

Maîtrise Universitaire en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Qualification d'un lyophilisateur et validation du remplissage aseptique

présenté à la

Faculté des sciences de
l'Université de Genève

par

Sarah Cardoso

Responsable
Prof. André Pannatier

Superviseurs
Dr. Marc Voeffray
Dr. Lina Berger
Rachele Chianese

Genève
2010

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans l'aide et la contribution de nombreuses personnes que je remercie infiniment.

Tout d'abord, je remercie le Docteur Marc Voeffray, Pharmacien Responsable de la Production en petite quantité, pour son aide, sa disponibilité ainsi que pour le temps accordé au suivi de ce travail.

Merci au Docteur Lina Berger, Pharmacienne Responsable du laboratoire d'analyses de contrôle-qualité, pour ses conseils, ses remarques ainsi que la mise à disposition des locaux et équipements nécessaire à la partie validation.

Je remercie également Sheila De Sousa Silva, laborantine, pour son aide et ses conseils.

Je remercie Madame Rachele Chianese, Responsable Qualité, pour ses conseils concernant les documents rédigés.

Je remercie le Professeur André Pannatier, Pharmacien-Chef du Service de Pharmacie du CHUV pour l'accueil et l'intérêt pour ce travail.

Merci à Dragi Trailovic, aide-préparateur, pour le travail fourni lors de la validation.

Merci à tous les collaborateurs de la pharmacie pour leur accueil. Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidée à un moment ou à un autre durant ce travail.

Je souhaite également remercier les messieurs du Service Technique pour le travail effectué ainsi que pour leurs remarques.

Je remercie Monsieur Frédéric Beurel, travaillant chez Serail, pour les réponses à mes questions quant à l'utilisation du lyophilisateur lors de problèmes rencontrés.

Merci à Monsieur Dominique Blanc pour son aide apportée durant la validation.

Je remercie également ma famille et mes amis pour leur écoute du déroulement de ce travail. Je remercie particulièrement Lauriane et Coraline pour leur sympathique compagnie durant ce travail.

Sarah Cardoso

TABLE DES MATIERES

Glossaire (abréviations et définitions)	1
Résumé	2
1 INTRODUCTION.....	3
1.1 La lyophilisation	3
1.2 Locaux et habillement.....	7
1.3 Notions de qualification et validation	9
1.4 Buts du travail.....	10
2 MATERIEL ET METHODE	11
2.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place).....	11
2.2 Qualification du lyophilisateur	11
2.2.1 Cleaning-in-place (CIP)	11
2.2.2 Sterilization-in-place (SIP).....	12
2.3 Validation du remplissage aseptique	13
3 RESULTATS	15
3.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place).....	15
3.2 Qualification du lyophilisateur	17
3.2.1 Cleaning-in-place (CIP)	17
3.2.2 Sterilization-in-place (SIP).....	23
3.3 Validation du remplissage aseptique	27
4 DISCUSSION.....	29
4.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place).....	29
4.2 Qualification du lyophilisateur	29
4.2.1 Cleaning-in-place (CIP)	29
4.2.2 Sterilization-in-place (SIP).....	33
4.3 Validation du remplissage aseptique	34
5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	36
6 BIBLIOGRAPHIE.....	38
7 ANNEXES.....	40

Glossaire (abréviations et définitions)

- Abréviations :
 - BI : indicateur biologique
 - BPF : Bonnes pratiques de fabrication
 - CHUV : Centre hospitalier universitaire vaudois
 - CIP : cleaning-in-place
 - EHP: eau hautement purifiée
 - IQ : installation qualification
 - OQ : operational qualification
 - PIC/S : Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme
 - ppm : partie par million
 - PQ : performance qualification
 - SIP : sterilization-in-place
 - TOC : Total Organic Carbon
 - ZAC : zones à atmosphère contrôlée

- Définitions :
 - F_0 : La valeur F_0 représente le temps équivalent en minutes à une stérilisation effectuée à 121.1 °C.
 - valeur D : La valeur D représente le temps nécessaire pour que la population initiale de spores soit réduite de 10%.
 - valeur Z : La valeur Z représente le nombre de degrés nécessaires pour modifier la valeur D d'un facteur 10.
 - « worst-case » : Cela signifie que les conditions choisies représentent un cas en mode dégradé par rapport aux conditions normales en routine.

Résumé

La qualification de performance (PQ) du lyophilisateur CS15-1 en place actuellement à la Pharmacie centrale du CHUV est nécessaire avant de débiter la production de médicaments. Le lyophilisateur est constitué de systèmes de lavage et de stérilisation automatiques. Ces deux systèmes font partie intégrante de cette qualification.

Pour la qualification du lavage, des plaques en inox contaminées par une solution de lactose sont disposées dans le lyophilisateur. Des analyses TOC (Total Organic Carbon) sont ensuite effectuées. Les critères d'acceptation sont d'avoir des résultats inférieurs à 0.5 ppm après reconstitution des échantillons.

Pour la qualification de la stérilisation, douze indicateurs biologiques ($2.3 \cdot 10^6$ spores de *Bacillus stearothermophilus* par languette) sont associés à douze sondes de mesure de la température et disposés dans le lyophilisateur. Afin de satisfaire aux critères d'acceptation, les indicateurs biologiques doivent être négatifs et la température mesurée dans la cuve durant le cycle de stérilisation doit être supérieure à 121.1 ° C pendant 18 minutes.

La validation du remplissage aseptique du lyophilisateur est également nécessaire afin de prouver l'asepsie du processus complet allant du lavage des flacons à leur remplissage et au chargement du lyophilisateur. Les flacons sont remplis avec un milieu de culture (Media-fill). Une simulation de l'étape critique est réalisée en faisant le vide dans le lyophilisateur et en le cassant trois fois de suite. Les flacons sont ensuite mis à incuber à 20-25 °C pendant 7 jours puis à 30-35 °C pendant 7 jours. Les critères d'acceptation pour cette validation sont de n'avoir aucune contamination (bactéries ou moisissures).

La qualification du lavage du lyophilisateur est non-conforme, alors que la qualification de la stérilisation est conforme. Les investigations menées pour rechercher les causes du lavage défaillant en certains points ont permis d'exclure certaines hypothèses et de proposer des changements techniques.

La validation du remplissage aseptique du lyophilisateur réalisée avec des flacons de 50 ml remplis avec 30 ml de milieu ainsi qu'avec des flacons de 3 ml remplis avec 2 ml de milieu de culture est conforme. Une contamination a été observée dans un flacon de 3 ml qui s'est révélée être une particule inerte, après investigations.

Ce travail a permis de constater la somme d'argent et de travail devant être investi lors de la mise en place d'un équipement utilisé pour la production pharmaceutique afin de satisfaire aux exigences constantes d'obtenir des produits de bonne qualité.

1 INTRODUCTION

1.1 La lyophilisation

L'utilisation de la lyophilisation en tant que procédé industriel est apparue au 20^{ème} siècle. Le besoin de conserver des produits sanguins ainsi que la découverte des antibiotiques a contribué à son développement [1]. Les avancées technologiques concernant la mise sous vide et la réfrigération ont également contribué au fort développement de cette technique tout d'abord utilisée dans l'industrie alimentaire puis dans l'industrie pharmaceutique [1].

La lyophilisation est un procédé permettant de conserver des produits instables sous forme liquide en les congelant puis en sublimant l'eau ce qui aboutit à une substance sèche poreuse [1].

Cela permet d'améliorer la stabilité de produits pharmaceutiques labiles ce qui conduit à l'amélioration du stockage à long terme [2]. La poudre obtenue permet la reconstitution facile du produit avec de l'eau avant utilisation [3].

La figure 1 représente schématiquement les différentes étapes de la lyophilisation. Tout d'abord, la solution à lyophiliser est congelée. Il est préférable d'avoir une congélation rapide afin d'obtenir une grande quantité de petits cristaux. La deuxième étape consiste à éliminer la glace par sublimation, la vapeur formée étant refroidie par le condenseur servant de piège (condensation de la vapeur en glace). L'évaporation de la glace à l'intérieur du produit conduit à la formation d'un résidu poreux [4]. Après la dessiccation primaire des cristaux de glace, des molécules d'eau restent fixées au produit poreux. Une dernière étape de désorption est réalisée à une très basse pression, c'est la phase de dessiccation secondaire [1, 4].

Les plateaux du lyophilisateur servent au transfert d'énergie avec la solution afin de permettre le déroulement des différentes phases de la lyophilisation. Ces plateaux peuvent être chauffés avec une résistance électrique ou avec un fluide circulant à l'intérieur des plateaux [4]. Les plateaux peuvent être abaissés afin de permettre le bouchonnage des flacons qui se déroule sous vide ou à l'aide d'un gaz inerte (azote) dans la chambre du lyophilisateur [5].

La dernière étape avant administration au patient est une phase de reconstitution de l'échantillon. Cela peut se faire avec de l'eau ou avec un autre solvant afin d'obtenir une solution ayant la même concentration qu'avant la lyophilisation ou une solution plus diluée ou plus concentrée [5].

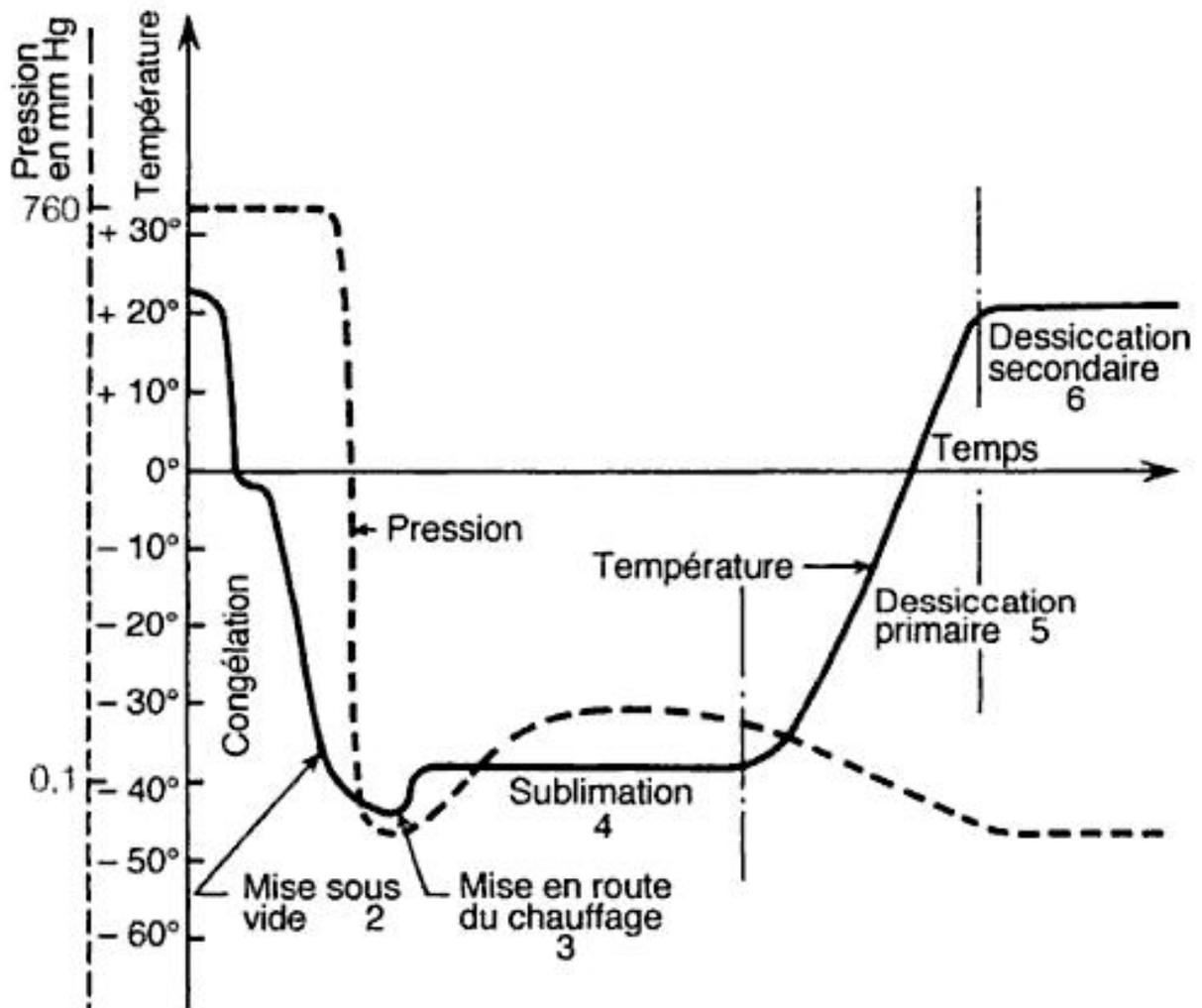


Figure 1: Schéma des différentes phases de la lyophilisation [4]

Un avantage de la lyophilisation est le faible contenu en eau des produits résultants ce qui améliore considérablement leur stabilité [1, 4]. Les produits lyophilisés ont une structure poreuse ce qui permet leur reconstitution rapide en solution ou en suspension [1, 4]. Le cycle de lyophilisation stabilise le produit en empêchant la croissance bactériologique ou les réactions enzymatiques. Ceci est dû au fait que le produit se trouve à de très basses températures durant le cycle de lyophilisation et à son faible contenu en eau [4].

Un principal désavantage de la lyophilisation est le coût élevé des équipements et de l'énergie nécessaire pour la réalisation d'un cycle de lyophilisation [3, 6]. De plus, il est fréquemment observé que plusieurs jours sont nécessaires au déroulement d'un cycle de lyophilisation [7].

De nombreux produits peuvent être lyophilisés. Dans l'industrie pharmaceutique, des enzymes, hormones, antibiotiques, vitamines, dérivés sanguins, anticorps, vaccins inactivés peuvent être produits par lyophilisation [1]. La lyophilisation est également très utilisée dans l'industrie alimentaire (café, soupes, purée de pommes-de-terre par exemple) [6].

Le diagramme ci-dessous représente les trois états de l'eau en fonction de la température et de la pression. Cela permet de comprendre l'étape de sublimation lors de la lyophilisation. En effet, lorsque la pression et la température sont basses, l'eau peut passer de l'état solide à l'état gazeux directement [4].

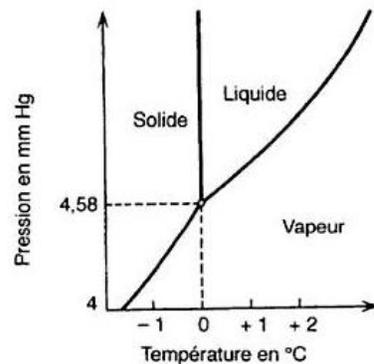


Figure 2: diagramme des phases de l'eau [4]

La figure ci-dessous représente un schéma d'un lyophilisateur. Les flacons se trouvent dans la chambre du lyophilisateur en contact direct avec les plateaux. La vapeur d'eau se déplace de la chambre du lyophilisateur au condenseur. Une pompe à vide permet l'extraction de gaz non-condensables [3].

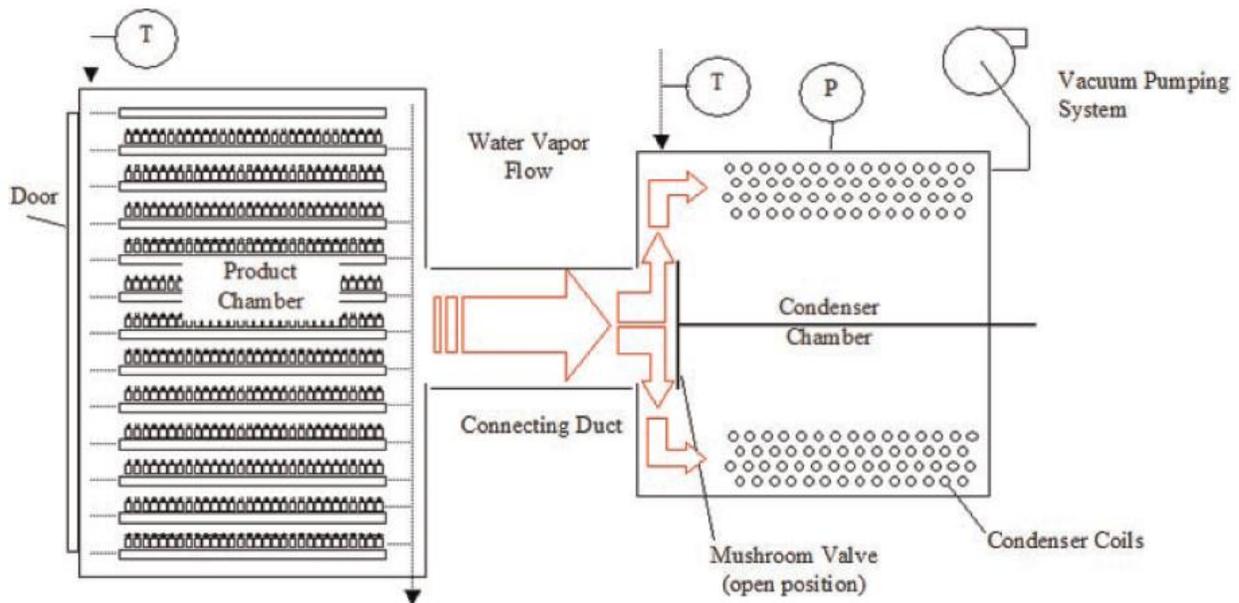


Figure 3: schéma simplifié d'un lyophilisateur [3]

Le lyophilisateur CS15-1 (Serail, le Coudray St-Germer, France) en fonction au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) est un lyophilisateur comportant une chambre en acier inoxydable (inox) avec quatre plateaux d'une surface totale de 1.02 m², une pompe à vide, une pompe à anneaux liquide, un condenseur. Les plateaux peuvent être abaissés afin de permettre le bouchonnage des flacons. Les dimensions du lyophilisateur sont de 2.7*1.6*2.6 m (longueur, largeur, hauteur).

Le local technique (ordinateur permettant de contrôler le lyophilisateur, vannes,...) se situe en salle n°565. La porte du lyophilisateur s'ouvre sous un flux laminaire de classe A dans une zone de classe B (salle n°562).

La figure suivante représente le lyophilisateur CS15-1.

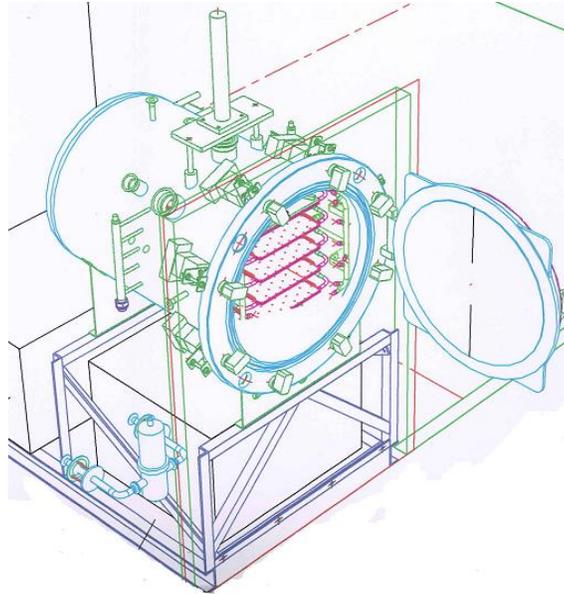


Figure 4: Schéma du lyophilisateur CS15-1 en place à la Pharmacie du CHUV

Les photographies ci-dessous représentent les deux parties principales du lyophilisateur. La figure 5 représente la chambre de lyophilisation une fois que la porte est ouverte sous le flux laminaire de classe A. Les quatre plateaux et les buses à l'entrée de la chambre peuvent être observés, à l'arrière on devine la plaque protégeant le condenseur qui se trouve derrière.

La figure 6 représente le lyophilisateur du côté du local technique. Les différentes vannes et tuyaux d'amenées et d'évacuations des fluides peuvent y être observés.

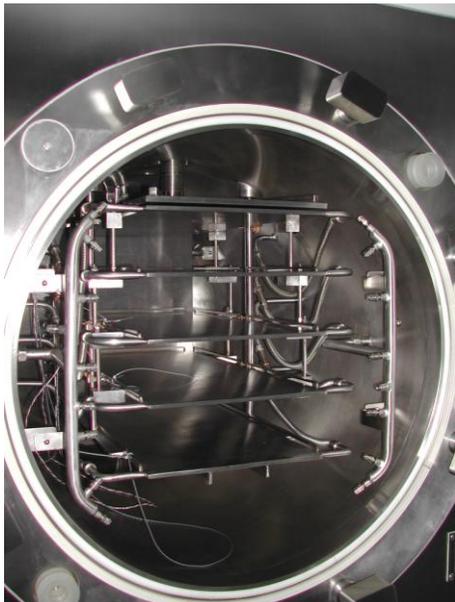


Figure 5: chambre du lyophilisateur



Figure 6 : local technique

Le lyophilisateur est équipé d'un système de lavage (CIP : cleaning-in-place) et de stérilisation (SIP : sterilization-in-place). Cela permet de laver la chambre du lyophilisateur de manière automatique avec de l'eau hautement purifiée chauffée à 80°C et d'effectuer une stérilisation à la vapeur permettant de conduire à un environnement stérile et sec dans la chambre du lyophilisateur.

L'eau hautement purifiée est monitorée pour assurer les caractéristiques mentionnées dans la Pharmacopée Européenne 6.3 (monographie de l'eau hautement purifiée).

Le lavage se déroule selon plusieurs étapes : rinçage, drainage et séchage. Tout d'abord, de l'eau hautement purifiée chauffée à 80°C est aspergée dans la cuve au moyen de buses. C'est la phase de rinçage. La phase de drainage consiste à évacuer l'eau présente dans la cuve. Finalement, la phase de séchage se déroulant sous vide est effectuée à la fin d'un ou plusieurs cycles de rinçage/drainage. Le temps de chaque paramètre peut être modifié.

La stérilisation se déroule également selon plusieurs étapes. L'air est remplacé par la vapeur, injectée par les buses, grâce à plusieurs phases de mises sous vide suivies d'injection de vapeur consécutives. Lors de la troisième phase d'injection de vapeur, la stérilisation est effectuée à 121.1 °C pendant 20 minutes. Ensuite, une phase de séchage sous vide et une phase de refroidissement sont effectuées.

Le lyophilisateur est manipulé à partir de l'ordinateur présent dans le local technique, à l'aide du logiciel « S. G. D. Serail Division » (version : 13062, app. date : 080505-1727).

Dans le cas de la pharmacie centrale du CHUV, des produits injectables pour des études cliniques ou pour la production sont lyophilisés, principalement des antibiotiques (Amikacine ou Amphotéricine B).

Les produits injectables doivent être produits dans des conditions aseptiques. Ceci explique pourquoi la porte du lyophilisateur s'ouvre sous un flux laminaire de classe A (plafonnier).

1.2 Locaux et habillement

Les produits pharmaceutiques produits de manière aseptique doivent satisfaire à certaines exigences à propos des locaux. Le nombre de particules doit être contrôlé afin de ne pas dépasser un certain seuil selon les valeurs mentionnées dans le tableau 1[8].

Le personnel entrant dans ces locaux doit s'habiller d'une manière spécifique en passant par des sas d'entrée entre les différents locaux. Une différence de pression doit être maintenue entre les différents sas afin de ne pas contaminer la zone de classe supérieure. Le flux d'air provenant d'un flux laminaire vertical doit avoir une vitesse de 0.30 m/s [8].

Tableau 1: Caractéristiques particulières des zones à atmosphère contrôlée au repos et en activité (adapté de [8])

classe	nombre maximal de particules autorisées par m ³ d'air			
	au repos /taille des particules ≥ à		en activité /taille des particules ≥ à	
	0.5 µm	5 µm	0.5 µm	5 µm
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	non-défini	non-défini

Le personnel doit s'habiller de manière à ne pas contaminer la zone et les produits fabriqués. Tout d'abord, une cagoule et un masque sont mis. Les mains sont lavées puis désinfectées. Une paire de gants stériles est mise. Après passage dans le sas suivant, une combinaison comportant une cagoule est portée. Des bottes et une deuxième paire de gants stériles sont mises. Des protocoles en vigueur actuellement au CHUV sont suivis concernant l'habillement pour travailler en zone aseptique. La figure ci-dessous représente une photographie d'un opérateur travaillant en zone aseptique.



Figure 7: Personnel habillé pour travailler en zone aseptique

Les PIC/S (Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspection Co-Operation Scheme) sont des réglementations dans le domaine pharmaceutique afin d'avoir une concordance entre les pays et les industries. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) sont mentionnées et exigées lors de la fabrication de médicaments [8-10]. Les BPF conduisent à l'établissement de règles et de directives permettant la production de produits conformes aux exigences législatives.

1.3 Notions de qualification et validation

Comme mentionné plus haut, les Bonnes Pratiques de Fabrication conduisent à des exigences bien réglementées. Il est nécessaire de qualifier l'équipement utilisé pour la production ainsi que de valider les procédés.

Il existe différentes dénominations pour la qualification (termes anglais) [11] :

- Installation qualification (IQ) : Toutes les procédures conduisant à l'installation adéquate de l'appareil dans l'environnement sélectionné sont incluses dans cette qualification. Elle inclut également toutes les directives comme quoi l'appareil est correctement installé et que l'environnement est adéquat pour l'opération et l'utilisation de l'appareil.
- Operation qualification (OQ) : La démonstration que l'appareil fonctionne adéquatement aux spécifications dans l'environnement sélectionné fait partie de cette qualification.
- Performance qualification (PQ) : Cela inclut la démonstration que l'appareil fonctionne de manière appropriée en relation avec les spécifications en routine.

La validation est l'évaluation de performance d'un procédé et l'observation que les performances sont conformes à certains critères prédéterminés. La validation établit et fournit des documents officiels certifiant que la procédure est conforme [11].

Il existe trois types de validation [12]:

- validation prospective : Cela établit des preuves documentées que le procédé conduit à des résultats corrects et reproductibles sur trois charges consécutives, basé sur un protocole écrit avant la mise en place du procédé en routine.
- validation concurrente : Cela établit des preuves documentées que le procédé conduit à des résultats corrects et reproductibles, basé sur les informations obtenues durant la réalisation du procédé (des données complémentaires peuvent être collectées).
- validation rétrospective : Cela établit des preuves documentées que le procédé conduit à des résultats corrects, basé sur une synthèse et une analyse d'informations historiques des dossiers de production et d'analyse de toutes les charges produites sur une période donnée.

Une revalidation doit être réalisée si des changements importants sont effectués sur l'appareil ou dans le procédé. Une revalidation périodique doit également être réalisée.

1.4 Buts du travail

Les buts de ce travail sont :

1. de qualifier le lyophilisateur CS15-1(PQ : performance qualification). Les systèmes de lavage et de stérilisation de la cuve du lyophilisateur font partie intégrante de cette qualification. L'IQ (installation qualification) et l'OQ (operational qualification) ayant déjà été effectués, il n'est pas nécessaire de les refaire (date : novembre 2006).
2. de valider le procédé de remplissage aseptique de flacons et de chargement du lyophilisateur.

Pour la qualification du lavage, de petites plaques en inox sont contaminées avec une solution de lactose. Les plaques sont ensuite fixées dans le lyophilisateur. Après le lavage, les échantillons sont reconstitués afin de permettre des analyses TOC (Total Organic Carbon). Différentes méthodes pour la qualification du lavage sont mentionnées dans la littérature [13-15].

Pour la qualification de la stérilisation de la cuve, des indicateurs biologiques (spores de *Bacillus stearothermophilus*) sont disposés dans le lyophilisateur.

La température et la pression sont également mesurées dans la cuve durant les cycles de lavage et de stérilisation.

La validation du remplissage aseptique du lyophilisateur est importante, c'est pourquoi cela nécessite une validation (validation prospective). En effet, les produits lyophilisés ne sont pas stérilisés, mais sont produits de manière aseptique. Les étapes conduisant au remplissage aseptique des flacons et le chargement du lyophilisateur sont nombreuses et le risque d'avoir une contamination lors du procédé est élevé.

Diverses étapes font partie du processus complet du remplissage du lyophilisateur : lavage des flacons, dépyrogénéisation des flacons, transfert des flacons en zone aseptique de classe B puis sous le flux de classe A, préparation de la solution à lyophiliser, filtration de la solution avec un filtre à 0.22 µm, remplissage des flacons, dépôt des bouchons sur les flacons, chargement du lyophilisateur, bouchonnage des flacons, sortie des flacons du lyophilisateur...[16].

Afin de valider le remplissage aseptique du lyophilisateur, une simulation est effectuée. Les étapes se déroulent de manière habituelle. Cependant, les flacons sont remplis avec un milieu de culture (Media-fill). Un cycle de lyophilisation n'étant pas effectué, une simulation est réalisée en faisant le vide dans la cuve et en le cassant trois fois. Les flacons contenant le milieu de culture sont mis à incuber afin de pouvoir observer par la suite d'éventuelles contaminations survenues lors du déroulement du remplissage [10].

De nombreux articles mentionnent l'importance des qualifications et des validations dans le domaine pharmaceutique [17-20], en particulier lors de processus aseptiques [21-26].

Afin de permettre l'utilisation adéquate du lyophilisateur lors de ce travail, un mode d'emploi est rédigé, en particulier concernant le CIP et le SIP. Le document d'une vingtaine de pages n'a pas été annexé, mais deux pages d'exemple se trouvent dans l'annexe 1.

2 MATERIEL ET METHODE

2.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place)

Tout d'abord, une phase de développement est effectuée afin de déterminer une méthode efficace pour la qualification du lyophilisateur.

La méthode de détection appelée TOC (Total Organic Carbon) est souvent utilisée pour la validation de nettoyage [14, 27-29]. Cette méthode mesure le carbone présent dans l'échantillon. La faible limite de détection (partie par million=ppm équivalent à mg/l) en fait une méthode appréciée. Cependant, le peu de sélectivité peut conduire à mesurer également des interférents [27]. Les analyses sont faites par le laboratoire « Scitec Research » à Lausanne. La méthode est tirée de la Pharmacopée Européenne 6 (chapitre 2.2.44). L'appareil utilisé (Phoenix) a une limite de quantification de 0.2 ppm. L'analyse TOC induit l'oxydation du carbone dans l'échantillon, le gaz carbonique produit étant ensuite détecté [27].

Pour la qualification, il est décidé d'utiliser une solution de lactose monohydraté ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) comme contaminant.

Concernant la méthode de dépôt et de récolte des échantillons, plusieurs possibilités sont décrites dans la littérature. La solution de contamination peut être déposée dans la cuve, puis les eaux de rinçage analysées [30]. Des coupons de la même matière que l'appareil à évaluer peuvent être utilisés [30]. La solution peut être déposée dans la cuve à certains endroits précis, puis les échantillons sont récoltés avec un écouvillon [29].

Lorsque la méthode de dépôt et de récolte des échantillons adéquate est trouvée et adaptée, la reconstitution des échantillons est évaluée. Une quantité connue de solution contaminante est déposée puis est récoltée sans effectuer un cycle de lavage. Ceci permet de savoir si la méthode de récolte des échantillons est efficace. Le taux de recouvrement des échantillons est calculé afin de connaître l'erreur susceptible d'intervenir lors des analyses.

Par la suite, plusieurs cycles de lavage sont effectués afin de déterminer lequel sera utilisé pour la qualification.

2.2 Qualification du lyophilisateur

Le protocole concernant le plan de la qualification du lyophilisateur rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 2.

2.2.1 Cleaning-in-place (CIP)

Dix-huit plaques en inox sont contaminées par une solution de lactose monohydraté (Hänseler AG, Herisau, Suisse) préalablement préparée (concentration de 68.75 g/l). Les plaques sont placées dans l'étuve puis un gramme de la solution est prélevé à l'aide d'une seringue et déposé sur chaque plaque. L'étuve est programmée pour une nuit environ à 85-90°C afin d'évaporer le solvant et d'obtenir un résidu de lactose sur les plaques.

Calcul de la concentration en ppm C de la solution de lactose monohydraté ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) à 68.75 g/l de lactose :

$$PM_{\text{lactoseMonohydraté}} = (12 \cdot 12) + (22 \cdot 1) + (11 \cdot 16) + 18 = 360g$$

$$m_{\text{lactose}} = 360g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 12 \cdot 12 = 144g$$

$$m_{\text{lactose}} = 68.75g \rightarrow m_{\text{carbone}} = \frac{68.75 \cdot 144}{360} = 27.5g$$

$$27.5g/l = 27'500mg/l = 27'500ppmC$$

Calcul de la quantité de lactose déposé sur les plaques (1g de solution équivalent à 1 ml) :

$$V_{\text{solution}} = 1ml \rightarrow m_{\text{lactoseMonohydraté}} = 68.75 \cdot 10^{-3}g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g$$

Les plaques sont disposées dans le lyophilisateur et un cycle de lavage est effectué. Le temps de lavage est réduit par rapport au lavage effectué en routine afin de se situer dans un « worst-case » (cela signifie que les conditions choisies représentent un cas en mode dégradé par rapport aux conditions normales en routine).

Les échantillons sont reconstitués afin d'effectuer des analyses TOC (Total Organic Carbon). Des tubes en verre de 40 ml sont utilisés et remplis avec de l'eau hautement purifiée.

La température et la pression sont également mesurées durant le cycle de lavage à l'aide d'une sonde ayant douze thermocouples (sonde pieuvre, Metrolog, France).

Selon la Pharmacopée Européenne 6.0, les valeurs des analyses TOC doivent être inférieures à 0.5 ppm. Les essais sont effectués en triplicat pour des raisons réglementaires et afin de vérifier la reproductibilité du lavage.

Après reconstitution des échantillons dans les tubes TOC contenant 40 ml d'eau hautement purifiée et si tout le lactose déposé reste sur les plaques en inox :

$$m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g = 27.5mg \rightarrow c_{ppmC} = \frac{27.5}{0.04} = 687.5mg/l = 687.5ppmC$$

Les spécifications étant de 0.5 ppmC, il y a réduction d'un peu plus de 3 logs.

Le protocole concernant la qualification du CIP rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 3.

2.2.2 Sterilization-in-place (SIP)

Selon la Pharmacopée Européenne 6.0 (chapitre 5.1.2), des languettes de spores de *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953, Raven, Mecolab, n° de lot : 3169531) sont disposées dans le lyophilisateur pour la qualification de la stérilisation par la vapeur.

- caractéristiques des spores de *Bacillus stearothermophilus*:
 - population : $2.3 \cdot 10^6$ spores par languette
 - valeur D_{121} : 1.9 minutes
 - valeur Z : 10 °C

Selon la Pharmacopée Européenne 6.0, la valeur D représente le temps nécessaire pour que la population initiale de spores soit réduite de 10%. La valeur Z représente le nombre de degrés nécessaires pour modifier la valeur D d'un facteur 10 [31].

La valeur F_0 représente le temps équivalent en minutes à une stérilisation effectuée à 121.1 °C [31]. Cette valeur peut être calculée après mesure de la température par douze sondes disposées dans le lyophilisateur durant le cycle de stérilisation et après analyse grâce au programme informatique (STLGWin, version 2.8, 2007, Metrolog, France) dirigeant les sondes.

Pour la qualification du SIP, douze indicateurs biologiques sont disposés dans le lyophilisateur. Chaque indicateur biologique est associé à une sonde de température.

Les indicateurs biologiques sont ensuite mis à incuber dans un milieu de culture modifié (modified Tryptic Soy Broth, Raven, Mecolab, n° de lot : 000211) à 60°C et observés après 24 et 48 heures. Les essais sont effectués en triplicat pour satisfaire aux exigences réglementaires et afin de vérifier la reproductibilité de la stérilisation.

Les indicateurs biologiques doivent être négatifs afin de satisfaire aux exigences de la Pharmacopée Européenne 6.0 (chapitre 5.1.2) et la valeur spécifiée de F_0 cumulé doit être atteinte (en l'occurrence, 18 minutes au minimum) [30]. Le temps de stérilisation est réduit de 10% par rapport aux conditions en routine.

Chaque cycle de stérilisation est effectué après un cycle de lavage afin de se trouver dans les conditions les plus proches de la routine.

Le protocole concernant la qualification du SIP rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 4.

2.3 Validation du remplissage aseptique

La validation du remplissage aseptique concerne toutes les étapes conduisant au chargement du lyophilisateur. Le lavage et dépyrogénéisation (220°C pendant 2 heures) des flacons, le transfert des flacons de la laverie en zone aseptique, le remplissage des flacons, le chargement du lyophilisateur avec les flacons, le bouchonnage,... font partie de la validation du remplissage aseptique [16].

Un milieu de culture (Media-fill, Trypcase Soy Bouillon EP/USP, Biotest) est utilisé pour remplir les flacons. Ce milieu de culture doit être qualifié avant utilisation. Un essai de fertilité est fait selon la Pharmacopée Européenne 6.3 (chapitre 2.6.1).

Tout d'abord, les flacons sont lavés à la machine-à-laver puis dépyrogénéiser à l'étuve dans le local de la laverie n° 569. Ils sont ensuite mis dans des boîtes métalliques puis dans des doubles emballages afin de permettre leur transfert dans le local n°562 via des sas.

Les flacons sont remplis avec un milieu de culture à l'aide d'une pompe de remplissage (Repeater Pomp, Baxa, Düsseldorf, Allemagne). Ensuite, les flacons sont chargés dans le lyophilisateur. Les flacons utilisés sont des flacons en verre incolore, de type borosilicaté. Selon la Pharmacopée Européenne 6 (chapitre 3.2.1), ce type de verre est requis pour les préparations injectables. De plus, ce type de verre a une forte résistance chimique et aux chocs thermiques [32]. Les flacons utilisés lors d'un cycle de lyophilisation doivent avoir un fond très plat afin de favoriser les échanges thermiques entre la solution à lyophiliser et les plateaux [4].

Une simulation de l'étape critique est effectuée en faisant le vide dans la cuve et en le cassant trois fois de suite, tout en restant à température ambiante [10]. Certains flacons remplis avec le milieu de culture ne sont pas disposés dans le lyophilisateur afin de pouvoir déterminer, en cas de contamination, si celle-ci provient d'une étape précédant le chargement du lyophilisateur ou si elle est apparue lors de l'étape de simulation dans le lyophilisateur. La simulation en cassant le vide plusieurs fois représente une étape critique lors de la lyophilisation pouvant conduire à une contamination. En effet, comme mentionné lors de la description de la lyophilisation, la pression à l'intérieur du lyophilisateur varie durant le cycle [4].

Les flacons contenant le milieu de culture sont incubés 7 jours à 20-25 °C puis 7 jours à 30-35 °C et observés les jours ouvrables [10].

La validation du remplissage aseptique est effectuée avec des flacons de 50 ml et avec des flacons de 3 ml. Les essais sont faits en triplicat (trois essais avec les flacons de 50 ml et trois essais avec les flacons de 3 ml).

160 flacons par lot de 50 ml sont préparés. 38 flacons sont disposés par plateau dans la cuve et 8 flacons sont gardés hors du lyophilisateur.

La taille des lots préparés avec les flacons de 3 ml est de 296 flacons. 72 flacons sont disposés sur chaque plateau, 8 flacons étant gardés hors du lyophilisateur.

Selon les PIC/S, le nombre de flacons pour chaque lot de validation étant inférieur à 3000 unités, aucune contamination ne doit être détectée [10].

Le protocole concernant la validation du remplissage aseptique du lyophilisateur rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 5.

3 RESULTATS

3.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place)

Dans le cas de la qualification du lavage du lyophilisateur, les eaux de rinçage ne peuvent pas être récoltées suite au fait qu'il n'y a pas de robinet permettant de prélever l'eau de rinçage au moment de l'écoulement.

Il a été décidé d'utiliser des plaques en inox contaminées par la solution de lactose afin de pouvoir facilement sécher le lactose sur les plaques en les mettant à l'étuve.

Taux de recouvrement des échantillons :

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats concernant la reconstitution des échantillons des plaques n'ayant pas été disposées dans le lyophilisateur afin de déterminer le taux de recouvrement.

Tableau 2: résultat de la reconstitution des échantillons

	valeur attendue [ppmC]	valeur mesurée [ppmC]	Taux de recouvrement [%]
solution-mère de lactose	27500	29260	106.4%
eau hautement purifiée	<0.5	<0.2	
plaque 3	712	662	93.0%
plaque 4	705	748	106.0%
plaque 5	706	704	99.7%
plaque 6	698	675	96.7%
plaque 7	699	646	92.4%
plaque 8	695	636	91.5%
plaque 9	692	664	95.9%
plaque 10	698	678	97.2%
plaque 11	688	661	96.0%
plaque 12	697	656	94.1%
plaque 13	691	670	97.0%
plaque 14	700	690	98.6%
plaque 15	692	660	95.3%
plaque 16 (blanc)	<0.5	<0.2	
plaque 17 (blanc)	<0.5	<0.2	
plaque 18 (blanc)	<0.5	0.3	

La valeur attendue n'est pas toujours de 687.5 ppmC, car la masse exacte de solution de lactose déposée sur les plaques en inox varie entre les différents échantillons.

Le taux de recouvrement des échantillons est compris entre 91.5 et 106.4 %.

Analyses TOC:

Ensuite, un cycle de lavage (un seul cycle de rinçage/drainage) est effectué avec dix-huit plaques dans le lyophilisateur. Les résultats des analyses TOC (Total Organic Carbon) et les observations visuelles se trouvent dans le tableau 3.

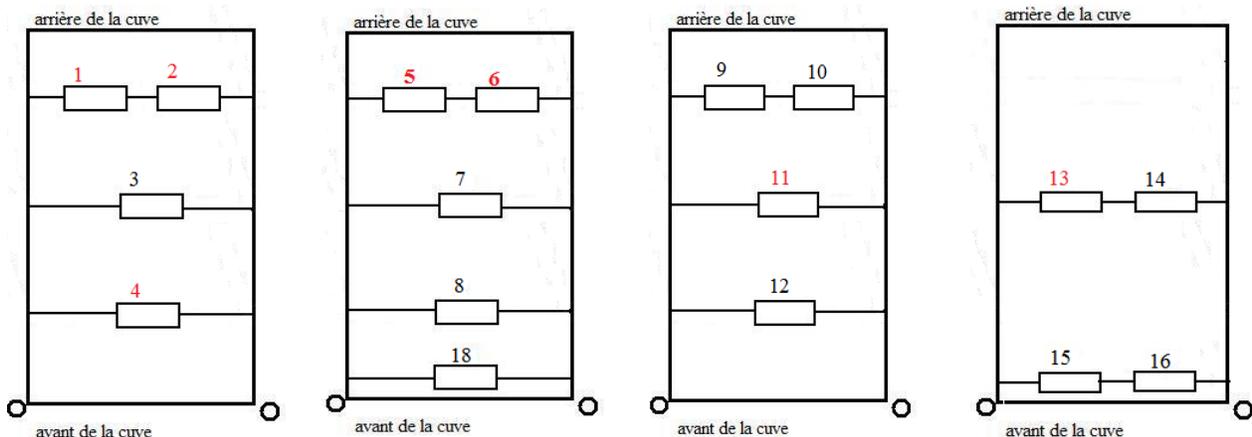
Tableau 3: Résultats des échantillons concernant le premier essai de lavage avec les plaques en inox

Critères d'acceptation: Teneur en carbone résiduel: ≤ 0.5 ppmC		
Échantillon	teneur en carbone [ppm]	observation visuelle
plaque 1	1.7	petites taches visibles
plaque 2	0.5	petites taches visibles
plaque 3	<0.2	rien
plaque 4	0.3	petite tache
plaque 5	29.8	tache d'apparence collante
plaque 6	39.7	présence visible de lactose
plaque 7	<0.2	rien
plaque 8	<0.2	rien
plaque 9	0.3	rien
plaque 10	<0.2	rien
plaque 11	0.5	petite tache
plaque 12	<0.2	rien
plaque 13	3.9	petites taches visibles
plaque 14	<0.2	rien
plaque 15	<0.2	rien
plaque 16	<0.2	rien
plaque 17	<0.2	rien
plaque 18	<0.2	rien
eau hautement purifiée	<0.2	-
solution-mère de lactose	26340	-

Selon les observations visuelles, sept échantillons présentent des résidus. Selon les analyses TOC, quatre échantillons ont des résultats hors des critères d'acceptation.

Disposition des plaques en inox dans le lyophilisateur :

Les figures ci-dessous montrent la disposition des plaques sur les plateaux (vus d'en-haut), dans la cuve du lyophilisateur. La plaque 17 se trouve fixée à l'envers en haut, à l'avant de la cuve. Les plaques numérotées en rouge ont des résultats concernant les analyses TOC supérieurs aux spécifications.



Figures 8, 9, 10 et 11: disposition des plaques sur les plateaux (de gauche à droite) : le plateau supérieur, le deuxième plateau, le troisième plateau et le plateau inférieur

Un rapport concernant la phase de développement a été rédigé. Il se trouve dans l'annexe 6.

3.2 Qualification du lyophilisateur

3.2.1 Cleaning-in-place (CIP)

Observations visuelles et analyses TOC :

Le tableau ci-dessous contient les observations visuelles des plaques avant la reconstitution des échantillons ainsi que les résultats des analyses TOC (Total Organic Carbon) des trois cycles de lavage de la qualification du CIP.

Tableau 4: Résultat des analyses TOC des échantillons pour les cycles de qualification du CIP

Critères d'acceptation: Teneur en carbone résiduel: ≤ 0.5 ppmC						
échantillon	ESSAI 1		ESSAI 2		ESSAI 3	
	observation visuelle	ppmC	observation visuelle	ppmC	observation visuelle	ppmC
plaque 1	rien	0.5	rien	0.4	rien	<0.2
plaque 2	lactose visible	71.8	lactose visible	110	lactose visible	12.6
plaque 3	rien	0.9	tache	26.8	petite tache	1.2
plaque 4	tache	0.8	rien	0.4	tache	1.5
plaque 5	tache	1.8	rien	0.4	rien	0.6
plaque 6	rien	<0.2	tache	0.3	tache	10.2
plaque 7	tache	44.1	rien	1.8 ou 16	rien	<0.2
plaque 8	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 9	rien	0.7	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 10	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 11	rien	0.3	rien	0.2	rien	<0.2
plaque 12	rien	<0.2	rien	0.2	rien	0.5
plaque 13	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	0.5
plaque 14	rien	<0.2	rien	0.5	rien	<0.2
plaque 15	rien	0.3	rien	0.2	rien	<0.2
plaque 16	lactose visible	259	tache	8.5 ou 8.7	lactose visible	140
plaque 17	rien	0.5	rien	0.8	rien	<0.2
plaque 18	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
eau hautement purifiée		0.2		<0.2		<0.2
solution-mère de lactose		23600		20440		24074

Si la plaque conserve l'entier du résidu de lactose, la valeur attendue après dilution dans 40 ml d'eau hautement purifiée est de 687.5 ppmC. Les critères d'acceptation étant d'obtenir une valeur de 0.5 ppmC, une réduction de 3 logs doit être observée.

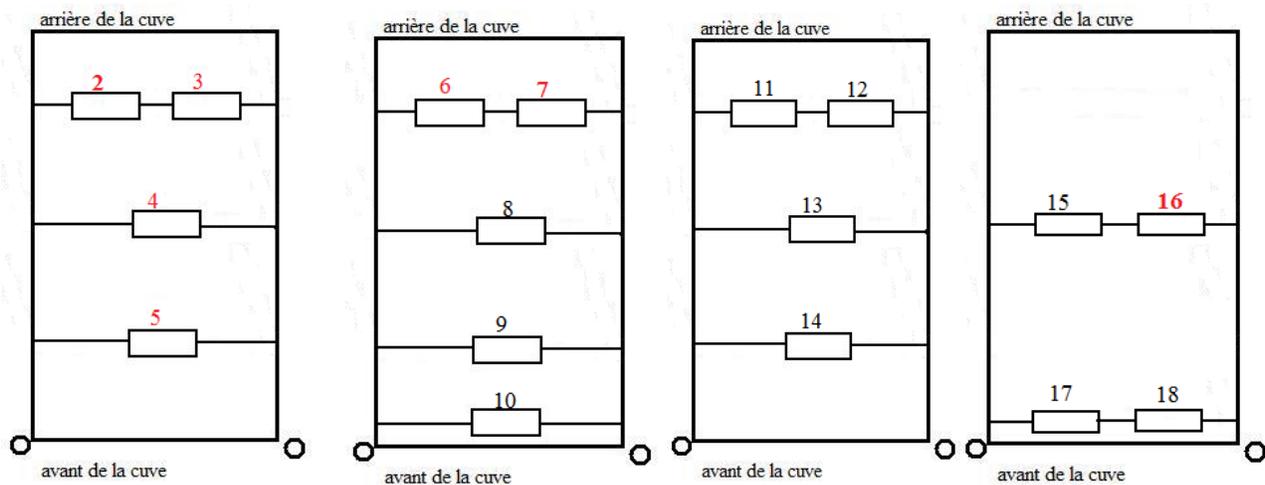
Selon les observations visuelles, lors de l'essai 1, cinq échantillons présentent des résidus de lactose. Lors de l'essai 2, quatre échantillons en présentent et lors de l'essai 3, cinq échantillons.

Selon les analyses TOC, sept échantillons lors de l'essai 1 ont des résultats supérieurs aux critères d'acceptation. Lors de l'essai 2, cinq échantillons et lors de l'essai 3, six échantillons ont des résultats hors spécifications.

Disposition des plaques en inox dans le lyophilisateur:

Les figures ci-dessous représentent la disposition des plaques en inox sur les plateaux du lyophilisateur (vus d'en-haut). La plaque n°1 se trouve devant en haut, à l'envers.

Les plaques numérotées en rouge ont des résultats concernant les analyses TOC supérieurs aux spécifications.



Figures 12, 13, 14 et 15: disposition des plaques sur les plateaux (de gauche à droite) : le plateau supérieur, le deuxième plateau, le troisième plateau et le plateau inférieur

Température et pression dans le lyophilisateur durant le lavage:

Le graphe suivant présente la température et la pression durant un cycle de lavage (essai 1). Les graphes des essais 2 et 3 se trouvent dans le rapport de qualification (PQ) du lyophilisateur (annexe 7).

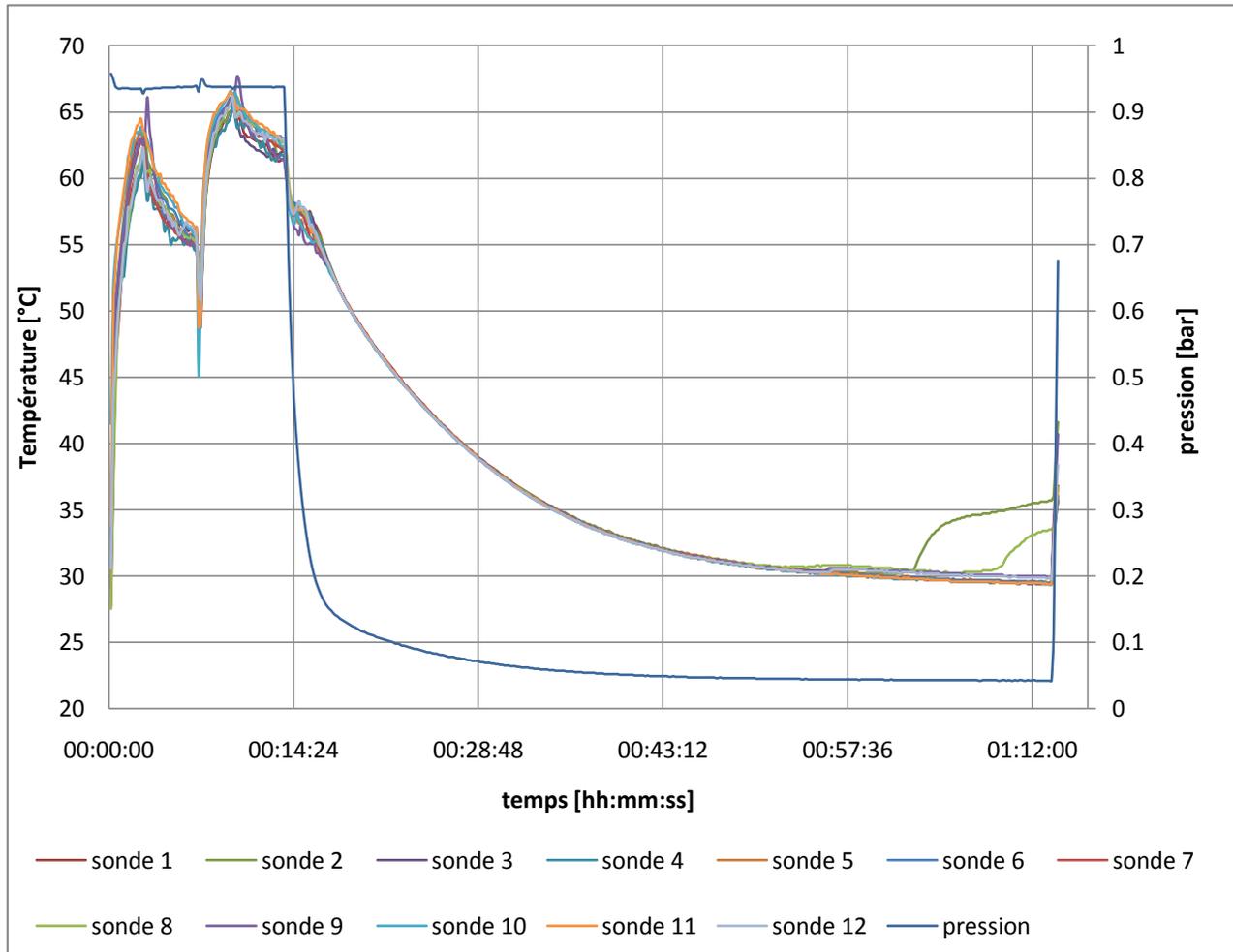


Figure 16: Graphe de la température et de la pression en fonction du temps durant le CIP (essai 1)

Le graphe suivant présente un agrandissement de la partie concernant la phase de lavage proprement dite, c'est-à-dire les deux cycles de rinçage/drainage durant l'essai n°1.

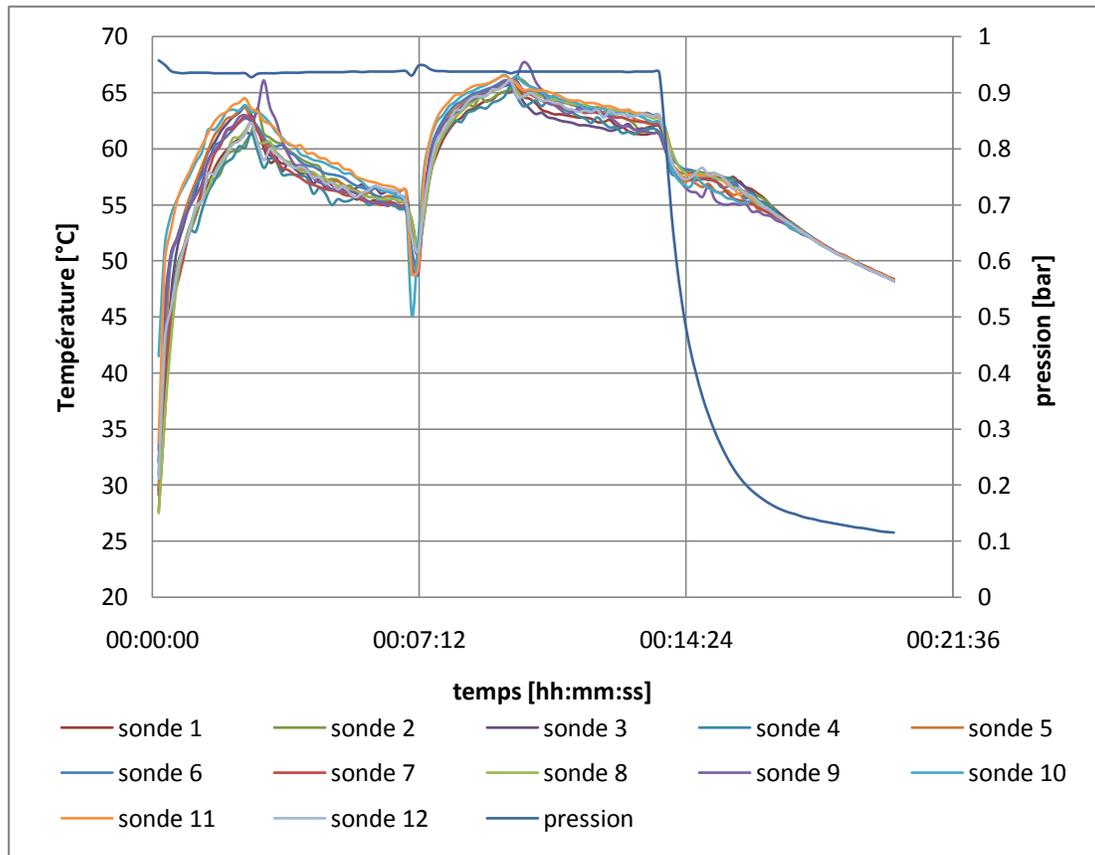
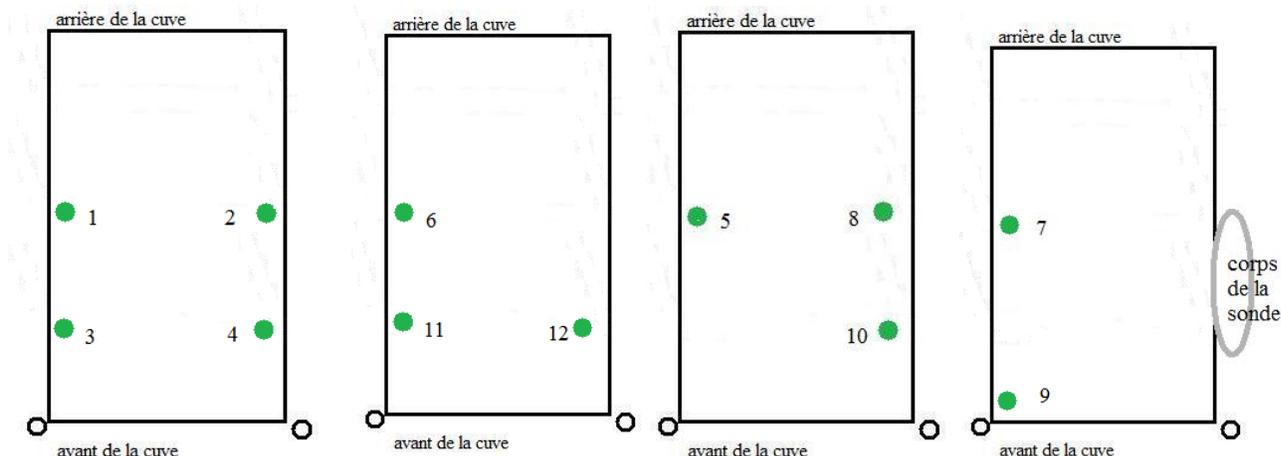


Figure 17: agrandissement du graphe de la température et de la pression en fonction du temps durant les deux cycles de rinçage/drainage (essai 1)

La température varie durant le cycle de lavage en fonction des différentes phases du cycle, avec un maximum lors de la deuxième phase de rinçage à 67.7°C.

Disposition des sondes de mesure de la température et de la pression :

Les figures 18 à 21 montrent la disposition des sondes de mesures de la température et de la pression lors des cycles de lavage pour la qualification du CIP sur les plateaux (vus d'en haut) du lyophilisateur.



Figures 18, 19, 20 et 21 : disposition des sondes de température sur les plateaux (de gauche à droite) : le plateau supérieur, le deuxième plateau, le troisième plateau et le plateau inférieur. La pression est mesurée au niveau du corps de la sonde.

Résultats de la qualification :

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus concernant la qualification du CIP. Il contient toutes les informations obtenues durant la qualification ainsi que le résultat de la conformité ou pas de celle-ci.

Tableau 5: Résumé des résultats concernant la qualification du CIP

Mesure	Principaux résultats	Conformité
Température	maximum : - essai 1 : 67.7 °C - essai 2 : 67.6 °C - essai 3 : 68.2 °C (cf figures 16 et 17)	conforme
Pression	(cf figures 16 et 17)	conforme
Observations visuelles	nombre de plaques présentant des résidus de lactose : - essai 1 : 5 plaques - essai 2 : 4 plaques - essai 3 : 5 plaques (cf tableau 4)	non-conforme
TOC	nombre d'échantillons ayant une valeur supérieure à 0.5 ppmC : - essai 1 : 7 échantillons - essai 2 : 5 échantillons - essai 3 : 6 échantillons (cf tableau 4)	non-conforme
La qualification du CIP est non-conforme.		

Palette d’observation visuelle de concentration :

Afin d’éviter de devoir effectuer de nombreuses et coûteuses analyses TOC (Total Organic Carbon), une palette de concentrations est effectuée afin d’obtenir des résultats visuellement. Le document contenant toutes les informations concernant la palette d’observation visuelle de concentrations se trouve dans l’annexe 8.

Recherche des causes de la non-conformité rencontrée lors de la qualification du CIP :

Les résultats des hypothèses concernant la non-conformité du CIP se trouvent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6: Présentation des résultats suite à l’investigation des problèmes rencontrés lors de la qualification du CIP

Problème	Certaines plaques en inox contaminées par la solution de lactose disposées dans le lyophilisateur lors d’un cycle de lavage présentent encore des résidus de lactose après le lavage.		
Hypothèse	<u>Hypothèse 1</u> : la disposition des plateaux n’était pas adaptée	<u>Hypothèse 2</u> : la sonde gênait le lavage	<u>Hypothèse 3</u> : le temps de lavage était trop court
Résolution du problème	La hauteur des plateaux est modifiée.	La sonde est enlevée.	Le temps de lavage est prolongé (3 cycles de rinçage/drainage au lieu de 2).
Observation visuelle des plaques disposées dans le lyophilisateur lors du lavage	n°3 et 6 : petite tache n°12, 15 et 16 : lactose visible	n°2 : lactose visible n°3 et 4 : tache d’aspect collant n°5 : faible tache n°16 : lactose visible	- 1 ^{er} essai : n°2, 3 et 7 : petites taches n°12 et 16 : tache d’aspect collant - 2 ^{ème} essai : n°2 : lactose visible n°3 et 4 : traces de lactose n°12 : tache d’aspect collant n°16 : lactose visible

Un problème est survenu lors de la vérification de l’hypothèse 1. Pour déplacer les plateaux, le corps de la sonde a été posé au-dessus du plateau supérieur. Lors du cycle de lavage, les plateaux sont descendus probablement à cause du poids du corps de la sonde. Le lavage en modifiant la hauteur des plateaux et sans la sonde n’a pas été effectué en raison des résultats obtenus précédemment qui démontrent que les plaques situées sur le plateau inférieur ont des résidus de lactose importants.

3.2.2 Sterilization-in-place (SIP)

Indicateurs biologiques :

Lors des trois cycles de stérilisation effectués pour la qualification du SIP, tous les indicateurs biologiques sont négatifs. La photographie ci-dessous montre un tube rempli de milieu de culture modifié contenant une languette disposée dans le lyophilisateur lors d'un cycle de stérilisation ainsi qu'un autre tube rempli de milieu de culture contenant une languette non disposée dans le lyophilisateur lors d'un cycle de stérilisation (témoin positif). Les tubes positifs deviennent jaunes, alors que les tubes négatifs restent violets.



Figure 22: Milieux de culture modifiés contenant une languette de spores de *Bacillus stearothermophilus*
à gauche : négatif à droite : positif

Température et pression dans le lyophilisateur durant la stérilisation :

Le graphe suivant montre la température et la pression durant la stérilisation lors du cycle n°1 effectué pour la qualification du SIP. Les graphes des essais n°2 et 3 se trouvent dans le rapport de qualification du lyophilisateur (annexe 7).

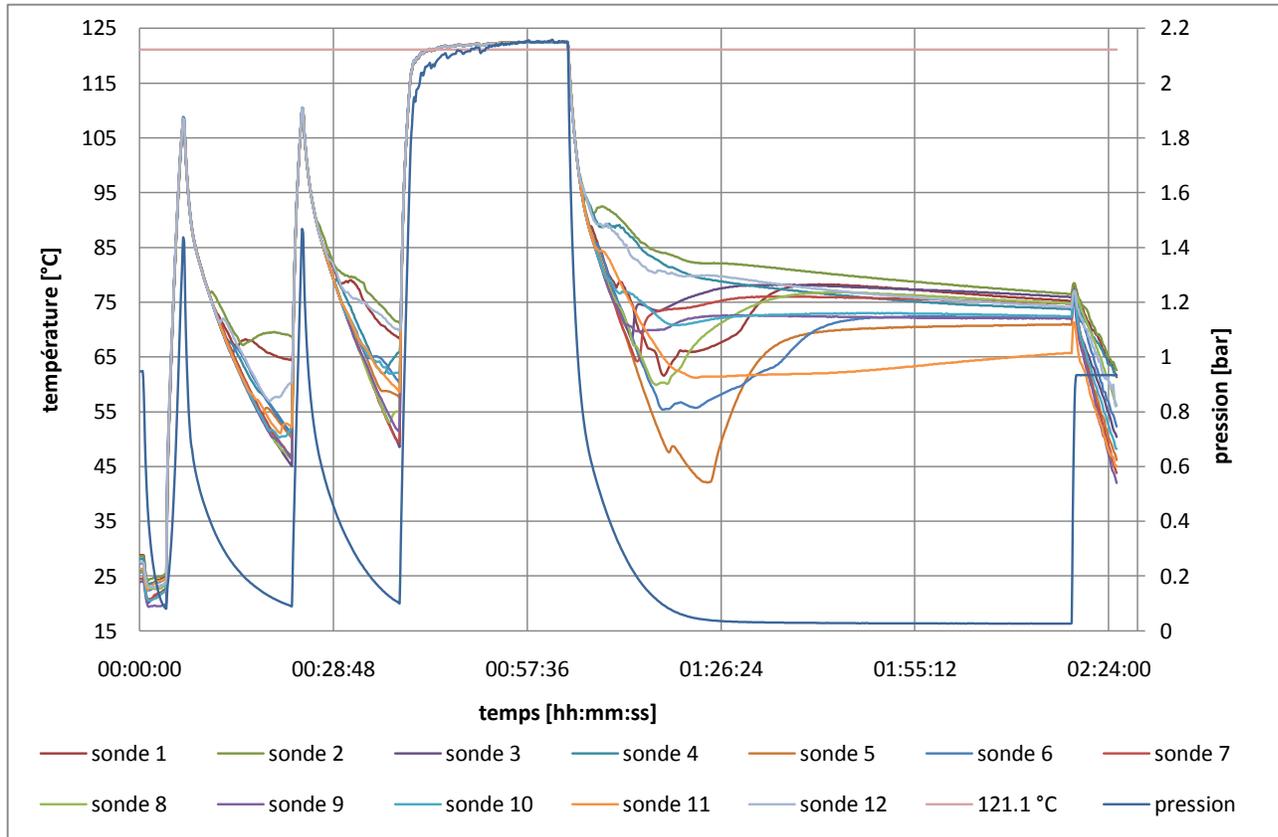


Figure 23: Graphe de la température et de la pression en fonction du temps au cours du cycle de stérilisation (essai n°1)

La figure 24 représente un graphe de la température au cours de la phase de stérilisation uniquement, lors d'un cycle de stérilisation (essai n°1). Les graphes correspondant aux essais n°2 et 3 se trouvent dans le rapport de qualification du lyophilisateur (annexe 7).

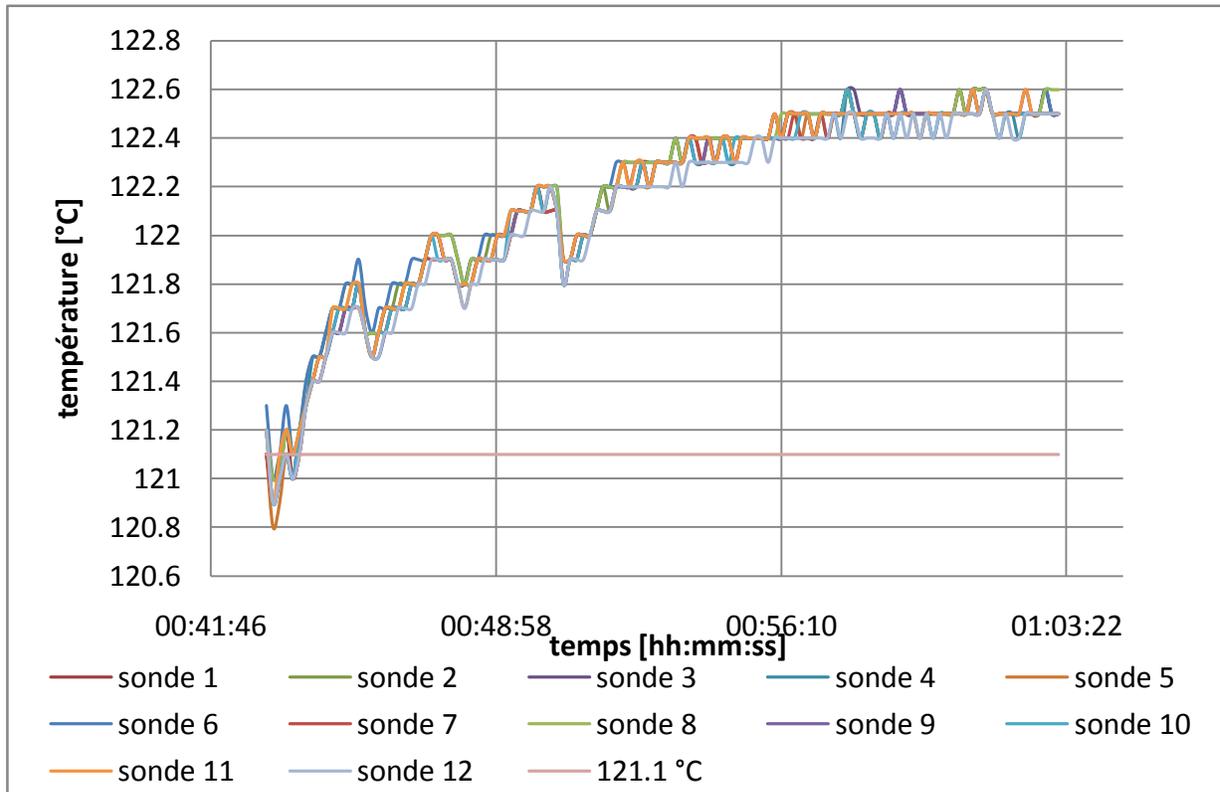
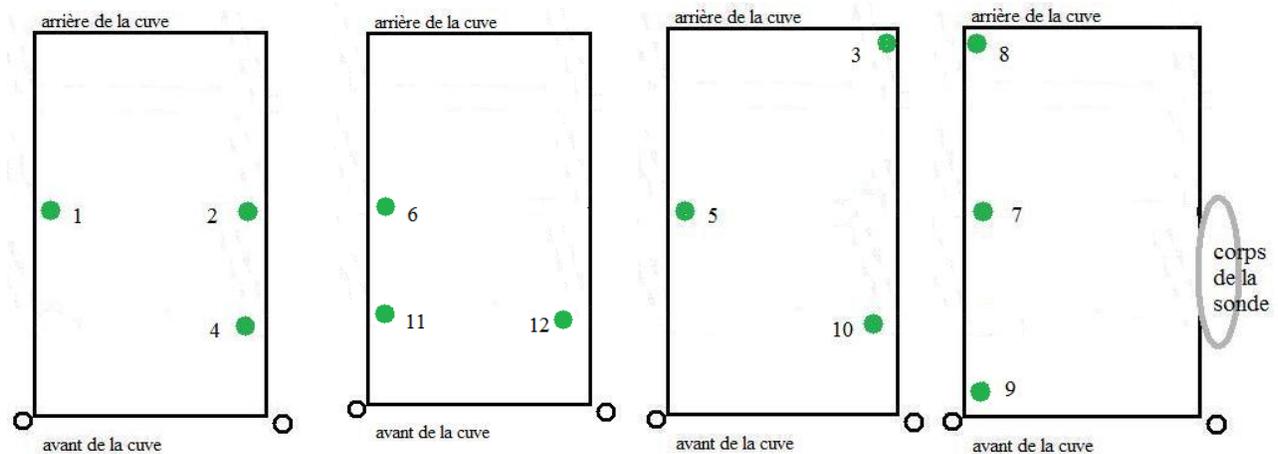


Figure 24: Graphe de la température en fonction du temps lors de la phase de stérilisation uniquement (essai 1)

La température est similaire pour toutes les sondes de mesures et atteint 122.6 °C durant la phase de stérilisation de 18 minutes.

Disposition des indicateurs biologiques et des sondes de mesures :

Les figures ci-dessous représentent la disposition des sondes de mesures de la température et de la pression ainsi que la disposition des indicateurs biologiques (chacun est associé à une sonde) sur les plateaux (vus d'en-haut) dans le lyophilisateur.



Figures 25, 26, 27 et 28: disposition des sondes de température et des indicateurs biologiques sur les plateaux (de gauche à droite) : le plateau supérieur, le deuxième plateau, le troisième plateau et le plateau inférieur. La pression est mesurée au niveau du corps de la sonde.

F₀:

Le F₀ a été calculé à l'aide du programme informatique StlgWin (programme informatique commandant les sondes de mesures de la température et de la pression).

Tableau 7: F₀ pour chaque cycle lors des trois cycles de stérilisation pour la qualification du SIP

F ₀ minimal attendu : 18 minutes												
n° de la sonde	F ₀ [min]											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SIP1	28.9	29.1	28.9	28.8	28.7	29.2	28.7	29.1	28.9	28.8	28.9	28.6
SIP2	28.7	28.9	28.7	28.6	28.5	28.8	28.5	28.8	28.7	28.6	28.7	28.3
SIP3	27.6	27.8	28	27.5	27.4	27.7	27.4	27.6	27.5	27.5	27.6	27.2

Résultats de la qualification :

Le tableau ci-dessous résume les principaux résultats concernant la qualification du SIP. La conformité de la qualification peut en être déduite.

Tableau 8: Résumé des principaux résultats concernant la qualification du SIP

Mesure	Principaux résultats	Conformité
Indicateurs biologiques	pas de croissance	conforme
Température	- <u>cycle 1</u> : maximum : 122.6 °C minimum pendant la phase de stérilisation : 120.8 °C - <u>cycle 2</u> : maximum : 122.6 °C minimum pendant la phase de stérilisation : 121. 0 °C - <u>cycle 3</u> : maximum : 122.6 °C minimum pendant la phase de stérilisation : 120.9 °C (cf figures 23 et 24)	conforme
Pression	(cf figure 23)	conforme
F ₀	cycle 1 : entre 28.6 et 29.1 minutes cycle 2 : entre 28.3 et 28.9 minutes cycle 3 : entre 27.2 et 28 minutes (cf tableau 7)	conforme
La qualification du SIP est conforme.		

Le rapport concernant la qualification du lyophilisateur rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 7. Il contient les données concernant le CIP ainsi que le SIP.

3.3 Validation du remplissage aseptique

Résultats des flacons de Media-fill :

Le tableau ci-dessous résume tous les résultats concernant la validation du remplissage aseptique. Il contient les résultats des flacons de 50 ml remplis avec 30 ml de milieu de culture ainsi que les résultats des flacons de 3 ml remplis avec 2 ml de milieu de culture.

Tableau 9: Résumé des observations des flacons de Media-fill pour la validation du remplissage aseptique du lyophilisateur

volume des flacons [ml]	essai n°	disposition des flacons	nombre de flacons conformes	nombre de flacons non-conformes	Résultat de l'étude
50	1	hors lyophilisateur	8	0	conforme
		1 ^{er} plateau	37	0	
		2 ^{ème} plateau	38	0	
		3 ^{ème} plateau	38	0	
		4 ^{ème} plateau	38	0	
	2	hors lyophilisateur	8	0	
		1 ^{er} plateau	38	0	
		2 ^{ème} plateau	37	0	
		3 ^{ème} plateau	38	0	
		4 ^{ème} plateau	32	0	
	3	hors lyophilisateur	8	0	
		1 ^{er} plateau	38	0	
2 ^{ème} plateau		38	0		
3 ^{ème} plateau		38	0		
4 ^{ème} plateau		38	0		
3	1	hors lyophilisateur	9	0	conforme
		1 ^{er} plateau	72	0	
		2 ^{ème} plateau	72	0	
		3 ^{ème} plateau	72	0	
		4 ^{ème} plateau	72	0	
	2	hors lyophilisateur	11	0	
		1 ^{er} plateau	72	0	
		2 ^{ème} plateau	72	0	
		3 ^{ème} plateau	72	0	
		4 ^{ème} plateau	72	0	
	3	hors lyophilisateur	11	0	
		1 ^{er} plateau	72	0	
2 ^{ème} plateau		72	0		
3 ^{ème} plateau		72	0		
4 ^{ème} plateau		72	0		
La validation du remplissage aseptique est conforme.					

Lors du premier lot avec les flacons de 50 ml, un flacon a été mal bouchonné. Il a été retiré du lot.

Lors du deuxième lot avec les flacons de 50 ml, 6 flacons se sont cassés dans le lyophilisateur. Un flacon a été mal bouchonné. Il a été retiré du lot.

Les flacons retirés des lots n'ont pas été pris en compte pour la validation.

Le septième jour d'incubation du troisième lot des flacons de 3 ml, une contamination a été observée. Une investigation a été faite afin de connaître la nature de cette contamination qui est en réalité une particule inerte (cf. chapitre 4.3, p.34).

Les figures ci-dessous représentent les flacons utilisés pour la validation du remplissage aseptique. L'image de droite représente un flacon de 50 ml remplis avec 30 ml de milieu de culture, l'image de gauche un flacon de 3 ml rempli avec 2 ml de milieu de culture.



Figure 29: flacon de 50 ml



Figure 30: flacon de 3 ml

Le rapport concernant la validation du remplissage aseptique du lyophilisateur rédigé pour la pharmacie du CHUV se trouve dans l'annexe 9.

4 DISCUSSION

4.1 Phase de développement pour la qualification du CIP (cleaning-in-place)

Le lactose est un diluant souvent utilisé dans les préparations lyophilisées [33] ce qui conduit à l'hypothèse qu'il serait possible d'en trouver dans la chambre et sur les plateaux du lyophilisateur en cas de projections lors du chargement du lyophilisateur et lors d'un cycle de lyophilisation. Le lactose étant un composé facilement oxydable, il peut être détecté par la méthode TOC.

Taux de recouvrement des échantillons :

Il est observé grâce au tableau 2 que la méthode de reconstitution des échantillons est une méthode adéquate. Les résultats sont compris entre 91.5 et 106.4 % de recouvrement.

Disposition des plaques en inox dans le lyophilisateur :

Les plaques en inox sont disposées dans le lyophilisateur selon les figures 8 à 11 afin de couvrir différents endroits dans le lyophilisateur. Cela permet de déterminer si certains points sont mal lavés ou pas.

Analyses TOC :

Lors du premier lavage effectué avec les dix-huit plaques en inox disposées dans la cuve du lyophilisateur, un seul cycle de rinçage/drainage est effectué. Les résultats des analyses TOC démontrent que cela n'est pas suffisant, mais que la méthode choisie est sensible, car elle permet de mettre en évidence des zones où le lavage ne semble pas satisfaisant.

Il est donc décidé de procéder à la qualification du CIP en effectuant deux cycles de rinçage/drainage (trois cycles de rinçage/drainage étant le lavage effectué en routine, deux cycles correspondent par conséquent à un « worst-case »).

4.2 Qualification du lyophilisateur

4.2.1 Cleaning-in-place (CIP)

Observations visuelles et analyses TOC :

Il est observé que la cuve est humide après chaque cycle de lavage. Même un temps de séchage prolongé ne résout pas le problème. Après plusieurs essais, il a pu être observé que la cuve ne peut être séchée qu'en effectuant un cycle de stérilisation après chaque cycle de lavage. Malgré le fait que la cuve soit humide après un cycle de lavage, la cuve est visuellement propre. Cependant, le fond de la cuve en particulier présente une étendue d'eau. Il peut être supposé qu'un risque non négligeable de prolifération de micro-organismes dans l'eau stagnante est possible. Pour cette raison, un cycle de lavage est toujours suivi d'un cycle de stérilisation afin de sécher totalement la cuve du lyophilisateur.

Lors des trois essais effectués pour la qualification du CIP, certaines plaques présentent des résidus de lactose visible à l'œil nu. La présence de lactose est confirmée par les analyses TOC qui conduisent à des valeurs supérieures à la limite de 0.5 ppmC. Les

plaques présentant des résidus de lactose sont identiques lors des trois essais. Ce sont les plaques disposées sur le plateau supérieur ainsi qu'une plaque sur le plateau inférieur, au centre à droite.

Les taux de recouvrement calculés précédemment ne permettent pas d'expliquer les valeurs largement supérieures à 0.5 ppmC. De plus, les observations visuelles et les analyses TOC sont corrélées et permettent de se confirmer l'une avec l'autre.

Disposition des buses dans le lyophilisateur :

La disposition des seize buses du lyophilisateur est étudiée. Huit buses se trouvent à gauche et à droite des plateaux, selon la même disposition. De chaque côté, trois buses fixées horizontalement permettent de laver la surface des plateaux et les autres buses sont orientées de biais (vers le haut ou vers le bas). Le nombre de plateaux étant de quatre, il aurait été judicieux d'avoir quatre buses fixées horizontalement afin d'avoir une buse horizontale en face de chaque plateau après, éventuellement, avoir changé leur hauteur.

La photographie ci-dessous permet de visualiser les buses à l'entrée droite de la cuve du lyophilisateur.



Figure 31: buses situées à l'avant de la cuve du lyophilisateur

Température et pression dans le lyophilisateur durant le lavage :

Les figures 16 et 17 représentent la température dans la chambre durant le cycle de lavage de l'essai n°1 réalisé pour la qualification. Les différentes phases du cycle sont identifiables. Tout d'abord, la température augmente jusqu'à 66.1 °C durant le premier rinçage. Elle diminue ensuite durant la phase de drainage jusqu'à 56.1 °C. Le deuxième rinçage permet d'augmenter la température dans la cuve jusqu'à 67.7°C. Durant le deuxième drainage suivi du séchage, la température diminue progressivement uniformément dans toute la cuve. Les températures mentionnées sont les valeurs maximales mesurées durant la phase respective du lavage.

L'eau hautement purifiée est chauffée à 80°C avant d'être projetée dans le lyophilisateur. Néanmoins, cette température n'est pas atteinte lors du cycle de lavage dans la chambre. Les sondes mesurent la température dans l'air et pas la température de l'eau proprement dite à moins que de l'eau gicle la sonde. Il serait intéressant de pouvoir mesurer la température de l'eau à la sortie des buses. Il y a également un effet d'inertie dû au

réchauffement des conduites inox du CIP et de la cuve qui se trouvent à température ambiante au début du cycle.

Malgré cela, une faible corrélation entre la température et les zones moins bien lavées a été observée. En effet, les sondes fixées sur le plateau supérieur mesurent une température légèrement plus basse de 5° C environ que les autres sondes. Les plaques fixées sur ce plateau présentent des résultats des analyses TOC supérieurs aux valeurs de 0.5 ppmC. De plus, il est observé qu'aucune buse horizontale n'est disposée de manière à projeter de l'eau sur ce plateau. Cependant, concernant la plaque n°16 présentant le plus de résidus de lactose, aucune corrélation ne peut être faite, aucune sonde de mesure de la température n'ayant été disposée à proximité.

Les figures 16 et 17 représentent la pression dans la chambre durant le cycle de lavage. Durant les deux cycles de rinçage/drainage, la pression dans la chambre est semblable à la pression atmosphérique (environ 950 mb). Ensuite, il est observé une diminution de la pression. Cela correspond au début de la phase de séchage. A ce moment, la température mesurée par les sondes diminue.

Résultats de la qualification :

Les résultats concernant la qualification du CIP conduit à la non-conformité de celle-ci. En effet, lors de l'observation visuelle des plaques, des résidus de lactose sont visibles ce qui est confirmé ensuite par les analyses TOC.

Recherche des causes de la non-conformité rencontrée lors de la qualification du CIP :

Une investigation des problèmes est faite. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer pourquoi certaines plaques présentent des résidus de lactose.

1. Premièrement peut-être que la hauteur des plateaux n'était pas adéquate. En effet, les plateaux peuvent être déplacés pour permettre le bouchonnage des flacons lors d'un cycle de lyophilisation.
2. Deuxièmement, peut-être que le corps ainsi que les fils de la sonde mesurant la température et la pression gênait le lavage.
3. Troisièmement, l'hypothèse la plus probable, peut-être que le temps de lavage était trop court. En effet, il est observé grâce aux figures 16 et 17 (graphes de la température en fonction du temps au cours du cycle de lavage) que la température dans la cuve augmente en fonction du temps et en fonction du nombre de cycle de rinçage/drainage. Peut-être que si un troisième cycle de rinçage/drainage est effectué, le lavage sera plus efficace.

Palette d'observation visuelle de concentrations :

Dans la littérature, il est mentionné que l'évaluation du lavage peut également être réalisée visuellement tout en ayant des résultats satisfaisants [34]. Pour cette raison et pour des soucis d'économies, il est décidé de réaliser une palette d'observation visuelle de concentrations.

Des solutions de lactose monohydraté de concentrations croissantes sont préparées puis disposées sur les plaques en inox qui sont mises à l'étuve. Des photographies des

plaques sont prises afin d'avoir des résultats visuels lors des prochains tests. Les échantillons sont ensuite reconstitués dans des tubes en verre de 40 ml afin de les analyser par la méthode TOC.

Il est possible de remarquer que les plaques contaminées avec une solution conduisant à une valeur inférieure à la limite de détection (0.5 ppm) après dilution dans 40 ml (après reconstitution des échantillons dans les tubes) ont une tache très faible, presque pas visible à l'œil nu. Le fait de prendre une photographie avec le flash permet de visualiser la présence d'une tache ou pas.

Résultats de l'investigation des causes de la non-conformité du CIP :

L'investigation des problèmes rencontrés lors de la validation du lavage a conduit aux observations suivantes :

1. Un lavage (deux cycles de rinçage/drainage) est effectué en modifiant la hauteur des plateaux. Les plaques situées sur les deux plateaux inférieurs contiennent des résidus de lactose. Le problème est déplacé aux plateaux inférieurs.
2. Un lavage (deux cycles de rinçage/drainage) est effectué sans la sonde de mesure de la température. Aucun changement n'est observé par rapport aux cycles de lavage effectués en présence de la sonde.
3. Un lavage plus long (trois cycles de rinçage/drainage) est effectué. Certaines plaques présentent des résidus de lactose. Le résultat est confirmé par un second lavage de trois cycles.
Cependant, par manque de temps, les sondes de mesures de la température et de pression ne sont pas disposées dans le lyophilisateur lors d'un lavage avec trois cycles de rinçage/drainage ce qui ne permet pas de vérifier l'hypothèse d'augmentation de la température.

Il est remarqué que deux plaques en particulier (n°12 et 16) sont mal lavées lors des différents essais. Cela peut être dû à leur disposition dans le lyophilisateur. La plaque n°12 se trouve sur le plateau supérieur au fond à droite et la plaque n°16 sur le plateau inférieur au milieu à droite. Il est donc constaté un problème de lavage à ces endroits.

L'investigation des problèmes rencontrés lors de la qualification du CIP permet de conclure que la cause de la non-conformité provient du nombre et/ou de l'orientation des buses du CIP.

D'autres observations ont été faites lors de cette qualification. En particulier, la cuve d'eau hautement purifiée se vide trop rapidement lors d'un cycle de lavage du lyophilisateur en mettant en alarme le système de production d'eau. Cela est probablement dû au fait qu'un volume d'eau trop grand est injecté dans le lyophilisateur pendant un temps trop court.

Une amélioration du lavage peut être réalisée en augmentant le nombre de buses fixées horizontalement ou en équipant le CIP de buses à têtes pivotantes afin de les orienter vers les endroits moins bien lavés. De plus, pour éviter la vidange trop rapide de la cuve d'eau hautement purifiée, il faudrait équiper le CIP de buses à orifice plus petit afin d'augmenter la pression de cyclage et de réduire le débit.

En attendant que d'autres investigations et modifications sur le lyophilisateur soient réalisées, la qualification du CIP est non-conforme.

Observations complémentaires :

Lors des essais réalisés, un phénomène de corrosion à l'intérieur du lyophilisateur a été observé. La figure ci-dessous le représente.



Figure 32: conduits à l'intérieur du lyophilisateur présentant un phénomène de corrosion

Ce phénomène est connu sous le nom de « rouging » à cause de l'apparition d'une coloration rouge de l'inox [35]. Il est souvent observé lors d'appareillage utilisant de l'eau hautement purifiée chauffée ou de la vapeur d'eau. Cela peut induire une dégradation du matériel ainsi que la génération de particules [35]. De plus, le fait que la cuve du lyophilisateur ne soit pas complètement sèche après un cycle de lavage contribue à augmenter le risque de survenue de ce phénomène. Il a également été remarqué dans la littérature [36] que le « rouging » peut induire la formation d'un biofilm sur les surfaces concernées. Ceci ajouté au risque de prolifération de micro-organismes dans l'eau stagnante amène à dire qu'il est absolument nécessaire de procéder à un cycle de stérilisation directement après un cycle de lavage.

Cependant, aucun moyen d'éviter ou de résoudre l'apparition de ce phénomène n'a été trouvé dans la littérature. Il est donc difficile de savoir exactement comment éviter la survenue de « rouging » sur l'inox.

4.2.2 Sterilization-in-place (SIP)

Indicateurs biologiques :

Tous les indicateurs biologiques ayant été disposés dans la cuve du lyophilisateur et mis à incuber étant négatifs, il peut être déduit que la stérilisation de la cuve a bien fonctionné. Les indicateurs biologiques ont été disposés dans le lyophilisateur en les laissant dans leur emballage. La vapeur devant passer à travers le papier d'emballage pour stériliser les indicateurs biologiques, la qualification est réalisée dans des conditions « worst-case ».

Température et pression dans le lyophilisateur durant la stérilisation :

Les figures 23 et 24 représentant la température en fonction du temps durant le cycle de stérilisation montrent que la température requise de 121.1 °C a été atteinte pendant 18

minutes au moins. Très peu de variations entre les différentes sondes de mesure de la température disposées à différents endroits dans la cuve ont été observées. La température est homogène dans la chambre du lyophilisateur.

F₀:

Le F₀ mesuré est compris entre 28.6 et 29.1 minutes pour l'essai 1 (les deux autres essais sont semblables). La durée du cycle minimale prédéterminée comme « worst-case » étant de 18 minutes, les exigences sont donc remplies. Cela signifie que la durée minimale pour effectuer la stérilisation est dépassée.

Résultats de la qualification :

Ces observations permettent de conclure que la stérilisation s'est déroulée dans de bonnes conditions. Tous les critères d'acceptation de la qualification cités dans le protocole de qualification du SIP (le protocole du SIP se trouve dans l'annexe 4) ont été accomplis.

La qualification du SIP (sterilization-in-place) du lyophilisateur CS15-1 est conforme.

4.3 Validation du remplissage aseptique

Résultats des flacons de Media-fill :

Aucune contamination n'a été détectée lors de la validation du remplissage aseptique réalisée avec les flacons de 50 ml. Cette validation est donc conforme.

Cependant, une déviation a été observée durant cette validation. En effet, six flacons disposés sur le plateau inférieur au centre à droite (à proximité d'un montant) se sont cassés dans le lyophilisateur durant le bouchonnage des flacons.

Une investigation est faite concernant l'abaissement des plateaux. Le plateau inférieur est fixe, les autres plateaux étant abaissés l'un après l'autre. Cela conduit à penser qu'un renforcement du plateau inférieur est nécessaire. En effet, ce plateau n'a pas de support au-dessous de lui. Lors de l'abaissement des plateaux afin de permettre le bouchonnage des flacons, le plateau inférieur subit une force élevée. N'ayant qu'une paire de montant au centre, les deux extrémités du plateau sont sujettes à un voilage ce qui peut conduire à l'endommagement du plateau inférieur et à la casse de flacons.

Lors de la validation réalisée avec les flacons de 3 ml, une contamination a été observée au septième jour d'incubation. Tout d'abord, une contamination par une moisissure est suspectée. Le flacon contaminé est conservé et incubé avec les autres flacons à 34 °C. Cependant, aucune croissance n'est observée jusqu'au quatorzième jour d'incubation et aucun autre flacon contaminé n'est observé. Pour ces raisons, une investigation plus approfondie quant à la nature de cette contamination est faite. La contamination est prélevée à l'aide d'une seringue et déposée sur une lame. Une coloration au bleu de lactophénol est réalisée ce qui permet de colorer en bleu les structures des champignons, en particulier leurs parois cellulaires [37]. Lors de l'observation microscopique de la préparation (grossissement de 40x), aucune structure caractéristique d'une moisissure n'est observée. La particule observée est inerte ce qui conduit à rejeter que la contamination soit une moisissure.

Grâce à cette investigation, la validation du remplissage aseptique avec les flacons de 3 ml est conforme.

La validation du remplissage aseptique, du chargement du lyophilisateur et du maintien de l'asepsie durant la lyophilisation est conforme.

Cependant, des investigations quant à la provenance de la particule inerte doivent être réalisées. Celles-ci ne sont pas effectuées par manque de temps. Mais, l'hypothèse concernant un problème durant le lavage des flacons à la machine-à-laver ou lors de leur manipulation avant dépôt dans les boîtes métalliques est possible.

De plus, un filtre hydrophobe utilisé normalement durant un cycle de lyophilisation n'a pas pu être mis en place durant la validation, une pièce étant manquante. Le risque de contamination particulaire causé par la non-utilisation de ce filtre ne peut pas être négligé.

Un produit lyophilisé contenant une contamination par une particule inerte ne cause pas de graves préjudices. En effet, lors de la reconstitution du produit avant administration au patient, si une particule est observée, le produit est rejeté et n'est pas administré.

Améliorations à mettre en place pour la prochaine validation :

Néanmoins, des améliorations possibles pour une prochaine validation sont à évaluer.

Elles sont listées ci-dessous.

- Le personnel procédant à la validation du remplissage aseptique doit être qualifié et son habillement doit être validé.
- Avant de commencer le remplissage aseptique, lors du lavage des flacons à la machine à laver, conserver un nombre de flacons à déterminer afin de pouvoir procéder aux tests suivants sur les flacons vide :
 - Test de stérilité selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.6.1
 - Essai des endotoxines bactériennes selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.6.14 (la méthode utilisée au CHUV est la méthode de chromocinétique)
 - Contamination particulaire : particules non visibles selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.9.19
- Emballer les boîtes contenant les flacons dans un triple emballage (1^{er} enlevé : passage dans le sas de transfert ; 2^{ème} enlevé : passage dans la zone ; 3^{ème} enlevé : passage sous le flux laminaire)
- Utiliser une boîte adaptée aux flacons de 3 ml ou mettre les flacons dans le couvercle. (En effet, il a été observé lors du remplissage à l'aide de la pompe qu'il était difficile de remplir convenablement les flacons situés à proximité des bords de la boîte.)
- Utiliser un statif inoxydable afin d'éviter le relargage de particules dans la zone aseptique.
- Utiliser un impacteur (appareil « Air idéal », contenant une plaque de sédimentation et permettant de filtrer 1000 litres d'air pendant 10 minutes).
- Utiliser un appareil mesurant le nombre de particules non-viables dans la zone durant le travail.
- Utiliser des géloses de contact pour l'habillement du personnel une fois que le travail est terminé.
- Lors de la mise en incubation des flacons contenant le milieu de culture, il serait judicieux d'incuber des témoins positifs en même temps (un témoin contenant une moisissure/*Aspergillus niger* et un témoin contenant des bactéries aérobies/*Staphylococcus aureus*), ceci afin de permettre de prouver que les conditions d'incubation sont adéquates.

- Lors de l'observation des flacons contenant le milieu de culture, il pourrait être judicieux d'avoir une observation réalisée par deux personnes afin d'avoir un contrôle. En effet, la particule inerte a été observée après le septième jour ce qui a conduit à l'hypothèse d'une contamination par une moisissure. Si la contamination avait été observée dès le début de l'incubation, l'hypothèse quant à l'identité de la contamination aurait probablement été différente.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de constater le temps et les ressources nécessaires à une qualification et une validation. La phase de développement a permis de rédiger les protocoles de qualification de performance (PQ) pour le CIP et le SIP et de mettre en place un mode d'emploi concernant l'utilisation du lyophilisateur pour ces deux systèmes, aucun mode d'emploi n'étant disponible. Beaucoup de temps et d'argent sont nécessaires pour les qualifications d'équipements déjà coûteux, mais cela est nécessaire afin d'apporter une preuve que les systèmes automatiques fonctionnent comme attendu et que les opérations manuelles critiques sont réalisées conformément aux BPF.

Bien que le procédé de stérilisation soit conforme, le lavage conduit à une non-conformité. La méthode utilisée pour la qualification du lavage est adéquate, car elle s'est révélée suffisamment sensible pour mettre en évidence une zone insuffisamment lavée de la cuve. De plus, une corrélation entre les observations visuelles et les analyses TOC a pu être constatée. Pour cette raison, une palette d'observation visuelle de concentrations est réalisée. Un document contenant une corrélation entre des photographies de plaques contaminées avec différentes concentrations de lactose et des analyses TOC est rédigé. Cela permettra de diminuer les dépenses pour les prochaines qualifications en réduisant le recours à des analyses TOC.

La validation du remplissage aseptique et le chargement du lyophilisateur est conforme. Cependant, des tests et essais supplémentaires à réaliser durant la validation ont été notés après le début de la validation ce qui n'a pas permis de les y inclure. De plus, des améliorations doivent être mises en œuvre pour réduire les risques de contamination lors du remplissage et pour faciliter le chargement et le déchargement du lyophilisateur.

Les buts de ce travail ne sont donc que partiellement atteints. Le CIP est toujours non-conforme malgré les investigations réalisées. Les modifications proposées n'ont pas pu être effectuées par manque de temps. Une amélioration du lavage pourrait être de changer les buses à l'intérieur du lyophilisateur.

Les perspectives pour l'avenir de l'utilisation du lyophilisateur seraient de procéder à un renforcement du plateau inférieur, à la mise à jour du processeur automate et à la modification des buses avant de refaire la qualification du CIP. Il pourrait également être judicieux de procéder à la calibration des trois sondes permettant de mesurer la température dans le produit durant un cycle de lyophilisation. En effet, des différences de mesure ont été observées entre ces sondes et les mesures de la sonde pieuvre.

Une fois les changements effectués et la qualification du CIP conforme, il est conseillé de refaire la qualification du SIP. En effet, les BPF recommandent de requalifier l'équipement après des modifications de l'équipement.

En cas de changement des buses, il est nécessaire de refaire trois cycles de stérilisation en présence d'indicateurs biologiques. En effet, les buses sont également utilisées pour l'injection de vapeur dans la cuve lors de la stérilisation.

Les documents étant déjà rédigés et la phase de développement étant déjà réalisée, le temps pour la mise en place des essais de requalification du lyophilisateur devrait être réduit.

Une fois la qualification de performance (PQ) du lyophilisateur conforme, il est conseillé de revalider le remplissage aseptique et le chargement du lyophilisateur en tenant compte des nombreuses améliorations mentionnées. Cependant, la validation peut être réalisée uniquement avec les flacons de 3 ml, car la Pharmacie centrale du CHUV produit en particulier des médicaments lyophilisés dans ce type de flacons.

Une qualification et une validation permettent d'accorder une certaine confiance à la performance effective des équipements et des procédés. Cependant, cela ne remplace pas les contrôles visuels et mécaniques devant être réalisés après un lavage et une stérilisation réalisés avant d'effectuer un cycle de lyophilisation.

Par la suite, il sera nécessaire de procéder périodiquement à une requalification (PQ) du lyophilisateur CS15-1 et une revalidation du remplissage aseptique des flacons et du chargement du lyophilisateur dans un souci constant de satisfaire aux bonnes pratiques de fabrication et d'obtenir des médicaments de bonne qualité.

6 BIBLIOGRAPHIE

1. Przic, D.S., et al., *Lyophilization - The Process and Industrial Use*. Chem. Ind., 2004. **58**(12): p. 552-562.
2. Tang, X., et al, *Review: Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 191-200.
3. Alexeenko, A.A., et al., *Computational Analysis of Fluid Dynamics in Pharmaceutical Freeze-Drying*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(9): p. 3483-3494.
4. Le Hir, A., *Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication*. 1991, Masson: Paris.
5. Rey, L., and May, J. C., ed. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. Drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 137. 2004, Informa Healthcare: New-York.
6. Ratti, C., *Hot air and freeze-drying of high-value food: a review*. Journal of Food Engineering, 2001. **49**: p. 311-319.
7. Pikal, M.J., *Freeze Drying* Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Third Edition, 2006: p. 1807 - 1833.
8. PIC/S, *GUIDE TO GOOD PRACTICES FOR THE PREPARATION OF MEDICINAL PRODUCTS IN HEALTHCARE ESTABLISHMENTS (PE 010-3)*. 1 October 2008.
9. PIC/S, *Recommendations on VALIDATION MASTER PLAN, INSTALLATION AND OPERATIONAL QUALIFICATION, NON-STERILE PROCESS VALIDATION, CLEANING VALIDATION (PI 006-3)*. 25 september 2007.
10. PIC/S, *Recommendation on the VALIDATION OF ASEPTIC PROCESSES (PI 007-5)*. 1 July 2009.
11. Ermer, J., ed. *Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice*. 2005, Wiley- VCH.
12. Chow, S.-C., and Liu, J.-P., *Statistical Design and Analysis in Pharmaceutical Science*. 1995, Dekker: New York.
13. Yang, P., et al., *Method Development of Swab Sampling for Cleaning Validation of a Residual Active Pharmaceutical Ingredient*. Pharmaceutical Technology, 2005: p. 84-94.
14. Westmann, L., et al., *Methods for Detecting Residues of Cleaning Agents During Cleaning Validation*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2000. **54**(5): p. 365-372.
15. Fourman, G., et al., *Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations*. Pharmaceutical Technology, 1993 (april): p. 54-60.
16. DeSantis, F., et al., *Aseptic Formulation and Filling Using Isolator Technology*. Pharmaceutical Technology, 2003: p. 32-42.
17. Le Vacon, F., *Qualification des matériels*. Transfusion Clinique et Biologique, 2005. **12**: p. 200-204.
18. Amer, G., *An Overview of Process Validation (PV)*. Pharmaceutical Engineering, 2000: p. 62-76.
19. Jatto, E., and Okhamafe, A. O., *An Overview of Pharmaceutical Validation and Process Controls in Drug Development*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2002. **1**(2): p. 115-122.

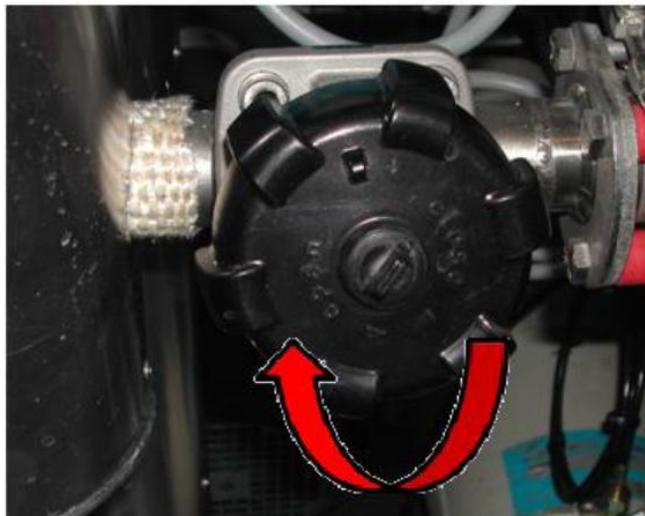
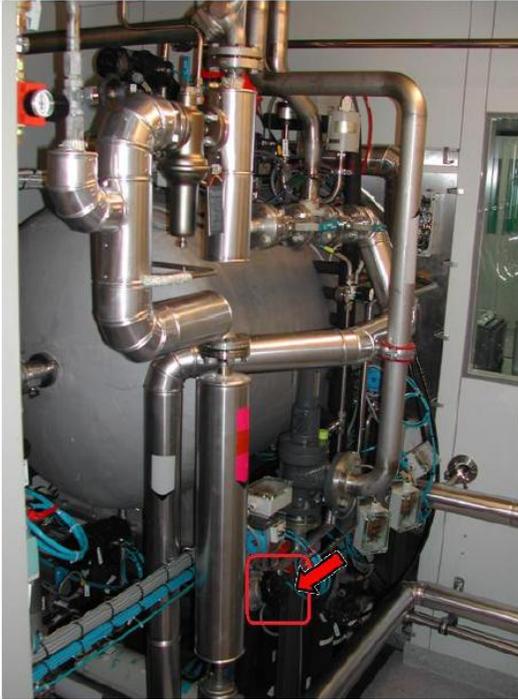
20. Rathore, A.S., et al., *ProcessValidation: How Much to Do and When to Do It*. BioPharm, 2002: p. 18-28.
21. Agalloco, J., et al., *Aseptic Processing: A Review of Current Industry Practice*. Pharmaceutical Technology, October 2004: p. 126-150.
22. Cundell, A.M., *Microbial Testing in Support of Aseptic Processing*. Pharmaceutical Technology, June 2004: p. 56-66.
23. Isanhart, C.M., et al., *Parenterals Laboratory Course to Reduce Microbial Contamination Rates in Media Fill Tests Performed by Pharmacy Students*. American Journal of Pharmaceutical Education, 2008. **72**(2): p. 1-4.
24. Roganti, F., and Boeh, R. J. , *Design of an Aseptic Process Simulation*. Pharmaceutical Technology, September 2004: p. 76-84.
25. Trissel, A.L., et al., *Using a medium-fill simulation to evaluate the microbial contamination rate for USP medium-risk-level compounding*. American Society of Health-System Pharmacists, 2005. **62**: p. 285-288.
26. Uratani, B., and Friedman, R. L., *The Development of FDA's Guidance on Aseptic Processing*. Pharmaceutical Technology, 2003: p. 8-11.
27. Jenkins, K.M., et al., *Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 1996. **50**(1): p. 6-15.
28. Gavlick, W.K., et al., *Analytical Strategies for Cleaning Agent Residue Determination*. Pharmaceutical Technology, 1993 (march): p. 136-144.
29. Wallace, B., et al., *Implementing Total Organic Carbon Analysis for Cleaning Validation*. Pharmaceutical Technology, 2004: p. 40-43.
30. Junker, B., *Technical Evaluation of the Potential for Streamlining of Equipment Validation for Fermentation Applications*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **74**(1): p. 49-61.
31. Agalloco, J., et al., *Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Revised 2007. **61**(S-1).
32. Wang, W., *Review: Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **203**: p. 1–60.
33. Rowe, C.R., Sheskey, P. J., and Weller, P. J., *Handbook of pharmaceutical Excipients, Fourth Edition*. 2003, Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association. p. 323-332.
34. Forsyth, R.J., et al., *Visible-Residue Limit for Cleaning Validation and its Potential Application in a Pharmaceutical Research Facility*. Pharmaceutical Technology, 2004. **28**(10): p. 58-73.
35. Dong, X., et al., *Investigation of Stainless Steel Corrosion in Ultrahigh-Purity Water and Steam Systems by Surface Analytical Techniques*. Journal of Materials Engineering and Performance, 2010. **19**(1): p. 135–141.
36. Hyde, F.W., M. Alberg, and K. Smith, *Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997. **19**(2): p. 142-149.
37. Leck, A., *Preparation of Lactophenol Cotton Blue Slide Mounts*. Community Eye Health, 1999. **12**(30): p. 24.

7 ANNEXES

- Annexe 1 : Deux pages d'exemple du Mode d'emploi du Lyophilisateur CS15-1
- Annexe 2 : Plan Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 (A-1055)
- Annexe 3 : Protocole PQ CIP (Cleaning-in-place) – Lyophilisateur CS15-1 (A-1056)
- Annexe 4: Protocole PQ SIP (sterilization-in-place) – Lyophilisateur CS15-1 (A-1057)
- Annexe 5 : Protocole de validation du remplissage aseptique du lyophilisateur CS15-1 (A-1059)
- Annexe 6 : Rapport de développement
- Annexe 7 : Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1 (A-1060)
- Annexe 8 : Palette d'observation visuelle de concentrations
- Annexe 9 : Rapport de validation du remplissage aseptique du lyophilisateur CS15-1 (A-1062)

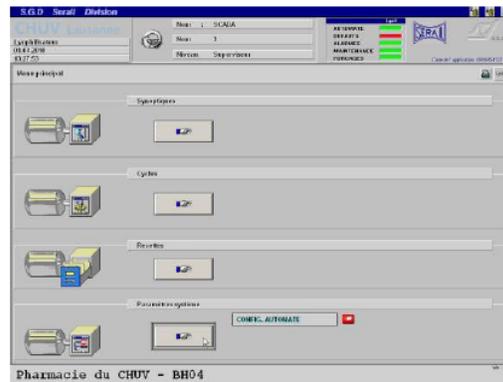
Annexe 1 : Deux pages d'exemple du Mode d'emploi du Lyophilisateur CS15-1

- **Pour lancer un cycle de lavage :**
!! Avant de commencer un cycle de lavage, vérifier que la vanne noire de vapeur soit fermée !! cf photo ci-dessous

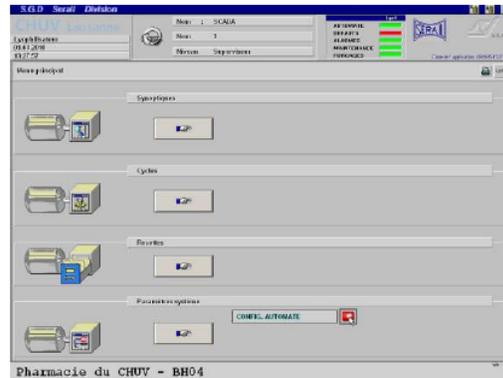


- Pour modifier des paramètres de CIP (cleaning-in-place) ou SIP (sterilization-in-place), cliquer sur la main sous « Paramètres système ».

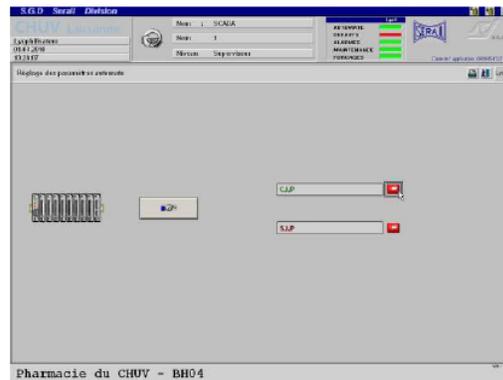
Ces modifications sont à effectuer avant le départ d'un cycle.



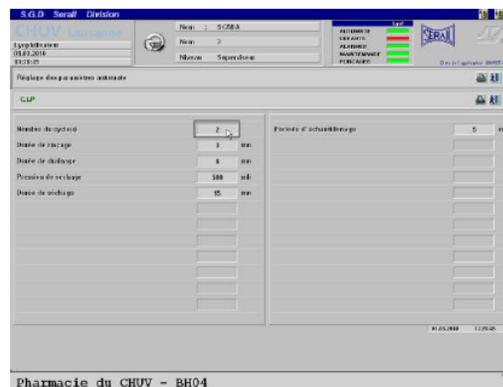
- Cliquer ensuite sur la case rouge à droite de « CONFIG. AUTOMATE » :



- Pour modifier des paramètres du CIP, cliquer sur la case rouge à droite de « CIP » :



- La fenêtre suivante s'ouvre. Pour modifier, par exemple, le nombre de cycle, cliquer sur la case contenant le chiffre.



Annexe 2 : Plan Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 (A-1055)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	PLAN			Elaboré par ---
Code A-1055	Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M. Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L. Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ		
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18		PLAN	Elaboré par ---
Code A-1055	Version 1.0	Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

1. OBJET

La pharmacie du CHUV utilise pour sa production un lyophilisateur CS15-1 dans le local technique n°565, s'ouvrant dans le local n°562 de classe B sous un flux laminaire de classe A.
Le but de cette qualification est de démontrer que le CIP (cleaning-in-place) et le SIP (sterilization-in-place) sont efficaces et reproductibles.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique au procédé de lavage et au procédé de stérilisation de la cuve du lyophilisateur CS15-1.

3. DEFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication
PHA8 : unité de contrôle qualité
RAQ : responsable assurance qualité

4. RESPONSABILITES

FAB9

- Rédiger le protocole de validation
- Planifier en collaboration avec PHA8 les essais de validation.
- Préparer le matériel et l'équipement nécessaires à la validation.
- Effectuer l'échantillonnage selon le plan d'échantillonnage décrit ci-dessous.
- Rédiger le rapport de validation.

PHA8

- Approuver le protocole de validation.
- Planifier en collaboration avec la production les essais de validation.
- Préparer le matériel et l'équipement nécessaires aux analyses des échantillons.
- Effectuer les analyses demandées.
- Approuver le rapport de validation

RAQ

- Autoriser le protocole et le rapport de validation.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

NA

6. DOCUMENTS ASSOCIES

	Mode d'emploi Lyophilisateur CS15-1
	Protocole et Rapport de la phase de développement
A-1056	Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)
A-1057	Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Sterilization-in-place (SIP)

7. DEROULEMENT

7.1. STRATEGIE DE VALIDATION

La qualification fait suite à une phase de développement. Des essais hors lyophilisateur ont été effectués (se référer au document : « Développement de la méthode pour évaluer le lavage en place (cleaning-in-place, CIP) du lyophilisateur CS15-1 »). Ensuite, plusieurs cycles ont été effectués afin de déterminer quel programme de lavage sera utilisé pour la qualification et quel cycle sera utilisé en routine.

Une fois la phase de développement terminée, la qualification peut commencer. La qualification du lyophilisateur CS15-1 se déroule de la manière suivante : le CIP et le SIP doivent être qualifiés. Les essais



Processus VAL.18		PLAN	Elaboré par ---
Code A-1055	Version 1.0	Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

de qualification du CIP et du SIP sont groupés. Chaque cycle de lavage est suivi d'un cycle de stérilisation. Ces deux cycles consécutifs sont effectués en triplicat afin d'observer la reproductibilité des cycles.

ETAPES	INSTRUCTIONS
Étape 1	
Qualification du CIP	<ul style="list-style-type: none"> • se référer à A-1056 « ANNEXE 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP) » • Une solution de lactose est préparée. • Des plaques en inox sont contaminées avec la solution de lactose. • Les plaques contaminées sont fixées dans la cuve du lyophilisateur. • Un cycle complet de lavage est effectué. • Les plaques sont récupérées. Les échantillons sont reconstitués dans des flacons en verre de 40 ml afin d'effectuer des analyses TOC (Total Organic Carbon). • Les essais sont effectués en triplicat.
Étape 2	
Qualification du SIP	<ul style="list-style-type: none"> • se référer à A-1057 « ANNEXE 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Sterilization-in-place (SIP) » • Des languettes de spores (<i>Bacillus stearothermophilis</i>, 10⁶) sont déposées aseptiquement dans la cuve du lyophilisateur. • Une sonde permettant de mesurer la température et la pression est fixée dans la cuve. • Un cycle de stérilisation est effectué. • Les languettes de spores sont récupérées aseptiquement, déposées dans des flacons contenant des milieux de culture puis transmises au contrôle qualité. • Les essais sont effectués en triplicat.

7.2. MATERIEL, PRODUITS ET METHODE

7.2.1. Matériel

7.2.2. Produits

7.3. Protocole

8. CRITERES D'ACCEPTATION

CIP :

- La cuve et les plateaux sont visuellement propres, en particulier aux points critiques (fond de la cuve)
- La teneur en carbone des échantillons est ≤ 0.5 ppm. Il doit y avoir une réduction de 3 logs.
- La teneur en carbone de l'eau hautement purifiée est ≤ 0.5 ppm
- La durée totale du cycle est réduite d'un cycle rinçage/drainage par rapport aux conditions normales.

SIP :

- La cuve et les plateaux sont visuellement propres et secs, en particulier aux points critiques (fond de la cuve)
- La température doit être constante à 121. 1 °C durant tout le processus de stérilisation. La température aux points froids ne doit pas être inférieure à cette température.
- Il doit y avoir réduction de 6 log des indicateurs biologiques.
- La durée de la stérilisation est réduite de 10% soit 18 minutes au lieu de 20.



Processus VAL.18		PLAN	Elaboré par ---
Code A-1055	Version 1.0	Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

9. DOCUMENTS A JOINDRE AU RAPPORT DE VALIDATION

CIP :

- Copie du certificat d'analyse du lactose monohydraté
- Enregistrement des pesées lors de la préparation de la solution de lactose
- Enregistrement des pesées lors de la contamination des plaques en inox des essais 1, 2 et 3.
- Enregistrement des mesures de températures lors du cycle de lavage des essais 1, 2 et 3
- Enregistrements des mesures de la pression lors du cycle de lavage et séchage final à vide des essais 1, 2 et 3
- Enregistrements des cycles de lavage des essais 1, 2 et 3.
- Photo de la disposition des plaques dans la cuve avant le lavage lors des essais 1, 2 et 3
- Photo de la cuve à la fin du lavage lors des essais 1, 2 et 3
- Résultats de la teneur en carbone (ppm) des essais 1, 2 et 3

SIP :

- Schéma de disposition des sondes de mesure de la température et des indicateurs biologiques
- Photo de la cuve avant la stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Photo de la cuve après stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Enregistrement du cycle de stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Rapport du laboratoire concernant les indicateurs biologiques

Qualification du lyophilisateur CS15-1 :

- Tout commentaire relatif à l'étude (arrêt, alarme)
- L'analyse de l'étude en fonction des critères d'acceptation
- Le statut de l'étude (Etude conforme, non-conforme)

Annexe 3 : Protocole PQ CIP (Cleaning-in-place) – Lyophilisateur CS15-1 (A-1056)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	PROTOCOLE			Elaboré par ---
Code A-1056	Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Cleaning-in-place (CIP)			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M.Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L.Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ	_____	_____
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)			

1. OBJET

La Pharmacie Centrale du CHUV utilise pour sa production le lyophilisateur CS15-1 dans le local technique n°565, la porte s'ouvrant sous un flux laminaire de classe A dans le local n°562 de classe B.

Ce protocole concerne le nettoyage de la cuve du lyophilisateur (procédés de cleaning-in-place). Aucun détergent n'est utilisé, uniquement de l'eau hautement purifiée chauffée à 80°C.

Le but de cette qualification est de démontrer que le procédé de lavage de la cuve du lyophilisateur est capable de garantir la propreté de la cuve, d'éliminer les contaminants et les résidus à un niveau conforme aux critères d'acceptation et d'assurer la reproductibilité du cycle de lavage.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique au procédé de lavage du lyophilisateur CS15-1 (cleaning-in-place). Le procédé de lavage se déroule selon les étapes suivantes (temps réduit par rapport au procédé habituel):

- eau hautement purifiée à 80 °C
- 2 cycles (rinçage/drainage) par lavage
- séchage final à la pompe à vide

3. DEFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

4. RESPONSABILITES

FAB9

- o Rédiger le protocole de validation
- o Planifier en collaboration avec PHA8 les essais de validation.
- o Préparer le matériel et l'équipement nécessaires à la validation.
- o Effectuer l'échantillonnage selon le plan d'échantillonnage décrit ci-dessous.
- o Rédiger le rapport de validation.

PHA8

- o Approuver le protocole de validation.
- o Planifier en collaboration avec la production les essais de validation.
- o Préparer le matériel et l'équipement nécessaires aux analyses des échantillons.
- o Effectuer les analyses demandées.
- o Approuver le rapport de validation

RAQ

- o Autoriser le protocole et le rapport de validation.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

[1-9]

1. Gavlick, W.K., et al., *Analytical Strategies for Cleaning Agent Residue Determination*. Pharmaceutical Technology, 1993 (march): p. 136-144.
2. Westmann, L., et al., *Methods for Detecting Residues of Cleaning Agents During Cleaning Validation*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2000. 54(5): p. 365-372.
3. Jenkins, K.M., et al., *Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 1996. 50(1): p. 6-15.
4. Fourman, G., et al., *Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations*. Pharmaceutical Technology, 1993 (april): p. 54-60.
5. Junker, B., *Technical Evaluation of the Potential for Streamlining of Equipment Validation for Fermentation Applications*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. 74(1): p. 49-61.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0	Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)	Validé par ---

6. Gieseler, H., et al., *Quality by Design in Freeze-Drying: Cycle Design and Robustness Testing Using Advanced Process Analytical Technology*. Pharmaceutical Technology, 2008. **october**: p. 88-93.
7. Geigert, J., et al., *Role of Quality Control in Validation of Biopharmaceutical Processes: Case Example of Clean-in-Place (CIP) Procedure for a Bioreactor*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 1994. **48(5)**: p. 236-240.
8. Pharmacopée Européenne 6.0
9. PIC/S, *Recommendations on VALIDATION MASTER PLAN, INSTALLATION AND OPERATIONAL QUALIFICATION, NON-STERILE PROCESS VALIDATION, CLEANING VALIDATION (PI 006-3)*, 25 september 2007

6. DOCUMENTS ASSOCIES

- Mode d'emploi Lyophilisateur CS15-1
- Protocole et Rapport de la phase de développement
- A-1055 Plan : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1
- A-1057 Annexe 2 : Protocole de qualification de sterilization-in-place (SIP) du lyophilisateur CS15-1

7. DEROULEMENT

7.1. STRATEGIE DE VALIDATION

Différents tests sont effectués afin de démontrer le bon fonctionnement du cycle de lavage et sa reproductibilité.

Tous les tests sont effectués en triplicat. Chaque cycle de lavage est suivi par un cycle de stérilisation.

- a) Mesurer la température lors du lavage
 Mesurer la température en différents points à l'aide de douze sondes disposées selon la figure 1 (schéma de disposition des sondes de température sur les plateaux).
- b) Mesurer la pression durant tout le cycle de lavage.
- c) Observer visuellement la propreté dans la cuve, en particulier au fond.
- d) Effectuer des analyses TOC (Total Organic Carbon) : déposer l'indicateur (lactose) sur des petites plaques en inox qui seront placées sur les plateaux selon la figure 2 (schéma du plan de contamination des plateaux).

Plan de qualification

- Préparer la solution de lactose
- Contaminer les plaques avec la solution de lactose
- Mettre les plaques à l'étuve
- Disposer les plaques à différents endroits sur les plateaux du lyophilisateur
- Mesurer la température en différents points (12)
- Mesurer la pression dans la cuve
- Effectuer un cycle de lavage complet (eau à 80°C, 2 cycles de lavage (rinçage/drainage) puis séchage final à la pompe à vide)
- Récupérer les plaques
- Reconstituer les échantillons
- Envoyer les échantillons au laboratoire d'analyse
- Traiter les résultats

7.2. MATERIEL, PRODUITS ET METHODE

7.2.1. Matériel

- Lyophilisateur CS15-1
- Etuve Memmert
- Sondes d'acquisition des données de température durant le cycle de lavage



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)			

- Sonde d'acquisition des données de pression durant le cycle de lavage
- Ordinateur portable avec le programme permettant de programmer et lire les données des sondes
- Analyseur TOC
- Tubes (TOC) d'échantillonnage de 40 ml
- Barreau magnétique
- Balance analytique
- Erlenmeyer
- Flacon en verre avec bouchon pour conserver la solution de lactose
- Spatule
- Plaque chauffante et magnétique
- Pipette avec poire
- Vortex Genie 2
- Bain à ultrasons
- Plaques en inox, dimensions : 8 cm*1.5 cm avec deux trous de 3 mm de diamètre, selon le schéma

suivant



- Seringue
- « Colson » pour attacher les plaques sur les plateaux
- Pince pour retirer les plaques des tubes TOC

7.2.2. Produits

- Eau hautement purifiée
- Lactose monohydraté

7.3. Protocole

Préparation de la solution de lactose

- Enregistrer le nom du fabricant de lactose
- Enregistrer le numéro de lot
- Enregistrer le numéro du certificat d'analyse
- Joindre une copie du certificat d'analyse au rapport de qualification
- Préparer un erlenmeyer et y placer un barreau magnétique
- Identifier une balance analytique appropriée préalablement calibrée
- Placer l'erlenmeyer contenant le barreau magnétique sur la balance et mettre la tare à 0.00
- A l'aide d'une spatule propre, placer 20.625 g de lactose dans l'erlenmeyer et enregistrer le poids affichés par la balance. Joindre l'enregistrement au rapport de qualification.
- Dissoudre en ajoutant de l'eau hautement purifiée ad 300 g sous agitation en chauffant à environ 45-50 °C.
- Continuer à dissoudre le lactose jusqu'à dissolution complète. Peser la solution et joindre l'enregistrement de la pesée au rapport de qualification.
- Identifier la solution de lactose, sa concentration et la date de préparation.
- Peser un flacon en verre avec couvercle propre et sec de volume de 500 ml et mettre la tare à 0.00
- Transférer quantitativement la solution de lactose dans le flacon, fermer le flacon avec son couvercle et peser le poids net. Joindre l'enregistrement au rapport de qualification.
- Identifier le flacon : Solution de lactose 68.75 g/l. Date :.....
 Cette solution correspond à une concentration en carbone de 27'500 mg/l ou 27'500 ppmC (voir calcul ci-dessous).
- Prélever 40 g de la solution dans un tube TOC et identifier l'échantillon. Le confier ensuite au laboratoire d'analyses pour déterminer la concentration de la solution-mère (SM).
- Conserver le flacon au frigo à 2-8°C.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)			

Calcul de la concentration en ppm C de la solution de lactose monohydraté ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) à 68.75 g/l de lactose :

$$PM_{\text{lactoseMonohydraté}} = (12 \cdot 12) + (22 \cdot 1) + (11 \cdot 16) + 18 = 360g$$

$$m_{\text{lactose}} = 360g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 12 \cdot 12 = 144g$$

$$m_{\text{lactose}} = 68.75g \rightarrow m_{\text{carbone}} = \frac{68.75 \cdot 144}{360} = 27.5g$$

$$27.5g/l = 27'500mg/l = 27'500ppmC$$

Calcul de la quantité de lactose déposé sur les plaques (1g de solution équivalent à 1 ml) :

$$V_{\text{solution}} = 1ml \rightarrow m_{\text{lactoseMonohydraté}} = 68.75 \cdot 10^{-3}g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g$$

Après reconstitution des échantillons dans les tubes TOC contenant 40 ml d'eau hautement purifiée et si tout le lactose déposé reste sur les plaques en inox :

$$m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g = 27.5mg \rightarrow c_{ppmC} = \frac{27.5}{0.04} = 687.5mg/l = 687.5ppmC$$

Les spécifications étant de 0.5 ppmC, il y a réduction d'un peu plus de 3 log.

Déterminer le titre en carbone à l'aide d'un analyseur TOC préalablement calibré.

Mesure de la température lors du cycle de lavage

- S'assurer que les sondes sont opérationnelles et calibrées.
- Distribuer les sondes de température selon le schéma d'implantation des sondes (selon la figure 1). Mettre une sonde dans le drain du lyophilisateur (point froid).
- Enregistrer les valeurs de température durant le cycle de lavage. Joindre cet enregistrement au rapport de qualification.
- Déterminer si présence de points froids après analyse des résultats.

Mesure de la pression

- S'assurer que les appareils de mesure de la pression sont opérationnels et calibrés.
- Enregistrer les mesures lors du cycle de lavage. Joindre cet enregistrement au rapport de qualification.

Contamination de la cuve et des plateaux du lyophilisateur et séchage à l'étuve

- Disposer les plaques en inox sur le plateau supérieur de l'étuve.
- Prélever 1 g de la solution de lactose avec une seringue. Enregistrer les pesées. Joindre l'enregistrement des pesées au rapport de qualification.
- Déposer ces prélèvements sur les petites plaques en inox.
- Déposer la solution de lactose de manière à contaminer le maximum de surface de la plaque.
- Les plaques contaminées sont prêtes pour le séchage à 85-90 °C pendant une nuit.
- Fermer la porte de l'étuve, enclencher le chauffage en indiquant la date et l'heure. Début séchage :
- Déclencher le chauffage de l'étuve. Fin séchage :
- Ouvrir la porte de l'étuve et s'assurer de l'évaporation complète du solvant.
- Récupérer les plaques et les transférer au lyophilisateur.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)

Lavage du lyophilisateur (cuve et plateaux, cleaning-in-place)

- S'assurer que le lyophilisateur est opérationnel.
- Fixer les paramètres du cycle de lavage pour la qualification :

Eau de lavage : eau à 80°C Durée de lavage : 3 minutes Durée du drainage : 5 minutes Durée du séchage : 60 minutes	}	1 cycle (est réalisé 2 fois)
---	---	------------------------------
- Pression pour le séchage : seuil à 500 mb
- Distribuer les plaques contaminées sur les plateaux du lyophilisateur selon la figure 2 (schéma du plan de contamination des plateaux).
- Attacher les plaques avec des « Colson ». S'assurer que les plaques sont bien fixées.
- Prendre une photo de la disposition des plaques. Joindre cette photo au rapport de qualification.
- Enclencher le cycle de lavage et l'enregistreur du lyophilisateur.
- Récupérer, à la fin du cycle de lavage, l'enregistrement du cycle et le joindre au rapport de qualification.
- Contrôler visuellement la propreté de la cuve et des plateaux du lyophilisateur, en particulier aux endroits préalablement déterminés comme étant critiques (fond de la cuve et arrière des plateaux en particulier). Prendre une photo de la cuve à la fin du lavage. Joindre cette photo au rapport de qualification.
- Récupérer aseptiquement les petites plaques déposées dans le lyophilisateur.

Reconstitution des échantillons pour les analyses TOC

- Peser 35 g d'eau hautement purifiée dans un tube TOC de 40 ml. Enregistrer les pesées. Joindre l'enregistrement au rapport de qualification.
- Déposer une plaque contaminée dans un tube rempli avec l'eau hautement purifiée.
- Passer délicatement les tubes au vortex (programme Vortex 1-2) pendant 2-3 minutes puis mettre les tubes dans un bain à ultrasons pendant 2-3 minutes.
- Récupérer les plaques avec une pince.
- Rajouter 5 g d'eau hautement purifiée. Enregistrer les pesées. Joindre l'enregistrement au rapport de qualification.
- Mélanger les échantillons.
- Prélever également 40 g d'eau hautement purifiée utilisée pour récolter les échantillons.
- Conserver les échantillons au frigo avant de les envoyer au laboratoire d'analyses.
- Confier les échantillons au laboratoire d'analyses.
- Analyser les résultats.
- Joindre les résultats bruts au rapport de qualification.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)			

Disposition des sondes de température (figure 1)

12 sondes sont disposées dans la cuve.

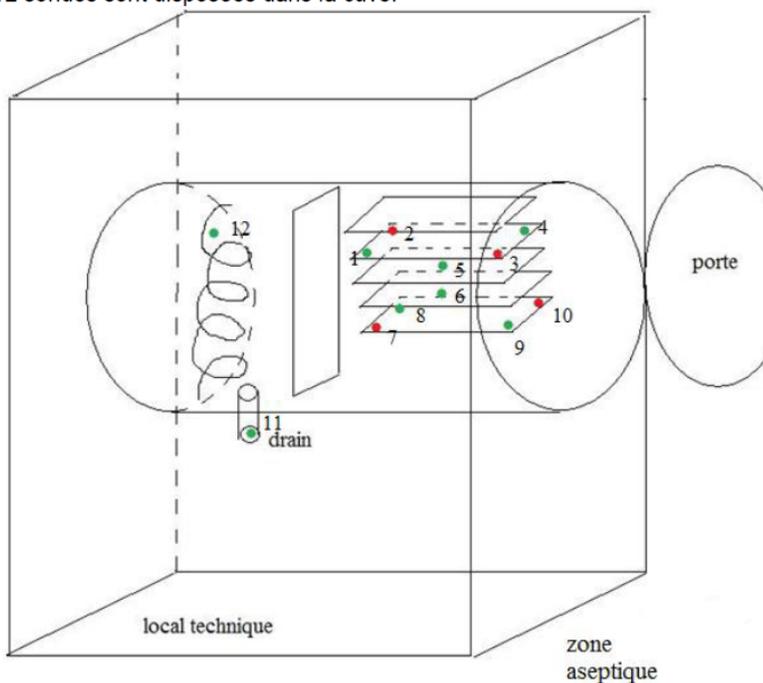


Figure 1 : schéma de disposition des sondes dans le lyophilisateur (sur les plateaux, dans le drain et vers le piège)

Schéma de contamination des plateaux et de la cuve par le lactose (figure 2)

Contamination des petites plaques en inox :

- Haut de la cuve : 1 plaque à l'envers fixée à l'avant de la cuve
- Plateau supérieur : 4 plaques en inox selon la figure 2
- 2^{ème} plateau depuis le haut : 5 plaques en inox
- 3^{ème} plateau depuis le haut : 4 plaques en inox selon la figure 2
- Plateau inférieur : 4 plaques en inox

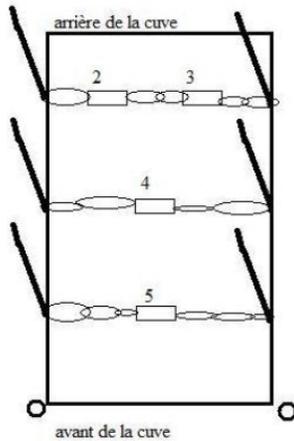
Les plaques sont fixées aux tuyaux disposés sur les côtés de la cuve à l'aide de « Colson ».

La plaque n°1 se trouve fixée à l'envers, en haut à l'avant de la cuve.

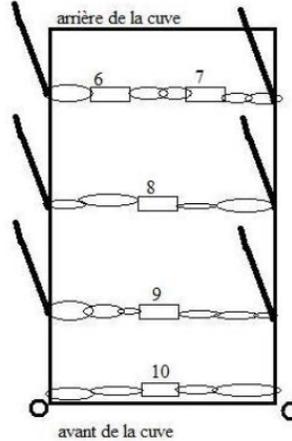


Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)			

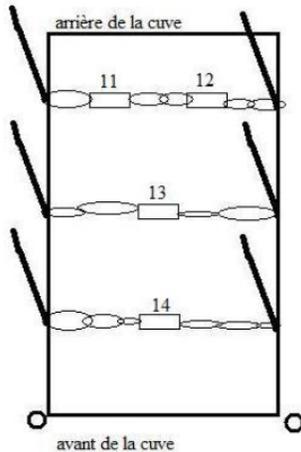
plateau supérieur :



2^{ème} plateau :



3^{ème} plateau :



plateau inférieur :

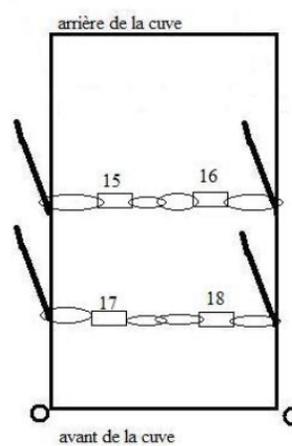


Figure 2 : schéma de disposition des plaques en inox sur les plateaux, vu de dessus

Lavage des plaques en inox entre les différents cycles tests de lavage

- Prendre un grand béccher
- Le remplir d'eau distillée
- Mettre les plaques dans le béccher contenant l'eau
- Mettre au bain à ultrasons pendant 5 minutes. Éventuellement, rincer l'eau et recommencer.
- Laisser sécher les plaques à l'air libre

- **Conditions « worst-case » :**

La durée totale du cycle est réduite d'un cycle rinçage/drainage par rapport aux conditions normales.

8. CRITERES D'ACCEPTATION

- La cuve et les plateaux sont visuellement propres, en particulier aux points critiques (fond de la cuve)
- La teneur en carbone des échantillons est ≤ 0.5 ppm



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1056	Version 1.0		Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)

- La teneur en carbone de l'eau hautement purifiée est ≤ 0.5 ppm

9. DOCUMENTS A JOINDRE AU RAPPORT DE VALIDATION

- Copie du certificat d'analyse du lactose monohydraté
- Enregistrement des pesées lors de la préparation de la solution de lactose
- Enregistrement des pesées lors de la contamination des plaques en inox des essais 1, 2 et 3.
- Enregistrement des mesures de températures lors du cycle de lavage des essais 1, 2 et 3
- Enregistrements des mesures de la pression lors du cycle de lavage et séchage final à vide des essais 1, 2 et 3
- Enregistrement des pesées lors de la reconstitution des échantillons des essais 1, 2 et 3.
- Enregistrements des cycles de lavage des essais 1, 2 et 3.
- Résultats de la teneur en carbone (ppm) des essais 1, 2 et 3
- Photo de la disposition des plaques dans la cuve avant le lavage
- Photo de la cuve à la fin du lavage

Annexe 4 : Protocole PQ SIP (sterilization-in-place) – Lyophilisateur CS15-1 (A-1057)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	PROTOCOLE			Elaboré par ---
Code A-1057	Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Sterilization-in-place (SIP)			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M.Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L.Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ		
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1057	Version 1.0		Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Sterilization-in-place (SIP)

1. OBJET

Le but de ce protocole est de démontrer que le procédé de stérilisation du lyophilisateur CS15-1 dans le local technique n°565, la porte s'ouvrant sous un flux laminaire de classe A dans le local n°562 de classe B, sterilization-in-place (SIP) est capable de conduire à un environnement stérile.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique au procédé de stérilisation du lyophilisateur CS15-1. Le procédé de stérilisation se déroule selon les étapes suivantes :

- stérilisation à la vapeur, 121.1°C pendant 18 minutes puis séchage final à la pompe à vide (temps de stérilisation réduit de 10% par rapport aux conditions normales).

3. DEFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

4. RESPONSABILITES

FAB9

- o Rédiger le protocole de validation
- o Planifier en collaboration avec PHA8 les essais de validation.
- o Préparer le matériel et l'équipement nécessaires à la validation.
- o Effectuer l'échantillonnage selon le plan d'échantillonnage décrit ci-dessous.
- o Rédiger le rapport de validation.

PHA8

- o Approuver le protocole de validation.
- o Planifier en collaboration avec la production les essais de validation.
- o Préparer le matériel et l'équipement nécessaires aux analyses des échantillons.
- o Effectuer les analyses demandées.
- o Approuver le rapport de validation

RAQ

- o Autoriser le protocole et le rapport de validation.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

[1-2]

1. Junker, B., *Technical Evaluation of the Potential for Streamlining of Equipment Validation for Fermentation Applications*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. 74(1): p. 49-61.
2. PIC/S, *GUIDE TO GOOD PRACTICES FOR THE PREPARATION OF MEDICINAL PRODUCTS IN HEALTHCARE ESTABLISHMENTS* (PE 010-3), 1 October 2008

6. DOCUMENTS ASSOCIES

- A-1055 Mode d'emploi Lyophilisateur CS15-1
- A-1055 Protocole et Rapport de la phase de développement
- A-1056 Plan : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1
- A-1056 Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1057	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Sterilization-in-place (SIP)			

7. DEROULEMENT

7.1. STRATEGIE DE VALIDATION

Différents tests sont effectués afin de démontrer le bon fonctionnement du cycle de stérilisation et sa reproductibilité.

L'essai de stérilisation est effectué en triplicat. Chaque cycle de stérilisation est effectué après un cycle de lavage.

L'efficacité du procédé de stérilisation est démontrée dans des conditions réduites de stérilisation (temps diminué de 10%) en présence d'indicateurs biologiques :

- 121.1 °C pendant 18 minutes
- séchage final à la pompe à vide

Il s'agit également de démontrer que la température est constante durant tout le cycle de stérilisation et de démontrer que la pression mesurée est adéquate.

Plan de qualification

- Mesurer la température et la pression en différents points grâce à des sondes de température et de pression disposées selon la figure 1 (schéma de disposition des sondes sur les plateaux et dans la cuve)
- Effectuer un cycle de stérilisation en présence d'indicateurs biologiques (*Bacillus stearothermophilis*, 10⁶ spores par languettes). Les indicateurs biologiques sont disposés de manière à être à côté d'une sonde de mesure de température.
- Prélever les indicateurs biologiques de manière aseptique
- Observer après 24h et après 48h d'incubation
- Résultats des analyses

7.2. MATERIEL, PRODUITS ET METHODE

7.2.1. Matériel

- Lyophilisateur CS15-1
- Sondes d'acquisition des données de température durant le cycle de stérilisation
- Sonde d'acquisition des données de pression durant le cycle de stérilisation
- Incubateur pour les indicateurs biologiques

7.2.2. Produits

- Indicateurs biologiques : *Bacillus stearothermophilis* à concentration $\geq 10^6$ spores par languette.
- Milieux de culture Raven au Trypticase de soja

7.3. Protocole

Des sondes de température préalablement calibrées sont utilisées. Les sondes de température sont disposées sur les plateaux, dans la cuve du lyophilisateur selon la figure 1 (schéma de disposition des sondes de températures sur les plateaux). Les mesures de température sont enregistrées. Cet enregistrement est joint au rapport de qualification. Les valeurs sont comparées puis analysées afin de déterminer d'éventuels points froids.

Placer 12 indicateurs biologiques dans le lyophilisateur, en particulier aux endroits où des points froids sont connus (drain, piège). Les indicateurs biologiques sont associés à une sonde de température.

Procédure :

- Vérifier qu'un cycle de lavage ait été effectué avant le cycle de stérilisation.
- Programmer le système d'acquisition des données pour enregistrer les mesures de températures (effectuer un profil de température).
- Positionner les sondes de mesure de la température et de la pression dans la cuve.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1057	Version 1.0		Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Sterilization-in-place (SIP)

- Répartir les indicateurs biologiques en les associant à des sondes de mesure de la température. Laisser les indicateurs biologiques dans leur emballage (worst-case).
- Etablir un schéma indiquant la position exacte des sondes et des indicateurs biologiques. Joindre ce schéma dans le rapport de qualification.
- Prendre également une photo de la cuve avant la stérilisation. Joindre cette photo dans le rapport de qualification.
- Noter tous les paramètres de stérilisation
- Ne pas commencer le cycle de stérilisation si la température initiale des capteurs est au-dessus de 40 °C.
- Démarrer le cycle de stérilisation et l'équipement de qualification
- A la fin du cycle de stérilisation, récupérer les indicateurs biologiques de manière aseptique.
- Déposer les languettes d'indicateurs biologiques dans les flacons contenant le milieu de culture sous flux laminaire.
- Déposer également une languette d'indicateur biologique non stérilisée dans un flacon contenant le milieu de culture afin d'avoir un témoin positif.
- Prendre une photo de la cuve à la fin de la stérilisation. Joindre cette photo au rapport de qualification.
- Transférer les flacons au laboratoire de contrôle de la qualité.
- Incuber les milieux de culture à 60°C ± 2°C pendant 24h.
- Observer également les milieux de culture après 48h.

Disposition des sondes de température et des indicateurs biologiques (figure 1)

12 sondes disposées dans la cuve. Les indicateurs biologiques sont disposés sur les 12 points.

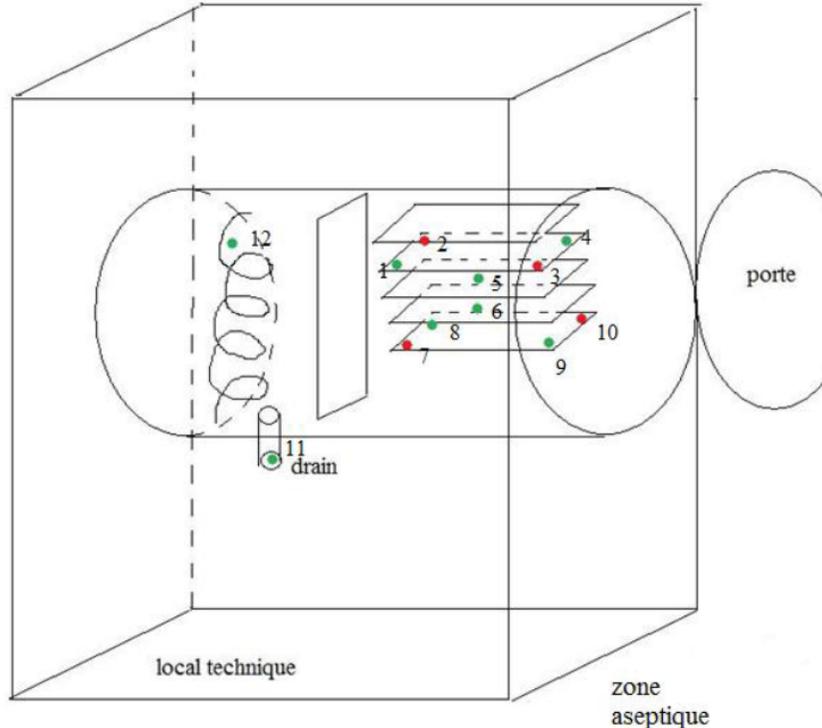


Figure 1 : schéma de disposition des sondes et des indicateurs biologiques dans le lyophilisateur (sur les plateaux, dans le drain et vers le piège)



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1057	Version 1.0		Validé par ---
Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1- Sterilization-in-place (SIP)			

8. CRITERES D'ACCEPTATION

- La cuve et les plateaux sont visuellement propres et secs, en particulier aux points critiques (fond de la cuve)
- La température doit être constante à 121. 1 °C durant tout le processus de stérilisation. La température aux points froids ne doit pas être inférieure à cette température.
- Il doit y avoir réduction de 6 log des indicateurs biologiques.

9. DOCUMENTS A JOINDRE AU RAPPORT DE VALIDATION

- Schéma de disposition des sondes de mesure de la température et de la pression et des indicateurs biologiques
- Photo de la cuve avant la stérilisation
- Photo de la cuve après stérilisation
- Enregistrement du cycle de stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Enregistrement des mesures de température et de pression lors des essais 1, 2 et 3.
- Rapport du laboratoire des indicateurs biologiques

Annexe 5 : Protocole de validation du remplissage aseptique du lyophilisateur CS15-1 (A-1059)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	PROTOCOLE			Elaboré par ---
Code A-1059	Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M.Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L.Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ	_____	_____
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18		PROTOCOLE		Elaboré par ---
Code A-1059	Version 1.0	Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1		Validé par ---

1. OBJET

La Pharmacie Centrale du CHUV utilise pour sa production un lyophilisateur CS15-1 dans le local technique n° 565, la porte se trouvant sous un flux laminaire de classe A dans le local n°562 de classe B. Il permet la production de préparations injectables de manière aseptique.

Ce protocole concerne la validation du remplissage aseptique de flacons et le chargement de ces flacons sur les différents plateaux du lyophilisateur.

Le but est de démontrer que toutes les étapes conduisant au remplissage aseptique de flacons et au chargement de la cuve du lyophilisateur sont conformes dans les conditions déterminées.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce protocole s'applique au remplissage aseptique sous flux laminaire de type plafonnier de classe A dans un local de classe B et chargement du lyophilisateur CS15-1.

3. DEFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

4. RESPONSABILITES

FAB9

- Rédiger le protocole de validation
- Planifier en collaboration avec PHA8 les essais de validation.
- Préparer le matériel et l'équipement nécessaires à la validation.
- Effectuer l'échantillonnage selon le plan d'échantillonnage décrit ci-dessous.
- Rédiger le rapport de validation.

PHA8

- Approuver le protocole de validation.
- Planifier en collaboration avec la production les essais de validation.
- Préparer le matériel et l'équipement nécessaires aux analyses des échantillons.
- Effectuer les analyses demandées.
- Approuver le rapport de validation

RAQ

- Autoriser le protocole et le rapport de validation.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

[1-4]

1. Tang, X., et al, *Review: Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(2): p. 191-200.
2. Przic, D.S., et al., *Lyophilization - The Process and Industrial Use*. Chem. Ind., 2004. **58**(12): p. 552-562.
3. DeSantis, F., et al., *Aseptic Formulation and Filling Using Isolator Technology*. Pharmaceutical Technology, 2003: p. 32-42.
4. PIC/S, *Recommendation on the VALIDATION OF ASEPTIC PROCESSES (PI 007-5)*. 1 July 2009.

6. DOCUMENTS ASSOCIES

- A-1055 Mode d'emploi du lyophilisateur CS15-1
- A-1055 Plan : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1
- A-1056 Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)
- A-1057 Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Sterilization-in-place (SIP)



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1059	Version 1.0		Validé par ---
Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1			

A-1060 Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1

7. DEROULEMENT

7.1. STRATEGIE DE VALIDATION

Différents tests sont effectués afin de valider le remplissage aseptique et le chargement du lyophilisateur en procédant à un « Worst-case ». Un milieu de culture (Media-fill) est introduit dans des flacons, les bouchons stériles sont déposés à la main sur les flacons qui sont ensuite déposés dans la cuve. Les tests sont effectués en triplicat. Tout d'abord, trois essais avec des flacons de 50 ml sont effectués. Ensuite, trois essais avec des flacons de 3 ml sont effectués à l'aide du même protocole. Le nombre de Media-fill dépend de la taille des lots habituellement produits. Si le nombre d'unités est inférieur à 3000, les lots de simulations contiennent le même nombre d'unités que les lots produits [4]. Le nombre de flacons a dû être restreint à cause d'une limitation de la machine à laver qui ne peut laver que 128 flacons à la fois.

Plan de validation

- Laver les flacons à la machine-à-laver
- Dépyrogénéiser les flacons
- Stériliser les bouchons
- Transférer les flacons, les bouchons et le milieu de culture en zone aseptique
- Remplir les flacons avec le milieu de culture (Media-fill) à l'aide d'une pompe de remplissage
- Poser les bouchons stériles sur les flacons
- Charger le lyophilisateur avec les flacons contenant le milieu de culture
- Effectuer une simulation de l'étape critique (appliquer le vide et le casser trois fois de suite)
- Fermer les bouchons sous vide partiel dans le lyophilisateur.
- Décharger le lyophilisateur
- Sceller les flacons avec les capsules métalliques.
- Transférer aseptiquement les flacons contenant le milieu de culture au contrôle qualité
- Incuber les milieux de culture (« Media-fill »)
- Analyser les résultats

7.2. MATERIEL, PRODUITS ET METHODE

7.2.1. Matériel

- Flacons de 50 ml (160 flacons par essai => $160 \times 3 = 480$)
ou Flacons de 3 ml (296 flacons par essai => $296 \times 3 = 888$)
- Bouchons adaptés aux flacons ($160 \times 3 = 480$ ou $296 \times 3 = 888$)
- Machine à laver
- Etuve
- Boîtes pour flacons
- Emballages
- Pompe de remplissage avec tubulures stériles jetables
- Lyophilisateur CS15-1
- Filtre hydrophobe
- Table (place de travail à avoir sous le flux laminaire)
- Papier stérile à déposer sur la table de travail
- Lingettes désinfectantes
- Appareil pour sceller les bouchons
- Capsules pour sceller les flacons ($160 \times 3 = 480$ ou $296 \times 3 = 888$)
- Incubateur
- Thermomètre



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1059	Version 1.0		Validé par ---
Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1			

7.2.2. Produits

- Milieux de culture (Media-fill) (4,8 litres par essai donc 15 litres pour les 3 essais ou 600 ml par essai, prendre 3 litres pour les 3 essais)
- 24 plaques de milieux de culture/ 4 plaques par essai (2 plaques de sédimentation et 2 plaques pour empreintes de gants)

7.3. Protocole

Lavage et stérilisation de la cuve du lyophilisateur

- Effectuer un cycle de lavage du lyophilisateur selon les indications du mode d'emploi (paramètres : 3 cycles de rinçage/drainage de 3 et 5 min, séchage de 60 min).
- Effectuer un cycle de stérilisation du lyophilisateur selon les indications du mode d'emploi (paramètres : 18 min à 121.1 °C).

Lavage des flacons à la machine à laver dans le local « laverie » n° 569

- Prendre 128 flacons de 50 ml ou 128 flacons de 3 ml
- Les transférer dans la machine à laver
- Lancer un programme de lavage. Joindre l'enregistrement du programme au rapport de validation.
- A la fin du cycle de lavage, sortir les flacons de la machine à laver aseptiquement.
- Effectuer 4 lavages de flacons de 50 ml (4*128=512) ou 7 lavages de flacons de 3 ml (7*128=896)

Dépyrogénéisation des flacons dans le local « laverie » n° 569

- Transférer aseptiquement les flacons dans l'étuve
- Lancer un programme de dépyrogénéisation. Joindre l'enregistrement du programme au rapport de validation.
- A la fin de la dépyrogénéisation, sortir les flacons de l'étuve.
- Mettre les flacons dans des boîtes puis dans un double emballage.
- Avoir préalablement stérilisé les sachets.
- Les transférer dans le sas « matériel » afin de sortir les flacons du local

Stérilisation des bouchons et du filtre hydrophobe

- Sous flux laminaire, préparer 3 emballages de 165 bouchons ou 3 emballages de 300 bouchons.
- Les mettre dans des doubles emballages
- Mettre le filtre hydrophobe dans un double emballage
- Stériliser les bouchons et le filtre hydrophobe. Joindre l'enregistrement du programme au rapport de validation.

Transfert des flacons, des bouchons et du milieu de culture en zone aseptique (salle n°562) et habillage du personnel

- Enlever le 1^{er} emballage.
- Transférer les flacons et les bouchons dans le double emballage dans le sas afin de permettre le transfert en zone aseptique.
- Transfert du milieu de culture en zone aseptique de la même manière que pour toutes les matières premières
- Avant d'aller en zone aseptique, actionner l'ouverture de la porte du lyophilisateur selon les indications du mode d'emploi
- S'habiller pour aller en zone aseptique
- Récupérer les flacons, les bouchons et le milieu de culture dans la zone aseptique.

Mise en place du filtre hydrophobe

- Le filtre hydrophobe doit être préalablement stérilisé à l'autoclave avant d'être transféré dans la zone aseptique. Joindre l'enregistrement de l'autoclave au rapport de validation.



Processus VAL.18		PROTOCOLE	Elaboré par ---
Code A-1059	Version 1.0		Validé par ---
Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1			

- Dévisser le tube à gauche de la porte du lyophilisateur
- Placer le filtre hydrophobe à l'intérieur du tube
- Revisser le tube
- Attention, après déchargement de la cuve du lyophilisateur, retirer le filtre hydrophobe (avant d'effectuer un cycle de lavage et de stérilisation).

Préparation de la place de travail

- Enclencher le flux laminaire
- Désinfecter tout le matériel devant aller sous le flux laminaire ainsi que la place de travail à l'aide de lingettes désinfectantes
- Prendre un chariot ou une table sous le flux laminaire.
- Mettre un papier stérile sur la place de travail.
- Ouvrir une plaque de sédimentation de chaque côté de la place de travail.
- Disposer la pompe de remplissage, la tubulure, les flacons, le milieu de culture sur la place de travail.

Remplissage des flacons avec le milieu de culture

- Mettre en place la pompe (tubulure, flacon du milieu de culture, réglage du volume dispensé par la pompe)
- Ouvrir les boîtes contenant les flacons sur la place de travail
- Remplir chaque flacon (30 ml par flacon de 50 ml ou 2 ml par flacon de 3 ml) à l'aide de la pompe de remplissage
- Poser les bouchons sur les flacons
- Fermer complètement les bouchons de 8 flacons remplis avec le milieu de culture.
- Garder ces flacons de côté et les incuber ensuite avec les autres flacons. En cas de contamination, cela déterminera si la contamination est due à une étape avant le chargement du lyophilisateur ou pas.

Chargement du lyophilisateur avec les flacons contenant le milieu de culture

- Ouvrir la porte du lyophilisateur
- Charger le lyophilisateur avec les flacons contenant le milieu de culture un à un (38 flacons de 50 ml par plateau ou 72 flacons de 3 ml par plateau).
- Disposer les flacons sur un plateau de manière à couvrir la surface du plateau du lyophilisateur.
- Fermer la porte du lyophilisateur
- Fermer les plaques de sédimentation disposées des 2 côtés de la place de travail.
- Faire des empreintes des gants (chaque doigt, main droite et gauche) sur des plaques de gélose
- Sortir de la zone aseptique
- Actionner la fermeture de la porte du lyophilisateur selon les indications du mode d'emploi
- Effectuer une simulation de l'étape critique en faisant le vide trois fois dans le lyophilisateur à température ambiante [4].
- Actionner la descente des plateaux afin de boucher les flacons sous un vide de 800 mbar.
- Casser le vide
- Actionner la montée des plateaux afin de pouvoir récupérer les flacons (porte fermée)

Prélèvement aseptique des flacons contenant le milieu de culture

- Actionner l'ouverture de la porte du lyophilisateur selon les indications du mode d'emploi
- S'habiller pour aller en zone aseptique
- Ouvrir la porte du lyophilisateur
- Décharger le lyophilisateur en prenant les flacons un à un
- Ne pas mélanger les flacons si possible. Les séparer selon la disposition dans la cuve (en fonction du plateau)
- Mettre les flacons remplis et bouchonnés dans le sas de transfert « matériel »
- Sortir de la zone aseptique



Processus VAL.18		PROTOCOLE		Elaboré par ---
Code A-1059	Version 1.0	Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1		Validé par ---

Scellage des flacons

- Hors de la zone aseptique, mettre une capsule sur chaque flacon
- Sceller chaque flacon à l'aide de l'outil adéquat

Transmettre les milieux de culture au contrôle qualité

- Incuber les milieux de culture à 20-25 °C et à l'obscurité durant 7 jours, puis à 30-35 °C et à l'obscurité durant 7 jours [4].
- Transmettre les plaques de gélose (air et empreintes de gants) au contrôle qualité
- Observer les flacons les jours ouvrables
- Egalement, mesurer la température du local ou de l'incubateur les jours ouvrables
- En cas de contamination, mettre en culture afin de déterminer la nature de la contamination.

8. CRITERES D'ACCEPTATION

- Le nombre de flacons étant inférieur à 5000, aucune contamination ne doit être détectée [4].

9. DOCUMENTS A JOINDRE AU RAPPORT DE VALIDATION

- Certificats d'analyse du milieu de culture.
- Résultats d'analyse du contrôle qualité des essais 1, 2 et 3 pour les validations avec les deux types de flacons.
- Enregistrement des cycles de lavage et de stérilisation effectués avant les essais 1, 2 et 3 pour les validations avec les deux types de flacons.
- Enregistrement des appareils utilisés (machine-à-laver, étuve, autoclave)
- Tout commentaire relatif à l'étude (arrêt, alarme)
- L'analyse de l'étude en fonction des critères d'acceptation
- Le statut de l'étude (Etude conforme, non-conforme)

Annexe 6 : Rapport de développement

avril 2010

Sarah Cardoso

RAPPORT Développement Lyophilisateur CS15-1

1. OBJET

Ce rapport contient les résultats de la phase de développement de l'échantillonnage, de reconstitution des échantillons et des essais préliminaires pour trouver un cycle efficace de lavage de la cuve du lyophilisateur CS15-1.

Des plaques en inox sont contaminées par une solution de lactose, fixées dans le lyophilisateur puis un cycle de lavage de la cuve est effectué. Les échantillons sont reconstitués afin d'effectuer des analyses TOC (Total Organic Carbon). Les critères d'acceptation de la future qualification du CIP sont d'obtenir des résultats des analyses \leq à 0.5 ppmC.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce rapport couvre les résultats de la phase de développement avant la qualification du lyophilisateur. La reconstitution des échantillons pour les analyses TOC ainsi que le procédé de cleaning-in-place (CIP) du lyophilisateur sont étudiés.

3. DÉFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

TOC : Total Organic Carbon

CIP : cleaning-in-place

4. RESPONSABILITÉS

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE RÉFÉRENCE

NA

6. DOCUMENTS ASSOCIÉS

Mode d'emploi Lyophilisateur CS15-1

avril 2010

Sarah Cardoso

7. DÉROULEMENT

7.1 DÉVIATIONS

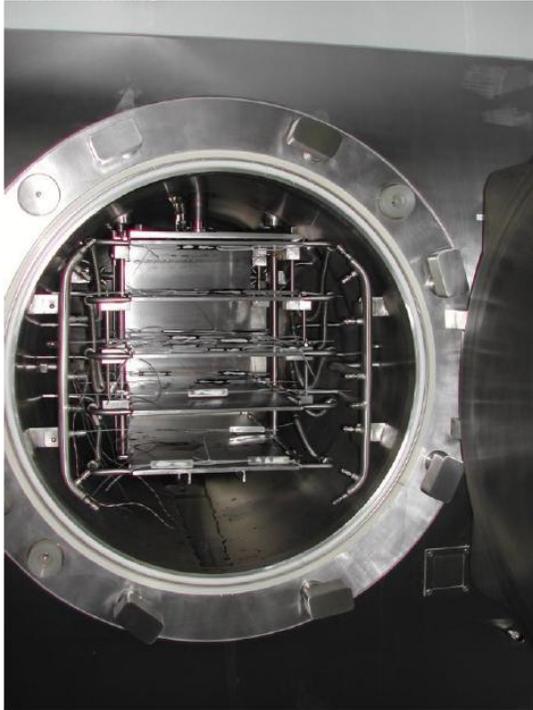
Aucune déviation mineure ni majeure n'a été détectée.

7.2 PROTOCOLE

Un protocole approximatif avait été pensé avant de débiter les essais de développement afin d'avoir une idée de ce qui allait être fait.

Les différents essais effectués ont permis d'améliorer le protocole et de rédiger un protocole de qualification du CIP (cleaning-in-place).

La photo ci-dessous montre la cuve du lyophilisateur après disposition des plaques contaminées par le lactose.



8. RÉSULTATS

8.1 EN RÉSUMÉ

Sur la base des résultats obtenus, la reconstitution des échantillons conduit à des résultats satisfaisants.

Lors des essais préliminaires, il est possible d'observer qu'un seul cycle de lavage (rinçage/drainage) n'est pas suffisant pour conduire à une cuve propre.

avril 2010

Sarah Cardoso

8.2 RÉSULTATS

Reconstitution des échantillons :

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus après reconstitution des échantillons et analyse TOC.

	masse de solution de lactose déposée [g]	numéro du tube TOC	valeur attendue [ppmC]	valeur mesurée [ppmC]	taux de recouvrement [%]
solution-mère de lactose	.-	E101	0	29260	
eau hautement purifiée	.-	E102	<0.5	<0.2	
plaque 3	1.035	E103	712	662	93.0%
plaque 4	1.026	E104	705	748	106.0%
plaque 5	1.027	E105	706	704	99.7%
plaque 6	1.015	E106	698	675	96.7%
plaque 7	1.017	E107	699	646	92.4%
plaque 8	1.011	E108	695	636	91.5%
plaque 9	1.007	E109	692	664	95.9%
plaque 10	1.015	E110	698	678	97.2%
plaque 11	1.001	E111	688	661	96.0%
plaque 12	1.014	E112	697	656	94.1%
plaque 13	1.005	E113	691	670	97.0%
plaque 14	1.018	E114	700	690	98.6%
plaque 15	1.007	E115	692	660	95.3%
plaque 16 blanc	.-	E116	<0.5	<0.2	
plaque 17 blanc	.-	E117	<0.5	<0.2	
plaque 18 blanc	.-	E118	<0.5	0.3	

Il est observé une différence entre les valeurs attendues et les valeurs mesurées. Le taux de recouvrement des échantillons est compris entre 91.5 et 106%. Ces résultats montrent que la méthode de reconstitution des échantillons est adéquate et permettront éventuellement lors de la qualification d'expliquer certaines valeurs proches mais hors des critères d'acceptation.

Les calculs ci-dessous expliquent la valeur attendue ainsi que le nombre de log de réduction afin de satisfaire aux critères d'acceptation.

Calcul de la concentration en ppm C de la solution de lactose monohydraté ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) à 68.75 g/l de lactose :

$$PM_{\text{lactoseMonohydraté}} = (12 \cdot 12) + (22 \cdot 1) + (11 \cdot 16) + 18 = 360g$$

$$m_{\text{lactose}} = 360g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 12 \cdot 12 = 144g$$

$$m_{\text{lactose}} = 68.75g \rightarrow m_{\text{carbone}} = \frac{68.75 \cdot 144}{360} = 27.5g$$

$$27.5g/l = 27500mg/l = 27500ppmC$$

avril 2010

Sarah Cardoso

Calcul de la quantité de lactose déposé sur les plaques (1g de solution équivalent à 1 ml) :

$$V_{\text{solution}} = 1\text{ml} \rightarrow m_{\text{lactose Monohydraté}} = 68.75 * 10^{-3} \text{ g} \rightarrow m_{\text{carbone}} = 27.5 * 10^{-3} \text{ g}$$

Après reconstitution des échantillons dans les tubes TOC contenant 40 ml d'eau hautement purifiée et si tout le lactose déposé reste sur les plaques en inox :

$$m_{\text{carbone}} = 27.5 * 10^{-3} \text{ g} = 27.5 \text{ mg} \rightarrow c_{\text{ppmC}} = \frac{27.5}{0.04} = 687.5 \text{ mg/l} = 687.5 \text{ ppmC}$$

Les spécifications étant de 0.5 ppmC, il y a réduction d'un peu plus de 3 log.

Cycle d'essai du lavage du lyophilisateur CS15-1 :

Un cycle de lavage est effectué avec les paramètres suivants :

temps de rinçage : 3 minutes

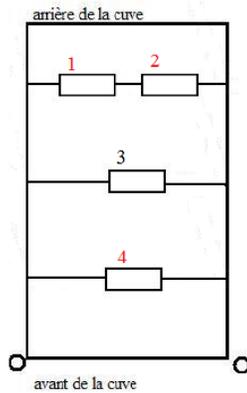
temps de drainage : 5 minutes

Un seul cycle de rinçage/drainage est effectué.

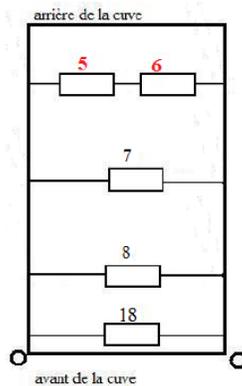
temps de séchage : 60 minutes

Les figures ci-dessous montrent la disposition des plaques sur les plateaux, dans la cuve du lyophilisateur. La plaque 17 se trouve fixée à l'envers en haut, à l'avant de la cuve.

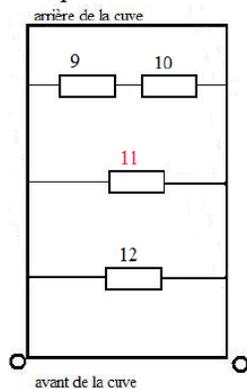
plateau supérieur :



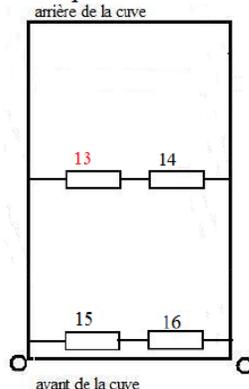
2^{ème} plateau :



3^{ème} plateau :



plateau inférieur :



avril 2010

Sarah Cardoso

Après observation visuelle, il est observé que certaines plaques présentent des taches. Une plaque présente des signes visibles de lactose.

plaques n°1 et n°2 : présence de petites taches visibles

plaque n°4 : présence d'une petite tache

plaque n°5 : présence d'une tache à l'apparence collante

plaque n°6 : présence visible de lactose

plaque n°11 : présence d'une petite tache

plaque n°13 : présence de petites taches

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats des analyses TOC et les observations visuelles concernant les plaques disposées dans le lyophilisateur CS15-1 durant le procédé de CIP.

Echantillon	teneur en carbone [ppm]	observations visuelles
E201	1.7	petites taches visibles
E202	0.5	petites taches visibles
E203	<0.2	rien
E204	0.3	petite tache
E205	29.8	tache d'apparence collante
E206	39.7	présence visible de lactose
E207	<0.2	rien
E208	<0.2	rien
E209	0.3	rien
E210	<0.2	rien
E211	0.5	petite tache
E212	<0.2	rien
E213	3.9	petites taches visibles
E214	<0.2	rien
E215	<0.2	rien
E216	<0.2	rien
E217	<0.2	rien
E218	<0.2	rien
E219	<0.2	-
E220	26340	-

eau hautement purifiée
 solution-mère de lactose

8. CONCLUSION GÉNÉRALE

Grâce à la phase de développement, la qualification du lyophilisateur CS15-1 peut débiter. La reconstitution des échantillons est effectuée selon le protocole rédigé pour la qualification du CIP.

Il est observé durant le lavage du lyophilisateur qu'un seul cycle de rinçage/drainage ne suffit pas. De plus, il est observé que les plaques contaminées par le lactose et disposées à l'arrière des plateaux présentent des traces visibles ce qui est confirmé par les analyses TOC.

Les paramètres du CIP utilisés pour la qualification sont mentionnés ci-dessous :

temps de rinçage : 3 minutes

temps de drainage : 5 minutes

avril 2010

Sarah Cardoso

2 cycles de rinçage/drainage sont effectués.
temps de séchage : 60 minutes

9. DOCUMENTS EN ANNEXE AU RAPPORT DE DÉVELOPPEMENT

Reconstitution des échantillons :

- Copie du certificat d'analyse du lactose monohydraté
- Enregistrement des pesées de solution de lactose déposée sur les plaques
- Enregistrement des pesées d'eau hautement purifiée ajoutée dans les tubes TOC
- Résultats bruts en ppm C du laboratoire d'analyses

Cycle d'essai du lavage du lyophilisateur CS15-1 :

- Enregistrement des pesées lors de la préparation de la solution de lactose
- Enregistrement des pesées lors de la contamination des plaques en inox
- Enregistrement des pesées lors de la reconstitution des échantillons
- Enregistrements du cycle de lavage
- Résultats de la teneur en carbone (ppmC)
- Photo de la disposition des plaques dans la cuve avant le lavage

Annexe 7 : Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1(A-1060)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M.Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L.Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ	_____	_____
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

1. OBJET

Ce rapport contient les résultats de la qualification du lyophilisateur CS15-1 installé dans la salle n° 565. Les résultats de la qualification du CIP (cleaning-in-place) et du SIP (sterilization-in-place) sont présentés dans ce rapport.

La qualification est présentée en deux parties. Tout d'abord, les résultats du CIP sont présentés, puis ceux du SIP.

La qualification du **CIP** consiste à contaminer des plaques en inox avec une solution de lactose préalablement évaporée et de les disposer dans le lyophilisateur afin d'observer le lavage de la cuve. Le lavage effectué dans les conditions « worst-case » atteint son objectif si le résidu de lactose (détecté par la méthode TOC : Total Organic Carbon) après lavage est conforme aux critères d'acceptation définis dans le protocole.

Le lavage est effectué uniquement avec de l'eau hautement purifiée chauffée à 80 °C.

A chaque essai, la teneur en ppmC (ppm carbone) de la solution contaminante de lactose est déterminée, de même que la teneur en ppmC de l'eau hautement purifiée utilisée pour le lavage.

La température et la pression sont mesurées dans la cuve lors du lavage. Les valeurs doivent être conformes aux critères d'acceptation définis dans le protocole.

La qualification du **SIP** consiste à introduire des indicateurs biologiques (languettes contenant 10⁶ spores de *Bacillus stearothermophilus*) dans la cuve du lyophilisateur. La stérilisation atteint son objectif si les indicateurs biologiques sont conformes aux critères d'acceptation définis dans le protocole.

La température et la pression sont mesurées dans la cuve lors de la stérilisation. Les valeurs doivent être conformes aux critères d'acceptation définis dans le protocole.

La qualification de performance (PQ) du lyophilisateur CS15-1 atteint son objectif si tous les tests effectués concernant le CIP et le SIP sont conformes.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce rapport couvre la qualification du lavage (CIP) et de la stérilisation (SIP) de la cuve du lyophilisateur CS15-1.

3. DÉFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

TOC : Total Organic Carbon

ppmC : ppm de carbone

4. RESPONSABILITES

FAB9 :

- Rédiger le rapport de qualification



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

- PHA8 :
- Approuver le rapport de qualification
- RAQ :
- Autoriser le rapport de qualification

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

-

6. DOCUMENTS ASSOCIES

- Mode d'emploi du lyophilisateur CS15-1
- A- 1055 Plan : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1
 - A- 1056 Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)
 - A- 1057 Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Sterilization-in-place (SIP)

7. DEROULEMENT

7.1. DEVIATIONS

Lors des cycles de lavage, une déviation mineure est observée. Certaines plaques présentent encore des résidus de lactose.

- Essai 1 : 7 échantillons hors spécifications
- Essai 2 : 5 échantillons hors spécifications
- Essai 3 : 6 échantillons hors spécifications

Lors des cycles de stérilisation, une déviation a été observée. En effet, le temps de stérilisation n'était pas décompté par le programme informatique ce qui a conduit à devoir arrêter le cycle de stérilisation à l'aide du programme informatique après avoir observé un temps adéquat de stérilisation. Lors du premier cycle de stérilisation, la température a été observée sur le programme informatique. Lorsqu'elle était supérieure à 121.1 °C, un chronomètre a été enclenché. 18 minutes ont été mesurées. Pour les cycles suivants, le même temps d'injection de vapeur n°3 a été effectué.

7.2. Protocole

Le protocole a été suivi.

La qualification du lavage a été séparée de la qualification de la stérilisation.

Cependant, après chaque cycle de lavage, un cycle de stérilisation était effectué afin de conduire au séchage complet de la cuve (cycle de stérilisation arrêté à l'aide du programme informatique).

Egalement avant chaque cycle de stérilisation, un cycle de lavage était effectué (cycle de lavage réduit : 1 cycle rinçage/drainage de 3 et 5 minutes puis séchage pendant 15 minutes) afin de se trouver environ dans les mêmes conditions qu'en routine.



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Lors du lavage, les sondes de mesures de la température et de la pression n'ont pas été disposées selon le schéma présenté dans le protocole. Afin d'améliorer la lisibilité de disposition des sondes de mesures de la température, le schéma a été modifié. Les figures ci-dessous montrent la disposition des sondes de mesures de la température et de la pression.

Les plaques en inox ont été disposées selon le schéma présenté dans le protocole.

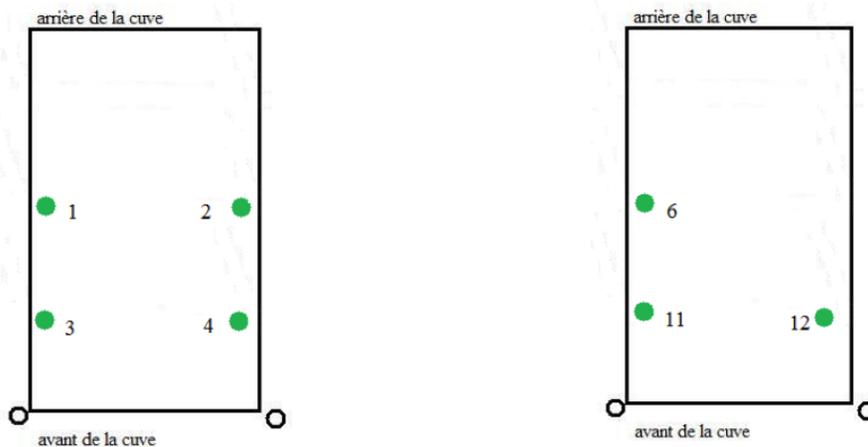


Figure 1 et Figure 2 : disposition des sondes de température sur le plateau supérieur et sur le deuxième plateau

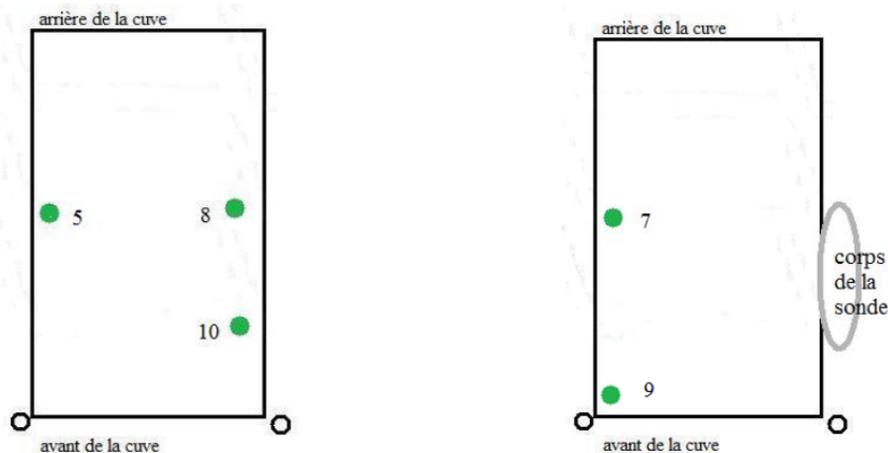


Figure 3 et Figure 4 : Disposition des sondes de température sur le troisième plateau et sur le plateau inférieur. La pression est mesurée au niveau du corps de la sonde.



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Lors de la stérilisation, les sondes de mesure de la température et de la pression ainsi que les indicateurs biologiques n'ont pas été disposés comme mentionné dans le protocole. Le schéma de disposition des sondes et des indicateurs biologique a été modifié afin de faciliter sa lecture. Le schéma de disposition des sondes et des indicateurs biologiques est présenté ci-dessous. Il n'a pas été possible de mettre une sonde et un indicateur biologique dans le drain.
 Les indicateurs biologiques étaient chacun associés à une sonde de mesure de la température.

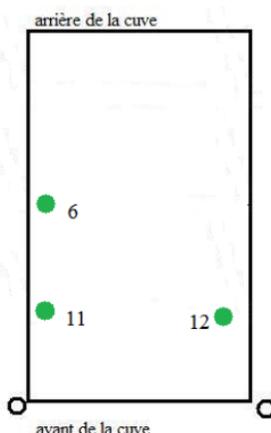
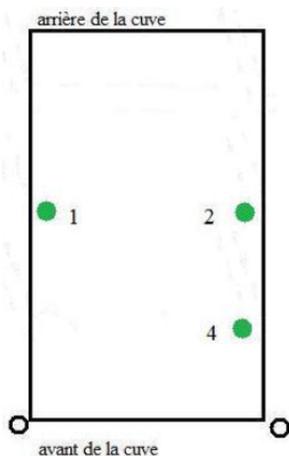


Figure 5 et Figure 6 : disposition des sondes de température et des indicateurs biologiques sur le plateau supérieur et sur le deuxième plateau

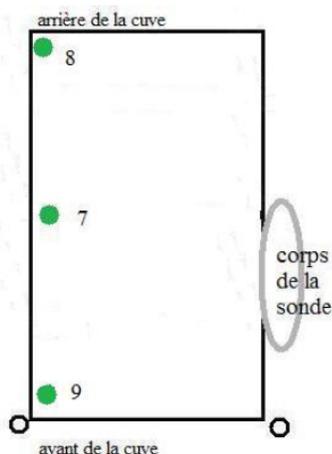
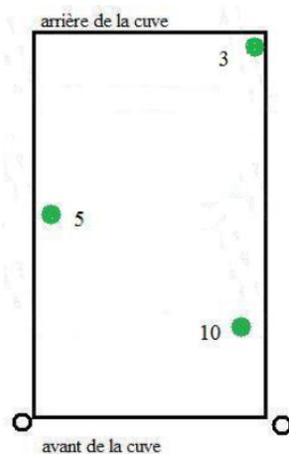


Figure 7 et Figure 8 : disposition des sondes de température et des indicateurs biologiques sur le troisième plateau et sur le plateau inférieur. La pression est mesurée au niveau du corps de la sonde.



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

8. RESULTATS

8.1 RÉSUMÉ

Sur la base des résultats obtenus pour le lavage, les critères d'acceptation définis dans le protocole ont conduit à une phase d'investigation des problèmes rencontrés. En effet, les résultats obtenus concernant les analyses TOC (Total Organic Carbon) n'étaient pas satisfaisants.

Il a été observé que les plaques disposées sur le plateau supérieur présentaient encore des traces de lactose après le lavage. Une plaque se trouvant sur le plateau inférieur présentait également des traces de lactose après le lavage. L'observation visuelle est confirmée avec les résultats des analyses TOC.

Afin d'éviter d'effectuer de nombreuses et coûteuses analyses TOC, une palette de concentration a été effectuée. Ainsi, il n'est plus nécessaire d'envoyer les échantillons à un laboratoire d'analyses pour les analyses TOC, une observation visuelle étant suffisante.

Sur la base des résultats obtenus pour la stérilisation, les critères d'acceptation définis dans le protocole ont conduits à des résultats satisfaisants.

8.2 RÉSULTATS

8.2.1 CIP (cleaning-in-place)

- observation visuelle :

Des photos de la cuve avant et après le lavage sont présentées ci-dessous pour chaque cycle. Il est observé que la cuve est humide après un cycle de lavage. Pour cette raison, un cycle de stérilisation est toujours effectué après un cycle de lavage.

Essai n°1 :

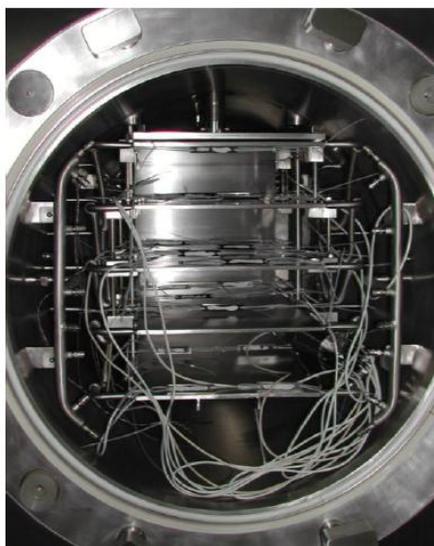


Figure 9 : cuve avant le lavage

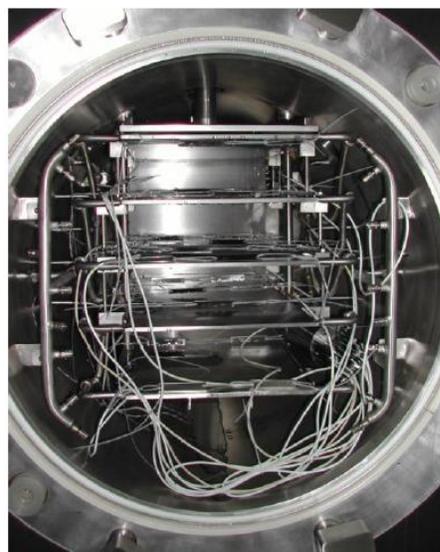


Figure 10 : cuve après le lavage



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Essai n° 2 :

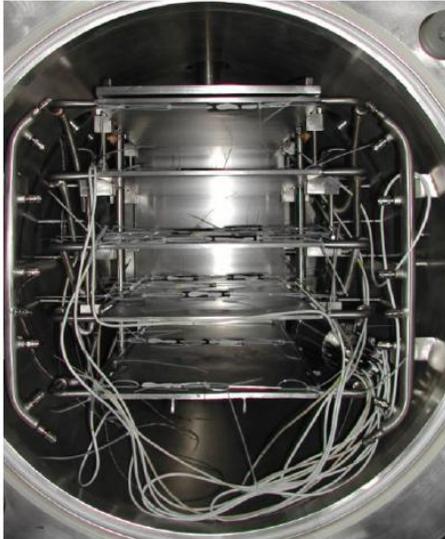


Figure 11 : cuve avant le lavage

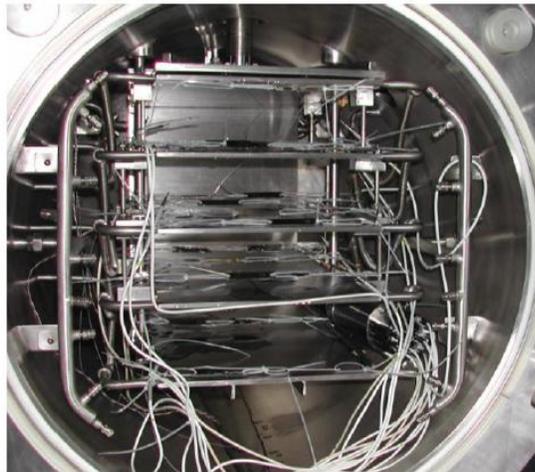


Figure 12 : cuve après le lavage

Essai n° 3 :

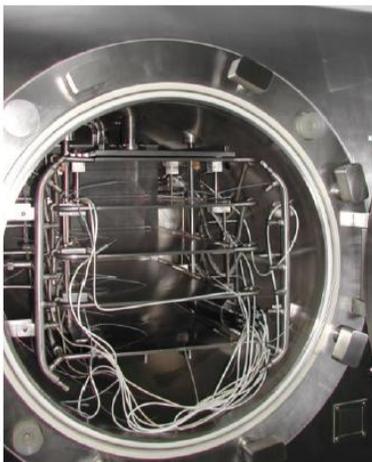


Figure 13 : cuve avant le lavage

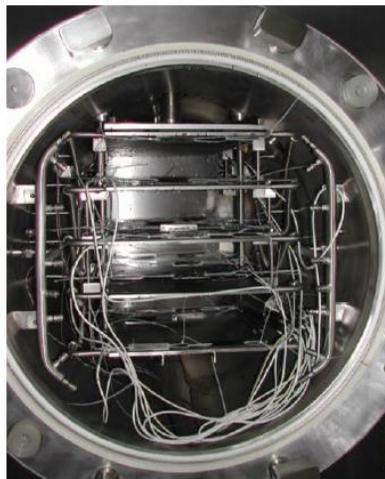


Figure 14 : cuve après le lavage



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Le tableau ci-dessous résume les observations visuelles des plaques en inox après le lavage lors des 3 cycles de qualification. Il contient également les résultats concernant les analyses TOC. Les plaques en inox ont été mises à l'étuve pendant environ 1h après le lavage et avant la reconstitution des échantillons. Cela a permis l'observation d'éventuels résidus de lactose sur les plaques en inox.

Il est observé que, lors des 3 essais, ce sont les mêmes endroits dans la cuve qui présentent des résidus. Les plaques n°2, 3, 4, 5, 6, 7 et 16 présentent au moins une fois des résidus de lactose.

- ppmC : Les résultats des analyses TOC (Total Organic Carbon) se trouvant dans le tableau ci-dessous peuvent être comparés avec les observations visuelles. Certaines plaques ont des résultats qui ne sont pas satisfaisants. Les plaques situées sur le plateau supérieur ainsi qu'une plaque située sur le plateau inférieur au fond à droite ne sont pas bien lavées.

Les plaques n°2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 16 et 17 présentent des valeurs supérieures aux valeurs prédéfinies dans le protocole (0.5 ppmC). Deux plaques (9 et 17) ont des valeurs légèrement supérieures à 0.5 ppmC bien que lors de l'observation visuelle rien n'était visible. Les autres plaques ayant des valeurs supérieures à 0.5 ppmC présentaient des résidus de lactose lors de l'observation visuelle.

Critères d'acceptation: Teneur en carbone résiduel: ≤ 0.5 ppm						
échantillon	ESSAI 1		ESSAI 2		ESSAI 3	
	observation visuelle	ppmC	observation visuelle	ppmC	observation visuelle	ppmC
plaque 1	rien	0.5	rien	0.4	rien	<0.2
plaque 2	lactose visible	71.8	lactose visible	110	lactose visible	12.6
plaque 3	rien	0.9	tache	26.8	petite tache	1.2
plaque 4	tache	0.8	rien	0.4	tache	1.5
plaque 5	tache	1.8	rien	0.4	rien	0.6
plaque 6	rien	<0.2	tache	0.3	tache	10.2
plaque 7	tache	44.1	rien	1.8 ou 16	rien	<0.2
plaque 8	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 9	rien	0.7	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 10	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
plaque 11	rien	0.3	rien	0.2	rien	<0.2
plaque 12	rien	<0.2	rien	0.2	rien	0.5
plaque 13	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	0.5
plaque 14	rien	<0.2	rien	0.5	rien	<0.2
plaque 15	rien	0.3	rien	0.2	rien	<0.2
plaque 16	lactose visible	259	tache	8.5 ou 8.7	lactose visible	140
plaque 17	rien	0.5	rien	0.8	rien	<0.2
plaque 18	rien	<0.2	rien	<0.2	rien	<0.2
EHP	-	0.2	-	<0.2	-	<0.2
solution-mère de lactose	-	23600	-	20440	-	24074



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Les calculs ci-dessous sont repris du protocole du CIP. Ils mentionnent les valeurs attendues si aucun lavage n'est effectué ainsi que le nombre de log de réduction afin de satisfaire aux critères d'acceptation.

Calcul de la concentration en ppm C de la solution de lactose monohydraté ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) à 68.75 g/l de lactose :

$$PM_{\text{lactoseMonohydraté}} = (12 \cdot 12) + (22 \cdot 1) + (11 \cdot 16) + 18 = 360g$$

$$m_{\text{lactose}} = 360g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 12 \cdot 12 = 144g$$

$$m_{\text{lactose}} = 68.75g \rightarrow m_{\text{carbone}} = \frac{68.75 \cdot 144}{360} = 27.5g$$

$$27.5g/l = 27'500mg/l = 27'500ppmC$$

Calcul de la quantité de lactose déposé sur les plaques (1g de solution équivalent à 1 ml) :

$$V_{\text{solution}} = 1ml \rightarrow m_{\text{lactoseMonohydraté}} = 68.75 \cdot 10^{-3}g \rightarrow m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g$$

Après reconstitution des échantillons dans les tubes TOC contenant 40 ml d'eau hautement purifiée et si tout le lactose déposé reste sur les plaques en inox :

$$m_{\text{carbone}} = 27.5 \cdot 10^{-3}g = 27.5mg \rightarrow c_{ppmC} = \frac{27.5}{0.04} = 687.5mg/l = 687.5ppmC$$

Les spécifications étant de 0.5 ppmC, il y a réduction d'un peu plus de 3 log.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats : la hauteur des plateaux n'était pas adéquate, le corps de la sonde gênait le lavage ou le temps de lavage était trop court. Ces hypothèses devront être vérifiées par la suite.

Afin d'éviter d'effectuer de nombreuses et coûteuses analyses TOC, une palette de concentration a été effectuée. Ainsi, il n'est plus nécessaire d'envoyer les échantillons à un laboratoire d'analyses pour les analyses TOC, une observation visuelle est suffisante.

Les résultats et les photos concernant la palette de concentration se trouvent en annexe.

- pression et température : Les graphes suivants présentent la pression et la température au cours des cycles de lavage effectués pour la qualification. Des graphes présentant un agrandissement des deux phases de rinçage/drainage sont également présentés.

Il est observé que la température augmente après le 2^{ème} cycle de rinçage de la cuve. L'hypothèse peut être posée que la température augmentera encore si un 3^{ème} cycle de rinçage est effectué et également si le temps de rinçage est prolongé ce qui pourrait améliorer le lavage.



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

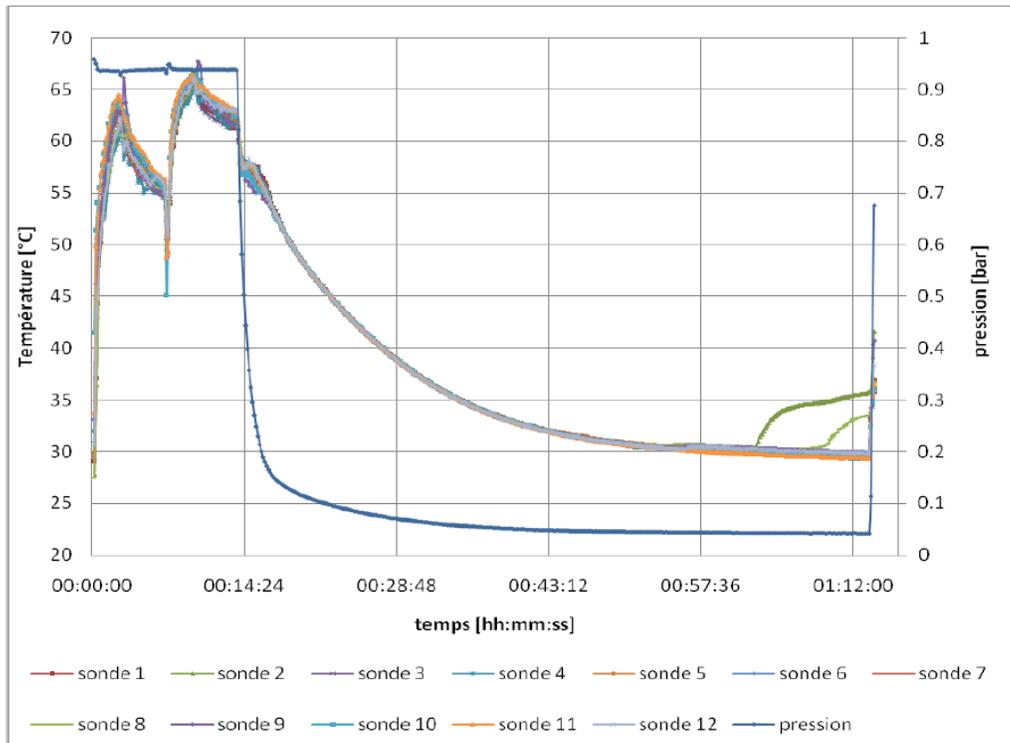


Figure 15 : graphe de la température et de la pression lors du CIP (essai 1)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

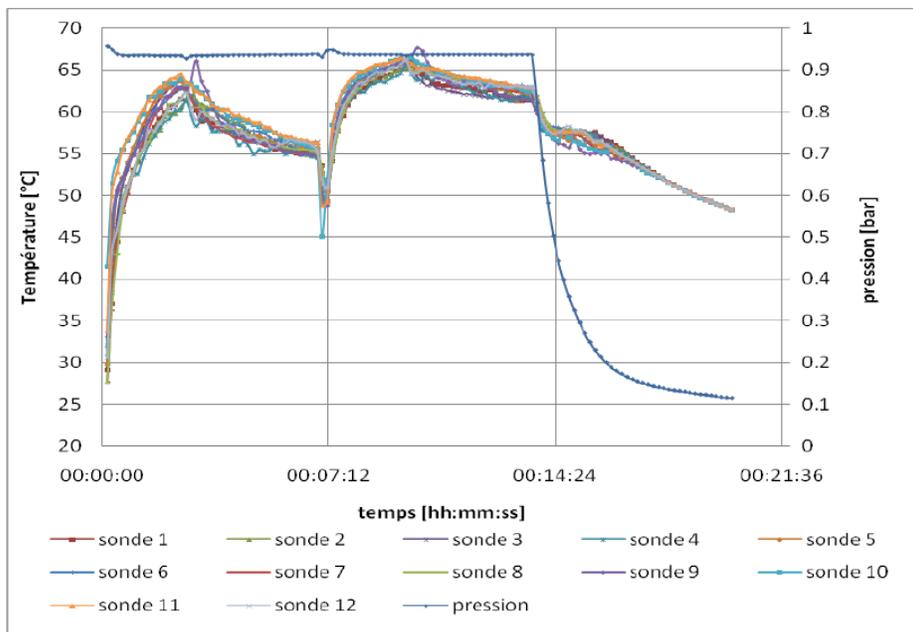


Figure 16 : température et pression lors des deux cycles de rinçage/drainage (essai 1)

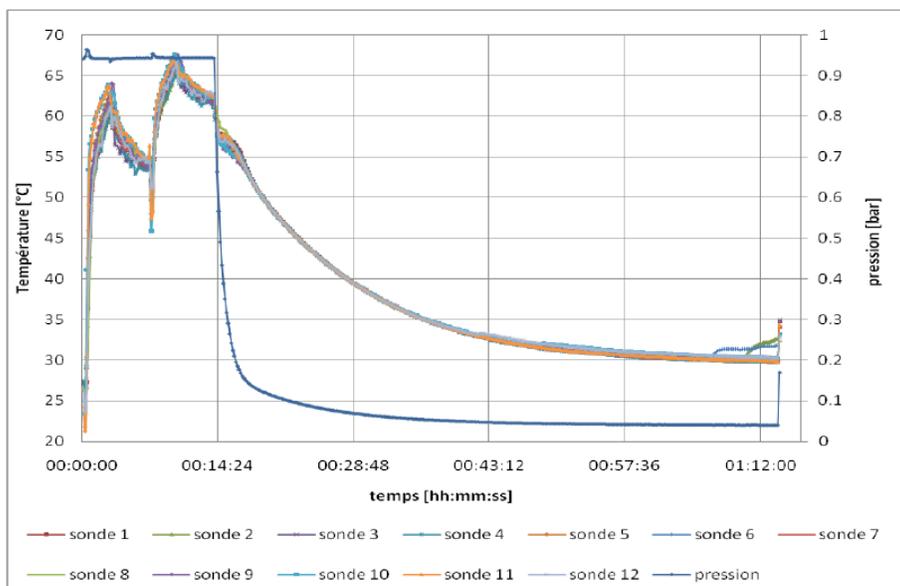


Figure 17 : graphe de la température et de la pression lors du CIP (essai 2)



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

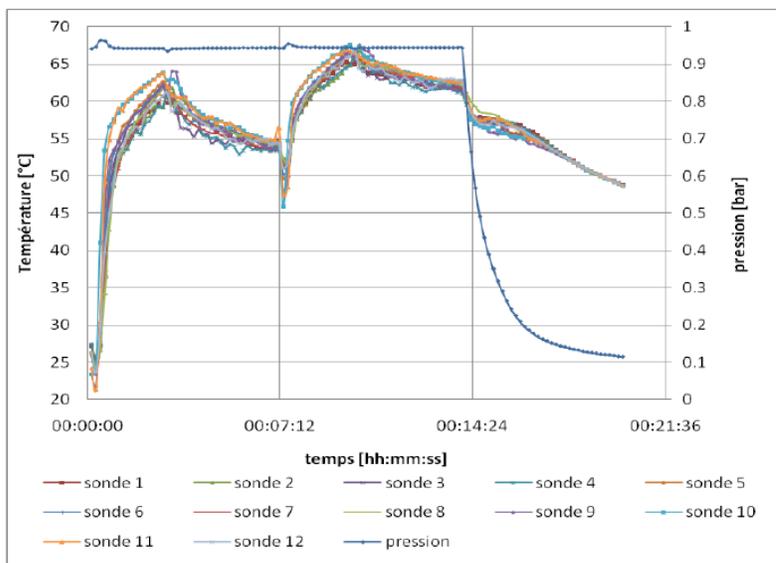


Figure 18 : température et pression lors des deux cycles de rinçage/drainage (essai 2)

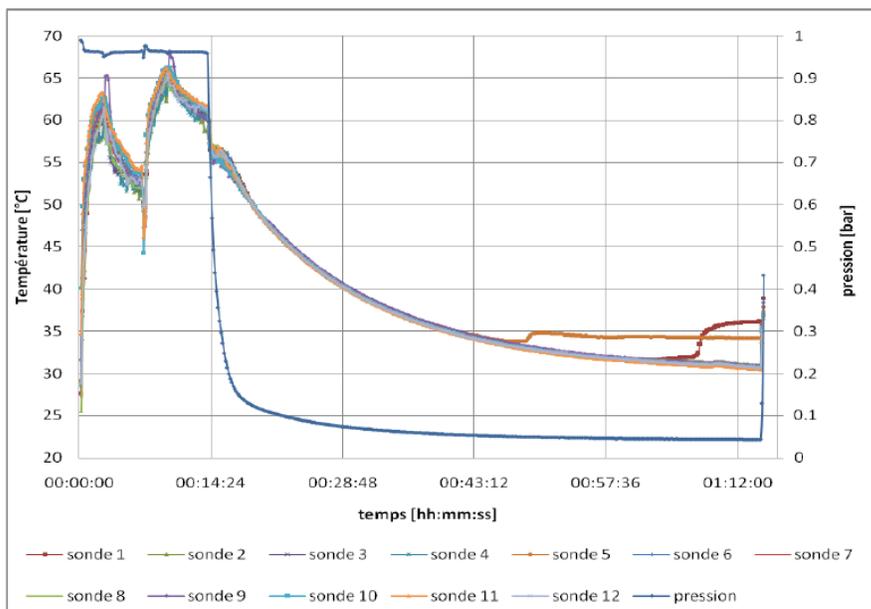


Figure 19 : graphe de la température et de la pression durant le CIP (essai 3)



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

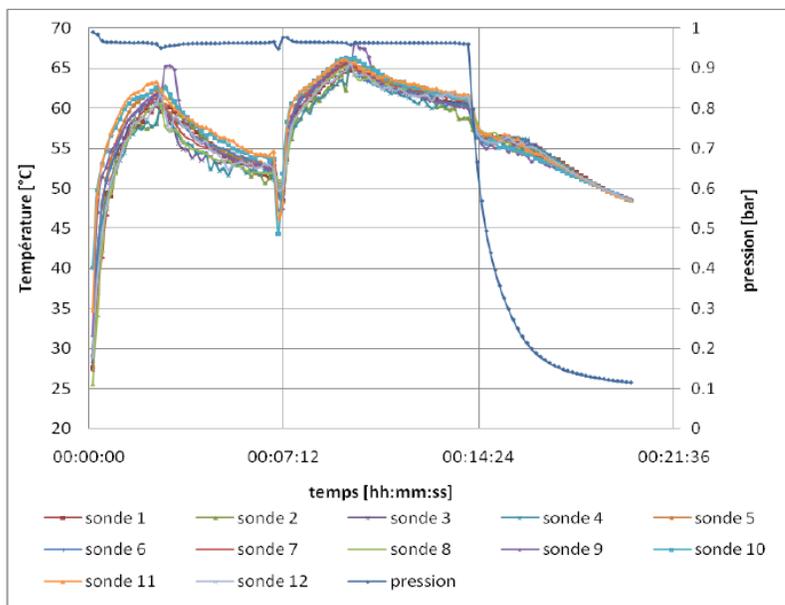


Figure 20 : température et pression durant les deux cycles de rinçage/drainage (essai 3)

- investigation des problèmes :

Le tableau ci-dessous présente les problèmes rencontrés durant la qualification du CIP, les hypothèses posées et les résultats concernant la vérification des hypothèses.

Problème	Certaines plaques en inox contaminées par la solution de lactose disposées dans le lyophilisateur lors d'un cycle de lavage présentent encore des résidus de lactose après le lavage.		
Hypothèse	Hypothèse 1 : la disposition des plateaux n'était pas adaptée	Hypothèse 2 : la sonde gênait le lavage	Hypothèse 3 : le temps de lavage était trop court
Résolution du problème	La hauteur des plateaux est modifiée.	La sonde est enlevée.	Le temps de lavage est prolongé (3 cycles de rinçage/drainage au lieu de 2).
Observation visuelle des plaques disposées dans le lyophilisateur lors du lavage	n°3 et 6 : petite tache n°12, 15 et 16 : lactose visible	n°2 : lactose visible n°3 et 4 : tache d'aspect collant n°5 : faible tache n°16 : lactose visible	- 1 ^{er} essai : n°2, 3 et 7 : petites taches n°12 et 16 : tache d'aspect collant - 2 ^{ème} essai : n°2 : lactose visible n°3 et 4 : traces de lactose n°12 : tache d'aspect collant n°16 : lactose visible



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

Il est observé, malgré les divers changements effectués, que des problèmes sont toujours rencontrés lors du lavage du lyophilisateur. En particulier, certains endroits dans le lyophilisateur sont toujours mal lavés. Par manque de temps, d'autres investigations n'ont pas pu être faites.

De plus, il a été remarqué par le service technique que la cuve d'eau hautement purifiée était vidée très rapidement au niveau d'un seuil critique pour l'alarme lors d'un cycle de lavage du lyophilisateur. Cela est probablement dû au fait qu'un grand volume d'eau hautement purifiée est injecté dans la cuve à une forte pression durant un temps très court.

Une amélioration possible à effectuer pourrait être de modifier les buses permettant d'injecter l'eau hautement purifiée dans le lyophilisateur.

En effet, il est observé que trois buses sont disposées de manière horizontale, les autres buses étant disposées de biais vers le haut ou le bas. Le nombre de plateaux étant de quatre, il serait judicieux d'avoir quatre buses horizontales.

Une amélioration également possible pourrait être de disposer de petites buses à têtes pivotantes afin de pouvoir cibler les endroits dans le lyophilisateur ayant des difficultés à être lavés. De petites buses permettraient de limiter la consommation importante d'eau hautement purifiée en maintenant un fort débit nécessaire au lavage.

La photo ci-dessous montre la disposition des buses à droite à l'intérieur du lyophilisateur. Les buses sont disposées de la même manière de l'autre côté du lyophilisateur.



Figure 21 : disposition des buses



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0		Validé par ---
Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			

8.2.2. SIP (sterilization-in-place)

- observation visuelle :

Des photos de la cuve avant et après la stérilisation sont présentées ci-dessous pour chaque cycle.

Essai n° 1 :

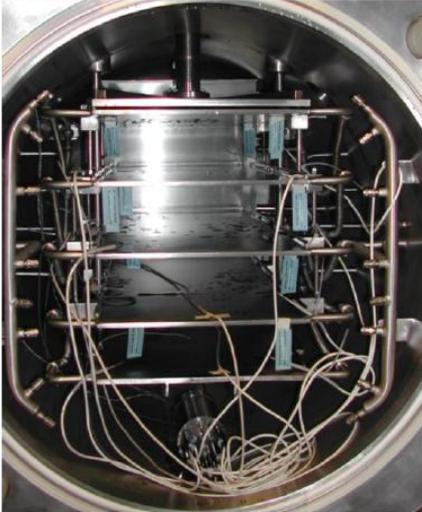


Figure 22 : cuve avant la stérilisation

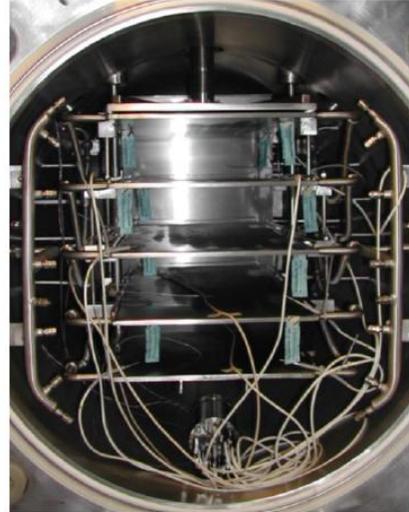


Figure 23 : cuve après la stérilisation

Essai n° 2 :

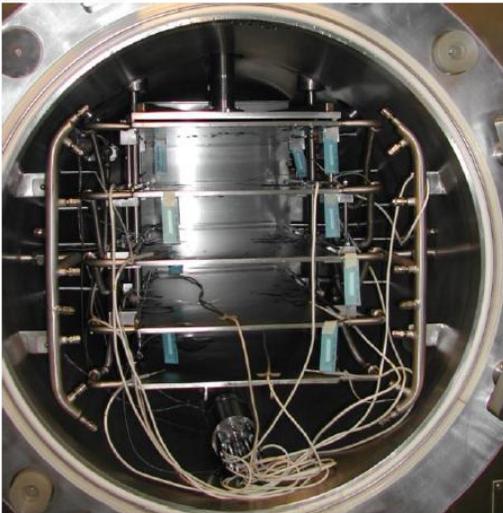


Figure 24 : cuve avant la stérilisation

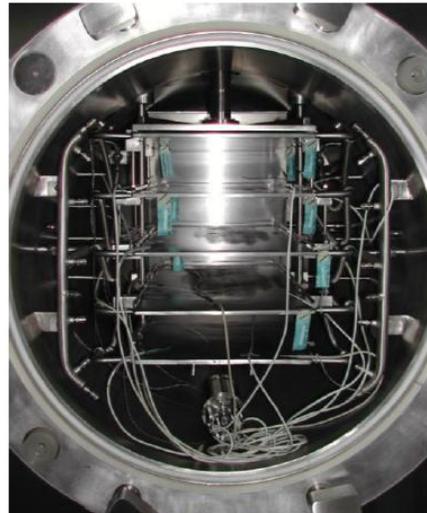


Figure 25 : cuve après la stérilisation



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0		Validé par ---
Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			

Essai n° 3 :

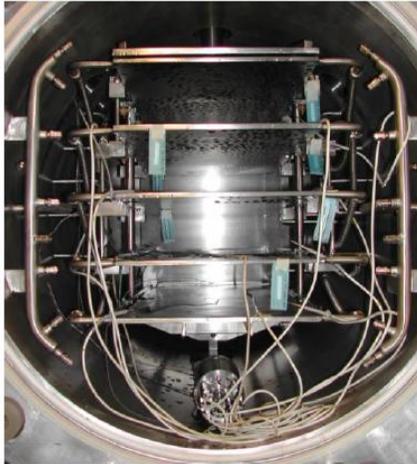


Figure 26 : cuve avant la stérilisation

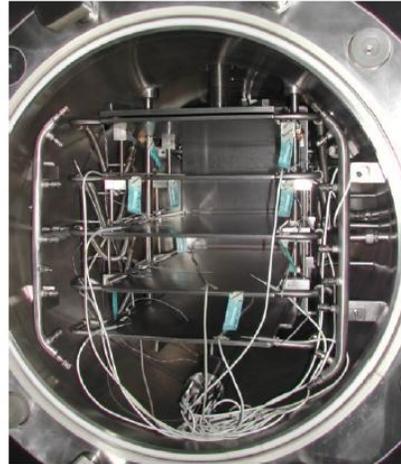


Figure 27 : cuve après la stérilisation

Il est observé que la cuve qui était humide après un cycle de lavage est complètement sèche après un cycle de stérilisation. Cela signifie qu'après chaque cycle de lavage, il est nécessaire d'effectuer un cycle de stérilisation afin de conduire au séchage complet de la cuve.

- température et pression :

Les graphes suivants présentent la température dans la cuve durant la phase de stérilisation lors de chacun des cycles de stérilisation. Il est observé que la température est supérieure à 121.1 °C pendant toute la phase et qu'elle est homogène en tous points durant toute la durée de la stérilisation. Toutes les sondes ont des résultats semblables. On peut donc conclure que la température est uniforme dans toute la cuve.

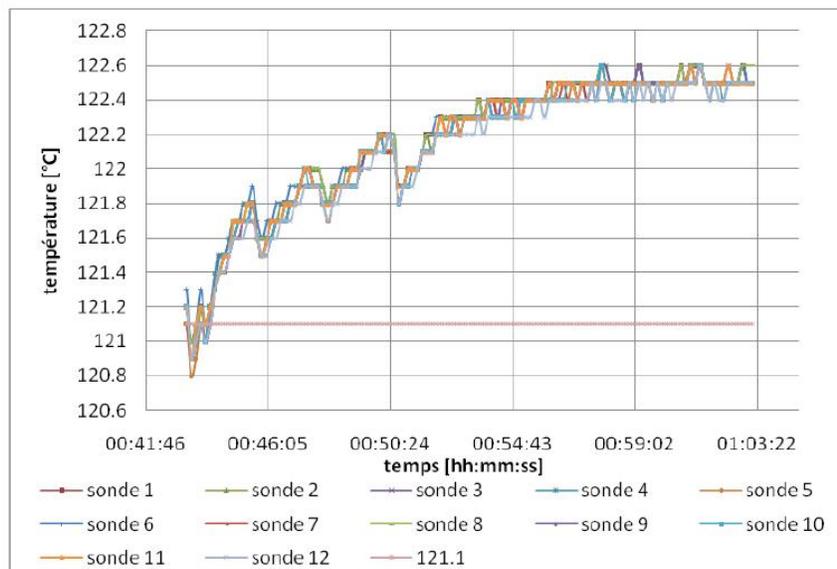


Figure 28 : température durant la phase de stérilisation uniquement lors de l'essai 1



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

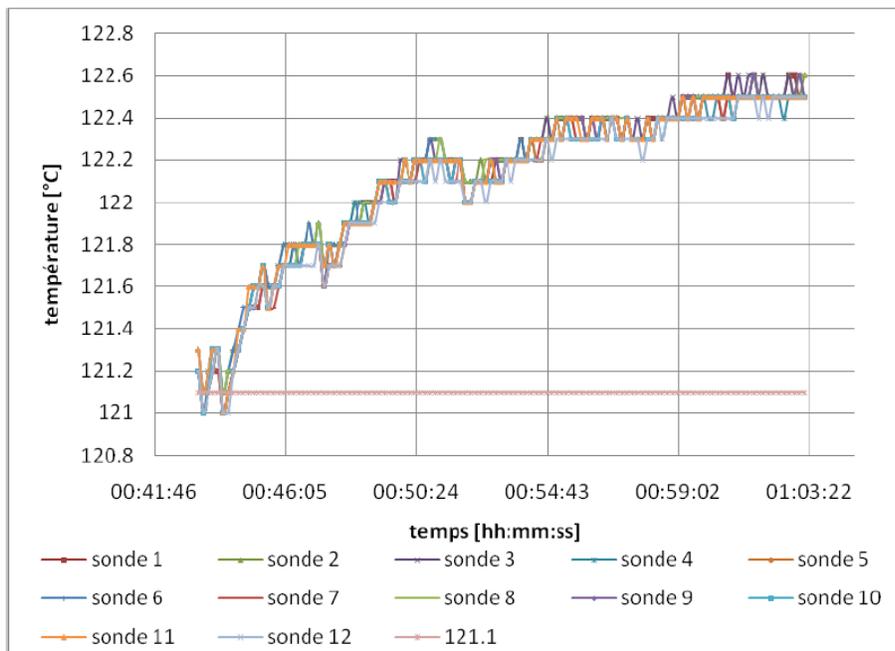


Figure 29 : température durant la phase de stérilisation uniquement lors de l'essai 2

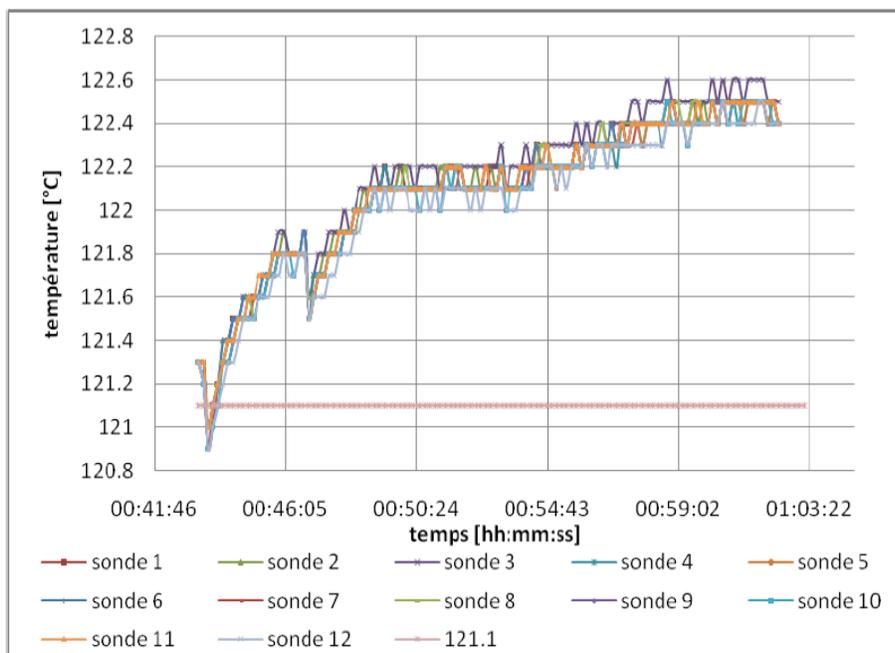


Figure 30 : température durant la phase de stérilisation uniquement lors de l'essai 3



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0		Validé par ---
Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1			

Les graphes suivants présentent la température et la pression pendant toute la durée du cycle de stérilisation lors de chacun des cycles de stérilisation effectué pour la qualification du SIP.

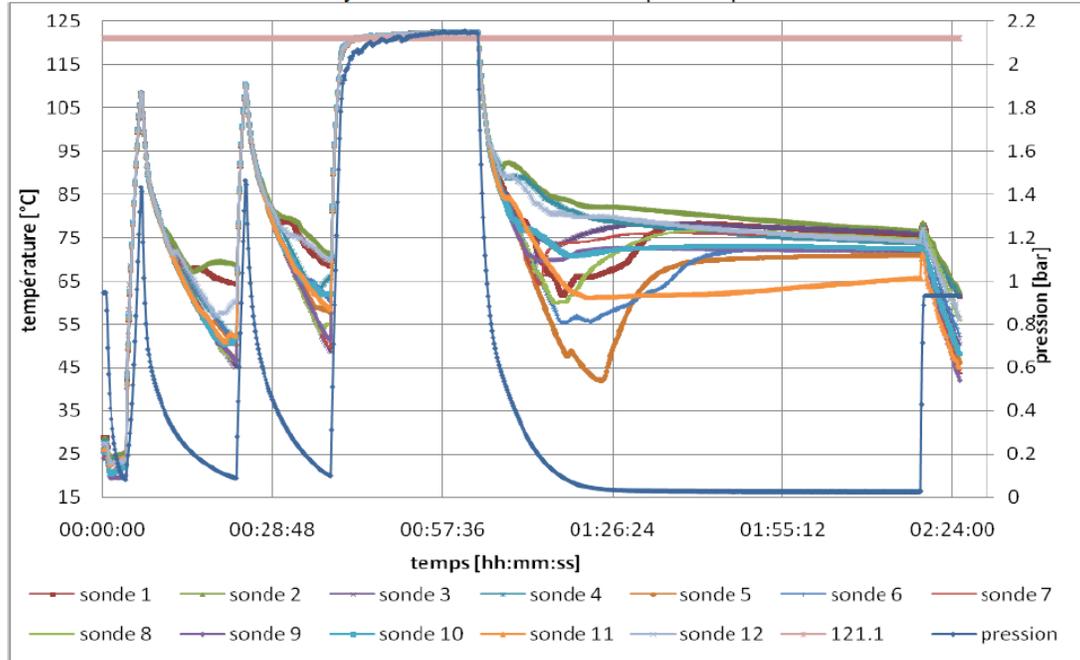


Figure 31 : température et pression durant le cycle de stérilisation complet lors de l'essai 1

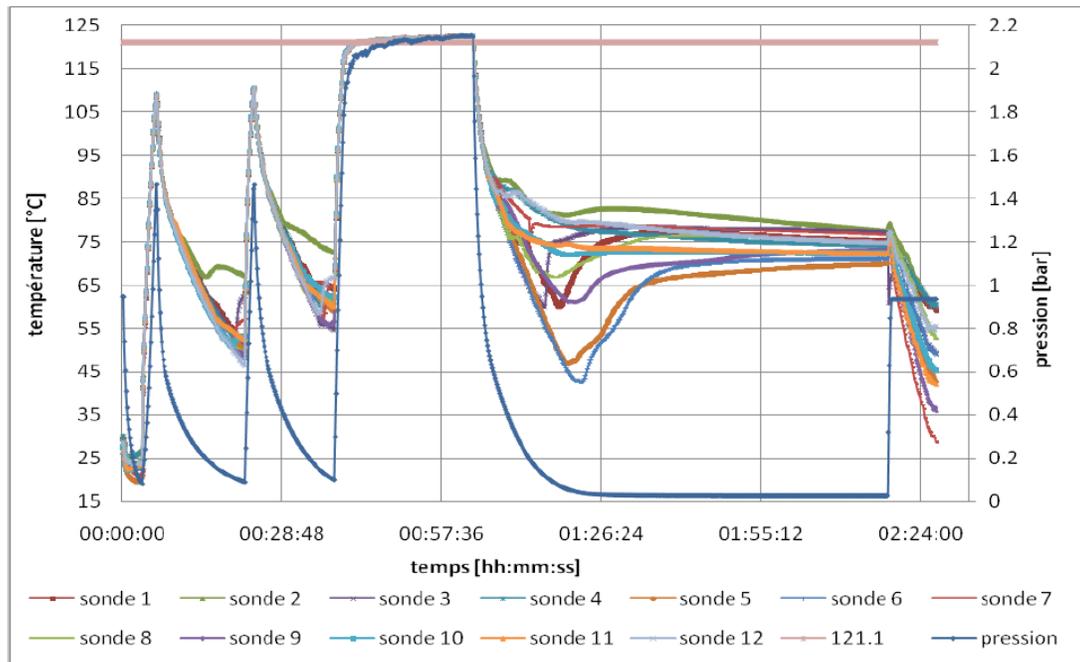


Figure 32 : température et pression durant le cycle de stérilisation complet lors de l'essai 2



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

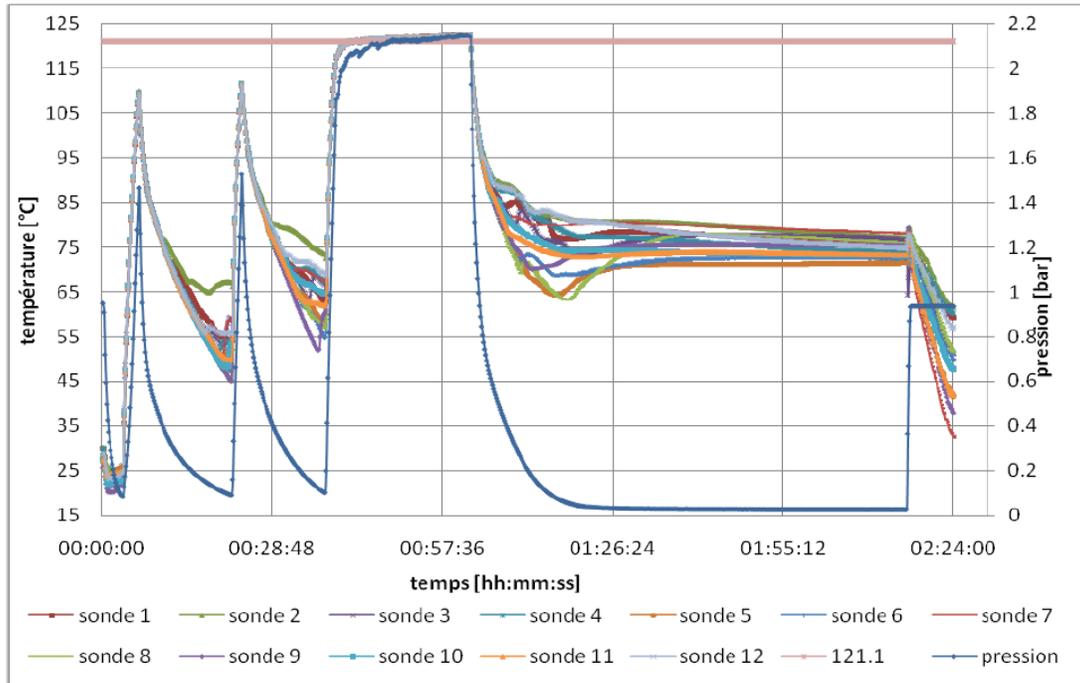


Figure 33 : température et pression durant le cycle de stérilisation complet lors de l'essai 3

- F₀ :

Les valeurs de F₀ ont été calculées grâce au programme informatique STLGWin (programme commandant les sondes de mesures de la température et de la pression). Les valeurs pour chaque cycle et chaque sonde ainsi que la moyenne des trois cycles se trouvent dans le tableau ci-dessous.

F ₀ minimal attendu : 18 minutes												
	F ₀ [min]											
n° de la sonde	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SIP1	28.9	29.1	28.9	28.8	28.7	29.2	28.7	29.1	28.9	28.8	28.9	28.6
SIP2	28.7	28.9	28.7	28.6	28.5	28.8	28.5	28.8	28.7	28.6	28.7	28.3
SIP3	27.6	27.8	28	27.5	27.4	27.7	27.4	27.6	27.5	27.5	27.6	27.2

SIP1 : F₀ compris entre 28.6 et 29.1 minutes
 SIP2 : F₀ compris entre 28.3 et 28.9 minutes
 SIP3 : F₀ compris entre 27.2 et 28 minutes

Il est observé que les valeurs lors de chaque cycle de stérilisation sont largement supérieures au temps recommandé par la Pharmacopée Européenne 6.0 qui est de 15 minutes à 121.1 °C. La valeur F₀ correspond au temps de stérilisation équivalent à une stérilisation à 121.1 °C. Dans ce cas, le temps supérieur à 15 minutes et la température précédemment reportée démontrent que tous les paramètres mécaniques de la stérilisation sont adéquats.



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

- indicateurs biologiques :

Les résultats complets se trouvent en annexe.

Les indicateurs biologiques sont déposés dans des milieux de culture puis incubés à $60\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Ils sont observés après 24h et après 48h.

Un témoin positif est également mis à incuber.

Lors des trois cycles de stérilisation, aucun indicateur biologique n'est positif ce qui démontre que la stérilisation est efficace et reproductible. Toute la cuve est stérilisée adéquatement.



Figure 34 : milieux de culture avec indicateur biologique
à gauche : négatif
à droite : témoin positif

9. CONCLUSION GÉNÉRALE

Un critère d'acceptation n'est pas satisfait :

- La teneur en ppmC de toutes les plaques en inox contaminées par la solution de lactose n'est pas inférieure aux valeurs définies dans le protocole. Certaines valeurs sont supérieures.
- L'investigation des problèmes rencontrés lors de la qualification du CIP ne permet pas de conclure à sa conformité.

Les autres critères d'acceptation sont satisfaits :

- La température mesurée pendant le cycle de lavage est conforme aux valeurs définies dans le protocole.
- La pression mesurée pendant le cycle de lavage est conforme aux valeurs définies dans le protocole.
- Les indicateurs biologiques déposés dans la cuve lors de la stérilisation sont négatifs. Cela correspond aux critères définis dans le protocole.
- La température mesurée pendant le cycle de stérilisation est conforme aux valeurs définies dans le protocole.
- La pression mesurée pendant le cycle de stérilisation est conforme aux valeurs définies dans le protocole.

L'étude de cette qualification est NON-CONFORME, à cause de la non-conformité du CIP.

Pendant, la qualification du SIP est conforme.



Processus VAL.18		RAPPORT		Elaboré par ---
Code A-1060	Version 1.0	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1		Validé par ---

10. DOCUMENTS EN ANNEXE AU RAPPORT DE QUALIFICATION

CIP :

- Copie du certificat d'analyse du lactose monohydraté
- Enregistrement des pesées lors de la préparation de la solution de lactose
- Enregistrement des pesées lors de la contamination des plaques en inox des essais 1, 2 et 3.
- Enregistrement des mesures de températures lors du cycle de lavage des essais 1, 2 et 3
- Enregistrements des mesures de la pression lors du cycle de lavage et séchage final à vide des essais 1, 2 et 3
- Enregistrements des cycles de lavage des essais 1, 2 et 3.
- Photo de la disposition des plaques dans la cuve avant le lavage lors des essais 1, 2 et 3
- Photo de la cuve à la fin du lavage lors des essais 1, 2 et 3
- Résultats de la teneur en carbone (ppm) des essais 1, 2 et 3

SIP :

- Schéma de disposition des sondes de mesure de la température et des indicateurs biologiques
- Photo de la cuve avant la stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Photo de la cuve après stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Enregistrement du cycle de stérilisation lors des essais 1, 2 et 3
- Rapport du laboratoire concernant les indicateurs biologiques

Qualification du lyophilisateur CS15-1 :

- Tout commentaire relatif à l'étude (arrêt, alarme)
- L'analyse de l'étude en fonction des critères d'acceptation
- Le statut de l'étude (Etude conforme, non-conforme)

Annexe 8 : Palette d'observation visuelle de concentrations

Palette de concentration – Solution de lactose

- Critères d'acceptation lors de la qualification du lyophilisateur CS15-1 (CIP : cleaning-in-place) :
 Des plaques contaminées par un ml de solution de lactose à 68.75 g/l et échantillons reconstitués dans 40 ml d'eau hautement purifiée pour des analyses TOC (Total Organic Carbon) : Les résultats doivent être ≤ 0.5 ppmC.
- Le tableau ci-dessous regroupe les résultats des analyses TOC des plaques en inox contaminées. De cette façon, les concentrations exactes en ppmC sont connues et les photos permettent une observation visuelle.
- Les photos ci-dessous ont été contaminées par différentes solutions de lactose à différentes concentrations afin d'avoir un certain résultat lors de la reconstitution des échantillons pour les analyses TOC.

Echantillon	teneur en carbone voulue [ppm]	teneur en carbone mesurée [ppm]	concentration calculée selon SM1 [ppmC]	concentration dans tubes TOC calculée (dilué dans 40 ml) [ppmC]	
SM4	P101	0.3	0.5	10.1	0.3
	P102	0.5	0.5	16.8	0.4
	P103	0.6	0.6	20.1	0.5
	P104	0.8	0.8	26.8	0.7
	P105	1	0.8	33.5	0.8
	P106	2	1.6 ou 1.7	67.1	1.7
	P107	5	4.2 ou 3.9	167.7	4.2
SM3	P108	8	6.7 ou 6.4	268.4	6.7
	P109	10	7.9	335.5	8.4
	P110	15	12.9	503.2	12.6
	P111	20	16.3	671.0	16.8
	P112	30	27.5	1006.5	25.2
SM2	P113	40	42.1	1342.0	33.5
	P114	50	44.8	1677.5	41.9
SM1	P115	EHP	<0.2		
	P116	solution-mère de lactose	23042		

- Le tableau ci-dessous résume la manière de préparer les différentes solutions utilisées pour la contamination des plaques en inox.

concentration de la solution-mère de lactose [g/l] SM1	68.75	ppmC désiré [mg/l=ppmC]	masse de carbone par plaque, dilué dans 40 ml ensuite [mg]	masse de lactose par plaque [g] dans 1 ml	concentration de la solution de lactose déposée [g/l]	volume de SM à prélever pour préparer la solution [ml]	SM à prélever	ad
SM2	50	2	0.005	5	3.64	SM1	50 ml	
1	40	1.6	0.004	4	8	SM2	10 ml	
2	30	1.2	0.003	3	6	SM2	10 ml	
3	20	0.8	0.002	2	4	SM2	10 ml	
4	15	0.6	0.0015	1.5	3	SM2	10 ml	
SM3	10	0.4	0.001	1	10	SM2	50 ml	
5	8	0.32	0.0008	0.8	8	SM3	10 ml	
6	5	0.2	0.0005	0.5	5	SM3	10 ml	
7	2	0.08	0.0002	0.2	2	SM3	10 ml	
SM4	1	0.04	0.0001	0.1	5	SM3	50 ml	
8	0.8	0.032	0.00008	0.08	8	SM4	10 ml	
9	0.6	0.024	0.00006	0.06	6	SM4	10 ml	
10	0.5	0.02	0.00005	0.05	5	SM4	10 ml	
11	0.3	0.012	0.00003	0.03	3	SM4	10 ml	

Exemple de calcul :

$$concentration_désirée = 50 ppmC$$

$$M_{carbone_par_plaque_dilué_dans40ml} = 0.04 * 50 = 2mg$$

$$M_{lactose_par_plaque} = \frac{2 * 10^{-3} * 360}{144} = 0.005g$$

$$concentration_{solution_lactose_dépôtée} = 0.005 * 1000 = 5g/l$$

$$Volume_{solution-mère_à_prélever} = \frac{5 * 50}{68.75} = 3.64ml$$

mesuré : 0.5 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- **mesuré : 0.5 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)**



- **mesuré : 0.6 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)**



- **mesuré : 0.8 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)**



- mesuré : 0.8 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 1.7 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 4.2 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 6.7 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 7.9 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 12.9 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 16.3 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- mesuré : 27.5 ppmC (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- **mesuré : 42.1 ppmC** (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



- **mesuré : 44.8 ppmC** (une fois reconstitué dans 40 ml d'EHP)



Annexe 9 : Rapport de validation du remplissage aseptique du lyophilisateur CS15-1 (A-1062)



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
 Centres interdisciplinaires et logistique médicale
 Service de Pharmacie



Processus VAL.18	RAPPORT			Elaboré par ---
Code A-1062	Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1			Validé par ---
Version 1.0				Libéré par ---
Remplace Nouveau	S'applique à Tous	Dossier ---	Article ---	Diffusé le

	NOM	FONCTION	SIGNATURE	DATE
Elaboré par :	S. Cardoso		_____	_____
Validé par :	M.Voeffray	PhaRU FAB9	_____	_____
	L.Berger	PhaRU PHA8	_____	_____
	R. Chianese	RAQ		
Libéré par :	R. Chianese	RAQ	_____	_____



Processus VAL.18		RAPPORT		Elaboré par ---
Code A-1062	Version 1.0	Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1		Validé par ---

1. OBJET

Ce rapport contient les résultats de la validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1 situé dans le local technique n° 565, la porte se trouvant sous un flux laminaire de classe A dans la salle n°562 de classe B.

La validation du remplissage aseptique est effectuée en deux parties : tout d'abord, la validation est faite avec des flacons de 50 ml remplis avec 30 ml de Media-fill. Ensuite, la validation est faite avec des flacons de 3 ml remplis avec 2 ml de Media-fill. Du milieu de culture est utilisé pour remplir les flacons afin de pouvoir déterminer s'il y a une contamination ou pas.

Les flacons contenant le milieu de culture sont ensuite mis à incuber pendant 7 jours à 20-25 °C puis 7 jours à 30-35 °C. Ils sont observés les jours ouvrables.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce rapport couvre la validation du remplissage aseptique de la cuve du lyophilisateur CS15-1. Toutes les étapes permettant d'aboutir au remplissage de la cuve sont comprises dans cette validation (lavage et dépyrogénéisation des flacons, transfert en zone aseptique, remplissage des flacons, mise en place des bouchons, chargement dans le lyophilisateur,...).

3. DÉFINITIONS

FAB9 : unité de fabrication

PHA8 : unité de contrôle qualité

RAQ : responsable assurance qualité

4. RESPONSABILITES

FAB9 :

- Rédiger le rapport de validation

PHA8 :

- Approuver le rapport de validation

RAQ :

- Autoriser le rapport de validation

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

-

6. DOCUMENTS ASSOCIES

	Mode d'emploi du lyophilisateur CS15-1
A-1055	Plan : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1
A-1056	Annexe 1 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Cleaning-in-place (CIP)
A-1057	Annexe 2 : Protocole PQ Lyophilisateur CS15-1 – Sterilization-in-place (SIP)
A-1060	Rapport PQ Lyophilisateur CS15-1
A-1059	Protocole de validation du remplissage aseptique du Lyophilisateur CS15-1

7. DEROULEMENT

7.1. DEVIATIONS

Une déviation mineure a été observée. Lors d'un cycle de stérilisation effectué avant le remplissage du lyophilisateur, une alarme s'est déclenchée. Il y a depuis « Défaut » en jaune sur l'écran de contrôle du lyophilisateur sur l'ordinateur.

Une autre déviation est survenue. Des flacons se sont cassés dans le lyophilisateur lors de l'abaissement des plateaux afin de permettre le bouchonnage des flacons.

7.2. Protocole

Le protocole a été suivi.



Processus VAL.18		RAPPORT		Elaboré par ---
Code A-1062	Version 1.0	Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1		Validé par ---

Cependant, le filtre hydrophobe n'a pas été utilisé car une pièce servant à le maintenir en place est manquante.

Lors du deuxième essai de remplissage avec les flacons de 50 ml, au moment de la descente des plateaux afin de permettre le bouchonnage des flacons, un problème est survenu. 6 flacons disposés sur le plateau inférieur se sont cassés en risquant l'endommagement du plateau inférieur. Pour le troisième essai, les flacons ont été bouchonnés manuellement hors du lyophilisateur. Les flacons ont été scellés à l'aide des capsules directement dans la zone aseptique afin de réduire le risque d'ouverture non-voulue (« pop-up ») des flacons lors de leur déplacement.

La simulation est effectuée en faisant des forçages à l'aide du logiciel informatique commandant le lyophilisateur (se référer au mode d'emploi pour une explication détaillée). La pompe sèche (pompe à vide à palettes) est démarrée et arrêtée à 500 mb. Le vide est cassé en ouvrant les vannes de l'air provenant de la zone aseptique. Ce processus est effectué trois fois.

La fermeture des fioles consiste à faire le vide une quatrième fois jusqu'à 800 mb, de descendre les plateaux, de casser le vide et de remonter les plateaux. Cependant, en raison des problèmes rencontrés mentionnés plus haut, cela n'est effectué que pour les 2 premiers essais concernant les flacons de 50 ml.

En fonction de ce qui a été expliqué concernant la simulation, il a été observé durant les essais qu'il est plus judicieux d'être deux pour le déroulement des essais. En effet, une personne est dans la zone aseptique et une autre personne peut manipuler le lyophilisateur à l'aide du logiciel informatique dans le local technique.

8. RESULTATS

8.1 RÉSUMÉ

Concernant les flacons de 50 ml, aucune contamination n'a été observée après 14 jours d'incubation des milieux de culture.

Concernant les flacons de 3 ml, aucune contamination n'a été observée après 14 jours d'incubation des milieux de culture.



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1062	Version 1.0	Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

8.2 RÉSULTATS

Le tableau suivant regroupe tous les résultats de l'observation des flacons remplis de milieux de culture.

volume des flacons [ml]	essai n°	dénomination des flacons	nombre de flacons conformes	nombre de flacons non-conformes	Résultat de l'étude
50	1	50V1P0	8	0	conforme
		50V1P1	37	0	
		50V1P2	38	0	
		50V1P3	38	0	
		50V1P4	38	0	
	2	50V2P0	8	0	
		50V2P1	38	0	
		50V2P2	37	0	
		50V2P3	38	0	
		50V2P4	32	0	
	3	50V3P0	8	0	
		50V3P1	38	0	
		50V3P2	38	0	
		50V3P3	38	0	
		50V3P4	38	0	
3	1	03V1P0	9	0	conforme
		03V1P1	72	0	
		03V1P2	72	0	
		03V1P3	72	0	
		03V1P4	72	0	
	2	03V2P0	11	0	
		03V2P1	72	0	
		03V2P2	72	0	
		03V2P3	72	0	
		03V2P4	72	0	
	3	03V3P0	11	0	
		03V3P1	72	0	
		03V3P2	72	0	
		03V3P3	72	0	
		03V3P4	72	0	
Résultat de la validation : conforme					

Lors du premier lot avec les flacons de 50 ml, un flacon a été mal bouchonné. Il a été retiré du lot.

Lors du deuxième lot avec les flacons de 50 ml, 6 flacons se sont cassés dans le lyophilisateur. Un flacon a été mal bouchonné. Il a été retiré du lot.

Les flacons retirés des lots n'ont pas été pris en compte pour la validation.

Lors du 7^{ème} jour d'incubation du troisième lot avec les flacons de 3 ml, un flacon contaminé a été observé. Il est cependant conservé et incubé jusqu'à la fin avec les autres flacons.

Aucun autre flacon contaminé n'a été observé, de plus aucune croissance de la contamination n'est observé ce qui aurait normalement dû se passer si la contamination était une moisissure. Cela a conduit à une investigation concernant cette contamination à l'aide de M. Blanc travaillant au laboratoire au 19^{ème}



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1062	Version 1.0	Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1	Validé par ---

étage du CHUV. La contamination a été prélevée à l'aide d'une seringue et déposée sur une lame en verre. Elle a été colorée au bleu de lactophénol puis observée au microscope (grossissement de 40x). Aucune structure cellulaire n'est observée ce qui conduit à la conclusion que la contamination est une particule inerte.

La figure ci-dessous représente un schéma de la place de travail sous le plafonnier durant le remplissage aseptique.

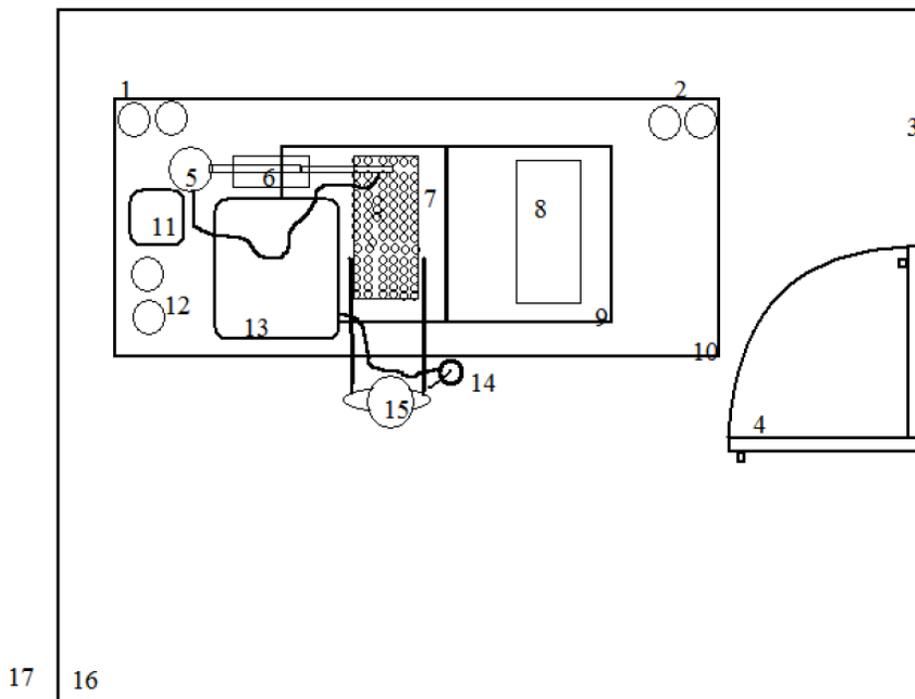


Figure 1 : schéma de la zone de travail vue depuis le haut durant le remplissage aseptique

légende :

- 1 et 2 : plaques de gélose ouvertes ; sédimentation
- 3 : vitre permettant d'avoir un contact visuel avec le local technique
- 4 : porte du lyophilisateur
- 5 : bouteille contenant le milieu de culture
- 6 : statif avec pinces et support permettant de tenir la bouteille contenant le milieu de culture et la tubulure
- 7 : boîte métallique contenant les flacons à remplir
- 8 : couvercle de la boîte métallique
- 9 : papiers stériles déposés sur la table de travail
- 10 : table de travail mobile
- 11 : emballage contenant les bouchons
- 12 : plaques de gélose pour les empreintes de gants effectuées à la fin de travail
- 13 : pompe de remplissage avec tubulure stérile
- 14 : pédale permettant d'actionner le remplissage des flacons



Processus VAL.18		RAPPORT	Elaboré par ---
Code A-1062	Version 1.0		Validé par ---
Rapport Validation du remplissage aseptique Lyophilisateur CS15-1			

15 : personnel effectuant le remplissage des flacons
16 : plafonnier/ flux laminaire de classe A
17 : salle de classe B

Par manque de temps, des investigations approfondies quant à la provenance exacte de la contamination n'ont pas pu être réalisées.
Cependant, des améliorations à faire lors de la prochaine validation sont listées ci-dessous.

Amélioration possible pour la prochaine validation du remplissage aseptique :

- Le personnel procédant à la validation du remplissage aseptique doit être qualifié et son habillement doit être validé.
- Avant de commencer le remplissage aseptique, lors du lavage des flacons à la machine à laver, conserver un nombre de flacons à déterminer afin de pouvoir procéder aux tests suivants sur les flacons vide :
 - Test de stérilité selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.6.1
 - Essai des endotoxines bactériennes selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.6.14 (la méthode utilisée au CHUV est la méthode de chromocinétique)
 - Contamination particulaire : particules non visibles selon la Pharmacopée Européenne 6.7, chapitre 2.9.19
- Emballer les boîtes contenant les flacons dans un triple emballage (1^{er} enlevé : passage dans le sas de transfert ; 2^{ème} enlevé : passage dans la zone ; 3^{ème} enlevé : passage sous le flux laminaire)
- Utiliser une boîte adapté aux flacons de 3 ml ou mettre les flacons dans le couvercle (En effet, il a été observé lors du remplissage à l'aide de la pompe qu'il était difficile de remplir convenablement les flacons situés à proximité des bords de la boîte.)
- Utiliser un statif inoxydable
- Utiliser un impacteur (appareil « Air idéal », contenant une plaque de sédimentation et permettant de filtrer 1000 litres d'air pendant 10 minutes)
- Utiliser un appareil mesurant le nombre de particules non-viables dans la zone durant le travail.
- Utiliser des géloses de contact pour le personnel une fois que le travail est terminé.
- Lors de la mise en incubation des flacons contenant le milieu de culture, il serait judicieux d'incuber des témoins positifs en même temps (un témoin contenant une moisissure/*Aspergillus niger* et un témoin contenant des bactéries aérobies/*Staphylococcus aureus*).
- Lors de l'observation des flacons contenant le milieu de culture, il pourrait être judicieux d'avoir une observation par deux personnes afin d'avoir un contrôle.

9. CONCLUSION GÉNÉRALE

La validation du remplissage aseptique du lyophilisateur CS15-1 est conforme. Cependant, il serait judicieux de procéder une nouvelle fois à la validation en tenant compte des remarques mentionnées ci-dessus.

10. DOCUMENTS EN ANNEXE AU RAPPORT DE VALIDATION

- Certificats d'analyse du milieu de culture.
- Résultats d'analyse du contrôle qualité des essais 1, 2 et 3 pour les validations avec les deux types de flacons.
- Enregistrement des cycles de lavage et de stérilisation effectués avant les essais 1, 2 et 3 pour les validations avec les deux types de flacons.
- Enregistrement des appareils utilisés (machine-à-laver, étuve, autoclave)
- Tout commentaire relatif à l'étude (arrêt, alarme)
- L'analyse de l'étude en fonction des critères d'acceptation
- Le statut de l'étude (Etude conforme, non-conforme)