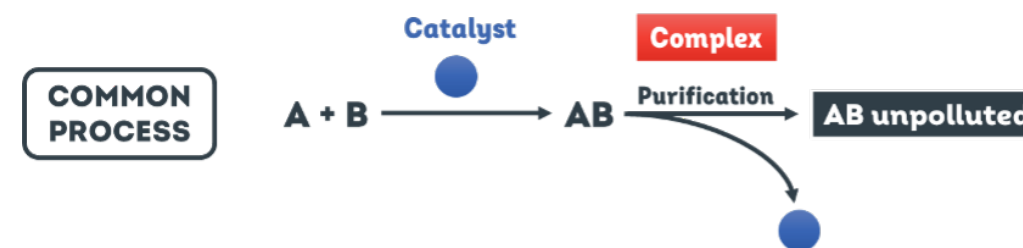


Figure 8 : Schéma du procédé catalytique habituel

Une nouvelle solution voit le jour : des nanocatalyseurs réutilisables. La technologie de base repose sur le couplage de nanoparticules magnétiques avec, à leur surface, des métaux catalytiques comme le palladium, le ruthénium ou bien encore le rhodium, le cuivre, le nickel, l'or, le platine ou le manganèse. Les métaux sont directement accrochés à la surface, en une seule étape de synthèse et sans ligands contrairement à l'état de l'art. Grâce à leur cœur magnétique, il est ainsi possible de récupérer ces nanocatalyseurs facilement par aimantation afin d'étendre leur durée de vie en les réutilisant jusqu'à 10 cycles dans un nouveau batch catalytique, comme illustré dans la Figure 7. Ainsi, en les récupérant et en les réutilisant, les industriels peuvent réduire leurs coûts de production et opter pour une chimie plus durable.

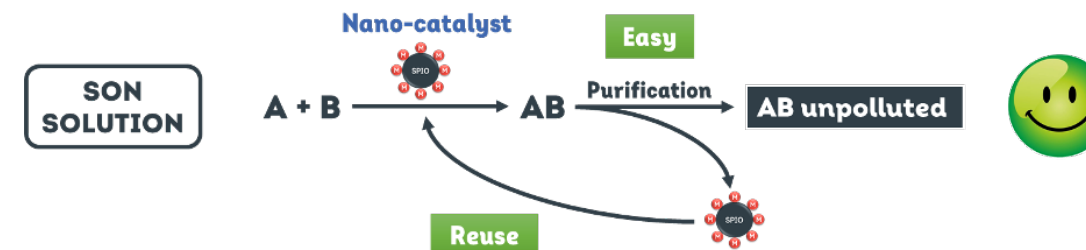


Figure 9 : Schéma d'un procédé catalytique optimisé avec l'utilisation de nanocatalyseurs magnétiques réutilisables.

De plus, ces nouveaux nanocatalyseurs offrent d'autres avantages tels que l'obtention de meilleures performances en catalyse grâce à leur petite taille qui leur confère une surface de contact réactionnelle très large.

En effet, une étude comparative des performances catalytiques entre les nanocatalyseurs de SON (ex : nanocatalyseur au Palladium) et les catalyseurs classiques ( ex : Palladium sur charbon) a été effectuée. Il a été démontré que pour une même réaction catalytique, dans des conditions similaires et avec les mêmes installations que les industriels, la quantité de métal critique utilisée (0,1% de palladium immobilisé sur les nanocatalyseurs vs. 10% de palladium dans le palladium sur charbon) ainsi que les coûts de productions (réduction de 90% des coûts) sont drastiquement réduits pour l'obtention d'un rendement plus élevé (98% avec les nanocatalyseurs vs. 70% avec le palladium sur charbon).

Cette innovation nanotechnologique permet ainsi de :

- Purifier facilement le milieu par aimantation en présence de dispositif magnétique ;
- Récupérer les nanoparticules facilement par aimantation (ou les isoler en fin de réaction dans la même cuve) ;
- Réutiliser dans un nouveau batch catalytique ;
- Réaliser une catalyse très performante avec une surface de contact réactionnelle très largement supérieure à la catalyse classique ;
- Réduire considérablement les coûts de production et d'opter pour une chimie moins polluante et donc plus durable.

Ainsi, les champs d'applications des nanocatalyseurs sont vastes. Ces derniers peuvent être utilisés pour différents types de catalyses (ex : Heck, Suzuki, Sonogashira, Ullmann), mais aussi pour la déshydrogénation de l' amino-borane afin de produire de l'hydrogène<sup>[7]</sup>.

### 3. Conclusion

Les nanoparticules superparamagnétiques sont porteuses d'innovation dans de nombreux secteurs. Dans le domaine médical, les nanoparticules magnétiques représentent un moyen simple et rapide pour isoler une population cellulaire. Elles permettent également, en étant fonctionnalisées par des agents chélatant, de dépolluer sélectivement les milieux. Enfin, elles constituent une solution innovante permettant d'augmenter les performances en catalyses, tout en évoluant vers une chimie plus verte et plus durable en permettant la réutilisation des métaux critiques.

#### Glossaire

##### SPIO (SuperParamagnétique Iron Oxide) :

nanoparticules d'oxyde de fer ayant des propriétés superparamagnétiques.

**Objet superparamagnétique :** objet qui présente des propriétés magnétiques lorsqu'il est placé dans un champ magnétique mais qui ne présente aucun magnétisme résiduel une fois retiré de ce champ.

**Cristallite :** une cristallite est une portion de matière qui possède la même structure qu'un monocrystal c'est-à-dire que sa structure n'est formée que pas une seule famille de plan atomiques.

#### Références

- [1] Myriam RICAUD; Olivier WITSCHGER (INRS). (2012). Les nanomatériaux : Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention (Edition INRS ED 6050). ISBN 978-2-7389-20210-2. 14110 Condé-sur-Noireau: Corlet.
- [2] Julien HACCOUN, Didier THERON, Aline TOURNIER. (2021). Les nanotechnologies : un nouveau paradigme, Les cahiers de l'ANR - n°5. Repéré à l'URL : <https://anr.fr/fileadmin/documents/2012/Cahier-ANR-5-nanotechnologies.pdf>
- [3] Myriam RICAUD, Cécile OILLUC-TISSIER, Pascale BARBILLON, Catherine BRUGNOT, Christine DOLLE, Laurent FINA, Philippe LEBON, Frédéric MAITRE, Jean-Michel ODOIT (2014). Aide au repérage des nanomatériaux en entreprise (Edition ED 6174). ISBN 978-2-7389-2132-1.
- [4] J. PARIS. (2015). Nanoparticules d'oxyde de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie cancéreuse. (Thèse de doctorat). Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne, DIJON.
- [5] C.J.EID (2010). Synthèse et caractérisation de nouvelles nanostructures à base d'oxyde et de carbure de Fe. (Thèse de doctorat en cotutelle). Université Claude Bernard, LYON. NNT : 2010LYO10172. Tel-00720870.
- [6] F. Ghiringhelli, E. Schmitt. Tri par billes magnétiques Technique et exemple du tri des lymphocytes T régulateurs CD25+ chez le rat. Annales de Biologie Clinique. 2004;62(1):73-78.
- [7] Poinot D., Bouzid M.; Burlot A.; Mboyi C. D.; Doulain P. E.; Paris J.; Heintz O.; Domenichini B.; Colliere V.; Kahn M. L.; and Hierso J.-C. High Recyclability Magnetic Iron Oxide-Supported Ruthenium Nanocatalyst for H2 Release from Ammonia-Borane Solvolysis. ChemNanoMat, 2022, 9 (8), pp.e202200285. (10.1002/cnma.202200285). (hal-03728542)

# Développement d'une nouvelle approche préventive pour réduire les infections microbiennes avec les nanoparticules d'oxydes métalliques.

Par Imroi EL-HABIB, Anne ROYNETTE, Christine MIELCAREK & Rabah AZOUANI - EBInnov Ecole de Biologie Industrielle  
Alex LEMARCHAND & Mamadou TRAORE - LSPM-CNRS Institut Galilée, Université Sorbonne Paris Nord

La prolifération de bactéries pathogènes multirésistantes est considérée comme un véritable défi de santé dans le monde entier<sup>(1)</sup>. Les maladies infectieuses associées aux biofilms représentent plus de 80% des infections microbiennes dans l'organisme, entraînant une augmentation de la morbidité des patients et la prise en charge hospitalière/ médicale<sup>(2,3)</sup>.

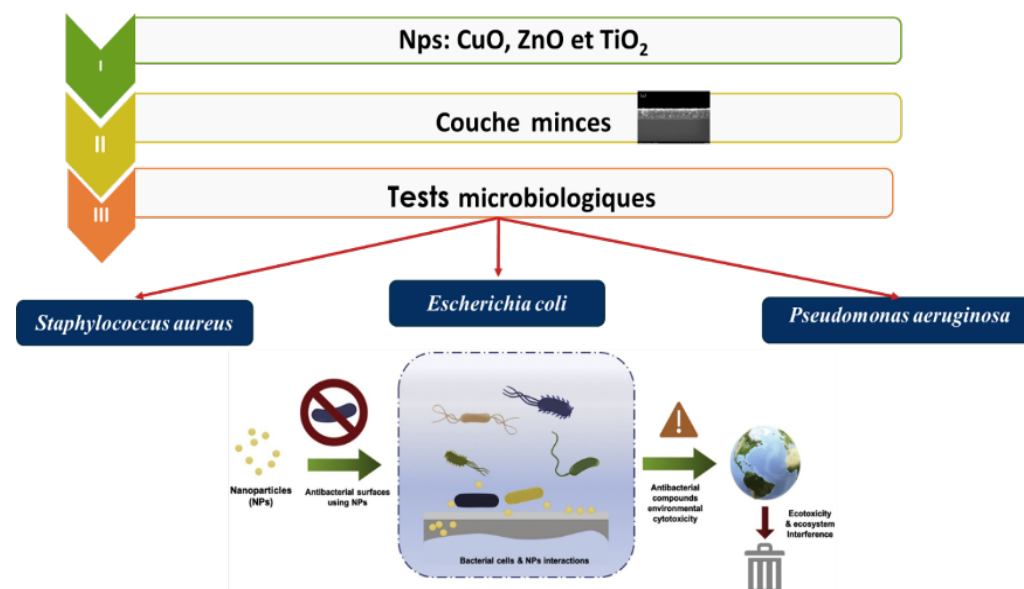


Figure 1. Démarche globale de développement de nanomatériaux biocides<sup>(4)</sup>

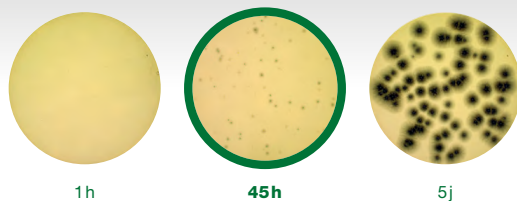
L'avancée dans le domaine des nanobiotechnologies, en particulier la capacité à préparer des nanomatériaux à base d'oxyde métalliques de taille et de forme spécifiques, sont susceptibles de conduire au développement de nouveaux agents antibactériens. Le projet EBiocide a germé de la volonté de développer des nanomatériaux avec des activités biocides pour des applications en couches minces, ce qui permettrait d'apporter une réponse aux problématiques d'infections nosocomiales et d'autres applications biomédicales et industrielles. Ces derniers étant considérés comme des agents prometteurs contre la diffusion des microorganismes résistants aux antibiotiques traditionnels en raison de leurs propriétés antimicrobiennes à large spectre. En effet, la disponibilité d'une large surface spécifique et leur taille confèrent à ces matériaux des mécanismes antimicrobiens unique comprenant principalement : la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) ; la libération d'ions métalliques et la destruction de la membrane cellulaire par contact direct<sup>(4)</sup>. Ces multiples mécanismes, d'origine physique et chimique, réduiraient donc l'apparition de résistance de la part des microorganismes.

Les travaux initiaux ont été portés sur la synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques (ZnO, CuO) sous forme de colloïdes et sous forme de couches minces afin d'évaluer leurs activités antibactériennes pour des applications industrielles. Nous avons effectué les tests de cytotoxicité des NPs sur des cellule fibroblastes dermiques, les premiers résultats ne montre pas d'effet toxique sur les cellules, d'autres tests sont en cours. Concernant la résistance mécanique, nous l'avons effectué sur des couches minces avec un traitement thermique à 500 °C, bonne résistance, mais cela doit être effectué dans les conditions réelles de formulation. La finalité est l'utilisation de ces nanomatériaux pour la décontamination de surfaces notamment dans le milieu hospitalier et autres applications



Digitalisez vos boîtes de Petri

Obtenez des résultats anticipés !



Suivi en temps réel des analyses et résultats anticipés dès 45 heures au lieu de 5 jours pour *Aspergillus brasiliensis* sur gélose Sabouraud



industrielles. La Figure 1 présente le schéma synoptique de l'approche globale adoptée pour le développement de ces nanomatériaux biocides.

### 1. Synthèse des nanoparticules et couches minces de CuO et ZnO

La méthode sol-gel a été utilisée pour la synthèse des NPs de CuO et de ZnO. Les solutions de CuO et de ZnO sont préparées à l'intérieur d'une boîte à gants à partir de l'acétate de zinc dihydraté et de l'acétate de cuivre monohydraté dissout dans un mélange d'isopropanol et de monoéthanolamine (MEA) utilisés comme solvant et stabilisateur respectivement (figure 2). Les couches minces ont été préparées par dip-coating sur des plaques de verre après une préparation de surface préalable avec de l'acide sulfurique. Les couches minces préparées ont été traitées thermiquement à 500°C pendant une heure.

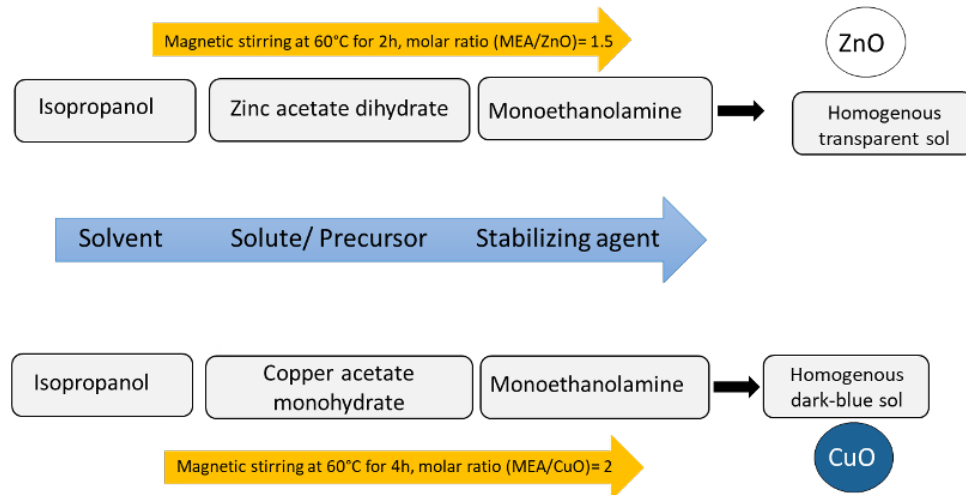


Figure 2 : synoptique de la préparation des nanoparticules de ZnO et CuO<sup>[5]</sup>

Nous avons obtenu des tailles moyennes de l'ordre de 3 nm pour les deux oxydes sous forme colloïdale. Pour ce qui est des couches minces, l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) met en évidence que les dépôts formés pour CuO et ZnO sont constitués de particules de diamètre proche de 30-40 nm, ces films sont homogènes, denses et formés de particules sphériques. Les résultats de ces caractérisations confirment la présence d'une couche mince d'oxyde de zinc et d'oxyde de cuivre, la figure 3 présente les couches minces obtenues.

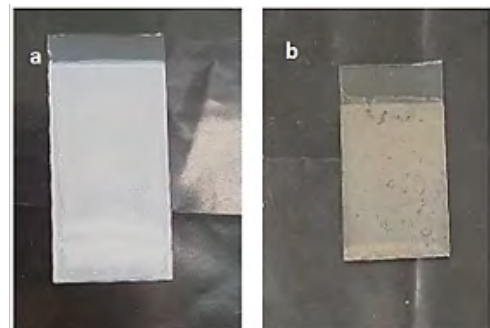


Figure 3 : Photos des couches minces obtenues selon la technique Dip-Coating a) ZnO et b) CuO<sup>[5]</sup>

### 2. Les tests d'activités antibactériennes des Nps en solution colloïdale et couche minces

Nous avons utilisé la méthode de disque de diffusion en premier lieu pour réaliser un screening de la sensibilité antibactérienne aux nanoparticules. Pour ces tests, nous utilisons les NPs en suspension, et donc sous une forme amorphe. Les disques de papier (6mm de diamètre) sont imbibés avec une solution colloïdale de NPs à différentes concentrations avec un volume de 20µL, ensuite déposés à la surface des boîtes de Pétri qui sont inoculées par différentes suspensions bactériennes à une concentration de 10<sup>7</sup> UFC/mL, puis incubées pendant 24h à 37°C pour garantir des conditions optimales de croissance des souches. La concentration minimale à laquelle les nanoparticules présentent des activités antimicrobiennes est appelée concentration d'inhibition minimale (CMI) et la zone autour du disque où aucune croissance bactérienne n'est observée et appelée la zone d'inhibition. Un disque imbibé uniquement de solvant sert quant à lui de témoin (Photo1). La sensibilité microbienne des nanoparticules d'oxydes métalliques varie selon les espèces microbiennes et les concentrations d'oxydes métalliques.



Photo1 : Méthode de diffusion sur disque avec le propan-2-ol à 99.5%

Les résultats obtenus sont représentés par la figure 4 :

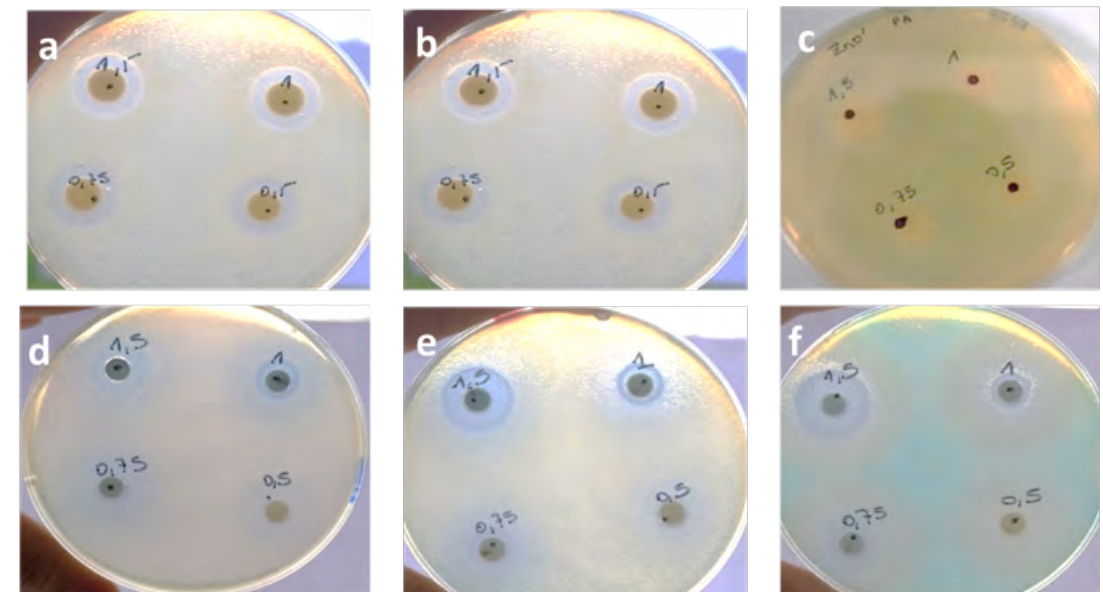


Figure 4 : Méthode de diffusion sur disque ZnO/E.coli (a), ZnO/S.aureus (b), ZnO/P.aeruginosa (c), CuO/E.coli (d), CuO/S.aureus (e) and CuO/P.aeruginosa (f). Les nombres indiquent la concentration en colloïds en mol/L<sup>[6]</sup>

Les résultats montrent que les sols de nanoparticules de CuO et de ZnO se comportent comme des agents antibactériens avec la présence de zones d'inhibition. Les nanoparticules de ZnO inhibent les bactéries uniquement à des concentrations suffisamment élevées, environ 0,5 M, tandis que le comportement antibactérien des nanoparticules de CuO commence à une concentration plus faible. Ces résultats ont été confirmés par la méthode d'ATPmétrie, des concentrations des sols de nanoparticules similaires à celles de la méthode de diffusion sur disque ont été utilisées. Les mesures ont été réalisées dans des plaques à 96 puits après avoir déposé dans chaque puits 50 µL de suspension bactérienne à 10<sup>9</sup> UFC/mL et 50 µL de solution de NPs. Les mesures instantanées d'ATP dans les solutions de NPs de ZnO et de CuO convergent vers zéro pour les trois souches bactériennes. Le témoin positif (suspensions bactériennes sans NPs) a été mesuré comme référence pour chaque souche. La figure 5 montre une valeur élevée d'ATP au contrôle positif avec toutes les souches en phase stationnaire.

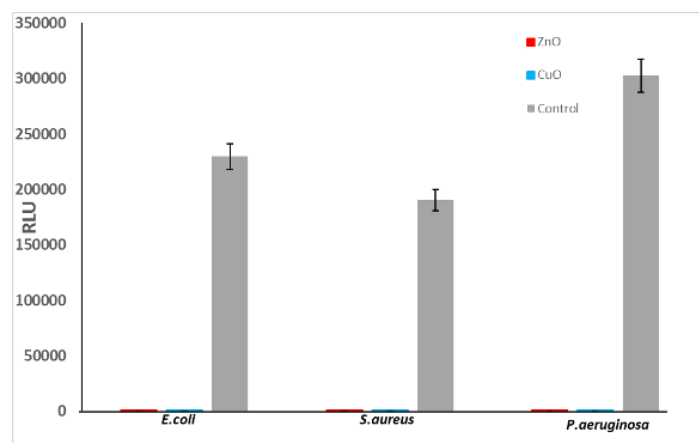


Figure 5 : Mesure d'ATP des suspensions bactériennes en contact avec les nanoparticules ZnO and CuO (1,5 mol/l)<sup>[6]</sup>

L'intensité RLU des témoins sans bactéries sont très élevées, et nous constatons un abattement important sur les histogrammes rouge et bleu dans la figure 5. En revanche une forte diminution du signal d'ATP a été observée avec tous les échantillons en contact avec des NPs de ZnO et de CuO, ce qui met en évidence leur effet antibactérien.

Pour les tests antibactériens sur les couches minces, nous avons développé une méthodologie permettant l'évaluation de l'activité antibactérienne sous forme de couches minces en nous inspirant de la norme européenne NF EN 14561 (2007-03)<sup>[7]</sup>, nous avons validé notre méthode avec les couche minces de ZnO, CuO et TiO<sub>2</sub> sur les souches bactériennes de référence utilisées dans ce travail<sup>[8]</sup> comme le montre la figure 6.

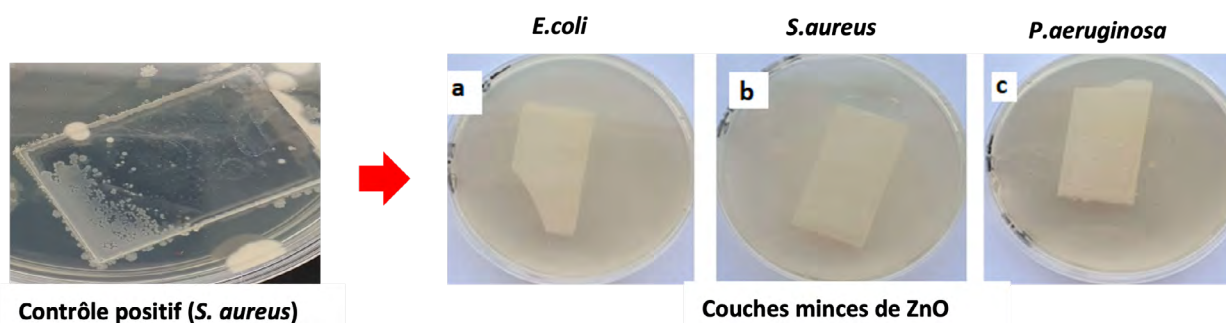


Figure 6 : test antibactérien sur couche mince de ZnO

Les résultats obtenus après incubation des lames sont présentés dans la figure 7 et montrent une diminution de la viabilité des souches étudiées quand elles sont en contact avec les NPs de ZnO et CuO. En effet, on observe aucune croissance bactérienne sur les gélases dans lesquelles les lames de couches minces de NPs ont été disposées. Les résultats montrent que les couches minces de nanoparticules présentent une forte activité antibactérienne. On note une suppression de 5 log de la population bactérienne déposée pour les 3 souches étudiées.

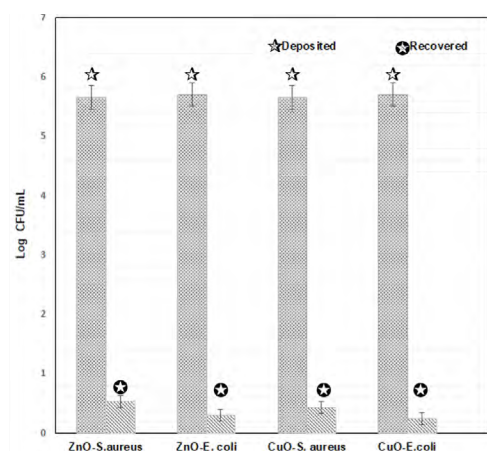


Figure 7 : Effet antibactérien de couches minces de CuO et ZnO en contact avec E. coli et S. aureus

### Conclusion

Les NPs de ZnO et CuO en solution présentent un effet antibactérien vis à vis des souches de bactéries à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les résultats des tests antibactériens sur les couches minces montrent une efficacité antibactérienne de l'ensemble des NPs sur les différentes souches étudiées avec une réduction de 5 log de la population bactérienne.

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la poursuite de ces travaux :

- Elargir ces tests vers les espèces fongiques et virus.
- Etudes de l'effet de la taille des nanoparticules sur l'activité antibactérienne
- Réaliser des formulations avec ces nanoparticules pour aboutir à des produits avec des propriétés antibactériennes (peintures, packaging...).
- Réaliser et optimiser les tests sur des prototypes sous forme de couches minces.
- Croiser ces résultats avec la thématique concernant les biopolymères dans le but de développer des biomatériaux antibactériens.

### Références

[1] Izunna S. Okeke, Kenneth K. Agwu, Augustine A. Ubachukwu, Fabian I. Ezema, Influence of transition metal doping on physicochemical and antibacterial properties of ZnONanoparticles: A review, Applied Surface Science Advances, Volume 8, 2022, 100227  
 [2] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, « Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases », Nature Reviews Microbiology, vol. 2, no. 2, pp. 95-108, 2004.  
 [3] P. Watnick and R. Kolter, « Biofilm, city of microbes », Journal of Bacteriology, vol. 182, no. 10, pp. 2675-2679, 2000.  
 [4] S. Kheiri, X. Liu, M. Thompson, Nanoparticles at biointerfaces: Antibacterial activity and nanotoxicology, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 184, 2019, 110550, ISSN 0927-7765.  
 [5] Rania Dadi. Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Matériaux. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2019  
 [6] R. Dadi, R. Azouani, M. Traore, C. Mielcarek, A. Kanaev. Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram-positive and gram-négative strains. Materials Science and Engineering: C, Volume 104, 2019, 109968, ISSN 0928-4931  
 [7] Norme NF 14651, Agence Française de Normalisation, Décembre 2007  
 [8] C. Mielcarek, R. Dadi, A. Roynette, A. Lemarchand, A. Kanaev, K. Senni, M. Traore, R. Azouani. Antibacterial Activity Evaluation of ZnO, CuO, and TiO2 Nanoparticles in Solution and Thin Films Bioluminescence, 2022, Volume 2525. ISBN : 978-1-0716-2472-2

### Glossaire

- |  |   |
|--|---|
| ATP : adénosine triphosphate             | NPs : nanoparticules                                |
| CMI : concentration minimale inhibitrice | RLU : unité de luminescence relative                |
| CuO : nanoparticules d'oxyde de cuivre   | TiO <sub>2</sub> : nanoparticules d'oxyde de titane |
| ERO : espèces réactives à l'oxygène      | UFC : unité formant colonie                         |
| MEA : monoethanolamine                   | ZnO : nanoparticules d'oxyde de zinc                |

TERANGA GROUPE

L'alliance des compétences au service de la qualité

Un holding indépendante TERANGA associe la synergie d'un groupe à la flexibilité d'entreprises à taille humaine. Grâce à leurs offres et expériences complémentaires, ACM Pharma, Cebiphar, UPS Consultants et ACD Swiss constituent un groupe leader dédié aux industries de santé et cosmétiques.



### Votre partenaire expert en développement pharmaceutique et contrôle qualité :

- Contrôle et expertise microbiologiques
- Tests biologiques et biologie moléculaire
- Développement analytique
- Études de stabilité
- Contrôle qualité physico-chimique
- Affaires technico-réglementaires
- Études vétérinaires
- Validation de nettoyage
- Validation qualification des ZAC
- Formation
- Audit et Conseil



NOTRE VISION

Être un partenaire fiable et disponible au delà d'une simple relation client-fournisseur.



NOS MISSIONS

Apporter des solutions techniques et réglementaires durant les différentes phases de développement et de contrôle de vos produits.



NOS VALEURS

Le sens du service, notre proactivité et l'épanouissement de nos équipes sont des éléments clés de la réussite de vos projets.





# Surveillance numérique de l'environnement : détecter les défaillances avant qu'elles ne se produisent.

Jacques PARLONGUE - MYCELLHUB

jacques.parlougue@mycellhub.com

Les avantages d'un processus de surveillance numérique au quotidien sont nombreux, mais comment un système digital fait-il face à un événement de contamination dans l'environnement ? C'est là que les avantages passent de l'efficacité opérationnelle à l'agilité opérationnelle.



Les directives relatives aux bonnes pratiques de fabrication (ou BPF) exigent qu'une zone de production de médicaments stériles fasse l'objet d'une surveillance environnementale. L'objectif de la surveillance environnementale est de s'assurer que la salle blanche répond à ses spécifications (selon la norme ISO 14644-1) et que le risque de contamination du produit final est minimal (surveillance de routine).

Certains endroits critiques de la salle blanche peuvent nécessiter une surveillance quotidienne de routine par une combinaison de tests de contrôle de l'environnement tels que l'échantillonnage actif de l'air, l'échantillonnage par exposition de boîtes de Petri, par utilisation de boîtes de contact, par écouvillonnage, etc.

Cela conduit à des plans d'échantillonnage complexes dans lesquels des dizaines d'échantillons quotidiens doivent être prélevés, analysés, rapportés, examinés et faire l'objet de tendances. Malheureusement, ce processus d'échantillonnage pour la surveillance de l'environnement est le plus souvent réalisé manuellement et géré sur papier, ce qui représente une lourde charge pour les opérateurs de salles blanches et est souvent une source de problèmes d'intégrité des données.

## 1. La numérisation, une évidence ?

En raison de sa nature hautement routinière et normalisée, l'échantillonnage de surveillance environnementale est un candidat de choix pour la numérisation.

Par exemple, dans le module de MyCellHub, un plan directeur d'échantillonnage numérique peut être généré à partir d'un plan de l'installation. Grâce à l'utilisation de tablettes, les opérateurs sont guidés

activement vers le bon emplacement d'échantillonnage et reçoivent des instructions de travail interactives adaptées à la classification de la zone où ils se trouvent et au type d'échantillonnage qu'ils doivent effectuer.

Au lieu d'écrire à la main le lieu d'échantillonnage sur le couvercle des boîtes d'échantillonnage, les opérateurs peuvent utiliser la caméra de la tablette pour relier le code-barres des boîtes de contrôle environnemental à l'action d'échantillonnage exacte. Une fois les résultats de l'échantillonnage connus, ils sont automatiquement vérifiés par rapport aux bonnes spécifications et un avertissement pour tout type d'écart par rapport à une référence spécifique peut être envoyé automatiquement à toutes les parties prenantes. Enfin, toutes ces données collectées sont automatiquement transformées en un rapport de tendances par pièce et par point d'échantillonnage, en un simple clic.

La numérisation des flux de travail de surveillance environnementale peut clairement apporter de la valeur.

La valeur de la numérisation des flux de travail BPF se situe généralement à trois niveaux :

### 1. Réduction des erreurs

Grâce à des instructions de travail interactives, les opérateurs sont avertis de manière proactive des points d'échantillonnage qui sont omis, des boîtes de contact qui pourraient être utilisées deux fois par accident, des boîtes de décontamination qui doivent être fermées à temps, ou de l'utilisation de boîtes dont la date de péremption est dépassée. Chaque erreur évitée est une victoire pour la sécurité du produit final et réduit considérablement la charge de travail liés aux potentiels impacts en aval, liés au traitement des actions correctives et préventives.

### 2. Rationalisation de la conformité

En travaillant numériquement, une piste d'audit intégrée générée par ordinateur permet de savoir de manière 100% irrévocable qui a fait quoi et quand. Les données étant accessibles à toutes les parties prenantes dès leur saisie dans le système, cela permet également aux services de contrôle et d'assurance qualité d'observer de près et de réagir rapidement.

### 3. Gains de temps

Si les gains de temps sont souvent secondaires à la sécurité des produits pour de nombreux processus de fabrication en salle blanche, dans le cas de la surveillance environnementale, ils vont de pair. La rapidité est essentielle, notamment pour la détection de contaminations viables dans les échantillons de surveillance environnementale. La charge biologique sous forme de bactéries ou de levures croît souvent de manière exponentielle à un certain endroit de l'échantillonnage. Avec ce type de dynamique de croissance, la détection d'une contamination juste un jour plus tôt peut faire une différence significative pour la sécurité du produit.

Il est donc important d'avoir accès aux données de surveillance environnementale (tendances) aussi près que possible du moment de l'échantillonnage. Lorsqu'on travaille sur papier, la collecte de toutes ces données à partir de tous les points d'échantillonnage de l'ensemble de l'installation et la saisie manuelle des résultats des échantillons dans une feuille de calcul pour établir les tendances (exigées par la réglementation) des données environnementales par pièce et par point d'échantillonnage est une tâche fastidieuse qui prend souvent des semaines.

Par conséquent, certaines installations de salles blanches ne regardent leurs données de tendances que tous les trimestres, alors qu'il est clair que des tendances plus fréquentes pourraient signaler les problèmes plus tôt. En outre, le fait de permettre à des opérateurs de salle blanche hautement qualifiés d'effectuer des tâches ennuyeuses et répétitives plus rapidement et sans effort libère directement du temps pour des tâches à plus forte valeur ajoutée, ce qui profite à la fois à l'opérateur et à l'employeur.

## 2. De l'efficacité opérationnelle à l'agilité opérationnelle

Si la numérisation des flux de surveillance de l'environnement est logique d'un point de vue opérationnel, le changement de paradigme dans la création de valeur intervient lorsque les silos de données sont supprimés et que celles provenant de différentes sources sont intégrées pour prendre des décisions mieux informées sur les opérations en salle blanche.

Prenons l'exemple d'un flacon qui tombe par accident pendant la production. Les opérateurs de fabrication signaleront l'événement dans le dossier de lot, les opérateurs chargés de la surveillance de l'environnement enregistreront une valeur hors norme dans les comptages de particules et l'équipe de nettoyage signalera qu'elle a dû effectuer une tâche de nettoyage supplémentaire.

Dans un système papier où ces trois documents ont chacun leur propre chaîne de contrôle, qui est examinée et approuvée à des moments différents, il peut en résulter trois rapports d'incident distincts qui génèrent chacun un travail en aval. Dans un système intégré horizontalement où les dossiers de lot électroniques, les rapports de surveillance environnementale numériques et les rapports de nettoyage numériques sont disponibles, ces trois éléments seraient marqués automatiquement, ce qui permettrait à un examinateur de voir beaucoup plus facilement qu'ils sont liés, ce qui réduirait considérablement le temps consacré à la paperasserie en aval.

Avec la bonne quantité de données contextualisées recueillies en travaillant numériquement, l'intégration peut être poussée encore plus loin. Par exemple, il n'est pas impensable qu'à l'aide d'un algorithme dédié, le logiciel décide automatiquement qu'une tâche de nettoyage supplémentaire doit être programmée après qu'un déversement a été signalé et qu'il rassemble la documentation requise concernant le déversement, l'excursion du nombre de particules qui en résulte et la tâche de nettoyage supplémentaire sans qu'il soit nécessaire de faire appel à un opérateur direct.

En combinant les données des dossiers de lots et les données de surveillance de l'environnement, les sources de contamination les plus probables (humaines ou techniques) peuvent être identifiées de manière algorithmique, et des mesures proactives peuvent être prises pour les prévenir.

Pour insister encore davantage sur la nécessité d'une évolution rapide des données de surveillance de l'environnement, ici encore, avec des données suffisantes sur les résultats de la surveillance de l'environnement des différents emplacements de la salle blanche, il n'est pas improbable que des algorithmes puissent prédire quelles zones sont à risque avant même que la contamination ne soit détectable par la surveillance de routine de l'environnement et que les problèmes puissent être évités en mettant à jour de manière proactive le programme de nettoyage de la Salle blanche ou la rotation des produits de nettoyage.

**C'est ce type de méthodologies basées sur les données qui permet à nos clients de débloquer l'agilité opérationnelle et de rationaliser les opérations classées BPF afin de réduire les coûts de fabrication sans faire de concessions sur la qualité des produits**

# Maximizing Sterility Assurance: Sterile Hold Time Testing for Sterilized Items Used in Parenteral Drug Manufacturing.

By Renee BUTHE - STERIS

Renee\_Buthe@steris.com

The sterile hold time depends on the sterilization wrapping system, operator performance and sterilization cycle performance. After sterilization occurs, parts and equipment are to be used within a timeframe that is tested and validated. This allowable hold time is established for each sterilized item and associated sterilization wrapping system and is generally confirmed by an aseptic process simulation (APS). Benchmarking was completed of manufacturers within the pharma and biopharma



industry to determine if common practices exist for establishing hold times for autoclaved items used within aseptic fill/finish manufacturing.

Established hold time is confirmed by using "expired" parts installed on the filling line or in aseptic filling operations as part of the routine APS. Using sterilized parts at the end of the hold time in the APS confirms the parts remain sterile through the expiry period. The hold time studies allow for sterile parts storage, thereby eliminating the need to sterilize materials the same day as the filling process.

For items required to be sterile, sterilization wrapping (bags and pouches) allows for steam penetration during autoclaving and maintains a microbial barrier post sterilization. The wrapping allows for parts and equipment to be moved throughout the facility and within the clean rooms without compromising the critical product contacting surfaces. Double wrapping or using a wrapping material that is compatible with manual application of surface disinfectants are both recommended methods of reducing risk during material transfer into higher classified spaces. For these reasons, defining the sterilization wrapping system (material of construction and closure method) is essential.

To test and confirm sterilization wrapping system performance, studies<sup>7</sup> have been conducted using various bags, pouches, and closure methods over a defined hold time of 30 days. Biological indicators were used to confirm sterilization at time zero and sterility testing was performed throughout the hold time duration.



## SOLUTIONS PERSONNALISÉES POUR ISOLATEURS & RABS

### GST® GLOVE & SLEEVE TESTER

#### Testez l'intégrité de vos gants et manchettes.

- Vérification de l'intégrité : adapté aux exigences spécifiques de détection
- Traçabilité des résultats : enregistrement des données de test et génération automatique de rapport en format électronique
- Simplicité de fonctionnement : interface intuitif avec deux écrans tactiles
- Ergonomie optimale

#### Spécifications

- Détection de trou : à partir de 100 µm
- Batterie : lithium-ion grande capacité > 50 tests
- Pression d'épreuve : de 1000 à 3000 Pa
- Configuration : rond ou ovoïde



#### JCE BIOTECHNOLOGY

ZA Bioparc - Rue Michel Renaud - 03270 Hauterive - France  
Tél. : 33 (0)4 70 59 51 40 - Fax : +33 (0)4 70 59 51 41  
contact@jcebiotechnology.com





## 1. Regulatory Requirements and Industry Guidance

Multiple regulatory (FDA, MHRA, HPRA, ANVISA, EMA) agencies discuss the need for hold time studies to be completed to support parenteral drug manufacturing. With regards to the packaging, this is defined in more detail in the newly released EudraLex: Volume 4, Annex 1 and addressed in other regulatory guidance documents. There are also industry guidelines that discuss using sterile held parts within the APS.

European Union EudraLex: Volume 4, Annex 11

8.46: “Where possible, materials, equipment and components should be sterilised by validated methods appropriate to the specific material. Suitable protection after sterilisation should be provided to prevent recontamination. If sterilised items are not used immediately after sterilisation, these should be stored using appropriately sealed packaging. A maximum hold time should also be established.”

8.48: Where materials, equipment, components, and ancillary items are sterilised in sealed packaging or containers, the packaging should be qualified for minimizing the risk of particulate, microbial, endotoxin/pyrogen or chemical contamination, and for compatibility with the selected sterilisation method. The packaging sealing process should be validated. The validation should consider the integrity of the sterile protective barrier system and the maximum hold time before sterilisation and maximum shelf life assigned to the sterilised items. The integrity of the sterile protective barrier system for each of the sterilised items should be checked prior to use.

With the increased level of detail provided in Annex 1, some expectations are much clearer, but there are some expectations where the execution methods are not explained. Annex 1 now specifically says that hold time studies are required, but how to perform this testing is not explained.

**USP 12112:** Equipment in direct contact with components, containers, closures, and sterile products

The procedures used for the cleaning and sterilization of direct contact surfaces, including dirty, clean, and sterile hold times, must be validated to ensure they do not adversely impact essential product quality attributes as well as to verify the effectiveness of the cleaning procedure and that no microbial recontamination/proliferation occurs during equipment storage.

Parenteral Drug Association (PDA) provides the following guidance to the industry in Technical Report #22, “Process Simulation for Aseptically Filled Products”<sup>5</sup>. In this section, the information is describing worst case examples for developing the APS.

3.2... Other examples of “worst-case” practices may include: Using room/equipment at the maximum time period after completion of sanitization/sterilization (clean hold time).

Regulatory and APS considerations are discussed in Pharmaceutical Engineering March/April 2022<sup>4</sup> when developing the simulation to meet all of the needs of the process. The list below contains examples of some of the worst-case challenges that are expected to be carried out within an APS. Page 51: APS Considerations- Worst Case Challenge:...

Hold Time

Equipment/room clean hold time

Equipment sterilization hold time

## 2. Operational Advantage

Hold time testing ensures package integrity to protect the sterile part or equipment. Packages can then be held in a cleanroom post sterilization and can be ready to use when needed without extra preparation time. The autoclave is in high demand in most facilities and the extra reprocessing time is costly and just in time availability may be limited. Confirming a hold time also allows for less reprocessing of autoclaved parts/equipment if not used within production on the same day as sterilization.

Decoupling the sterile hold time from the APS reduces the possible variables if a failure occurs. Because of the worst-case scenarios tested, removing any unnecessary variables allows for a more streamlined investigation and root cause determination.

## 3. Re-qualification

As mentioned previously, a sterile hold time would be confirmed during an APS. Use of expired material would be re-qualified during this testing. However, the APS purpose is not only to confirm a sterile hold time. Within an APS, there are multiple variables all being tested as the worst-case process. Because of the multiple variables, determining the root cause of a failure is difficult. Separating the sterile hold time studies and the APS reduces the variables during the simulation. If this decoupling does not occur, it would be difficult to pinpoint the sterile held parts as a root cause in the event of a failing simulation.

## 4. Designing Experiments

Sterility assurance is maximized by confirming hold times of parts or equipment used for aseptic manufacturing. Each end user is required to validate routine wrapping configurations using representative parts and equipment for a time range that fits the individual process. This wrapping should be easy to reproduce for employees to ensure consistency. The consistency of wrapping can help confirm the microbial barrier is intact after each sterilization cycle. The sterile hold time should be confirmed by the end-user and tested during an APS.

During a hold time study, there are multiple variables that are needed to be tested to create a comprehensive study. Some examples that were benchmarked from the biopharmaceutical industry are listed in table 1 below.

The movement of parts through the facility should be evaluated. Parts should be prepared and wrapped in such a way to facilitate material transfer. How the transfer process occurs post sterilization within a material handling airlock can have a major impact on the wrapping integrity which then can impact the microbial barrier of the wrapping. For example, surface sanitization of the wrapping or removal of an outer layer of wrapping should be tested and validated. The process of material transfer then allows for the sterile wrapped parts to be placed within the controlled cleanroom area. The final configuration of the wrapping after material transfer into a clean area is the wrapping that is tested for the sterile hold time.

....→

Table 1: Examples of variables in a sterile hold time test

Variable	Example
Duration	30 Days
Part	Stopper Bowl
Wrapping	Tyvek®/PET film pouch
Number of Wrapping Layers	2 Layers
Closure Method	Heat Seal
Testing Method of sample	Immersion
Sterilization Cycle	Hard goods
Bag/Pouch Size	Double wrapped in a pouch with a larger outer bag

Parts and equipment chosen during a study will determine the wrapping configurations to be tested. Wrapping material should be low particulate generating to limit the risk to the drug product. It also needs to be compatible with transfer methods into an aseptic area. Transfer is typically completed by application of disinfectants or alcohols onto the wrapped item prior to transfer from lesser classifications to the more critical areas. Once in the higher classifications, shedding the outer layer of wrapping material, if double wrapped, can be a faster and more streamlined material transfer method.

The wrapping of parts is decided based on the process and the aseptic presentation during use of the part, as the unwrapping of the part post sterilization is the highest risk for sterile surface contamination. Ease of unwrapping at the time of use minimizes the risk of contamination from operators and the environment. This is why the wrapping system needs to be configured for each specific process and part.

Closure methods are to be tested within a sterile hold study. Best practice closures avoid materials that could generate particles such as cellulose-based materials (“blue wrap”) and autoclave tape within the aseptic area. According to Annex 1, Section 8.48, “Where materials, equipment, components and ancillary items are sterilised in sealed packaging or containers, the packaging should be qualified for minimizing the risk of particulate, microbial, endotoxin/pyrogen or chemical contamination, and for compatibility with the selected sterilisation method...” The best practice closure methods allow for removal of parts from the packaging with limited contact from personnel or tools that could result in contamination and present risk to the final product.

Elasticized covers are used as initial barriers for product contact surfaces but are not considered a full microbial barrier. They allow for extra protection when installing parts and equipment that are product contacting to limit contamination by personnel handling during installation and line set up.

The time frame of the study is dependent on end-user processing restrictions and parts. For example, for complicated filling processes, 30-days hold time might be required for flexibility, while simpler processes might only need 7-days as the parts may be used quickly. Replications at the same time point are tested for repeatability. Multiple time points can be tested to increase confidence in longer sterile hold times.

## 5. Methodology

A study was conducted using parts, wrapping materials and closure methods shown in Table 2.

To start the study, representative parts were chosen based on frequently used items in pharmaceutical aseptic fill/finish processing. Worst-case items were also selected based on size. i.e., the largest, bulky objects and the small, sharp objects that prove difficult to wrap. The parts tested were a stopper bowl, stainless steel fittings, tubing, filling needles, forceps and glass beakers. These parts were wrapped in best practice wrapping<sup>8</sup> solutions listed above in table 2.

The closure methods, as shown in Table 2, were implemented based on the wrapping material used. All closures tested are the standard recommendations for each style of wrapping used. In addition to using representative parts, stainless steel and glass coupons were tested to minimize testing variability and ensure consistency. Using the coupons allowed for full immersion testing in a growth media.

A duration of 30-days was tested as a general duration for this evaluation, with sterility testing done at 10, 20, and 30 days. The timepoints of the study were in 10-day increments, allowing for more data to be collected for each wrapping configuration in the event of a failure at the longest time point of 30 days. The larger materials and representative parts were only tested at the 30-day mark with passing results.

During the testing period, one positive control for each time point tested was placed in the uncontrolled storage area with the wrapped and sterilized parts. Stainless steel coupons were wrapped in eight configurations (Table 2) with different closure methods and immersed in tryptic soy broth (TSB) for fourteen days to test sterility per USP 43 < 71><sup>6</sup>.

Table 3, below, lays out the number of samples tested at each time frame.

....→

Table 2: Parts, Wrapping and Closure methods used during study.

Types of Wrapping and Closure Methods Used						
Parts	Wrapping Material	Heat Seal	Self Seal	Gooseneck	Drawstring	Elasticized Cover
Stopper Bowl	All-Tyvek® Bag	N/A	N/A	X	N/A	X
Filling needle with Tubing (2)	All-Tyvek® Bag and Tyvek®/PET film pouch	N/A	X	N/A	X	N/A
Filling needle with Tubing (1)	Needle Bag with All-Tyvek® Bag	X	N/A	N/A	X	N/A
Glass Beaker	All-Tyvek® Bag	N/A	N/A	X	N/A	X
Stainless Steel Fitting	Tyvek®/PET film pouch	N/A	X	N/A	N/A	X
Forceps	Tyvek®/PET film pouch	N/A	X	N/A	N/A	N/A

Biological Indicators and Coupons						
1	Tyvek®/PET film pouch	N/A	X	N/A	N/A	N/A
2	Tyvek®/PET film pouch	X	N/A	N/A	N/A	N/A
3	Tyvek®/HDPE film pouch	X	N/A	N/A	N/A	N/A
4	All-Tyvek® Bag- Needle Bag	N/A	N/A	N/A	X	N/A
5	All-Tyvek® Bag	N/A	N/A	X	N/A	N/A
6	All-Tyvek® Bag- Rigid Tyvek®	X	N/A	N/A	N/A	N/A
7	All-Tyvek® Bag- Needle Bag and Tyvek®/PET film pouch	N/A	X	N/A	X	N/A
8	All-Tyvek® Bag	X	N/A	N/A	N/A	N/A

Table 3: Number of samples sterility tested at each timepoint.

Test Timeframe	Number of Samples	Types of Samples
Day 0	8	Biological Indicators
Day 10	9	Coupons (8), Positive Control (1)
Day 20	24	Coupons (23), Positive Control (1)
Day 30	31	Coupons (17), Positive Control (1), Representative Parts (13)

Table 4: Results from Sterile Hold Time testing

Results	
<b>BI</b>	8 tested in load, all negative for growth
<b>Day 10</b>	8 samples negative, 1 positive
<b>Day 20</b>	23 samples negative, 1 positive
<b>Day 30</b>	29 samples negative, 2 positive

## 6. Results

See Table 4 for results summary.

The results that were collected during this study showed data that was expected. The eight biological indicators were negative for growth, confirming that the sterilization cycle run on the parts was successful. The positive samples for each of the time points were the positive controls. The second positive sample at the day 30 time point was for a sample that was in a small, All-Tyvek bag without a positive closure, only a drawstring. This shows the importance of a positive closure to ensure the microbial barrier is intact. This data confirms a gooseneck closure (tortuous path) is required for a drawstring bag to maintain sterility of the contents.

## Conclusion

Completing a hold time study maximizes the sterility assurance of your parts and equipment as well as the finished drug product. It also helps to reduce the reprocessing of sterile parts and equipment. This testing allows end users to store sterilized parts and equipment within the clean area to limit the amount of sterilization required on the day of processing. Parts tested and wrapping configurations should mimic routine wrapping practices. Justification can be used to limit the number of parts that are required to be tested using a risk-based approach. The testing summarized here supports a 30-day sterile hold time using Tyvek® bags, pouches and covers and can be used to aid in the design of a study protocol by the end-user, as well as to provide confidence in the package integrity time frame.

Compliance with industry regulations is the responsibility of the end user / manufacturer, using their unique circumstances.

## Références

- [1] European Union Guidelines. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. 2022.
- [2] United States Pharmacopeia 41 Chapter <1211>, "Sterility Assurance." 2020.
- [3] US Food and Drug Administration. "Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing- Current Good Manufacturing Practice." September 2004
- [4] "Validation of Aseptic Processes- Using Media Fill" By Richard Chai and David J. W. Barber. Pharmaceutical Engineering March/April 2022.
- [5] PDA Technical Report #22. "Process Simulation for Aseptically Filled Products." Revised 2011.
- [6] United States Pharmacopeia Chapter <71>, "Sterility Testing." 2015.
- [7] Poster Presentation. "Maximizing Sterility Assurance- Sterile Hold Time Testing for Autoclaved Items within Parenteral Drug Manufacturing." PDA Microbiology Conference, October 10-11, 2022. Washington, DC. Renee Buthe.
- [8] Technical Tip #0002. "Recommended Methods for closure of sterilization wrapping systems." Revised 2018. STERIS reference 455-200-0002.



We're here for you.

Before supporting you with a unique portfolio of contamination control equipment, consumables and services, we ask about your objectives to help ensure **your success.**

Comprehensive offerings. Integrated support.

**STERIS**  
sterislifesciences.com



OUR TEST, YOUR CURE...



ENSURING  
A HEALTHY  
WORLD



ACC combines robust reagents, analysis and technical service expertise, to provide you with diverse solutions for endotoxin and glucan testing.



**Associates of Cape Cod Int'l, Inc.**

*Your Endotoxin & Glucan Experts*

[www.acciuk.co.uk](http://www.acciuk.co.uk) • (+44) 151.547.7444

Associates of Cape Cod, Inc. - a Seikagaku Group Company