

Biologisten lääkkeiden mikrobiologiset testimenetelmät

Farmakopeaseminaari 2023

Hanna Kankkonen, FT

Erikoistutkija (biologisten lääkkeiden laatu-arvioija)

Fimea – Myyntiluvat vastualue – Farmaseuttis-biologinen yksikkö – Biologinen jaosto

Biologisiin lääkkeisiin liittyviä Ph. Eur. monografioita / tekstejä ja EU/EMA ohjeistoja, joissa viittauksia Ph. Eur. mikrobiologisiin testeihin

Ph. Eur. monografia / yleisteksti / EU/EMA ohjeisto	Sterility 2.6.1	Microbial enum. 2.6.12	Microbiol. cell-based products 2.6.27	Microbiol. non-sterile 5.1.4	Alternative methods 5.1.6	Bacterial endotox 2.6.14	Myco- plasma 2.6.7	Mycobact 2.6.2
EP 0153 Vaccines for human use						X		
EP 2.6.16 Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use	X						X	X
EP 5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use	X						X	X
EP 1063 Allergen products	X			X				
EP 2031 Monoclonal antibodies for human use	X					X		
EP 0784 Products of recombinant DNA technology	"mikrobiologinen laatu"					"endotoksiinitesti"		
EP 2323 Human haematopoietic stem cells	X		X			X		
EP 2262 Bovine serum	X					X	X	
EP 5.2.12 Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products	X	X				X	X	
EP 5.14 Gene transfer medicinal products for human use	X	X	X			X	X	
<i>EP 3186 Gene therapy medicinal products for human use</i>								
<i>EP 5.32 Cell-based preparations</i>								
Guideline on human cell-based medicinal products <i>EMEA/CHMP/410869/2006</i>			X		X			

2.6.39 Ihmiskudosten mikrobiologiset testit

- Sovelletaan ihmiskudoksiin (2004/23/EY), ei koske verivalmisteita
- Menetelmän **valinta perustuu riskinarvioon** (kudostyyppi, alkuperä, hankinta- ja käsittelyvaiheet, erä koko, varastointi, kuljetus,...)
- **Näytteenotto**: kudoksen sisältä, pinnalta ja sen kanssa kosketuksissa olevista liuoksista, edustaa koko näytettä
- Mikrobiologinen laatu määritetään **2.6.1** tai **2.6.27** mukaan, vaihtoehtoiset menetelmät validoitava **5.1.6** mukaan
- Jos kudokset pitää vapauttaa ennen lopullista mikrobiologista testitulosta, voidaan käyttää **väliaikaista testitulosta** yhdessä prosessikontrollitulosten kanssa, testit suoritettava kuitenkin loppuun
- Riskiperusteisesti testataan myös mykoplasma (**2.6.7**), mykobakteerit (**2.6.2**) ja bakteeriendotoksiinit (**2.6.14, 2.6.30, 2.6.32**)
- Esimerkki: sarveiskalvon mikrobiologiset testit

2.6.27 Solupohjaisten valmisteiden mikrobiologiset testit

- Sovelletaan **tilanteissa jossa 2.6.1 ei ole teknisistä syistä mahdollinen** (kesto aika, näytemäärä); ei sovelleta verivalmisteisiin
- **Näytteen tulee edustaa koko valmistetta**: pelkkä kasvatus/säilytys/kuljetus-liuoksen testaus ei välttämättä riitä – mikrobikontaminaatio voi olla solun sisällä, pinnalla tai muissa valmisteen komponenteissa
- **Näytemäärän** tulee olla riittävä
- Menetelmä valitaan **valmisteen ominaisuuksien ja valmistusprosessin perusteella**
 - automatisoidut kasvuun perustuvat menetelmät
 - vaihtoehtoiset menetelmät (**5.1.6**)
 - **2.6.1 Sterility**

2.6.27 Solupohjaisten valmisteiden mikrobiologiset testit – Automatisoidut kasvuun perustuvat menetelmät

- **Menetelmäsopivuustesti** (spesifisyys, herkkyys, toistettavuus, robustisuus) tuotteen läsnä ollessa jokaiselle solupohjaiselle valmisteelle
 - Osoitetaan tunnetuilla mikrobeilla (≤ 100 CFU)
- Jokainen kasvatusliuoserä on testattava **kasvukontrollikokeella**
- Näytteet siirrostetaan kasvatusliuokseen (**aerobinen + anaerobinen**) ja
 - inkuboidaan **vähintään 7vrk** +30-37°C:ssa
 - lisäksi +20-25°C jos merkittävä riski ympäristön aiheuttamille kontaminaatioille
- Kasvatusliuosta tutkitaan **visuaalisesti / automaattisesti** vähintään päivittäin ja kasvatuksen loppuksi. Mikrobikasvua ei saa ilmetä.

2.6.27 Solupohjaisten valmisteiden mikrobiologiset testit – Vaihtoehtoiset menetelmät

- **Esikasvatus + nopea testimenetelmä:**
 - näytteitä inkuboidaan lyhyen aikaa (esim. 12-24h) aerobisessa ja anaerobisessa kasvatusmediumissa, sen jälkeen nopea testimenetelmä
- **Suorat testimenetelmät (5.1.6)**
 - silloin kun soluvalmisteen kesto aika hyvin lyhyt (tunteja) tai kun standardimenetelmällä ei saada luotettavaa tulosta
- **ESIM.** nukleiinihappojen monistustekniikat (NAT) (2.6.21), virtausytometria (2.7.24), bioluminesenssi (5.1.6)
- **Menetelmävalidointi 5.1.6** mukaisesti

5.1.6 Vaihtoehtoiset mikrobiologiset menetelmät

+ menetelmävalidointi

Esimerkkejä:

**Kasvuun
perustuvat
testit**

- Elektrokemialliset menetelmät (*impedanssin muutos*)
- Kaasun tuotantoon/kulutukseen perustuvat menetelmät (*sähkövarauksen / värin muutos*)
- **Bioluminesenssi** (*mikro-organismista vapautuneen ATP:n määrä*)
- Turbidimetria (*muutos sameudessa*)
- Valikoiva/indikatiivinen kasvatusalusta (*muutos värissä*)

**Suorat
mittaus-
menetelmät**

- Kiinteän faasin sytometria (*elinkykyisten mikrobien värjäys*)
- **Virtaussytometria** (*mikrobien värjäys fluorokromilla*)
- Suora epifluoresenssisuodatustekniikka (DEFT) (*mikrobien värjäys fluorokromilla*)
- Autofluoresenssi

**Solujen
analysointi**

- Fenotyyppitekniikat: immunologiset menetelmät, rasvahappo profiili, FTIR-spektroskopia, massaspektrometria, biokemialliset fysiologisiin reaktioihin perustuvat menetelmät
- Genotyyppitekniikat: suora hybridisointi, **NAT**, fingerprionting

2.6.7 Mykoplasmat

- **Viljelymenetelmä** (solu- ja viruspankit, kontrollisolut)
 - Jokainen mediuurä testattava tunnetuilla mikro-organismeilla
 - Inhiboivat aineet testattava jokaiselle valmisteelle + kun muutos valmistusmenetelmässä
 - Näytteiden inkubointi 35-38°C:ssa 14 pv maljalla **tai** 20-21 pv liuoksessa josta siirrostukset maljalle (4x) kasvatuksen kuluessa, viljely maljalla 7pv
 - Mykoplasmakolonioita ei saa ilmetä
- **Indikaattorisolu menetelmä** (solu/viruspankit, kontrollisolut, viruskeräys, bulk rokote, lopputuote)
 - Näyte siirrostetaan indikaattorisoluviljelmään (esim. Vero) jota inkuboidaan 35-38°C:ssa ≥ 3 pv + 3-5pv → värjäys fluoresoivalla DNA:han sitoutuvalla väriaineella
 - Mykoplasmalle tyypillistä fluoresenssia ei saa ilmetä
- **NAT testimenetelmä (2.6.21)**
 - Näytteestä eristettyjen nukleinihappojen monistus spesifisten alukkeiden avulla
 - Menetelmän validointi ohjeistettu
 - Ohjeita menetelmän vertailukelpoisuuden osoittamiseksi vs. viljely- ja indikaattorisolumenetelmät

Kiitos!