

# La Vague

LE MAGAZINE DE LA PHARMA ET DES BIOTECHS

N° 80 | Janvier 2024  
Trimestriel

The Myth of Testing Colored Samples: Debunked.

The alternatives and rapid Microbiological methods & Pharmacopeias world.

Conception de modèles galéniques intelligents pour la formulation de molécules actives.

Advancing Sustainability: Recycling Single-Use Technology in the Pharmaceutical Industry.

## Développement Durable Microbiologie



# Sommaire

N°80 // Janvier 2024

<b>Édito</b>   Retour vers le futur ! .....	3
<b>Ils ont participé à ce numéro</b>   .....	4
<b>Billet d'humeur</b>   Bâtissons tous ensemble la communauté A3P Biothérapies .....	5
<b>Actualités A3P</b>   Synthèse A3P Single-use.....	6
<b>Actualités A3P</b>   Synthèse A3P Biothérapie .....	10
<b>Actualités A3P</b>   Événements A3P en 2024 .....	13
<b>Actualités A3P</b>   Événement A3P Nettoyage/Bionettoyage .....	14
<b>Actualités A3P</b>   Événement A3P Microbiologie .....	15
<b>Réglementaire</b>   Ring .....	16
<b>Microbio</b>   The alternatives and rapid Microbiological methods & Pharmacopeias world .....	17
<b>Microbio</b>   Industry pivots to rFC adoption: Reshaping the Endotoxin Test & Regulatory Landscape .....	23
<b>Microbio</b>   Rapid Bioburden & Sterility Testing: exploring Detection Limits of an Automated Solid Phase Cytometry System .....	25
<b>Microbio</b>   The Myth of Testing Colored Samples: Debunked.....	29
<b>Microbio</b>   Conception de modèles galéniques intelligents (stimuli-sensitifs) pour la formulation de molécules actives .....	33
<b>Eco</b>   Comment la sobriété du process peut aider les industries pharma à atteindre leurs objectifs de réduction d'empreinte carbone ? .....	38
<b>Recycling</b>   Advancing Sustainability: Recycling Single-Use Technology in the Pharmaceutical Industry .....	43

## La Vague

Revue trimestrielle N° 80 - Janvier 2024  
Numéro offert aux adhérents de l'Association (valeur 10€)

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

• Rédactrice en chef  
Anne RIGOULOT

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

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

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

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

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

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

Tirage : 2300 exemplaires  
Imprimé sur du papier issu de forêts durables.



## Les avantages de l'adhésion A3P

Inscrivez le site\* de votre entreprise &

faites bénéficier de toute la base documentaire, à vos collaborateurs !



Depuis votre espace personnalisé sur le site A3P, bénéficiez de tous les **contenus techniques, scientifiques** (supports de conférences et guides), accédez aux **annuaires adhérents et sociétés**, profitez de l'outil de **veille réglementaire RING**, participez à des **événements privilégiés**, utilisez l'**application mobile**, recevez tous les trimestres sur votre bureau la **version papier du magazine La Vague**, ... et surtout faites partie du **Réseau de l'Industrie du propre & stérile** !



**Tout le contenu des événements A3P**  
conférences, ateliers, ...



**Réglementaire**  
veille, warning letter, ...



**Tous les Guides Techniques & scientifiques**



**Annuaire des membres du réseau**

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

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

# Retour vers le futur !

Que ce soit dans le domaine particulier des pyrogènes ou plus généralement dans celui de la microbiologie, quelle année 2023 ! Je vous ferai grâce de revenir sur l'Annexe 1 qui nous a mobilisée ces dernières années ! Je vais plutôt me consacrer à l'essai des endotoxines bactériennes qui devrait prendre le relais et nous occuper en 2024 :

**alors montez à bord de la Delorean et accrochez-vous !**

Tout d'abord un peu d'histoire sur l'essai LAL et l'évolution des méthodes de détection des pyrogènes en général. Cette histoire a connu une évolution fulgurante ces dernières années, depuis le test pyrogène chez le lapin en passant par le test au Lysat d'Amoebocytes de *Limule* puis le test MAT et finalement les méthodes recombinantes novatrices.

**Test pyrogène lapin.** Mis au point au début du XXe siècle, c'est dans les années 20 que le test pyrogène est devenu incontournable pour tester l'absence de produits pyrogènes dans les injectables. Il consiste à mesurer l'élévation de température provoquée chez le lapin par l'injection intraveineuse d'une solution stérile du produit à examiner. Le chapitre 2.6.8 a été publié pour la première fois dans la Pharmacopée Européenne en 1986. Encore décrit aujourd'hui dans certains dossiers AMM et de fait utilisé malgré l'existence d'alternatives *in vitro*, la Commission européenne de Pharmacopée a décidé dès juin 2021 de prendre des mesures qui devraient permettre le remplacement total de l'essai des pyrogènes sur lapin dans la Pharmacopée Européenne dans un délai de 5 ans.

**Test LAL.** L'histoire de l'essai LAL remonte quant à elle en 1956, lorsque les scientifiques Frederick Bang et Jack Levin ont découvert que le sang bleu du *Limulus polyphemus* (crabe en fer à cheval) contenait des protéines capables de sauver des vies humaines. Les principes actifs contenus dans les cellules sanguines (Amoebocytes) coagulent en présence d'endotoxines bactériennes. C'est de cette découverte qu'ont été mises au point les différentes méthodes de dosage : gel point final, turbidimétrie cinétique, colorimétrie cinétique et colorimétrie point final. En 1970, la FDA approuve le test LAL comme alternative au test lapin pour identifier la présence d'endotoxines dans les médicaments pharmaceutiques, produits biologiques et dispositifs médicaux. L'essai LAL commence alors à être commercialisé en tant que méthode reconnue dans l'industrie pharma. Mais il faudra attendre les années 1980 pour que l'essai intègre la Pharmacopée Américaine (en 1980, actuellement chapitre 85) puis la Pharmacopée Européenne (en 1989, actuellement chapitre.2.6.14), soit reconnu comme une méthode officielle pour la détection des pyrogènes.

**Test MAT.** Dans une démarche de réduction de l'utilisation de l'animal, l'Essai d'activation des monocytes a été ajouté à la Pharmacopée Européenne en 2009 (chapitre 2.6.30) pour offrir une alternative *in vitro* à l'essai des pyrogènes sur lapin, permettant de détecter à la fois les endotoxines et les pyrogènes non endotoxiniques. Toutefois, malgré les multiples efforts déployés pour encourager les industriels à utiliser l'essai MAT au lieu de l'essai des pyrogènes sur lapin, peu d'entre eux ont franchi le cap.

**Méthodes recombinantes.** Ce sont peut-être les méthodes recombinantes qui vont finalement détourner les utilisateurs du lapin. Elles ont commencé à émerger dans les années 2000 et c'est la Pharmacopée Européenne qui, la première, a montré sa motivation à supporter l'approche 3R en officialisant l'utilisation d'un réactif recombinant (facteur C recombinant ou rFC) en janvier 2021 (chapitre 2.6.32). La mise sur le marché d'autres réactifs recombinants "Full Cascade" rCR (Recombinant cascade reagent) présage d'une révolution dans le monde des endotoxines, resté bien calme pendant plus de 50 ans. Si l'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour la limule lui a permis de devenir une espèce protégée, c'est une nouvelle étape vers des tests d'endotoxines 100% "animal free", qui nous permettent de répondre à l'initiative 3R (Replace, Reduce, Refine).

## Et maintenant tournons-nous vers 2024 : à quoi faut-il s'attendre pour la détection des pyrogènes ?

La stratégie annoncée par la Pharmacopée Européenne pour remplacer totalement le test pyrogène lapin a conduit à la création du nouveau chapitre général 5.1.13 "Pyrogénicité". Celui-ci offrira aux utilisateurs la possibilité de faire un test de pyrogénicité par l'un des tests disponibles (LAL ou méthodes recombinantes pour les endotoxines, et MAT si la présence de pyrogènes non endotoxiniques ne peut être exclue). La décision d'utiliser l'un des essais de dosage d'endotoxines (2.6.14 ou 2.6.32) comme unique essai de pyrogénicité devra faire l'objet d'une évaluation rigoureuse des risques. Nous devrions avoir la version définitive de ce texte en 2024. Et du côté de la Pharmacopée Américaine quoi de nouveau ? Le chapitre 86 est en cours de finalisation et devrait également être officiel courant 2024. En support du chapitre 8.5, il décrit les 2 méthodes recombinantes (rFC et rCR).

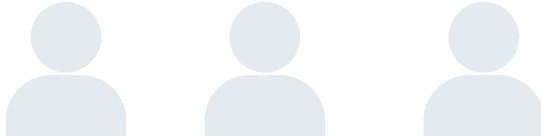
## En cette période de transition, la question en 2024 sera : quoi faire pour bien faire ?

Sans harmonisation réglementaire sur les méthodes recombinantes de détection des endotoxines bactériennes, il est certain que nous aurons tous besoin de travailler ensemble (industriels et fournisseurs) de méthodes de dosage, pour répondre aux attentes des instances réglementaires, montrer notre volonté d'embrasser les technologies modernes et d'embarquer pour le futur ! N'oublions pas non plus les méthodes de détection microbienne rapide en 2024. Celles-ci se développent rapidement et les instances réglementaires y sont sensibles. Nul doute que celles-ci vont finir par entrer officiellement comme méthodes de référence... Comme dirait Doc à Marty : "nom de Zeus", ça va décoiffer en 2024 !

Alors bonne année 2024 à tous et bonne lecture.

Merci à nos Contributeurs

# Ils ont participé à ce numéro



Rédacteurs de "Conception de modèles galéniques intelligents (stimuli-sensitifs) pour la formulation de molécules actives"

**Samar ISSA**

ECOLE DE BIOLOGIE INDUSTRIELLE - EBI

Pharmacien (Université Libanaise), docteur en Chimie organique et habilité à diriger les recherches à l'Université de Lyon. Samar est Responsable de l'Axe de Compétences Biologie à l'Ecole de Biologie Industrielle. Son expertise comprend la conception et le développement d'excipients en tant que modèles galéniques innovants dans la libération prolongée de principes actifs.

**Camille MATHIEU**

LABORATOIRE PIMM & EBI

Camille est diplômée de l'Ecole Nationale supérieure des ingénieurs en arts chimiques et technologiques (ENSIACET). Elle possède une spécialité Matériaux avec un parcours matériaux polymères fonctionnels et innovants. Elle prépare une thèse sur l'utilisation des polymères de la famille des polyacrylamides dans le domaine de la pharma et le relargage contrôlé de principes actifs.

**Emmanuel RICHAUD**

LABORATOIRE PIMM

Emmanuel est Professeur des Universités à Arts et Métiers ParisTech où il est responsable de l'Unité d'Enseignement Polymères et Composites en 3<sup>ème</sup> année. Il effectue sa recherche au laboratoire Procédés et Ingénierie en Mécanique et Matériaux sur le vieillissement et la durabilité des Polymères et Composites.

**SAMA RINGA**  
VEOLIA



"Advancing Sustainability: Recycling Single-Use Technology in the Pharmaceutical Industry"

Global Life sciences market Director. Sama veille à assurer la cohérence de l'offre Veolia dans les différents BU à travers le monde, en mettant l'accent sur la performance environnementale de l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

**Marine SCHNETTERLE**

REDBERRY



Rédactrices de "Rapid Bioburden and Sterility Testing: exploring Detection Limits of an Automated Solid Phase Cytometry System."

Currently overseeing microbiological assays in the development of Red One™, the new generation of automated solid-phase cytometry by Redberry, Marine is specifically tasked with developing release testing workflows and reagent kits for pharmaceutical quality control. Her role also involves providing strong support for roll-out and customer interactions. Before joining Redberry, Marine earned her PhD in bacteriology from the French Armed Forces Biomedical Research Institute (IRBA) in 2018. Her primary research focused on the role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria, particularly Burkholderia pseudomallei.



**Pauline SILBERREISS**

REDBERRY

After earning her Master's degree in Microbiology from the University of Strasbourg, Pauline entered the field of environmental testing, with a specific focus on water analysis. She then transitioned to microbiological controls within intricate matrices, particularly in the food and beverage sector. In 2021, she made the decision to concentrate on the development of a rapid sterility test for pharmaceutical products, utilizing Red One™ as a central component of her ongoing PhD research at Redberry. This collaborative effort involves partnerships with the University of Strasbourg and initial users of the technology.



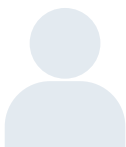
**THIERRY BONNEVEY**

SANOVI VACCINE

Rédacteur de "The alternatives & Rapid Microbiological methods & Pharmacopeias world"

Thierry Bonnevey a plus de 20 ans d'expérience dans le domaine du contrôle de la qualité microbiologique, acquis au sein de la société Sanofi Pasteur et a occupé différents poste tant dans le domaine industriel qu'en R&D.

Il fait partie du conseil d'administration de l'Association A3P ainsi que du groupe d'experts de l'USP sur les méthodes microbiologiques modernes (MMM) depuis 2015 ; du Groupe d'Experts de la Pharmacopée Européenne EDQM au sein du Groupe 1 Microbiologie (depuis 2016) ; du Groupe de Travail Endotoxines Bactériennes (WP BET) depuis 2017 et du groupe de travail sur les Mycoplasmes (WP MYC) depuis 2018.



**Ludovic HUGUENIN**

PHARMASEP

Rédacteur de "CleanByDesign.

Comment la sobriété du process peut aider les industries pharmaceutiques à atteindre leurs objectifs de réduction d'empreinte carbone ?"

Ludovic Huguenin est ingénieur commercial chez Pharmasep. Titulaire d'un diplôme d'ingénieur mécanique à l'ECAM Lyon, il est en charge du développement commercial chez Pharmasep sur les gammes durables et single-use sur le centre - Ouest de la France. Il est le référent technique pour la gamme solution durable liée à l'approche Clean By Design, accompagnant les clients dans leurs recherches d'optimisations des process.



**Kevin WILLIAM**

bioMérieux

Rédacteur de "Industry pivots to rFC adoption: Reshaping the Endotoxin Test & Regulatory Landscape "

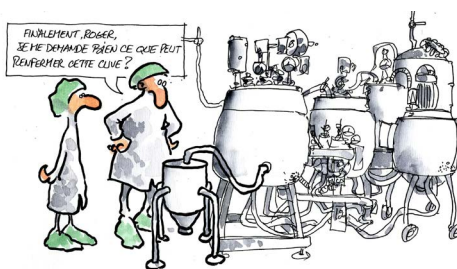
Kevin is a renowned expert microbiologist who has worked for Eli Lilly & Company for 31 years in the Quality Control Labs developing microbiological and endotoxin detection systems. He then worked at Hospira (now Pfizer), Lonza, and GE Water before joining bioMérieux. He has written extensively on the subject of Endotoxin including authoring three books: Endotoxins 2nd Edition (Marcel Dekker, 2001), Endotoxins 3<sup>rd</sup> Edition (Informa Healthcare, 2007), and Microbial Contamination Control in Parenteral Manufacturing (CRC Press, 2004). Kevin has developed automated test systems for endotoxin testing and control strategies for raw material testing.

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



Billet d'Humeur  
Par Alain RACHON - Membre du CA A3P

# Bâtissons tous ensemble la communauté A3P Biothérapies.



La biothérapie est un domaine plein de promesses, d'innovations et de défis.

La liste des expertises nécessaires au développement clinique ainsi qu'à la mise sur le marché de solutions thérapeutiques issues des nouvelles modalités est vaste. Elle requiert de fortes compétences en stratégie CMC & réglementaire, en développement & maîtrise des procédés ainsi qu'en développement & validations des méthodes analytiques. Dans un contexte actuel de raréfaction du financement de tels projets pourtant capitaux afin d'assurer le traitement de pathologies lourdes voir incurables pour certaines et garantir l'accès à ces médicaments par une plus large population, le challenge à relever pour le dirigeant de Start-up ou le responsable de projet est toujours le même **"Comment concilier Le Temps/Le Coût et le niveau de Risques sachant que les 3 simultanément sont impossible à gérer ?"**

Afin de partager les expériences respectives pour résoudre ce dilemme, A3P a créé en 2023, un **Groupe d'Intérêt Commun (GIC) Biotherapy Processes**. Celui-ci a pour mission de faciliter et d'accélérer le développement, l'industrialisation et la mise sur le marché de nouvelles solutions thérapeutiques et plus particulièrement des médicaments de thérapie innovante (MTI) ou Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP). Le GIC est constitué de 28 membres représentant toute la diversité des acteurs du secteur et il a comme objectif d'éditer un guide destiné à vous aider à naviguer et interpréter des textes réglementaires souvent nouveaux ou pas toujours adaptés aux nouvelles modalités et donc sujet à interprétations. A titre personnel, j'ai intégré le Conseil d'Administration de l'Association A3P depuis plus de 10 ans et j'ai souvent fait face à des remarques et parfois même des critiques, concernant celle-ci : "Trop Franco-Français, trop orientée "Drug Product", pas assez innovante, pas assez Technologique..."

Par ce billet d'humeur, j'entends vous convaincre que notre très chère Association évolue et répond aux attentes concrètes de la communauté biopharmaceutique. Ainsi, le GIC Biotherapy Processes a été constitué comme un vaste jeu d'équilibriste, de façon à répondre à ces commentaires. En effet, il se veut tout d'abord résolument international avec la présence de membres Belges, Suisses, Canadiens et Français. Par ailleurs, il est également diversifié grâce à la participation de représentant de start-ups innovantes, de sociétés biopharmaceutiques (agissant comme sponsors financiers lors des phases de développement cliniques préliminaires ou comme partenaires afin d'assurer la mise sur le marché), de prestataires de services CDMO/CRO (apportant la diversité de leurs expériences ainsi que leur flexibilité lors des phases d'exécution de projet), de fournisseurs garant de l'innovation technologique des nouvelles plateformes de développement et de production et enfin de consultants (agissant comme experts indépendants, garant des bons choix à faire afin de gérer au mieux le temps, les coûts et les risques inhérents à chaque projet). Enfin, il intègre tous types d'expertises allant de l'Upstream au Downstream, du manufacturing au QC, du QA & Réglementaire au design des locaux, en passant par la qualification des matières premières utilisées dans le développement et la production de bulk stérile (ou Drug Substance). Maintenant, j'aimerais parler un peu de vous... Vous qui vous reconnaissez dans un de ces domaines d'activités et qui êtes confrontés à ces questionnements pratiques dans votre activité quotidienne. Oui, vous qui vous êtes souvent demandés « À qui pourrais-je m'adresser pour résoudre ce problème ou interpréter ce texte réglementaire ? Oui, oui vous qui êtes riche de compétences et d'expériences que vous souhaitez partager et développer.

A3P a besoin de votre expérience, de votre expertise, de votre réseau professionnel, de votre énergie et de votre passion. Rejoignez-nous dans cette aventure exaltante et contribuez par votre savoir-faire à faire grandir la communauté A3P dans un esprit collaboratif, transparent, pragmatique et convivial.

Alors, n'hésitez plus, manifestez-vous ! Contribuer, participer, communiquer au sujet des objectifs du guide en préparation et des événements liés au GIC A3P Biothérapies. À très bientôt donc, chers acteurs de l'industrie des biotechnologies, car c'est ensemble que nous bâtissons l'avenir de la biothérapie française mais surtout internationale.

On compte sur vous... (Comme aurait dit Coluche !)



2 jours



115 participants



65% Congressistes

35% Fournisseurs

55 sociétés



3,5/4\*



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

Les systèmes à usage unique (SUS : Single Use Systems) se développent de façon considérable afin de répondre aux besoins de l'industrie : flexibilité, rapidité, coûts d'infrastructures réduits ... Les experts membres du GIC A3P Single Use Systems souhaitent partager de façon pérenne les résultats de leurs travaux durant un évènement biannuel de référence, à destination des professionnels des secteurs Pharma & Bioproduction. En 2021, une restitution dans le cadre du Congrès Annuel A3P a permis d'apporter des réponses sur les sujets comme les problématiques d'approvisionnement (Supply), de développement durable (Sustainability) et d'initier de nouvelles réflexions pour 2023 autour de l'Annex1 GMP Eu, de l'USP665, l'analyse de risques E&R et la gestion du cycle de vie des produits SUS.

Ces 2 journées à Tours ont eu pour objectifs de partager les bonnes pratiques et les points de vigilances sur des sujets stratégiques majeurs comme la gestion de l'intégrité, le "PUPSI", la stratégie de sécurisation des approvisionnements et la mise en place des politiques éco-responsables.

Accès aux présentations [www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/](http://www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/)

## 1. Sustainability – Développement durable

### **Utilisation d'équipements à usage unique en biopharma/ pharma, une alternative écoresponsable ?** par *Eric DREYTON, BOEHRINGER INGELHEIM & Mehdi BOUKAMI, MERCK*

Au-delà de l'apport incontestable des SUS dans l'industrie pharmaceutique, cette conférence nous permet de mieux appréhender l'impact potentiel des SUS sur l'environnement et les voies de réflexion pour en diminuer l'impact. Les SUS étant en contact produit, leur utilisation et leur destruction sont très encadrées. Certes, ils ne finiront pas dans les océans (incinération), mais leur fabrication reste émettrice de CO<sub>2</sub>, énergivore, consommatrice de dérivés du pétrole, et met en œuvre de nombreux transports. Plusieurs voies de solution sont en cours de réflexion : Produire plus près des utilisateurs, valider des durées d'utilisation plus longues, ré-utiliser certains SUS en campagne, limiter les longueurs de tuyaux, optimiser le packaging, ... Mais avant tout, il faut aborder cela avec une vision globale pour ne pas déplacer le problème.

### **Retour d'expérience Sanofi "Evolutive Facility". Gestion des déchets liés aux single Use** par *Estelle DOGER, SANOFI*

Pour limiter son empreinte, Sanofi cherche à limiter la surface des locaux classés et les nettoyages / stérilisations très énergivores. Le choix du SUS favorise l'utilisation de systèmes clos, et améliore la flexibilité (différentes tailles / process, ... dans les mêmes locaux). Pour limiter les déchets liés aux SUS, Sanofi met en place des solutions technologiques permettant de réduire la volumétrie de déchets contaminés notamment en les broyant et en les décontaminant à la vapeur suivie d'une incinération classique. Par ailleurs, Sanofi travaille avec ses fournisseurs pour améliorer le taux de recyclage du packaging, et faciliter le tri (utilisation de code barre, d'indicateur visuel, ...). Mais un des points de difficulté actuel est d'intéresser les filières de recyclage en rendant le modèle économiquement viable. Pour cela il faut de la volumétrie, de la récurrence, un marché utilisateur du matériau recyclé, un travail avec l'ensemble des acteurs du marché.

## 2. Sécurisation de la supply

### **Single Use technologies as flexibility enablers in clinical manufacturing** par *Mareike HARMSEN, UCB*

Le recours aux SUS dans la fabrication de lots cliniques donne une flexibilité permettant de monter une molécule en statut GMP très rapidement. Toutefois, cette souplesse ne doit pas occulter certains points d'attention tels que le retraitement des déchets et la sécurisation de la supply. UCB a sélectionné des fournisseurs engagés sur la diminution / recyclage du packaging. Pour la sécurisation de la supply-chain UCB travaille sur 3 axes : Un Dual sourcing (fournisseurs différents mais mêmes fonctionnalités), des fournisseurs disposant de stocks sur plusieurs localisations géographiques, et des fournisseurs prêts à travailler main dans la main avec UCB pour limiter les risques de shortage.

### **L'analyse de risque comme outil d'aide à la mise en place d'une stratégie de sécurisation : retours d'expérience** par *Marie-Agnès BOL, LFB & Jean-Yves DUVAL, SANOFI*

L'outil d'analyse de risque est un moyen d'identifier la criticité des composants et de mettre en place des moyens de sécurisation adaptés. Les moyens de mitigation peuvent être de différents niveaux : la Standardisation et la simplification permettant de faciliter l'interchangeabilité des composants et des stocks ; La mise en place d'un fournisseur unique avec plusieurs usines ; la mise en place d'un dual sourcing avec plusieurs fournisseurs. Le succès de cette démarche nécessite l'implication de la direction pour définir des objectifs annuels de déploiement. Elle réside dans le choix d'une méthode / critères simples et lisibles, de la connaissance des composants et de leur supply chain (continuity plan fournisseur) et d'une démarche intégrée achats, qualité, supply et production notamment.

### **Etude de cas – Standardisation des montages à**

#### **Henogen (ThermoFisher VVS-EU) par Julien CANON,**

HENOGEN / THERMO FISHER SCIENTIFIC

La complexité et la multitude des montages rendent la supply-chain complexe et à risque. Il est difficile d'imaginer un dual sourcing sur un montage complexe, mais il devient plus simple de l'imaginer pour un flexible avec 2 connecteurs. Henogen a une démarche de simplification : Standardiser la dénomination des montages (éviter plusieurs références pour le même montage) et leur design ; Sous diviser les montages complexes en sous-montages plus simples permettant un multi-usage par combinaison ; Construire un catalogue pour rendre visible ces montages et proposer des process play-book pour standardiser les utilisations et Avoir des stocks disponibles permettant d'inciter à l'utilisation de ces composants standards.

### **Sécurisation des approvisionnements par l'interchangeabilité : quelle approche pour les FILTRES ?**

par Aurélie DOWNES, ASPEN & Jean-Philippe MINNE, PARKER HANNIFIN FRANCE

Le GIC SUS a réfléchi sur l'interchangeabilité des filtres clarifiants / stérilisants pour application liquide ou gaz. Avant tout, interchangeabilité n'est pas synonyme d'équivalence : l'interchangeabilité dans un procédé donné résultera de la validation du nouveau filtre. Un outil d'analyse de risque (prochainement disponible auprès des adhérents A3P) a été élaboré afin de définir les requis d'évaluation de la validation en fonction des changements prévus sur le produit, le filtre ou les paramètres process. La stratégie de validation ainsi définie est à identifier au plus tôt et peut être impactée par les évolutions réglementaires telle que la révision de l'Annexe 1 (PUPSIT) ou la réglementation REACH (PFAS).

### **Interchangeabilité des composants des systèmes à usage unique (BioPhorum) par Hélène VALETTE, SANOFI**

Une équipe de plus de 60 experts (fournisseurs de SUS et biomanufacturers) au sein du BioPhorum travaille actuellement à l'élaboration de recommandations et d'outils sur l'interchangeabilité des composants. L'objectif est d'arriver à un consensus pour évaluer l'équivalence entre composants grâce à la définition de points de comparabilité et de méthodes de tests standards. 3 livrables sont attendus : un Position Paper cadrant les règles d'interchangeabilité, un package de formation, des templates et outils (Users Requirements Specification, testing validation and release requirements, ...). Après avoir notamment établi une liste hiérarchisée de composants, le groupe travaille actuellement à établir des définitions standards, une terminologie et des tables d'équivalence par composant.

## 3. Stérilisation au Rayon X en remplacement de la $\gamma$ irradiation

### **Implémentation des rayons X pour la stérilisation des systèmes à usage unique : état actuel**

par Lucie DELAUNAY, SARTORIUS

Les X rays ont été identifiés comme une solution de remplacement pertinente à la  $\gamma$  irradiation pour répondre au manque de capacité face aux besoins grandissant du marché. La  $\gamma$  irradiation et les X rays font tous deux parties de la même famille de stérilisation par rayons ionisants. Les études ont démontré l'équivalence des deux pour l'ensemble des matériaux utilisés par Sartorius, sur la shelf-life déjà établie : La dose de rayon ionisant et le taux de pénétration sont similaires, seule la durée d'exposition est allongée pour les X rays ; L'efficacité des rayons sur les micro-organismes n'est pas significativement différente (maintien du statut de stérilité) ; Les profils d'extractibles et les fonctionnalités des assemblages sont similaires entre les deux technologies. Ces données sont en cours d'évaluation par les autorités mondiales, pour permettre un déploiement au plus tôt.

### **Bioprocess X-Ray implement risk assessment – Sharing of experience from a Vaccine manufacturer**

par Charlotte MASY, GSK

Pour autoriser la stérilisation par X ray sur ces assemblages, GSK a mis en place une méthodologie d'analyse de risques. Les composants sont classés notamment en fonction de leur sensibilité à l'irradiation et de leur position dans le process. Les risques élevés sont maintenus en stérilisation par  $\gamma$  irradiation, les risques faibles sont basculés vers le X-Ray et les risques moyens sont traités au cas par cas. La priorité est donnée aux risques faibles pour libérer rapidement la capacité de  $\gamma$  irradiation pour les systèmes à risques élevés. Pour autoriser le déploiement, GSK met en place la démarche proposée par le BPSA (Bio Process System Alliance).

## 4. Contrôle/Maintien de l'Intégrité

### **Contamination Control Strategy (CCS) : Stratégies de contrôle de l'intégrité et du niveau de contamination particulière dans les systèmes à usage unique**

par Patrick EVRARD, CYTIVA / PALL

Les fournisseurs de SUS apportent des éléments importants aux utilisateurs pour soutenir leur CCS. L'expertise des fournisseurs sur le développement et la fabrication, les méthodes de test, l'inspection visuelle et sur la formation essentielle des opérationnels sont autant d'éléments importants pour la maîtrise de l'intégrité. La maîtrise de la contamination particulière apparaît moins mature, entre autres pour les particules visibles (USP <790> transposé du Drug Product aux SUS) – le "Zéro-particule" étant irréaliste. Des fournisseurs travaillent à la maîtrise de la contamination de leurs zones de fabrication et sur des contrôles particuliers des SUS, dans une démarche d'amélioration continue.

### **Maintien de l'intégrité des assemblages à usage unique : bonne pratique de contrôle visuel et partage d'expérience**

par Aurélie LABOURIER, RECIPHARM & Jérôme TORRES, ASEPTIC GROUP

L'inspection visuelle est un moyen parmi d'autres qui participe à l'assurance de l'intégrité. Les tests d'intégrité ou les tests de fuite ne sont pas toujours possibles ou pertinents. L'inspection visuelle est nécessaire à chaque étape de la fabrication et de l'utilisation chez le fournisseur puis chez l'utilisateur (avant, pendant et après son utilisation). Les conférenciers ont partagé leur expérience sur les points de contrôle / d'inspection, sur l'importance de la formation et sur l'importance de travailler avec le fournisseur pour différencier les défauts générateurs des risques d'intégrité et les imperfections visibles sans risque pour l'intégrité.




## 5. Extractibles et Relargables

### E&R : Approches USP <665> / BPOG et retour par *Cindy CHAGOT, SANOFI & Marine CANNUEL, SARTORIUS*

Le BPOG propose des critères et des pondérations pour réaliser le risk assessment requis par l'USP <665> pour définir les actions à mener : Conformité à la pharmacopée, études d'E&R, évaluation de toxicité, ... Le BPOG et l'USP <665> proposent des solvants modèles et des conditions de test parfois différents pour les études d'extractibles. Le retour d'expérience montre que les solvants acides sont interchangeable, à la différence des solvants basiques qui peuvent donc venir en complément les uns des autres. Il est possible d'optimiser les études de relargables en utilisant un placebo, sur des volumes plus petits (maintien du ratio Volume / Surface) ou en complétant avec des études en conditions accélérées.

### E&R pour les fournitures industrielles à Usage Unique : Evolution de l'approche basée sur le Seuil de Préoccupation Toxicologique (TTC) dans le cadre des Evaluations du risque appliquées aux Affaires Industrielles Vaccins – SANOFI par *Paul Desert, SANOFI*

Pour l'évaluation de la toxicité des E&R, Sanofi met en place 2 approches : Seuils basés sur la PDE prioritairement, ou utilisation d'un seuil TTC (Threshold of Toxicological Concern) basé sur la littérature. Le calcul de la PDE étant chronophage, l'utilisation d'un seuil TTC peut permettre un gain de temps, cependant, il existe peu de référentiel citant des seuils de TTC pour les vaccins, nécessitant ainsi l'extrapolation de seuils issus d'autres formes galéniques. Les référentiels couramment utilisés sont l'ICHM7 (mutagénicité), PQRI, Masuda, Kroes, ... Si le taux des E&R analysés est supérieur à ce seuil, les actions à prendre sont à évaluer au cas par cas. Sanofi a proposé un arbre décisionnel pour accompagner cette évaluation. Au-delà du seuil de toxicité, il convient de garder un œil critique sur le nombre d'E&R identifiés : Un nombre important d'E&R doit attirer l'attention et pousser les industriels à évaluer d'autres matériaux contenant potentiellement moins d'E&R.



# SINGLE-USE TECHNOLOGIES

## in Pharma / Biopharma, a Green alternative to traditional manufacturing ?

### 1. Context

**Public**  
Usage of single-use plastics more & more rejected by public opinion

**After-life**  
Risk for daily SU plastics to end up in the ocean and break up into microplastics threatening marine life

**B2B ≠ B2C**  
Waste are highly controlled and are mainly considered as Biohazard. Biohazard waste are destroyed through incineration

**NO RISK** to become microplastics in the ocean

**CO<sub>2</sub> Impact**  
Manufacturing & Transportation of SU plastics

**Migration**  
• Manufacturing location?  
• Recycling : Can Pharma industry to leverage recycled material?

### 2. Complexity

**SU vs SST processes impact**  
SU & SST manufacturing both bring different pollution types that are difficult to compare in their global life cycle  
SU = Plastics  
SST = Water / Electricity / Chemical

**GIC SU Work**  
Comparing SU to SST manufacturing is a complex exercise.  
Evaluation done in 2021 at A3P

- Energy consumption is the larger variable factor
- Initial CAPEX has a significant "fix" impact
- Frequency of Use (Multi product – process) is key
- Kinetics of Risk (financial = environmental?)

**Single Use Benefits**  
Single-use technologies today present multiple benefits, some having a direct impact of plant energy consumption, thus helping to reduce environmental impact when used

Manufacturing footprint reduction

Closed processing

**Mitigation of Financial Risk**

### 3. Three R improvements

**Scope definition**  
Understanding different scope is a key element to understanding of environmental impact. Idea is to reduce global impact and NOT to simply move impact to another scope not considered

**Re-use**  
Need to evaluate value of SU vs SST for new projects.  
Need to "reduce" packaging used around SU assemblies  
Need to reduce shipment impact

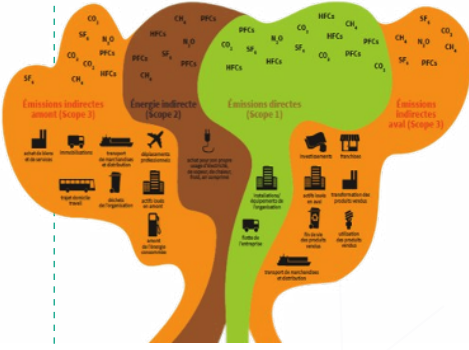
**Re-use**  
Possibility to redefine "cycle duty" for extended use  
ie: Extended use during Covid pandemic  
Leverage continuous processing trend  
Limit = need for cleaning / sterilization

**Re-cycle**  
Difficult due to various types of plastics used (multilayer films), as well as decontamination needed (biohazardous wastes)  
A sector to be developed close to major points of use (quantity, consistency & geographical proximity)  
Question of packaging material

### 4. Conclusion

**Preconceptions & Improvements**

- Importance of big picture
- No risk for B2B wastes to end up as microplastics
- Both SU & SST have an environmental impact
- Comparing SU to SST is highly complex
- Leveraging Single-Use technologies can help reduce CO<sub>2</sub> impact
- Importance to reduce impact (SU & SST)



Flux amount → Organization declarante → Flux aval

**How sustainable are you?**  
How important is sustainability in your supplier selection?

Quality Sustainability Cost  
Performance Supply

© A3P all rights reserved - Copying & distribution Prohibited Version 2024







1 jour



95 participants



73% Congressistes

27% Fournisseurs

69 sociétés



3,4/4\*



Des perspectives médicales extraordinaires sont engendrées par la thérapie génique et cellulaire et dans un tout autre domaine, par l'ARN Messenger remis en lumière lors de la crise du Covid. L'évocation de ces différentes modalités fait prendre conscience de la diversité des procédés de production utilisés et des spécificités qui leurs sont propres. A l'écoute des demandes de nos adhérents, A3P a organisé le 22 novembre 2023 à Lyon un évènement dédié aux procédés de Biothérapie afin de rassembler les principaux acteurs du domaine (Start up, industriels, CDMO, fournisseurs & prestataires). Cette journée a pour objectif d'adresser les problématiques techniques et réglementaires à considérer lors des différentes phases de développement (pré-clinique & clinique) pour préparer, accélérer et réussir l'industrialisation. *Accès aux présentations* ➔ [www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/](http://www.a3p.org/supports-conferences-ateliers/)

### **Présentation des travaux du GIC A3P Procédés de Biothérapie**

par *les membres du GIC A3P Procédés de Biothérapie*

Le GIC A3P Procédés de Biothérapie, constitué de 28 membres, rassemble les différents acteurs de la Bioproduction : start-up, industriels, CDMO/ CRO, fournisseurs & consultants. Au travers de ses travaux, le GIC a pour objectif de faciliter et d'accélérer le développement, l'industrialisation et la mise sur le marché de molécules innovantes et à forte valeur ajoutée, tout en garantissant la maîtrise des coûts, la qualité du produit et la sécurité des patients. Les médicaments de thérapie innovante (MTI) ou Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) sont des médicaments à usage humain qui comprennent la thérapie génique, la thérapie cellulaire somatique, l'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante. L'aspect innovant et les particularités de ces produits rendent leur développement plus long et plus coûteux, et l'industrialisation des procédés à grande échelle plus complexe. En parallèle, les exigences réglementaires applicables à ces produits aux différents stades de développement ne sont pas toujours simple d'interprétation. Un guide est en cours de rédaction pour identifier notamment les enjeux, les leviers et les pièges à éviter dans le développement des biothérapies. Il sera disponible lors de la prochaine édition du GIC Procédés de Biothérapie le 21 novembre 2024.

### **Evolution of the Regulatory Landscape. Providing an Efficient Pathway for Novel Medicinal Products**

par *Frédérique VIEVILLE, PHAXIAM*

PHAXIAM développe des traitements antibactériens basés sur l'utilisation de virus bactériophages pour lutter contre les infections bactériennes chez l'homme, notamment celles résistantes aux antibiotiques. La conférence s'attache à présenter la mutation et le dynamisme de l'environnement réglementaire dans le contexte de développement des ATMP / MTI. La spécificité de ces produits nécessite une adaptation et une harmonisation des référentiels réglementaires, afin de répondre aux défis liés aux produits de biothérapie, tout en garantissant la qualité et la sécurité des produits. Les exigences réglementaires concernant spécifiquement les ATMP / MTI sont décrites dans la partie IV des BPF, qui met notamment en avant l'application des approches basées sur le risque. En complément, de nombreuses guidelines techniques sont disponibles, pour supporter leur développement clinique et leur fabrication. Dès les phases early du développement, les échanges précoces avec les Autorités de Santé sont utiles pour confirmer la classification ATMP / MTI du produit d'intérêt ou solliciter des avis scientifiques concernant le développement du produit, et faciliter ensuite l'enregistrement. De nouvelles approches réglementaires encadrées, tel que le dispositif accéléré d'autorisation d'essais cliniques (Fast Track) ou le processus PRIME, permettent d'accélérer l'accès aux thérapies innovantes ou jugées prioritaires (c'est-à-dire aux médicaments répondant à un besoin médical non satisfait). Afin d'illustrer la conférence, un Case Study concernant le développement des Bactériophages contre la bactério-résistance est proposé, avec le partage des challenges liés au développement de produits qui doivent continuellement évoluer pour s'adapter aux besoins des patients.

### **The pharmaceutical development of an antibody fragment to treat the acute phase of ischemic stroke, from early development to phase 2/3 clinical trials**

par *Kristell LEBOZEC, ACTICOR BIOTECH*

Acticor Biotech développe un médicament innovant pour le traitement de la phase aiguë de l'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) ischémique et d'autres urgences cardio-vasculaires. Le Glencocimab est actuellement en phase clinique II/III. Le développement du produit fait face à plusieurs types de challenges, parmi lesquels la gestion de la sous-traitance (diversité de partenaires externes nécessitant des ressources et compétences spécifiques pour les piloter) ; la gestion des réactifs critiques et la caractérisation des standards ; la sélection et le développement des méthodes analytiques pertinentes pour la caractérisation du produit ; et les multiples exercices de comparabilité requis tout au long du développement (scale up, changement procédé, transfert d'un CDMO à un autre). L'indication thérapeutique d'urgence du produit ajoute un autre défi, celui de la gestion des essais cliniques : la supply chain doit assurer en permanence dans chacun des centres un stock minimal de produit avec une shelf life suffisante, le protocole d'administration doit être adapté à un contexte d'urgence, obtention du consentement en urgence d'un patient victime d'AVC. D'un point de vue réglementaire, le Glencocimab bénéficie de la désignation PRIME, qui a pour objectif de faciliter et d'accélérer le dépôt réglementaire. La communication en amont et les consultations scientifiques avec les autorités de santé, ici l'EMA et la FDA, sont des outils stratégiques pour sécuriser l'enregistrement du produit. Trouver le bon équilibre coût/valorisation, qualité, rapidité reste un véritable défi dans la priorisation des activités CMC.

## **Design d'expérience. Maitriser et optimiser son process Upstream pour la production de vecteurs viraux par transfection transitoire**

par [Paul Giroud, POLYPLUS](#)

Afin de se préparer au besoin croissant de production d'AVV qui émerge, il est nécessaire d'anticiper la capacité des unités de production pour faire face à l'augmentation des demandes, de diminuer les coûts de production, et de réduire le temps de développement pour accélérer la mise sur le marché de ce type de produit. Polyplus, en tant que CDMO spécialisé dans le manufacturing de vecteurs viraux pour les produits de thérapie génique, met en avant l'utilisation du Design Of Experiment (DoE) comme outil contribuant à répondre à ces enjeux. Le DoE permet de caractériser efficacement le procédé et est une clé de succès dans le cas de scale-up successifs, par une meilleure compréhension des interactions entre les paramètres (et donc leur optimisation), et par une augmentation de la robustesse du procédé, en permettant de déterminer les Normal Operating Range (NOR) optimaux des paramètres critiques. Le DoE est un processus itératif qui se décompose en plusieurs étapes : le design de l'expérience qui doit être pensé de manière approfondie, pour répondre aux questions posées, et pour maîtriser le nombre d'expériences nécessaires ; la réalisation des essais, dans des conditions minimisant les sources de variabilité extérieures aux facteurs testés ; et enfin l'analyse et interprétation des résultats, basés sur un package analytique robuste. La randomisation des essais (pour éliminer les variables inconnues ou non maîtrisées), la réplication des expériences et le "blocking" (pour restreindre la randomisation lorsque la variation d'un facteur est trop coûteuse ou impossible) sont trois principes importants à considérer lors du design.

## **From Preclinical to Clinical Development of a Scaffold-Free Autologous Cell-Based Product as a New Candidate for Treatment of Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia**

par [Nicolas THEYS, NOVADIP](#)

NOVADIP Biosciences est une société biopharmaceutique en phase clinique, spécialisée dans les thérapies cellulaires pour les pathologies osseuses. Un essai clinique de Phase I/II est en cours pour évaluer la sécurité et l'activité clinique du produit NVD-003, une thérapie autologue dérivée de cellules souches adipeuses, comme traitement unique potentiel pour sauver les membres et restaurer la mobilité chez les patients atteints de pseudarthrose congénitale du tibia (CPT), une maladie osseuse pédiatrique rare. L'industrialisation du procédé a dû répondre à de nombreux challenges, avec notamment le passage d'un procédé manuel opéré en phase ouverte, à un procédé automatique opéré en système clos. Les choix technologiques effectués pour réaliser les opérations de production ont permis de réduire les risques de contamination du produit, d'obtenir un procédé industrialisable, d'intégrer des contrôles analytiques en ligne, d'améliorer la reproductibilité du procédé et de diminuer les coûts de fabrication. Un retour d'expérience est également partagé concernant les points d'attention des agences réglementaires (EU/US) pour la soumission des dossiers des études cliniques. La composition du produit, la mise en œuvre du QbD (approche basée sur une analyse scientifiques des risques) et la justification de la stratégie de contrôle du produit (justification des spécifications, choix de l'étape du procédé pour la réalisation du contrôle libératoire...) sont notamment abordés.

## **Challenges and best practices from discovery to early phase gene therapy product development**

par [Christine LE BEC, SENSORION PHARMA](#)

Un partage d'expérience sur les requis, les challenges et les points d'attention à considérer au cours du développement des produits de thérapie génique, de la recherche à la clinique. Dès l'étape de Drug Discovery, certains points doivent être pris en compte pour obtenir un procédé et un package analytique robuste, compliant et reproductible : du design du vecteur viral à l'utilité du DoE pour sécuriser le scale-up du procédé, de nombreux retours d'expériences sont mis en avant. L'importance de la CMC est également soulignée : dès les Early Phase, les requis CMC doivent être pris en compte avec l'ensemble des acteurs du développement. Idéalement, des plateformes USP/DSP et analytiques disponibles en interne permettent de réaliser des activités de caractérisation du produit, de générer du matériel représentatif pour les études POC et pré-cliniques, et dans un second temps, d'augmenter l'efficacité du transfert chez un CDMO. D'un point de vue analytique, la spécificité des produits de thérapie génique (complexité des tests de potency, caractérisation du ratio capsides pleines versus vides, définition de spécifications pour les hcDNA et les HCP) permet de justifier d'efforts graduels au fur et à mesure du développement. Les défis du manufacturing sont également nombreux, la caractérisation du produit et du procédé restant plus limitée au moment de l'enregistrement que pour d'autres typologie de produits.

## **Les étapes clefs du développement d'un procédé de production de lots cliniques de fibroblastes gingivaux humains et la mise en conformité GMP, retour d'expérience Scarcell Therapeutics & Bio Elpida**

par [Mathieu CASTELA, SCARCELL THERAPEUTICS & François DUMOULIN, BIO ELPIDA](#)

Scarcell Therapeutics partage, avec son partenaire de production Bio Elpida, son retour d'expérience sur le développement de fibroblastes gingivaux, avec une application vétérinaire de réparation tissulaire. L'accent est mis sur les enjeux de transposition d'un procédé développé en laboratoire de recherche peu habitué aux contraintes GMP et avec un budget limité. Dans ce contexte, et avec très peu de connaissance produit / procédé formalisée pendant cette phase de développement, le transfert et l'industrialisation du procédé chez le CDMO ont été des étapes longues et complexes. Scarcell Therapeutics et Bio Elpida ont su développer une collaboration équilibrée, au sein de laquelle l'expertise produit est apportée par le propriétaire du produit, et la CDMO joue son rôle d'accompagnement sur l'industrialisation d'un procédé conforme aux requis GMP. Les conclusions partagées par les deux parties renforcent l'importance de penser le développement d'un produit en intégrant les futures contraintes GMP (du choix des matières premières au Knowledge Management), et de sélectionner le CDMO le plus adapté pour travailler en pleine collaboration. En cela, la taille et les enjeux du CDMO sont des critères intéressants à évaluer.

## **Table ronde Q&A : Les enjeux et leviers pour bien préparer et accélérer l'industrialisation des biothérapies**

par [les membres du GIC A3P Procédés de Biothérapie](#)

Différents sujets ont été partagés au cours de la table ronde : L'importance de bien définir le produit, via la formalisation du TPP (Target Product Profile) et du QTPP (Quality Target Product Profile), pour driver les choix de développement du produit et du procédé ; La nécessité d'initier un dialogue précoce avec les Autorités de Santé, dès la disponibilité d'une preuve de concept préclinique, afin d'intégrer les exigences réglementaires dès les phases amont du développement ; L'évaluation des risques pour préparer et anticiper les choix de développement afin de faciliter l'industrialisation et le passage en phase III du procédé et Les requis de qualification / validation des méthodes analytiques doivent être adaptés en fonction des stades de développement du produit et de l'intention d'utilisation de la méthode.



# It's Easy To See



# BET Sustainability

LAL Reagent Comparison Table	Conventional LAL Reagent	ACC's PyroSmart NextGen® (rCR) Reagent	First Generation Competitor (rFC) Reagent
<b>Sustainable Reagent</b> (animal free)	<b>No</b>	✓ <b>Horseshoe Crab Blood Free</b>	✓ <b>Horseshoe Crab Blood Free</b>
Kinetic Assay	Kinetic	✓ Kinetic	✗ No. Endpoint only
Assay Setup	Single step reconstitution	✓ Single step reconstitution	✗ No. rFC requires three reagents in a 1:4:5 ratio and a 10 min. pre-incubation step
Same Standard Plate Reader	Incubating plate or tube reader at 405 nm	✓ Yes. Incubating plate or tube reader at 405 nm	✗ No. Fluorescent reader required
Derived From <i>Limulus</i> Amebocyte Lysate (LAL)	LAL	✓ Yes. rCR is recombinant LAL	✗ No. Based on <i>Carcinoscorpius</i> or <i>Tachyplesus</i> Amebocyte Lysate (CAL/TAL)
Multi-step Cascade Pathway	Yes	✓ Yes	✗ No
Endotoxin Specific	No	✓ Endotoxin Specific	✓ Endotoxin Specific



**Associates of Cape Cod Int'l., Inc.**  
 Your Endotoxin & Glucan Experts  
 www.acciuk.co.uk • (+44) 151.547.7444  
 Associates of Cape Cod, Inc. - a Seikagaku Group Company





Network | Event | Actuality  
Clean & Sterile Industry

# THEMES 2024 PROGRAMMES & INSCRIPTION

CCS Analytique  
Cosmétique  
HVAC Biotech Biothérapie  
Single APS visuelle  
Congrès Lyo CCS Use Forum  
Water exposition ateliers sessions  
Inspection conférences Systems  
Upstream Microbiologie



[www.a3p.org](http://www.a3p.org)

A3P-Service - Sous réserve de modifications

# A3P Nettoyage Bionettoyage

**Nettoyage, Désinfection, Bionettoyage, Décontamination, Bio-Décontamination, Détergence, lavage...** Tous ces mots sont régulièrement mal compris ou mal utilisés sur les sites industriels. Le nettoyage fait plutôt référence à la maîtrise de la chimie quand le mot bionettoyage signifie plutôt l'élimination du vivant. Il faut plutôt se baser sur les exigences de l'**Annexe 1 des GMPs** pour la désinfection et la décontamination alors que le nettoyage et sa validation font plutôt

références aux exigences de l'Annexe 15. En réalité, bien souvent, ces mots sont liés et toutes nos **surfaces de ZAC** se doivent d'être visuellement propres et sèches avec un niveau **bioburden** le plus bas possible avant de réaliser une opération de fabrication. Ceci implique un effort de **validation** adapté et bien dimensionné pour les **procédés de décontamination**, notamment des surfaces en contact produit indirect, à la marge des "deux mondes".

**Cet événement parlera donc de la maîtrise de la décontamination des surfaces et reviendra notamment sur les indirect contact parts de nos Technologies Barrières sans oublier les fondamentaux de la validation de nettoyage.**



## Conférences

### Aperçu du programme ...

#### Procédés de nettoyage : se positionner entre Annexe 1 et Annexe 15

Julie RACAUD, LABORATOIRES AGUETTANT & Thomas ROHAUT, AKTEHOM

#### Maitrise de la Décontamination des surfaces pour les isolateurs & RABS. Approches communes et spécificités

Audrey FOURCADE LABELLE, LFB & Audrey THIERY, DELPHARM & Elodie PASTRE, ISOTEC'XEL

#### Séchage : un process à part entière !

Guillaume BONNEAU, NOVO NORDISK

#### Taux de recouvrement en contrôle microbiologique environnemental, est-ce bien raisonnable ?

Philippe TAILLIEZ, ACM PHARMA

#### Développement et validation des méthodes analytiques pour la validation de nettoyage : trucs & astuces

Solenn JANVIER, PIERRE FABRE

#### Prise en compte du DHT et des tailles de campagnes dans l'approche pire-cas en validation des procédés de nettoyage

Agnès FRANCO, VIRBAC & David UGOLINI, UPS CONSULTANTS

#### Validation de l'efficacité des désinfectants : méthodologie, étude cas et conseils

Denis STREIT, ECOLAB & Nicolas PALLUET, CONTEC EUROPE

#### Faut-il réviser les PDEs ?

Stéphane PIERRE, CEHTRA

#### Quelle approche pour des contraintes multiples ? Comment appréhender le nettoyage d'un box de fabrication en classe A/B ?

Marie-Bénédicte TESSIER, VETOQUINOL

#### Stratégie de nettoyage des surfaces en contact indirect dans un isolateur de remplissage

Nicolas TAILLIERE, PHARMACIE CENTRALE DES ARMEES & Ségolène LEBRUN CHARRAT, COPHACLEAN

#### Maitrise de la contamination croisée et validation de nettoyage : cas des lyophilisateurs

Cecilia LA ROCCA, SYNERLAB LYOFAL & Christophe GAMBLIN, THERAXEL

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



# A3P Microbiologie

Venez rejoindre les professionnels du secteur pharmaceutique ainsi que les autorités réglementaires, pour partager et échanger sur les meilleures pratiques, l'évolution de la réglementation, et le développement, la validation et l'implémentation des technologies innovantes, alternatives et automatisées. Le programme est conçu autour de l'échange et du partage d'expérience, comprenant 14 conférences, une exposition des fournisseurs clés du secteur, ainsi que des ateliers animés par nos partenaires. Les principaux thèmes abordés incluent **la réglementation européenne et américaine** liée aux méthodes alternatives, mettant en avant les changements et les nouveaux textes avec la participation de représentants de la pharmacopée européenne et américaine. De plus, des discussions approfondies sur **les méthodes incontournables d'identification microbienne**, en réponse aux exigences de la nouvelle **Annexe 1**, seront également au programme. L'événement explorera également les succès d'implémentation et les dernières innovations à venir dans le domaine des **méthodes alternatives** en microbiologie. Pour finir, un focus particulier sera mis sur les méthodes automatisées en microbiologie analytique, ainsi qu'une mise à jour sur les nouvelles approches d'évaluation des **endotoxines bactériennes et de la pyrogénicité**. Alors inscrivez-vous, on vous attend nombreux !




automatisées en microbiologie analytique, ainsi qu'une mise à jour sur les nouvelles approches d'évaluation des **endotoxines bactériennes et de la pyrogénicité**. Alors inscrivez-vous, on vous attend nombreux !


## Conférences


### Aperçu du programme ...


 Incubation mono-température pour les contrôles d'environnement en ZAC. Retour d'implémentation et perspectives  
Guillaume PINON, SERVIER


 Early detection, counting and identification of microorganisms on standard Petri dish using holographic imaging and artificial intelligence / Yvan CASPAR, CHU GRENOBLE

 Automated Environment Monitoring system experiences  
Niels VISSCHERS, MERCK

 European Pharmacopoeia strategy for phasing out the Rabbit Pyrogen Test  
Emmanuelle CHARTON, EDQM & Ingo SPREITZER, PEI

 Roadmap de Sanofi pour le test endotoxines : de l'évaluation à l'automatisation du test rFC  
Marine MARIUS, SANOFI

 La détection des mycoplasmes en méthodes NAT  
Aline LE TIEC, NOVARTIS

 Validation d'un test de stérilité rapide et approche avec les autorités. Exemple de la société GUERBET  
Guillaume GUIBERT & Imen BARNAT, GUERBET

 Feasibility of Solid Phase Cytometry for Rapid Bioburden Testing  
Sophie DRINKWATER, ASTRAZENECA

 Update on European Pharmacopoeia texts related to Microbiology  
Emmanuelle CHARTON, EDQM

 Update & Future looking statements from United States Pharmacopoeia USP Microbiology Expert Committee  
Liliana GAMBOA, SANOFI & Expert USP

 Annexe 1 & exigences en termes d'identification microbiologiques pour aller à l'espèce  
Arnaud CARLOTTI, EUROFINIS

 Challenges with the inclusion of local environment isolates in the Growth Promotion Test  
Isabelle HOENEN, LILLY

 Challenges de la sous-traitance des contrôles microbiologiques chez de multiples CDMOs  
Jérôme LAPORTE, MODERNA

 Mitigating DI Issues in the Microbiology Lab  
Jean-Louis JOUVE, COETIC

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



# Ring

regulatory  
intelligence guard





# The alternatives and rapid Microbiological methods & Pharmacopeias world.

By Thierry BONNEVAY, Pharm D. – Sanofi Vaccine



## 1. Introduction & the different main pharmacopeias

The main pharmacopoeias have different structures, internal organization, and mode of operation. In summary:

### European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)

is a multinational Pharmacopoeia that acts as an umbrella and integrates the main components of several national compendia still maintained in Europe. It is well recognized as a reference in many other countries and regions. It is edited and published by the European Directorate for Quality of Medicines (EDQM) which belongs to the Council of Europe. Ph.Eur. was founded in 1964 and is valid for the EU and many additional states. Every 3 years a new edition is published in both English and French. Ph. Eur. covers General Chapters (General notices, Methods of analysis, material for containers & containers, reagents, and general texts), General Monographs (e.g., on Dosage forms, vaccines for human & veterinary use or herbal drugs and herbal drug preparations), and Specific Monographs. New texts and revisions are published in *Pharmeuropa*, an online journal designed to gather public feedbacks.

### The United States Pharmacopeias (USP).

USP-NF is a combination of two compendia, the United States Pharmacopeia (USP) and the National Formulary (NF). It sets standards for chemical and biological drug substances, dosage forms, compounded preparations, excipients, medical devices, and dietary supplements manufactured, distributed, and consumed worldwide. USP has been founded in 1820. USP is a national Pharmacopoeia that is recognized reference in many other countries and regions. It is annually updated, along with two supplements, and is published in English. USP-NF is edited and published by U.S. Pharmacopeial Convention, a scientific nonprofit organization independent from the US FDA. USP is the only national pharmacopoeia that is not part of HAs. USP covers Monographs for drug substances, dosage forms, and compounded preparations. Monographs for dietary supplements and ingredients appear in a separate section of the USP. Excipient monographs are part of the NF. Public input and interactions are vital to the development of these standards. *Pharmacopeial Forum (PF)* is the bimonthly online journal through which USP develops and revises standards for the USP-NF by a process of public review and comment.

→

### The Japanese Pharmacopoeia (JP)

is the national Pharmacopoeia of Japan. It was founded in 1886 and is now edited and published by the Ministry of Health, Labor & Welfare (MHLW). A new edition is published every 5 years since JP9. JP is published in Japanese and English languages. For Legal Status JP is defined by the Act on Securing Quality, Efficacy and Safety of Pharmaceuticals, Medical Devices, Regenerative and Cellular Therapy Products, Gene Therapy Products, and Cosmetics. It covers standards for Chemical Drugs (APIs and Preparations), Biological Drugs (APIs and Preparations), and Excipients, including requirements for packaging materials. The creation of JP monographs is managed by Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) in interaction with pharmaceutical industries and other public stakeholders. Expert Committees review the drafts prior to public consultation via the Japanese Pharmacopoeial Forum, a Japanese and English journal for publication of draft texts.

### Chinese Pharmacopoeia (ChP)

is a national Pharmacopoeia of the People's Republic of China. It was founded in 1953 but it has several thousand-year compendial roots and due to this has a special focus on traditional Chinese herbal medicines. ChP is edited and published by the Pharmacopoeia Commission of China National Medical Products Administration (NMPA). The last version was published in 2020 and the official languages are Chinese and English. ChP covers the standards for Chemical Drugs, Biological products and excipients including requirements for packaging materials. ChP also covers standards for traditional Chinese medicines addressing, for example, Chinese Materia Medica and Prepared Slices of Chinese Crude Drugs, Oil, Fats and Extractives, as well as Traditional Chinese Patent Medicines and Single Herb Preparations. Other part covers Western Medicines such as chemical drugs, antibiotics, biochemical preparations and Radiopharmaceuticals, excipients for pharmaceutical use and biologics. Since the 2015 edition, ChP has a separate volume on general monographs and excipients.

## 2. Main compendial microbiology chapters & Pharmacopoeias

In 1989, the Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) was formed by the EDQM of the Council of Europe, the United States Pharmacopoeial Convention Incorporated, and the Japanese Pharmacopoeia of the MHLW. Since October 2023, the Indian Pharmacopoeia Commission (IPC) officially joined as a member in the PDG and the World Health Organization (WHO) has participated in the PDG as an observer since May 2001. The PDG generally meet twice a year (either face-to-face or by videoconference) to work on pharmacopoeial harmonization topics. The purpose of the PDG is to harmonize pharmacopoeial standards (excipient monographs and selected general chapters) in three major regions of the world. Harmonization reduces manufacturers' burden of having to perform analytical procedures in different ways, using different acceptance criteria, in order to satisfy pharmacopoeial requirements that differ between regions. The ultimate aim is to arrive at interchangeable methods or requirements so that demonstration of compliance using a general chapter from one of the 3 pharmacopoeias implies that the same results would be obtained using the general chapter of either of the other pharmacopoeias.

To help regulatory authorities and other users recognize the interchangeability of selected harmonized general chapters, the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) has issued topic-specific annexes with information about a limited number of these texts to facilitate their implementation.

For Microbiology methods topics, the oldest and most widely used general microbiology methods, i.e., the sterility test, microbial enumeration method, specified microorganisms detection, and bacterial endotoxin test, have been harmonized between USP, JP and Ph. Eur. pharmacopoeias for over 10 years now:

- **STERILITY TEST**, through ICH Q4B annex 8. This chapter has been revised to indicate its status within the context of harmonization, Chapter Ph. Eur. 2.6.1., USP <71>, and JP 4.06 are harmonized.
- **MICROBIAL ENUMERATION TEST**, through ICH Q4B annex 4A. This chapter has been revised to indicate its pharmacopoeial harmonization, Chapter Ph. Eur. 2.6.12., USP <61>, and JP 4.05 are harmonized.
- **TEST FOR SPECIFIED MICROORGANISMS**, through ICH Q4B annex 4B. Harmonization Chapter Ph. Eur. 2.6.13., USP <62>, and JP 4.05 are harmonized.
- **MICROBIOLOGICAL QUALITY OF NON-STERILE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS AND SUBSTANCES FOR PHARMACEUTICAL USE**: This chapter has been revised to indicate its status within the context of harmonization, Ph. Eur. chapter 5.1.4., USP <1111>, and JP General Information 12 are harmonized.
- **BACTERIAL ENDOTOXIN TEST**, through ICH Q4B annex 14 is harmonized, Ph. Eur. Chapter 2.6.14., USP <85>, and JP 4.01 are harmonized.

## 3. Alternative Microbiological methods & Pharmacopoeias

Traditional microbiological test methods have served industrial microbiologists well over the last 100 years. For example, the first pharmacopoeial sterility test appears in the British pharmacopoeia in 1932. Despite their limitations, the compendial microbiological assay are still a regulatory requirement for many pharmaceutical products releases.

In the 80s and 90s, one of the main issues with the traditional microbiological methods was the time to results. More rapid results were needed because a bioburden assay was at least 5 to 7 days, a sterility test 14 days, a Mycoplasma assay 28 days, and finally a Mycobacteria detection test 56 days.

Then the term Alternative methods appeared in the 90s and 2000s because issues it became increasingly clear that traditional methods were not only associated with long time to results but also with accuracy, precision, specificity, LOD and LOQ, robustness, etc. The expression Alternative and Rapid Microbiological Methods (ARMM) came into use, including both novel and automated traditional (and thus also "alternative") methods. The expression Modern Microbiological Methods is also used.

Toward the end of the 90s, a number of specific and dedicated conferences, congresses, and trainings on Rapid, Modern, Alternative microbiological methods appeared.

In the 90s impedancemetry, epifluorescence and bioluminescence were mainly used. Then in the 2000s Nucleic Acid Test based on PCR, and then qPCR, started to be evaluated and implemented.

Pharmacopoeias may appear to be lagging in the adoption of these alternative methods and to be still based solely on traditional methods, but this is not entirely correct. For more than 20 years, pharmacopoeias have been evolving, offering guides and recent compendial methods based on science and adapted to specific needs.

In May 2003, over 20 years ago, an international symposium on Microbiological control methods in European pharmacopoeia present and future was organized by EDQM in Copenhagen, Denmark. During that symposium, a session dedicated to alternative or new microbiological methods took place. Presentation on validation and registration of rapid microbiological methods (Dr P. Newby from GSK and Dr R. Dabbah from USP), testing of water with solid phase cytometry (Dr S. Guyomard from Aventis), detection of Mycoplasma by PCR (Dr L. Mallet from Aventis Pasteur and Dr T. Hammerle from Baxter), and microbial identification with 16S rRNA methods (Dr T. Sasaki from National Institute of Infection Diseases from Japan) were presented. Following this 2003 symposium, European pharmacopoeia agreed on the need of recognition from both European regulatory authorities as well as European Pharmacopoeia and created a specific subgroup to work on alternative microbiological methods. This led to the chapter 5.1.6. published in 2006 and the specific Working Party on

Mycoplasma (WP MYC). In the meantime, USP was already working on a guide on the validation of alternative methods with a compendial approach, the chapter <1223>, also published in USP 29 in 2006. In the general notices from the different pharmacopoeias, there is specific sections about alternative analytical procedures. With the agreement of the competent authority, alternative procedures may be used for control purposes, provided that they enable an unequivocal decision to be made as to whether compliance with the standards of the monographs would be achieved if the official procedures were used. In the event of doubt or dispute, the analytical procedures of the Ph. Eur. are to be alone authoritative. (See chapter 1.1.2.5. from General notices Ph. Eur.).

### 3.1 Alternative and rapid Microbiological methods & European Pharmacopoeia

An important chapter is **chapter 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality** (last version applicable since July 2017). The first version of this chapter was written by a dedicated subgroup from group 1 (Microbiology), following May 2003 EDQM symposium in Copenhagen. Published in 2006, it was designed to provide both information and guideline. In 2016, in the supplement 9.2 from European pharmacopoeia, this chapter was entirely revised to take into account technological developments in alternative microbiological methods. The introduction and the sections concerning the 3 major types of microbiological tests have been reworded and expanded. In addition, information on the use of alternative methods for process analytical technology (PAT) was also added. The objective of this chapter is to facilitate the implementation and use of alternative microbiological methods where this can lead to cost-effective microbiological control and improved quality assurance for pharmaceutical products. These alternative methods may also find a place in environmental monitoring. The principle of detection, enumeration, isolation, and identification of the methods that have successfully been used in the quality control (QC) of pharmaceuticals are described and a guidance on how to validate alternative microbiological methods is provided. Finally, 3 examples of validation protocols of alternative microbiological methods as per chapter 5.1.6 are presented, including a sterility test based on ATP, a bioburden test based on solid phase cytometry, and a microbial identification test based on rDNA 16S sequencing.

Since 2023, the group 1 (Microbiology) from EDQM started to work on the update of this chapter (Solène Le Maux, Conference Pharmed oral presentation, 21st November 2023 in Dusseldorf, the revision of chapter 5.1.6. Ph. Eur.). The chapter will be updated both to reflect the techniques currently in use and to update the validation guidance.

In parallel, the guidance chapter **5.1.9 GUIDELINES FOR USING THE TEST FOR STERILITY** will also be updated and will include indication on the possibility to use the official method, 2.6.1 Sterility, or an alternative method in accordance with the principles provided in Chapter 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality.

For sterility testing of cell-based preparations, the chapter **2.6.27 MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF CELL-BASED PREPARATIONS** was first published in June 2006 and then updated in 2016 and 2021. This chapter suggests that automated growth-based methods include more flexibility for the incubation temperatures and provide examples of temperature settings where the test volume allows 2 incubation conditions. In addition, it includes an updated list of micro-organisms used for method validation. Information about the sensitivity to be achieved during validation was also added. The chapter considers the characteristics and limitations of these cell-based preparations, in particular their shelf-life, which may not always allow for completion of conventional microbiological examination tests before administration to the patient. Also, it discusses the amounts available for testing and sampling-related issues (with the proposed 1% of total amount of product to be tested).

In the introduction of chapter **2.6.12 MICROBIAL ENUMERATION TEST and 2.6.13 Test for SPECIFIED MICROORGANISMS**, there are the mention that alternative microbiological procedures, including automated methods, may be used, provided that their equivalence to Pharmacopoeia methods has been demonstrated.

In **Chapter 2.6.7. MYCOPLAMAS**, since January 2008 this chapter describes the two classical methods (i.e., the microbiological culture method and the indicator cell culture method) along with the Nucleic Acid amplification Techniques (NAT) may be used as an alternative after suitable validation. The chapter describes the guideline for such NAT validation, the LOD to be reached and the comparability protocol. At the end of 2018, a WP MYC was assembled to update this chapter. After reviewing comments received and after discussions with the relevant Groups of Experts/Working Parties, this chapter has been amended and will be republished for public consultation in Pharmed 36.1 (January 2024). For more details, see presentation from Dr Thuy Bourgeois, EDQM, in the pre-Conference workshop Pharmed 2023, 20 Nov 2023 entitled "International Mycoplasma qPCR testing User Day".

The general chapter **2.6.21. NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNIQUES** was published in July 2014. In this general chapter, the PCR method is described as the reference technique. Alternative methods may be used if they satisfy the quality requirements described. This section establishes the requirements for sample preparation, in vitro amplification of DNA sequences, and detection of the specific PCR products. With the aid of PCR, defined DNA sequences can be detected. RNA sequences can also be detected following reverse transcription of the RNA to complementary DNA (cDNA) and subsequent amplification. A specific section is dedicated to Quality Assurance and two examples of validation of NAT in plasma pools (one for HCV and the other for the B19 virus) are discussed.

Since 2018, it is mentioned in chapter **2.6.16. TESTS FOR EXTRANEUS AGENTS IN VIRAL VACCINES FOR HUMAN USE**, that sensitive molecular methods with broad detection capabilities are available. These new approaches include high-throughput sequencing (HTS) methods, NAT (e.g., polymerase chain reaction (PCR), reverse transcriptase PCR (RT-PCR), product-enhanced reverse transcriptase (PERT) assays) for whole virus families or random-priming methods (associated or not with sequencing), hybridization to oligonucleotide arrays, and mass spectrometry with broad-spectrum PCR. These methods may be used either as an alternative to in vivo tests and specific NAT or as a supplement/alternative to in vitro culture tests, based on the risk assessment and with the agreement of the competent authority. For Spiroplasmas and Mycobacteria detection, it is specified that NAT (see above chapter 2.6.21) may be used as an alternative, provided such assay is validated and shown to be comparable to the culture method.

Likewise, in the guidance chapter **5.2.3 CELL SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF VACCINES FOR HUMAN USE**, NAT methods are also mentioned as potential alternatives (following adequate validation). In addition, new sensitive molecular methods with broad detection capabilities are referred to, including novel high-throughput sequencing (HTS) methods.

A future chapter under construction, chapter **2.6.41. "High Throughput Sequencing for the detection of viral extraneous agents"**, will describe the technology, methods, and workflow of the HTS methods, as well as guidelines for their validation. This future chapter is being prepared by the HTS WP (Ph. Eur. group of Expert: regulators, OMCLs and industry from Europe, US, Canada) and should be published in Pharmed 2024.

In the field of pyrogens and endotoxins assay, European pharmacopoeia is at the forefront with the **chapter 2.6.30. Monocyte activation test**, first applicable in 2010 and updated in 2016. The monocyte-activation test (MAT) is used to detect or quantify substances that activate human monocytes or monocytic cells to release endogenous mediators such as pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6). These cytokines are known to have a role in fever pathogenesis.



Consequently, the MAT will detect the presence of pyrogens in the test sample. The MAT is suitable, after a product-specific validation, as a replacement for the classical rabbit pyrogen test. Since 2018, in chapter 2.6.8. describing Pyrogens test in Rabbit (RPT), it is mentioned that wherever possible and after product-specific validation, the pyrogen test ought to be replaced by the monocyte-activation test (2.6.30). The EDQM is working for complete removal of chapter 2.6.8. in all related texts (60 texts) and a new guideline on Pyrogenicity (future guideline 5.1.13.) prepared by the WP BET has been finalized and published in PHARMEUROPA 34.2 for public comments. Finally, a new update and the 3rd version of chapter 2.6.30. MAT will be published in 2024. For more information on Pyrogens, see Dr Gwenaël Ciréface (EDQM) presentation during track 3, Pharmalab congress November 2023.

On the topic of Endotoxins, the new **chapter 2.6.32 TEST FOR BACTERIAL ENDOTOXINS USING RECOMBINANT FACTOR C** was published in July 2020 and has been applicable since January 2021. The EDQM was the first pharmacopeia to introduce in compendia recombinant Factor C (rFC) reagent for endotoxins testing. The rFC reagent was added to the BET WP work program at the 131<sup>st</sup> session of Ph. Eur. Commission (June 2008). In 2016, the guideline chapter 5.1.10. Guideline for BET opens the way for the use of rFC and states: *“the use of alternative reagents such as recombinant factor C (rFC) as a replacement to the amoebocyte lysate eliminates the use of a reagent extracted from live animals”*. Chapter 2.6.32. describes a BET that uses a rFC based on the horseshoe crab gene sequence, and a fluorimetry end-point detection method. This chapter is no longer a standalone chapter and, since Pharmeuropa 34.3. (July 2022), the EDQM has published updated versions Water for injections (0169) and Purified water (0008), two fundamental Ph. Eur. monographs. Both texts have been revised to allow the use of rFC to test for bacterial endotoxins, as described in general chapter 2.6.32. These revisions have been adopted, the revised monographs published in supplement 11.4, and the implementation date is 1 April 2024. For users, update mean that they can select the test described in 2.6.32 directly when testing pharmaceutical waters, that is, without the requirement of a side-by-side comparison against the tests described in general chapter 2.6.14 Bacterial endotoxins.

### [3.2 Alternative and rapid Microbiological methods & USP](#)

In parallel to chapter 5.1.6. on alternative microbiological methods, the UPS chapter <1223> **VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS** provides guidance on the selection, evaluation, and use of microbiological methods as alternatives to compendial methods. To properly implement alternative methods, one must consider a number of important issues before selecting the analytical technology and qualifying that method with the actual product. These issues include, but are not limited to, identification of suitable alternative methodology, development of user specifications for equipment selection, demonstration of the applicability of the method as a replacement for a standard compendial method, and qualification of the method in the work environment it is meant to be used. The limitations of the use of CFU (Colony Forming Unit) as a standard signal for microbiological methods are also described. This chapter has been updated in May 2018 but was first made official in the 2<sup>nd</sup> Supplement of USP 29-NF 24 in 2006, at about the same time as the Ph. Eur. chapter 5.1.6. (Applicable in 2006.)

A new guideline **chapter <1071> Rapid Sterility Testing of Short-Life Products: A Risk-Based Approach** was published June 2019 and became official in December 2019. USP created an expert panel in 2015 called “Modern Microbiological Methods (MMM) Expert Panel” to work on this chapter and a stimuli article was published in PF 43.5, (September–October 2017). In the chapter’s introduction, it is mentioned that the use of rapid microbial tests (RMTs) should be risk-based so the stakeholder can select the preferred technology for their intended use and balance user requirement specifications (URS) including time to result, specificity, limit of detection (LOD), sample size, and product attributes. This general informational chapter discusses the needs of those who manufacture/prepare and test products with a short shelf life and the associated URS and includes a brief discussion of suitable methods for risk-based rapid microbial testing for the release of short shelf-life sterile products (hereafter

referred to in this chapter as “short-life products”).

After the publication of this new chapter Guideline <1071>, two new chapters were published in 2021 but are not yet applicable: **chapter <72>: RESPIRATION-BASED RAPID MICROBIAL METHODS FOR THE RELEASE OF SHORT SHELF-LIFE PRODUCTS** and **chapter <73>: ATP BIOLUMINESCENCE-BASED RAPID MICROBIAL METHODS FOR THE RELEASE OF SHORT SHELF-LIFE PRODUCTS**. Still at the stage of public comment, another new chapter was published in PF 48(5) in September 2022 and is entitled **chapter <74> Solid Phase Cytometry-Based Rapid Microbial Methods for the Detection of Contamination in Short Shelf-Life Products**. Finally, as part of future work from 2024 onwards, USP announced two chapters centered on the theme of rapid sterility testing for short shelf-life products: **chapter <75>: NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHODS** and **chapter <76>: FLOW CYTOMETRY METHODS**.

On Mycoplasma, a new chapter published in September 2022 and now at the stage of public comment, is entitled **chapter<77> MYCOPLASMA NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TESTS**. This new chapter describes criteria for selecting a NAT to detect mycoplasma that is comparable to either the compendial methods from Mycoplasma Tests chapter <63>: the agar and broth media procedure (method A) or the indicator cell culture procedure (method B). The new USP MEC (Microbiology Expert Committee) will address the comments and work on that chapter in 2024.

Also related to the use of NAT based methods, it is of note that USP will work on a **NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TEST (NAT)** for *Burkholderia cepacia* detection.

Finally on the topic of pyrogens and endotoxins, USP released in 2023 a new **chapter <86> “Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Reagents”**. It has entered the stage of public comment in PF 49(6), 1<sup>st</sup> November 2023. The deadline for comments is January 31<sup>st</sup>, 2024. This new chapter provides additional techniques using non-animal derived reagents to complement the Bacterial Endotoxins Test <85>. This test uses a reagent containing the recombinant Factor C (rFC) protein or a recombinant cascade reagent (rCR) containing recombinant Factor C, recombinant Factor B, and recombinant pro-clotting enzyme. The main difference with Ph. Eur. chapter 2.6.32. is that the current draft chapter <86> proposed the rCR reagent. For Pyrogens, USP has not yet planned a chapter even in a guideline mode for MAT to replace RPT.

### [3.3 Alternative and rapid Microbiological methods and Japanese Pharmacopoeia](#)

Like in Ph. Eur. chapter 5.1.6. and USP chapter <1223>, the JP includes a chapter on ARMMs: **chapter <G4-6-170> RMM Rapid Microbiological Methods**. In the introduction to this chapter, it is mentioned that, since the 1980s, it has become clear that most bacteria in the natural environment have low growth ability in conventional culture media and that the detection, enumeration, and identification of these bacteria are difficult by means of culture methods alone. Compared to the conventional methods, these new methods are not necessarily superior in every respect, but they usually offer a shorter time to result, greater accuracy and can also applied to fungi and viruses. The chapter describes all detection targets and principles; it is divided in 2 parts distinguishing direct methods such as solid phase and flow cytometry and indirect methods. Then, a specific paragraph is dedicated to the validation part and, finally, there is an overview of different possible applications such as quality control of water, sterility, microbial limit test, antimicrobial and preservatives effectiveness, raw materials, etc. The JP offers some considerations on RMMs, mentioning that RMMs rely on principles that differ from those of the conventional methods and, as such, are based on other signals than CFU. The JP also states that correlation between RMMs and conventional methods is not always required and that these methods can be applied to quality control via the PAT.

Overall, these novel methods should improve both accuracy and time to results compared to conventional method. Moreover, approaches that use phylogenetic analyses based on high-throughput sequencing offer the possibility to glimpse at the real microbial world in pharmaceutical manufacturing facilities.



Since JP15, the **Mycoplasma testing for cell substrates used for the production of biotechnological/biological products, chapter <G3-14-170>** describes NAT mycoplasma applications. The two classical tests are described, that is, the culture method and the indicator cell culture method. However, it also includes a method C based on NAT. It underlines that several NAT methods are available without prescribing any particular ones. Overall, the selected NAT method should be validated for adequate sensitivity (ie, detection limit) and specificity, as well as for robustness (ie, results unaffected by small variations in extraction method parameters or in composition of the reaction mix). Any NAT method can be used as long as its specificity and sensitivity have properly been validated, as described in the chapter.

A chapter entitled **rapid counting of microbes using fluorescent staining chapter <G4-8-152>** has been part of JP since JP15 Supplement 2. This chapter overviews rapid methods using fluorescence staining for the quantitative estimation of viable microorganisms. It first underlines that incubation on an agar medium has been widely used for quantitative estimation of viable microorganisms, but that several environmental microorganisms of interest are not easily grown under usual conditions. To overcome this problem, new microbial detection methods based on fluorescence or luminescence have been developed. Two methods are described in the chapter, the CFDA-DAPI double staining method and the microcolony method. These rapid and accurate methods tend to give higher counts than the other techniques as they provide quantitative estimates of viable microorganisms based on a very specific definition of viability, which may be different from that implicit in other methods.

For microbial identification, **chapter <G4-7-160> Rapid identification of microorganisms** based on Molecular Biological Methods has been included since JP 16. This chapter describes methods to identify or enumerate microorganisms (bacteria and fungi), found in in-process control tests or lot release tests of pharmaceutical products, at the species or genus level, based on their DNA sequence homology. The identification of isolates found in the sterility test or aseptic processing can be helpful for investigating the causes of contamination. Furthermore, information on microorganisms found in raw materials used for pharmaceutical products, processing areas of pharmaceutical products, and so on, is useful in designing measurements to control the microbiological quality of drugs.

For endotoxins test, a new guideline was published in September 2019, **chapter <G4-4-180> "Bacterial Endotoxins Test and alternative methods using recombinant protein reagents for endotoxin assay"**. In the § 4 of this new guideline, the measurement by alternative methods using recombinant protein-reagents for endotoxin assay and points is considered. As of now, this chapter is still a guideline and recombinant reagents are still considered by JP as alternative methods. If these reagents for endotoxin assay are used as an alternative method, users need to demonstrate that accuracy, precision, sensitivity, specificity, etc. are equal or better compared to Bacterial Endotoxins Test <4.01> using lysate reagents.

### [3.4 Alternative and rapid Microbiological methods & Chinese Pharmacopoeia](#)

The main traditional and conventional methods (sterility, endotoxins, microbial enumeration tests, etc.) described in the Chinese Pharmacopoeia are not yet fully harmonized with Ph. Eur., USP and JP. However, since 2020, the ChP has moved closer to these other pharmacopoeias although there are still slight differences.

Since ChP 2020, a chapter is dedicated to ARMMs: **chapter 9201 Guidelines for Validation of Alternative Microbiological Methods for Pharmaceutical products**. The objective of this chapter is to provide guidelines for validating methods to be used as alternatives to classical culture-based microbiological methods for pharmaceutical products. With the rapid development of microbiological analytical technology, and in order to meet the demands of in-process control of pharmaceutical manufacture, some new technologies for pharmaceutical microbiological control have been introduced. Compared with traditional methods, the new technologies are rapid and allow real-time or near-real-time monitoring. The chapter divides

technologies in 3 types: (1) growth-based detection methods, where a detectable signal such as bioluminescence, electrochemical methods and turbidimetry, is usually achieved after a period of subculture ; (2) direct detection measurement of viable microorganisms, such as solid phase cytometry and flow cytometry ; (3) specific cell component analysis such as fatty acid analysis, NATs, and genetic fingerprinting. The types and Validation Parameters of Microbiological Tests are described with a table including validation Parameters by Type of Microbiological Test (qualitative or quantitative).

For endotoxins testing, a new guideline was also introduced in ChP 2020, under **chapter 9251 Guidelines for Application of Bacterial Endotoxin Test Methods**. The guidelines further explain the content and application of bacterial endotoxin test methods. At the end of this chapter, the rFC method is described as an attachment. Of note, Factor C is a protein that is sensitive to bacterial endotoxin in Tachypleus Amebocyte Lysate and is capable of selectively recognizing that endotoxin. According to the testing principle, this method does not have the G-factor bypass interference and is highly specific. It is thus suitable for testing sample containing  $\beta$ -glucan interference. The reagent used in this method does not contain factor B, coagulase or coagulogen, etc., therefore, a sample containing an inhibitory or potentiating effect on the above substances is suitable for use in the rFC method. However, according to the ChP, rFC reagent is still considered as an alternative method compared to traditional TAL/LAL reagents.

## 4. Conclusion

Overall, the interest for ARMMs is still high in the pharmaceutical industry. This is mainly due to the over 20 years of experiences and feedback on some methods and to the appearance of a number of ARMMs specifically designed for use in pharmaceutical sector. However, the registration and full implementation of ARMMs still remains quite low despite a slight increase observed since 2020.

The conventional and traditional microbiological methods used for detection, enumeration and identification of microorganisms can hardly be qualified as modern. These methods have been highly successful, remained both quite cheap and simple to perform. However, they are also labor intensive, take between 5 (bioburden) up to 56 days (Mycobacteria detection) to generate results, and require expert interpretation that, in some contexts, may raise questions of data integrity. Moreover, they remain difficult to automate and will never provide real-time data for accurate and responsive process control.

In contrast, ARMMs methods could provide rapid results, in some cases in real time or in near real time as some used in-line or on-line PAT applications. These applications tend to be easier to automate, to be labor efficient, and show outstanding data integrity compliance.

There is a real need for the introduction, validation, and implementation of these ARMMs in pharmaceutical industries as they could help address the requirements for a highly technological and competitive twenty first century industry!

As things stand today, it would be wrong to claim that pharmacopoeias are old-fashioned and rather conservative with regards to analytical methods. Pharmacopoeias have their own pace but keep very close to contemporary science.

For over 20 years now, pharmacopoeias have helped and supported the pharmaceutical industry by working to develop alternative microbiological methods into guidelines, at least, or into the best compendial alternative microbiological methods. This helped introduce novel methods and guided future users toward the validation and implementation of their approach, until acceptability by competent health authorities. ■

*The Author Thierry Bonnevey is a Sanofi employee and may hold shares and/or stock options in the company. Thierry Bonnevey would like to thank Jean Sebastien Bolduc (Global Scientific & Medical Publications Manager from SANOFI) for proofreading this article and for his comments.*

### Glossary

<b>ARMM</b>	Alternative and Rapid Microbiological Methods
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate
<b>BET</b>	Bacterial Endotoxin Test
<b>ChP</b>	Chinese Pharmacopeia
<b>EDQM</b>	European Directorate for Quality of Medicines
<b>EU</b>	Europe
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>HAs</b>	Health Authorities
<b>HTS</b>	High Throughput Sequencing
<b>ICH</b>	International Council for Harmonization
<b>IPC</b>	Indian Pharmacopeia Commission
<b>JP</b>	Japanese Pharmacopeia
<b>LAL</b>	Limulus Amebocyte Lysate
<b>LOD</b>	Limit Of Detection
<b>LOQ</b>	Limit of Quantification
<b>MHLW</b>	Ministry of Health, Labor & Welfare, Japan
<b>NAT</b>	Nucleic Acid Tests
<b>NF</b>	National Formulary
<b>NMPA</b>	National Medical Products Administration, China
<b>OMCLs</b>	Official Medicines Control Laboratories
<b>PAT</b>	Process Analytical Technology
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDG</b>	Pharmacoepial Discussion Group
<b>PF</b>	Pharmacoepial Forum
<b>Ph. Eur.</b>	European pharmacopeia
<b>PMDA</b>	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan
<b>QC</b>	Quality Control
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>rFC</b>	recombinant Factor C
<b>RMM</b>	Rapid Microbiological Methods
<b>rRNA</b>	Ribosomal Ribonucleic Acid
<b>USP</b>	United States pharmacopeia
<b>WHO</b>	World Health Organization

### References

- *Les Méthodes alternatives de contrôle microbiologique. Présentation des principales techniques rapides. Rapport commission SFSTP, E. Petat and al. STP Pharma Pratiques 6 (4) 281-301 – 1996.*
- *Microbiological control methods in the European pharmacopeia: Present and Future – International symposium organized by the EDQM – 5 and 6 May 2003, Copenhagen, Denmark. Technical Report N°33. Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological methods. PDA. First published in 2000. Revised in 2013.*
- *International conference & Technology, BARNETT International conference group – Rapid Method & automation in microbiology – 19 and 20 October 2000 – Radisson SAS Hotel, Brussels, Belgium (18 oral conferences).*
- *Miller, M. J. The Impact of Process Analytical Technology (PAT), cGMPs for the 21st Century, and Other Regulatory and Compendial Initiatives on the Implementation of RMMs. In Encyclopedia of RMMs, Miller, M.J., Ed.; DHI Publishing: Bethesda, MD, 2005; Vol. 1, pp 195–215.*
- *Miller, M. J. RMMs and demonstrating a return on investment: It's easier than you think! Am. Pharm. Rev. 2009, 12 (5), 42– 47.*
- *USP 42 and Pharmacopeial Forum. All microbiological methods and chapters cited in this article.*
- *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) and Pharmedropa 11th Edition. All microbiological chapters cited in this article.*
- *Japanese Pharmacopoeia (18th Edition). Japan: The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare; All microbiological chapters cited in this article.*
- *ECA, 11th Pharmedropa 2023 conference, Dusseldorf, 20-22 November 2023. Solène Le Maux, EDQM, oral presentation "Revision of Ph. Eur. chapters 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality"/ Thuy Bourgeois, EDQM, oral presentation "Current revision of Ph. Eur. chapter 2.6.7 Mycoplasmas and its impact on other Ph. Eur. texts"/ Gwenaël Ciréfce, EDQM, oral presentation "Towards animal free pyrogen tests in the Ph. Eur: latest progress"/ Paul Newby, Gilberto Dalmaso, Bryan Riley, Peter Cooney, and Kim Tyndall. The Introduction of*
- *Qualitative Rapid Microbiological Methods for Drug-Product Testing. Pharmaceutical Technology PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY 2004.*
- *British Pharmacopeia. 1932. B. test for sterility.*
- *Moldenhauer, J. The Rush to Rapid Microbiological Methods – Or Not. Eur. Pharm. Rev. 2017, Issue 2. Am. Pharm. Rev. (accessed Oct. 28, 2021).*
- *Miller, M. The Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods: The New Fourth Volume Discusses Technologies, Regulatory Acceptance and Validation Case Studies. Eur. Pharm. Rev. 2013, Issue 3.*



# L'AVENIR DU CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE EN LIGNE

**BWT AQU@SENSE MB**



VOIR LA VIDÉO



La qualité de l'eau purifiée et de l'eau pour préparation injectables, parfaitement démontrable à chaque instant.

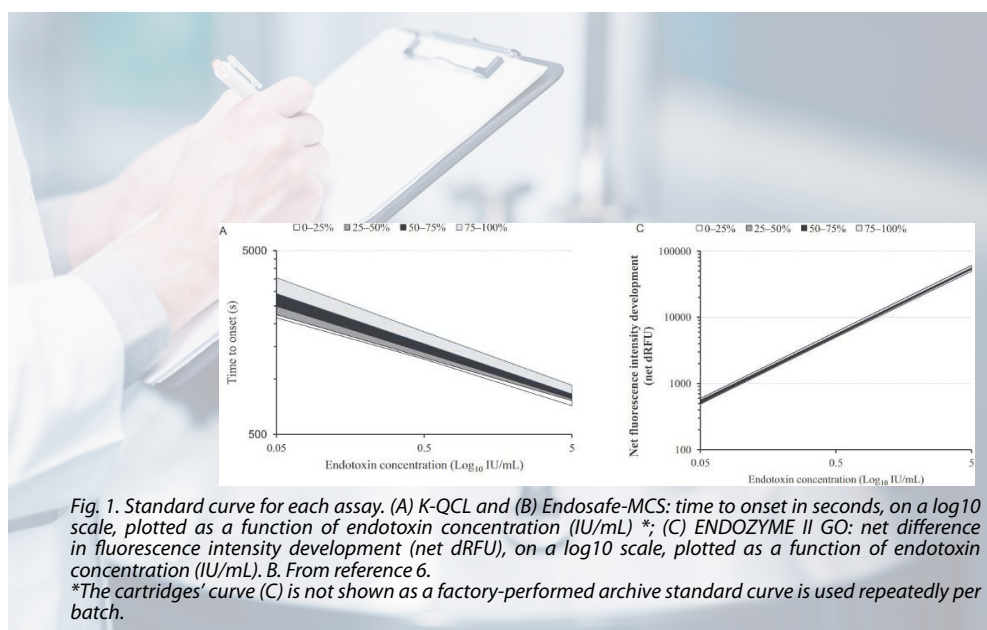
BWT présente l'AQU@Sense MB, un système fiable, éprouvé et précis de mesure en continu des TCC (total cell count) grâce à la cytométrie en flux.

[bwt-pharma.com](http://bwt-pharma.com)

# Industry pivots to rFC adoption: Reshaping the Endotoxin Test & Regulatory Landscape.

By Kevin L. WILLIAMS, bioMérieux

The absence of compendial recognition by the USP has slowed down the widespread adoption of rFC, impacting not only domestic pharmaceutical companies but also posing challenges for European entities seeking to export products beyond the EU. However, the imminent embrace of rFC within the USP (Draft USP <86>) represents a transformative moment, aligning global industry initiatives with regulatory momentum.



The evolving regulatory landscape is witnessing a pivotal shift, particularly with the imminent inclusion of **Recombinant Factor C** (rFC in the United States Pharmacopeia as **USP <86>**). This change signifies a significant breakthrough as rFC gains compendial recognition, aligning with its existing status in the European Pharmacopoeia (EP). The convergence of these standards signifies a broader acknowledgment of rFC's efficacy, indicating a potential for global harmonization in a near future<sup>(3)</sup>.

The global pharmaceutical market has expanded substantially over the last two decades, growing sixfold from \$113 billion in 2000 to \$629 billion in 2019. With this growth, however, comes increased vulnerability in terms of **supply chain security**. As more companies rely on a complex network of global suppliers, the need for robust and resilient strategies becomes paramount. A recent survey by the McKinsey Global Institute highlighted concerns about sole sourcing and the lack of visibility into supplier risks, signifying critical vulnerabilities within the industry<sup>(1)</sup>. The motivation behind the adoption of rFC is multifold. Industry leaders recognize the urgency to (a) diversify their supply chains<sup>(2)</sup> (b) fortify their resilience, addressing concerns related to geopolitical threats, (c) achieve environmental sustainability, and (d) assure global test performance uniformity. The limited availability of horseshoe crabs essential for Limulus amoebocyte lysate (LAL) production poses a critical risk. With both climate challenges as well as geopolitical tensions potentially impacting the accessibility of these marine animal-derived products. The adoption of rFC emerges as a proactive measure to secure a consistent supply of testing reagents for pharmaceutical products<sup>(3,4,5)</sup>.

Moreover, the inherent consistency of rFC derived from biotechnological production stands in stark contrast to the variability associated with materials sourced from the wild. Natural source variability includes animal diversity (sex, weight, diet, etc.) as well as production-related extraction and formulation-associated variation. Recombinant reagents offer a level of consistency crucial for maintaining uniform test results, characterized by their stable performance across batches, as opposed to the inherent variations in naturally harvested materials. The rFC reagent has



been demonstrated to be much less variable in terms of repeating constant standard curve properties related to batch after batch testing as shown in Fig. 1.

The urgency of adopting rFC is underscored by the escalating demand for LAL in the wake of the global surge in COVID-19 vaccine and treatment testing<sup>(7)</sup>. Biomedical harvesting of horseshoe crabs has grown 27% full-year over year (now at 911,826) as per the ASMFC report on the 2022 Fishing year (Oct. 2023, Table 2, page 8). Efforts to expand horseshoe crab harvest areas to meet this demand are straining the ecosystem, threatening the delicate balance of shorebirds dependent on this keystone species<sup>(8,9,10)</sup>. Recognizing the challenges in transitioning entirely from LAL, many companies opt for a phased approach to meet their sustainability and supply chain assurance goals. They integrate rFC for **water, raw material, and container closure testing** endotoxin testing while continuing to use LAL for legacy

finished products., Water, raws, and container closures constitute a significant portion of endotoxin tests (>80%). The wide range of non-finished products that can be tested without regulatory permission (classified as “inspectional”) allows for a seamless transition without incurring substantial regulatory barriers<sup>(3)</sup>. The imminent inclusion of rFC in the USP demonstrates the industry's proactive perspective towards embracing sustainable solutions. As the pharmaceutical sector increasingly integrates rFC into its practices, the path toward global regulatory acceptance becomes clearer, serving to fortify supply chain robustness. The momentum toward adopting rFC represents a critical mass, where industry and regulatory bodies converge to **prioritize resilient, sustainable, and consistent endotoxin testing methods**. This joint effort marks a significant step forward in reshaping the landscape of pharmaceutical testing and highlights the imperative for adaptive, sustainable, and globally accepted methods<sup>(1,4,7)</sup>.

**References**

- 1 Foster T, Patel P, Skiba K. Four ways pharma companies can make their supply chains more resilient. Pharmaceuticals & Medical Products Practice. McKinsey & Company. 2021.
- 2 Lakovou E, Chelsea C. White III, How to build more secure, resilient, next-gen U.S. supply chains. Brookings Tech Stream, December 3, 2020. <https://www.brookings.edu/techstream/how-to-build-more-secure-resilient-next-gen-u-s-supply-chains/>
- 3 Marius, Vacher, Bonnevey. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices. Biologicals, Volume 67, Sept. 2020, Pages 49-55.
- 4 Eisner C. Of McMaster and Marshes: Inside the \$500K proposal to bleed protected SC horseshoe crabs. The State, Sept. 5, 2022. <https://www.thestate.com/news/state/south-carolina/article257214377.html#storylink=cpy>
- 5 Galvin WF. Horseshoe Crab Blood Extraction Facility Proposed. The Cape Cod Chronicle. April 6, 2022.
- 6 Galvin WF. Despite Mortality Concerns, Horseshoe Crab Blood Facility Gets Permit. The Cape Cod Chronicle. April 20, 2022.
- 7 Earls M. Pharma Lab Seeks Emergency Order to Begin Horseshoe Crab Harvest. Bloomberg Law. May 18, 2021. <https://news.bloomberglaw.com/environment-and-energy/pharma-lab-seeks-emergency-order-to-begin-horseshoe-crab-harvest>
- 8 “Revision to the Framework for Adaptive Management of Horseshoe Crab Harvest in the Delaware Bay Inclusive of Red Knot Conservation.” ASMFC, Adaptive Resource Management Subcommittee. Draft, 2021. Framework Revision. Page 28. [http://www.asmfc.org/files/Meetings/2022WinterMeeting/HorseshoeCrabBoard\\_Jan2022.pdf](http://www.asmfc.org/files/Meetings/2022WinterMeeting/HorseshoeCrabBoard_Jan2022.pdf).
- 9 Watson J, Tangle L. Shorebirds' Fate Hinges on Horseshoe Crabs. Conservation (NWF). Sep 30, 2013.
- 10 Without enough horseshoe crabs, a threatened bird could go extinct. The State We are in (NJCF). August 25, 2022. <https://www.njconservation.org/without-enough-horseshoe-crabs-a-threatened-bird-could-go-extinct/>

# skan

## SKANalytix

Safeguarding process, product and operator safety with analytical data

SKAN, a global leader in isolator technology, offers a range of analytical services to the pharmaceutical, biotech and medical devices industries, which have similar regulatory requirements.

With state-of-the-art techniques, SKAN provides solutions for analytical questions such as:

- Cleaning validation
- Migration of extractables and leachables
- Genotoxic impurities
- Occupational hygiene analytics
- Pharmacopeial testing
- Release testing
- Residual solvents
- Stability studies

For further information, please visit:



skan.com





# Rapid Bioburden & Sterility Testing: exploring Detection Limits of an Automated Solid Phase Cytometry System.

By Marine Schnetterle & Pauline Silberreiss - Redberry

Compendial microbiological methods have been widely used for the detection and quantification of microorganisms. These methods are renowned for their reliability, simplicity and consistent performance over decade establishing them as the gold standard. While well defined, their drawback lies in their slow and time-consuming nature. In contrast, alternative approaches, such as solid phase cytometry, have demonstrated the potential to yield faster results.



These compendial methods rely on the detection of microorganisms through their multiplication. In the case of sterility testing, multiplication occurs within two liquid mediums allowing the observation of turbidity caused by microbial growth after 14-days of incubation<sup>[1]</sup>. Meanwhile, in bioburden assessment, colony forming unit (CFU) are enumerated on solid phase agar plate after a 5-days incubation phase.<sup>[2]</sup>

Due to short shelf life of some biological products and the push from industries to obtain faster results, alternative and rapid microbiological methods are required. Solid phase cytometry holds the promise of expedited results<sup>[3]</sup>. The Red One™ instrument, utilizing automated solid phase cytometry, incorporates advanced image processing techniques to enable real-time detection of viable cells, distinguishing them from background debris with a high degree of reliability. Detecting very low inoculum levels using these methods can pose significant challenges for several reasons:

- **The ability to automatically detect rare events within the background noise**
- **The need for post-analysis identification in the event of a confirmed contamination.**

A strategy involving preliminary activation or enrichment phases before the microorganisms' detection step can enable to achieve very low detection levels in just a few hours to several days, as opposed to the several days to two weeks (required for sterility tests) to yield results. In accordance with the pharmacopeia chapters<sup>[4,5]</sup> addressing the implementation and utilization of alternative microbiological methods, several critical parameters must be assessed, including the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and an often underestimated yet crucial criterion in evaluating the performance of rapid systems, the limit of blank (LOB). In this paper, we will assess various options for detecting contamination in pharmaceutical matrices using the Red One™ solid phase cytometer focusing on their impact on LOD/LOQ/LOB criteria and time-to-result (TTR). Results will be presented for various matrices, including those

with low background levels (less than 1,000 particles per test) and those with higher background, such as Fluid Thioglycollate medium (FTM) for sterility testing.

### 1. Red One™ technology, new generation of solid phase cytometry

Red One™ is a fully automated microbiology platform that detects stained single cells based on their metabolic activity. Suited for any lab setup, Red One™ integrates easily into a laminar flow hood and has proven a highly reliable detection capacity of individual cells by monitoring their staining kinetics. Key features are:

- Sample Size: 10 µL to 250 mL
- Single-Use cap: based on a track-etched PET membrane (0.4 µm)
- Calibration-Free Operation.

All operations, including filtration and labeling, are fully automated. The system labels microorganisms using a fluorescein diacetate derivative sensitive to cell esterase activity. Red One™ employs a high-power LED lighting (excitation:  $\lambda_{exc} = 485\text{nm}$ ) and a high-resolution CMOS sensor camera (emission:  $\lambda_{em} = 520\text{nm}$ ), reducing equipment size and cost. High-resolution images capture microorganisms before, during, and after introducing the viability staining agent over a 10 to 15 minutes period. This fluorescence evolution during the time, so-called staining kinetics (patented by Redberry), allows reliable differentiation of viable cells from inert particles, such as those exhibiting auto-fluorescence (Fig. 1).

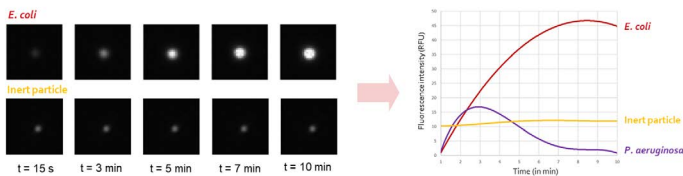


Fig. 1: staining kinetics principle on Red One™

### 2. Viability labeling using fluorescein derivative: activation & growth strategy

The use of a fluorescein derivatives to label viable cells is a method proven to be very sensitive provided that the microbiological flora of the samples to be analyzed is sufficiently metabolically active. Indeed, microorganisms in sporulated form or stressed germs for instance may not emit sufficient fluorescence. This usually requires an activation phase to ensure that (i) the staining agent can enter the cells and (ii) it could emit a sufficient level of fluorescence to be detected.

Since staining single microorganisms is always toxic to some extent, an enrichment step is mandatory to recover viable microorganisms if post-identification is required for the application. Pharmaceutical Quality Control applications often demand the lowest possible analytical sensitivity (1 CFU for a sterility test). The challenge for any system based on viability staining is that the fluorescence emitted by microorganisms can be distinguished from the background noise to confirm or deny the presence of a microorganism. This often requires a post-analysis confirmation with a microscope by an operator. Red One™ being fully automated, it avoids any potential bias from the operator. This analytical sensitivity is determined by the LOB, LOD, and LOQ criteria (Fig. 2). LOD and LOQ can be estimated using blank measurements, similar to the LOB<sup>[6, 8]</sup>.

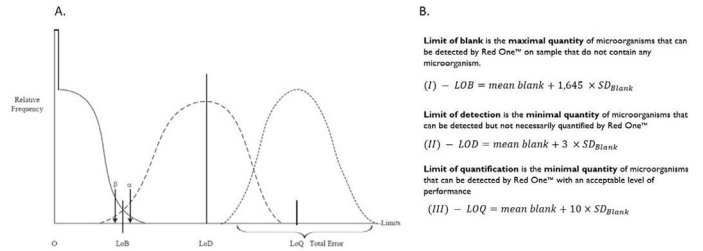


Fig. 2: relationship between LOB, LOD and LOQ<sup>[6, 8]</sup>

Therefore, the LOB quantifies the background noise of the Red One™ system. Below this limit, the system cannot reliably discriminate between particles and microorganisms, leading to a risk of false positives. This value should hence be low to distinguish rare events from the matrix background noise. In the case of an analysis using Red One™, microorganisms in the matrix must have a sufficient metabolic activity and a membrane integrity that enables them to exhibit a staining kinetics different enough from inert particles (matrix background noise).

To achieve this, several strategies are applied:

**Activation step:** This approach allows fragile or stressed microorganisms to recover metabolic activity and a membrane integrity sufficient to be stained with a kinetics. This activation phase can occur directly on the solid-phase consumable, similar to a Petri dish, and deliver results within a few hours (3-4h), the time required for microbial activation. This method is used for Red One™ Bioburden application as the results remain quantitative due to solid phase activation (Fig. 3).

**Enrichment step:** This allows a single cell to multiply sufficiently and then exceed the positivity threshold set by the system's LOB. With this approach Red One™ gives a qualitative result indicating the presence or absence of microbial cells in a matrix.

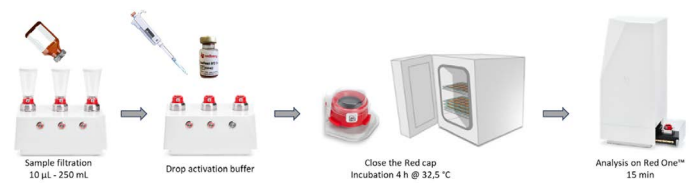


Fig. 3: Bioburden application workflow with Red One™

Red One BB – 0 CFU application is a qualitative test for the presence/absence of total aerobic flora after a 24 h enrichment phase directly on Red Caps consumables. Following a 24-hour enrichment, the consumable is analyzed on Red One™ for 10 minutes. Red One™ "Sterility Sample & Analysis" application strictly relies on compendial sample preparation in a standard double-canister device. A small volume from the canister, typically ranging from 1 to 5 mL, is sampled and analyzed on Red One™ (Fig. 4). The liquid-phase enrichment allows the detection of a single CFU in a matrix, no longer providing a quantitative result but a qualitative one (presence/absence). The required enrichment period is 96 hours.

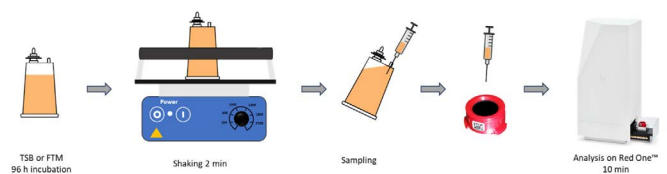


Fig. 4: Sterility testing application workflow with Red One™

The system achieves a short Time to Result (TTR) due to its unique capability to detect single microbial cells. This is in contrast to traditional visual inspection methods (turbidity or colonies on a plate) that require a considerably higher microbial population (typically on the order of 10<sup>8</sup> cells) to confirm a positive result. For sterility testing and, in certain cases, for bioburden testing, the identification of contaminating microorganisms is mandatory. Some existing studies indicate a post-labeling recovery issue, particularly for gram-negative bacteria<sup>[9]</sup>.

One advantage of post-enrichment analysis is that the concentration of microorganisms is no longer in the range of a few CFUs but rather above hundreds. Additionally, during an analysis with Red One™, the contact time between microorganisms and the staining agent does not exceed 15 minutes (Table 1), thereby minimizing the risk of toxicity.

**Table 1:** percentage of successful recultivation for identification post Red One™ analysis. For Each strain, starting inoculum was 3-6 CFU – coming from Bioball 550. Red One™ analysis occurred after 24h of incubation on the Red Caps (except for C. acnes – 48h in anaerobic jar). Yeast and mold have been plated on Sabouraud dextrose agar plate and bacteria on Tryptic soy agar plate.

Strains	% of successful recultivation after staining
A. brasiliensis	75%
B. subtilis	100%
C. albicans	100%
C. acnes (48 enrichment in Red Caps in anaerobic jar)	100%
E. coli	100%
P. aeruginosa	100%
S. aureus	100%

For sterility testing with Red One™, the toxicity of the staining agent is not a concern, as the culture media remains in the canister after sampling a few milliliters for Red One™ analysis. Users can then perform identification using their standard operating procedure in the case of contamination.

### 3. LOB/LOD & LOQ for Quantitative Bioburden applications.

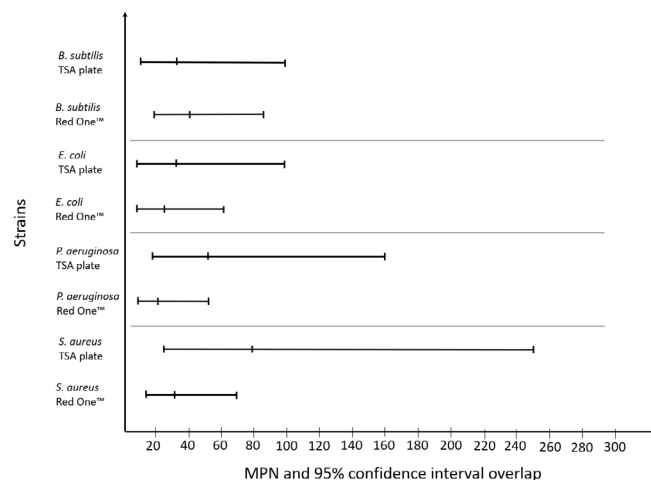
**Table 2:** LOB, LOD and LOQ calculation for BB - bacteria and BB - bacteria & fungi applications using blank measurements

Application	Matrice	Number of tests (n)	Value
BB Bacteria n = 60	Tryptone salt	n = 7	LOB = 2,57 LOD = 4,01 LOQ = 11,47
	Fluid A	n = 19	
	Water for injection	n = 34	
BB Bacteria & Fungi n = 108	Tryptone salt	n = 20	LOB = 2,16 LOD = 3,58 LOQ = 10,94
	NaCl 0.9%	n = 13	
	PBS	n = 22	
	Water for injection	n = 47	
	Fluid A	n = 6	

A cohort of negative sterile samples was used to calculate the LOD and LOQ on Red One™ with so-called “clean matrices”, meaning with a very low background level (<1000 inert particles). Determining LOB, LOD, and LOQ criteria on blank matrices is straightforward, as indicated in Table 2. However, these criteria alone are not sufficient to confirm that a low concentration of the analyte will indeed generate a signal distinguishable from a blank sample with zero concentration.

We then compared the Red One™ bioburden application to the compendial method using a very low inoculum. Multiple microbial contamination levels (50 – 5 – 0.5 – 0.05 CFU) were employed, and the Most Probable Number (MPN) technique was applied to compare the

alternative method with the compendial one. If the confidence levels overlap, and the non-inferiority test is not significant, the methods can be considered equivalent<sup>[10]</sup>.



**Fig 5:** MPN and non-inferiority testing between Red One™ BB - bacteria application and agar plate count. Bacterial strains come from Bioball® 550 CFU (BioMérieux) and ten folds dilution have been applied – 4 dilutions and 5 replicates for each. Numeration on Red One™ have been performed using BB – bacteria application. Agar plate count have been performed using TSA plate (BioMérieux) incubated 24h @ 32.5 °C.

Fig. 5 indicates that, in all cases, the 95% confidence intervals of the compendial method and Red One™ bacteria application overlap. Performing an exact Fisher test on these data does not reveal any statistical difference between the two methods at low inoculum. Based on these tests, the Limit of Detection (LOD) of Red One™ can be considered equivalent to the compendial method.

Nevertheless, after calculating the method's noise on a clean matrix and obtaining a value of 2.07 cells (Table 2), it is clear that Red One™ cannot reliably differentiate inert particles from viable particles at these concentrations. Consequently, for the validation of an alternative method, it is crucial not to depend solely on LOD calculation methods but to meticulously take into account these two parameters.

Therefore, Redberry, adopting a conservative approach to avoid the necessity of confirming these objects via a microscopic analysis, asserts a LOD of 5 viable cells for the BB applications.

### 4. LOB & positivity threshold for Sterility application

For sterility testing, the LOD is mandated to be at 1 CFU according to Ph. Eur. 2.6.1<sup>[3]</sup> and USP <71><sup>[11]</sup>. To achieve such sensitivity, an incubation phase is required to allow the multiplication of the initial microorganism. With the compendial method, a 14-day incubation period is necessary for visually detecting contamination. As the Red One™ system has a much higher sensitivity than visual detection methods, the time-to-result can be reduced as little as 96 hours.

This time-to-result is associated with the determination of LOB calculated from blank samples. It is essential to establish the method's positivity threshold in accordance with the background noise generated by the broth used for the sterility test in order to avoid any false-positive results. False-positive results can be due to either background noise or microbial contamination during sample preparation.

Different on-the-shelf media (TSB, FTM, and FTM clear) were tested to evaluate their respective background noise levels. Six TSB and seven FTM were tested during the study, and the background noise has been assessed on each media using the LOB formula. The main results of this study are summarized in Table 3.

While the composition of the growth media is identical across these products, we observed differences among suppliers that led to variations in background noise resulting in disparities in the LOB. To ensure product positivity with a 95% confidence interval, the positivity

**Table 3:** Assessment of the LOB on 1 mL of on the shelf enrichment media from several suppliers

TSB				FTM				
Supplier	Reference	Nb of tests	LOB	Type of FTM	Supplier	Reference	Nb of tests	LOB
Oxoid	BO0509M	47	17,9	/	Oxoid	BO0510M	33	4,4
VWR	84675.0500	10	0,0	clear	BioMérieux	44021	30	0,1
BioMérieux	44011	37	0,0	/	BioMérieux	TO be tested		
Merck	STBMTSB12	20	2,9	/	Merck	STBMFTM12	5	0,0
				clear	Merck	STBMCTM12	20	0,0

threshold must be set higher than 18 viables cells detected per tested sample as presented in Table 3.

As presented in Table 4, with a positivity threshold set at 25 viable cells detected per tested sample, no significant differences in results were observed between the compendial and the rapid method indicating an absence of false positive results due to background noise. This threshold could be further reduced by excluding media that generates excessive background noise. In this data set, one result was positive with both rapid and compendial methods. Contamination occurred during the preparation of closed devices and was subsequently confirmed, thus explaining this positive result.

**Table 4:** Statistically significant test comparing the results of compendial method versus the rapid method on WFI incubated 96 hours on either TSB at 20-25°C or FTM at 30-35°C in close device.

	Compendial method	Rapid method	p-value Khi-square
Number of negative close devices	59	59	1
Number of positive close devices	1	1	

These tests conducted on blank samples established a suitable interpretation of the results

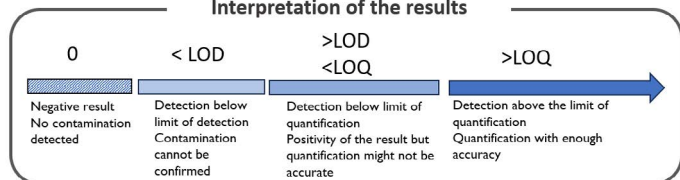


Fig 6: Red One™ bioburden results interpretation with Red One™

### 5. Conclusion

This study showcases the Red One™ automated solid phase cytometry system as a rapid and reliable alternative for bioburden and sterility testing. The system, with its advanced image processing techniques based on staining kinetics, offers quicker results compared to traditional compendial methods (see Table 5).

Key parameters such as limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and limit of blank (LOB) are explored, emphasizing the importance of analytical sensitivity. The system demonstrates equivalence to compendial methods in quantitative bioburden applications, with careful consideration of LOD and LOB parameters. For sterility testing, the study highlights the necessity of establishing a positivity threshold aligned with background noise. Evaluation of on-the-shelf media reveals variations among suppliers, leading to a proposed positivity threshold to minimize false positives and expedite results from 14 days to 4 days.

**Table 5:** Pharmaceutical Quality Control applications developed on Red One™

Red One™ - Rapid Testing Pharmaceutical Applications From 100 µL to 100mL	BB Bacteria	BB Bacteria & Fungi	BB OCFU	Sterility Sample & Analysis
Suitable for	Total Bacterial Flora Enumeration (aerobic - including spores)	Total Aerobic Flora Enumeration (including Yeasts & Molds)	Total Aerobic Flora Presence/Absence (enrichment on the cap)	Total Flora Presence/Absence (Standard Sample preparation)
LOD / LOQ	LOQ = 5 viable cells (per sample)	LOQ = 5 viable cells (per sample)	LOD = 1 CFU (per sample)	LOD = 1 CFU (per sample)
TTR	3 hours	4 hours	24 hours	96 hours

### References

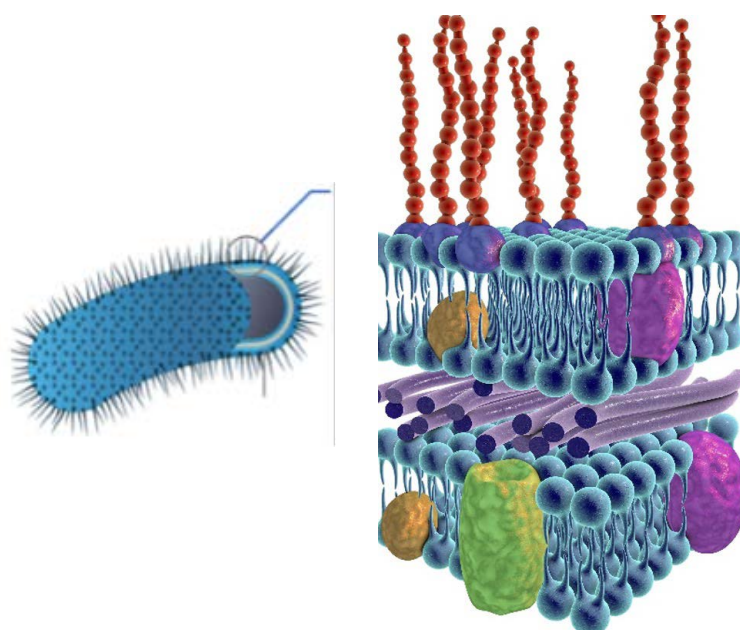
- European Pharmacopoeia Commission, "Chapter 2.6.1. Sterility," in European Pharmacopoeia, 7th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2010
- European Pharmacopoeia Commission, "Chapter 2.6.12. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Tests," in European Pharmacopoeia, 7th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2010
- Smith, R., Von Tress, M., Tubb, C., & Vanhaecke, E. (2010). Evaluation of the ScanRDI® as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeia Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 64, 356-363.
- European Pharmacopoeia Commission, "Chapter 5.1.6. Alternative Methods for Control of Microbiological Quality," in European Pharmacopoeia, 7th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2010
- United States Pharmacopoeial Convention, "Chapter <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods," in The United States Pharmacopoeia and the National Formulary; USP 34-NF 29; United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, 2011
- Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev. 2008 Aug;29 Suppl 1(Suppl 1):S49-52. PMID: 18852857; PMCID: PMC2556583.
- Taleuzzaman, M. (2018). Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ). Organic & Medicinal Chemistry International Journal, 7(5), 127-131
- Shrivastava, A. and Gupta, V. (2011) 'Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods', Chronicles of Young Scientists, 2(1), 21
- Grosselin J, Palazuelo M, Girard V, Monnin V, Saccomani MC, Wittemberg V, Montero-Julian F. Easy post-scan growth method provides combination of rapid industry relevant microorganisms quantification and identification with ScanRDI and VITEK® MS (poster). 2015 PDA Pharmaceutical Microbiology Conference. Washington DC.
- PDA Technical Report No. 33. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Methods; Parenteral Drug Association, Inc.: Rockville, MD, 2000.



# The Myth of Testing Colored Samples: Debunked.

By Veronika WILLS, MSc. Associate Director, Global Technical Services, ACCI

Bacterial endotoxins can be nasty little pests! As non-infectious particles found within the cell walls of every Gram-negative bacteria, endotoxins can induce immune responses leading to fever, inflammation, septic shock, and even death in severe cases.



## 1. Know Your Enemy: An In-depth Look at Bacterial Endotoxins

Contamination of pharmaceutical and healthcare products with endotoxins, therefore, poses serious risks. Rigorous in-house programs for endotoxin testing are imperative to ensure the safety and quality of pharmaceutical products and medical devices. As such, BET is a regulatory requirement and a critical step in safeguarding public health.

## 2. Color Me Curious: The Science Behind Chromogenic Testing, BET

Have you ever wondered how kinetic chromogenic testing works? Next, we'll walk you through the science behind this pharmacopeial technique, exploring how chromogenic tests measure the color change in a reaction to determine the presence of bacterial endotoxins.

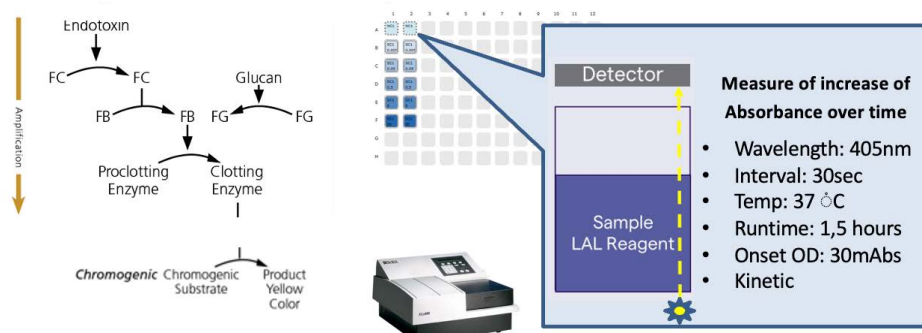


Fig. 2 Depiction of the LAL cascade mechanism and the method principle of a kinetic chromogenic test. ....

The magic of chromogenic testing lies in its simplicity, linearity and accuracy. In addition to the LAL enzymes of the cascade mechanism (Factor C, Factor B and Proclotting enzyme), this test uses a chromogenic substrate.

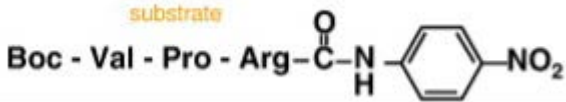


Fig. 3 Example of Chromogenic substrate used in ACC chromogenic reagents

The chromogenic substrate, which is colorless initially, is known to react with an activated Clotting Enzyme – as a result of Factor C activation by endotoxin. As Clotting enzyme cleaves the Arginine – CO bond in the chromogenic substrate, it releases a chromophore called para-nitroaniline (pNA) - a particle that absorbs light (with the absorption maxima close to the visible wavelength of 405nm) - and causes a change in color to yellow (as visible to the naked eye). The resulting color change is then measured using an absorbance spectrophotometer. It was documented in the past that the intensity of the developing color is proportional to the amount of endotoxin present in the sample, allowing for a quantitative analysis of endotoxin in the sample.

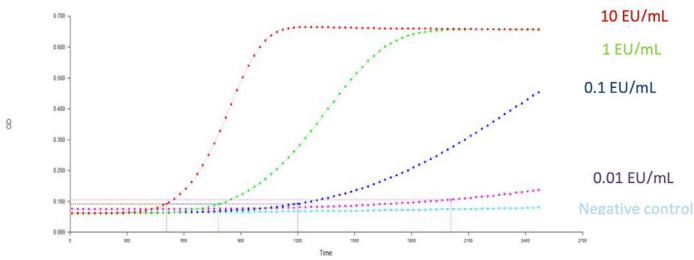


Fig. 4 A typical diagram of the developing absorbance as measured at 405nm as dependent on endotoxin concentration.

It's a blend of biology and colorimetry that delivers rapid, accurate results, that made the chromogenic testing a game-changer in the field of bacterial endotoxin testing already back in 1990s.

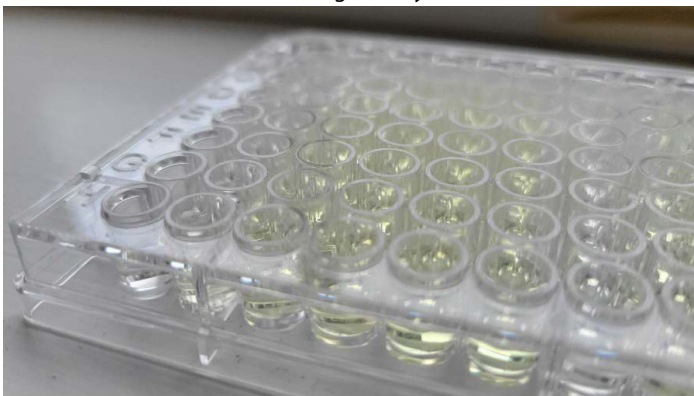


Fig. 5 A typical microplate showing the developed color at the end of a kinetic chromogenic test.

### 3. How the Recombinant Chromogenic Test Further Improves the Output

The recombinant chromogenic test takes the advantages of the chromogenic test to the next level. How? Thanks to several groundbreaking features:

- First and foremost, recombinant cascade reagent (rCR) PyroSmart NextGen® employs recombinant Factor C, Factor B and

Proclotting enzyme, genetically cloned from *Limulus polyphemus* and expressed preparations of the cascade enzymes, thereby eliminating the need for animal-derived components and making the test eco-friendly. (Fig6)

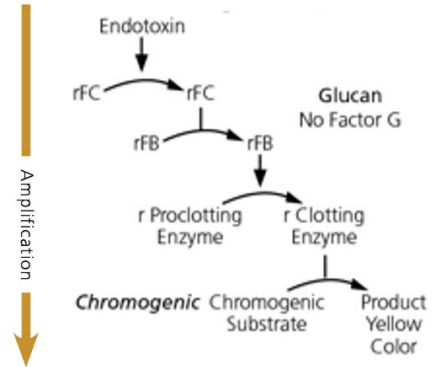


Fig. 6 Mechanism of action of the recombinant cascade reagent

- Furthermore, it is free of Factor G, a native component of the animal-derived LAL reagent, that is documented to cause co-sensitivity to 1,3-β-glucans (common contaminants) thus reducing the risk of Out of Specification results. (Fig7)

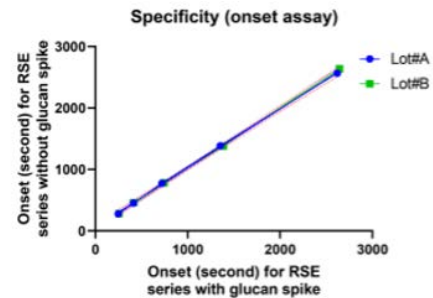


Fig. 7 Linear regression of Onset Times (in seconds) for two RSE standard series with and without 1,3-β-glucan spike

- Perhaps most importantly, it has a documented lot-to-lot reproducibility of results which is a building stone towards standardization and modernization within the quality control laboratories (including automation of liquid handling).

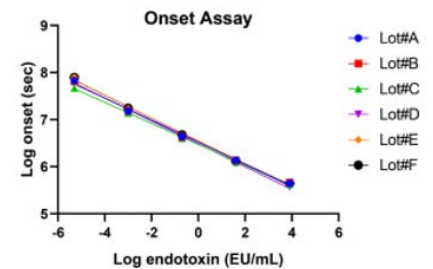


Fig. 8 RSE standard curve series using six different lots of PyroSmart NextGen® demonstrating strong lot to lot reproducibility.

At ACC, PyroSmart NextGen® is manufactured with consistent quality and performance under the same cGMP conditions in the same ISO 14385-certified facility as our FDA-licensed LAL reagent. This guarantees reliable and repeatable results, making rCR a robust and sustainable solution for endotoxin testing.

### 4. Debunking The Myth: The Data Behind Testing Colored Samples

There's a common misconception that chromogenic testing struggles when it comes to colored samples. Here, we'll set the record straight, showcasing the data that proves chromogenic testing, including the recombinant chromogenic assay, works efficiently and accurately on colored samples following a well-executed method suitability.

Per USP <85> and <1085> , method suitability testing is to be done on all samples prior to routine testing<sup>(1,2)</sup>. This allows for appropriate method development and it typically includes testing the sample in a series of dilutions (not exceeding the Maximum Valid Dilution) and evaluating the assay setup (reagent type, method type and instrumentation) for compatibility with the sample.

**Fun fact #1:** Most pharmaceutical sample types interfere with the BET.

**Fun fact #2:** A vast majority of sample interferences are overcome by simple dilution in water for BET (such as LAL Reagent Water (LRW)).

Colored samples are no different. Often in addition to the inherent color, they are likely to consist of components that interfere with the test. Based on our experience, dilution in LRW is highly likely to resolve both concerns – the optical and chemical interference - in one simple step.

In addition to dilution, there is another invaluable tool: instrumentation and software. The advent of advanced spectrophotometric methods has significantly alleviated the concern with testing colored samples. Baseline setting and zeroing play a pivotal role in this process. For example, in Pyros Kinetix Flex tube reader, where each well is individually timed and evaluated, it involves recording the initial absorbance of the sample. This is essentially measuring the absorbance by the inherent color of the sample before any reaction takes place. This baseline reading is then used as a reference point for all subsequent 10 second measurements, allowing the true color intensity increase to be accurately captured, irrespective of the color of the sample itself. Pyros Kinetix Flex is powered by Pyros eXpress software which has built-in specifications for the raw data retrieved by each well. A sample with an intense color absorbing at 405nm will yield low transmittance values during the initial zeroing period and thus will be flagged in the software as being out of range, alarming the operator to take further action.

### 5. Case Studies: Real-World Applications of Chromogenic Methods for Colored Samples Testing

So how does this all work together? Let's examine comparability testing of MIC injection - a vitamin mix injection consisting of the primary compounds (methionine, inositol, choline) in addition to other components, e.g. Vitamin B12. Depending on the concentration of the components, the final preparation may look like this:

- Dilution series in LRW (MVD = 14,000)

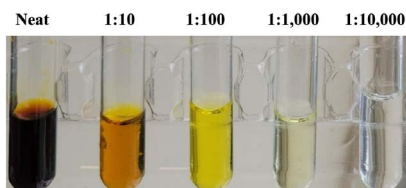


Fig. 9 Dilution series of MIC injection

- Addition of the BET reagent yields an additional dilution of the colored background
- Testing the MIC injection using the **kinetic turbidimetric assay (KTA)**: Data collection plots for Positive control and Positive Product Controls for all dilutions tested (nominal value of 0.5 EU/mL)

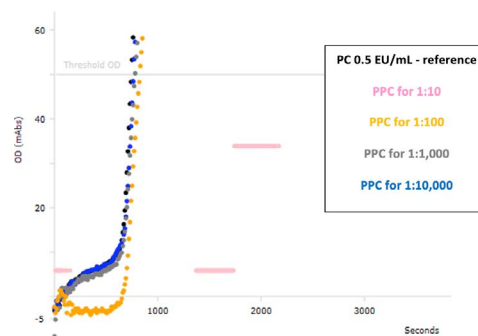


Fig. 10 Data collection plots obtained for the range of MIC injection dilutions spiked with 0.5 EU/mL when tested by kinetic turbidimetric test in Pyros Kinetix® Flex tube reader

#### Interpretation

- Neat – not tested. The concentrated MIC injection is off deep yellow color which absorbs non-specifically a full visible light spectrum
- PPC for 1:10 – the inherent color is still too deep for the turbidimetric test, still absorbing the passing light non-specifically, Pyros eXpress notifies the user 60 seconds into the test that the transmittance specification was not met.
- PPC for 1:100 – there is a residual optical interference between 0 to 600 seconds, which is then overcome by the increasing change in turbidity, related to the endotoxin reaction
- PPC for 1:1,000 – no optical interference
- PPC for 1:10,000 – no optical interference

Testing the MIC injection using the **kinetic chromogenic assay (KCA)**: Data collection plots for Positive control and Positive Product Controls for all dilutions tested (nominal value of 0.5 EU/mL):

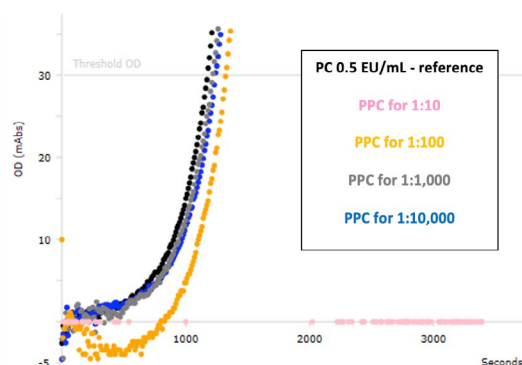


Fig. 11 Data collection plots obtained for the range of MIC injection dilutions spiked with 0.5 EU/mL when tested by kinetic chromogenic test in Pyros Kinetix® Flex tube reader

**Interpretation**

- Neat – not tested. The concentrated MIC injection is off deep yellow color which absorbs non-specifically a full visible light spectrum
- PPC for 1:10 – the inherent color is still too deep for the turbidimetric test, still absorbing the passing light non-specifically, Pyros eXpress notifies the user 60 seconds into the test that the transmittance specification was not met
- PPC for 1:100 – there is a residual optical interference between 0 to 800 seconds, which is then overcome by the increasing change in turbidity, related to the endotoxin reaction
- PPC for 1:1,000 – no optical interference
- PPC for 1:10,000 – no optical interference

**6. Expert Opinions: Quality Control Technicians Weigh In**

Don't just take our word for it! Ask around! Leading pharma QC scientists and managers successfully validated kinetic chromogenic testing for colored samples. In some cases, they choose to go directly to the chromogenic technique, taking advantage of the wide dynamic range of the test, some started with the turbidimetric technique and then transitioned to the chromogenic one. Others, especially when implementing in-house testing for new products, go directly to the use of the recombinant chromogenic tests for colored samples. Apart from analytical performance, the photometric techniques comply with the 3R principles (Reduce, Replace, Recycle) in reducing the amount of the raw animal-derived material in the reagent with the recombinant reagent completely eliminating it:

**7. All About Dilution: A Key to Unlocking Accurate Results**

In closing, proper dilution techniques are instrumental in facilitating accurate results with colored samples (as with colorless ones), thus dismantling the misconception around chromogenic testing's capabilities. Understanding the components of the reaction and using the right instrumentation/software platforms with built-in features to report samples not meeting specifications allow the user to identify any issues shortly into the assay. With the appropriate method development, the chromogenic technique can be used for testing of colored samples with equivalent results to the turbidimetric technique. The recombinant chromogenic method confirmed the validity of the results even at a lower dilution and has been proven suitable for colored samples as well. In the light of expert opinions, empirical data and the ethical commitment to animal welfare, it is evident that the recombinant chromogenic test is a robust, sustainable and reliable approach for endotoxin testing, regardless of sample color<sup>(3,4,5,6,7)</sup>. Embracing state-of-the-art methods signifies a leap forward in pharmaceutical quality control towards standardization and modernization of the procedures, while ensuring the safety and efficacy of medical products.

**Table 1:** Summary evaluation of the photometric data

	Dilutions	Mean EU/mL	PPC Recovery %	PPC CV%
KTA	1:10	Invalid	< 1%	Invalid
	1:100	< 0.5	82%	1.58
	1:1,000	<5	109%	0.39
	1:10,000	<50	109%	0.21
KCA	1:10	Invalid	< 1%	Invalid
	1:100	< 0.5	55%	0.61
	1:1,000	<5	85%	1.83
	1:10,000	<50	78%	1.42
rCR	1:500	< 2.5	90%	0.45

In conclusion: the magnitude of optical interference observed on the turbidimetric test vs. chromogenic test was identical. Residual interference was observed at 1:100 dilution when testing by both methods. 1:1,000 dilution was free of both optical and chemical interference when testing by both LAL methods and thus could be chosen for further testing and validation. Additional testing was done with PyroSmart NextGen® where MIC injection was diluted 1:500 and that was sufficient enough to overcome the optical interference.

**References**

1. Bacterial Endotoxins Test <85>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
2. Guidelines for Bacterial Endotoxins Test <1085>, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Shapovalova O V et. al. New direction in the determination of bacterial endotoxins: Analysis using recombinant Factor C. Pharmaceutical chemistry journal, 56, 1133-1139, 2022.
4. Stevens I et. al. Advanced Recombinant Cascade Reagent PyroSmart NextGen® for Bacterial Endotoxins Test as Described in the Pharmacopeias BPB, Vol.5, No. 5 105-114 (2022)
5. Kelley M et. al. Evaluation of Recombinant Cascade Reagent PyroSmart NextGen® and Limulus Amebocyte Lysate Equivalency in a Plate and Tube Reader for Bacterial Endotoxins Testing, BPB, Vol.6, No. 1 11-15 (2023).
6. Kelley M et al. A Demonstration of the Validation Process for Alternative Endotoxin Testing Methods Using PyroSmart NextGen® Recombinant Cascade Reagent, BPB, Vol.6, No. 2 68-75 (2023).
7. Kikuchi Y et al. Collaborative study of bacterial endotoxins test using recombinant Factor C-based procedure for detection of lipopolysaccharides (Part 3). Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science, 54 (4), 341-351 (2023).



# Conception de modèles galéniques intelligents (stimuli-sensitifs) pour la formulation de molécules actives.

Par Camille MATHIEU - Laboratoire PIMM et EBI, Emmanuel RICHAUD - Laboratoire PIMM & Samar ISSA - EBI

Parmi les différents systèmes de libération prolongée des principes actifs (API) (Active Pharmaceutical Ingredient), les polymères stimuli-sensitifs, dits matériaux "intelligents", ont gagné un intérêt en développement galénique compte-tenu du changement de la configuration du réseau polymère selon le paramètre de choix de son environnement (pH, température, oxydoréduction, polarité...).

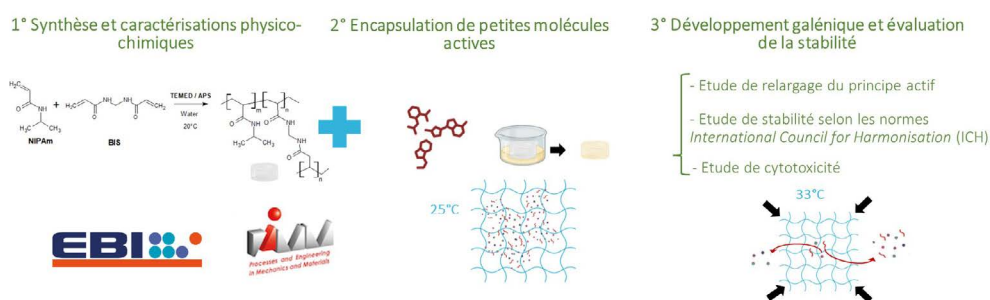


Fig. 1. Méthodologie globale d'étude du pouvoir d'encapsulation et de libération du support.

Cet article décrit la méthodologie de développement de formulation prolongée à base de Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM), un polymère biocompatible, thermosensible, aux propriétés uniques et versatiles et les caractéristiques physico-chimiques du vieillissement, ainsi que sa capacité d'encapsulation d'API.

Avec l'augmentation de la prévalence des maladies chroniques, la croissance du marché des produits biologiques, l'augmentation des investissements en R&D qui se divisent les avancées technologiques accompagnées de lancement de nouveaux produits, la prévision du taux de croissance annuel moyen du marché mondial de l'administration de médicaments serait de 5,9 %<sup>[1]</sup>. Plusieurs approches en matière d'administration de médicaments par le biais de modifications (du médicament, de son environnement et des systèmes d'administration) ont été développées afin d'améliorer l'efficacité et la libération d'API tout en minimisant son accumulation hors cible<sup>[2]</sup>. Parmi les différents systèmes de délivrance de médicament (Drug Delivery Systems, DDS), plusieurs familles de polymères ont été décrites<sup>[3]</sup> se divisant en deux familles : les polymères naturels et synthétiques (Fig. 2) dont les polymères biodégradables et bio absorbables tels que l'acide poly-lactiques (polylactic acid, PLA) et l'acide poly-lactique-co-glycolique (poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA).

En tenant compte des **5 différentes générations d'API**, des formulations utilisant des polymères sont décrites :

- 1) petites molécules (< 900 daltons) : Naloxegol (Movantik®), naloxone PEGylée ,
- 2) protéines & peptides : Pegademase bovine (Adagen®), protéine PEGylée,
- 3) anticorps : Certolizumab pegol (Cimzia®),
- 4) acides nucléiques : Givosiran (Givlaari®), un conjugué N-acetylgalactosamine-siRNA, (GalNAc-siRNA),
- 5) thérapie cellulaire : les CAR-T cells, (Chimeric Antigen receptor (CAR) inserted into the T cells, hydrogels à base de Gelatin Methacryloyl (GelMA) récemment développés depuis la commercialisation du Tisagenlecleucel (Kymriah®)<sup>[4]</sup>.

→

Systèmes de Délivrance de Médicament - Polymeric Drug Delivery Systems (DDS)	
Polymères Naturels	Polymères synthétiques
Dérivés de la L-Arginine Dérivés du Chitosan Dérivés de la Cyclodextrine Acides Poly(glycoliques), poly (lactiques). Acide Hyaluronique Polysaccharides — Amylose	Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (Poly(HEMA)) Poly(N-isopropyl acrylamide)s (PNIPAAm) Poly(éthylèneimine)s (PEI) Polymères Dendritiques  Polymères biodégradables and bio-absorbables <ul style="list-style-type: none"> <li>— Poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA</li> <li>— Poly(lactic acid) PLA</li> <li>— Poly(glycolic acid) PGA</li> <li>— Poly(ortho esters) (POE)</li> <li>— Poly(anhydrides)</li> <li>— Poly(amides)</li> <li>— Poly(ester amides)</li> <li>— Poly(phosphoesters)</li> <li>— Poly(alkyl cyanoacrylates) PACA</li> </ul>

Fig. 2. Présentation des différents polymères décrits dans les DDS (adapté de Sung & Kim 2020<sup>[3]</sup>)

Le (PNIPAm) est un polymère modèle pour ses propriétés thermosensibles en tant que polymère intelligent "smart polymer". Il possède des propriétés tout à fait uniques en solution aqueuse et ces dernières sont représentées par son diagramme de phase et sa Lower Critical Solution Temperature (LCST) décrite depuis 1968 par Heskings et Guillet<sup>[5]</sup> (Fig. 3). Au-dessus de cette température critique, les chaînes polymériques du PNIPAm transitionnent d'un état de pelote vers une configuration plus hydrophobe. Ceci entraîne la rétraction des chaînes polymériques sous forme de globule et deux phases apparaissent<sup>[6,7]</sup>. Cette propriété est d'autant plus intéressante puisqu'elle est/compte tenu qu'elle soit proche de celle du corps humain (LCST = 32°C)<sup>[8]</sup>.

Les travaux présentés dans cet article montrent la première phase du projet de thèse, en co-direction entre deux laboratoires à l'EBI et l'ENSAM, qui consiste à étudier le comportement thermosensible d'un polymère modèle, le PNIPAm de forme linéaire. De plus, pour vérifier la stabilité de ce matériau dans le temps, des vieillissements thermo-oxydantifs accélérés ont été réalisés. Puis dans un second temps, un gel de PNIPAm est synthétisé, par voie radicalaire, et sa capacité à encapsuler un API est étudiée complétée par les caractérisations physico-chimiques.

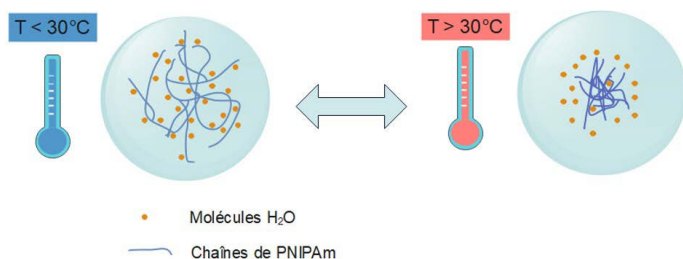


Fig. 3. Présentation de la transition de phase du PNIPAm

## 1. Matériels et Méthodes

### 1.1 Matériaux

#### PNIPAm Linéaire

Le modèle de polymère linéaire utilisé dans cette étude est un Poly(N-isopropylacrylamide) (CAS : 25189-55-3, Sigma-Aldrich) ayant une masse molaire (donnée fournisseur) en nombre Mn = 40 000 g.mol<sup>-1</sup>.

#### Synthèse de l'hydrogel de PNIPAm

La synthèse de l'hydrogel de PNIPAm a été adaptée selon le protocole décrit par Lapointe<sup>[9]</sup>. Le monomère, N-isopropylacrylamide (NIPAm) (CAS : 2210-25-5, Thermo Scientific) est recyclé dans de l'éther diéthylique (CAS : 60-29-7, VWR Chemicals). Puis une polymérisation radicalaire en milieu aqueux est effectuée. Pour résumer, 0,8 g de NIPAm, le monomère, 0,012 g de N, N'-méthylènebisacrylamide (BIS), l'agent réticulant (CAS : 110-26-9, Sigma-Aldrich) et 0,0085 g de tétraméthyléthylènediamine (TEMED), jouant le rôle d'agent réducteur, accélérateur de la réaction rédox, (CAS : 110<sup>-1</sup>8-9, VWR Chemicals) sont

homogénéisés dans 10 mL d'eau déionisée (EDI). Ensuite, 340 µL d'une solution de persulfate d'ammonium (APS) (CAS : 7727-54-0, ACROS ORGANICS) (10% wt) est ajouté pour initier la réaction rédox<sup>[9]</sup>. Les solutions sont initialement mises sous flux d'azote pendant 1 heure et la synthèse est scellée pendant 24 heures à température ambiante (20°C). À la suite de la synthèse, un nettoyage de 7 jours en immersion dans de l'EDI est effectué.

### 2.2 Caractérisation de la stabilité du polymère

Pour étudier le comportement thermosensible du PNIPAm linéaire et sa stabilité, une méthode reposant sur des mesures par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis) est appliquée. La démarche consiste à resolubiliser le polymère dans de l'EDI, avant et après vieillissement à 120°C (en étuve ventilée), à 1 % de concentration spécifique et 10 % en poids. Puis, chaque échantillon est analysé par UV-Vis à une longueur d'onde de 651 nm avec une rampe de chauffe de 0,3 °C.min<sup>-1</sup> entre 20°C et 40°C pour caractériser la température de transition de phase.

Pour étudier la stabilité chimique des fonctions chimiques du polymère au cours du vieillissement thermique, une analyse par spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) par réflectance Totale Atténuée (ATR) est réalisée en mode transmission. L'analyse par IRTF est effectuée entre les nombres d'onde allant de 650 à 4000 cm<sup>-1</sup>, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>, et un total de 32 enregistrements.

Pour étudier les variations de masses molaires au cours du vieillissement thermique, des analyses par chromatographie à perméation de gel (GPC) sont effectuées. Les colonnes de séparation utilisées T3000 et T6000 permettent d'analyser une gamme de 10 000 à 20 000 000 g.mol<sup>-1</sup> et utilisant le tétrahydrofurane (THF) comme phase mobile. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de 5 échantillons standards de poly (méthyl méthacrylate) (PMMA) (Mw = 4,7.103 -137,0.103 g.mol<sup>-1</sup>). Les poudres de polymère (2,0 mg.mL<sup>-1</sup>) sont analysées à 35°C avec un débit de la phase mobile de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Caractérisation de la synthèse d'hydrogel et de la capacité r d'adsorption et de désorption

Afin de vérifier la conformité du polymère synthétisé, une des caractérisations consiste en une analyse par spectroscopie infrarouge (IRTF-ATR).

Pour étudier la capacité du gel de PNIPAm à encapsuler l'API, le protocole suivant a été mis en place : Des solutions aqueuses de métronidazole (MTZ), à différentes concentrations (0,01, 0,5 et 2 mg.mL<sup>-1</sup>) sont préparées. Puis 0,04 g de gel séché est déposé dans 20 mL de la solution à 20°C (réalisé en triplicata). L'absorbance est suivie en mesurant  $\lambda_{\text{max}} = 317 \text{ nm}$  du MTZ dans l'EDI par Spectroscopie UV-Vis pour différents intervalles de temps (30min, 1h, 2h, 3h, 5h et 24h).

Une courbe d'étalonnage est préalablement constituée à partir de solutions de MTZ de concentration allant de 2 µg.mL<sup>-1</sup> à 10 µg.mL<sup>-1</sup>. La saturation de la mesure UV apparaît pour 25 µg.mL<sup>-1</sup>. Ainsi, pour réaliser le suivi de l'encapsulation, il est nécessaire de se positionner en dessous de cette concentration.

Le calcul de la quantité de MTZ adsorbé par masse de PNIPAm est obtenu selon l'équation (1).

→

$$Q_t = \frac{C_0 - C_t}{m} \times V \quad (1)$$

Avec  $C_0$  (mg. mL<sup>-1</sup>) la concentration initiale,  $C_t$  (mg. mL<sup>-1</sup>) la concentration à l'instant  $t$ ,  $m$  la masse du support (g) et  $V$  le volume de solution (mL).

Le calcul du pourcentage de MTZ adsorbé est obtenu selon l'équation<sup>(2)</sup>

$$\% \text{ de MTZ adsorbé} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

## 2. Résultats

### 2.1 Propriétés thermosensibles et stabilité du support polymérique

Le PNIPAm linéaire étudié possède un diagramme de phase représenté par les carrés (Fig. 4a). En dessous des températures de turbidités ( $T_c$ ), les solutions de PNIPAm sont homogènes et une phase unique est observée. Les fonctions amides, présentes sur la chaîne latérale, sont liées par des liaisons hydrogène à l'eau, le polymère est totalement soluble. Lorsque la température est augmentée au-delà de la  $T_c$ , la rupture des liaisons hydrogène provoque un réarrangement des chaînes du polymère : une rétractation s'observe sous forme de globule et ensuite une démixtion de phase (Fig. 3). Le critère de démixtion correspond ici à une perte de 50 % de transmittance. Pour des solutions très faiblement concentrées en PNIPAm, les  $T_c$  sont élevées. Ces dernières diminuent cependant très rapidement lorsque la teneur en PNIPAm augmente, jusqu'à atteindre un plateau autour 25°C correspondant à la LCST à 50 % en poids de PNIPAm<sup>[8]</sup>.

A la suite du vieillissement thermique du PNIPAm linéaire, il est observé une augmentation de la  $T_c$  pour une même concentration. Par exemple, pour une solution à 10 % en poids, un écart de 2,8°C est relevé après 90 jours de vieillissement à une température de 120°C (Fig. 4b). Plus le vieillissement est sévère, que ce soit en termes de température ou bien de durée, plus l'écart de  $T_c$  est significatif. Une telle variation provient très certainement d'une modification au niveau des chaînes polymériques qui interagissent avec l'eau différemment une fois le vieillissement thermique effectué. Des caractérisations structurales sont ainsi effectuées afin de mieux comprendre l'origine de cette modification de comportement.

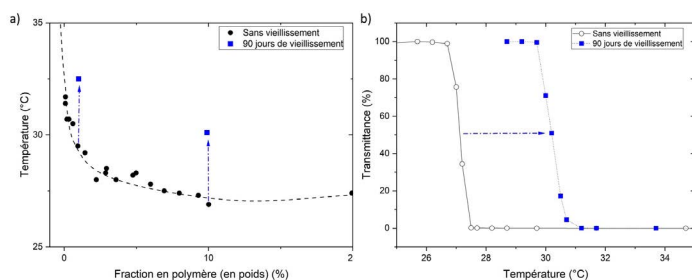


Fig. 4. a) Diagramme de phase; b) Courbes de turbidités à 10 % en poids.

Le spectre infrarouge typique du PNIPAm est décrit dans la Fig. 5a. La bande à 3289 cm<sup>-1</sup> correspond aux liaisons -OH. Les bandes à 2973, 2928 et 2872 cm<sup>-1</sup> correspondent aux liaisons -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub> et -CH<sub>2</sub> du groupement isopropyle ainsi que les bandes à 1460 et 1386 cm<sup>-1</sup>. Le groupement amide correspond aux bandes à 1633 cm<sup>-1</sup> de la liaison -C=O amide I et à 1537 cm<sup>-1</sup> de la liaison -C=O amide II.

Pour finir, la bande à 1367 cm<sup>-1</sup> est propre à la chaîne primaire du squelette carboné du PNIPAm. Après un vieillissement thermique de 90 jours à 120°C, aucune modification chimique n'est observée sur le spectre. Ces résultats indiqueraient que la structure chimique du polymère reste stable et ne serait pas responsable de l'augmentation des  $T_c$ .

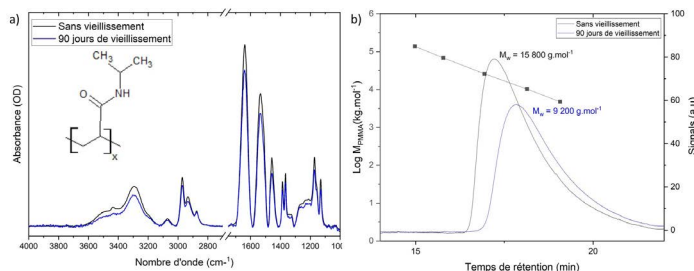


Fig. 5. a) Comparaison des spectres infrarouges avant et après un vieillissement à 120°C; b) Pics de rétention avant et après un vieillissement à 120°C

L'analyse par GPC (Fig. 5b) permet d'estimer la masse molaire du polymère vieilli. Après vieillissement thermique, un pic de rétention du polymère se trouve légèrement déplacé vers un temps de rétention plus long. Ceci démontre que la taille des chaînes du polymère deviennent plus courtes, à la suite du vieillissement thermique. Ce raccourcissement peut s'expliquer par des phénomènes de coupure de chaîne sous l'effet d'un vieillissement thermo-oxydatif. La taille des chaînes polymériques du PNIPAm impacte fortement les  $T_c$  tels que décrits par Furryk et al.<sup>[7]</sup>. Plus les masses molaires du PNIPAm sont courtes, plus les  $T_c$  sont élevées, ceci concorde avec les résultats obtenus.

### 2.2 Caractérisation initiale des gels polymériques

À la suite de la polymérisation et au lavage, un séchage sous étuve à 40°C est réalisé et la conformité de l'hydrogel est analysée (Fig. 6). Le spectre IR du gel synthétisé présente exactement la même structure que le PNIPAm linéaire commercial. Les liaisons correspondantes aux groupements amides, isopropyle et la chaîne carbonée sont bien présentes.

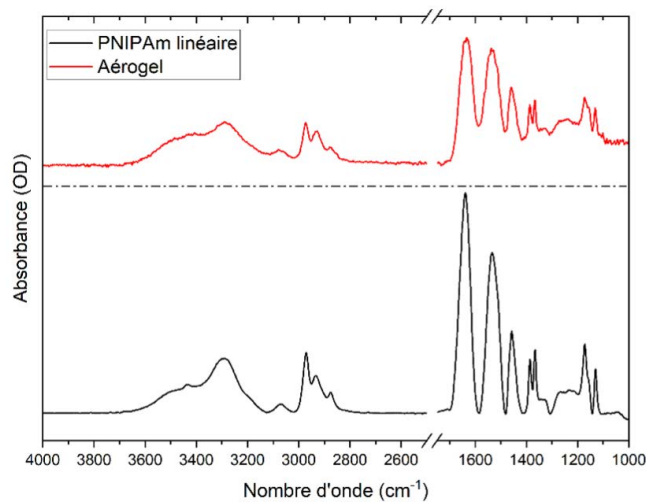


Fig. 6. Spectre Infrarouge du PNIPAm synthétisé vs. PNIPAm linéaire

### 3. Étude d'adsorption/désorption du MTZ

Après séchage, des aérogels sont obtenus et l'adsorption de MTZ a pu être effectuée par mise en contact du support avec une solution de MTZ. Une adsorption maximale de 40 % avec 468 mg.g<sup>-1</sup> de MTZ/g de gel sec est obtenue pour une concentration initiale de 2 mg. mL<sup>-1</sup> et un temps de contact de 3 heures.

Après traitement des résultats plusieurs phénomènes peuvent être relevés. Tout d'abord, plus la concentration initiale en MTZ est importante plus la quantité adsorbée par le support est forte. La seconde observation est que l'état d'équilibre est atteint après 24 heures n'offre pas l'adsorption la plus optimale qui retourne à 0 %. Après 3 heures de mise en contact une désorption en MTZ apparaît.

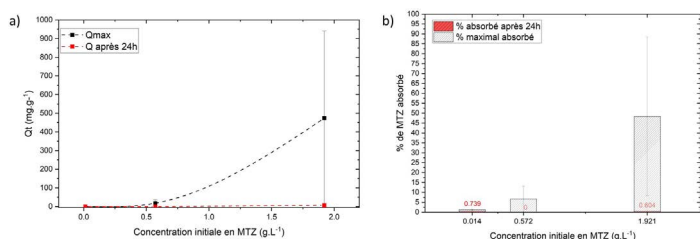


Fig. 7. Analyse de l'adsorption du MTZ encapsulé dans du PNIPAm linéaire

La phase de désorption est aussi relevée pour d'autres molécules actives et apparait entre 1 et 3 heures de mise en contact. Les interactions entre l'EDI et le gel, plutôt hydrophile, sont très favorables, au détriment des interactions API-support, d'où l'importance du choix du solvant lors de l'adsorption. Le solvant le plus adéquat pour le couple API-PNIPAm est sélectionné. Par ailleurs, d'autres observations ont été réalisées en fonction du nombre de groupements donneurs d'H de l'API, de son logP et son poids moléculaire.

Enfin, les évaluations en termes de stabilité et toxicité seront effectuées selon le guide International Conference on Harmonisation (ICH) Q8 (R2)<sup>[10]</sup>.

### 3. Conclusion

La stabilité thermo-chimique du PNIPAm a été étudiée. Le vieillissement thermo-oxydatif accéléré effectué ne provoque aucune modification chimique et impose un mécanisme assez lent de coupure de chaîne. La conséquence principale est une légère modification du comportement thermosensible. Ce polymère est donc stable chimiquement pour être appliqué dans la formulation pharmaceutique. Par ailleurs, l'adsorption est réalisée sur un réseau de PNIPAm sous forme d'hydrogel, ou forme réticulée qui est encore plus stable que le modèle linéaire. Par conséquent, ces résultats confirment que la propriété thermosensible sera maintenue stable 12 mois à minima à 120°C et ainsi d'une durée plus importante à température ambiante, selon les conditions de formulation et de stockage du matériau. Une mise en contact avec un antibiotique, le MTZ, a été effectuée et celui-ci intègre facilement le réseau de PNIPAm mais ne s'y lie pas, les molécules d'eau possédant une plus grande affinité avec le gel de PNIPAm. Il est donc projeté par la suite d'étudier des protéines qui sont capables de s'intégrer davantage dans le réseau en phase avec le développement de médicaments issus de la biotechnologie.

Les propriétés d'adsorption, désorption et modélisation seront poursuivies dans le cadre du projet de thèse : <https://www.theses.fr/s353389>

\*Camille Mathieu est lauréate du prix de financement de sa thèse à 50% par le concours de l'Ecole Doctorale ED432 <https://edsmi.hesam.eu/et> à 50% par le Fonds Social de l'EBI <https://www.helloasso.com/associations/ecole-de-biologie-industrielle/collectes/lancement-de-la-fondation-ebi>

### Références

1. Pharmaceutical Drug Delivery Market by Route of Administration (Oral, Injectors, Implantable, Syrups, Gels, Pulmonary, Solutions, Tablets, Syringes), Application (Cancer, Diabetes), Facility of Use (Hospitals), COVID-19 Impact - Forecast to 2026; MarketsandMarkets, 2021.
2. Vargason, A. M., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). The evolution of commercial drug delivery technologies. *Nature biomedical engineering*, 5(9), 951-967.
3. Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*, 24(1), 1-12.
4. Zhou, W., Lei, S., Liu, M., Li, D., Huang, Y., Hu, X., Yang, J., Li, J., Fu, M., Zhang, M., Wang, F., Li, J., Men, K. & Wang, W. (2022). Injectable and photocurable CAR-T cell formulation enhances the anti-tumor activity to melanoma in mice. *Biomaterials*, 291, 121872.
5. Heskins, M., & Guillet, J. E. (1968). Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, 2(8), 1441-1455.
6. Tamai, Y., Tanaka, H., & Nakanishi, K. (1996). Molecular dynamics study of polymer-water interaction in hydrogels. 2. Hydrogen-bond dynamics. *Macromolecules*, 29(21), 6761-6769.
7. Furryk, S., Zhang, Y., Ortiz-Acosta, D., Cremer, P. S., & Bergbreiter, D. E. (2006). Effects of end group polarity and molecular weight on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44(4), 1492-1501.
8. Halperin, A., Kröger, M., & Winnik, F. M. (2015). Poly(N-isopropylacrylamide) Phase Diagrams: Fifty Years of Research. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(51), 15342-15367.
9. Lapointe, J. (2012). Fabrication et caractérisation d'hydrogels thermosensibles pour des applications de livraison ciblée de médicament et d'embolisation. Ecole polytechnique de Montréal.
10. International Conference on Harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (Pharmaceutical development Q8 (R2) [https://database.ich.org/sites/default/files/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf)

### Glossaire & Abréviations

API	Active Pharmaceutical Ingredient
APS	Ammonium Persulfate
ATR	Attenuated Total Reflectance
BIS	N, N' - méthylènebisacrylamide
CAR-T cells	Chimeric Antigen receptor (CAR) inserted into the T cells
DDS	Drug Delivery Systems
EDI	Eau Déionisée
GPC	Gel Permeation Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IRTF	InfraRouge à Transformée de Fourier
LCST	Lower Critical Solution Temperature
MTZ	Métronidazole
NIPAm	N-isopropylacrylamide
PLA	PolyLactic Acid
PLGA	Poly-Lactic-co-Glycolic Acid
PMMA	Poly (MéthylMéthAcrylate)
PNIPAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
Tc	Température critique de transition de phase
TEMED	N, N, N', N'-TétraMéthylEthylèneDiamine
THF	TétraHydroFurane
UV-Vis	Spectroscopie Ultraviolet-Visible



# VOTRE PARTENAIRE SPECIALISE DANS LA MAITRISE DE LA CONTAMINATION



**Fonderephar rejoint ACM Pharma  
afin de poursuivre son développement et  
renforcer notre pôle R&D**

Une offre complète de services adaptée à chaque secteur :

- Analyse microbiologique
- Identification microbienne
- Essai de stérilité
- Essai d'efficacité antimicrobienne
- Challenge test
- Développement, validation et applicabilité de méthodes
- **Biocides et virucidie**
- **Cytotoxicité cellulaire**
- Endotoxines bactériennes
- Microbiologie et chimie des eaux
- Tests biologiques et biologie moléculaire
- Méthodes rapides et alternatives
- Validation des procédés de nettoyage
- Monitoring environnemental
- **Adhésion microbienne/cellules eucaryotes**
- **Biofilm**



**NOTRE  
VISION**

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



**NOS  
MISSIONS**

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



**NOS  
VALEURS**

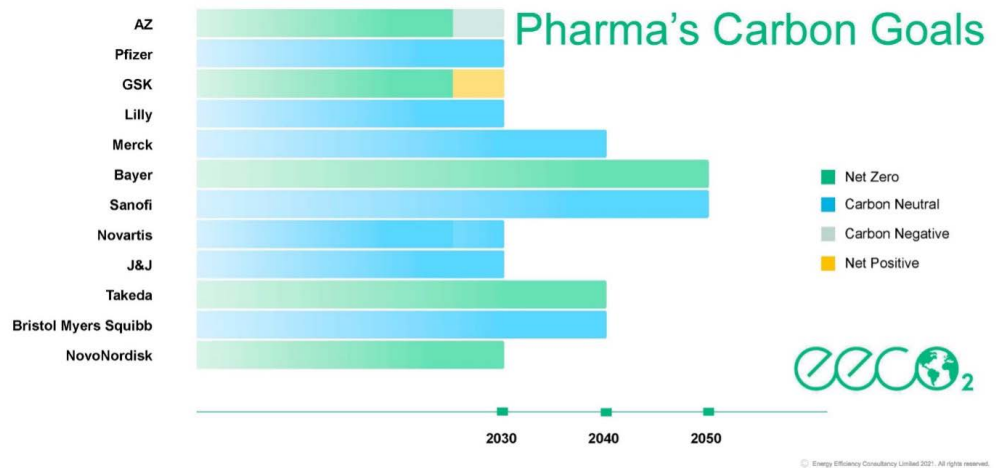
Le sens du service, notre proactivité et l'épanouissement de nos équipes sont des éléments clés de la réussite de vos projets.



# Comment la sobriété du process peut aider les industries pharma à atteindre leurs objectifs de réduction d'empreinte carbone ?

Par Ludovic HUGUENIN, Pharmasep

Dans une époque où le réchauffement climatique est un enjeu majeur de la survie de notre espèce, l'être humain essaie de progresser et d'améliorer ses industries, afin de limiter son impact sur l'environnement. Cet enjeu vital a été compris depuis plusieurs décennies et mis en application dans plusieurs secteurs d'activité, où des virages importants ont été amorcés.



## 1. Les engagements neutralité carbone dans l'industrie pharmaceutique

L'industrie pharmaceutique fait partie des derniers bastions où les efforts sont perceptibles. C'est d'autant plus important que **le secteur de la santé en général, est un des secteurs les plus émetteurs de CO<sub>2</sub>**, étant même devant le secteur de l'automobile, pourtant tant décrié (source : article "Carbon footprint of the global pharmaceutical industry and relative impact of its major players" <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959652618336084>)

En effet, les contraintes réglementaires, mises en place pour la protection des patients, sont des freins à l'innovation. De ce fait, les ingénieurs en charge de nouvelles installations, ont le réflexe, pour ne pas mettre en péril la réalisation qui leur est confiée, à répliquer des installations existantes. Par ailleurs, les décideurs ont compris que le virage devait être amorcé, et ont mis en place des objectifs très ambitieux pour atteindre la neutralité carbone dans les prochaines décennies.

Les objectifs des 10 plus grandes entreprises pharmaceutiques en réduction d'émissions carbone, (source : EECO2). Pour atteindre ces objectifs, de nombreuses techniques sont disponibles, et des politiques internes de management permettent d'impliquer les salariés dans la démarche.

## 2. Quels sont les postes d'émissions de gaz à effet de serre dans une usine ?

Par ailleurs, il est important de se pencher sur les émissions carbonées des sites, en analysant quels postes sont le plus consommateurs de ressources dans les usines. L'étude de EECO2 Ltd sur un site biopharma en Irlande, apporte un éclairage intéressant sur la répartition des dépenses énergétiques.



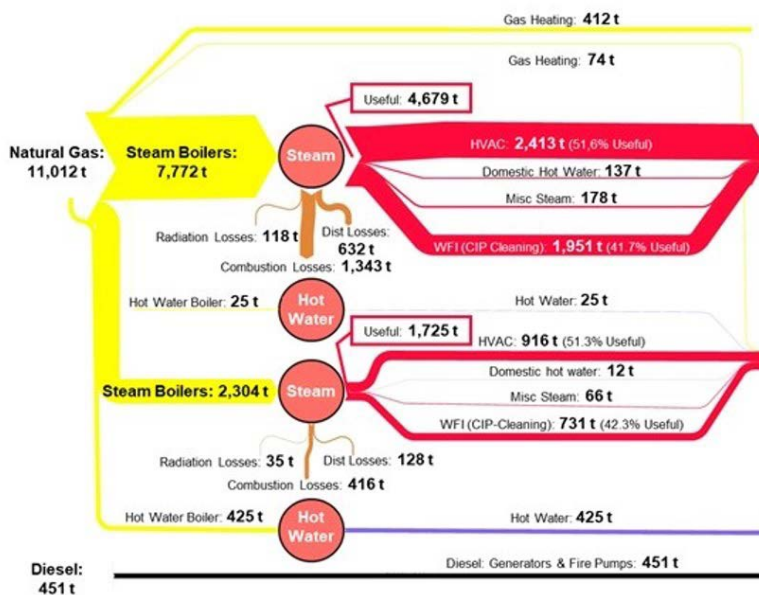


Fig. 2. The U.S. Manufacturing Static Carbon Sankey diagrams illustrate the flow of greenhouse gas emissions by U.S. manufacturing plants, based on EIA MECS data for 2018 and the EPA Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks (1990-2019).

Sur ce site pharmaceutique, il est intéressant de noter, que le premier poste de dépense énergétique est l'HVAC. Cela semble logique tant le traitement de l'air est important, pour assurer les conditions adéquates pour la production d'un médicament injectable. Cela dit, il est plus surprenant de voir que la production d'eau purifiée représente le deuxième poste de dépense, et surtout, représente 41.7% de l'énergie utilisée. A la vue, en général, des faibles volumes de produit fini dans cette industrie, cela paraît être un volume énorme. L'eau utilisée dans le produit est une part infime de cette consommation, qui est généralement due à 80-90% aux opérations de nettoyage de type NEP (Nettoyage En Place).

Imaginons maintenant réduire cette consommation d'eau de nettoyage de moitié. **Quel serait l'impact ? Il serait ainsi possible de réduire la consommation globale en énergie du site, d'au moins 20%.**

Une aubaine au vu des objectifs affichés ! Cet objectif de réduction, c'est celui que s'est fixé Richard Hall Hall, lorsqu'il a proposé de créer un groupe au sein de l'ASTM International, afin de travailler sur le développement d'une norme : **New Guide for the Design of Clean in Place-Friendly Equipment for Pharmaceutical and Biopharmaceutical Applications** (CbD Clean by Design).

Ce collège d'industriels travaille depuis 2 ans sur ce guide à paraître prochainement, énonçant les bonnes pratiques, afin de prendre en compte, dès la phase de conception, la nettoyabilité (e.g. la capacité à rendre un nettoyage efficace et reproductible) des équipements (cuves) et des tuyauteries process. Il est fort à parier qu'il va être considéré de près par tous les industriels du secteur. En effet, on annonce **une réduction de l'ordre de 50 à 80%** selon les process et les pratiques.

Ces engagements sont en premier lieu basés sur les scopes 1 et 2 du bilan carbone, c'est à dire l'émission de gaz à effet de serre directe (Scope 1), et l'émission liée à l'énergie du site de production (Scope 2). (Voir Fig.3). La plupart des industriels ont pris des engagements pour les 15 prochaines années, pour la réduction voire la neutralité carbone à horizon 2030 ou 2050. Cela commence en général (et parfois cela se résume) au niveau des Scopes 1 et 2.

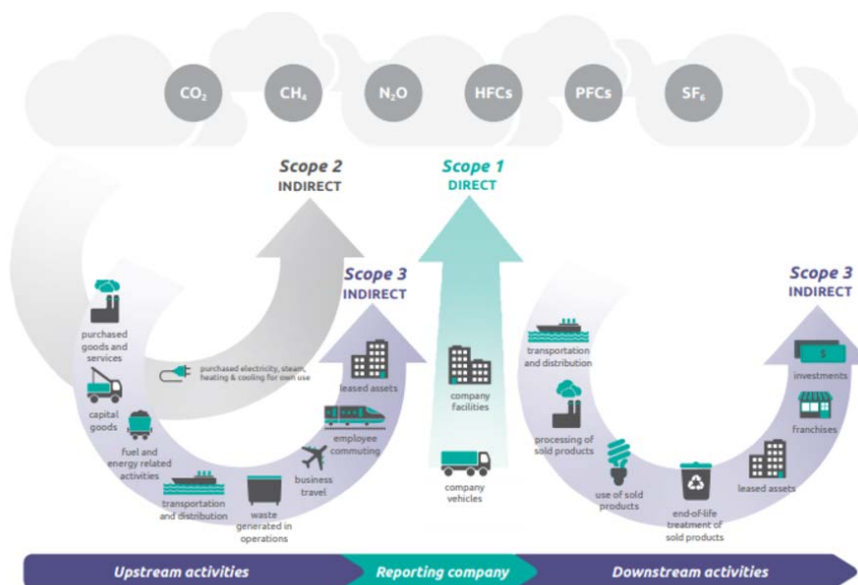


Fig. 3. Source : <https://www.usinenouvelle.com/article/reperes-scope-1-scope-2-scope-3-ce-que-recouvre-le-referentiel-des-emissions-directes-et-indirectes-de-gaz-a-effet-de-serre.N1137699>

### 3. La démarche Clean By Design

L'application de la méthode Clean By Design, qui vise à réduire de manière importante la consommation d'eau à haute **valeur ajoutée** : Water For Injection (WFI) lors des phases de nettoyage, peut apporter aux industriels un gain intéressant du point de vue de la consommation d'énergie, mais ce n'est pas la seule conséquence. En effet, l'optimisation de la nettoyabilité (ou Clean By Design), aura pour influence, de réduire considérablement les temps de nettoyage, et les arrêts de production entre 2 lots. Qu'en est-il de ces arrêts aujourd'hui ?

Le *Tableau 1* reprend tous les facteurs qui entrent en compte dans le calcul de performance d'une installation industrielle. Parmi les 6 causes de perte de performance, les temps d'arrêt pour les phases de nettoyages sont catégorisés en arrêt planifiés mais inévitables un fois l'installation réalisée (en bleu dans le tableau).

**Tableau 1.** Facteurs qui entrent en compte dans le calcul de performance d'une installation industrielle

Total Effective Equipment Performance	Typical Losses - TEEP
Schedule Loss	Lack of Orders / Reserve Capacity
	Lack of Labor
Overall Equipment Effectiveness (OEE)	Typical Six Big Losses - OEE
Availability Loss	Unplanned Stops (e.g. unplanned maintenance)
	Planned Stops (e.g. cleaning)
Performance Loss	Small Stops (e.g. delay in supply of media)
	Slow Cycles (e.g. delay reaching some CPP)
Quality Loss	Production Rejects
	Startup Rejects

Graphic inspired by [www.oee.com](http://www.oee.com) / [www.vorne.com](http://www.vorne.com)

Une étude intéressante menée par le prof. Dr Thomas Friedli, de l'université de St. Gallen en Suisse, a montré, selon les données obtenues de plusieurs sites de fabrication d'injectables en Suisse, que les temps d'arrêts inhérents aux nettoyages, représentent en moyenne 20% du temps total calendaire :

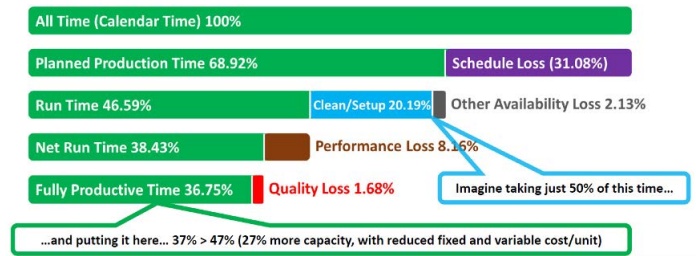


Fig.4. Source : Data kindly supplied by Prof. Dr. Thomas Friedli, University of St. Gallen, Switzerland

L'optimisation Clean by Design (CbD) permettant de viser une réduction des temps de 50 à 80%, apportera un regain de productivité d'au moins 10%.

Cela ouvrira sur une conception différente des installations, qui aura pour conséquence d'impacter le dimensionnement des utilités : Si l'installation se nettoie et stérilise plus rapidement avec moins d'eau, il est possible de sous-dimensionner l'équipement de production d'eau et de vapeur.

Le potentiel de la ligne de production étant également amélioré (en passant de 20% à 8-10% d'arrêt pour la maintenance), c'est le dimensionnement global qui pourra être repensé (taille de lot, ...) Et ce ne sont pas les seuls avantages. La plupart des industriels travaillant en multiproduits déclarent avoir recours au :

- Nettoyage hors ligne (COP), et changement planifié des élastomères (pièces d'étanchéité comme les joints et les membranes) à chaque changement de produit
- Au CIP par "overkill" : pour compenser la faiblesse du design (en termes de nettoyabilité) de la ligne de production, on augmente la température, le débit, ou le niveau de détergent lors du CIP.

### 4. Comment mettre en place cette approche ?

Il est intéressant de s'inspirer de la démarche Quality By Design. L'idée est d'impliquer les équipes dès la phase de projet, d'augmenter ses ressources en amont, afin d'en obtenir les gains au moment de la qualification.

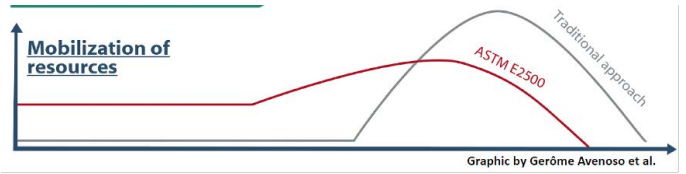


Fig 5. Extrait de graphique tiré du guide ASTM E2500 portant sur le quality by design.

L'approche QbD est aujourd'hui communément acceptée. L'idée de l'ASTM E2500, est de mettre en œuvre d'avantage de ressources en amont d'un projet de réalisation de ligne, afin d'optimiser les systèmes pour améliorer la qualité du produit :

**ASTM E2500** est une norme décrivant une approche de spécification, de conception et de vérification des équipements et systèmes de production du domaine Pharmaceutique / Biotechnologie. Elle s'applique aux équipements ; systèmes/processus ; utilités (Industrielle, propres) ; systèmes de laboratoire ; systèmes informatisés et automatisés pouvant affecter la qualité du produit et la sécurité du patient. (source site A3P : <https://www.a3p.org/astm-e2500-lets-cross-the-bridge/>)

Le Quality byDesign est un changement d'état d'esprit.

La démarche Clean By Design consiste à appliquer une méthodologie spécifique dans le but d'améliorer la nettoyabilité (en plus de la qualité). Cela peut tout-à-fait être mené en parallèle du QbD car les démarches sont complémentaires.

Le résultat est multiple, puisqu'il permet à la fois d'améliorer les temps de nettoyage, donc d'optimiser la disponibilité de l'équipement pour du temps de production, mais également de tirer des bénéfices substantiels tels que la diminution de consommation d'eau et de détergent. Cela aura pour incidence de préserver les élastomères (joints, membranes), et aura une répercussion sur la maintenance (préventive et curative), ainsi que sur l'assurance qualité (rendre un nettoyage robuste va fiabiliser le process CIP/SIP).

Dans une approche actuelle, en phase projet, toutes les étapes nécessaires au bon fonctionnement, mais qui ne sont pas des étapes de "valeur ajoutée" au produit, ne sont pas ou peu considérées.

Ainsi, la phase de nettoyage ne sera abordée qu'au moment de la FAT (Factory Acceptance Test), après la réalisation de l'équipement. Voici un diagramme simplifié présentant la démarche de validation :

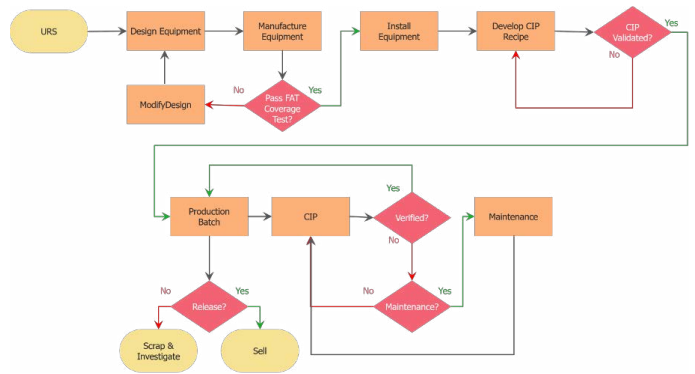


Fig. 7. diagramme simplifié de la démarche de validation. Source: Richard Hall Hall, Rattiinox)

L'URS est bien souvent écrit par un tiers, et ne spécifie bien souvent, peu voire aucun requis sur la nettoyabilité (ni notion d'efficacité, ni détail sur les résidus ou les produits à nettoyer).

Selon l'approche traditionnelle, un essai à la riboflavine est effectué en fin de fabrication de l'équipement/ligne. Il s'agit de lancer un cycle

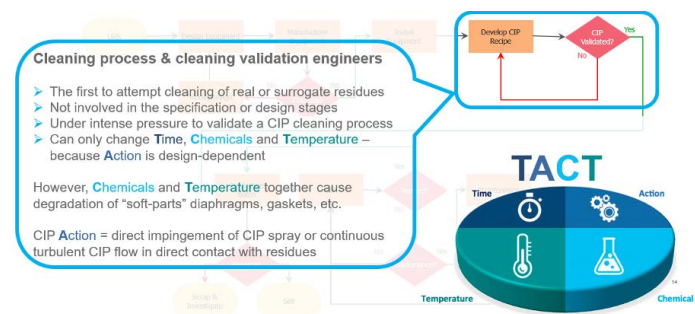


et de vérifier la mouillabilité de toutes les zones par le fluide, à l'aide des buses. L'objectif de ce test est de vérifier que le liquide entrera en contact avec toutes les surfaces.

Mais ce test a ses limites : les zones d'ombres (zones non-aspergées) seront détectées, mais on ne vérifie aucunement le nettoyage. En effet, des zones grises comme des bras morts (selon les normes en vigueur, l'acceptabilité est un bras mort de  $L/d = 2$ ), répondront positifs aux tests Riboflavine, grâce à l'impact par rebond du jet.

Ces zones restent néanmoins difficiles à nettoyer, et nécessitent un débit, une température plus haute, ou un détergent plus concentré.

Ainsi à l'étape suivante, l'équipe validation devra définir une recette de CIP plus agressive (consommatrice d'énergie et de temps) afin de trouver la solution aux faiblesses de l'architecture.



Ainsi, tous les services liés à l'exploitation opérationnelle et support, tels que le service production, l'assurance qualité, la maintenance, auront des actions correctives à mener, liées à la faiblesse de l'architecture initiale.

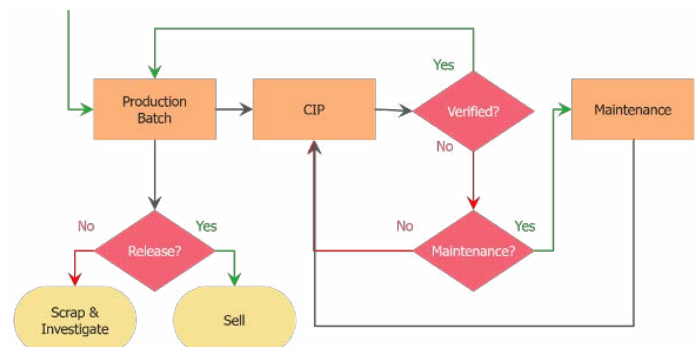


Fig. 7bis. Extrait du diagramme simplifié de la démarche de validation

La démarche Clean By Design, vise à revoir l'organisation pour intégrer dans la phase projet, des experts de chaque domaine (AQ, maintenance, process). L'objectif est de définir des exigences de nettoyabilité dès la phase de rédaction d'URS.

Ainsi pourront être menées des études pour vérifier la nettoyabilité du produit (test sur les matériaux, ...) et l'optimisation de l'architecture pour le nettoyage en place et la stérilisation en place : suppression des bras morts. L'outil pour mener à bien cette démarche, est un guide à paraître début 2024 (en cours de relecture) : **STM E55-11 Clean By Design**.

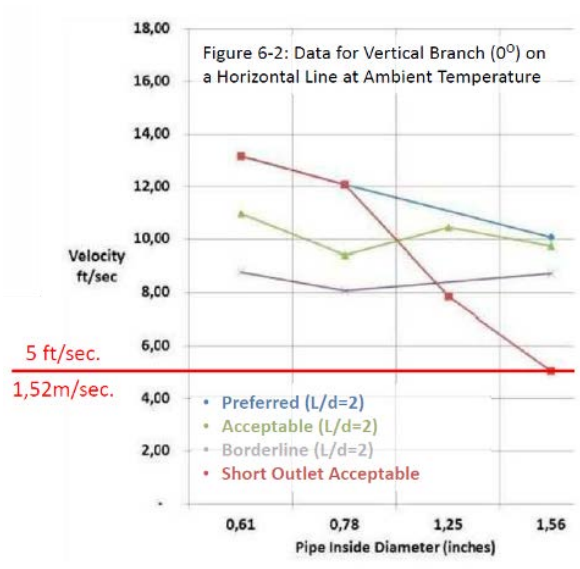
L'objectif de ce guide est de définir les termes liés à la nettoyabilité : qu'est-ce qu'un design aseptique, ou la nettoyabilité d'un équipement ? Il donnera une liste de requis, recommandations pour l'élaboration des URS. Par exemple, la définition des indicateurs qui permettront de mesurer l'efficacité du nettoyage (temps de nettoyage, % d'occupation de la ligne pour les opérations de CIP).

Il aidera à la fois à définir les tests qui valideront le nettoyage (des études plus poussées que le simple test de "coverage" à la riboflavine), et donnera des conseils concrets pour optimiser le design.

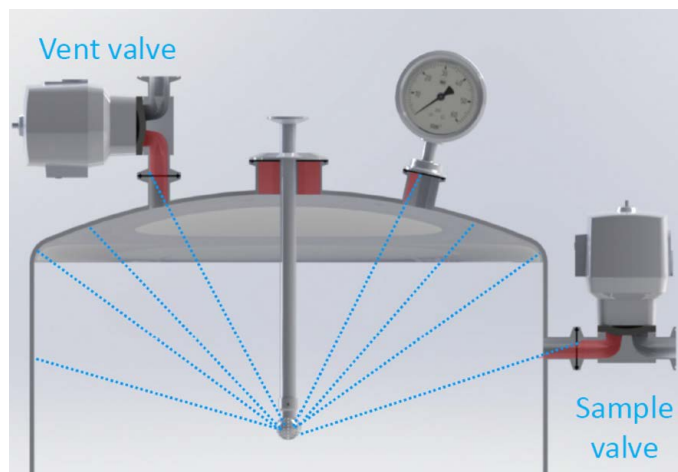
### 5. Et concrètement, quel est l'impact des améliorations de design sur la nettoyabilité ?

Prenons l'étude menée par l'ASTM (STP-PT-065 en 2013), qui étudie la vitesse d'humidification d'une branche conçue selon les concepts

communément admis de ration  $L/d=2$ . Ce ratio permet difficilement de mouiller les surfaces (ne parlons pas de les nettoyer) en utilisant la vitesse recommandée de 1.52m/s.



Des exemples de ratio  $L/d=2$  communément rencontrés dans des installations



Pour évaluer l'impact du ratio  $L/d$  sur le nettoyage, nous avons décidé de mener nos propres expérimentations. Sur un couvercle plat sont disposés des piquages ainsi qu'une connexion pour une boule de lavage. Sur les piquages affleurants sont montés des tubes de ratio  $L/d$  variant de 0 à 3 (en effet, le cas du vent valve ci-dessus, correspond quasiment à 3d.)



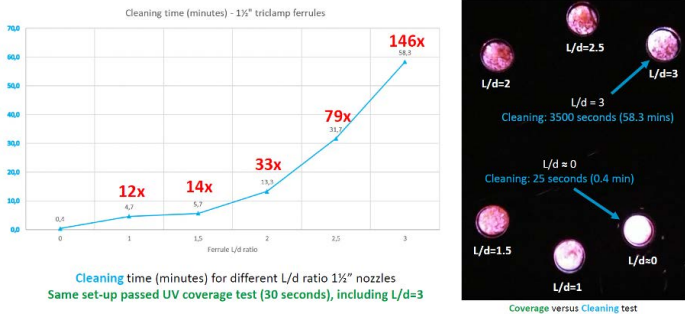
Les tubes ont été enduits d'une solution saturée en sucrose, soluble

dans l'eau et colorée.

Un test de mouillage classiquement réalisé sur ce type d'installation note naturellement un résultat positif sur toutes les configurations, et ce après 30 secondes de nettoyage.

Lors du test équivalent réalisé avec la solution, le résultat est édifiant.

**COVERAGE test compared with CLEANABILITY test – nozzles with different L/d ratios**



A L/d=0, 35 secondes suffisent. Cela passe à 4min30 pour L/d=1, 13min à L/d=2 et même 58 minutes à L/d=3.

Ce test démontre la nécessité de remettre en question les modèles établis, et considérer la nettoyabilité comme un indispensable d'un URS. En effet, on imagine aisément les économies réalisées, lorsque le nettoyage est rendu plus rapide : moins de temps, moins de produits chimiques (l'action mécanique étant plus efficace en impact direct), moins de température.

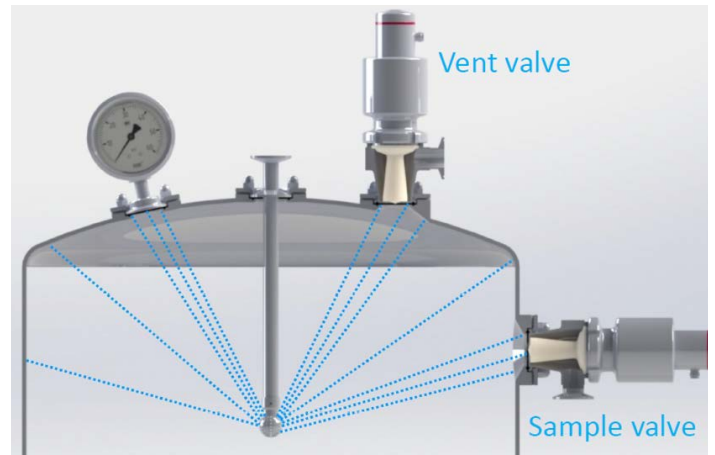
**6. Conclusion**

Au vu des enjeux actuels, le guide Clean By Design arrive à point nommé pour mettre en place ces démarches, afin de dépolluer des designs qui ont peu évolué ces 40 dernières années.

Rendre les installations pharmaceutiques nettoyables plus rapidement

et en consommant moins de ressource, aura pour effet de limiter l'empreinte carbone des installations. Ce virage à adopter en termes de conception, se fera à l'aide nouvelles technologie (comme les vannes à membranes permettant les connexions sans bras mort, et la diminution des volumes de rétention résiduels) mais surtout un changement des habitudes et des dogmes. Le gain pour l'utilisateur, en vaut la chandelle (selon nos estimations, le retour sur investissement CAPEX, se fera en quelques semaines tellement le coût OPEX est réduit une fois en service).

Ce virage amorcé sera également une occasion pour les utilisateurs, de reconsidérer leurs choix technologiques entre l'approche « single-use » et "installation durable", qui doit être définie selon le type d'installation (mono ou multiproduits) et également, la différence d'empreinte carbone entre les 2 solutions, puisqu'il s'agit d'une des priorités des années à venir.



# Des sueurs froides ?

## Parlons-en ensemble !

La technologie des vannes CAD de Rattiinox, vous permet d'appliquer la méthode "Clean by Design". Pensez-y, lors de la conception de vos installations process et utilités !

Contactez-nous par email :

**contact@pharmasep.fr**,

nos experts vous conseilleront.



# PHARMASEP

Always by your side





# Advancing Sustainability: Recycling Single-Use Technology in the Pharmaceutical Industry.

Introduction par Samah RINGA, Veolia

For several years, and especially since the covid pandemic, the pharmaceutical industry essentially in bioprocesses has been witnessing a significant shift towards single-use technology as an alternative to traditional stainless steel equipment in biomanufacturing.



Indeed, the pharmaceutical industry has been increasingly adopting single-use technology thanks to numerous benefits such as:

- Contamination Risk Reduction: Single-use systems eliminate the risk of cross-contamination between different products or batches on one hand, and provide a sterile, pre-assembled, and pre-sterilized solution, minimizing the risk of contamination on the other hand.
- Flexible capabilities: Single-use systems enable easy scale-up and scale-down of production processes. The size of single-use bags or bioreactors can be adjusted based on the desired batch volume, allowing for flexibility in meeting varying market demands.
- Time Efficiency: Single-use technology reduces the time required for cleaning, sterilization, and changeover between different production batches.
- Cost Savings: While the initial investment in single-use technology may be high, the Total Cost of Ownership can be optimized. Single-use systems have no requirements on regular maintenance or cleaning, reducing operating costs.

As far as environmental considerations are concerned, it's obvious that Single-use technology can reduce water and energy consumption on site, as well as the generation of wastewater associated with cleaning processes. However, it

generates plastic waste, which is mostly incinerated after use today. It's worth noting that the pharmaceutical industry is exploring and developing circular economy practices related to single-use technology. Collaboration among industry stakeholders, providers of single use systems, recyclers, waste management companies, and regulatory bodies is crucial to overcome challenges and ensure the effective implementation of circular economy principles in the pharma sector. Based on this, Sanofi as a large user of single use systems, Sartorius as one of its main suppliers and Veolia as a key partner on pharmaceutical waste management decided to explore recycling strategies by combining their knowledge, expertise and Veolia's R&D facilities.

The following article (first launch in Sustainability magazine, Nov 22) aims to summarize the outcomes of a tripartite study by examining the current state of recycling single-use technology, highlighting technical challenges, innovation and solutions, regulatory considerations and opportunities for a more sustainable approach.

Exploring the economic viability and business opportunities must also be considered to incorporate circular economy principles. Strengthening collaborative efforts between pharmaceutical companies to reach economic scale should encourage establishing recycling infrastructure tailored to the specific needs of the pharmaceutical industry. ...→

Article by Duc-Nam LUU, Sanofi; Magali BARBAROUX, Sartorius; Gaelle DOREZ, Veolia Recherche & Innovation; Katell MIGNOT, Sartorius; Estelle DOGER, Sanofi Pasteur; Achille LAURENT, Sanofi; Jean-Michel BROSSARD, Veolia Recherche & Innovation & Claus-Jürgen MAIER, Sanofi

## 1. Introduction

Despite its intrinsic role to provide and make available<sup>[1-3]</sup> treatments for patients, the pharmaceutical industry does not avoid the usual paradigm of all manufacturers in terms of environmental issues. Studies showed the links between GHG and the development of diseases<sup>[4-6]</sup>. Eckelman et al. suggests that the pharmaceutical industry contributes between 4.4 to 4.6% of the worldwide Greenhouse Gas (GHG) emissions<sup>[7]</sup>. Environmental concerns of medicine include other aspects such as the ecotoxicity<sup>[8]</sup>. This could be identified in manufacturing facilities<sup>[9,10]</sup> or hospital<sup>[11,12]</sup> effluents and even in rivers<sup>[13,14]</sup>. To manage this paradox between making treatment available and affordable versus the environmental impacts that contribute to health concerns of populations, the pharmaceutical industry should embrace the holistic approach of eco-design<sup>[15]</sup>.

One way to manufacture Active Pharmaceutical Ingredients (API) is through biotechnology<sup>[16]</sup>. The birth of modern bioprocess was identified in the mid-1970s with recombinant DNA<sup>[17]</sup>. Historically, the biologics were traditionally made through stainless steel (SS) infrastructure<sup>[18]</sup>. As markets were growing, a second period began in the 1990s with both an increased number of biotechnology molecules based on clinical research and bigger facilities for industrialization<sup>[19]</sup>. With the aim to reduce cost, increase quality, speed, and gain more flexibility of production<sup>[20]</sup>, Single-Use Technologies (SUTs) first appeared. Gallihier et al. described a significant change around 2010 where SUTs switched from "support systems" to "production systems"<sup>[18]</sup>. Recently, SUTs were made part of the response to the COVID-19 crisis, by allowing shorter timelines to implement production processes for vaccines<sup>[21]</sup>. Despite these advantages, the perception of SUTs remains subject to concerns<sup>[22]</sup>.

The positive environmental impact of SUTs could be improved by avoiding incineration and landfills, and implementing circularity options, when possible. Because SUTs are usually composed of multilayers and multiple polymer types and because they are often treated as bio contaminated wastes, they are seen as difficult to recycle. However, according to the World Health Organization (WHO), of the total amount of waste generated by health-care activities, about 85% is general, non-hazardous waste<sup>[23]</sup>. If this assumption is confirmed for plastics in biomanufacturing, this would create recycling opportunities in this field, provided the waste management system in place would sort these two categories of waste. The recycling of these materials represents a way to contribute to this topic. Especially because the plastic used in the bioprocess industry complies with strict regulation, such as REACH for instance, and that the suppliers provide extractable guides to allow standard toxicology study for risk assessment.

The environmental burden of plastic is a topic known in the scientific community. Researchers have documented the marine pollution<sup>[24-26]</sup> and the impact on health<sup>[27-29]</sup> of plastics. In their paper, Li et al. mention that plastic pollution can be summarized as diverse, persistent, global, and threatening to human health. Furthermore, the authors support the fact that the pollution can be direct or indirect in aquatic, atmospheric, and terrestrial systems<sup>[30]</sup>. The proper management of plastic waste represents a key issue<sup>[31]</sup>, which is taken into consideration increasingly more by international organizations, such as the European Union<sup>[32]</sup>.

An optimized eco-design approach requires anticipating the end of life of the product. The circularity of products and materials (at their highest value)—"in practice" at scale and not only from a theoretical or laboratory level—is one of the key principle of the circular economy<sup>[33]</sup>. After tracking, collection, and sorting, the technical requirements for recycling must be met. As an example, for the packaging, the ISO 18604:2013<sup>[34]</sup> is mentioning "reprocessing, by means of a manufacturing process, of a used packaging material into a product, a component incorporated into a product, or a secondary (recycled) raw material; excluding energy recovery and the use of the product as a fuel".

The EU commission sorts plastic recycling in three categories: mechanical, chemical, and organic recycling. Organic recycling is defined by the EU Packaging and Packaging Waste Directive 94/62/EC as aerobic treatment (industrial composting) or anaerobic treatment (biogasification) of packaging waste and is out of this study scope. Mechanical recycling refers to operations that aim to recover plastics via mechanical processes (grinding, washing, separating, drying, regranulating, and compounding). For mechanical recycling, the ability to separate and sort components and materials in post-used products must be taken into consideration to confirm that the quality of the post-used materials meets the recycling process specifications and expectations as a secondary raw material in a new use. Some materials or substance incompatibilities can affect the success of mechanical recycling with the current technologies. To overcome mechanical recycling limits, chemical recycling by dissolution/precipitation, thermocatalysis, steam cracking, or pyrolysis<sup>[35,36]</sup> have been widely investigated. However, the scalability at industrial level and its environmental benefit thereof still needs to be validated, especially from a lifecycle perspective<sup>[37]</sup>. Many technical parameters such as the massification of the feedstock quantity, the quality maximized, the olefin recovery yields (compared to ethylene yields from naphtha for example), and purification of the pyrolysis oil must be challenged to validate efficiency and robustness of such process. The existing pilots still require the sorting of plastics<sup>[37,38]</sup>. At the moment, lack of data for life cycle assessment makes the overall environmental impact evaluation of the process difficult and the dissolving rates of the recycled stream in the refinery is a traceability challenge for allocating the recycled content. Chemical recycling is an additional set of technologies to recycle plastics which cannot be mechanically recycled<sup>[39]</sup> and mechanical recycling in standard waste streams, when possible, is on top of the recycling hierarchy.

The driver for this study was to challenge the widespread thought that SUTs in general cannot be recycled in standard waste streams for plastics. Therefore, we asked ourselves if the mechanical recyclability of the Single-Use Technology faces a technical constraint and focused the paper to address some answers.

The inclusion of stakeholders all along the value chain of a product, such as the supplier, end-user, and recycler, is a key factor of an eco-design approach<sup>[36]</sup>. With this aspect in mind, a collaboration between Sartorius, Sanofi, and Veolia was established to explore if, when carefully designed, plastic parts used in bioprocessing for non-hazardous application can technically be diverted from incineration or landfill and recycled into raw materials with the quality equivalent to pristine grades of polymers.

First, the sorting and manual separation<sup>[24-26]</sup> could be managed at the industrial sites producing the waste and recirculation routes already existing in practice for the main component materials (mainly LDPE). Additionally, a mechanical extrusion process exists at scale. Nevertheless, the material separation strategy and the quality of the secondary raw material that could be recovered from this end-of-life product have to be evaluated. Results obtained at laboratory scale on representative items will then serve the discussion on the different recovery and valorization scenarios including criteria of logistics, volume, and uses.

The focus of this work was to identify and analyze the product separation strategy, to characterize the quality of the recycled plastic at a laboratory scale on representative items. To engage the discussion and to evaluate if a circular option can be an environmentally sustainable solution, we estimated the environmental footprint, based on data available in the literature. These results will then serve a future study on the different recovery and valorization scenarios including criteria of logistics, volume, and uses.



## 2. Single-Use Technology

Before the SUT recycling possibilities are discussed, we define what we refer to when talking about SUT material in this paper.

Single-Use Technologies (SUTs) refers to technical solutions based on Single-Use Assembly (SUA) which is also called Single-Use Systems (SUS). An SUA is an engineered process equipment solution most commonly assembled from components made of polymeric materials, which together create a system or unit operation designed for one time of campaign use<sup>[40]</sup>. In other words, an SUA is a ready to use, closed processing equipment consisting of integration and presterilized components. These systems are usually sterilized by gamma irradiation, but X-ray is today emerging. A sterile bioreactor composed of plastic parts such as bag, impeller, spargers, tubes, and connectors, is an example of an SUA. A storage bag with or without filter, or a mixing bag with or without single-use sensors with all parts being made of plastic materials, are other typical examples.

These systems are said to be single use because, when compared to conventional stainless-steel equipment, they are not designed nor qualified to be cleaned and reused for another campaign. However, the duration of use might reach weeks, months, and even years for long-term storage application in cold or frozen states (e.g., bulk storage before final form and fill).

Surveys suggest that waste to energy is currently the most widely used post-use management method within the biopharmaceutical industry<sup>[41]</sup>. Indeed, incineration is often the only possible option for the treatment of what is considered as a bio-contaminated waste.

Rogge et al. proposed a comparison between SS plants and SUA ones. They suggest that for most of the parameters, SUA presents more advantages in terms of economical and quality aspects<sup>[42]</sup>. Whitford et al. performed a life cycle assessment (LCA), showing less environmental burden of SUA versus SS as shown in Fig. 1. This can be explained by the reduced energy and water consumption due to the elimination of cleaning and sanitization.

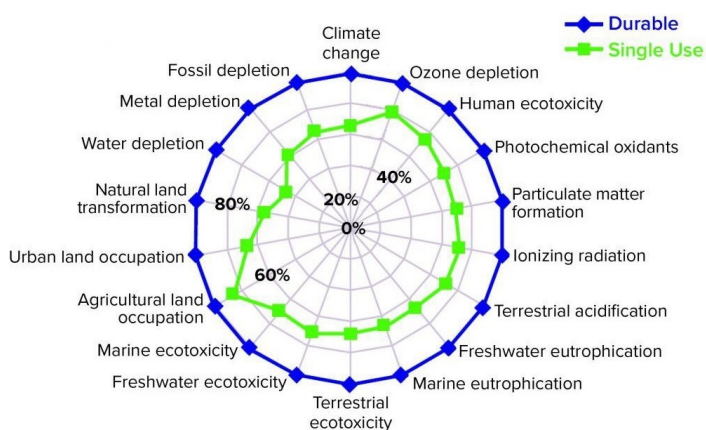


Fig. 1. On average, SU facilities are more ecofriendly than traditional (durable) facilities in 18 distinct categories of environmental pressure by Barbaroux et al.<sup>[43]</sup>

In addition to these elements, SUT presents the advantage of avoiding investments related to the installation of the infrastructure which supports SS<sup>[44]</sup>. This leads to both time and economical savings. By easing technical and regulatory scale up, SUT can significantly simplify the processes of industrialization by just integrating the production unit into modular clean rooms<sup>[45]</sup>. This last point represents a major advantage when it comes to the need to make new treatment for patients available as soon as possible. The success of making the COVID-19 vaccine available in one year is a relevant illustration of this aspect<sup>[21]</sup>.

The aim of this collaboration was to revisit the current practices of post-use management of SUA to assess alternatives to traditional end-of-life methods. The first step was to identify which SUAs need to be treated as hazardous waste and which do not. For example, SUA has been initially used for buffer and media preparation and storage in aseptic mixers and bags<sup>[46]</sup>. Due to the composition of standard buffer and media, these SUAs may not be required to be handled as hazardous

waste. This segregation between hazardous and not hazardous opens the door to alternative post-use management options such as sorting and recycling, which is the focus of this article.

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Materials

In this study, three different finished products in standard double packaging have been analyzed. Materials for the constitution of SUA are well known and characterized. They are compliant with regulatory requirements, such as REACH (EU Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) for instance. Quantities and chemical characteristics of the additives added to polymers were optimized to be compliant with bioprocess applications<sup>[47]</sup>.

The transparent film which constitutes the bag chamber (Fig. 2) for storage bags, mixers, or bioreactors is mainly composed of low-density polyethylene (LDPE), linear low-density polyethylene (LLDPE), and polyethylene vinyl alcohol (EVOH) as a barrier layer<sup>[48]</sup>. EVOH is widely used in multilayer structures for its excellent flex-crack resistance, high resistance to hydrocarbons, oil, solvent, and for its gas barrier properties. Since it is sensitive to moisture, it is recommended to use it between at least two layers of a hydrophobic material, such as LDPE<sup>[49,50]</sup>. In this film the ratio of EVOH is such as it has a minor impact on the recycled material<sup>[51]</sup>.



Fig. 2. Example of the structure of a bag: 1—cable tie, 2—bag port (welded on the film), 3—packaging tie, 4—tubes, 5—packaging overwrap, 6—film-bag chamber is composed of the film and the welded flange ports.

Packaging film is transparent and composed of LDPE as a sealant layer to guarantee barrier to sterility and polyamide (PA) for its good gas barrier properties<sup>[52]</sup>, its exceptional mechanical strength, high resistance to impact, and puncture and pin holding<sup>[53]</sup> which are expected properties for packaging of sterilized device. PA in multilayer films is currently classified as non-recyclable in many design guidelines but this indeed depends on PA type and concentration. Tubes are translucent, composed of a synthetic thermoplastic elastomer suitable for pumping application, and connected to the bag with black polyamide cable ties.

In order to evaluate impact of dismantling/sorting strategy on quality of recycled product, two grades of rLDPE have been prepared in this study from post-industrial SUA:

- The first one, "rLDPE\_Pure", represents a total dismantling with complete and clean disconnection of the tubes at the port flange. Thus, this first material is composed of the bag chamber, itself composed by the film and port flanges (Fig. 2).
- The second one, "rLDPE\_Blend", represents a rapid dismantling without disconnection of the tubes and cable ties, but with a cut (or



Fig. 3. Steps of material preparation of rLDPE\_Pure.

a sealing equipment for a totally closed disconnection) at the port flange level. Thus, this second material is composed of bag chamber (film and port flanges), cable ties, pieces of tubes, and additionally, packaging (Fig. 3). All the non-PE components can thus be considered as “foreign” materials in the “rLDPE\_Pure” stream.

- A cable tie (1) is a “fastener” as described in the ISPE Good-Practice Guide: Single- Use Technology<sup>[54]</sup>, page 17: non-wetted components used to keep the tubing (4) in position of the fitting or port (2), with adjustability to variable circumstances. These cable ties are fixed with calibrated equipment, they are not intended to be removed after installation.

- Some ties (5) are used to maintain packaging, manually assembled to wrap, and protect sensitive components during shipping, to be removed manually before use.

Plastic cable ties are today widely used in bioprocessing application, mainly in polyamide and black color, but there is an emerging market requesting different colors for lines identification and differentiation. Cable tie is a critical component, as it is a key element for engagement safety and as such is part of the extensive qualification process for the integrity of single assemblies and must be therefore carefully selected. Metal clamps could potentially represent an option that would allow for an easier sorting at end of life.

### 3.2. Samples Production

#### 3.2.1. Material Preparation

The SUA followed several steps of preparation to achieve the two grades of materials.

Firstly, all parts were manually disconnected. Every element was grinded individually.

For the “rLDPE\_Pure”, the mainstreams (bag chambers) were shredded two times with a shear crusher and finally grinded with a knife grinder, with a mesh of 5 mm size (Fig. 3).

For the “rLDPE\_Blend”, the secondaries streams (ties, pieces of tubes, packaging) were individually grinded with a knife grinder with a 4 mm mesh size.

#### 3.2.2. Extrusion

The “rLDPE\_Pure” material was directly extruded, from the flakes stream composed by bag chamber and port flange, in a co-rotating twin-screw extruder and pelletized with a rotary cutter (Fig. 3). The extrusion temperature profile was in the range 190–235°C and the rotation speed of the screw was 350 tr/min. A filter 80 × 40 mesh was used at the end of the die to avoid unmelted impurities into the recycled granulates.

The “rLDPE\_Blend” was obtained by blending the flakes of all the different components. To be representative of the proportions of each material in the different SUAs, a quantitative analysis of the mass of the different parts of the bag chamber was carried out (Table 1). The choice of blending formulation was based on a worst-case scenario, i.e., the SUA with the highest ratio of “foreign” material such as the lower (bag chamber/total) weight ratio. The SUA1 was the one with the highest ratio. After that, all the flakes from the different components were mixed and homogenized with the following proportion: 55% bag chamber/port flange, 42% packaging, 0.5% ties, and 2.5% pieces of tubes. The resulting flakes were extruded with the same condition as the “rLDPE\_Pure” material.

Table 1. Composition of different SUA

Streams	SUA1	SUA2	SUA3
Bag chamber	372g (55%)	565g (66%)	1546g (59%)
Packaging (plastic film)	290g (42%)	261g (31%)	1044g (40%)
Ties	3g (0.5%)	4g (0.5%)	5g (0.2%)
Pieces of tubes *	16g (2.5%)	20g (2.5%)	15g (0.7%)
TOTAL	681g	850g	2610g
Weight ratio (bag chamber/total)	54.6%	66.4%	59.2%

\* The mass of the pieces of tubes correspond to the weight of the tube left on the port flange after that the tube has been cut without removing the ties.

#### 3.2.3. Injection

For the mechanical and colorimetric properties measurements, standard samples were molded by injection using an injection molding device with a clamping force of 450 kN. This device is equipped with a screw of 25 mm diameter and an effective screw length (L/D ratio) of 24. For the two batches, the temperature range was 200–240°C and the mold temperature was set at 40 °C. The injection mold is composed of one tensile bar type 1A according to ISO 527-2:2012<sup>[21]</sup>, one bar 80 × 10 × 4 mm<sup>3</sup> for flexural and Charpy impact test and one disk with a thickness of 1 mm and a diameter of 50 mm for colorimetric analysis.

### 3.3. Methodology and Testing

#### 3.3.1. Fourier Transform Infra-Red (FTIR)

Fourier transform infra-red were recorded between 4000 and 650 cm<sup>-1</sup> using a Spectrum 100 set us in ATR mode (4 scans, resolution of 4 cm<sup>-1</sup>) on the four streams.

#### 3.3.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The melting and crystallization behaviors of the four streams of the SUA were determined using a DSC under nitrogen atmosphere. The analysis conditions of melting temperature measurement depend on the piece of the SUA considered. For the bag chamber and port flange, the samples were cooled down to -30°C, held at isothermal for 8 min, heated up to 200°C (first cycle of fusion), then cooled down again to -30°C at 10°C/min, held at isothermal for 8 min (cycle of crystallization), and heated up to 200°C again at 10°C/min (second cycle of fusion). The packaging followed the same protocol with a range of temperature from -30 to 300°C. For the ties, the sample was heated up to 350°C at 10°C/min, held at isothermal for 2 min, then cooled down to -25°C at 10°C/min, and finally heated up again to 300°C with one scanning temperature rate of 10°C/min. The thermograms presented in this study focus on the cycle of crystallization and the second cycle of fusion, to disregard the thermal history of the material.

• 3.3.3. Macro TGA

A thermogravimetric was used to analyze the thermal degradation. Sample weights at around 4.5 g were heated up from 40°C to 750°C at a heating rate of 10°C/min under laboratory atmosphere followed by 3 h temperature dwell at 750°C. Only the residual weight at 750°C was determined from this analysis. Three measurements were applied for both "rLDPE\_Pure" and "rLDPE\_Blend" materials.

• 3.3.4. Density

A densitometric balance was used to determine the volumetric mass in water at 23°C, according to the standard ISO 1183-1:2012<sup>[55]</sup>.

• 3.3.5. Melt Flow Rate

The melt flow rate is an indirect measurement of the melt viscosity of materials. The MFR measurements were carried out in a melt flow index, at 190 °C, 2.16 kg, according to the standard NF EN ISO 1133-1:2011<sup>[56]</sup>.

• 3.3.6. Color

A spectrophotometer was used to determine the three-color components in the CIE L\*, a\*, b\* domain, with the parameters: SCE, Illuminant D65, angle 10°. A method to determine the opacity was implemented by measuring the L\*, a\*, b\* of a 1 mm thickness sample on a white and a black background. The ΔE will be calculated with the formula:

L\* correspond to the lightness axis (L\* = 100 for the white and L\* = 0 for the black), a\* correspond to the green-red axis and b\* correspond to the blue-yellow axis.

• 3.3.7. Tensile Tests

The tensile tests were carried out according to NF ISO 527-1:2012<sup>[57]</sup> using a type 1A tensile bar on a tensile test machine with a 10 kN load cell. The crosshead was moved with a constant velocity of 50 mm/min for strength and the strain at break determination. The Young modulus was determined with a constant velocity of 1 mm/min and an extensometer. At least five measurements were obtained for each test and material. The results are presented in Supplementary File S1.

• 3.3.8. Flexural Test

The flexural tests were carried out according to NF EN ISO 178:2010<sup>[58]</sup> using bars 80 × 10 × 4 mm<sup>3</sup> placed on a three-point flexural device with a 5 kN load cell adapted on a tensile test machine. The crosshead was moved with a constant velocity of 2 mm/min and the flexural modulus was determined on the average of five measurements.

$$\Delta E = \frac{q}{L_{white}^* - L_{black}^*} + \frac{a_{white}^* - a_{black}^*}{L_{white}^* - L_{black}^*} + \frac{b_{white}^* - b_{black}^*}{L_{white}^* - L_{black}^*}$$

• 3.3.9. Charpy Choc

The Charpy impact tests were carried out according to NF EN ISO 179-2:2010<sup>[52]</sup> using a test specimen type 1 (80 × 10 × 4 mm<sup>3</sup>), a type of notched A and a 5J hammer on a Charpy impact test device.

4. Results

In general, most of the plastics contain additives (flame retardant, pigments, ...) which are needed to meet technical requirements of a product during its first life. However, these additives could create hurdles during the recycling process and limit second life options for recycled material. Therefore, a chemical analysis is usually required to define the composition of the recycling streams and anticipate potential problems of miscibility or the un-melted phase during the transformation phase. In this study, chemical analysis was used to confirm the known composition of the studied SUAs and identify potential unexpected issues.

The analyses of the FTIR spectra allow to determine the nature of the chemical bonds of the material of each component. The FTIR spectrum of the bag chamber (Fig. 4) shows a characteristic spectrum of polyethylene with two peaks at 2915 cm<sup>-1</sup> and 2849 cm<sup>-1</sup> corresponding to the C-H strength bond. The presence of the wavelength at 1377 cm<sup>-1</sup> corresponds to CH3 bend peak and allows

to assert that the polyethylene is a LDPE or a LLDPE<sup>[53]</sup>. The two faces of the bag chamber were analyzed and have the same spectra. If the bag chamber is a multilayer system, the inner layer or layers cannot be detected with the FTIR. The DSC analysis allows the characterization of all the crystalline polymers present in the layers. The bag chamber thermogram, Fig. 5a, shows three melting temperatures at 109°C, 126°C and 186°C perfectly aligned with the literature for LPDE (Tmelt1 = 109°C), LLDPE (Tmelt2 = 126 °C) and EVOH (Tmelt3 = 186°C) (Table 2)<sup>[59-61]</sup>.

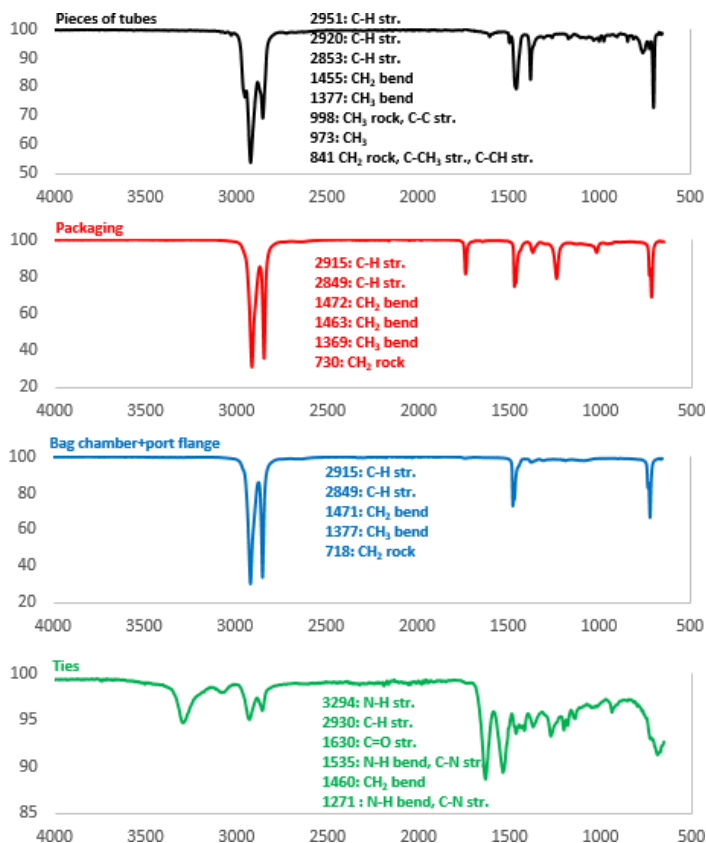


Fig. 4. FTIR spectra of the pieces of tubes (black), packaging (red), bag chamber (blue); and ties (green)

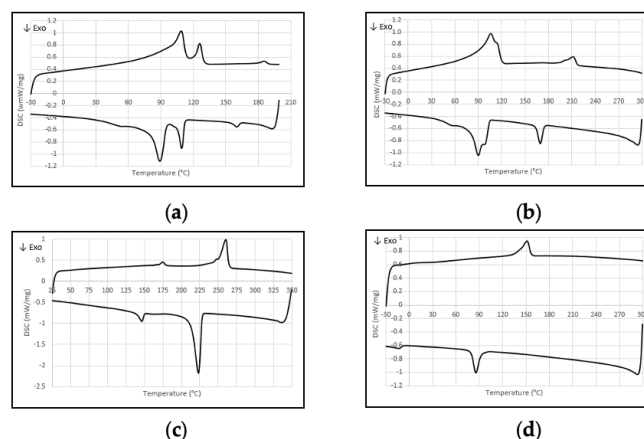


Fig. 5. DSC thermograms of (a) bag chamber; (b) packaging; (c) ties; (d) pieces of tubes.

The packaging FTIR spectrum (Fig. 5b) also presents the two characteristic bonds at 2915 cm<sup>-1</sup> and 2849 cm<sup>-1</sup> corresponding to a polyethylene but additional bands relative to other polymers are detected. The packaging thermogram (Fig. 6b) presents two melting temperatures: 105 °C and 211°C (Table 2) corresponding respectively to LDPE and a PA polymer<sup>[58]</sup>.



Table 2. DSC Results

	Bag Chamber + Port Flange	Packaging	Tie	Tubes
<b>Melting temperature (°C)</b>	T <sub>melt1</sub> = 109°C T <sub>melt2</sub> = 126°C T <sub>melt3</sub> = 186°C	T <sub>melt1</sub> = 105°C T <sub>melt2</sub> = 211°C	T <sub>melt1</sub> = 175°C T <sub>melt2</sub> = 259°C	T <sub>melt1</sub> = 152°C

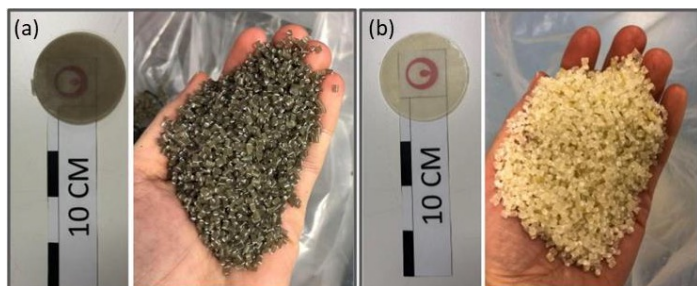


Fig. 6. Pellets and disk of (a) rLDPE\_Pure grade, (b) rLDPE\_Blend grade.

Fig. 5c shows the spectrum corresponding to the ties. As expected, it is close to a polyamide spectrum with several N-H and C-N bonds (3294 cm<sup>-1</sup>, 1535 cm<sup>-1</sup>, 1271 cm<sup>-1</sup>)<sup>[52]</sup>. The DSC thermogram ties also present two melting temperatures at 175 and 259°C (Table 2). These two temperatures are characteristic of the melting temperature of polyamides<sup>[61]</sup>, which is consistent with the FTIR analysis.

The piece of tube FTIR spectrum (Fig. 5d) presents several peaks which indicate that the plastic is composed of ethylene groups, but it is not a polyethylene or a polypropylene. To complete, the DSC analysis highlights one melting temperature at 152°C (Table 2).

It is expected that PA and TPE may have an impact on the extrusion step of “rLDPE\_Blend” grade properties and should be closely monitored. After extrusion and injection of the two recycled grades, typical physical properties such as density, ash content, and melt flow index were measured as shown in Table 3. No significant difference between the two grades was observed. For both grades, the density is in the range of density of a virgin LDPE between 910 and 940 kg/m<sup>3</sup>. The ash content is very low which means that the streams are lightly filled and the MFR are very low too.

Table 3. Density, ash content, and melt flow index results

	rLDPE_Pure	rLDPE_Blend
<b>Density (kg/m<sup>3</sup>)</b>	927 ± 2	945 ± 5
<b>Ash content</b>	0.37 ± 0.005	0.38 ± 0.05
<b>MFR* (g/10 min)</b>	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.05

The main differences between the two samples are the colorimetry and the opacity. The first observation showed that the “rLDPE\_Pure” sample yellowed although the initial flakes of the bag chamber were totally translucent, without color. After the extrusion step, the pellets present a yellowish tinge with a b\* = 7.76 (corresponding to the blue-yellow axis) (Table 4) and a decrease in the opacity (Fig. 6a).

This decrease in properties could be due to the presence of the EVOH, which was thermo-oxidized during the extrusion phase at 190–235°C<sup>[62]</sup>.

The second observation showed the “rLDPE\_Blend” grade was darker than “rLDPE\_Pure” (decrease of L\*<sub>LDPEBC</sub> = 78.7 to L\*<sub>LDPEWC</sub> = 54.7) due to the presence of the black cable ties in the blend (Fig. 6, Table 4). The transparency was also impacted with a decrease in the ΔE for 31 to 15 between “rLDPE\_Pure” and “rLDPE\_Blend”.

Change of color and an issue for a second life of the materials when they contribute to the functionality was found.

Table 4. Spectrocolorimeter results.

	rLDPE_Pure		rLDPE_Blend	
	White	Black	White	Black
<b>L* (ET)</b>	78.7 (0.52)	48.4 (0.68)	54.7 (0.72)	42.2 (0.68)
<b>a* (ET)</b>	-1.66 (0.11)	-2.71 (0.09)	0.77 (0.03)	-1.28 (0.06)
<b>b* (ET)</b>	7.76 (0.25)	0.70 (0.23)	11.94 (0.19)	4.00 (0.28)
<b>ΔE</b>	<b>31.13</b>		<b>14.81</b>	

It is difficult to observe the impact of the EVOH on the LDPE, because film without EVOH has not been characterized so far. Nevertheless, EVOH in the “rLDPE\_Pure grade” does not lead to a premature break of the sample during tensile tests (Fig. 7).

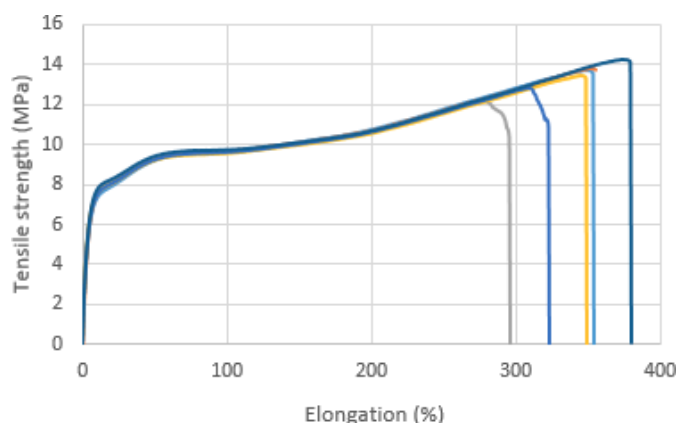


Fig. 7. Tensile test of rLDPE\_Pure grade where each color represents one sample

When compared to “rLDPE\_Pure” grade, the “rLDPE\_Blend” grade shows a reduction of the elongation at break (Fig. 8) and a slight increase of the young modulus while no significant difference is observed for the other parameters (Table 5). Charpy impact notched value is quite high and representative of LDPE, impact of PA addition from packaging is not visible in the “rLDPE\_Blend” sample.

Table 5. Mechanical test results.

	rLDPE_Pure	rLDPE_Blend
<b>Tensile stress at break (MPa)</b>	12.5 ± 0.7	11.8 ± 0.05
<b>Elongation at break (%)</b>	334.1 ± 13	217.9 ± 3
<b>Young modulus (MPa)</b>	200 ± 5	231 ± 1
<b>Flexural modulus (MPa)</b>	178 ± 7	179 ± 3
<b>Charpy impact notched (kJ/m<sup>2</sup>)</b>	48.5 ± 0.75	47.6 ± 1.8



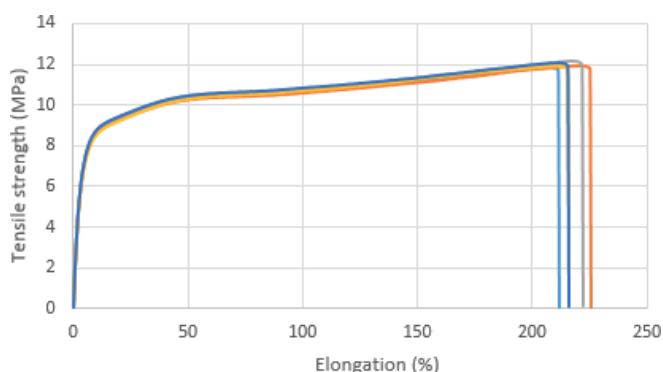


Fig. 8. Tensile test of rLDPE\_Blend grade where each color represents one sample

**5. Discussion**

The overall purpose of this research is to reduce the environmental impact of the end-of-life of post-use bioprocessing plastic containers. Therefore, the mechanical technical recyclability of SUA will be discussed and the environmental profiles of different end of life scenarios, will be compared, using a comparative LCA approach.

**5.1. Mechanical Technical Recyclability**

Simulation of the mechanical recycling stages performed in this study showed that main mechanical recycling steps such as extrusion and injection are compliant with industrial recycling practices. Different strategies of dismantling and blending can be considered regarding the end of life of industrial items such as SUAs. In the first approach, “rLDPE\_Pure favors the purity of the LDPE stream by dismantling and carefully sorting each component material. The second approach, “rLDPE\_Blend”, minimizes the effort for waste logistics and maximizes the amount of one unique recycled LDPE grade containing traces of “foreign” materials. Technical evaluation of these two options shows comparable properties, close to virgin LDPE and to existing LDPE recycling grades (Tables 6 and 7, Fig. 9). Thus, it is assumed, as a first approach, that both streams can be oriented to application with similar performance requirements than the one of virgin material (films, bags, pipes and fittings, profiles, and flexible sheets).

Table 6. Corresponding rate with commercial LDPE grades (virgin LDPE\_V or recycled LDPE\_R) by applying a mean square calculation based on the different properties measured

	LDPE_V	LDPE_R
rLDPE_Pure	74%	92%
rLDPE_Blend	72%	92%

However, when compared to the “rLDPE\_Pure” grade, the “rLDPE\_Blend” grade shows a lower elongation at break (35% lower), a higher Young modulus (15.5% higher), and grayish and less transparent color—which could limit potential applications.

Although there exists a wide range of fields of application for mechanically recycled LDPEs with similar high properties i.e., bags and industrial films, packaging and containers, and construction materials, this material will neither achieve medical grade nor even food grade compliance, as no mechanical extrusion process is currently validated by EFSA to deliver an LDPE food grade certificate. This study focused on post-industrial recycled (PIR) material, and it will be necessary to include, in the case of post-consumer recycled (PCR) material, at least one washing step before the dismantling step and possibly drying step after grinding. As it represents a usual standard step in Polyolefin mechanical recycling, no major challenge is expected.

**5.2. The Strategy for Recycling**

Due to the low use quantities, the “purest” approach requires the dismantling and sorting, organized as a manual post-use operation, on site. Indeed, the low quantities of post-used products will require mixing with other waste streams, assisted by automation, with the risk of downgrading the quality of the outcome. Therefore, the main goal will be to massify all these products to avoid the blending with other LDPE sources for which traceability could not be guaranteed, contrary to the healthcare products.

Because of the formulation, the “blended” option will likely face challenges to identify a suitable valorization route. Application opportunities of this grade will likely be limited due to the dark color, from the black cable ties, even in small quantity (0.5 wt.%). Short-term recommendations shall be to eliminate this component from the blending to maintain the light color. A longer-term option because it is extremely resource intensive, could be a re-design and qualification on an alternative connection.

**5.3. Environmental Profiles of Different End of Life Scenarios**

A comparative LCA was performed to compare the chemical recycling vs. mechanical recycling vs. incineration with energy recovery by considering 1 kg of “rLDPE\_Blend” treated. The methodology is presented in Supplementary File S2. The overall scope is presented in Supplementary File S3 and the main assumptions and life cycle inventory are presented in Supplementary File S4. As incineration with energy recovery is the current waste stream, it is considered as the reference scenario. The mechanical and chemical recycling are considered as two different scenarios.

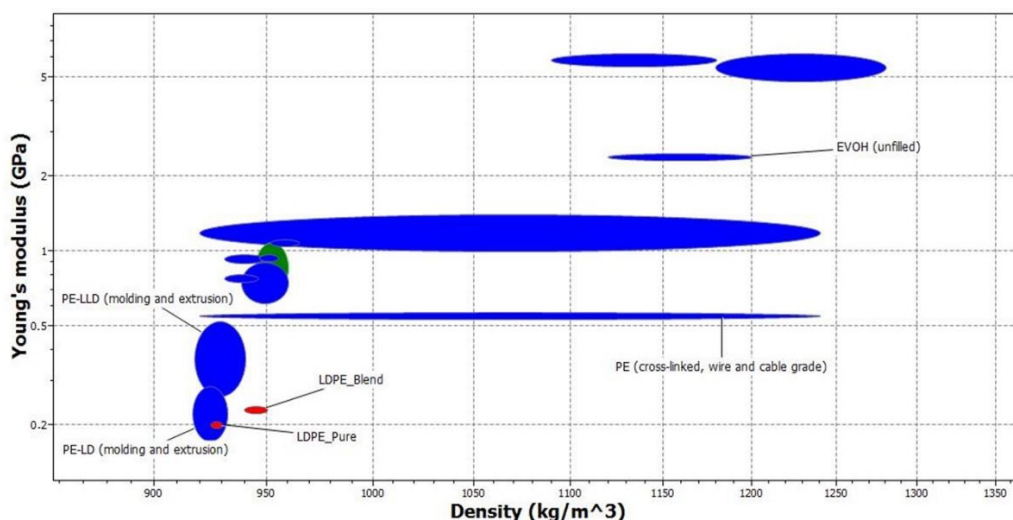


Fig. 9. Tensile test of rLDPE\_Blend grade.

As shown in Fig. 10, the incineration seems to present a similar profile than the mechanical recycling of “rLDPE\_Blend” for the climate change short term (GWP100 method) impact. Nevertheless, as illustrated for the mineral resources use, the mechanical recycling for the “rLDPE\_Blend” seems to have a better profile for most of the indicators compared to the incineration and chemical recycling.

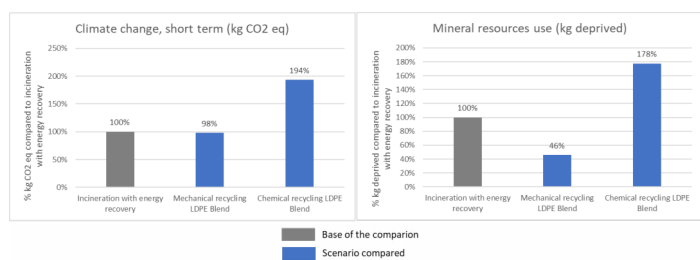


Fig. 10. Comparative LCA results of mechanical treatment vs. incineration vs. chemical treatment for 1 kg of SUA treated, for two mid-point indicators, climate change short term and mineral resources use (IMPACT World + Midpoint V1,01)

A sensitivity analysis is proposed by assessing “rLDPE\_Pure” and “rLDPE\_Blend”. The overall results are disclosed in Supplementary File S5. If we focus on mechanical and chemical treatments, results show that for 1 kg of recycled LDPE in the output of the processes, all mid-point indicators are in favor of mechanical recycling, as illustrated in Fig. 11.

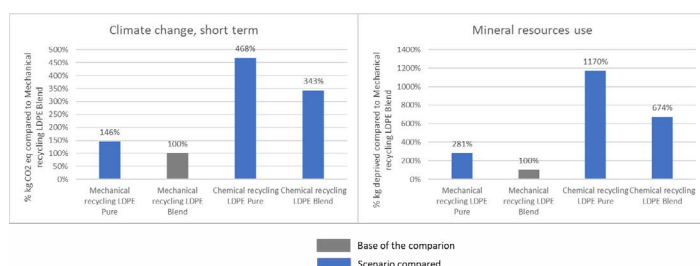


Fig. 11. Comparative LCA results of mechanical treatment vs. chemical treatment by considering “rLDPE Blend” and “rLDPE Pure” for 1 kg of LDPE recycled, for two mid-point indicators, climate change short term and mineral resources use (IMPACT World + Midpoint V1,01)

From the different data generated by the LCA, we can assume that the chemical recycling has the worst environmental footprint. The mechanical recycling is not worse than the incineration for most of the environmental aspects. However, the calculations were performed

based on literature data for all types of recycling. As chemical recycling is still in the pilot phase, the data and hypothesis related to this process remain uncertain, unlike the incineration and the mechanical recycling which are well implemented. The chemical recycling presents the advantage to provide a virgin-like material and choice of material between chemically or mechanically recycled material should be discussed in terms of balance between final use property requirements, targeted environmental benefits, and costs.

In a circular perspective, mechanical and chemical recycling present the advantage of keeping the material in the loop in contrast to incineration which is not circular even with energy recovery<sup>[33]</sup>. Main difference between chemical and mechanical recycling is linked to the recycled material in output, and also to the readiness level of chemical recycling technologies thus to environmental data available at scale. Depending on the requirements, the choice of a material will be based on its performance. In an eco-design perspective, such material selection should be decided at early design stages based on both their technical characteristics and their environmental footprint.

### 6. Conclusions

Through this study, we highlighted that recycled plastics from Single Use Assembly (SUA) for bioprocessing could technically be oriented to second use with similar physical properties (films, bags, pipes and fittings, profiles, and flexible sheets), provided an appropriate sorting and massification solution is identified.

This outcome is true only for SUA made of LDPE film as pure as possible. The result can be very different for multilayer films with various plastics. Even if the technical feasibility is shown through this study, several challenges remain. The trade-off between the quality and quantity of the recycled plastic needs to be further evaluated. The cost and efficiency of sorting is another area that needs to be addressed.

The comparative LCA, based on a theoretical framework, shows that mechanical recycling for end of life presents the advantage of keeping material in the loop and does not show a significant statistical difference compared to incineration with regards to the climate change indicator.

The lack of accurate data (e.g., production volume, energy consumption, quantities of emissions), related to the emergence of this new circular scheme product, is one limit of this LCA. To assess the whole environmental impact, using different logistic scenarios to ensure the economic viability from a cost perspective, would require a more detailed cradle-to-cradle LCA, with more accurate data (raw materials, SUA production, location use, waste treatment streams), with relevant stakeholders, when the recycling scheme at scale will be defined.

Table 7. Comparison of physical and mechanical properties of rLDPE\_Pure and rLDPE\_Blend grades produced versus virgin and commercial recycled grade

Properties	Test Method	rLDPE_Pure	rLDPE_Blend	LDPE_V <sup>1</sup>	LDPE_R <sup>2</sup>	Unit
Density	ISO 1183	927 ± 2	945 ± 5	932	915–970	kg/m <sup>3</sup>
Melt flow rate	ISO 1133 (190 kg; 2.16 kg)	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.05	0.8	2–5	g/10 min
Young module		200 ± 5	231 ± 1	620	199	MPa
Tensile stress at yield	ISO 527	13.4 ± 0.37	11.4 ± 0.37	18	10.1	MPa
Tensile stress at break		12.5 ± 0.7	11.8 ± 0.05	N.R.	N.R.	MPa
Elongation at break		334.1 ± 13	217.9 ± 3	700	75	%
Flexural modulus	ISO 178	178 ± 7	179 ± 3	N.R.	N.R.	MPa
Charpy notched	ISO 179	48.5 ± 0.75	47.6 ± 1.8	30	30	kJ/m <sup>2</sup>
Ash content	ISO 3451-1	0.37 ± 0.005	0.38 ± 0.5	0	N.R.	%

<sup>1</sup>: SABIC®LLDPE 6135BE-used for extrusion. <sup>2</sup>:A commercial recycled grade.

## References

1. Beran, D.; Lazo-Porras, M.; Mba, C.M.; Mbanya, J.C. A global perspective on the issue of access to insulin. *Diabetologia* 2021, *64*, 954–962. [CrossRef] [PubMed]
2. Emanuel, E.J.; Buchanan, A.; Chan, S.Y.; Fabre, C.; Halliday, D.; Heath, J.; Herzog, L.; Leland, R.J.; McCoy, M.S.; Norheim, O.F.; et al. What are the obligations of pharmaceutical companies in a global health emergency? *Lancet* 2021, *398*, 1015–1020. [CrossRef] [PubMed]
3. Nussbaum, A.K. Ethical corporate social responsibility (CSR) and the pharmaceutical industry: A happy couple? *J. Med. Mark. Device Diagn. Pharm. Mark.* 2009, *9*, 67–76. [CrossRef]
4. D'Amato, M.; Cecchi, L.; Annesi-Maesano, I. Climate change and respiratory diseases. *Eur. Respir. Rev.* 2014, *23*, 161–169. [CrossRef] [PubMed]
5. Ogden, N.H.; Gachon, P. Climate change and infectious diseases: What can we expect? *Can. Commun. Dis. Rep.* 2019, *45*, 76–80. [CrossRef]
6. Leddin, D.; Macrae, F. *Climate Change*. *J. Clin. Gastroenterol.* 2020, *54*, 393–397. [CrossRef]
7. Eckelman, M.J.; Huang, K.; Lagasse, R.; Senay, E.; Dubrow, R.; Sherman, J.D. *Health Care Pollution And Public Health Damage In The United States: An Update*. *Health Aff.* 2020, *39*, 2071–2079. [CrossRef]
8. Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 2006, *76*, 122–159. [CrossRef]
9. Larsson, D.J.; de Pedro, C.; Paxeus, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 2007, *148*, 751–755. [CrossRef] [PubMed]
10. Phillips, P.J.; Smith, S.G.; Kolpin, D.W.; Zaugg, S.D.; Buxton, H.T.; Furlong, E.; Esposito, K.; Stinson, B. *Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents*. *Environ. Sci. Technol.* 2010, *44*, 4910–4916. [CrossRef]
11. Daouk, S.; Chèvre, N.; Vernaz, N.; Widmer, C.; Daali, Y.; Fleury-Souverain, S. Dynamics of active pharmaceutical ingredients loads in a Swiss university hospital wastewaters and prediction of the related environmental risk for the aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 2016, *547*, 244–253. [CrossRef] [PubMed]
12. Azuma, T.; Arima, N.; Tsukada, A.; Hirami, S.; Matsuoka, R.; Moriwake, R.; Ishiuchi, H.; Inoyama, T.; Teranishi, Y.; Yamaoka, M.; et al. Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Sci. Total Environ.* 2016, *548–549*, 189–197. [CrossRef] [PubMed]
13. Wiegel, S.; Aulinger, A.; Brockmeyer, R.; Harms, H.; Löffler, J.; Reincke, H.; Schmidt, R.; Stachel, B.; von Tümpling, W.; Wanke, A. *Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries*. *Chemosphere* 2004, *57*, 107–126. [CrossRef] [PubMed]
14. Wilkinson, J.L.; Boxall, A.B.A.; Kolpin, D.W.; Leung, K.M.Y.; Lai, R.W.S.; Galbán-Malagón, C.; Adell, A.D.; Mondon, J.; Metian, M.; Marchant, R.A.; et al. *Pharmaceutical pollution of the world's rivers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2022, *119*, e2113947119. [CrossRef] [PubMed]
15. Luu, D.-N.; Gachet, H.; Maier, C.-J.; Maranzana, N.; Aoussat, A. *Eco-design and medicine: Opportunities to implement eco-design in the pharmaceutical R&D process*. *J. Clean. Prod.* 2022, *365*, 132785. [CrossRef]
16. ICH. *Q 7 Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients*; ICH: Geneva, Switzerland, 2006; Volume 48.
17. Steinberg, F.M.; Raso, J. *Biotech pharmaceuticals and biotherapy: An overview*. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2000, *1*, 48–59.
18. Galliher, P.M. Chapter 29-Single Use Technology and Equipment. In *Biopharmaceutical Processing*; Jagschies, G., Lindskog, E., Ła, cki, K., Galliher, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 557–577. ISBN 978-0-08-100623-8.
19. Evens, R.; Kaitin, K. *The Evolution Of Biotechnology And Its Impact On Health Care*. *Health Aff.* 2015, *34*, 210–219. [CrossRef]
20. Lopes, A.G. *Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations*. *Food Bioprod. Process* 2015, *93*, 98–114. [CrossRef]
21. Kis, Z.; Rizvi, Z. *How to Make Enough Vaccine for the World in One Year*; Public Citizen: Washington, DC, USA, 2021; p. 37.
22. Rader, R.A.; Langer, E.S. *Upstream Single-Use Bioprocessing Systems*. *BioProcess Int.* 2012, *10*, 12–18.
23. WHO *Health-Care Waste*. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste> (accessed on 1 March 2022).
24. Ganesh, K.A.; Anjana, K.; Hinduja, M.; Sujitha, K.; Dharani, G. *Review on plastic wastes in marine environment—Biodegradation and biotechnological solutions*. *Mar. Pollut. Bull.* 2020, *150*, 110733.
25. Almroth, B.C.; Eggert, H. *Marine Plastic Pollution: Sources, Impacts, and Policy Issues*. *Rev. Environ. Econ. Policy* 2019, *13*, 317–326. [CrossRef]
26. Abbott, J.K.; Sumaila, U.R. *Reducing Marine Plastic Pollution: Policy Insights from Economics*. *Rev. Environ. Econ. Policy* 2019, *13*, 327–336. [CrossRef]
27. Thompson, R.C.; Moore, C.J.; vom Saal, F.S.; Swan, S.H. *Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2009, *364*, 2153–2166. [CrossRef] [PubMed]
28. Wright, S.L.; Kelly, F.J. *Plastic and Human Health: A Micro Issue?* *Environ. Sci. Technol.* 2017, *51*, 6634–6647. [CrossRef]
29. Waring, R.; Harris, R.; Mitchell, S. *Plastic contamination of the food chain: A threat to human health?* *Maturitas* 2018, *115*, 64–68. [CrossRef]
30. Li, P.; Wang, X.; Su, M.; Zou, X.; Duan, L.; Zhang, H. *Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2020, *107*, 577–584. [CrossRef]
31. Vanapalli, K.R.; Sharma, H.B.; Ranjan, V.P.; Samal, B.; Bhattacharya, J.; Dubey, B.K.; Goel, S. *Challenges and strategies for effective plastic waste management during and post COVID-19 pandemic*. *Sci. Total Environ.* 2020, *750*, 141514. [CrossRef] [PubMed]
32. Matthews, C.; Moran, F.; Jaiswal, A.K. *A review on European Union's strategy for plastics in a circular economy and its impact on food safety*. *J. Clean. Prod.* 2020, *283*, 125263. [CrossRef]
33. *Ellen MacArthur Foundation Circularity Definitions*; Ellen MacArthur Foundation: Cowes, UK, 2020; p. 13.
34. *ISO 18604:2013; Packaging and the Environment—Material Recycling*. ISO: Geneva, Switzerland, 2013; p. 18.
35. Achilias, D.S.; Roupakias, C.; Megalokonomos, P.; Lappas, A.A.; Antonakou, E.V. *Chemical recycling of plastic wastes made from polyethylene (LDPE and HDPE) and polypropylene (PP)*. *J. Hazard. Mater.* 2007, *149*, 536–542. [CrossRef]
36. Fra, czak, D. *Chemical Recycling of Polyolefins (PE, PP): Modern Technologies and Products*; IntechOpen: London, UK, 2021; ISBN 978-1-83969-681-7.
37. Jeswani, H.; Krüger, C.; Russ, M.; Horlacher, M.; Antony, F.; Hann, S.; Azapagic, A. *Life cycle environmental impacts of chemical recycling via pyrolysis of mixed plastic waste in comparison with mechanical recycling and energy recovery*. *Sci. Total Environ.* 2021, *769*, 144483. [CrossRef]
38. Solis, M.; Silveira, S. *Technologies for chemical recycling of household plastics—A technical review and TRL assessment*. *Waste Manag.* 2020, *105*, 128–138. [CrossRef] [PubMed]
39. Maris, J.; Bourdon, S.; Brossard, J.-M.; Cauret, L.; Fontaine, L.; Montebault, V. *Mechanical recycling: Compatibilization of mixed thermoplastic wastes*. *Polym. Degrad. Stab.* 2018, *147*, 245–266. [CrossRef]
40. Repetto, R.; Munk, M.; Brown, S.; Carter, J.; Guldager, N.; Julien, C.; Low, D.; Markovic, I.; Martin, J.; Priebe, P.; et al. *PDA Technical Report No. 66, (TR 66) Application of Single-Use Systems in Pharmaceutical Manufacturing (Single User Digital Version)*; PDA: Bethesda, MD, USA, 2014; ISBN 978-0-939459-69-8.
41. *ASQ 834 2021 0115; What Is the Most Common Disposition Method for Your Company's Single-Use Waste?* Aspen Media: Lake Dallas, TX, USA, 2021.
42. Rogge, P.; Müller, D.; Schmidt, S. *The Single-Use or Stainless Steel Decision Process*. *BioProcess Int.* 2015, *13*, 10–15.
43. Barbaroux, M.; Horowski, B.; Mokuolu, S.; Petrich, M.A.; Whitford, W.G.; BPSA; Flanagan, B. *The Green Imperative Part One: Life-Cycle Assessment and Sustainability for Single-Use Technologies in the Biopharmaceutical Industry*. *BioProcess Int.* 2020, *18*, 12–19.
44. Gupta, P.; Monge, M.; Boulais, A.; Chopra, N.; Hutchinson, N. *Single-Use Process Platforms for Responsive and Cost-Effective Manufacturing*. *Single-Use Technol. Biopharm. Manuf.* 2019, 201–210. [CrossRef]
45. Jacquemart, R.; Vandersluis, M.; Zhao, M.; Sukhija, K.; Sidhu, N.; Stout, J. *A Single-use Strategy to Enable Manufacturing of Affordable Biologics*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2016, *14*, 309–318. [CrossRef] [PubMed]
46. Kappel, W.; Vadavi, B.; Lodha, S.; Karrer, D. *Application of Single-Use Equipment for Buffer Storage and Distribution in Medium Size MAb Production Facility*. *Pharm. Eng.* 2014, *34*, 9.
47. Delaunay, L.; Jurkiewicz, E.; Greller, G.; Barbaroux, M. *How to Design and Qualify an Improved Film for Storage and Bioreactor Bags*. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 229–234. ISBN 978-1-119-47789-1.
48. Vachette, E.; Fenge, C.; Cappia, J.-M.; Delaunay, L.; Greller, G.; Barbaroux, M. *Robust and Convenient Single-Use Processing: The Superior Strength and Flexibility of Flexsafe Bags*. *BioProcess Int.* 2014, *12*, 38–42.
49. Júnior, L.M.; de Oliveira, L.M.; Bócoli, P.F.J.; Cristianini, M.; Padula, M.; Anjos, C.A.R. *Morphological, thermal and mechanical properties of polyamide and ethylene vinyl alcohol multilayer flexible packaging after high-pressure processing*. *J. Food Eng.* 2020, *276*, 109913. [CrossRef]
50. Niaoounakis, M. *Recycling of Flexible Plastic Packaging*; William Andrew: Norwich, NY, USA, 2019; ISBN 978-0-12-816603-1.
51. *Plastics Recyclers Europe PE Flexible Films Recycling: New Findings for Functional Barriers—EVOH Properties Tested*. Available online: <https://recyclclass.eu/news/pe-flexible-films-recycling-new-findings-for-functional-barriers-evoh-properties-tested/> (accessed on 21 June 2022).
52. *ISO 179-2:2010; Plastics—Determination of Charpy Impact Properties—Part 2: Instrumented Impact Test*. ISO: Geneva, Switzerland, 2010; p. 23.
53. Jung, M.R.; Horgen, F.D.; Orski, S.V.; Rodriguez, V.; Beers, K.L.; Balazs, G.H.; Jones, T.T.; Work, T.M.; Brignac, K.C.; Royer, S.-J.; et al. *Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms*. *Mar. Pollut. Bull.* 2018, *127*, 704–716. [CrossRef]
54. *ISPE ISPE Good Practice Guide: Single-Use Technology*; ISPE: Bethesda, MD, USA, 2018; p. 180.
55. *ISO 1183-1:2012; Plastics—Methods for Determining the Density of Non-Cellular Plastics — Part 1: Immersion Method, Liquid Pycnometer Method and Titration Method*. ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
56. *ISO 1133-1:2011; Plastics—Determination of the Melt Mass-Flow Rate (MFR) and Melt Volume-Flow Rate (MVR) of Thermoplastics—Part 1: Standard Method*. ISO: Geneva, Switzerland, 2011.
57. *ISO 527-2:2012; Plastics—Determination of Tensile Properties—Part 2: Test Conditions for Moulding and Extrusion Plastics*. ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
58. *ISO 178:2010; Plastics—Determination of Flexural Properties*. ISO: Geneva, Switzerland, 2010; p. 20.
59. Alipour, N.; Gedde, U.W.; Hedenqvist, M.S.; Yu, S.; Roth, S.; Brüning, K.; Vieyres, A.; Schneider, K. *Structure and properties of polyethylene-based and EVOH-based multilayered films with layer thicknesses of 150nm and greater*. *Eur. Polym. J.* 2015, *64*, 36–51. [CrossRef]
60. Nasri, Y.; Benaniba, M.T.; Bouquey, M. *Elaboration and characterization of polymers used in flexible multilayer food packaging*. *Mater. Today Proc.* 2022, *53*, 91–95. [CrossRef]
61. *Netzsch. The Handbook DSC on Polymers*; Netzsch: Selb, Germany, 2015.
62. Salehiyan, R.; Bandyopadhyay, J.; Ray, S.S. *Mechanism of Thermal Degradation-Induced Gel Formation in Polyamide 6/Ethylene Vinyl Alcohol Blend Nanocomposites Studied by Time Resolved Rheology and Hyphenated Thermogravimetric Analyzer Fourier Transform Infrared Spectroscopy Mass Spectroscopy: Synergistic Role of Nanoparticles and Maleic-anhydride-Grafted Polypropylene*. *ACS Omega* 2019, *4*, 9569–9582. [CrossRef] [PubMed]



# PENSEZ ENGAGEMENT DURABLE AVEC CONTEC.



## Engagement durable.

Contec relève le défi pour un engagement durable tout en maintenant un environnement stérile, par de petits changements qui s'avèrent nécessaires.

Contec s'engage à utiliser des sources d'énergie alternatives, à réduire le volume des déchets mis en décharge, à utiliser des emballages recyclables et à développer de nouveaux produits innovants fabriqués à partir de produits recyclés.

Pour recevoir une copie de notre rapport RSE 2022, avec des informations sur nos nouvelles ReFIBE lingettes présaturées entièrement fabriquées à partir de bouteilles en plastique recyclées et nos projets pour continuer à agir dans le bon sens pour notre planète - consultez [international.contecinc.com/eu/sustainability](https://international.contecinc.com/eu/sustainability)



*Quand le nettoyage est primordial*

 **CONTEC**<sup>®</sup>  
CLEANROOM