

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw S.A.M. Dijkma  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 07 juni 2016  
**KENMERK** CGM/160607-02  
**ONDERWERP** Advies Grootschalige productie van genetisch gemodificeerde adenovirale vectoren in een 'Single-Use Bioreactor'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van de vergunningaanvraag IG 16-050\_III-000 met als titel: 'Productie van adenovirale vectoren met behulp van PER.C6® cellen op grote schaal: "Intensified virus production (iVip)"' van Janssen Biologics B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige productie van replicatiedefectieve, genetisch gemodificeerde (gg-) adenovirale vectoren (AdVs) in een bioreactor voor eenmalig gebruik. Deze zogenaamde Single-Use Bioreactor (SUB) bestaat uit een kunststof bioreactorzak. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op MI-III niveau uit te mogen voeren.

Belangrijke aspecten bij de risicoanalyse van deze aanvraag zijn de kans op lekkage van de SUB en de kans op verspreiding van de gg-AdVs uit de productieruimte bij eventuele lekkage. De COGEM raadt normaliter aan de integriteitstest van de SUB onder de maximaal toelaatbare druk te laten plaatsvinden, daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten, de roerpeddel in werking te stellen en de druktest bij voorkeur te verrichten met het volume waarmee de kweek wordt uitgevoerd. Om antwoord te kunnen geven op de vraag of de SUB voldoende inperking biedt, of een lekkage een incidentele gebeurtenis is en of de door de aanvrager voorgestelde integriteitstest de lekdichtheid voldoende test, acht de COGEM het noodzakelijk dat de aanvrager aanvullende informatie geeft over de bioreactorzak, de integriteitstest van de producent, de validatie van de kill-tank en de overige afvalverwerkingsstromen.


Zoals voorgeschreven voor MI-III kan het volledige volume van de SUB opgevangen worden in de productieruimte zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden. De COGEM merkt op dat zelfs als replicatie deficiënte gg-AdVs onverhoopt uit de productieruimte in het milieu terecht komen, de kans op verdere verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein is.

Gezien de aard van het ggo en het feit dat de werkzaamheden op MI-III inperkingsniveau plaatsvinden, is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Grootschalige productie van genetisch gemodificeerde adenovirale vectoren in een ‘Single-Use Bioreactor’

## COGEM advies CGM/160607-02

### 1. Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag van Janssen Biologics B.V. voor de grootschalige productie van genetisch gemodificeerde (gg) adenovirale vectoren met behulp van animale cellen in een bioreactor voor eenmalig gebruik, de zogenaamde ‘Single-Use bioreactor’ (SUB). In plaats van de stalen reactorvaten wordt bij een SUB gebruik gemaakt van kunststof zakken. Vanwege het eenmalige gebruik van deze zakken is het risico op kruiscontaminatie bij opeenvolgende productieprocessen uitgesloten. Daarnaast hoeven zij na inactivatie niet schoongemaakt te worden, omdat ze na afloop worden vernietigd. De aanvrager wil voor de productie gebruik maken van een ‘G3pro systeem van Thermo Fisher in een Finesse setting’ voor producties van maximaal 1000 liter.<sup>1</sup> De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op MI-III inperkingsniveau. Het Bureau GGO heeft gevraagd of de gebruikte SUB gedurende het hele kweekproces voldoende inperking biedt voor de productie van de gg-AdVs, of de voorgestelde integriteitstesten voldoende inzicht geven in de mate van lektheid van de SUB en of lekkage van de SUB als een incidentele gebeurtenis beschouwd kan worden.

### 2. SUB's en risicoanalyse

SUB systemen voor grootschalige productie (> 20 L) bestaan doorgaans uit een kunststof zak die wordt opgehangen in een roestvrijstalen omhulsel. De kunststof zak bevat onder andere geïntegreerde buizen voor het toedienen en afnemen van medium, een druksensor, geïntegreerde inlaatopeningen voor additionele metingen waarbij gebruik gemaakt wordt van conventionele sensoren, en gasleidingen met filter. In sommige SUB's zijn bewegende onderdelen geïntegreerd. SUB's worden al langere tijd gebruikt in ondermeer de biofarmaceutische industrie.

Een aantal jaren geleden heeft Xendo Bioprocessing in opdracht van het toenmalige ministerie van VROM een rapport uitgebracht waarin een generieke risicoanalyse wordt geschetst voor de kweek van ggo's in SUB's.<sup>2</sup> Het rapport geeft aan dat bij het toepassen van SUB systemen ggo's op twee manieren vrij kunnen komen. Enerzijds kan lekkage van ggo's plaatsvinden ten gevolge van de aard van het systeem, de zogenaamde *construction containment risks*. Anderzijds kunnen ggo's vrijkomen bij operationele handelingen, de zogenaamde *operational containment risks*. Het rapport biedt diverse handvatten voor het uitvoeren van de risicoanalyse wanneer een SUB systeem in gebruik genomen wordt.

### 3. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden verschillende keren geadviseerd over grootschalige producties in SUBs op MI-III inperkingsniveau.<sup>3,4,5,6</sup> In 2010 heeft de COGEM geadviseerd over de grootschalige productie van gg-animale cellen in SUB's van 50, 250 en 1000 liter van de producent

Thermo Scientific Hyclone.<sup>3</sup> Om de kans op lekkage te minimaliseren, adviseerde de COGEM het SUB systeem voor de ingebruikname aan een integriteitstest te onderwerpen. Zij raadde daarvoor aan om de SUB onder maximale toelaatbare druk te plaatsen en daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten en de roerpeddel in werking te stellen. Zij gaf aan dat deze druktest bij voorkeur gedaan diende te worden met het kweekvolume waarmee de productie werd uitgevoerd. Met betrekking tot de aard van het ggo was de COGEM van mening dat de toegepaste ggo's apathogeen waren en niet in staat om buiten de SUB te overleven of te vermenigvuldigen. Concluderend achtte de COGEM de risico's van voorgenomen grootschalige productie op MI-III inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De COGEM heeft in 2011 tweemaal geadviseerd over grootschalige productie in een SUB. De eerste aanvraag betrof de grootschalige productie van humane monoklonale antilichamen met behulp van gg-PER.C6 cellen in een SUB van het type XDR.<sup>4</sup> De COGEM was van mening dat de betreffende gg-PER.C6 cellen apathogeen zijn en alleen onder laboratoriumcondities kunnen overleven en delen. Bij eventuele lekkage van het ggo uit de bioreactor achtte de COGEM de milieurisico's derhalve verwaarloosbaar klein. Zij was van mening dat de grootschalige productie veilig uitgevoerd kon worden op MI-I inperkingsniveau.

De andere aanvraag betrof de grootschalige productie van virale eiwitten met behulp van een zogenaamd baculovirusexpressiesysteem in een 500 liter SUB van het type Hyclone Hyc<sup>R</sup> CX5-14.<sup>5</sup> Omdat baculovirussen als klasse 2 pathogeen zijn ingedeeld en de ggo's in deze vergunningaanvraag geen IA of IAB erkenning hadden, moesten de werkzaamheden op inperkingsniveau MI-III plaatsvinden.

In 2015 heeft de COGEM geadviseerd over een grootschalige productie van diverse humane eiwitten en fusie-eiwitten met behulp van verschillende gg-cellijnen in een SUB van het type Sartorius Cultibag STR 500 L.<sup>6</sup> Op basis van de integriteitstest die de aanvrager voorafgaand aan de in gebruik name van de bioreactorzak uitvoert, de visuele inspecties en de aangebrachte elektronische beveiligingssystemen, achtte de COGEM de kans dat de bioreactorzak gaat lekken zeer klein. Zij merkte daarbij op dat de productieruimte zodanig geconstrueerd was, dat de volledige inhoud van de SUB opgevangen kan worden. De COGEM was daarom van mening dat de kans dat betreffende gg-cellen tijdens de werkzaamheden in het milieu terecht komen, verwaarloosbaar klein was.

#### **4. Overweging**

De aanvrager wil grootschalige producties uitvoeren met replicatiedefectief gg-AdVs met behulp van PER.C6 cellen. Bij de risicoanalyse spelen de volgende aspecten een belangrijke rol: de aard van het ggo, de kans op lekkage en de kans op verspreiding van het ggo buiten de MI-III ruimte.

##### **4.1 Aard van het ggo**

De aanvrager wil grootschalige producties uitvoeren met replicatiedefectieve gg-adenovirale vectoren op PER.C6 cellen. De cellen zijn afkomstig uit een embryonale retinacel en zijn geïmmortaliseerd met behulp van human adenovirus type 5 (HAdV-5) E1A en E1B gensequenties.<sup>7</sup> De aanvrager wil gg-adenovirale vectoren gebruiken die gebaseerd zijn op HAdV-26 of -35. In deze vectoren is de E1 sequentie vervangen door de afzonderlijke coderende sequenties van eiwitten uit *Human immunodeficiency virus 1*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human papillomavirus 16* en *18*, *Lake Victoria marburgvirus*, *Sudan ebolavirus* en *Zaire ebolavirus* en de Ebola Ivory Coast strain. De E1 regio is essentieel voor de virusreproductie. Zonder de genen uit de E1 regio kunnen de gg-AdVs alleen vermenigvuldigen in helpercellijnen waarin de E1 regio wordt gecompliceerd. Na complementatie zijn de vectoren infectieus en kunnen ze nieuwe cellen infecteren. Er kan echter geen nieuw virus geproduceerd worden in cellen die E1 niet tot expressie brengen. Daarnaast is in de gg-AdVs een deel van de E3 regio verwijderd en is de coderende sequentie van E4 het deel E4orf6/7 uitgewisseld met dat van HAdV-5. Werkzaamheden met deze gg-AdVs zijn eerder vergund op ML-II inperkingsniveau onder toepassing van enkele aanvullende voorschriften.

##### **4.2 De SUB**

De aanvrager wil voor de productie gebruik maken van een 'G3pro systeem van Thermo Fisher in een Finesse setting' voor producties van maximaal 1000 liter. De aanvrager geeft niet aan welk type bioreactorzak er gebruikt wordt voor de productie van de gg-AdVs.

In theorie bestaat er bij gebruik van een kweekstelsel bestaande uit kunststof zakken een verhoogde kans op lekkage (vergeleken met een conventioneel stalen systeem) waarbij het ggo kan vrijkomen. Deze lekkage kan bijvoorbeeld optreden als gevolg van scheurtjes in de zak. Volgens de aanvrager is de integriteit van de bioreactorzak door de producent getest en wordt voorafgaand aan de installatie van de bioreactorzak in het systeem de zak visueel geïnspecteerd op schade. Nadat de SUB volledig is opgebouwd, wordt deze zonder medium onderworpen aan een druktest. Vervolgens wordt de SUB gevuld met medium en wordt gedurende een nacht gemonitord of er lekkages zijn. Hierna wordt het systeem geïncubeerd met PER.C6 cellen. De gg-AdVs worden enige dagen later toegevoegd, waardoor het systeem al gedraaid heeft zonder dat er ggo's aanwezig zijn.

De aanvrager geeft verder aan dat er binnen het bedrijf ruime ervaring is met het gebruik van SUBs voor het kweken van cellen met virussen in 50 liter SUBs en dat de medewerkers getraind zijn om te werken met SUBs. Hij voegt hier aan toe dat het bedrijf in de Verenigde Staten twee succesvolle

runs gedraaid heeft met 1000 liter SUBs voor het genereren van monoclonale antilichamen. De aanvrager geeft aan dat er in het verleden verschillende incidenten beschreven zijn. Twee hiervan waren te wijten aan overdruk door een door schuim geblokkeerd afgasfilter. Dit wordt volgens de aanvrager voorkomen door een antischuimmiddel toe te voegen. Daarnaast wordt een druksensor aan het systeem toegevoegd waardoor bij een bepaalde overdruk de pomp stilgelegd wordt.

#### ***4.3 Inactivatie van het ggo***

Bij het toevoegen van het ggo aan het kweekmedium, het nemen van monster en het verversen van kweekmedium worden er geen open handelingen verricht. Na afloop van de productie worden de cellen gelyseerd in de SUB waarna het kweekmedium met het gg-AdV wordt gezuiverd totdat er een zuiver eindproduct met gg-AdVs is verkregen. Dit wordt vervolgens ingevroren.

De aanvrager geeft aan dat de gg-AdVs replicatiedefectief zijn en dat bij een grote spill ademwegbescherming wordt gedragen om blootstelling van de medewerker aan aerosolen te voorkomen.

De COGEM merkt op dat hoewel er inzicht wordt geboden in de procedures die gevolgd worden bij een spill, de gegevens over de validatie ontbreken. Ook is uit de aangeleverde stukken niet duidelijk hoe het overige afval geïnactiveerd wordt. Er zijn geen validatiegegevens over de kill-tank overlegd waarin de duur en de temperatuur van de inactivatie vermeld zijn. Op grond van deze gegevens kan niet met zekerheid worden geconcludeerd dat het gg-AdV effectief wordt geïnactiveerd.

#### ***4.4 Inperking van de gg-AdVs***

Zoals voorgeschreven voor MI-III is de productieruimte zodanig ingericht dat de volledige inhoud van de SUB binnen de productieruimte kan worden opgevangen. In de productieruimte is een afvoerput aanwezig waardoor de gelekte vloeistof direct in een kill-tank geloosd kan worden. Hierdoor kunnen eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo buiten het MI-III leiden.

De COGEM merkt op dat in de aanvraag alleen ingegaan wordt op de fabrikant van het controlesysteem dat gebruikt wordt voor de grootschalige productie, maar het type van de bioreactorzak niet wordt genoemd. Volgens de website van de fabrikant zijn er meerdere bioreactorzakken van 1000 liter in combinatie met het systeem te gebruiken.<sup>1</sup> Omdat de specificaties onbekend zijn en mogelijk afwijken van SUBs waar de COGEM eerder over heeft geadviseerd, is het onduidelijk of de gangbare integriteitstesten van toepassing zijn.

### **5. Advies**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mate van lekdichtheid van de SUB die gebruikt wordt voor de grootschalige productie van replicatiedefectieve gg-AdVs. Daarnaast is gevraagd of het beschreven systeem voldoende inperking biedt voor de productie van de replicatiedefectieve gg-AdVs. De COGEM kan deze vragen niet beantwoorden, omdat het type bioreactorzak en de

specificaties van de bioreactorzak onbekend zijn. Daarnaast is het niet duidelijk hoe de integriteit van het systeem door de producent getest is. Verder geeft de aanvrager niet aan of de druktest met een maximaal toelaatbare druk is uitgevoerd, hoe hoog deze druk is en hoe lang deze wordt gemonitord. De COGEM mist verder de gegevens over de validatie van de kill-tank en een beschrijving en validatie van de inactivatie van het overige afval.

Zoals voorgeschreven voor MI-III kan het volledige volume van de SUB opgevangen worden in de productieruimte zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden. De COGEM merkt op dat zelfs als replicatie deficiënte gg-AdVs onverhoopt uit de productieruimte in het milieu terecht komen, de kans op verdere verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein is.

Gezien de aard van het ggo en het feit dat de werkzaamheden op MI-III inperkingsniveau plaatsvinden, is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

## 6. Referenties

1. Finesse (2016). G3Pro universal. [www.finesse.com/products/smartcontrollers/bioreactor-controllers/g3pro-bioreactor-controllers/](http://www.finesse.com/products/smartcontrollers/bioreactor-controllers/g3pro-bioreactor-controllers/) (bezoekt: 2 juni 2016)
2. Xendo Bioprocessing (2010). GMO containment risks evaluation of single-use bioreactors
3. COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-use bioreactor. COGEM advies CGM/101028-03
4. COGEM (2011). Grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van PER.C6 cellen in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110503-01
5. COGEM (2011). Eiwitproductie in een Single-Use Bioreactor met behulp van baculovirusexpressiesysteem. COGEM advies CGM/111128-02
6. COGEM (2015). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in de 'Single-Use Bioreactor Sartorius STR'. COGEM advies CGM/150907-01
7. Fallaux FJ et al. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenovirus. Hum. Gene Ther. 9: 1909-1917