



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre: _____

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

—

**VALIDATION DE PROCÉDÉS DE FABRICATION ASEPTIQUE :
APPLICATION À LA TECHNOLOGIE BLOW-FILL-SEAL**

Présenté par Thomas EGLY

Soutenu le 13 juin 2024 devant le jury constitué de

Professeur Thierry Vandamme, Président

Professeur Thierry Vandamme, Directeur de thèse

Mme Sandrine Kolb, Mme Laura Nicou, M. Guillaume Conzatti, Autres membres du jury

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg



Doyen	Esther KELLENBERGER
Directeurs adjoints	Julien GODET Béatrice HEURTAULT Emilie SICK
Directeur adjoint étudiant	Léo FERRERA-MOURIAUX
Responsable administrative	Rachael MOUEZY

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT**Professeurs -**

Phillippe BOUCHER	Physiologie
Nathalie BOULANGER	Parasitologie
Lise BUREL	Chimie thérapeutique
Pascal DIDIER	Biophotonique
Said ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie GEOFFROY	Microbiologie
Phillippe GEORGEL	Bactériologie, Virologie
Béatrice HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric MARCHON	Chimie analytique
Rachael MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Francis MEIGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves MELV	Physique et Biophysique
Jean-Yves PARST	Droit Economie pharm.
Françoise PONS	Toxicologie
Valérie SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence TOTI	Pharmacologie
Thierry VANDAMME	Biogalénique
Catherine VONTRON	Pharmacognosie
Pascal WEHRLÉ	Pharmacie galénique

Professeurs praticiens hospitaliers

Julien GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc LESSINGER	Biochimie
Bruno MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline SOULAS-SPRAUEL	Immunologie
Geneviève UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

Enseignants contractuels

Alexandra CHAMBERT	Pharmacie d'officine
Matthieu FOHRES	Pharmacie d'officine
Phillippe GALAIS	Droit et économie pharm.
Phillippe NANDE	Ingénierie pharmaceutique

Maîtres de Conférences -

Nicolas ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha BATOOL	Biochimie
Martine BERGAENTZLÉ	Chimie analytique
Elsa BOMBARDA	Biophysique
Aurélien BOURDERIOUX	Pharmacochimie
Emmanuel BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne CASSET	Toxicologie
Thierry CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela CHIFER	Pharmacie biogalénique
Guillaume CONZATTI	Pharmacie galénique
Marceña DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge DUMONT	Biologie cellulaire
Grégoire HAAN-ARCHIPOFF	Plantes médicinales
Célien JACQUEMARD	Chémoinformatique
Julie KARPENAD	Pharmacochimie
Nathalie NIEDERHÖFFER	Pharmacologie
Sergio ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie PEBROTEY	Parasitologie
Romain PERTSCH	Chimie en flux
Frédéric POZYBILLA	Biostatistiques
Patrice RASSAM	Microbiologie
Eléonore REAL	Biochimie
Andreas REISCH	Biophysique
Ludvine RIFFAULT-VALOIS	Analyse du médicament
Carole RONZANI	Toxicologie
Emilie SICK	Pharmacologie
Yaouba SOUMBOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria SPANEDDA	Chimie thérapeutique
Jérôme TEBRAND	Physiopathologie
Nassera TOUNSI	Chimie physique
Aurélien URBAIN	Pharmacognosie
Bruno VAN OVERLOOP	Physiologie
Maria ZENIDU	Chimio génomique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie BRUNET	Parasitologie
Nelly ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique
Vincent GIES	Immunologie

Assistants hospitaliers universitaires

Abdelmalek BENDJAMA	Production de médicaments anticancéreux
Maxime PETIT	Pharmacotechnie
Damien REITA	Biochimie



SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.



REMERCIEMENTS

A Monsieur Thierry VANDAMME,

De me faire l'honneur de la présidence du jury de thèse. Merci d'avoir accepté la direction de cette thèse, de m'avoir corrigé et conseillé dans la rédaction de ce travail.

A Sandrine,

Merci beaucoup d'avoir accepté ce rôle de jury. Je te serai toujours reconnaissant d'avoir parié sur un novice pour intégrer ton équipe. Encore merci pour ta confiance.

A Laura,

Merci pour ton temps et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A Monsieur Guillaume CONZATTI,

Pour avoir accepté de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

A mes parents et à mon frère,

Merci pour votre soutien tout au long de mes études et jusqu'à ce jour. Cette réussite je vous la dois en grande partie.

A mes collègues,

Pour votre soutien lors de la rédaction de ma thèse et de l'élaboration de ma soutenance. Un remerciement tout particulier à Stéphanie pour m'avoir orienté sur le choix du sujet.

Table des matières

I.	Introduction	1
II.	Concepts généraux	2
1.	La fabrication de médicaments stériles	2
a.	Contexte réglementaire	2
b.	La méthode AMDEC	4
c.	Les procédés de stérilisation	6
d.	Procédé aseptique vs stérilisation terminale	8
2.	La technologie Blow-Fill-Seal (BFS)	9
a.	Principe de fonctionnement	9
a.	Fonctionnement d'une machine alternative	11
b.	Fonctionnement d'une machine rotative	13
3.	La validation des procédés de fabrication	14
a.	Conception et développement du procédé	15
b.	Qualification du procédé	16
c.	Vérification continue du procédé	17
d.	Cas particulier de la validation de procédés de fabrication aseptique	17
III.	Prérequis à la validation des procédés de fabrication aseptique	19
1.	Validation de la filtration stérilisante	19
2.	Validation des procédés de stérilisation à la vapeur	21
3.	Validation du processus d'extrusion	22
4.	Qualification environnementale des locaux	23
5.	Qualification du personnel	25
6.	Surveillance environnementale	28
a.	Surveillance environnementale d'une machine alternative	29
b.	Surveillance environnementale d'une machine rotative	31

7.	Test d'intégrité des récipients	32
a.	Détection par variation de pression ou du vide	33
b.	Test d'immersion (challenge bactérien)	33
IV.	Mise en œuvre de la validation de procédé de fabrication aseptique.....	35
1.	Documentation de validation	35
a.	Plan de validation	35
b.	Cahier des Charges Utilisateurs.....	35
c.	Description du procédé	36
d.	Analyse de risques des procédés aseptiques	37
e.	Protocole de validation	39
2.	Déroulé d'une simulation de procédé aseptique	41
a.	Le milieu de culture	41
b.	Vitesse et volume de remplissage.....	41
c.	Durée et taille de lot.....	42
d.	Opérations simulées lors des APS	43
e.	Incubation des doses	46
f.	Lecture des unités incubées	47
g.	Réconciliation	48
3.	Résultats	48
V.	Conclusion	51

Glossaire et liste des abréviations

AEM : Agence Européenne des Médicaments

AQC : Attribut Qualité Critique

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité

APS : Aseptic Process Simulation (Simulation de procédé aseptique)

BFS : Blow-Fill-Seal (Soufflage Remplissage Scellage)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BTS : Bouillon Trypcase Soja

CCS : Contamination Control Strategy

CTA : Centrale de Traitement d'Air

HEPA : High Efficiency Particulate Air

ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

NAS : Niveau d'Assurance de Stérilité

NEP : Nettoyage En Place

PV : Plan de Validation

PEBD : Polyéthylène Basse Densité

PEHD : Polyéthylène Haute Densité

PPC : Paramètre de Procédé Critique

PUPSIT : Pre-Use Post Sterilization Integrity Testing (test d'intégrité post-stérilisation et avant utilisation)

SEP : Stérilisation En Place

SQP : Système Qualité Pharmaceutique

UFC : Unité Formant Colonie

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu d'un processus de gestion des risques de qualité selon l'ICH Q9	4
Figure 2 : Arbre décisionnel pour le choix de la méthode de stérilisation d'un produit aqueux	8
Figure 3 : Fonctionnement d'une machine alternative.....	12
Figure 4 : Fonctionnement d'une machine rotative	13
Figure 5 : Niveaux de contrôle environnemental possibles pour une machine alternative.....	29
Figure 6 : Schéma d'une douche d'air stérile (machine alternative)	30
Figure 7 : Exemple de gabarit pour le contrôle du volume.....	42
Figure 8 : Exemple de collecteur de condensats	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple de matrice de décision.....	5
Tableau 2 : Concentration totale maximale de particules autorisée pour la classification	24
Tableau 3 : Niveau maximal de contamination microbienne autorisé pendant la qualification	25
Tableau 4 : Habillage requis selon le type de classe.....	26
Tableau 5 : Méthodes de tests d'intégrité des récipients	32
Tableau 6 : Interprétation des résultats	49

I. Introduction

La maîtrise de la contamination microbienne et particulaire est un enjeu majeur dans la fabrication de médicaments stériles. L'industrie pharmaceutique met en œuvre de nombreux moyens dans le but de limiter le risque de contamination afin d'assurer la sécurité d'utilisation du médicament et de répondre aux multiples exigences réglementaires.

Le Blow-Fill-Seal (BFS), ou Soufflage-Remplissage-Scellage en français, est une technologie de remplissage et de conditionnement aseptique qui est généralement utilisée pour des produits pharmaceutiques liquides ou semi-liquides stériles, avec des volumes de remplissage allant de 0,1mL jusqu'à 10L.

Le BFS est défini dans l'Annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) comme étant une technologie dans laquelle des récipients sont façonnés à partir de granulés thermoplastiques, remplis avec du produit, puis scellés, en une chaîne continue et automatisée d'opérations [1].

Une large gamme de produits peut être fabriquée à l'aide d'un procédé BFS comme par exemple des solutions injectables, des gouttes ophtalmiques, des solutions pour perfusion, des solutions pour dialyse, des solutions pour inhalation, des solutions buvables.

L'utilisation de cette technologie permet de limiter au maximum la présence humaine lors des opérations de production car le procédé de remplissage et de conditionnement aseptique est réalisé dans un espace clos et stérile à l'intérieur d'une seule et même machine, et sans nécessité d'intervention humaine pour la réalisation du procédé.

Les entreprises pharmaceutiques qui fabriquent des produits stériles au moyen de procédés aseptiques doivent démontrer la maîtrise de leurs procédés de fabrication et de leur environnement de production par le biais de simulation de procédé aseptique, ou Aseptic Process Simulation (APS) [2].

Cette thèse a pour objectif de proposer une stratégie globale de validation de procédés de fabrication aseptique appliquée à un procédé BFS, en tenant compte des exigences réglementaires et en particulier celles de l'Annexe 1 des BPF.

II. Concepts généraux

1. La fabrication de médicaments stériles

a. Contexte réglementaire

La fabrication des médicaments stériles impose des exigences particulières dans le but de réduire au maximum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. Ces exigences sont dictées par les différentes réglementations internationales :

- les Good Manufacturing Practices européennes (EU GMP) et ses annexes ;
- les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) : les BPF sont la traduction française des GMP européennes ;
- les current Good Manufacturing Practices (cGMP) américaines avec les 21 CFR part 211 ;
- les différentes Pharmacopées internationales (européenne, américaine, japonaise, ...).

L'Annexe 1 des EU GMP (ou Ligne Directrice 1 des BPF) fixe les règles spécifiques à la fabrication de médicaments stériles. La version originale a été partiellement révisée à plusieurs reprises en 1996, 2003 et 2007. Depuis lors, les technologies ont considérablement évolué et les GMP ont connu des changements importants suite à l'adoption des lignes directrices ICH Q9 et Q10 [3].

L'Annexe 1 des GMP a donc fait l'objet d'une révision complète dans le but de :

- faciliter la mise en œuvre des concepts de l'ICH Q9 et Q10 ;
- prendre en compte les nouvelles technologies qui n'étaient pas couvertes précédemment ;
- corriger les inexactitudes historiques ;
- clarifier les domaines qui ont été mis en évidence comme étant ambigus en raison de l'ancienneté du document initial.

La révision de l'Annexe 1 a été publiée le 25 août 2022, avec une mise en application officielle un an plus tard, soit le 25 août 2023. L'Annexe 1, qui était jusqu'alors constituée de 127 paragraphes répartis sur 22 parties, se décompose désormais en 11 chapitres. Les principes généraux de chaque chapitre sont décrits en *annexe 1* de cette thèse d'exercice.

D'une manière générale, les modifications apportées à l'Annexe 1 ont pour objectif de réduire les risques de contamination par la mise en place d'une stratégie de contrôle de la contamination (CCS) et d'un Système de Qualité Pharmaceutique (SQP) basé sur la gestion des risques qualité, en utilisant notamment les outils innovants tels que décrits dans les lignes directrices ICH Q9 et Q10 [1].

La fabrication de médicaments stériles utilisant la technologie BFS doit répondre à la fois aux exigences générales concernant la fabrication de médicaments stériles (locaux, personnel, utilités ...) et aux exigences spécifiques concernant l'utilisation de cette technologie (Annexe 1 Chapitre 8 « Production et technologies spécifiques »).

La ligne directrice ICH Q10 décrit un modèle de Système de Qualité Pharmaceutique basé sur une approche scientifique et sur la gestion des risques qualité tout au long du cycle de vie d'un produit, de son développement jusqu'à l'arrêt de sa commercialisation [4].

Les trois principaux objectifs de l'ICH Q10 sont :

- de délivrer un produit conforme à ses attributs qualité et répondant aux attentes du patient, des professionnels de la santé, des autorités et des clients internes ou externes.
- d'établir et de maintenir un état de contrôle par la mise en œuvre de systèmes efficaces de surveillance et de contrôle de la qualité des produits et des performances des processus.
- de faciliter l'amélioration continue de la performance des processus et de la qualité des produits.

La ligne directrice ICH Q9 fournit des principes et des exemples d'outils pour la gestion des risques de qualité [5]. Les deux principes fondamentaux de cette ligne directrice sont les suivants :

- l'évaluation du risque qualité doit être basée sur les connaissances scientifiques et dans un objectif de protection du patient ;
- le niveau d'efforts, d'actions et de documentation à mettre en œuvre doit être approprié par rapport au niveau du risque.

Le processus de gestion des risques de qualité se décompose en 3 étapes principales (Figure 1) :

- l'appréciation du risque repose sur l'identification des dangers existants, l'analyse de ces dangers et l'évaluation des risques associés à une exposition à ces dangers.
- la maîtrise du risque consiste à réduire le risque à un niveau acceptable ou à l'éliminer complètement. Les efforts mis en place visant à réduire ou éliminer le risque doivent être proportionnels au niveau de risque.
- la revue du risque permet de maintenir sous contrôle le risque par la revue des événements passés (revues périodiques, audits, enquêtes à la suite d'incidents, ...). Cette étape doit permettre de mettre en évidence d'éventuels dérives tout au long du cycle de vie du produit. La fréquence des revues se doit d'être cohérente avec le niveau du risque.

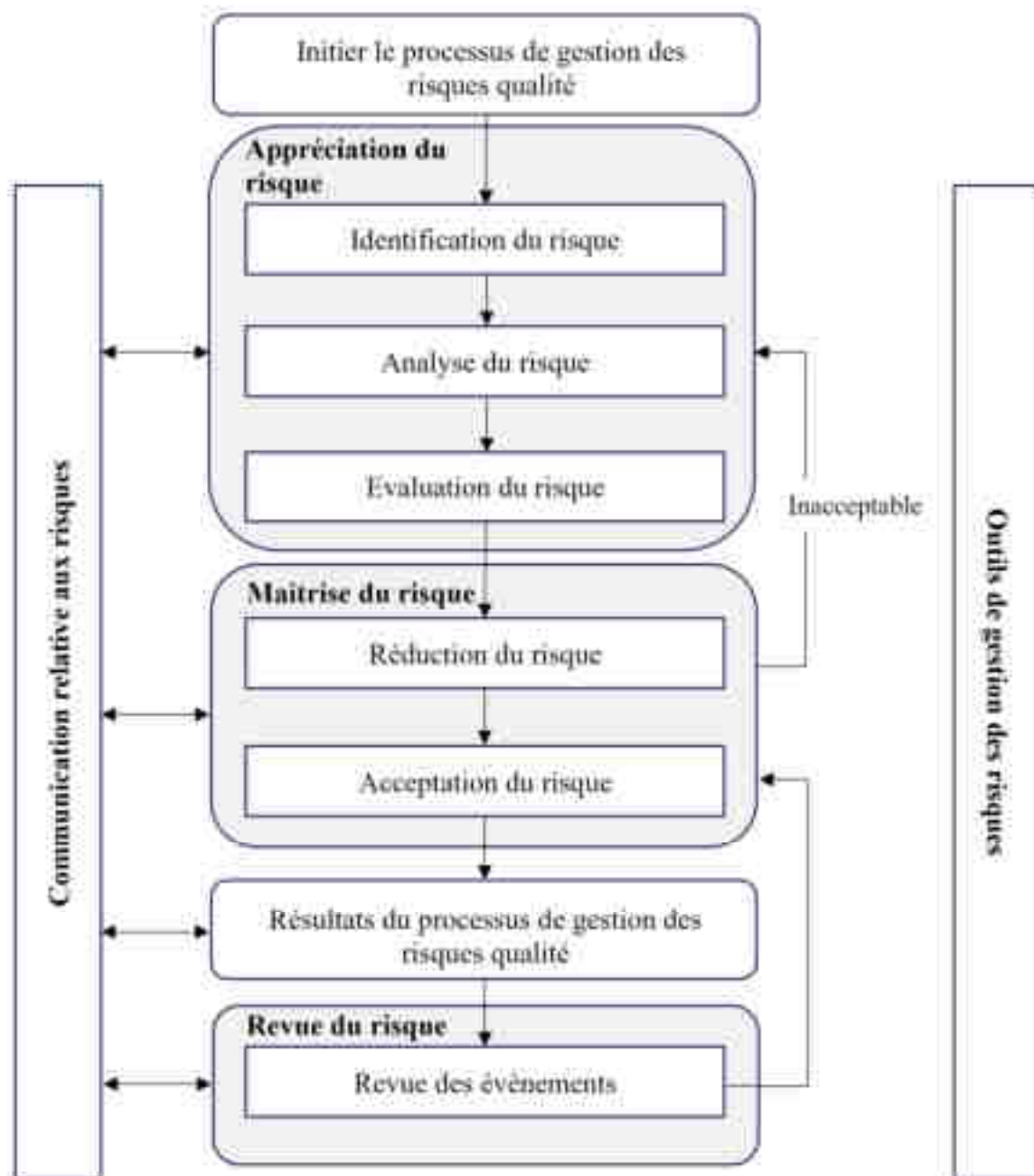


Figure 1: Aperçu d'un processus de gestion des risques de qualité selon l'ICH Q9 [5]

b. La méthode AMDEC

L'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité (AMDEC) est un outil de gestion de la qualité, d'analyse et d'évaluation des risques. Cet outil de gestion des risques est recommandé par l'ICH Q9 pour l'analyse des défaillances et des risques associés aux procédés de fabrication [5].

L'AMDEC est une démarche inductive car le point de départ de l'analyse repose sur l'identification des défaillances potentielles afin d'en déterminer leurs effets sur le procédé. L'identification des défaillances se doit d'être aussi exhaustive que possible et, le cas échéant, doit être réalisée par un groupe de travail pluridisciplinaire (Assurance qualité, Production, Validation, Maintenance, ...).

Le déroulement d'une analyse de risque type AMDEC permet :

- de décrire les différents risques pouvant conduire à une défaillance ;
- d'étudier les effets possibles des défaillances ;
- de rechercher les causes possibles des défaillances ;
- de préciser les moyens de détection des défaillances existants ;
- de définir les actions à mettre en place dans le but d'éliminer les défaillances, de réduire leurs effets ou de détecter les causes.

Les règles de cotation des risques sont définies à partir de 3 critères :

- la sévérité ou la gravité du risque (S) ;
- la probabilité d'occurrence ou d'apparition du risque (P) ;
- la détectabilité du risque (D).

Un score est attribué pour chaque critère permettant d'évaluer la criticité (C) du risque, calculée selon la formule suivante : $C = S \times P \times D$.

Le niveau du risque est déterminé à l'aide d'une matrice de décision (Tableau 1) et peut être :

- faible : le risque est accepté en l'état et aucune action supplémentaire n'est nécessaire pour réduire ou éliminer ce risque.
- modéré : une investigation doit être menée pour déterminer si le risque peut être réduit. Le risque peut être accepté en l'état s'il ne peut pas être réduit par la mise en place d'actions supplémentaires. La justification doit être clairement documentée dans l'analyse de risque.
- élevé : des actions doivent être mises en place afin de réduire le risque.

Tableau 1 : Exemple de matrice de décision

Détectabilité (D)	Sévérité x Probabilité d'occurrence (S x P)		
	Faible	Modéré	Elevé
Faible			
Modéré			
Elevé			

Couleur verte = niveau de risque faible, couleur orange = niveau de risque modéré, couleur rouge = niveau de risque élevé

c. Les procédés de stérilisation

Les produits stériles sont obtenus au moyen d'une méthode de stérilisation et peuvent être classés en deux grandes catégories selon leur mode de fabrication :

- les produits stérilisés après le conditionnement du produit dans leur récipient définitif et scellés hermétiquement ;
- les produits stérilisés avant le conditionnement du produit dans leur récipient définitif. Le remplissage du produit et le scellage du récipient sont effectués de manière aseptique afin de protéger le produit de toutes contaminations.

La stérilisation est un procédé permettant d'obtenir un produit ou un objet stérile, c'est-à-dire exempt de tout micro-organisme viable. Un procédé de stérilisation doit ainsi garantir un niveau d'assurance de stérilité (NAS) d'au moins 10^{-6} . Un NAS de 10^{-6} correspond à la probabilité de retrouver une unité contaminée dans un million d'unités après une exposition à un procédé de stérilisation [2].

Plusieurs méthodes de stérilisation sont décrites dans la Pharmacopée Européenne [6] :

Stérilisation par la chaleur sèche

La stérilisation par la chaleur sèche s'effectue à une température de 160°C pendant 2 heures et requiert l'utilisation d'un four ou d'un tunnel de stérilisation. Cette méthode ne peut pas être appliquée à un procédé BFS car les conditions de stérilisation (température et durée) ne sont pas applicables pour la stérilisation terminale des récipients plastiques.

Stérilisation par la chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide est la méthode de référence, en particulier pour la stérilisation terminale par autoclavage des solutions aqueuses. Les conditions conventionnelles de stérilisation sont de 121°C au minimum pendant une durée d'au moins 15 minutes.

D'autres combinaisons de température et de durée sont possibles à condition de démontrer un niveau d'assurance de stérilité suffisant.

Cette méthode est également la méthode de référence pour stériliser les équipements qui sont en contact avec le produit stérile. La stérilisation en place (SEP) joue un rôle essentiel dans le maintien de l'état stérile du produit dans le cas d'un procédé de fabrication aseptique.

Stérilisation par irradiation ionisante

Cette méthode repose sur l'exposition du produit à un rayonnement ionisant (rayonnement X, γ ou β) à l'aide d'un radioisotope ou d'un faisceau d'électron énergisés généré à l'aide d'un accélérateur de particule. La dose absorbée de référence est ≥ 25 kGy.

Cette méthode est principalement utilisée pour la stérilisation terminale de dispositifs médicaux et de produits thermolabiles.

Cette méthode n'est acceptable que si l'absence de détérioration par radiolyse du produit et des articles de conditionnement, pouvant être induite suite à l'exposition à des rayonnements ionisants a été démontrée scientifiquement.

Stérilisation par le gaz

La stérilisation par le gaz (p. ex. l'oxyde d'éthylène) repose sur la pénétration d'un gaz stérilisant dans le produit. La stérilisation par le gaz est suivie d'une étape de désorption afin de diminuer la concentration en gaz résiduel présent dans le produit.

Il faudra démontrer l'absence de gaz résiduel dans le produit stérilisé ou à minima que le gaz résiduel soit présent à une quantité non toxique pour le patient.

Cette méthode ne doit être employée que lorsqu'aucun autre procédé de stérilisation n'est applicable.

Filtration stérilisante

La filtration stérilisante est, selon la norme ISO13408-2, l'élimination de micro-organismes viables de fluides en faisant passer le fluide au travers d'un filtre dans les conditions spécifiées du processus, ce qui permet d'obtenir un filtrat stérile [7].

La filtration stérilisante est la méthode de choix pour stériliser les produits (liquide et gazeux) ne pouvant pas être stérilisés dans leur récipient final, par les procédés de stérilisation évoqués ci-dessus. Contrairement aux autres méthodes de stérilisation qui se basent sur l'inactivation des micro-organismes, la filtration stérilisante consiste à éliminer les micro-organismes du produit à l'aide d'un filtre d'une porosité d'au moins $0,22 \mu\text{m}$.

La filtration stérilisante finale doit être réalisée le plus proche possible du point de remplissage [2]. Il va de soi que la ligne de filtration et que tous les équipements se situant en aval du filtre stérilisant doivent être préalablement stérilisés avant de réaliser la filtration du produit.

La stérilité des produits conditionnés dans des récipients BFS est obtenue par un procédé de filtration stérilisante lorsque la stérilisation terminale du produit n'est pas possible.

d. Procédé aseptique vs stérilisation terminale

Quand cela est possible, la stérilisation terminale du produit fini est la méthode de référence pour les produits stériles car cette méthode garantit un plus haut niveau d'assurance de stérilité comparée à un procédé de fabrication aseptique.

Un procédé de fabrication aseptique consiste à répartir un produit, qui a été préalablement stérilisé, dans des contenants stériles. Le remplissage aseptique est réalisé dans des zones « critiques », c'est-à-dire des zones dans lesquelles le produit et les surfaces en contact avec le produit sont exposées à l'environnement.

L'Agence Européenne des Médicaments (AEM) recommande de suivre un arbre décisionnel afin de faciliter le choix du procédé de stérilisation en tenant compte des caractéristiques du produit [8].

En descendant dans l'arbre décisionnel (Figure 2), les méthodes de stérilisation présentent généralement un niveau d'assurance de stérilité décroissant et, par conséquent, la première option réalisable doit être retenue.

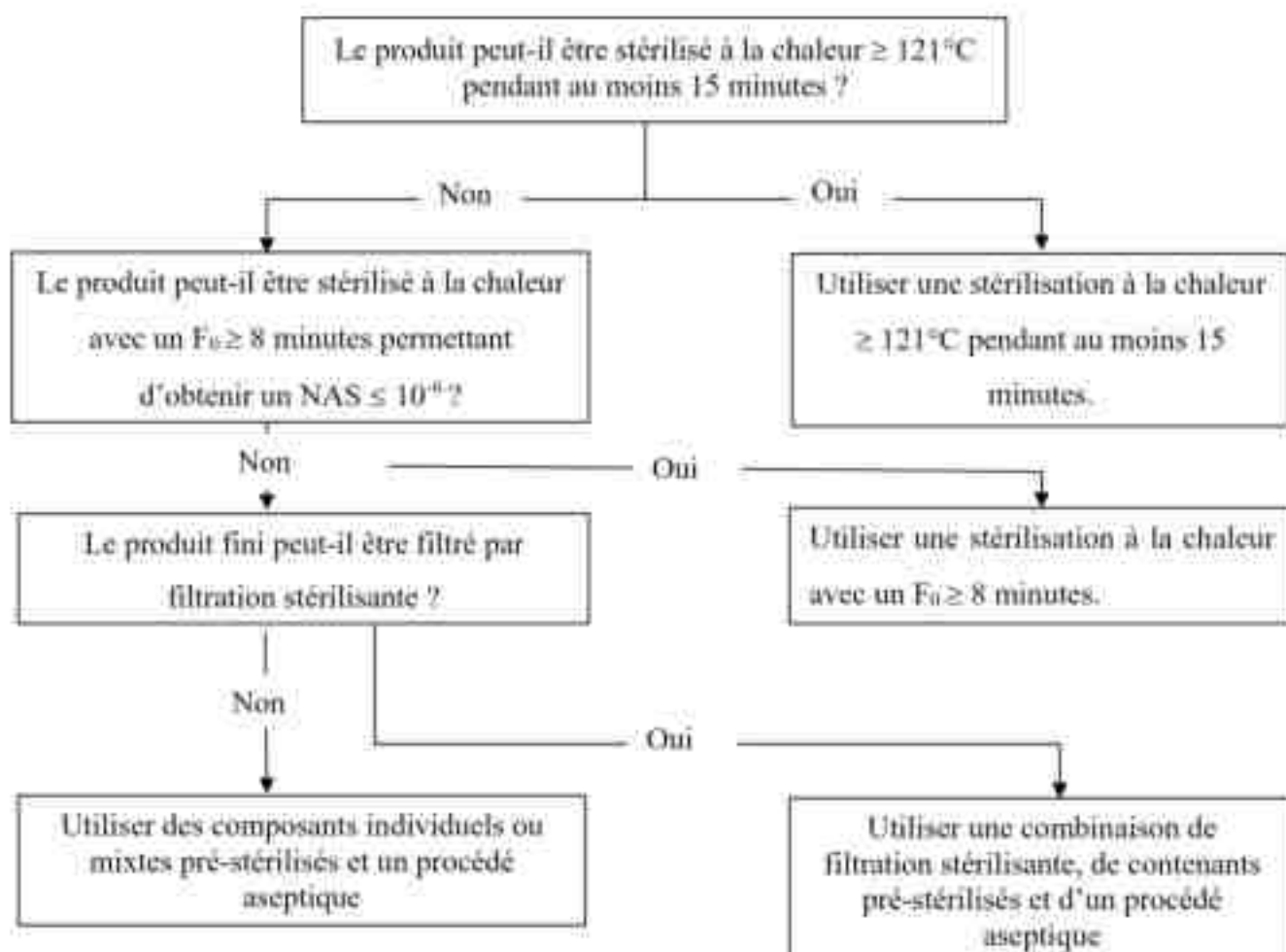


Figure 2 : Arbre décisionnel pour le choix de la méthode de stérilisation d'un produit aqueux [8]

Les produits issus d'un procédé BFS peuvent convenir à la stérilisation terminale. En fonction de la qualité de la résine de polymère choisie pour former les contenants plastique, les conditions de stérilisation (durée et température) doivent être adaptées :

- les résines polypropylène ou polyéthylène de haute densité (PEHD) sont en général retenues pour la stérilisation terminale.
- pour les résines en polyéthylène basse densité (PEBD), une durée de stérilisation plus longue à une température plus basse doit être envisagée pour atteindre le niveau d'assurance de stérilité requis, car le PEBD ne peut pas être exposé aux conditions conventionnelles de stérilisation par la chaleur sans risquer de provoquer des déformations irréversibles des contenants [9].

Cependant, la déformation des contenants plastique suite à une exposition prolongée à la chaleur et à la pression reste un risque potentiel pour toutes les résines, et en particulier pour les résines en PEBD.

Il est intéressant de noter que l'AEM ne propose pas de méthodes alternatives de stérilisation terminale autre que par la chaleur, comme par exemple des méthodes de stérilisation par irradiation ionisante [8].

Dans le cas où la stérilisation terminale ne peut pas être appliquée, notamment lorsqu'un produit ou un principe actif est thermolabile (p. ex. les produits issus de la biotechnologie), un procédé de fabrication aseptique permettant la production d'un produit stérile doit être envisagé.

Dans le cadre de la technologie BFS, un procédé de fabrication aseptique peut également être considéré sous réserve que :

- le fabricant peut démontrer que l'utilisation d'un contenant thermolabile présente un avantage significatif pour le consommateur si la formulation elle-même est thermolabile.
- les études de stabilité montrent que le produit est plus stable dans un contenant en polyéthylène de basse densité [9].

2. La technologie Blow-Fill-Seal (BFS)

a. Principe de fonctionnement

La technologie BFS est un procédé complexe de remplissage et de conditionnement de produits pharmaceutiques qui combine plusieurs opérations réalisées au sein d'une seule et même machine : la formation du contenant (conditionnement primaire), le remplissage du produit et le scellage du contenant.

Dans un procédé BFS, une résine de polymère plastique sous forme de granulés est utilisée pour former le contenant primaire. Cette résine alimente la trémie de la machine BFS par aspiration et est ensuite libérée dans la vis d'extrusion.

Les granulés de polymère plastique vont être progressivement chauffés à l'aide de résistances chauffantes placées tout le long de la vis d'extrusion pour être extrudés au niveau de la tête d'extrusion.

La tête d'extrusion est un assemblage fixé à l'extrémité de la vis d'extrusion permettant l'extrusion des granulés sous la forme d'un tube plastique, appelée paraison. Le processus d'extrusion est réalisé à une température comprise entre 170°C et 230°C et à une pression pouvant aller jusqu'à 350 bars.

La formation de la paraison est assurée par l'association de cônes et de contre-cônes situés dans la tête d'extrusion. Le réglage de ces éléments permet notamment de régler l'épaisseur des doses et l'orientation de la paraison par rapport aux moules.

Un flux descendant d'air stérile filtré passe à travers la paraison afin d'éviter l'effondrement du tube en fusion et permet également d'améliorer la formation des doses lorsque les moules se referment sur la paraison.

Le remplissage des doses est assuré par des injecteurs alimentés en produit depuis une cuve tampon. Une cuve tampon est une cuve de petite contenance (quelques litres) située sur le circuit produit de la machine permettant de diminuer la pression du circuit produit pour assurer un remplissage plus efficace des doses.

En effet, les produits stériles sont généralement stockés dans des cuves pressurisées (à environ 2 bars). A cette pression, le remplissage des doses n'est pas optimal (risque de mousse, d'éclaboussures, de doses percées, etc...). Il est donc nécessaire de faire passer le produit par la cuve tampon qui est maintenue à une pression plus faible.

Les injecteurs sont composés de deux parties :

- l'épave de remplissage, qui permet le passage du produit, avec le volume requis, vers la dose.
- le mandrin, qui protège l'épave de remplissage, forme l'opercule de la dose et permet l'échappement de l'air évacué lors du remplissage (dans certains cas).

Le corps de moule est la partie inférieure du moule permettant de former le corps de la dose et la languette. Le corps de moule de certaines machines BFS est, entre autres, composé de deux parties amovibles appelées listons :

- les listons de format : ces listons permettent de former le corps de la dose. Ils peuvent être remplacés pour ajuster le volume interne de la dose.
- les listons de gravage : ces listons permettent de former la languette de la dose et de graver, le nom du produit, le numéro de lot et la date de péremption, directement sur la languette.

La tête de moule est la partie supérieure du moule qui permet de sceller la dose après son remplissage en formant la tête de la dose. Une dose est composée de trois différentes sections :

- la tête (zone critique : en contact avec le produit) ;
- le corps (zone critique : en contact avec le produit) ;
- la languette (zone non critique : pas en contact avec le produit).

L'étape qui suit le remplissage et le scellage des doses est appelée l'étape de décarottage. Cette étape consiste à éliminer l'excédent de plastique enveloppant les doses. Les unités de décarottage doivent être conçues de manière à éviter d'endommager les doses lors du décarottage.

Le décarottage peut être réalisé au niveau de la machine BFS ou à l'extérieur de la salle de remplissage. Cependant, il est recommandé de réaliser l'étape de décarottage à l'extérieur de la salle remplissage afin de réduire la génération de particules autour de la machine de remplissage et de faciliter l'accès en cas d'opération de maintenance.

Remarque : Les étapes de préparation d'un produit rempli avec la technologie BFS sont identiques aux étapes de préparation d'un produit destiné à un remplissage aseptique dans une zone à atmosphère contrôlée conventionnel ou sous isolateur.

Les deux types de machines BFS les plus communément utilisées sont :

- les machines alternatives, également appelées machines avec « coupe de la paraison » ou « paraison ouverte »,
- les machines rotatives, également appelées machines avec « paraison fermée ».

a. Fonctionnement d'une machine alternative

Pour ce type de machine, l'extrusion de la paraison et l'étape de remplissage se produisent dans deux zones distinctes au sein de la machine :

- la zone d'extrusion : zone dans laquelle la dose est formée.
- la zone de remplissage : zone dans laquelle la dose est remplie et scellée.

Au niveau de la zone d'extrusion, les deux moitiés de partie inférieure du moule (corps de moule) se referment autour de la paraison soufflée et forment le corps de la dose. La dose partiellement formée est détachée de la paraison à l'aide d'un "couteau" et est transférée grâce à un chariot de transfert dans la zone de remplissage. Le chariot de transfert effectue des allers-retours entre la zone d'extrusion et la zone de remplissage.

Les injecteurs vont ensuite descendre dans la dose pour réaliser l'étape de remplissage. Lorsque le remplissage est terminé, les injecteurs remontent et la dose est scellée par la fermeture de la partie supérieure du moule (tête de moule). L'ensemble du moule s'ouvre alors, libérant la dose qui a été formée, remplie et scellée.

Lors de l'étape de remplissage, les injecteurs sont protégés des contaminants environnementaux par une douche d'air stérile. Il s'agit d'un dispositif monté sur la machine BFS qui fournit un flux d'air stérile en continu sur les injecteurs et sur le point de remplissage.

Un cycle complet dure généralement entre 10 et 20 secondes, en fonction du volume de remplissage et des caractéristiques du produit rempli (Pour un volume remplissage équivalent, le temps de remplissage d'un produit visqueux est généralement plus important que pour un produit aqueux).

Le temps de remplissage du produit dans la dose est relativement faible par rapport à la durée totale du cycle complet de production (environ 10% de la durée d'un cycle).

Un cycle complet comprend les étapes suivantes (Figure 3) :

- la paraison de polyéthylène est soufflée avec de l'air stérile (a) ;
- le corps de moule se referme sur la paraison pour former le corps de la dose puis la paraison est coupée à l'aide d'un couteau (b) ;
- le moule est transféré sous les injecteurs et le produit est rempli dans la dose (c) ;
- la tête de moule se referme pour sceller la dose et former la tête de la dose (d) ;
- le moule s'ouvre pour libérer la dose nouvellement formée (e).



Figure 3 : Fonctionnement d'une machine alternative [9]

b. Fonctionnement d'une machine rotative

Contrairement aux machines alternatives où il y a généralement une seule série de moules, ce type de machine est équipée d'environ une quinzaine de séries de moules situées sur deux chaînes rotatives.

Les injecteurs sont placés directement dans la tête d'extrusion de la machine. Les mandrins permettent de protéger les épines de remplissage et le produit de la chaleur induite par le processus d'extrusion.

Les moules viennent par rotation se refermer sur la paraison pour former le corps de la dose. Lorsque le corps de la dose est formé, la dose est ensuite remplie et le moule suivant vient sceller la dose en formant la tête de la dose et le corps de la dose du prochain cycle de production. Ainsi, les doses sont produites en un seul « ruban » continu, contrairement aux machines alternatives qui coupent la paraison entre chaque cycle de production. Par conséquent, un cycle de production d'une machine rotative est plus rapide que celui d'une machine alternative et dure environ 4 à 5 secondes (Figure 4).

Les machines rotatives ne sont pas équipées de douche d'air stérile « traditionnelle ». La protection des injecteurs contre les contaminants environnementaux est assurée par le circuit d'air stérile du soufflage de la paraison.

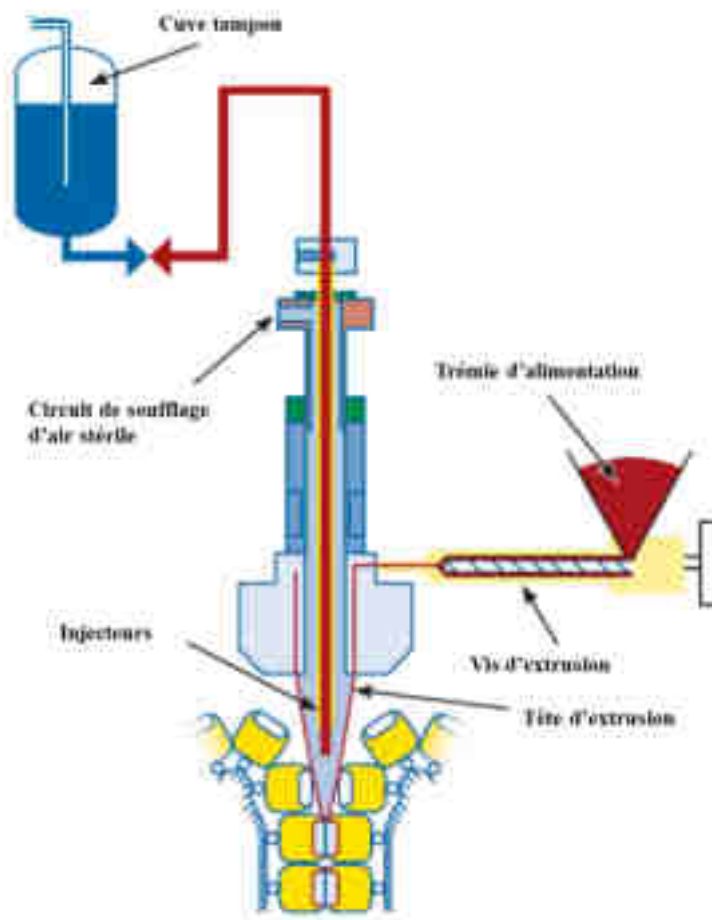


Figure 4 : Fonctionnement d'une machine rotative [9]

3. La validation des procédés de fabrication

Le concept de qualification et de validation occupe une place très importante dans le la réglementation pharmaceutique. Les instances réglementaires demandent de contrôler tous les aspects critiques des opérations mis en œuvre au cours d'un procédé au moyen de qualification et de validation.

L'Annexe 15 des BPF, dans laquelle sont décrits les principes généraux de la qualification et de la validation, définit la validation de procédé comme étant un ensemble d'« informations documentées attestant que le procédé, utilisé dans le cadre des paramètres établis, est capable de fonctionner efficacement et de manière reproductible pour produire un médicament répondant aux spécifications et caractéristiques qualitatives préalablement déterminées » [1].

La validation des procédés de fabrication peut être :

- prospective : la validation est effectuée sur des lots de validation avant la production de routine des produits destinés à la vente. La libération des lots est basée sur l'analyse du résultat global de la validation.
- simultanée (ou concomitante) : la validation est exécutée en même temps que la commercialisation des lots. Cependant, les données doivent être suffisantes pour prouver que tout le lot est uniforme et doivent répondre aux critères d'acceptation prédéfinis. Cette approche ne doit être utilisée que dans des circonstances exceptionnelles et justifiée par des bénéfices significatifs pour le patient.
- rétrospective : la validation se base sur la revue historique des données de production d'un grand nombre de lot. La validation rétrospective est donc seulement applicable pour un produit déjà commercialisé et pour des procédés bien connus sans modification significative. Cependant, cette approche n'est plus considérée comme acceptable pour la validation de nouveaux procédés de fabrication [1].

La validation des procédés implique une série d'activités se déroulant tout au long du cycle de vie du produit et du procédé. Les activités de validation de procédés peuvent se décomposer en trois étapes successives [10] :

- la conception et le développement du procédé ;
- la qualification du procédé ;
- la vérification continue du procédé.

a. Conception et développement du procédé

Cette étape a pour objectif de concevoir et développer un procédé de fabrication de routine qui pourra permettre l'obtention d'un produit conforme à ses attributs qualité critiques. Le choix du procédé doit être fait en adéquation avec les caractéristiques physicochimiques du principe actif, la formulation du produit et l'impact du procédé sur la qualité et la stabilité du produit [11].

Le programme de conception d'un procédé de fabrication consiste à :

- définir un procédé approprié pour produire de manière conforme aux BPF et en respectant les spécifications des produits et les contraintes techniques ;
- identifier les paramètres de procédé critiques (PPCs) qui affectent les attributs qualité critiques du produit (AQC) ;
- identifier les contrôles en cours de fabrication et les méthodes d'analyse ;
- identifier les équipements adéquats pour la fabrication du produit.

Selon les caractéristiques du produit et les contraintes techniques associées, plusieurs types de procédés de fabrication BFS peuvent être envisagés :

- un produit stérile est transféré directement d'une cuve de stockage sans filtration stérilisante vers la machine de remplissage. La machine de remplissage et la ligne de transfert ont été préalablement stérilisées en place. Ce procédé est destiné principalement pour remplir des produits ne pouvant pas être stérilisés par filtration.
- un produit stérile est transféré d'une cuve de stockage vers la remplisseuse avec une ligne de transfert directement reliée au système de remplissage de la machine (sans passer par la cuve tampon). La machine de remplissage et la ligne de transfert ont été préalablement stérilisées sur place de la même manière que pour le processus de remplissage indiqué ci-dessus. Ce procédé est destiné principalement pour remplir des produits visqueux.
- un produit stérile est transféré d'une cuve vers la machine de remplissage équipée d'une ligne de filtration stérilisante préalablement stérilisée. Ce procédé présente un haut niveau d'assurance de stérilité car le produit est stérilisé une première fois lors de sa fabrication puis une seconde fois juste avant son remplissage.
- un produit non-stérile est transféré d'une cuve de stockage vers la machine de remplissage équipée d'une ligne de filtration stérilisante préalablement stérilisée.

b. Qualification du procédé

Lors de la phase de qualification du procédé, le procédé conçu à l'étape précédente est évalué afin de démontrer que le procédé de fabrication fonctionne comme prévu et qu'il est capable d'assurer une fabrication commerciale reproductible.

Cette étape de qualification se décompose en deux parties [10] :

- la conception de l'installation et la qualification des équipements et des utilités ;
- la qualification des performances du procédé.

En pratique, la qualification de performance du procédé consiste à fabriquer un certain nombre de lots de validation (généralement au moins trois) dans des conditions de routine et avec une taille de lot identique à celle d'un lot de routine. Les lots de validation doivent être exclusivement fabriqués par le personnel formé au procédé. Au préalable, il faut au minimum que :

- les équipements, installations, utilités et systèmes utilisés pour la validation du procédé soient qualifiés ;
- les méthodes d'analyse soient validées ;
- les fournisseurs de matières premières soient qualifiés avant la fabrication des lots de validation.

La qualification de performance du procédé implique la collecte et l'évaluation de données sur tous les aspects et étapes du procédé de fabrication.

Lors de cette étape, l'échantillonnage (nombre de prélèvements, points de prélèvements, ...) est généralement plus élevé que lors d'une production commerciale de routine et des tests complémentaires peuvent être réalisés pour vérifier les performances du procédé.

L'utilisation d'outils et de méthodes statistiques est nécessaire pour mesurer et évaluer la stabilité, la capacité et la robustesse du procédé :

- les études et analyses des AQC's et PPC's ;
- l'étude de la variabilité du procédé (variabilité inter- et intra-lot) ;
- la corrélation entre les différents paramètres du procédé.

Les AQC's sont évalués et les PPC's doivent être pris en compte pour confirmer la qualité du produit et permettre la libération des lots fabriqués.

c. Vérification continue du procédé

L'objectif de cette dernière étape de validation est de s'assurer en permanence que le procédé reste dans un état validé pendant la fabrication de lots commerciaux [10]. La vérification en continu des performances du procédé permet d'identifier les problèmes et, le cas échéant, de déterminer si des mesures correctives ou préventives doivent être prises afin que le procédé reste maîtrisé.

Un programme continu de collecte et d'analyse des données relatives au produit et au procédé doit être mis en place pour documenter le maintien de l'état validé. Les données de production collectées doivent permettre de vérifier que les attributs qualité sont contrôlés de manière appropriée tout au long du procédé. La variabilité du procédé doit être évaluée périodiquement, et de ce fait, la surveillance et l'échantillonnage et le contrôle des PPCs et des AQCs doivent être adaptés en conséquence.

Les données collectées au cours de cette étape peuvent également suggérer des moyens d'amélioration et/ou d'optimisation du procédé. Des activités supplémentaires de conception et de qualification pourraient être envisagées en fonction de la modification proposée et de son éventuel impact sur la qualité du produit.

d. Cas particulier de la validation de procédés de fabrication aseptique

Une validation de procédé de fabrication aseptique est réalisée pour évaluer le risque de contamination d'un procédé par le biais de simulation de procédé aseptique, ou Aseptic Process Simulation (APS) [2]. Le principe des APS est de simuler les différentes étapes d'un procédé de fabrication, à l'aide d'un milieu de culture, afin de mettre en évidence le risque de produire des unités non-stériles.

En pratique, les simulations aseptiques consistent à préparer et à remplir un bouillon de culture en simulant, autant que possible, l'ensemble des étapes du procédé tel qu'il est réalisé en routine. Après incubation dans des conditions favorables au développement de micro-organismes, les unités remplies avec du bouillon de culture sont contrôlées visuellement par des opérateurs et ne doivent montrer aucune contamination microbienne (absence d'une turbidité dans les unités inspectées).

Les simulations de procédé aseptique ne se suffisent pas à elles seules à démontrer l'asepsie du procédé. Par conséquent, l'ensemble des éléments contribuant à l'asepsie du procédé tel que les centrales de traitements d'air, les locaux, les équipements de préparation et de remplissage, les étapes du procédé de fabrication (y compris les procédés de stérilisation) doit être qualifié et validé. Le personnel doit également être formé et qualifié.

Les simulations de procédé aseptique sont effectuées dans le cadre d'une :

- qualification initiale d'un équipement, d'un procédé ou d'une opération critique ;
- requalification de performance périodique d'un procédé aseptique ;
- revalidation en raison d'un changement important sur la ligne de production (p. ex. modification du système de traitement d'air) ;
- revalidation à la suite d'une investigation (p. ex. perte du statut validé d'un procédé) ;
- revalidation pour un procédé non-exécuté pendant une période prolongée.

Le nombre de simulations aseptiques à réaliser dans le cadre d'une validation initiale ou en cas de changement majeur est d'au moins trois [2].

Pour valider à l'initial un procédé de fabrication aseptique, les APS sont réalisées de façon consécutive et les résultats obtenus doivent être conformes aux critères d'acceptation définis dans le protocole de validation.

Les requalifications périodiques doivent être réalisées au minimum deux fois par an à un intervalle d'environ six mois [2]. Il est possible d'optimiser les requalifications périodiques en réalisant chaque année une APS avec la durée de remplissage la plus longue et une APS permettant de simuler l'ensemble des opérations de routine sans notion de durée.

La simulation du procédé aseptique doit inclure les opérations préalablement évaluées comme « critiques » dans le but de les autoriser lors d'une production de routine. Une opération critique est une opération pouvant présenter un risque aseptique, c'est-à-dire un risque pour le produit ou/et l'environnement de production.

Les exercices d'APS doivent être normalement réalisés pour chaque procédé de fabrication aseptique, chaque machine de remplissage et chaque équipe [2].

III. Prérequis à la validation des procédés de fabrication aseptique

1. Validation de la filtration stérilisante

La validation de la filtration stérilisante est généralement réalisée en deux étapes [12]. La première étape, réalisée à échelle réduite, consiste à démontrer la capacité du filtre à être stérilisant. La seconde étape, réalisée à échelle industrielle, doit permettre de démontrer que la qualité du produit n'est pas impactée par le procédé de filtration et que le procédé de filtration est reproductible. De manière générale, une validation est spécifique à un produit, toutefois une approche par « regroupement » de produit est possible mais elle doit être justifiée scientifiquement [8].

Le programme de validation de filtration stérilisante doit à minima inclure les essais suivants dans des conditions « worst-case » (p. ex. température, durée de contact, ...) :

- l'évaluation de la compatibilité chimique et de l'adsorption du produit sur le filtre ;
- l'étude des extractibles et des relargables ;
- la détermination des paramètres de test d'intégrité du filtre ;
- la stérilisation du système de filtration ;
- le test de rétention bactérienne.

Le test de rétention bactérienne est réalisé à partir d'une solution composée du produit à valider et d'une solution bactérienne de *Brevundimonas diminuta* à une concentration d'au moins 10^7 germes/cm² de surface filtrante [12]. De ce fait, un test de viabilité doit être réalisé en amont pour démontrer que le produit à valider n'a pas d'effet bactéricide ou bactériostatique sur la solution bactérienne [12]. Ainsi, le test de rétention bactérienne peut être réalisé par :

- inoculation directe : le test est réalisé en inoculant le micro-organisme de référence directement dans le produit à valider.
- inoculation indirecte : le test ne peut pas être réalisé en inoculant le micro-organisme dans le produit à valider. Par conséquent, les conditions de test (p. ex. réduction du temps d'exposition) et/ou les caractéristiques du produit (p. ex. produit modifié sans l'élément bactéricide) doivent être adaptés.

Les paramètres validés lors de ce test sont :

- le rapport volume de produit / surface filtrante ;
- la température du produit et de l'environnement de filtration ;
- le débit de filtration et la pression de filtration ;
- la durée maximale de filtration (durée maximale de contact filtre-produit).

Un test d'intégrité est un test non-destructif permettant de s'assurer que la capacité de rétention bactérienne du filtre n'a pas été altérée par le procédé de fabrication. Les deux tests d'intégrité des filtres stérilisants hydrophiles les plus communs sont les suivants [12] :

- le test du point de bulle : ce test consiste à mesurer la pression à laquelle un gaz expulse le liquide contenu dans les plus gros pores d'un filtre préalablement mouillé.
- le test de diffusion : ce test consiste à mesurer le débit de diffusion d'un gaz, c'est-à-dire le mouvement d'un gaz dissous à travers la membrane d'un filtre préalablement mouillé. Le débit de diffusion est proportionnel à la surface totale du filtre et à la pression appliquée.

Le liquide de mouillage du filtre utilisé pour le test d'intégrité est basé sur les recommandations du fournisseur du filtre et ne doit pas altérer la qualité du produit [2].

Un test d'intégrité du filtre doit être réalisé en ligne après la stérilisation de la ligne de filtration et avant son utilisation dans le but de contrôler la potentielle perte d'intégrité du filtre suite à la stérilisation (PUPSIT). L'étude des conditions de stérilisation du filtre et des conditions de filtration doit montrer qu'elles n'altèrent pas l'intégrité du filtre.

L'intégrité du filtre est contrôlée une seconde fois à la fin de la filtration pour s'assurer que le filtrat est stérile.

Par conséquent, le système de filtration doit être conçu pour [2] :

- permettre le bon fonctionnement du procédé de filtration dans les paramètres validés ;
- maintenir la stérilité du filtrat ;
- réduire au minimum le nombre de connexions aseptiques entre le filtre stérilisant final et le remplissage aseptique du produit ;
- être stérilisé en place ;
- être nettoyé en place (à réaliser si nécessaire) ;
- permettre les tests d'intégrité en place, avant et après la filtration.

Le contrôle de la biocharge (ou Bioburden) est réalisé avant l'étape de filtration stérilisante pour contrôler la contamination microbienne du produit pour augmenter le niveau d'assurance de la stérilité du procédé aseptique. Pour un test de biocharge, la limite d'action recommandée est de 10 UFC/100 mL avant la filtration stérilisante [8].

Une préfiltration dans une cuve de stockage peut être justifiée pour réduire la biocharge si cette limite ne peut pas être atteinte avant la filtration finale du produit au plus près du point de remplissage.

2. Validation des procédés de stérilisation à la vapeur

La validation de la stérilisation a pour but de démontrer qu'un procédé de stérilisation permet l'obtention d'un produit ou d'un équipement stérile à l'issue du cycle de stérilisation [13]. Dans le cadre d'un procédé BFS, l'objectif de la validation de stérilisation par la chaleur est de vérifier l'efficacité de la stérilisation des équipements en contact direct et indirect avec le produit, et non la stérilisation du produit fini.

La validation d'un procédé de stérilisation par la vapeur d'un équipement débute par une étude de la cartographie des températures du système à l'aide de thermocouples indépendants afin :

- de vérifier la pertinence des sondes de température de routine ;
- de mettre en évidence les éventuels points froids du système étudié (points critiques).

Sur la base des résultats de l'étude de cartographie des températures, des thermocouples sont placés sur les points critiques de l'équipement pendant les cycles de stérilisation. Des indicateurs biologiques, contenant des spores bactériennes résistantes à la chaleur, doivent également être placés dans tous les points critiques du système afin de soutenir l'exercice de validation [2].

Le fournisseur des bioindicateurs doit être qualifié et il doit être démontré que la qualité des bioindicateurs n'est pas impactée par les conditions de transport et de conservation [2].

Le germe *Geobacillus stearothermophilus* est un germe thermorésistant très fréquemment utilisé pour démontrer l'efficacité d'un procédé de stérilisation par la chaleur [6]. Ce germe possède une valeur D_T à 121°C comprise entre 1,5 et 3 minutes. La valeur D_T , ou temps de réduction décimale, correspond au temps nécessaire pour inactiver 90% de la population de micro-organismes initialement présents, pour une température définie. Ce germe couvre pratiquement l'ensemble des micro-organismes car la plupart des bactéries sporulantes ont une valeur D_T à 121°C entre 30 secondes et 1 minute.

Ce germe a également l'avantage d'être non pathogène pour l'Homme. De plus, *Geobacillus stearothermophilus* n'est pas un germe banal et permet donc d'éviter les faux positifs lors des exercices de validation.

L'approche de stérilisation par « sur-destruction » (« overkill ») est généralement utilisée lors de la validation. Cette approche permet d'obtenir la garantie d'un équipement stérile en se basant sur une réduction d'au moins 12 log d'une population de micro-organismes ayant une valeur D_T minimale d'une minute [2].

Dans le cadre d'une validation initiale, au moins trois essais de stérilisation doivent être exécutés pour démontrer la reproductibilité du procédé de stérilisation. L'objectif de ces essais est de valider des conditions de stérilisation pour atteindre un NAS d'au moins 10^{-6} [14].

Les résultats des indicateurs biologiques permettent de démontrer l'efficacité du procédé de stérilisation mais ne doivent en aucun cas remplacer le suivi des paramètres critiques du procédé de stérilisation (durée d'exposition, corrélation entre la pression et la température, la plage de température minimale/maximale pendant la durée de l'exposition, ...).

En principe, un procédé de stérilisation par la chaleur doit être requalifié une fois par an [14].

3. Validation du processus d'extrusion

Le processus d'extrusion d'une machine BFS est un cycle automatique et continu au cours duquel les granulés de polyéthylène sont chauffés, mélangés, compressés, transformés et extrudés en paraison.

Selon l'Annexe 1 des BPF, la capacité du système d'extrusion à fournir une assurance de stérilité suffisante pour le récipient formé doit être comprise et validée [2]. Dans le cadre de la technologie BFS, le processus d'extrusion peut être assimilé à un procédé de stérilisation permettant d'obtenir des récipients stériles pour le remplissage aseptique.

À ce jour, l'approche la plus efficace pour valider l'efficacité du processus d'extrusion consiste à utiliser des granulés de polymère plastique contaminés avec des spores de micro-organismes résistants à la chaleur et de montrer qu'en utilisant ces granulés contaminés, le remplissage des récipients avec un bouillon de culture ne va montrer aucune contamination après incubation [15].

Une étude scientifique [16] a permis de mettre en évidence que :

- les spores bactériennes présentes sur les granulés de polymère sont inactivées par la chaleur pendant le processus d'extrusion.
- il existe une relation directe entre la proportion de produit contaminée et la résistance des micro-organismes à la chaleur. Le nombre d'unités contaminées augmente rapidement avec l'augmentation de la valeur D_T du germe présent sur les granulés.
- la qualité microbiologique des granulés de polymère utilisés lors d'un processus d'extrusion impacte directement la stérilité de l'unité produite.

Il est donc essentiel, pour un procédé BFS, d'établir des limites d'acceptation pour le contrôle de la charge biologique des granulés de polymère dans le but d'assurer une production constante d'unités stériles. Le contrôle de la biocharge, et des endotoxines (si applicable), des granulés de polymère doit être réalisé à une fréquence déterminée dans la CCS [2].

Une attention particulière doit être portée à la conception, le contrôle et l'entretien des systèmes de stockage et de distribution des granulés de polymère pour éviter au maximum la contamination particulière et microbienne des granulés.

Les paramètres du processus d'extrusion (p. ex. température d'extrusion, vitesse d'extrusion, ...) jouent également un rôle majeur dans le maintien de la stérilité du produit. Ces paramètres critiques sont validés au travers des simulations aseptiques. Par conséquent, les paramètres d'extrusion utilisés lors des APS doivent être plus restrictifs que les paramètres d'extrusion qui seront utilisés lors de la production de routine (p. ex. utilisation d'une température d'extrusion moins élevée).

4. Qualification environnementale des locaux

La fabrication de produits stériles doit être réalisée dans des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) afin de réduire au maximum le risque de contamination microbienne et particulaire.

Les ZAC sont classées selon les qualités requises pour leur environnement [2] :

- classe A : réalisation des opérations à haut risque aseptique ;
- classe B : opérations de préparation et de remplissage aseptiques ;
- classe C et D : ZAC destinées aux étapes moins critiques de la fabrication de produits stériles (préparation de solutions destinées à être filtrées par exemple).

La qualité environnementale des locaux est assurée par des centrales de traitement d'air (CTA). Les CTA filtrent l'air au travers de filtres à haute efficacité, appelés filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air) pour contrôler le niveau de particules viables et non viables dans les locaux.

L'air filtré doit arriver à une vitesse suffisante (p. ex. de 0,36 à 0,54 m/s pour la classe A) afin d'éloigner les particules en dehors des zones critiques et pour maintenir un flux unidirectionnel durant les opérations.

La qualification des locaux d'une ZAC consiste à contrôler [2]:

- l'étanchéité du système de traitement de l'air ;
- l'intégrité des filtres à air ;
- le débit d'air nécessaire au renouvellement de l'air ;
- la visualisation et la direction du flux d'air ;
- la contamination particulaire de l'air et des surfaces (viables et non viables) ;
- la température et l'humidité relative des locaux ;
- les différentiels de pression : les BPF préconisent un différentiel de pression d'au moins 10 pascals entre deux pièces adjacentes relevant de classes différentes.

La classification des locaux est une méthode d'évaluation du niveau de propreté de l'air par rapport à une spécification d'une classe en mesurant la concentration totale de particules (viables et non-viables). La classification des locaux est réalisée « au repos » et « en activité ».

Le statut d'une salle propre est défini de la façon suivante [2]:

- au repos : « état où les locaux sont opérationnels (y compris des utilités et des systèmes de traitement d'air fonctionnels) avec le matériel de production en place mais au repos, sans que le personnel soit présent » ;
- en activité : « état où les locaux, le système de traitement d'air et les équipements fonctionnent selon le mode opératoire défini et en présence du nombre maximum prévu d'opérateurs simulant et/ou effectuant les opérations de fabrication de routine ».

La mesure du nombre de particules est réalisée à l'aide d'un compteur de particules. Le nombre de prélèvements et l'emplacement des points de prélèvements sont déterminés en fonction de la superficie du local. Des prélèvements supplémentaires peuvent être réalisés dans les zones considérées comme critiques (p. ex. les zones les plus génératrices de particules, les zones les moins brassées, ...) [17].

La concentration maximale autorisée pour les particules en suspension dans l'air pendant la qualification est donnée dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Concentration totale maximale de particules autorisée pour la classification

Classe	Nombre maximal autorisé de particules d'une taille supérieure ou égale à 0,5 $\mu\text{m}/\text{m}^3$		Nombre maximal autorisé de particules d'une taille supérieure ou égale à 5,0 $\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	Au repos	En activité	Au repos	En activité
A	3 520	3 520	Non spécifié	Non spécifié
B	3 520	352 000	Non spécifié	2 930
C	352 000	3 520 000	2 930	29 300
D	3 520 000	Non prédéfini	29 300	Non prédéfini

Les limites de particules totales indiquées ci-dessus pour l'état « au repos » doivent être atteintes après une période de récupération (moins de 20 minutes).

Dans le cadre de la qualification des locaux, le niveau de contamination microbienne des locaux est également déterminé « au repos » et « en activité ». Le nombre de points à prélever et leur positionnement est déterminé au travers d'une analyse des risques (p. ex. dans les zones qui présentent le risque de contamination le plus élevé).

Les contrôles microbiologiques consistent à contrôler la contamination :

- de l'air par prélèvement à l'aide d'un bio-collecteur (collecteur de germes par aspiration) ;
- de l'air par sédimentation à l'aide de boîtes de Petri ouvertes dans l'environnement à classer ;
- des surfaces à l'aide de géloses de contact.

Les limites maximales de contamination microbienne pendant la qualification pour chaque classe sont indiquées dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3 : Niveau maximal de contamination microbienne autorisé pendant la qualification

Classe	Échantillon d'air UFC/m ³	Boîtes de sédimentation (diamètre 90 mm) UFC/4 heures	Gélose de contact (diamètre 55 mm)
A	Pas de croissance		
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Les locaux sont requalifiés périodiquement à des intervalles définis selon la norme ISO14644-2 [18]:

- pour les zones de classe A et B, l'intervalle maximal pour la requalification est de 6 mois ;
- pour les zones de classe C et D, l'intervalle maximal pour la requalification est de 12 mois.

Conformément à l'Annexe 1 des BPF, une machine BFS doit être installée au minimum dans un local de classe C à condition qu'un habillage de classe A/B soit utilisé lorsque la machine est impliquée dans un procédé aseptique. Une machine BFS peut être installée dans un local de classe D à condition que le produit soit stérilisé dans son récipient final [2].

Les flux d'air dans la salle de remplissage peuvent ne pas être unidirectionnels dans certaines zones en raison de la nature du procédé BFS. En effet, les flux d'air peuvent être influencés par les courants thermiques (génération de chaleur et de turbulences lors du processus d'extrusion), ainsi que par le fonctionnement de l'équipement.

La visualisation des flux d'air, par la réalisation de test de fumée, doit mettre en évidence l'impact potentiel de la machine sur l'environnement de production [9]. Ce test doit montrer le caractère unidirectionnel du flux et l'absence de zones mortes, de zones de turbulence et de zones stagnantes.

5. Qualification du personnel

La principale source de contaminations dans les zones à atmosphère contrôlée est d'origine humaine. Il est donc essentiel de protéger le produit des potentielles contaminations apportées par les opérateurs lors des différentes étapes de fabrication. Le nombre de personnes présentes dans les ZAC doit être réduit au minimum et l'accès aux ZAC lors des interventions doit être limité au strict nécessaire pour éviter l'introduction de contamination [2].

Dans le cas d'un procédé BFS, il n'y a pas ou très peu d'intervention humaine lors du procédé de remplissage et, dans de nombreuses situations, aucun opérateur n'est présent dans la salle de remplissage afin de réduire au maximum les risques de contamination [9].

Le nombre maximal d'opérateurs présent en simultané dans une salle propre doit être déterminé lors d'une qualification initiale des ZAC et confirmé lors des APS [2].

Le personnel intervenant dans la fabrication de produits stériles doit être formé au minimum sur :

- les règles d'hygiène et les techniques d'habillage ;
- le comportement et le travail en ZAC ;
- les notions de base en microbiologie.

Le niveau de formation est adapté à la fonction occupée et à la criticité de la zone dans laquelle l'opérateur est amené à intervenir [2].

Le type d'habillage doit être adapté au procédé de fabrication et aux classes des zones de travail de façon à protéger l'opérateur et le produit contre tout risque de contamination (Tableau 4).

Tableau 4 : Habillage requis selon le type de classe

	Classe A/B	Classe C	Classe D
Cheveux, barbe, moustache	Une cagoule stérile couvrant tous les cheveux (pilosité faciale incluse)	Cheveux, barbe et moustache couverts	Cheveux, barbe et moustache couverts
Visage	Masque et dispositif de protection visuelle stériles couvrant la totalité du visage	Masque et dispositif de protection visuelle stériles si activité avec un risque de contamination	Masque et dispositif de protection visuelle stériles si activité avec un risque de contamination
Mains	Gants en caoutchouc ou plastique, stériles et non poudrés	Gants si activité avec un risque de contamination	Gants si activité avec un risque de contamination
Corps	Bas du pantalon rentré à l'intérieur des chaussures Et manches de la tenue rentrées dans les gants	Tenue en une seule pièce ou deux pièces munie d'un col montant et serrée aux poignets	Vêtement de protection générale
Pieds	Chaussures stériles de type surbottes	Chaussures désinfectées ou surchaussures	Chaussures désinfectées ou surchaussures

En raison de la spécificité de la technologie BFS, les opérateurs travaillant dans des zones à atmosphère contrôlée de classe C sont équipés d'une tenue vestimentaire de classe A/B [2].

De manière générale, les vêtements ne doivent pratiquement pas libérer de fibres et doivent retenir les particules émises par l'opérateur. La propreté et l'intégrité des vêtements doivent être vérifiées visuellement avant d'entrer en salle propre.

Des règles de comportement en ZAC et une gestuelle appropriée permettent de limiter le nombre de particules émises et donc la dispersion des contaminants dans l'environnement.

Il est préférable de se tenir debout plutôt qu'assis car les contacts entre le vêtement protecteur et le corps humain augmentent la probabilité d'émission de particules et de micro-organismes du corps vers l'environnement de production.

Le nombre de gestes doit se limiter au strict nécessaire et les mouvements doivent être lents et délibérés pour ne pas créer de turbulences (marcher lentement, ne pas balancer les bras, se tourner lentement, ...). En effet, les particules et les micro-organismes sont transportés par l'air et peuvent donc se diffuser sur de longues distances, même si on évolue avec précaution. Les gestes brusques sont à proscrire.

Le masque n'est pas une barrière efficace à 100% contre la diffusion de micro-organismes. La capacité de rétention microbienne du masque diminue dans le temps, au fur et à mesure qu'il s'humidifie. Par conséquent, il est important de parler le moins possible, et surtout ne pas parler fort ou crier même en cas d'intervention.

Le nettoyage et la désinfection des ZAC doivent être réalisés régulièrement afin d'éliminer les contaminants particuliers et microbiologiques présents dans l'environnement de production.

Il est recommandé d'utiliser plusieurs et différents types de désinfectants pour réduire le risque de résistance des micro-organismes aux désinfectants utilisés. Les désinfectants et détergents utilisés dans des ZAC de classe A/B doivent être stériles [2].

Une surveillance microbiologique des ZAC doit être mise en place pour confirmer l'état de propreté des ZAC mais doit également permettre de détecter le développement de souches résistantes.

La qualification du personnel consiste à :

- vérifier la technique d'habillage par l'échantillonnage de leurs vêtements à l'aide des géloses de contact qui sont appliquées à différents endroits sur la tenue et sur les gants de l'opérateur.
- contrôler leurs aptitudes à effectuer des opérations de fabrication aseptique en les faisant participer à un minimum de trois APS lors de la qualification initiale. Le personnel est ensuite requalifié chaque année en participant au minimum à une APS.

L'Annexe 1 a introduit la notion de « disqualification » du personnel. Un opérateur disqualifié (p. ex. un opérateur impliqué dans l'échec d'une APS) doit suivre une nouvelle formation et se requalifier avant de pouvoir à nouveau participer à des pratiques aseptiques. Cette requalification peut inclure la participation à une APS réussie [2].

6. Surveillance environnementale

Avant de démarrer les simulations aseptiques, une surveillance environnementale doit être mise en place afin de contrôler le niveau de contamination particulaire et microbienne de l'air, des surfaces, des gants et des tenues du personnel ainsi que du différentiel de pression entre les locaux, la température et l'humidité relative.

La surveillance environnementale concerne également les équipements ventilés par de l'air propre et, par conséquent, concerne les machines BFS :

- pour les machines alternatives, la paraison est ouverte à l'environnement, et par conséquent, les zones d'extrusion, de soufflage et scellage de la paraison doivent respecter les conditions de la classe A dans les zones critiques de la machine.
- pour les machines rotatives, la paraison est fermée à l'environnement une fois formée.

Pour les deux types de machine, l'environnement de remplissage doit être conçu et maintenu de manière à satisfaire aux conditions de classe A en ce qui concerne les limites de particules viables et totales à la fois « au repos » et « en activité » [2].

Dans le cadre d'une machine BFS, les états « au repos » et « en activité » peuvent être définis de la façon suivante [9] :

- « au repos » : La machine est à l'arrêt mais avec la douche d'air stérile et la ventilation de la salle de remplissage en fonctionnement. L'extrudeuse est en chauffe mais n'est pas fonctionnelle et le chariot de transfert des moules (pour les machines alternatives uniquement) est en attente. Aucun personnel n'est présent dans la salle de remplissage.
- « en activité » : la machine est entièrement opérationnelle et en cours de remplissage, avec le nombre de personnes présentes autorisé dans des conditions normales de fonctionnement.

En raison de la génération de particules provenant du processus d'extrusion et de la coupe de la paraison (machine alternative), ainsi que de la taille restreinte des zones de remplissage, la surveillance des particules totales des machines BFS « en activité » n'est pas requise [2].

a. Surveillance environnementale d'une machine alternative

La surveillance environnementale d'une machine alternative doit prendre en compte la douche d'air stérile et la « zone de protection » (Figure 5).

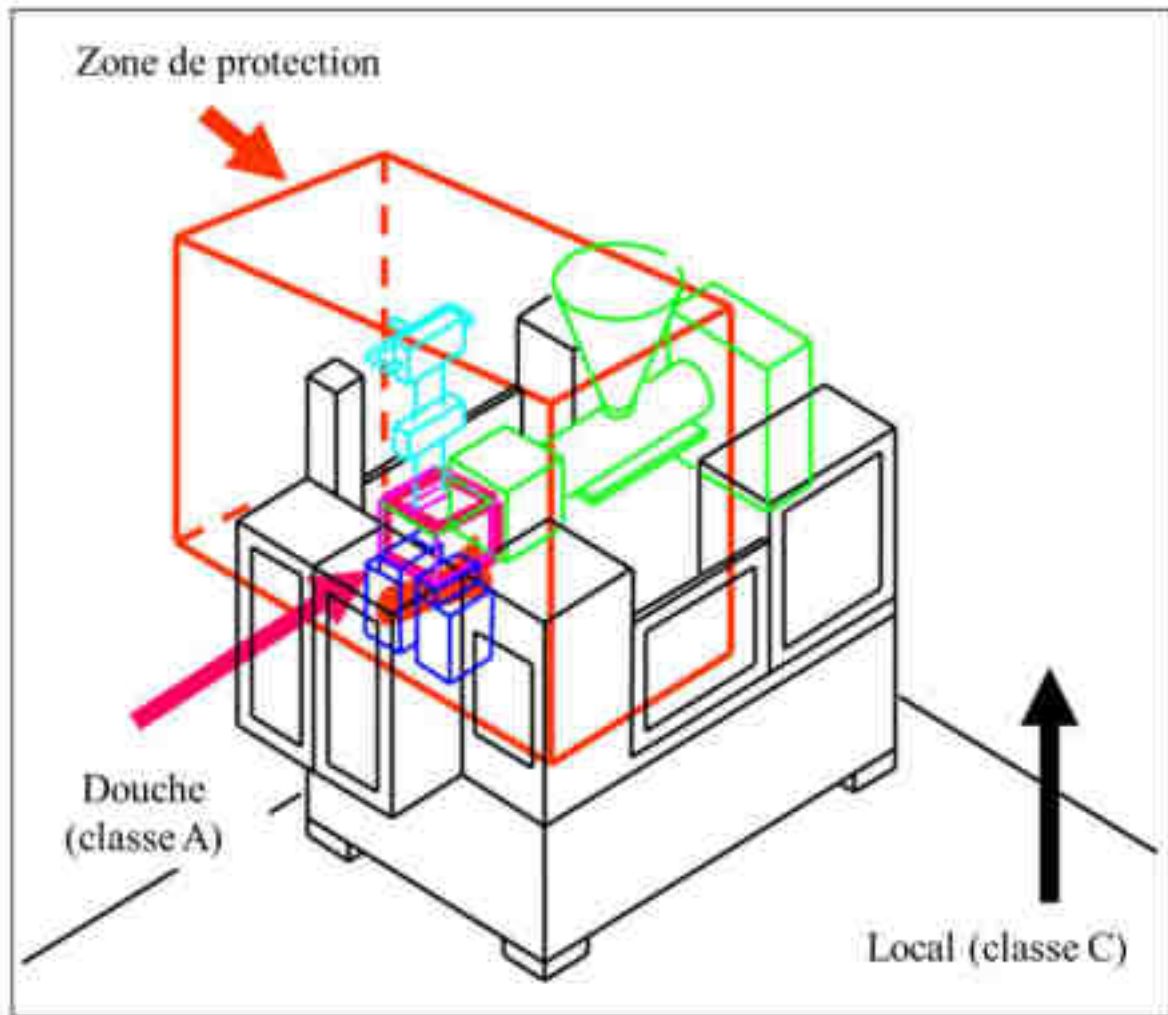


Figure 5 : Niveaux de contrôle environnemental possibles pour une machine alternative

Pour les machines alternatives, la zone située entre la coupe de la paraison et le scellage des doses peut être considérée comme une « zone de protection » [9]. Des filtres à air à haute efficacité HEPA sont installés au-dessus de la machine pour permettre des conditions environnementales de classe A lors du formage et du scellage des doses.

Des tests de fumée peuvent être envisagés pour visualiser les flux d'air et démontrer que l'air ambiant de la salle de remplissage ne pénètre pas dans la « zone de protection » de la machine.

Le contrôle de la qualité de l'air dans cette zone est réalisé à l'aide de prélèvements de particules non-viables et viables en suspension dans l'air et à l'aide de boîtes de sédimentation.

Les prélèvements sont réalisés à la même hauteur que la zone de coupe et au niveau du chariot de transfert sous la tête d'extrusion. Cette zone est la plus proche possible de la zone critique. La zone critique est située à l'intérieur de la paraison de polyéthylène mais il n'est pas possible d'effectuer un prélèvement de cette zone [9].

Pour des raisons de sécurité, la zone de découpe de la paraison n'est pas accessible pendant le remplissage. Les prélèvements dans cette zone sont effectués « au repos » lors de la qualification initiale de la machine et dans le cadre des requalifications périodiques afin de démontrer que la conception de l'équipement garantit un environnement de classe A conformément à l'Annexe 1 [2].

Une machine alternative est équipée d'une douche d'air stérile assurant un environnement de classe A au niveau de la zone de remplissage. Le flux d'air stérile qui circule dans la douche permet le maintien de la stérilité de la douche et des injecteurs (Figure 6). La douche d'air stérile est maintenue en suppression par rapport à la salle de remplissage (au moins 10 Pa) et est monitorée en continu.

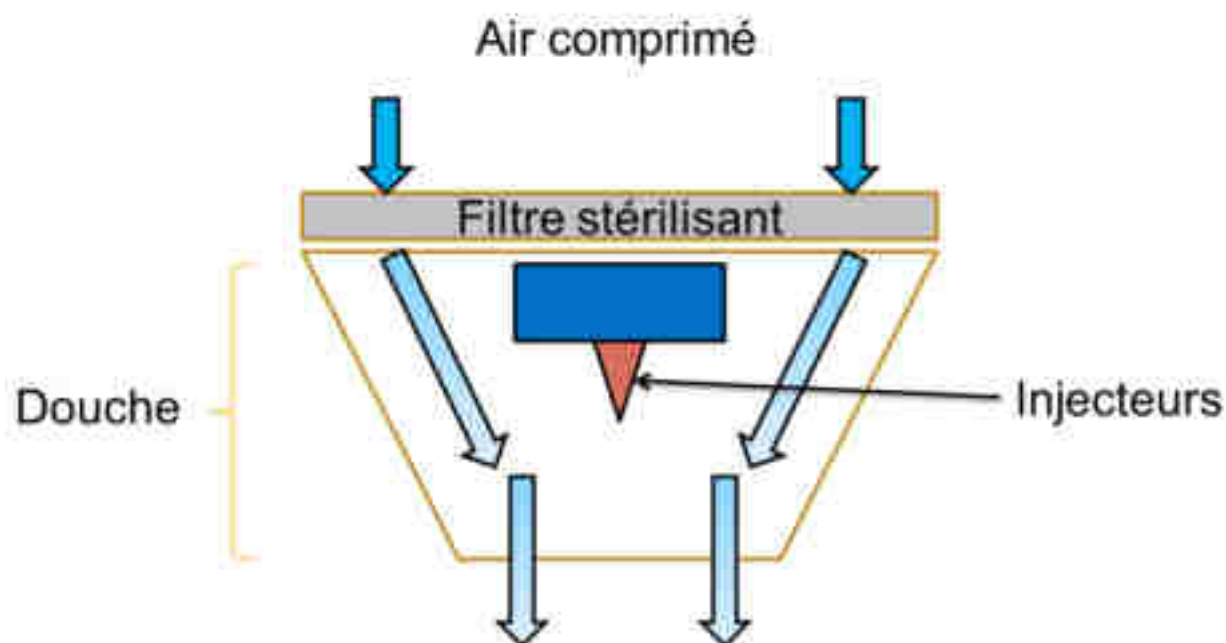


Figure 6 - Schéma d'une douche d'air stérile (machine alternative)

La qualification et les contrôles de routine permettent de vérifier la qualité de l'air dans cette zone. Pour la surveillance microbiologique et particulaire, la douche d'air stérile est généralement équipée d'une sonde pour la surveillance des particules totales et d'une sonde pour la surveillance des particules viables en suspension dans l'air.

Les points d'échantillonnage sont déterminés de manière à être représentatifs, autant que possible, de l'air présent autour des épines de remplissage. En effet, si les échantillons ne sont pas prélevés près du récipient ouvert au niveau du point de remplissage, ils ne seront pas représentatifs de l'air présent autour de l'unité ouverte.

Selon l'Annexe 1, les compteurs de particules doivent être équipés de tubes de prélèvements d'une longueur inférieure à 1 mètre et avec un nombre de coudes limité car les particules peuvent sédimenter dans les tubes de prélèvements longs et dans les coudes [2].

Dans le cas des machines BFS, il n'est techniquement pas possible d'avoir une longueur de tube de prélèvements inférieure à 1 mètre. En effet, la distance entre l'emplacement de la sonde (à l'intérieur de la douche) et les compteurs de particules (à l'extérieur de la machine) est supérieure à 1 mètre, mais :

- les compteurs de particules sont installés le plus près possible de la douche d'air stérile et la longueur des tubes est réduite au maximum ;
- le nombre de particules dans la douche est vérifié en continu et le dépassement des seuils d'alerte/d'action sont détectés par le système.

Un prélèvement de surface à l'aide d'une gélose de contact peut être réalisé sur la paroi interne de la douche mais uniquement à la fin du remplissage du lot car la douche est maintenue fermée pendant la production.

b. Surveillance environnementale d'une machine rotative

Comme précisé dans l'Annexe 1, il n'est pas possible d'effectuer un contrôle continu des particules viables et non viables pour les machines rotatives [2]. La paraison étant un système clos entourant les injecteurs, l'intrusion d'équipement de mesure ou de prélèvement dans la paraison pourrait interférer avec le flux d'air stérile et, par conséquent, pourrait modifier la vitesse et la direction du flux d'air entraînant l'effondrement de la paraison sur les injecteurs [9].

La surveillance environnementale de la machine en routine ne peut être assurée que par la réalisation de prélèvements avant le début du remplissage et après la fin du remplissage. Cependant, ces échantillons d'air prélevés ne fourniront pas de données significatives car l'environnement de remplissage cesse d'exister lorsque que le processus d'extrusion s'arrête à la fin du lot [9].

Par conséquent, la surveillance microbiologique de l'air et des surfaces n'est effectuée que dans la salle propre environnante pendant le remplissage.

Afin de démontrer que l'environnement de remplissage est de qualité appropriée, l'ensemble des éléments en faveur de l'assurance de stérilité du procédé doit être pris en considération :

- la surveillance des paramètres critiques au cours du lot ;
- le test d'intégrité du filtre du circuit de soufflage de la paraison ;
- la surveillance microbiologique du personnel ;
- le résultat des APS ;
- le contrôle de la biocharge des granulés de polymère, ...

7. Test d'intégrité des récipients

L'Annexe 1 exige que les contenants fermés par fusion, et notamment lors d'un procédé de formage/scellage, doivent faire l'objet d'un test d'intégrité à 100 % à l'aide de méthodes validées [2]. L'intégrité des récipients qui contiennent le produit joue un rôle important dans le maintien de la stérilité des produits stériles. En effet, la protection contre la contamination microbienne est assurée par le maintien de l'intégrité du récipient après le scellage du récipient [19]. La sélection de la méthode de détection de fuite la plus appropriée doit prendre en considération les points suivants :

- la capacité du système de test à détecter une fuite ;
- l'effet du produit sur le processus de détection de fuite (p. ex. les solutions salines concentrées peuvent cristalliser et obstruer un potentiel trou) ;
- la capacité de la méthode à détecter un changement (p. ex. un changement de pression) ;
- la potentielle perte de l'intégrité d'un récipient après son passage dans le détecteur de fuite.

La Pharmacopée américaine (USP) donne une vue d'ensemble des technologies permettant de tester l'intégrité des récipients [20] et les classes selon qu'elles soient déterministes ou probabilistes (tableau 5).

Tableau 5 : Méthodes de tests d'intégrité des récipients

Méthode déterministe	Méthode probabiliste
Conductivité électrique (HVLD)	Test d'immersion (challenge bactérien)
Analyse laser de l'espace de tête	Test d'immersion par pénétration d'un colorant
Extraction de masse	Emission de bulles
Variation de pression ou du vide	Détection de gaz traceur (test avec une sonde « renifleur »)
Détection de gaz traceur (test sous vide)	

Les technologies déterministes sont basées sur des mesures physico-chimiques et garantissent l'obtention de résultats reproductibles, quantifiables et avec une limite de détection connue. Alors que, les méthodes probabilistes sont basées sur un événement ayant une probabilité de se produire. Les résultats sont donc associés à des incertitudes. Les méthodes déterministes doivent être préférées aux méthodes probabilistes [20].

a. Détection par variation de pression ou du vide

La méthode la plus couramment utilisée pour la détection des fuites dans les récipients BFS est la méthode de détection par variation de pression ou du vide. Cette méthode non-destructive et quantitative permet de tester l'intégralité des unités produites.

Cette méthode de détection des fuites consiste à mesurer une variation de pression à l'intérieur d'une chambre d'essai à la suite d'une fuite de gaz ou de la vaporisation d'un liquide provenant d'un récipient non-intègre.

Cette méthode se base sur un échange de gaz entre une chambre d'essai et l'échantillon contrôlé. L'échantillon est placé dans une chambre d'essai qui est fermée hermétiquement. Une fois la chambre d'essai fermée, l'échantillon est exposé à une surpression/dépression appliquée à l'intérieur de la chambre pendant une durée prédéterminée.

Après une période de stabilisation, un différentiel de pression est mesuré à l'aide de capteur de pression. En cas de fuite, un échange gazeux se produit entre l'échantillon et la chambre d'essai, ce qui entraîne un changement de la pression permettant l'identification d'une fuite.

La détection des fuites est réalisée directement après l'étape de décarottage pour prévenir des anomalies liées au décarottage pouvant remettre en cause l'intégrité des doses (p. ex. l'écrasement des doses dans la matrice de décarottage) [21]. Les unités présentant une fuite sont alors éjectées de la ligne de production et mises au rebut.

b. Test d'immersion (challenge bactérien)

L'intégrité du contenant doit également être qualifiée dans le cadre de la qualification de la machine et/ou du moule. Les moules utilisés pour former les contenants doivent être considérés comme des équipements critiques et tout changement ou modification des moules doit donner lieu à une évaluation de l'intégrité des contenants de produits finis et, lorsque l'évaluation l'indique, doit être étayée par une validation [2].

Un test d'immersion (challenge bactérien) est généralement réalisé pour vérifier l'intégrité des récipients formés vis-à-vis d'une contamination extérieure éventuelle. Ce test est destructif et n'est normalement effectué que lors de la qualification initiale d'une machine ou d'un moule.

Ce test consiste à démontrer l'intégrité des unités remplies et scellées en les immergeant dans un bouillon de culture contenant une forte concentration de micro-organismes (p. ex. *Escherichia coli*). Ces unités sont ensuite incubées dans des conditions favorisant la croissance microbienne. Aucune unité contaminée ne doit être observée après la phase d'incubation.

Un protocole de test d'immersion peut se présenter de la façon suivante :

- des unidoses intègres (non percées) et remplies d'un milieu nutritif sont prélevées lors d'une APS. Le nombre d'unidoses testées doit être établi de façon à être représentatif de chaque épine de remplissage et de chaque moule.
- des unidoses supplémentaires sont également prélevées pour la réalisation des témoins négatifs et positifs. Pour les témoins positifs, les doses sont percées à l'aide d'une aiguille stérile. Les témoins négatifs correspondent à des unidoses non percées.
- les doses testées et les témoins positifs sont ensuite immergés, dans un bouillon de culture contenant une forte concentration bactérienne, avec la tête de la dose vers le bas. La mise sous vide ou sous pression au cours de ce test peut s'avérer nécessaire pour maintenir les échantillons immergés dans le bouillon de culture contaminé.
- les doses testées ainsi que les témoins négatifs et positifs sont incubés à des conditions de temps et de température suffisantes pour permettre la croissance bactérienne.
- à la fin de la période d'incubation, l'ensemble des doses testées et des témoins doit être inspecté visuellement. Un pouvoir de fertilité et une identification du germe de référence sur les témoins négatifs sont également réalisés.

Le test est considéré comme conforme si les conditions ci-dessous sont respectées :

- l'ensemble des doses testées soumis à l'immersion ne présente aucune contamination après incubation : absence de pousse microbienne visible ;
- l'ensemble des témoins positifs doit montrer une croissance du micro-organisme de référence (identification par coloration Gram, oxydase et certains caractères biochimiques, ...) ;
- l'ensemble des témoins négatifs doit montrer l'absence de croissance ;
- le pouvoir de fertilité du milieu de culture doit être conforme.

IV. Mise en œuvre de la validation de procédé de fabrication aseptique

1. Documentation de validation

a. Plan de validation

Chaque procédé à valider doit faire l'objet d'un Plan de Validation (PV). Le PV est un document de synthèse qui décrit la méthode, les moyens et la stratégie de validation en lien avec le projet. Les documents de références participant à l'élaboration du PV sont le Cahier des Charges Utilisateur (CCU), la description détaillée du procédé à valider et l'analyse de risques.

Le PV est construit selon le même principe que le Plan Directeur de Validation (PDV). La structure d'un PDV est décrite dans l'annexe 15 des BPF [1] et se base notamment sur les recommandations du Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S) [22]. Les principes généraux de chaque chapitre sont décrits en *annexe 2* de cette thèse d'exercice.

Un plan de validation doit inclure au minimum les éléments suivants :

- la description du projet ;
- les documents de référence et les référentiels utilisés ;
- les rôles et les responsabilités de chaque service ;
- le périmètre de la validation lié au projet ;
- les activités de qualification et de validation à effectuer dans le cadre du projet ;
- les étapes clés du projet, la planification des activités et les livrables attendus ;
- la gestion des non-conformités et la gestion des modifications ;
- les conditions d'autorisation de mise en production.

b. Cahier des Charges Utilisateurs

Les BPF exigent que les spécifications concernant les équipements, les installations, les utilités ou les systèmes doivent être clairement définies dans un cahier des charges de l'utilisateur (CCU) et/ou une description fonctionnelle [1]. La rédaction du cahier des charges de l'utilisateur permet entre autres :

- d'indiquer clairement aux fournisseurs les attendus en termes d'installations, d'utilités ou /et d'équipements ;
- de décrire l'ensemble du matériel nécessaire au projet ;
- de définir les exigences particulières (choix des matériaux, ...);
- de lister les documents remis par le fournisseur (documents techniques, plans, schémas, ...).

Ainsi, le CCU constitue le document de départ de la validation et sert de point de référence tout au long du cycle de validation. La qualité de la validation est corrélée à la qualité de l'expression des besoins. Par conséquent, si les besoins ne sont pas correctement définis ou si la connaissance du procédé n'est pas suffisante, le projet et la validation ne peuvent pas être menés dans de bonnes conditions.

c. Description du procédé

La description du procédé a pour objectif de recenser chaque étape du procédé et de détailler toutes les opérations rattachées à chaque étape afin d'identifier les opérations à risque d'un point de vue assurance de stérilité et maîtrise de l'asepsie. La liste des opérations critiques et des situations à risques doit être la plus exhaustive possible.

Une opération critique est une opération qui, lorsqu'elle est exécutée, risque de rompre l'asepsie du procédé. Les opérations critiques sont nécessaires à la réalisation du procédé et peuvent être classées de la façon suivante [2] :

- une intervention de routine (ou inhérente) - Une opération qui fait partie intégrante du procédé aseptique et qui est nécessaire au montage, au fonctionnement de routine et/ou à la surveillance du procédé. Ces opérations sont requises par une procédure ou une instruction de travail pour l'exécution du procédé.

Exemple : Opérations de réglage et de pilotage du remplissage

- une intervention exceptionnelle (ou corrective) - Une opération qui est effectuée pour corriger ou ajuster un procédé aseptique pendant son exécution. Ces opérations peuvent ne pas se produire à une fréquence déterminée dans le cadre d'une production de routine.

Exemple : Remplacement d'un élément stérile de l'équipement

Chaque APS doit simuler l'ensemble des interventions de routine et peut inclure une ou plusieurs interventions exceptionnelles [2]. Les interventions exceptionnelles recensées l'année précédente doivent être simulées au moins une fois durant l'année en cours.

Une intervention non-simulée lors des APS n'est pas considérée comme validée et n'est donc pas autorisée en routine. Toutes les interventions autorisées en routine doivent être simulées lors des APS et à une fréquence représentative d'une production commerciale. Il est important de préciser que les APS ne doivent pas être utilisées pour justifier des mauvaises pratiques qui représentent des risques de contamination. Les interventions qui présentent un risque déraisonnable de contamination ne doivent pas être réalisées ni lors des APS, ni lors d'une production de routine.

Dans le cas d'un procédé BFS, il est important de préciser que l'intervention directe d'un opérateur avec le produit stérile ou avec des surfaces stériles en contact avec le produit n'est pas nécessaire pour la réalisation du procédé et n'est, de ce fait, jamais autorisée [9].

Une opération dans un procédé de remplissage BFS peut avoir lieu à trois niveaux : dans la salle de remplissage, dans la machine de remplissage ou dans les zones critiques de la machine [9]

De plus, une opération peut avoir lieu soit lorsque la machine est en fonctionnement (avec ou sans remplissage) ou lorsque la machine est arrêtée. En effet, le remplissage peut être arrêté en cours de lot sans perdre le statut stérile de la machine car les épines de remplissage sont protégées des contaminations extérieures :

- soit par le circuit d'air stérile assurant le soufflage de la paraison pour les machines rotatives. Lors du remplissage, la paraison est extrudée en continu et entoure les injecteurs qui montent et descendent en fonction du cycle de remplissage/formage de la dose. Lorsque le remplissage est arrêté, les injecteurs remontent dans la tête d'extrusion. Par conséquent, les injecteurs sont constamment protégés par un flux d'air stérile.
- soit par la douche d'air stérile pour les machines alternatives. Les injecteurs ne descendent uniquement que lors de la phase de remplissage. Lorsque la machine est arrêtée, les injecteurs se trouvent dans la douche d'air stérile et sont donc protégés par un flux d'air stérile.

Les conditions aseptiques sont donc maintenues en cas d'arrêt du remplissage. Cependant, une durée maximale d'arrêt du remplissage en conditions aseptiques doit être définie et validée lors de l'exercice de simulation aseptique.

Une fois que les conditions de remplissage sont appropriées, le remplissage peut reprendre. Si pour une quelconque raison, le remplissage ne peut pas être relancé dans la durée prévue et validée, la machine de remplissage doit être nettoyée et restérilisée avant de pouvoir redémarrer le remplissage.

d. Analyse de risques des procédés aseptiques

La rédaction de l'analyse de risque est le point de départ pour l'établissement de la stratégie de validation et de la réalisation des simulations. Elle permet de :

- définir des critères d'acceptation pour les contrôles mis en place ;
- établir les priorités entre les paramètres à simuler lors des APS ;
- déterminer et hiérarchiser les opérations exceptionnelles et les opérations de routine à simuler lors des APS ;
- déterminer les conditions « Worst-Case » à simuler lors de la réalisation des APS.

L'analyse de risque doit reprendre la liste des opérations pouvant être réalisées au cours d'un lot de production et doit tenir compte du risque de contamination du produit ou/et de l'environnement de production, et de la probabilité de détection de la contamination liée à chaque opération.

L'objectif est de rechercher comment le procédé pourrait mener à une non-conformité et les conséquences associées. La méthode AMDEC, appliquée à l'analyse des risques liés à un procédé de fabrication aseptique, consiste à :

- lister toutes les opérations pouvant intervenir durant le procédé ;
- identifier les causes possibles de dysfonctionnement et les conséquences associées à ces dysfonctionnements pour chaque opération ;
- déterminer la criticité du risque liée à la réalisation d'une opération et basée sur les critères de sévérité, d'occurrence et de probabilité de détection ;
- rechercher des actions à mettre en place pour réduire le risque de contamination (si possible) ;
- réévaluer la cotation de chaque risque suite à la mise en place d'actions préventives et/ou correctives.

La criticité de chaque risque, après réévaluation de la cotation, va permettre de déterminer si la réalisation d'une opération présente un risque pour la stérilité du produit ou pour l'environnement de production. Une opération présentant un risque aseptique doit alors être simulée lors des APS et à une fréquence représentative d'une production de routine [2].

Les risques associés à un procédé de remplissage BFS peuvent être classés de la façon suivante :

- risques liés à la mise en œuvre du procédé : montage des éléments du procédé (tuyauterie, vannes, filtre, ...), stérilisation de l'équipement, connexions aseptiques ...
- risques liés aux opérations de remplissage et au processus d'extrusion : réglage du volume de remplissage, réglage de l'épaisseur la paraison ...
- risques liés à la machine de remplissage : changement de format ...
- risques liés au personnel : rythme de travail des équipes, nombre d'opérateurs impliqués, activités dans l'environnement de production ...

Les entreprises doivent clairement définir et décrire dans leur procédure quelles sont les interventions qui nécessitent l'arrêt du remplissage, et/ou du processus d'extrusion, du moulage et du scellage et, si nécessaire une re-stérilisation de la machine de remplissage [9].

e. Protocole de validation

Comme pour chaque validation de procédé aseptique, un protocole de validation est rédigé selon la stratégie définie dans le plan de validation et fondé sur l'analyse des risques aseptiques. Le protocole doit être adapté aux spécificités du procédé, aux besoins et aux moyens disponibles.

Le protocole doit être revu et approuvé par le personnel compétent tel que défini dans le SQP avant de démarrer la validation [1]. Le protocole doit contenir, sans s'y limiter, les informations suivantes :

- une introduction / objectif ;
- la description du procédé à valider ;
- les prérequis nécessaires à la validation ;
- les conditions de réalisation de l'exercice d'APS incluant les conditions « worst-case » ;
- la liste des interventions et pratiques aseptiques à simuler ;
- le choix du volume de remplissage ;
- le choix du milieu de culture ;
- la taille de lot et la durée de la simulation ;
- les températures et les durées d'incubation ;
- les critères d'acceptation pour chaque étape de la validation ;
- la planification des simulations.

Le protocole peut être accompagné d'un dossier de lot avec des adaptations spécifiques à la réalisation des APS. Le dossier de lot regroupe l'ensemble des activités réalisées au cours de la simulation aseptique (Préparation du milieu de culture, remplissage, incubation, lecture, ...) selon les paramètres définis dans le protocole.

Toutes les interventions et les arrêts de ligne effectués pendant les simulations doivent être enregistrés dans le dossier de lot, en incluant le début et la fin de chaque intervention et de chaque arrêt [2].

Tout écart constaté doit être consigné dans le dossier de lot et fera l'objet d'une déviation pour évaluer l'impact sur le procédé aseptique. Ce document est complété en temps réel lors de la production (informations datées et signées).

Les APS sont réalisées dans des conditions défavorables (« Worst case ») par rapport à celles utilisées en routine dans le but de couvrir l'ensemble des pratiques [9].

Dans le cadre de l'introduction d'un procédé BFS, le programme de validation doit être effectué en utilisant la configuration la plus défavorable du procédé après avoir pris en considération les paramètres suivants :

- les interventions inhérentes et exceptionnelles ;
- la taille d'ouverture du récipient et le système de fermeture ;
- le temps d'ouverture des récipients avant remplissage ;
- la cadence de la machine ;
- la taille des récipients ;
- la taille de lot et la durée de remplissage ;
- les paramètres critiques des équipements et du procédé pouvant avoir un impact sur le procédé aseptique (p. ex. les paramètres du processus d'extrusion) ;
- la fatigue des opérateurs comme risque de contamination ;
- le nombre maximum de personnes présentes dans la salle lors du remplissage.

Les simulations de procédé aseptique devraient être effectuées pour chaque configuration du procédé et/ou pour chaque moule (format du moule, design du moule, ...). Cependant, il serait possible de simuler uniquement la configuration du procédé qui présente les conditions les plus défavorables. Cette approche est acceptable à la condition que les autres configurations du procédé présentent un risque aseptique identique ou inférieur à celui du procédé « worst-case » [9].

Dans le cas où cette approche est mise en œuvre, la simulation est réalisée avec la configuration du procédé la plus défavorable en tenant compte des paramètres suivants [9] :

- la durée de remplissage la plus longue ;
- l'ouverture du récipient la plus large ;
- la durée d'exposition du récipient ouvert la plus longue.

La validation doit également prendre en compte les temps d'attente qui présentent un risque de contamination pour le produit. Ces temps d'attente peuvent être différenciés en trois types :

- le temps d'attente du produit avant sa stérilisation ;
- le temps d'attente du produit stérile avant l'étape de remplissage ;
- le temps d'attente entre la stérilisation des équipements et leur utilisation.

Lors de l'exercice d'APS, ces durées sont poussées à leur maximum afin de valider/revalider des durées d'exposition maximales autorisées pour les produits et les équipements stériles pendant le procédé aseptique.

2. Déroulé d'une simulation de procédé aseptique

a. Le milieu de culture

Les APS sont réalisées avec un bouillon nutritif fertile permettant la croissance d'un large spectre de micro-organismes [23]. Le milieu de culture doit être compatible aux conditions de fabrication du produit. La Pharmacopée Européenne recommande [6] :

- un bouillon trypcase soja (BTS) pour les procédés en conditions aérobies ;
- un bouillon de thioglycolate (FTM) pour les procédés en conditions anaérobies.

Les milieux de culture sont préalablement irradiés pour empêcher tout risque de contaminations (notamment par les germes de type mycoplasme) pendant les simulations aseptiques [24].

La fertilité du milieu de culture utilisé lors des APS doit être testée avant utilisation. Le milieu de culture doit permettre la croissance d'un large spectre de microorganismes de référence tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne et de micro-organismes isolés localement sur le site de production [2] :

- des germes d'origine humaine (p. ex. *Staphylococcus aureus*) ;
- des germes de l'environnement de l'eau (p. ex. *Pseudomonas aeruginosa*) ;
- des germes de l'environnement sporulant (p. ex. *Bacillus subtilis*) ;
- des moisissures et des levures (p. ex. *Aspergillus brasiliensis* / *Candida albicans*).

La fertilité du milieu de culture doit être également testée après utilisation afin de démontrer que les conditions de développement des micro-organismes sont préservées tout au long du procédé [24].

Ce test est réalisé sur des unités remplies avec du milieu de culture à la fin de la période d'incubation dans le but de confirmer la capacité du milieu à maintenir une potentielle croissance microbienne en cas de contamination [24]. La croissance microbienne peut être démontrée dans les 5 jours aux mêmes températures d'incubation que celles utilisées lors de l'exécution des APS.

Lors des simulations aseptiques, le milieu de culture est exposé aux mêmes équipements pour simuler le plus fidèlement le procédé classique de fabrication d'un lot commercial.

L'utilisation d'un milieu de culture sur une ligne de fabrication doit être suivie d'un nettoyage validé avant de démarrer la fabrication d'un produit.

b. Vitesse et volume de remplissage

En règle générale, la vitesse de la ligne utilisée lors des simulations aseptiques correspond à la vitesse de la ligne pour des lots de routine. Dans le cas d'une ligne à cadence machine multiple, l'utilisation d'une vitesse plus lente pourrait représenter une condition « worst-case » car la durée d'exposition du

réceptif ouvert serait plus longue [24]. L'utilisation d'une vitesse élevée serait appropriée pour évaluer des perturbations aérauliques au sein de la machine de remplissage. Le choix de la vitesse de ligne doit se baser sur l'évaluation des risques.

Quel que soit le format du contenant, il est recommandé de remplir les unités à moitié afin de garantir un volume d'air suffisant pour permettre la croissance des germes potentiellement présents dans le milieu de culture et pour permettre le contact avec toutes les surfaces internes de la dose [24]. Avant l'étape d'incubation, les doses sont manipulées, par retournement ou par agitation, afin de s'assurer que toute la surface interne du contenant a été en contact avec le milieu de culture [2].

Le volume de remplissage dépend du format de la dose et est contrôlé visuellement en utilisant un gabarit approprié selon les instructions de production (Figure 7).

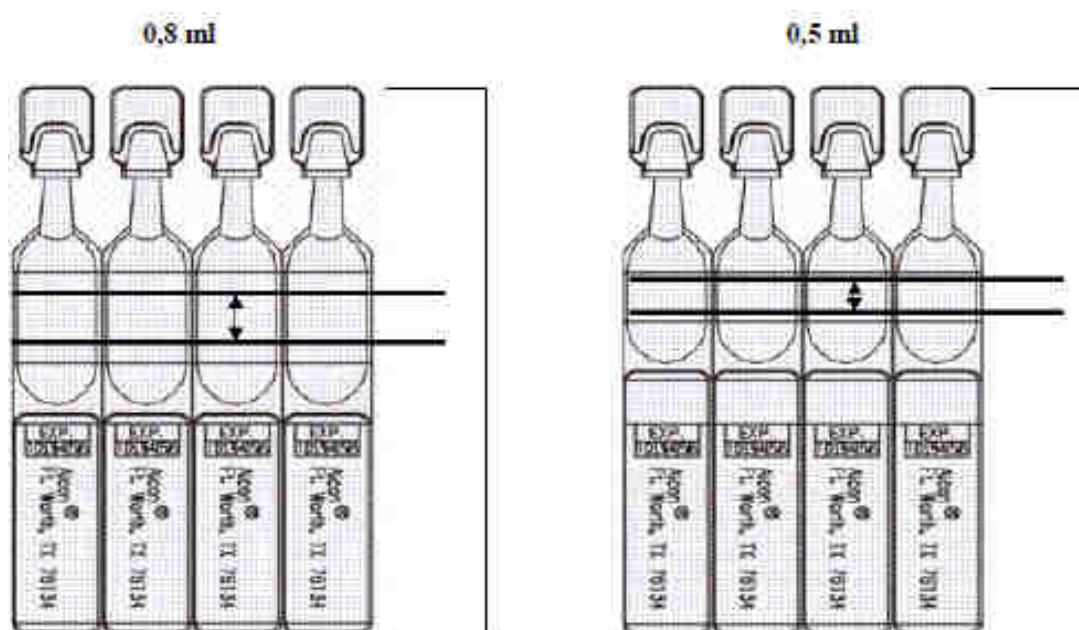


Figure 7 : Exemple de gabarit pour le contrôle du volume (Recipharm Kayzersberg Pharmaceuticals)

Lors des simulations aseptiques, une résine de polymère avec une opacité appropriée doit être utilisée pour assurer la détection visuelle de doses potentiellement contaminées.

c. Durée et taille de lot

La durée de l'exercice d'APS et le nombre d'unités remplies doivent être suffisants pour simuler toutes les activités de production et être représentatifs du procédé de fabrication [2].

Les simulations aseptiques sont réalisées sur les différentes équipes concernées et tous les rythmes de travail (matin, après-midi et nuit) doivent être évalués [23]. Le travail de nuit est à valider tout particulièrement, compte tenu de la fatigue des opérateurs et des contraintes physiques.

Il est généralement recommandé de remplir un minimum de 5000 à 10 000 unités lors des simulations aseptiques. Pour les petits lots, c'est-à-dire inférieurs à 5000 unités, le nombre d'unités remplies doit être au moins égal à la taille du lot de production [2].

Les procédés BFS sont particulièrement adaptés pour remplir des produits avec de grandes tailles de lots et de longues durées de remplissages [21]. Bien qu'il soit acceptable réglementairement de remplir un minimum de 5 000 unités, il convient également de tenir compte de la cadence élevée des machines BFS. En effet, l'intérêt des machines BFS est de produire un grand nombre d'unités en une seule fois et dans un court laps de temps [9].

De ce fait, il est très courant de remplir plus de 10 000 unités pour que la simulation soit représentative d'une production de routine pouvant s'étaler sur plusieurs jours. Le choix du nombre d'unités remplies lors des APS doit être clairement justifié dans le CCS.

Il a été démontré que les procédés BFS fonctionnent avec succès sur des durées de remplissage prolongées (plus de 48 heures) sans qu'il soit nécessaire de remplir les unités en continu. Il est possible de maintenir le milieu de culture au niveau des épines de remplissage, et de ne pas remplir pendant des périodes intermédiaires tout au long de la période de remplissage [25].

Si toutes les interventions sont réalisées au cours d'une équipe, le remplissage peut être suspendu jusqu'au début de l'équipe suivante. La machine de remplissage peut donc être inactive pendant plusieurs heures. Cette approche permet d'évaluer l'ensemble du procédé aseptique mais de limiter le nombre d'unités produites.

d. Opérations simulées lors des APS

Préambule : Cette liste d'opérations ne prétend pas être exhaustive. Elle présente simplement des exemples que l'on pourrait retrouver dans des simulations de procédé aseptique.

Démontage du collecteur de condensats

Lors de la stérilisation de la machine de remplissage, un dispositif de collecte de condensats de vapeur est installé sur les injecteurs (Figure 8). Ce dispositif est ensuite retiré des injecteurs manuellement par un opérateur après la stérilisation et le séchage de la machine.

Cette opération peut présenter un risque aseptique pour les machines les plus anciennes car un ou plusieurs injecteurs stériles peuvent être contaminés par une partie non-stérile du collecteur de condensat ou par l'opérateur lui-même lors du démontage.

Pour les machines les plus récentes, cette opération ne présente pas de risque car les injecteurs remontent soit dans la douche d'air stérile (machine alternative) ou soit dans la tête d'extrusion (machine rotative) avant de réaliser le retrait du collecteur de condensats. Dans tous les cas, cette opération est réalisée systématiquement lors des APS car elle fait partie de la mise en fonctionnement de la machine de remplissage.



Figure 8 : Exemple de collecteur de condensats

Nettoyage externe des cônes d'extrusion (machine alternative)

Cette opération est réalisée à titre préventif suite au démarrage de l'extrudeuse et consiste à retirer les résidus de matière plastique de la surface externe du cône d'extrusion avec une brosse métallique. Cette opération peut également être réalisée à titre curatif en cas de nécessité durant le remplissage d'un lot commercial.

Il s'agit d'une opération sans impact direct sur le procédé aseptique car le cône d'extrusion est une partie non stérile de l'équipement. De plus, lors du redémarrage de l'extrusion, la durée d'extrusion avant production ainsi que la température élevée du cône permettent l'élimination d'éventuelles contaminations.

Réglage de l'orientation de la paraison

L'orientation de la paraison se fait par l'intermédiaire de vis de réglage situées au niveau de l'extrudeuse. Le cône est vissé sur un axe qui reste fixe et ne bouge pas lors du réglage de l'orientation de la paraison. Seul le contre-cône est fixé sur un cylindre mobile et va bouger en fonction de la pression et du serrage appliqués par l'opérateur sur les vis de réglage.

La mauvaise orientation de la paraison peut induire des doses malformées. Cette opération est systématiquement réalisée au démarrage de la machine de remplissage et peut être effectuée au cours d'une production commerciale en arrêtant momentanément le remplissage.

Réglage de l'épaisseur de la paraison

L'épaisseur de la paroi du récipient formé est considérée comme un attribut de qualité critique, car l'épaisseur de la paroi peut avoir un impact sur l'intégrité du système de fermeture du récipient, sur la durée de conservation du produit ou encore sur la fonctionnalité du récipient (difficulté d'ouverture, compressibilité nécessaire à une bonne délivrance du produit). Ainsi, des limites supérieure et inférieure d'épaisseur de paroi pour le récipient sont définies pour chaque type de récipient.

Le réglage de l'épaisseur de la paraison est réalisé par l'opérateur à l'aide de vis de réglage au niveau de l'extrudeuse en agissant sur l'espace entre le cône et le contre-cône d'extrusion.

Changement de liston de format et/ou de gravage (machine alternative)

Le démontage complet de l'ensemble des moules nécessite du temps et une ergonomie de travail difficilement compatible avec un procédé aseptique. Cette opération consiste à intervenir sur des composants mécaniques et hydrauliques au niveau de la machine de remplissage ne permettant plus de garantir des conditions de production aseptiques (p. ex. risque de projection de liquide de refroidissement sur les injecteurs...).

Cependant, il est possible de changer en cours de production les listons de gravage et/ou de format pour répondre aux besoins spécifiques de la production. Lors d'un changement de liston, le remplissage est arrêté. Le charriot de transfert se trouve dans la zone de remplissage avec les moules ouverts et les injecteurs sont remontés et protégés par la douche d'air stérile.

Cette opération ne nécessite aucune intrusion dans une zone de classe A. Ces éléments amovibles sont situés dans la partie inférieure du corps de moule et sont fixés à l'aide de vis.

Purge du produit avec un bac de récupération

Cette opération permet d'éliminer le gaz résiduel présent dans le circuit en contact avec le produit et donc d'éviter la production de doses sous-remplies. Cette opération permet également d'éviter de boucher les épines en cas d'arrêt prolongé du remplissage.

Pour réaliser cette opération, l'opérateur installe un bac de récupération en-dessous des injecteurs et va ensuite purger le produit dans le bac. Le risque associé à cette opération est d'appliquer une pression trop élevée lors de la purge et donc de contaminer les injecteurs par projection de produit.

Lors de la purge du produit, les injecteurs sont généralement protégés par la douche d'air stérile (machine alternative) ou par la tête d'extrusion (machine rotative).

Réglage de la pression de la cuve de stockage ou de la cuve tampon

Cette opération consiste à régler la pression de la cuve de stockage ou de la cuve tampon de la machine pour permettre un remplissage optimal. Ce réglage est une opération réalisée au démarrage de la machine de remplissage et ne présente pas de risque aseptique pour le produit car l'opérateur intervient en dehors de la zone critique de la machine.

e. Incubation des doses

Les unités remplies avec du bouillon de culture sont d'abord contrôlées visuellement puis elles sont passées au détecteur de fuite pour éliminer les unités qui présentent un défaut d'intégrité avant d'être mises en incubation. Les unités non-intègres ont une forte probabilité de développer une croissance microbienne après incubation et sont donc mises au rebut lors d'une simulation de procédé aseptique car elles seraient également mises en rebut pour un lot de routine.

Toute dose rebutée doit être justifiée dans le dossier de lot et est comptabilisée afin de n'écarter aucune unité potentiellement contaminée sans motif valable et d'assurer une bonne réconciliation de l'ensemble des unités produites lors de l'exercice d'APS.

Les unités incubées sont les doses intègres dont les caractéristiques permettront d'identifier, de façon certaine, une éventuelle contamination après incubation. Ces doses seront lues et comptabilisées comme étant représentatives du procédé. Une dose présentant des défauts esthétiques doit être incubée et lue [2] car elle ne remet pas en cause la stérilité du produit.

Les doses intègres dont les caractéristiques ne permettront pas d'identifier, de façon certaine, une éventuelle contamination après incubation seront également lues mais comptabilisées comme n'étant pas représentatives du procédé (p. ex. : les doses sur-remplies ou sous-remplies).

Les conditions d'incubation choisies doivent être basées sur la capacité à permettre la croissance des micro-organismes normalement présents dans l'environnement de production ou dans la charge biologique du produit [24].

Les germes principalement retrouvés dans l'environnement de production sont des germes d'origine humaine (p. ex. coques Gram positif) et de l'environnement (p. ex. bacilles Gram positif et germes sporulants). Les germes retrouvés dans les produits sont principalement des germes d'origine environnementale et des germes de l'eau (bacilles Gram positifs et bacilles Gram négatif).

La Food and Drug Administration (FDA) recommande les conditions d'incubation suivantes [26] :

- la température d'incubation ne doit jamais se situer en dehors de l'intervalle de température 20 - 35°C ;
- la durée d'incubation ne doit pas être inférieure à 14 jours. Si deux températures sont utilisées pour l'incubation, les unités doivent être incubées pendant au moins 7 jours à chaque température (en commençant par la température la plus basse).

Les conditions d'incubation utilisées sont généralement de 20-25°C pendant sept jours minimum puis de 30-35°C pendant au minimum sept jours supplémentaires. L'utilisation d'une combinaison de deux plages de températures permet de favoriser le développement d'un large spectre de micro-organismes présents dans l'environnement de production pharmaceutique :

- les germes d'origine humaine qui ont une température optimale de croissance située entre 30-35°C.
- les moisissures et les levures environnementales qui ont une température optimale de croissance située entre 20-25°C.

f. Lecture des unités incubées

La lecture consiste à rechercher la présence d'une turbidité dans le milieu de culture après 14 jours d'incubation, ce qui met en évidence une croissance microbiologique. Une ou plusieurs lectures intermédiaires facultatives sont possibles entre 5 et 10 jours d'incubation, notamment en cas d'intervention à haut risque aseptique.

Avant de débiter la lecture finale, la personne en charge de la lecture des doses s'assure que les deux phases d'incubation (durée et température) ont bien été respectées. L'ensemble des unités incubées doit être lu.

La lecture des unités est assurée par des opérateurs qualifiés à l'inspection visuelle et selon une procédure opérationnelle normalisée détaillant les conditions d'inspection :

- le temps minimum requis pour l'inspection de l'unité par l'opérateur ;
- l'utilisation d'une salle d'inspection, de lampes d'inspection, de loupes d'inspection ;
- la position de l'opérateur (assis ou debout) et la position des unités inspectées par rapport au plan de travail ;
- l'intensité lumineuse de la zone ou de la salle d'inspection vérifiée à chaque lecture à l'aide d'un luxmètre, la couleur de la plaque de fond utilisée (blanc ou noir).

La qualification des opérateurs à la lecture se fait à l'aide de doses contenant du milieu de culture stérile artificiellement contaminées par des germes de l'environnement retrouvés sur le site de production et des souches bactériennes de référence (p. ex. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, ...). Les opérateurs qualifiés doivent être capables de détecter à la fois un faible et un haut niveau de contamination microbienne [24].

g. Réconciliation

Toutes les doses produites lors de l'exercice d'APS doivent être comptabilisées qu'elles soient intègres et incubées ou qu'elles soient non-intègres et mises au rebut.

La réconciliation consiste à s'assurer qu'aucune unité produite n'a été écartée lors des différentes étapes du procédé (unités remplies, incubées et non-incubées) [2]. Il est convenu que toute unité manquante soit considérée comme potentiellement contaminée.

Cette réconciliation doit être réalisée à chaque étape du procédé et permet de vérifier :

- le nombre d'unités produites à l'étape de remplissage ;
- le nombre d'unités mises en chambre d'incubation ;
- le nombre de d'unités inspectées lors de la lecture.

La réconciliation est documentée dans le dossier de lot. Tout écart sur la réconciliation des unités doit faire l'objet d'une investigation pour déterminer l'origine de cet écart et de son impact sur la validité de l'APS [24].

3. Résultats

A l'issue de la mise en œuvre du protocole de validation, les résultats et la conclusion de la validation doivent être documentés dans un rapport. L'objectif du rapport de validation est de :

- compiler l'ensemble des données et des paramètres enregistrés lors de la simulation aseptique et relatifs à son déroulement ;
- retranscrire les résultats de la validation et les confronter aux critères d'acceptation définis dans le protocole de validation ;
- résumer les déviations et statuer sur leur impact relatif à l'exercice de validation ;
- résumer les changements en cours de validation (si applicable) et évaluer l'impact de ces changements sur la validation ;
- faciliter la recherche dans les données brutes ;
- conclure sur la conformité de l'exercice de validation.

Avant la révision de l'Annexe 1, l'objectif des APS était de « zéro contenant ayant une contamination microbiologique » [1] et les résultats étaient interprétés en appliquant les règles indiquées dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : Interprétation des résultats

Nombre d'unités remplies	Nombre d'unité contaminée	Action
< 5 000	≥ 1	Investigation, mesures correctives, redémarrage de la validation
5 000 à 10 000	1	Investigation ¹ , considération d'une simulation supplémentaire
	> 1	Investigation, mesures correctives, redémarrage de la validation
> 10 000	1	Investigation ¹
	> 1	Investigation, mesures correctives, redémarrage de la validation

¹ Redémarrage de la validation lorsque l'investigation ne permet pas d'identifier la cause racine de la contamination.

Selon la nouvelle Annexe 1, les résultats attendus est l'absence de croissance microbiologique. La moindre unité contaminée n'est plus tolérée et cela quel que soit la taille du lot [2]. Par conséquent, les différentes considérations liées à la taille de lot de la simulation du procédé ne devraient plus s'appliquer.

Toute unité contaminée doit conduire à une investigation pour déterminer les causes racines de la défaillance les plus probables et à la réalisation d'un nombre suffisant d'APS consécutives et conformes (normalement un minimum de trois) afin de démontrer que le procédé est sous contrôle [2].

L'invalidation d'une APS est une mesure très rare. Les résultats pourraient être invalidés en cas de :

- durées et/ou températures d'incubation non respectées ;
- écarts de réconciliation ;
- contamination initiale du milieu de culture (à la réception) ;
- test du pouvoir de fertilité du milieu de culture non-conforme sur les souches de référence de la Pharmacopée Européenne et/ou sur les souches isolées dans l'environnement.

L'approbation du rapport de validation atteste de la capacité du procédé à être aseptique et autorise son utilisation pour des productions de routine.

Les APS de requalification périodique ont un impact à la fois sur les produits déjà fabriqués et sur les produits qui seront fabriqués ultérieurement. En cas de non-conformité, une investigation et des actions correctives adaptées doivent être mises en place :

- blocage de la production et mise en quarantaine des lots produits depuis la dernière APS conforme et jusqu'à ce qu'une résolution satisfaisante ait eu lieu ;
- rappel de lots et revalidation pour démontrer que le procédé est de nouveau dans un état de contrôle.

La production de routine ne doit reprendre qu'après la réalisation d'une revalidation conforme. En cas de résultat non-conforme attribuable à un opérateur, des mesures doivent être prises pour limiter ses activités jusqu'à ce que l'opérateur soit reformé et requalifié [2].

En cas d'arrêt d'un procédé de fabrication, une APS sera réalisée avant l'arrêt définitif du procédé dans le but de couvrir toute la période d'activité du procédé et donc de statuer sur la conformité de toutes les unités remplies.

V. Conclusion

Les procédés aseptiques jouent un rôle important pour assurer la stérilité des produits qui ne peuvent pas être stérilisés dans leur récipient définitif. Un procédé BFS est un procédé hautement automatisé et qui ne nécessite que très peu d'intervention humaine lors de l'exécution du procédé. De ce fait, cette technologie permet de garantir un haut niveau d'assurance de stérilité et d'offrir une alternative intéressante aux techniques de remplissage aseptique conventionnel.

L'objectif de la simulation du procédé aseptique est d'évaluer la probabilité de contamination microbienne du produit au cours du procédé de fabrication aseptique. La simulation du procédé aseptique doit intégrer les facteurs de risque de contamination qui peuvent se produire sur une ligne de production et évaluer avec précision l'état du contrôle du procédé.

Les APS doivent reproduire aussi fidèlement que possible le procédé de fabrication en incorporant les conditions les plus défavorables et les interventions représentatives du procédé. L'utilisation d'outil de gestion des risques est un élément essentiel dans l'élaboration de la stratégie de validation.

La simulation de procédé n'est qu'un maillon d'une longue chaîne de précautions et de contrôles qui conduiront à l'obtention d'un produit stérile et répondant aux critères de qualité, de sécurité et d'efficacité pour le patient.

Ainsi, l'exercice d'APS ne peut être réalisé seulement après les différentes étapes de qualification et de validation de procédé qui auront permis de démontrer la maîtrise de l'asepsie tout au long du procédé de fabrication.

Chaque modification apportée dans le procédé de fabrication et/ou dans les procédés transverses (stérilisation, filtration, ...) doit être évaluée. La revalidation du procédé ou la réalisation d'APS supplémentaires doivent être considérées selon l'impact de la modification.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANSM, Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), 2019
- [2] European Commission, Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines, Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products, 2022
- [3] EMA / PIC/S, Concept paper on the revision of annex 1 of the guidelines on good manufacturing practice – manufacture of sterile medicinal products, 2015
- [4] EMA, ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system, 2008
- [5] EMA, ICH guideline Q9 (R1) on quality risk management, 2023
- [6] Conseil de l'Europe, Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.), 11^{ème} édition, 2023
- [7] ISO13408-2, Traitement aseptique des produits de santé - Partie 2: Filtration stérilisante, 2018
- [8] EMA, Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container, 2019
- [9] PDA, Technical Report No. 77 (TR 77) The Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Using Blow-Fill-Seal Technology, 2017
- [10] FDA, Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices, 2011
- [11] EMA, Guideline on development pharmaceuticals for veterinary medicinal products, 2022
- [12] PDA, Technical Report No. 26 (TR 26) Sterilizing Filtration of Liquids, 2008
- [13] ISO17665-1, Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide - Partie 1: Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux, 2006
- [14] ISO17665-2, Stérilisation des produits de santé - Chaleur humide - Partie 2: Directives relatives à l'application de l'ISO 17665-1, 2009
- [15] Leo F, Poisson P, Sinclair C.S et Tallentire A, Evaluation of Blow/Fill/Seal Extrusion through Processing Polymer Contaminated with Bacterial Spores and Endotoxin, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, mai 2004 ; vol 58(3):p.147-158
- [16] Birch C.J et Sinclair C.S, Blow-Fill-Seal Extrusion of Spore Contaminated Polymer: An exploratory study, BFS News, BFS Operators Association, 1998

- [17] ISO 14644-1, Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 1: Classification de la propreté particulaire de l'air, 2015
- [18] ISO 14644-2, Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 2: Surveillance du maintien des performances de la salle propre pour la propreté particulaire de l'air, 2015
- [19] FDA, Guidance for Industry Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics, 1999
- [20] US Pharmacopeia (USP), Package integrity evaluation – Sterile products, USP <1207>, Rockville MD, United States Pharmacopoeial Convention, 2017
- [21] ISPE, Baseline Guide: Volume 3 - Sterile Product Manufacturing Facilities, 3rd Edition, 2018
- [22] Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S), PI 006-3, Recommendations on validation master plan installation and operational qualification non-sterile process validation cleaning validation, 2007
- [23] Pharmaceutical Inspection Co-opération Scheme (PIC/S), PI 007-6, Recommendation on the validation of aseptic processes, 2011
- [24] PDA, Technical Report No. 22 (TR 22) Process Simulation for Aseptically Filled Products, 2011
- [25] Ljungqvist B, Reinmüller B, Löfgren A et Dewhurst E, Current Practice in the Operation and Validation of Aseptic Blow-Fill-Seal Processes, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology juill 2006 ; vol 60(4):p.254-258
- [26] FDA, Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, 2004

ANNEXE 1 : Structure de la nouvelle Annexe 1 des GMP européennes

Chapitre	Présentation générale
1. Domaine d'application	L'Annexe 1 s'applique aux principes actifs, excipients, articles de conditionnement et produits finis stériles, mais est également applicable à d'autres produits qui ne sont pas destinés à être stériles pour lesquels la réduction et le contrôle de la contamination microbienne, particulaire et pyrogènes sont jugés importants.
2. Principe	Ce chapitre reprend les principes généraux appliqués à la fabrication de médicaments stériles et exige la nécessité de mettre en place une stratégie de contrôle de la contamination (CCS) pour minimiser les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène.
3. Système Qualité Pharmaceutique	<p>Le Système Qualité Pharmaceutique (SQP) doit avoir un système efficace de la gestion des risques qualité tout au long du cycle de vie du produit.</p> <p>Le SQP doit également inclure un processus d'enquête en cas d'écart par rapport au système ou de non-conformité en afin d'évaluer l'impact sur le procédé et le produit.</p>
4. Locaux	<p>L'Annexe 1 fait référence à la norme ISO14644 avec pour la classification des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) et à l'Annexe 15 des BPF pour la qualification des ZAC.</p> <p>Les exigences spécifiques aux technologies barrières (isolateurs, RABS) sont également clarifiées.</p>
5. Matériel	Il s'agit des exigences sur la conception et le fonctionnement des équipements.
6. Utilités	<p>Ce chapitre concerne les exigences applicables aux systèmes de distribution d'utilités pharmaceutiques (l'eau, l'air et le vide) et les systèmes de refroidissement.</p> <p>Il est à noter qu'une attention particulière doit être donnée à la prévention et l'élimination des biofilms présents dans les systèmes de distribution d'eau.</p>
7. Personnel	<p>Il s'agit des exigences en matière de formation, de connaissances et de compétences spécifiques. Cette annexe prodigue des conseils en termes de qualification personnel et de l'habillement.</p> <p>La notion de disqualification du personnel est également introduite.</p>

Chapitre	Présentation générale
8. Production et technologies spécifiques	<p>Ce chapitre permet d'introduire les exigences sur les différents procédés de stérilisation et sur les nouvelles technologies (système à usage unique, système clos).</p> <p>Certaines exigences spécifiques à la lyophilisation et aux technologies BFS (Blow-Fill-Seal) et FFS (Form-Fill-Seal) sont également clarifiées.</p>
9. Surveillance environnementale et surveillance des procédés	<p>Il s'agit des exigences dans le cadre de la surveillance de routine des zones à atmosphère contrôlée, en particulier les seuils d'alerte et d'actions et l'examen des données de tendances.</p> <p>Ce chapitre permet également d'approfondir les exigences en matière de simulation de procédé aseptique.</p>
10. Contrôle Qualité	<p>Ce chapitre rappelle et renforce les exigences spécifiques au contrôle qualité des médicaments stériles.</p>
11. Glossaire	<p>Il s'agit de définir les notions clés utilisées dans document.</p>

ANNEXE 2 : Structure d'un Plan Directeur de Validation selon le PIC/S

Chapitre	Présentation générale
Introduction	Politique de qualification et de validation de l'entreprise et le domaine d'application
Organisation structurelle des activités de validation	Responsabilités et implications des différents services dans les activités de qualification et de validation
Description du site de production, des procédés et des produits	Récapitulatif des installations, des équipements, des systèmes et des procédés du site
Considérations spécifiques	Brève description des spécificités du site de production et des procédés demandant une attention particulière
Liste des produits, des procédés et des systèmes à valider	Description du programme de qualification et de validation
Critères d'acceptation	Relevé général des critères d'acceptation des éléments à qualifier/valider
Format documentaire	Description des formats documentaires utilisés pour les protocoles et les rapports
Procédures	Liste des procédures requises
Planification	Estimation des ressources nécessaires (personnel, équipement, ...) et planification des activités de qualification et de validation
Maîtrise des changements	Description du contrôle des changements critiques des matières, facilités, équipements ou procédés



FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : EGLY

Prénom : Thomas

TITRE DE LA THÈSE :

VALIDATION DE PROCÉDÉS DE FABRICATION ASEPTIQUE : APPLICATION À LA TECHNOLOGIE BLOW-FILL-SEAL

Date et lieu de la soutenance : 13 juin 2024, Faculté de Pharmacie - Université de Strasbourg

N° d'ordre :

RÉSUMÉ :

La technologie Blow-Fill-Seal (BFS) est un procédé complexe de remplissage et de conditionnement de produits pharmaceutiques qui combine plusieurs opérations réalisées au sein d'une seule et même machine. La fabrication des médicaments stériles impose des exigences particulières dans le but de réduire au maximum les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. L'Annexe 1 des EU GMP fixe les règles spécifiques à la fabrication de médicaments stériles. Une validation de procédé de fabrication aseptique est réalisée pour évaluer le risque de contamination d'un procédé par le biais de simulation de procédé aseptique, ou Aseptic Process Simulation (APS). Le principe des APS est de simuler les différentes étapes d'un procédé de fabrication, à l'aide d'un milieu de culture, afin de mettre en évidence le risque de produire des unités non-stériles.

MOTS-CLÉS :

Simulation de procédé aseptique | Validation | Procédé de fabrication | Blow-Fill-Seal | Annexe 1

Nom du Directeur de Thèse : Professeur Thierry Vandamme



PERSONAL DATA SHEET

Name : EGLY

First name : Thomas

THESIS TITLE:

ASEPTIC MANUFACTURING PROCESS VALIDATION: APPLICATION TO BLOW-FILL-SEAL TECHNOLOGY

Date and place of the thesis defense: June 13, 2024, Faculty of Pharmacy - University of Strasbourg.

Order number:

SUMMARY:

Blow-Fill-Seal (BFS) technology is a complex filling and packaging process for pharmaceutical products, combining several operations in a single machine. The manufacture of sterile medicinal products imposes requirements to minimize the risk of microbial, particulate, and pyrogenic contamination. The EU GMP Annex 1 defines the specific rules for the manufacture of sterile medicinal products. The validation of aseptic manufacturing process assesses the risk of contamination of a process using Aseptic Process Simulation (APS). The principle of APS is to simulate the different steps of a manufacturing process with a growth medium in order to highlight the risk of producing non-sterile units.

KEYWORDS:

Aseptic Process Simulation | Validation | Manufacturing Process | Blow-Fill-Seal | Annex 1

Name of the Thesis Director: Professor Thierry Vandamme