

Pôle Pharmacopée, qualité pharmaceutique des
Médicaments chimiques, homéopathiques,
à base de plantes et préparations
Dossier suivi par :
Natacha CHARLIER-BRET / Tél. : 01 55 87 41 34
E-mail : natacha.charlier-bret@ansm.sante.fr
Agnès BERTOCCHI / Tél. : 01 55 87 42 25
E-mail : agnes.berlocchi@ansm.sante.fr
Numéro du document : 20211014_CR_CFP_BIO

Comité français de Pharmacopée « Produits biologiques et thérapies innovantes [CFP BIO] »

Séance du 14 Octobre 2021 de 9h30 à 18h20

Ordre du jour

Points prévus à l'ordre du jour	Pour info/avis
<p>9H15 – Ouverture de la session en visioconférence</p> <p>I – 9h30 Début de la séance :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Introduction - Tour de table 	
<p>II – Présentations :</p> <p>Agence nationale de sécurité du médicament :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Règlement intérieur du CFP et aspects déontologiques - Activités de la Pharmacopée : Présentation des groupes de la Pharmacopée Européennes rattachés au Comité Français de la Pharmacopée «Produits Biologiques et Thérapies Innovantes » [CFP BIO] 	
<p>III – Point sur les déclarations publiques d'intérêts</p>	
<p>IV – 11h00 Dossiers à examiner en séance :</p> <p>Vaccin diphtérique / audition Sanofi Pasteur : Sur demande de Sanofi Pasteur : proposition de demande de révision concernant le retrait du test d'irréversibilité de l'anatoxine diphtérique.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Introduction laboratoire de contrôle de l'ANSM (Lyon) - Audition Sanofi Pasteur - Audition GSK 	Pour Avis

Points prévus à l'ordre du jour	Pour info/avis
- Délibération membres CFP et ANSM	Pour Avis
<p>13h50 - Ouverture de la session en visioconférence</p> <p>V – 14h00 à 17h00 Dossiers à examiner en séance (suite) :</p> <p>Test de stérilité et méthodes alternatives en microbiologie : Sur demande de BioMérieux : proposition d'ajout au programme de travail des méthodes microbiennes rapides basées sur les technologies de détection de CO₂ ou basées sur la cytométrie en phase solide comme méthodes compendiales (méthode de référence) de test de stérilité dans la Pharmacopée Européenne.</p> <p>14h00 - Audition BioMérieux en présence des experts français du groupe 1 (Microbiologie) Ph Eur</p> <p>Dispositifs en lien : BACT/ ALERT3D dual T (CO₂) Scan RDI (cytométrie en phase solide)</p> <p>15h30 - Audition Becton Dickinson</p> <p>Dispositif en lien : BACTEC (CO₂)</p> <p>16h15 - Audition Charles River</p> <p>Dispositif en lien : CELSIS (ATP Bioluminescence)</p>	Pour Avis
<p>17h00 - Délibération membres CFP et ANSM</p> <p>17h45 - Fin de la réunion</p>	Pour Avis

Participants

Nom des participants		Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent		Absent /excusé
Membres			Matin	AP Midi	
COLIAT Pierre	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
COLIN Thierry	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CREOFF Estelle	Dénomination pour changement d'activité		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DAYAN-KENIGSBERG Jacqueline	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DECOUSSER Jean-Winoc	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DEVINE Eric	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DOUZIECH EYROLLES Laurence	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DUFOUR Nicolas	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DUVAL Raphael	Membre		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent		Absent /excusé
		matin	Ap midi	
Membres (suite)				
FAIVRE Lionel	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LORTEAU Céline	Membre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MONTRIBOT-ALBINO Anthia	Membre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
NIEL Philippe	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PERSON Jean-Marc	Membre Et Président du Gp 15V ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PIROT Fabrice	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RAGON Alain	Membre du CFP Chimie / Invité	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autres				
BONNEVAY Thierry	Expert gp1 Ph Eur Partie prenante Sanofi Pasteur	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LAPORTE Jérôme	Expert gp1 Ph Eur Partie prenante FAREVA Clermont Ferrand	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Auditionnés				
UHLRICH Sylvie	Partie prenante auditée Sanofi Pasteur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GENEST Béangère	Partie prenante auditée Becton Dickinson	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GADAL Philippe	Partie prenante auditée BioMérieux	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PARIS Arnaud	Partie prenante auditée BioMérieux	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PUIGMAL Yann	Partie prenante auditée Charles RIVER	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CHASEY Brice	Partie prenante auditée Charles RIVER	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PRONCE Thierry	Partie prenante auditée GSK	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ANSM				
BERTOCCHI Agnès	Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BOUSQUET Elodie	Evaluateur Qualité Pharmaceutique DMS Pôle 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CHARLIER-BRET Natacha	Evaluateur scientifique pharmacopée DMS Pôle2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CLOSSON- CARELLA Violaine	Référente TC TG DEI et Présidente gp CTP Ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DUFFOUR Marie Thérèse	Evaluateur DMS Pôle 1 et Présidente gp GTP Ph Eur	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
FOEILLET Estelle	Evaluateur DMS Pôle 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GARINOT Olivier	Evaluateur DEI CPSE et expert gp 6 PhEur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GARCIA Dominique	Evaluateur CTROL et expert gp 15 Ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
HOLZ Jérôme	Scientifique CTROL microbio	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MAITENAZ Solène	Evaluateur DEI Pôle1et expert gp CTP Ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MESLIER Yann	Scientifique CTROL microbio et expert gp1 Ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MORGAND Marion	CTROL Montp Chef de Pôle CBIOMI	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MORGEAUX Sylvie	Evaluateur CTROL Lyon vaccins	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
PANTERNE Béatrice	Inspecteur Bio DI	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
PASCO Muriel	Chef de pôle DMS Pôle 2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PLANA Michèle	Scientifique CTROL Microbio et expert gp BET MYC de la Ph Eur	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RIDOUX Valérie	Scientifique CTROL Montp et expert gp GTP Ph Eur	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
ROBIN Maeva	Evaluateur qualité pharmaceutique DMS Pôle 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SALOMON Valérie	Directrice DMS	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1. Introduction

- Point sur les DPI et les situations de conflits d'intérêts

- Aucun lien n'a été identifié pour les membres et les experts

- Engagement de confidentialité et droit de cession à la voix

Remerciements des membres pour avoir renvoyés les documents administratifs avant le CFP. Il est rappelé que la session est enregistrée.

- Tour de table

Après avoir souhaité la bienvenue aux participants, la directrice de la DMS (Direction des Métiers scientifiques) ouvre la séance.

Un tour de table des participants a été effectué.

12 membres sur 14 étaient présents (2 excusés). Il a été dénombré 22 à 28 participants selon les sujets et l'audition de 4 industriels (6 Participants).

Le quorum est donc bien atteint.

- Présentation de la DMS au sein de l'ANSM par la directrice de la DMS
- Présentation de la Pharmacopée et du rôle de l'Autorité Nationale de Pharmacopée par l'équipe Pharmacopée.

2. Dossiers thématiques

2.1. Audition Sanofi Pasteur : Vaccin diphtérique adsorbé (0443) – demande de révision

L'objectif : Portage ou non de la demande de révision à la Pharmacopée Européenne

Le sujet est résumé par la direction des contrôles puis une présentation de Sanofi Pasteur en français est présentée.

Historique :

La toxine diphtérique est une toxine de type A-B. Cette protéine d'une masse moléculaire de 62000 daltons est constituée de deux fragments A et B. Le fragment B permet son attachement à des récepteurs cellulaires et son internalisation. Le fragment A est responsable de l'action toxique, par une réaction enzymatique inhibant la synthèse protéique, entraînant ainsi la mort des cellules. La transformation en anatoxine par un traitement chimique est la base du vaccin diphtérique.

Depuis 2017, la réflexion a été portée par la Ph Eur sur les tests pouvant faire l'objet d'une diminution des tests sur animaux (3Rs). La démarche a alors été soit de les remplacer, soit de les supprimer s'ils n'étaient pas indispensables à la sécurité du produit. Les vaccins constitués d'anatoxines ont été étudiés et le **vaccin tétanique** a alors fait l'objet d'une suppression du test de toxicité spécifique et du test d'irréversibilité de l'anatoxine tétanique (toxine tétanique détoxifiée). Plusieurs tests étaient effectivement initialement réalisés : un test d'absence de toxine après les étapes de purification (= **Test de toxicité spécifique**) et un test prouvant la non réversion de l'anatoxine démontrant un procédé de fabrication stable. Ces 2 tests se faisaient sur cobaye. La recherche de toxine résiduelle au stade du produit fini a alors été considérée comme non nécessaire car d'autres tests étaient réalisés en amont de cette étape à des stades où le produit était plus concentré et il n'était pas utile de refaire ce test. Le test de recherche de réversion de l'anatoxine était réalisé après plusieurs semaines à 37°C. Des articles scientifiques ont mis en évidence que la toxine tétanique était thermolabile donc détruite à 37°C rendant ce test non pertinent.

Concernant le test de toxicité spécifique, le test a été supprimé de la monographie du vaccin diphtérique en juin 2021. « *L'exigence d'effectuer l'essai de toxicité spécifique sur le produit dans le cadre de la*

validation du procédé de production est jugée redondante car un essai des toxines résiduelles, plus sensible, est effectué en routine sur l'anatoxine purifiée en vrac. »

Il est proposé par Sanofi Pasteur de supprimer **le test d'irréversibilité de l'anatoxine diphtérique** après validation du procédé démontrant que la toxine diphtérique est détoxifiée de manière irréversible. Cette obligation de validation du procédé sera mentionnée clairement. Pour rappel la détoxification se fait par le formaldéhyde.

Le **test d'irréversibilité de la toxine** est un test qui se fait après 6 semaines d'incubation d'un échantillon dilué à + 37°C. Dans la monographie, il est combiné avec le **test d'absence de toxine** et les 2 tests sont donc faits en parallèle.

Les arguments avancés sont :

- Articles scientifiques dont le plus récent date de 2020 sur l'action du formaldéhyde : montre la création de multiples liaisons chimiques covalentes non réversibles et des greffages de glycine. Il y a une réticulation des sous unités A et B par des liaisons covalentes non réversibles. Le traitement au formaldéhyde convertit la toxine en anatoxine en modifiant de manière permanente le site catalytique et le site de liaison au récepteur. La détoxification est donc complète et stable.

► *Bernard Metz, Thomas Michiels, Joost Uittenbogaard, Maarten Danial, Wichard Tilstra, Hugo D. Meiring, Wim E. Hennink, Daan J.A. Crommelin, Gideon F.A. Kersten, Wim Jiskoot. Identification of Formaldehyde-Induced Modifications in Diphtheria Toxin. Journal of Pharmaceutical Sciences 109, 2020 (543-557)*

- Démonstration par des données d'absence d'irréversibilité sur des lots (47+49 lots) en France et au Canada pendant plus de 10 ans (voir présentation PowerPoint)

- Harmonisation du profil de contrôle de l'anatoxine diphtérique avec celui des autres anatoxines chimiquement détoxifiées (tétanos, coqueluche) afin de faciliter l'acceptation au niveau international de la suppression de ce test pour les autres anatoxines, notamment tétanique.

L'objectif est donc ici une mise en cohérence de l'ensemble des profils de contrôle, intéressant quand plusieurs valences sont dans un seul vaccin.

- Ce test est effectué après incubation 6 semaines à 37°C. Il utilise des cellules véro. Il se fait en parallèle du **test d'absence de toxine** qui pourra alors être effectué directement sans attendre 6 semaines de conservation préalable à + 5°C. Des données additionnelles de Sanofi datant de 1998 - 2003 (lorsque les tests se pratiquaient encore sur animaux) concernant le test d'absence de toxine alors effectué sur des échantillons non dilués conservés au plus 9 jours à +5°C n'a montré aucun cas de toxines résiduelles (sur plus de 98 tests). De même sur le site canadien entre 2010 et 2018.

Au final, en termes de rationalisation des tests, il n'y aurait plus qu'un échantillon utilisé directement.

- Le vaccin tétanique adsorbé [01/2021 (0452)] mentionne dans sa partie « Production/Dispositions générales » « Le procédé de détoxification est validé pour établir sa capacité à produire de façon reproductible /une anatoxine dotée de propriétés immunogènes et durablement détoxifiée »

- Le vaccin coquelucheux (adsorbé, multicomposé, acellulaire) [01/2020(1356)] mentionne « Le procédé de détoxification de la toxine coquelucheuse est validé pour établir sa capacité à produire de façon reproductible des antigènes dotés de propriétés immunogènes et durablement détoxifiés »

Proposition

Rajouter dans « Production /Anatoxine Purifiée », une information claire sur la validation du procédé de détoxification : « Le procédé de détoxification est validé pour établir sa capacité à produire de façon reproductible une anatoxine dotée de propriétés immunogènes et détoxifiée de manière irréversible » en lieu et place de « La toxine purifiée est détoxifiée par le formaldéhyde selon une méthode qui évite de détruire l'activité immunogène de l'anatoxine et la réversibilité de la toxine »

(La phrase diffère légèrement de celle proposée dans la présentation de Sanofi page 7)

Le Comité français de pharmacopée/ questionnement des membres :

- La structure chimique de la toxine diphtérique est-elle très différente des toxines tétanique et pertussique qui pourrait laisser supposer un comportement différent de la toxine au traitement par le formaldéhyde ?

Ce sont des protéines avec leurs structures propres mais l'action du formaldéhyde sur ces protéines montre une action chimique de même ordre donc laisse supposer une inactivation de même ordre. L'article de Metz paru dans *journal of pharmaceutical sciences* en 2020 apporte les détails sur la modification de la toxine diphtérique après action du formaldéhyde

- Articles fournis par un membre du CFP :

- ▶ *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 24, 183-187, 1971 *Reversion of toxicity of diphtheria toxoid, Akama & al*
- ▶ *Journal of biological standardization* (1988) 16, 99-108 *Acellular pertussis vaccines: evaluation of reversion in a nude mouse model* M. J. Quentin-Millet & al*
- ▶ *Dev Biol Stand* 1977; 34:149-53. *Irreversibility of toxoids. An improved method of testing, D Stainer & al*

Le premier article mentionne la réversion de toxine mais c'est un article ancien et il y a eu depuis 50 ans d'expérience.

Il n'existe pas beaucoup d'articles sur ce sujet.

- Le vaccin est très ancien. Le test d'irréversibilité a-t-il mis en évidence des réversions d'anatoxine en toxine ?

En 1948, un groupe pharmaceutique japonais a commercialisé une anatoxine diphtérique qui, a entraîné la mort de nombreux enfants au cours de la vaccination antidiphtérique (*Kurokawa & Murata 1961*).» La cause de ce drame a été en fait attribué non pas à une réversion mais à un procédé non maîtrisé avec de la toxine résiduelle libre. C'est donc le procédé de détoxification qui a été incriminé. Depuis 1948, aucun cas similaire n'a été décrit.

C'est toutefois à la suite de ce drame que les industries pharmaceutiques ont mis en place des contrôles destinés à écarter tout risque de réversion vers l'état toxique.

- La toxine tétanique est thermolabile à 37°C? Est-ce le cas de la toxine diphtérique ?

Ce n'est pas le cas mais il faut noter que le vaccin est conservé à 5°C et que la recherche à 37 °C a été mise en œuvre pour accélérer le processus (et certes a été un mauvais choix pour la toxine tétanique). Mais quelque part si on envisage une possibilité de réversion quelle qu'elle soit, il faut aussi envisager que celle-ci puisse se faire après une longue période de stockage à + 5°C. La maîtrise totale de la détoxification est donc le point critique et si il y a eu validation du procédé qui conduit à un processus maîtrisé et irréversible, c'est là l'important.

Le laboratoire GSK soutient la proposition des laboratoires Sanofi Pasteur et n'a mis en évidence aucun cas de réversion

Conclusion

La demande de révision sera transmise à la Pharmacopée Européenne. Il est à préciser que le groupe 15 / Vaccins pour usage humain est déjà au courant du sujet et souhaitait qu'une demande de révision leur soit transmis.

Les échanges et interrogations des experts scientifiques du CFP BIO seront également transmis afin que la prise de décision définitive de la révision soit prise de manière concertée avec les différents experts des différents pays constituant le groupe 15 de la Pharmacopée Européenne. L'article récent paru dans le «*Journal of pharmaceutical sciences*» de 2020 apporte beaucoup d'informations sur l'action du formaldéhyde sur la toxine diphtérique et insiste sur l'importance de la validation du procédé de détoxification qui, clairement mentionné dans la partie production de la monographie, peut être une solution.

2.2. Audition BioMérieux : Test de Stérilité et Méthodes alternatives en microbiologie

Sur demande de BioMérieux : proposition d'ajout au programme de travail des méthodes microbiennes rapides basées sur les technologies de détection de CO₂ ou basées sur la cytométrie en phase solide comme méthodes compendiales de test de stérilité dans la Pharmacopée Européenne.

BioMérieux a fait parvenir à l'ANSM une demande de révision / addition au programme de travail de la Ph Eur en Mai 2021. Cette demande vise à faciliter l'utilisation de méthodes alternatives en microbiologie pour la réalisation de test de stérilité permettant la libération des résultats plus rapidement que s'il était pratiqué le test de stérilité conformément au chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne (Ph Eur)

Il s'agit donc de faire reconnaître certaines méthodes de microbiologie rapide comme « compendiales » dans la Ph Eur et d'ouvrir ces applications sur tous les types de matrice.

Deux propositions sont émises par BioMérieux :

- 1 - Soit la création d'un nouveau chapitre complet sur toutes les technologies de test de stérilité rapide aujourd'hui validées par de nombreux utilisateurs.
- 2 - Soit la création d'un chapitre spécifique dédié à chaque technologie rapide.

Le chapitre de référence à la Ph Eur est le chapitre 2.6.1.

Son principe, pour rappel est le suivant : Filtration sur membrane ou inoculation directe du milieu de culture avec le produit à examiner.

Un échantillon est inoculé dans deux milieux liquides différents, le milieu Trypticase Soja (TSB) et le milieu Thioglycolate (FTM) puis incubés pendant **14 jours** à deux températures différentes (20-25°C et 30-35°C).

Si aucune turbidité n'apparaît ou aucun autre signe macroscopique de prolifération microbienne, le test est conforme aux exigences et indique qu'aucune contamination n'est présente.

Ce chapitre est dit « harmonisé » (chapitre 5.8 de la Ph Eur) c'est-à-dire repris dans la pharmacopée américaine (USP) et japonaise.

Pour les produits cellulaires, le chapitre de référence est le chapitre 2.6.27 qui lui s'appuie déjà sur des techniques de détection de production de CO₂ parce que plus rapides et plus sensibles.

Il n'est pas « harmonisé ». Pour rappel, ce chapitre est dédié aux produits cellulaires mais une diversification de son utilisation pourrait être étudiée suite à l'objectif de la demande de BioMérieux.

Des méthodes alternatives utilisables pour un test de stérilité rapide sont déjà disponibles ou en cours de développement. Ces nouvelles techniques sont basées sur différents principes tels que la cytométrie en phase solide (mesure directe), et les méthodes basées sur la croissance comme la détection du CO₂ produit par les micro-organismes en croissance ainsi que l'ATPmétrie. D'autres méthodes comme par exemple la réaction en chaîne par polymérase (PCR, analyse des composants cellulaires) sont moins connues dans cette utilisation mais étudiées.

- Les techniques basées sur la détection du CO₂ produit par les microorganismes en croissance mesurent une augmentation du CO₂ qui entraîne une diminution de pH, et provoque un changement de coloration d'un indicateur en complément de la turbidimétrie du milieu.
- Dans le cas de la cytométrie en phase solide, un échantillon est filtré directement à travers une membrane ad hoc, puis marqué afin de produire une fluorescence.
- L'ATPmétrie (bioluminescence) est basée sur la libération d'ATP par des micro-organismes viables.

Limite de la mise en application de ces méthodes : Avant qu'une méthode de test de stérilité alternative puisse être mise en œuvre en tant que test de routine, une validation complète de la méthode doit être effectuée par rapport à la méthode de référence (2.6.1). Ceci est un travail considérable nécessitant des ressources humaines et financières et un temps important qui limitent, in fine, leur utilisation par des laboratoires plus modestes, des Start up et aussi les Pharmacies à usage intérieur (Pharmacies hospitalières). L'utilisation de ce type de technologies pour les produits à demi

vie courte ou devant être administrés rapidement aux patients est une aide inestimable au bénéfice du patient qu'il faut réévaluer.

Pour résumer : Les Méthodes rapides de Test de stérilité (« Tests de stérilité rapide ») sont utilisables par l'industrie pharmaceutique.

Il existe en effet à la Ph Eur le **chapitre 5.1.6 « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique »** et aussi une Brochure « Exemples de protocoles de validation de méthodes microbiologiques alternatives selon le chapitre 5.1.6 » mais elles sont considérées comme **alternatives** et nécessitent donc une validation complète de la méthode pour chaque produit et pour chaque site pharmaceutique. La validation complète d'un test de stérilité rapide doit démontrer son équivalence par rapport à la méthode de référence (Ph Eur 2.6.1 Stérilité)

Le statut « compendial / Méthode de référence » des méthodes rapides ou à minima de certaines d'entre elles ayant fait leurs preuves diminuerait les efforts de validation qui seraient portés uniquement sur l'applicabilité de la méthode avec le produit seulement. L'applicabilité permet de vérifier qu'il n'y a pas d'interférence ou d'incompatibilité avec le produit en cours. Ainsi, il en résulterait une méthode plus simple, moins coûteuse et in fine, d'une utilisation plus importante par l'industrie pharmaceutique, laboratoires autres et pharmacies hospitalières.

L'Autorité Nationale de Pharmacopée a décidé d'auditionner le laboratoire BioMérieux dans le cadre du Comité Français de Pharmacopée des produits biologiques et thérapies innovantes comprenant de nombreux experts compétents en microbiologie.

Les technologies mises en avant et commercialisées par BioMérieux sont :

- Les technologies de détection du CO₂ : Bact/Alert Dual T
- Les technologies de cytométrie en phase solide : Scan RDI

Dans le but d'élargir le débat et d'informer d'autres fabricants de cette démarche, d'autres auditions ont été programmées, malheureusement limitées dans le temps imparti d'une demi-journée.

Ont été auditionnés en séance :

- **Becton Dickinson** qui commercialise un automate basé sur la détection de CO₂ : BACTEC 9000
- **Charles River** qui commercialise une technologie d'ATPmétrie : CELSIS.

D'autres laboratoires développant des méthodes alternatives en France ont été également contactés avant la réunion, notamment :

- la société **RedBerry** qui développe un cytomètre en phase solide : Red One.
- la société **GLB control** qui a développé une technique d'ATP métrie pour le contrôle microbio logique de l'eau essentiellement.

D'autres fabricants étrangers sont mentionnés dans la saisine de BioMérieux : Un système américain **Thermo Fisher Scientific** : le Versatrek / Signal et un système néerlandais **Innosieve Diagnostics** : le MuScan

Article en rapport: Sartorius « *Evaluation of rapid sterility test methods for radiopharmaceuticals* » Kim Van Boxtel and Arjan Langen (GE Healthcare).

Audition de BioMérieux :

La « saisine » (document argumenté de 21 pages pdf) a été transmise au préalable à tous les Membres et autres participants du CFP Bio accompagné de :

- un dossier de 65 publications sur le Bact Alert et de 61 publications sur le scan RDI
- deux présentations sur les principes des techniques utilisées

Une présentation d'une heure sur les 2 systèmes commercialisés par BioMérieux et sur les motifs et arguments de cette demande pour la Ph Eur a été faite.

La saisine de BioMérieux mentionne l'existence de dispositifs concurrents et précise l'absence de monopole technologique. Il existe donc désormais des dispositifs concurrents pour beaucoup de ces méthodes alternatives. Ceci est important à cette étape de la procédure, car que ce soit au niveau de la Ph Eur ou au niveau de l'USP, une avancée technologique émanant d'une seule et même source (situation de monopole) ne permettrait pas la demande d'addition au programme de travail de cette dernière.

Pour illustrer par un exemple récent, cela a été le cas pour l'adoption du chapitre « **2.6.32** Essai des endotoxines bactériennes par la méthode du facteur C recombinant » qui vient maintenant compléter la méthode « compendiale » initiale du chapitre **2.6.14** Essai des endotoxines bactériennes.

Ce ne sont pas des méthodologies sous brevet et l'offre sera sans aucun doute amenée à se diversifier dans les années à venir.

Dispositif Bact Alert et plus précisément le Bact Alert 3D Dual T :

Pour information, le **Bact Alert** a été mis sur le marché en 1991 (à l'époque par Organon Technika). Il s'agit donc d'un dispositif ayant des années d'expérience d'utilisation (comme ci-après l'automate Bactec de Becton Dickinson).

Il s'agit d'un dispositif basé sur la culture et détection de la production de CO₂ par les bactéries, levures, moisissures. Deux températures (Dual T) le caractérisent 32,5°C et 22,5°C, ce qui, pour le contrôle pharmaceutique est intéressant compte tenu de germes de l'environnement ou de germes difficilement cultivables à températures plus élevées. Les milieux de culture proposés sont nombreux et certains ont été développés pour l'application en industrie pharmaceutique, un peu différente des applications en clinique. Ils sont adaptés pour les bactéries aérobies et anaérobies et peuvent aussi contenir des billes polymériques neutralisantes, ce qui est intéressant en cas de présence d'antibiotiques ou de conservateurs anti microbiens.

Le mode opératoire consiste en l'injection directe de l'échantillon (1 à 10 ml) dans 2 flacons de culture aérobie et anaérobie, la mise en incubation dans l'équipement aux 2 températures et la détection est ensuite automatique par l'appareil et vérifiable par l'utilisateur (indicateur en fond de flacon qui passe au jaune et trouble dans la solution). Le signal repose sur différents paramètres : accélération, pente et seuil. La lecture est réalisée toutes les 10 minutes.

95% des souches sont détectées en 5 jours et on attend jusqu'à 7 jours.

Dispositif Scan RDI :

Le **SCAN RDI** est un cytomètre en phase solide.

Son mode opératoire passe par une filtration sur une membrane particulière qui permet de retenir les micro-organismes (jusqu'à 1 litre, pores de la membrane à 0,32 µm), marquage des microorganismes viables dans l'échantillon filtré, balayage de la membrane par un laser qui va illuminer le marqueur fluorescent (di acétate de carboxyfluoresceine) puis détection par l'automate des cellules fluorescentes. L'activité estérase nécessite l'intégrité de la membrane, donc des micro-organismes viables, le marqueur pénètre dans la cellule. La mesure des endotoxines est donc indispensable par ailleurs.

Le bruit de fond est limité par un contre colorant et des « événements » sont comptés. Un microscope particulier, motorisé permet ensuite, selon les cas, à l'opérateur de vérifier chacun des événements. Il peut avoir une idée du contaminant (ex levure, aspergillus, bactéries (bacille, cocci). C'est une méthode très sensible.

Cette technique, contrairement à d'autres fabricants, ne passe pas par une étape de croissance, un marquage direct des cellules est réalisé. Elle s'adresse à des échantillons filtrables et un résultat peut être donné en 4 heures. En cas de résultats positifs, il est possible de déposer la membrane sur une boîte de pétri ou de la plonger dans un milieu liquide par la suite. En dehors du test de stérilité, il peut servir au contrôle de l'eau dans les lignes de fabrication.

BioMérieux nous informe qu'aux Etats Unis 75 % des pharmacies produisant des médicaments « compounding pharmacies » sont équipées de SCAN RDI ou de Bact/Alert. La FDA utilise ces méthodes pour ses contrôles, notamment suite à un accident en 2012 sur des préparations non stériles. Des laboratoires libèrent des lots avec ce type de démarche, pour accélérer les libérations dans des contextes de ruptures de stock. Le laboratoire BioMérieux dispose d'un service de faisabilité qui aide les industriels pour la mise en œuvre.

Audition de Becton Dickinson :

Une présentation du **BD Bactec™** nous a été faite mais pour une utilisation initiale en Diagnostic In Vitro (marquage CE) c'est à dire l'application pour les hémocultures en clinique humaine ainsi que pour le contrôle des concentrés plaquettaires.

Comme le Bact Alert, il s'agit d'un dispositif basé sur la production de CO₂, automatisé, de 40, 200 ou 400 places. La détection finale est basée sur une mesure de la fluorescence émise par un colorant dans le capteur des flacons de milieux de culture.

Les milieux proposés sont nombreux selon que la recherche concerne les bactéries aérobies, anaérobies, mycobactéries, levures et champignons avec et sans résines. Des milieux conçus pour des échantillons de faible volume sont également proposés et aussi un milieu spécifique pour les échantillons plaquettaires.

Cette présentation intéressante n'était pas dans le champ d'application demandé mais les principes de base sont informatifs quelle que soit l'application.

Toutefois, l'ANSM a précisé qu'en France, en thérapie cellulaire, les contrôles étaient assez souvent réalisés par les laboratoires de bactériologie hospitaliers qui sont nombreux à être équipés de l'automate Bactec. Des publications existent sur l'évaluation du Bactec dans ce domaine.

Le système Bactec est annoncé comme ayant plus de 50 ans d'expérience avec la gamme d'instruments BD Bactec™ et plus de 30 ans avec les résines pour des usages en biologie médicale (Dispositif Médical de Diagnostic in vitro marqué CE).

Malgré une absence de positionnement pour une utilisation en industrie pharmaceutique, Becton Dickinson a accueilli positivement la démarche faite par BioMérieux.

Audition de Charles River

Une présentation du **CELSIS AMPIScreen** a été l'objet principal de l'audition. Il s'agit d'un dispositif utilisant le principe de l'ATPmétrie.

Tous les organismes vivants produisent de l'ATP (bactéries, levures, champignons).

Les dispositifs commercialisés par Charles River (Luminomètre) :

- Celsis advance II : 120 tests par heure
- Celsis Accel : 30 tests par heure

Après un départ de procédure identique à celle du chapitre 2.6.1 c'est-à-dire filtration et inoculation dans des milieux de culture (les milieux de culture utilisables sont laissés au choix de l'utilisateur et compatibles avec les milieux préconisés dans le 2.6.1) puis après incubation 6 jours pour le test de stérilité, la phase de détection est réalisée.

Le dispositif comporte un module de détection (luminomètre) qui rend un résultat de type « présence /absence » avec une expression des résultats en RLU (Relative Lights Units).

L'ATP en présence de luciférine et d'oxygène sous l'action d'une enzyme : luciférase et de Mg²⁺ est dégradée en AMP avec production de lumière.

Les résultats de stérilité sont rendus en 6 Jours (versus 14 jours) et concernant le « Bioburden » en 24 48 heures (versus 5 -7 jours)

Pour l'étape finale 50 µl de milieu après incubation est chargé dans le module terminal et les résultats sont obtenus en 1 heure.

Des exemples de validation avec des *inoculum* de 0,1 CFU, 1 CFU, 10 CFU nous ont été présentés et seront éventuellement transmis pour information à la Ph Eur.

L'utilisation de ce dispositif pour le contrôle des produits cellulaires, des lignées cellulaires utilisées en bioproduction, des thérapies géniques a également été présenté comme compatible grâce à un dispositif complémentaire : **Celsis Adapt™** qui permet de concentrer les échantillons et éliminer les composants cellulaires qui pourraient interférer avec le fond et le signal de détection de l'ATP-bioluminescence.

Ce dispositif est déjà utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

Echanges et Avis des membres du CFP Bio et conclusion

Les échanges ont eu lieu après les 3 auditions, chaque audition étant individuelle.

Pour rappel 12 membres constituant le CFP Bio (sur 14) étaient présents et les 3 experts représentant la France à la Ph Eur dans le **groupe 1/ Microbiologie** également. Deux de ces experts sont issus de laboratoires de contrôle microbiologique de 2 firmes différentes et ont été autorisés par les 3 industriels auditionnés à être présents lors des auditions. Le dernier expert est un scientifique des laboratoires de contrôle de l'ANSM. Des évaluateurs en qualité pharmaceutique et un inspecteur de l'ANSM étaient également présents.

Les échanges ont été très riches et le bien-fondé de la demande de BioMérieux n'a pas été remis en question. La mise à l'état de l'art des contrôles microbiologiques est un sujet d'actualité et le bénéfice de certaines méthodes pour obtenir des résultats plus rapides pour les patients est également un point à souligner.

Concernant l'ATPmétrie dans les tests de stérilité, il a été précisé que Merck Millipore avait lancé sa technologie « rapid milliflex » en 2006 et qu'en 2009 un industriel pharmaceutique a validé et publié cette validation pour des antibiotiques injectables. Il y a donc là aussi plus de 10 années de recul. Cette technique apparaît d'ailleurs dans la brochure liée au 5.1.6. La validation permettait un rendu de résultats en 5J au lieu de 14J.

Il a été souligné le fait qu'il est dommage que les industriels pharmaceutiques publient peu car cela faciliterait la démarche proposée.

Une information intéressante concerne le témoignage sur de telles mises en place de méthodes alternatives. En pratique une validation totale peut prendre 1 à 2 années alors qu'une validation de l'applicabilité sur son produit ne prendra que quelques mois. Les validations primaires (dont Limite de détection, Robustesse, Spécificité..) refaites des multiples fois par de multiples utilisateurs sur les mêmes appareils prennent du temps, du personnel dédié et sont donc très coûteuses avec en parallèle la nécessité de comparer à la méthode de référence alors que certaines techniques ont démontré qu'elles étaient même supérieures. Pour déterminer la limite de détection, le travail est considérable si on considère par exemple 20 souches différentes à différentes dilutions et dupliquées plusieurs fois (environ 1000 tests).

Rendre certaines techniques alternatives rapides « compendiales » permettrait des validations plus restreintes et uniquement avec sa propre matrice (son produit). L'utilisation de ces techniques serait sans aucun doute renforcée car plus simples à mettre en œuvre une fois l'appareil installé et qualifié sans avoir un temps de validation démesuré.

Des témoignages ont été apportés sur les 3 méthodes initialement sélectionnées (production de CO₂, cytométrie en phase solide et l'ATPmétrie), notamment pour la thérapie cellulaire à l'hôpital.

L'utilisation de l'ATPmétrie a été également mentionnée d'un grand intérêt dans un autre domaine géré par la Ph Eur : dialyse et contrôle de l'eau.

La démarche de portage à la Pharmacopée Européenne a été validée par les membres du CFP BIO et les intervenants externes et internes présents.

A propos des 2 propositions de départ :

- 1 - Soit la création d'un nouveau chapitre complet sur toutes les technologies de test de stérilité rapide aujourd'hui validées par de nombreux utilisateurs.
- 2 - Soit la création d'un chapitre spécifique dédié à chaque technologie rapide

Les experts du CFP BIO ont porté leurs choix sur la création de chapitres spécifiques dédiés à chaque technologie. En termes de faisabilité, cela leur semblait plus adéquat et il est vrai que l'expérience d'écriture du chapitre 5.1.6 a été relatée comme ayant été complexe et longue.

Il a été évoqué que le développement de nouvelles méthodes alternatives pourrait freiner la publication d'un chapitre multi techniques dans le cas où un fabricant arriverait avec sa nouvelle technique et demanderait son intégration dans le chapitre. Ainsi des chapitres individuels seraient plus simples à gérer, chacun à leur rythme.

Il a été proposé également de réviser le chapitre **5.1.9 Indications sur l'application de l'essai de stérilité** qui pourrait prendre exemple sur le chapitre **5.1.10 Recommandations pour la réalisation de**

l'essai des endotoxines bactériennes. Ce dernier a été révisé parallèlement à l'arrivée du chapitre 2.6.32. Pour rappel, ci-dessous un extrait des modifications du chapitre 5.1.10 apportées récemment :

13. REMPLACEMENT D'UNE METHODE PRESCRITE DANS UNEMONOGRAPHIE

13-1. REMPLACEMENT PAR UNE AUTRE METHODE DÉCRITE DANS LA PH. EUR.

Le remplacement d'une méthode prescrite dans une monographie par une autre méthode décrite dans la Ph. Eur. est à considérer comme un cas de recours à une méthode alternative pouvant se substituer à un essai de pharmacopée sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales.

L'analyste doit démontrer que l'essai peut être réalisé de façon satisfaisante sur la substance ou le produit considérés.

La méthode alternative ne nécessite donc pas une revalidation portant sur la méthode en soi, mais est à valider au regard de son utilisation pour une substance ou un produit spécifique, dans un environnement analytique spécifique, et de son équivalence à la méthode prescrite.

13-2. REMPLACEMENT PAR UNE METHODE NON DÉCRITE DANS LA PH. EUR.

Le remplacement d'une méthode prescrite dans une monographie par une méthode non décrite dans la Ph. Eur. est à considérer comme un cas de recours à une méthode alternative pouvant se substituer à un essai de pharmacopée sous les conditions décrites dans les Prescriptions générales.

Le chapitre 5.1.9 en liaison avec le chapitre 5.1.6 pourrait donner des explications plus concises et compréhensibles aux utilisateurs. Pour rappel, le chapitre 5.1.6 n'est pas dédié uniquement au test de stérilité, il est beaucoup plus général (numérations, mycoplasme), alors que le 5.1.9 est dédié.

Des chapitres individuels (ex 2.6.x, 2.6.y...), au final auraient une légitimité comparable au 2.6.32 pour les endotoxines. Il n'y aurait plus nécessité d'une revalidation totale mais uniquement une validation avec sa matrice. Si comme pour le 2.6.32, sa référence dans les monographies individuelles n'était pas précisée (là où le 2.6.1 est noté), cela impliquerait de fait une comparaison au 2.6.1 mais pour la partie de validation avec sa matrice. Ce serait donc déjà une grande avancée et permettrait une facilitation de l'utilisation de ces techniques par tous.

Compte tenu des nombreuses publications, d'information par BioMérieux et Charles River et des participants au CFP Bio, de la mise au courant de l'ANP française de dossiers d'AMM qui ont mis en œuvre ces technologies alternatives pour le test de stérilité, il apparait que la demande de BioMérieux est recevable et d'actualité. **La demande de révision sera donc portée à la Commission Européenne de Pharmacopée par la France.**

----- FIN de réunion CFP Bio : 18h20 -----

Annexe: Rappel des textes de la Ph Eur relatifs au domaine de la Microbiologie :

- 2.6.1 Stérilité *
- 2.6.27 Contrôle microbiologique des produits cellulaires
- 5.1.6 Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique
+
Brochure Exemples de protocoles de validation de méthodes microbiologiques alternatives selon le chapitre 5.1.6
- 5.1.1 Méthodes de préparation des produits stériles
- 5.1.2 Indicateurs biologiques et préparations microbiennes apparentées utilisés pour la fabrication de produits stériles
- 5.1.9 Indications sur l'application de l'essai de stérilité
- 2.6.7 Mycoplasmes
- 2.6.12 Contrôle microbiologique des produits non stériles: Essai de dénombrement microbien*
- 2.6.13 Contrôle microbiologique des produits non stériles: Recherche des microorganismes spécifiés*
- 2.6.39 Contrôle microbiologique des tissus (en cours COM Ph Eur Nov 2021)
- 5.1.4 Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques et des substances pour usage pharmaceutique non stériles *
-
- 2.6.14 Essai des endotoxines bactériennes *
- 2.6.30 Essai d'activation des monocytes
- 2.6.32 Essai des endotoxines bactériennes par la méthode du facteur C recombinant
- 2.6.8 Pyrogènes (suppression attendue janvier 2026) **5.1.13 Pyrogenicité (travail en cours)**
- 5.1.10 Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes
-
- 3053 Produits biothérapeutiques vivants pour usage humain
- 2.6.36 Contrôle microbiologique des produits biothérapeutiques vivants : Essai de dénombrement des contaminants microbiens
- 2.6.38 Contrôle microbiologique des produits biothérapeutiques vivants : Recherche des microorganismes spécifiés
-
- 2.6.31 Contrôle microbiologique des médicaments à base de plantes pour usage oral
- 5.1.8 Qualité microbiologique des médicaments à base de plantes pour usage oral
-
- 5.1.3 Efficacité de la conservation antimicrobienne
- 5.31 Substances actives et médicaments pour usage humain ou vétérinaire utilisés en phagothérapie (travail en cours)
- 5.8 Harmonisation des pharmacopées ***

Pour information : autres textes à l'USP et autres guides utilisés par l'industrie pharmaceutique [non exhaustif]

- USP <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods
- USP <71> Sterility Tests* = EP 2.6.1
- USP <61> Microbial Examination of Non sterile Products: Microbial Enumeration* = EP 2.6.12
- USP <62> Microbial Examination of Non sterile Products: Tests for Specified Microorganisms* = EP 2.6.13
- USP <60> Microbial Examination of Non sterile Products: Tests for *Burkholderia cepacia* complex
- USP <63> Mycoplasma tests
- USP <1071> Rapid microbial tests for release of sterile short-life products: a risk-based approach
- USP <1113> Microbial Characterization, identification and strain Typing
- USP <64> Probiotic tests
- USP <51> Antimicrobial effectiveness Testing
- USP <55> Biological indicators – Resistance Performance Tests
- USP <1085> Guideline on Endotoxins test
- USP <85> Bacterial Endotoxins Test* = EP 2.6.14



USP <151> Pyrogen Test

Autre guide :

Guidance PDA TR33 Évaluation, validation et mise en œuvre de méthodes microbiologiques alternatives et rapides