



Kontrola sterilnosti pri proizvodnji celičnih pripravkov CAR T

Nataša Švent - Kučina, Ivana Velimirović

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo



Kdaj je potrebna kontrola sterilnosti

- namen: zagotavljanje skupnih standardov za kakovost zdravil in njihovih sestavin
- vzorci:
 - pripravki, materiali, predmeti
 - celični pripravki CAR T

farmakopeja → predpisi za razvoj, izdelavo, preskušanje kakovosti zdravil in njihovih sestavin, podatki o uporabi zdravil

- **Evropska farmakopeja (EP)**, določa: Konvencija Sveta Evrope, l. 1964; izdaja: Evropski direktorat za kakovost zdravil; od l. 1997 obvezna v SLO
- **Formularium Slovenicum** (SLO dodatek EP), izdaja: JAZMP; SLO terminologija, predpisi, pomembni za SLO farmacevtsko stroko



Preiskava na sterilnost

- EP 2.6.1 Sterility
- EP 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations
- ustreza EP: zagotavljamo da v preiskovanem vzorcu nismo našli kontaminantov
- omejitve metode: ne zazna vseh mikroorganizmov
 - virusov
 - bakterij, ki za rast potrebujejo posebne pogoje (npr. mikoplazme, klostridiji, mikobakterije, legionele)
 - parazitov
 - bakterijskih endotoksinov
- mikoplazme (qPCR), bakterijski endotoksini (hitri kromatogeni test)



Pogoji za izvajanje preiskave na sterilnost

aseptični pogoji

- prostori in oprema
- čiščenje
- dekontaminacija
- izobražen kader
- stalen nadzor





vrsta in volumen vzorca	najmanjši dovoljen volumen vzorca za neposredno zasejanje	volumen gojišča (TIO, TSB)
tekočine		
< 1 mL	celoten volumen	9 mL
1-40 mL	½ volumna vzorca, ne < 1mL	9 mL ali več
>40 do < 100 mL	20 mL	180 mL
> 100 mL	10 % volumna vzorca, ne < 20 mL	180 mL ali več
tekočine z dodanim antibiotikom	1 mL	9 mL

- neposredno zasejanje – kvalitativna metoda
 - min volumen vzorca za zasejanje - odvisen od celotnega volumna vzorca:
 - tekoče gojišče TIO 35°C, 14 dni
 - tekoče gojišče TSB 25°C, 14 dni → opazujemo motnost gojišča
 - motna gojišča precepimo na KA, ID kolonije (MALDI TOF MS), atb
- membranska filtracija – kvantitativna metoda



vrsta in volumen vzorca	najmanjši dovoljen volumen vzorca za membransko filtracijo	membrana filtra (0,45 µL)
tekočine		
< 1 ml	celoten volumen	
1-40 ml	½ volumna vzorca, ne < 1ml	
>40 do < 100 ml	20 ml	
> 100 ml	10 % volumna vzorca, ne < 20 ml	
tekočine z dodanim antibiotikom	1 ml	

- vzorci ki vsebujejo antibiotike – potrebna inaktivacija npr. kazein pepton



Alternativne metode testiranja na sterilnost

- EP 2.6.27 Microbiological examination of cell-based preparations
- izbira metode odvisna od proizvodnega procesa in končnega pripravka

- avtomatiziran hemokulturni sistem, 7 dni
 - Bact/Alert 3D Dual T (Biomérieux): 32,5°C, iAST in iNST + 22,5°C, iAST; ≤10mL/stekleničko (komercialni proizvodi CAR T odobritev EMA in FDA)
 - BD Bactec FX (Becton Dickinson): 35°C, Ped Plus; 1-3 mL/stekleničko ± FOS (vzorci krvi, izjema primarno sterilne kužnine v BD BACTEC™ Myco/F Lytic Culture)

- pred kultivacija v tekočem gojišču + molekularna metoda, 2 dni
- neposredno testiranje z molekularno metodo, 1 dan



avtomatiziran hemokulturni sistem (*Vir: arhiv IMI*)



- zaprt sistem
- čas inkubacije 7 dni
- krajši čas do zaznave pozitivnega rezultata (ang. time to positivity, TTP)
- gojišče vsebuje snovi, ki inaktivirajo antibiotike



Testiranje sterilnosti v avtomatiziranem hemokulturnem sistemu

- min volumen vzorca zasejanega v HK (aerobno + anaerobno) - odvisen od celotnega volumna celičnega pripravka (EP 2.6.27)
 - ≥ 10 do ≤ 1000 mL \rightarrow 1 % celotnega volumna
 - od ≥ 1 do ≤ 10 mL \rightarrow 100 μ L
 - < 1 mL - testa sterilnosti ne moremo izvesti
- počasna rast (najserija, hemofilus, plesni) \rightarrow zmanjšana tvorba CO₂ \rightarrow ob zaključku inkubacije:
 - preverimo rast plesni v gojišču (*Penicillium*)
 - direktni mikroskopski preparat \rightarrow precepimo na KA, ČA_{CO₂} /TSA
- izbiro gojišč in pogoje inkubacije prilagodimo volumnu, vrsti vzorca



Primerjava klasične metode, Bactec FX in BactAlert 3D Dual T testiranja vzorcev na sterilnost

Detection of Product Sterility Contaminants

Journal of Clinical Microbiology

118 izolatov (77 bakterij (52 grampozitivnih, 25 gramnegativnih), 8 kvasovk, 33 plesni), < 100 CFU v PBS

TABLE 2 Positive detection of isolates within acceptable time frames and at 360 h

System and temperature	Positive detection (%) ^a							
	Gram-positive bacteria (n = 52)		Gram-negative bacteria (n = 25)		Fungi (n = 41)		Total (n = 118)	
	Acceptable time frame	<360 h	Acceptable time frame	<360 h	Acceptable time frame	<360 h ^b	Acceptable time frame	<360 h ^b
Manual method								
Both at 30–35°C	92.3	98.1	72.0	80.0	36.6	39.0	68.6	73.7
Both at 20–25°C	69.2	96.2	56.0	92.0	85.4	87.8	72.0	92.4
TSB at 20–25°C and Thiol broth at 30–35°C ^c	86.5	100	76.0	96.0	87.8	90.2	84.7	95.8
BacT/Alert								
Both at 32.5°C	94.2	98.1	72.0	88.0	63.4	70.7 (78.0)	78.8	86.4 (89.0)
Both at 22.5°C	48.1	80.8	60.0	80.0	56.1	80.5 (87.8)	53.4	80.5 (83.1)
Aerobic at 22.5°C and anaerobic at 32.5°C	65.4	94.2	68.0	88.0	58.5	80.5 (87.8)	63.6	88.1 (90.7)
Bactec, both at 35°C	76.9	82.7	72.0	72.0	43.9	46.3 (56.1)	64.4	67.8 (71.2)
SDA plates at 20–25°C	NA ^d	NA	NA	NA	100	100	NA	NA

^aAn acceptable time frame was defined as detection in <96 h for bacteria and <144 h for fungi.

^bValues for visual inspection of bottles from the automated systems are included in parentheses.

^cThe compendial USP<71> method consists of TSB incubated at 20 to 25°C and Thiol broth incubated at 30 to 35°C.

^dNA, not applicable (SDA plates were set up only for fungal isolates).

0,1 mL na SDA pri 20-25°C

England et al, 2019. JCM e01548-18



Posebnosti vzorcev celičnih pripravkov CAR T

- ATMP → vsi postopki (prostori, oprema, aparature, kader) morajo ustrezati standardom za dobro proizvodno prakso v farmaciji (presoje JAZMP!)
- GSO → dovoljenje za delo z GSO v zaprtem sistemu
- kratek rok trajanja ATMP; 36h → **pristop na osnovi tveganja** - test na sterilnost 3x v vsakem proizvodnem postopku
 - vhodni material (levkaferezni pripravek) **0. dan** (0,5-2,8 mL)
 - med procesom **5. dan proizvodnje** (medprocesna kontrola)
 - končni pripravek **12. dan** (≤ 1 mL oz. višek celic po pripravi odmerka zdravila za bolnika (ATMP), redčimo z gojiščem za gojenje celic do 1mL za inokulacijo HK)
→ končni rezultat znan, ko je bolnik že prejel ATMP!
- majhen volumen vzorca 0,5-3 mL (1 % volumna celičnega pripravka!)
 - katere patogene pričakujemo (vrsta gojišča, pogoji inkubacije)?
 - koliko stekleničk lahko inokuliramo?

EudraLex, Vol 4, EP 2.6.27

ZRGSO, UL RS, št. 67/02 (26. 7. 2002)



Postopek validacije

- proizvajalec: osnovna validacija (robustnost metode)
- izvajalec:
 - validacija za namen uporabe metode (testiranje sterilnosti celičnih pripravkov CAR T) **in**
 - ob vsaki spremembi proizvodnega postopka
- občutljivost in specifičnost: meja zaznave, na volumnih vzorca 0,5-3 mL/stekleničko, TTP
- testni sevi iz mednarodne zbirke referenčnih kultur (npr. American Type Culture Collection, ATCC)
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - *Clostridium sporogenes* ATCC 19404
 - *Candida albicans* ATCC 10231 - *Bacteroides fragilis* ATCC25285
 - *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (ustrezna dekontaminacija!)
 - nabor prilagodimo predhodnim izolatom iz celic CAR T
- znana konc. (≤ 100 CFU) + negativna kontrola
- vsaj 3 ponovitve nadomestni vzorci (buffy coat) **in**
- realni vzorci (levkaferezni pripravek, medprocesna kontrola, končni pripravek)



Testiranje sterilnosti v hemokulturnih sistemih na IMI

Medicinska fakulteta

INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO

Zaloška 4, 1000 Ljubljana, tel.: +386 1 543 74 00, fax: +386 1 543 74 01

predstojnik: prof. dr. Srečko Koren, dr. med.

Laboratorij za diagnostiko bolnišničnih infekcij in nadzor sterilnosti (BOL), tel: 01/ 543 74 30

Pošiljatelj: **BPK d.o.o.**

Zdravnik ni naveden

Datum sprejema: **27.02.2010 12:40**, datum izvida: **08.03.2010**

BPK-0355-2009, 26.02.2010, <ni naslova> (577803)



Protokol: **BS/544**

Status: **Končni**

Verzija: **1.00**

Točke za izvid: **21,5**

Izvid

Vzorec: **Popkovnična kri v gojišču Bact/ALERT** (odvzeto 26.02.2010 ob 19:00)

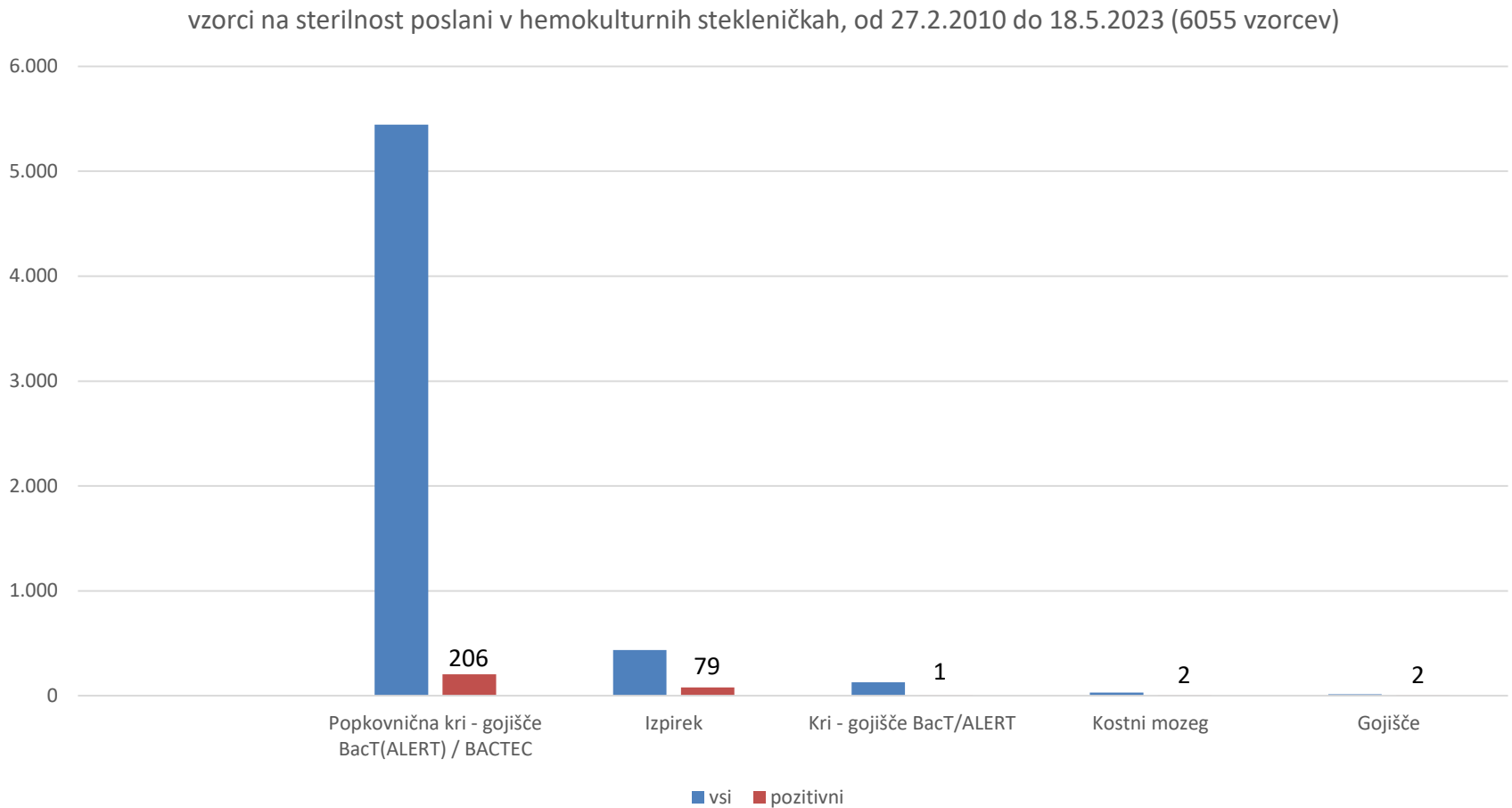
Hemokultura - preiskava popkovične krvi na sterilnost: **rast na zasejanem gojišču je odsotna.**

Bact/Alert (Biomérieux), 35°C, 7 dni, Bact/Alert VIRTUO/ Bact/Alert PF, 1-3 mL/stekleničko

BD Bactec FX (Becton Dickinson): 35°C, 7 dni, Bactec Peds Plus F; 1-3 mL/stekleničko ± FOS za vzorce brez krvi



Testiranje sterilnosti v hemokulturnih sistemih na IMI





vzorci na sterilnost v hemokulturnih sistemih (Bact/Alert, Bactec)

vsi 6055, pozitivni 290 (13 let)

popkovna kri, gojišča, izpirki, trombocitni pripravki

klasična preiskava na sterilnost, neposredno zasejanje

vsi 43312, pozitivni 84 (11 let)

raztopine, tekočine, gojišča (brez: bioloških materialov)

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	80	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
<i>Enterococcus faecalis</i>	53	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	27	<i>Staphylococcus warneri</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	24	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	24	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (beta hemolitični skupina B)	24	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	14	<i>Sphingomonas spp.</i>	2
<i>Streptococcus oralis</i> (skupina mitis)	12	<i>Staphylococcus capitis</i>	2
<i>Streptococcus anginosus</i> (skupina anginosus)	9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6
<i>Staphylococcus caprae</i>	5	<i>Streptococcus oralis</i> (skupina mitis)	2
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4	Plesni	3
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	3	ostalo	29
<i>Enterococcus faecium</i>	3		
<i>Lactobacillus crispatus</i>	3		
<i>Streptococcus salivarius</i> (skupina salivarius)	3		
<i>Actinomyces neuii</i>	2		
<i>Bifidobacterium longum</i>	2		
<i>Cutibacterium avidum</i> (<i>Propionibacterium avidum</i>)	2		
<i>Haemophilus influenzae</i>	2		
<i>Lactobacillus spp.</i>	2		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2		
<i>Streptococcus mitis</i> (skupina mitis)	2		
ostalo	23		



Protokol testiranja sterilnosti celičnih pripravkov CAR T

validacija metode s testnimi sevi in realnimi vzorci

- ✓ GSO
 - ✓ GMP
 - ✓ majhen volumen vzorca
 - ✓ kratek rok uporabnosti
- 1% volumna celotnega vzorca:
 - ✓ serum namenjen pripravi gojišča za gojenje celic
 - ✓ afarezni pripravek
 - ✓ medprocesna kontrola
 - ✓ končni celični pripravek/ ostanek celic po pripravi ATMP

otroška hemokulturna steklenička

satelitna enota BACTEC FX



< 1ml vzorca redčimo do 1mL
± FOS

+ 0,1 mL SDA, 25°C, 7 dni



POZITIVNO
ID na GLI IMI

35°C, 7 dni

NEGATIVNO

pregledamo na morebitno rast gliv
direktni mikroskopski preparat

±

ČAco₂, BAan, 35°C, 2 dni, (SDA, 25°C, 5 dni)

POZITIVNO

pregledamo na morebitno rast gliv
direktni mikroskopski preparat

(saponin MALDI TOF MS → končni pripravek)

KA, ČAco₂, BAan, (SDA)

ID MALDI TOF MS, atb



Hvala za pozornost!