

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 3 mei 2010
KENMERK CGM/100503-01
ONDERWERP Advies: grootschalige productie van monoklonale antilichamen in een Single-Use Bioreactor

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking IG 10-003 en de vergunning-aanvraag, getiteld 'Productie grote schaal monoklonale humane antilichamen m.b.v PER.C6 celkweek', van Crucell Holland B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige productie van humane monoklonale antilichamen in een bioreactor voor eenmalig gebruik (de zogenaamde Single-Use Bioreactor, hierna SUB). Deze SUB bestaat uit een zak van hoogwaardig plastic die wordt opgehangen in een roestvrijstalen omhulsel. De werkzaamheden vinden onder MI-III inperkingsniveau plaats.

Hoewel er al veel ervaring is met de risicoanalyse voor stalen reactoren geldt dit niet voor SUB's. Risico's kunnen ontstaan wanneer een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) door een lekkage vrijkomt uit de bioreactor.

Voor de ingebuikname van de SUB voert de aanvrager een integriteitstest uit waarbij een met medium gevulde reactor overnacht wordt geplaatst om te controleren of er lekkages zijn ontstaan. Hoewel de COGEM van mening is dat deze methode een redelijk inzicht geeft in de mate van lektheid, stelt zij als aanvullende voorwaarde dat het systeem onder de maximale druk wordt getest met zoveel mogelijk aangesloten leidingen en sensoren.

Het grootste risico op lekkage ontstaat door overdruk op het systeem tijdens het volpompen van de zak. Een geïntegreerde druksensor moet ervoor zorgen dat de pomp boven een bepaalde druk uitschakelt om lekkage te voorkomen. Hoewel de COGEM van mening is dat de kans op verlies van ggo materiaal klein is, garandeert het gebruik van een druksensor niet dat er geen verlies optreedt.

Het door Crucell gebruikte ggo is apathogeen en niet in staat om buiten de reactor te overleven of te vermenigvuldigen. Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive 'Z' followed by a horizontal line that curves upwards at the end.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Grootschalige productie van monoklonale antilichamen in een Single-Use Bioreactor

COGEM advies CGM/100503-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag voor de grootschalige productie van humane monoklonale antilichamen met behulp van PER.C6 cellen. Voor de productie van deze antilichamen wenst Crucell Holland B.V. gebruik te maken van een bioreactor voor eenmalig gebruik (de zogenaamde Single-Use Bioreactor, hierna SUB) in plaats van een conventionele reactor van staal.

Bij het gebruik van een SUB is er mogelijk een verhoogde kans op lekkage, waarbij het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) kan vrijkomen. De COGEM heeft de integriteitstest van het SUB systeem, zoals deze wordt voorgesteld in onderhavige vergunningaanvraag, beoordeeld. Daarnaast heeft de COGEM gekeken naar de mogelijke risico's die gepaard gaan met het vrijkomen van het gebruikte ggo.

PER.C6 cellijn

De PER.C6 cellijn is een humane cellijn die is voortgekomen uit een embryonale retinacel.¹ De PER.C6 cellen zijn geïmmortaliseerd met behulp van adenovirus type 5E1A en E1B gen sequenties. Daarnaast bevat de cellijn een stabiele insertie van de sequentie van het te produceren monoklonale antilichaam. De PER.C6 cellen zijn apathogeen en kunnen alleen onder laboratoriumcondities gekweekt worden. Volgens de aanvrager zijn de cellen bij lagere omgevingstemperaturen en afwezigheid van voedingsstoffen niet in staat te overleven en te reproduceren.

De grootschalige productie van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de regeling ggo.³ Omdat het ggo geen zogenaamde IA of IAB erkenning heeft, moeten de werkzaamheden met dit ggo op inperkingsniveau MI-III plaatsvinden.³

Single-Use Bioreactors

Single-Use Bioreactors zijn gemaakt van plastic. Voor de grootschalige productie van humane monoklonale antilichamen wil de aanvrager een SUB van het type XDR van producent Xcellerex gebruiken. Dit systeem bestaat uit een plastic zak die wordt opgehangen in een roestvrijstalen omhulsel. De plastic zak bevat onder andere geïntegreerde buizen voor het toedienen en afnemen van medium, een druksensor, inlaatopeningen voor additionele metingen, gasleidingen met filter en een magnetisch aangedreven rotor op de bodem van de zak.²

Risicoanalyse

SUB's worden al langere tijd gebruikt in de biofarmaceutische industrie. Echter, voor zover bekend is dit de eerste keer dat een ggo in Nederland wordt gekweekt in een SUB. Hoewel er veel

ervaring is met de risicoanalyse van conventionele stalen reactoren, is dit bij het gebruik van SUB's nog niet het geval. Het gebruik van SUB's zou mogelijk gepaard kunnen gaan met een verhoogde kans op lekkage.

Recentelijk heeft Xendo Bioprocessing in opdracht van VROM een rapport uitgebracht waarin een generieke risicoanalyse wordt geschetst voor de productie van ggo's in SUB's.⁴ Xendo deelt de risico's bij het gebruik van SUB's in naar twee groepen: de zogenaamde *construction containment risks* en de *operational containment risks*.

Construction containment risks

Onder construction containment risks vallen risico's die kunnen optreden als gevolg van de fysieke karakteristieken van de SUB. De sterkte van de plastic zak is hierbij een belangrijke limiterende factor. Tijdens het uitvouwen en installeren van de bioreactorzak kunnen er bijvoorbeeld scheurtjes in het plastic materiaal ontstaan, waardoor er tijdens gebruik van de SUB lekkage op kan treden.

De kans op lekkage wordt tevens vergroot wanneer men voor het meten van bijvoorbeeld de pH of partiële zuurstofdruk in de reactor gebruik maakt van conventionele sensoren. Deze sensoren moeten door de zak worden gestoken. Het XDR systeem bevat geïntegreerde inlaatopeningen voor dergelijke sensoren. Een alternatief zou het gebruik van wegwerpsensoren zijn. Deze sensoren zitten aan de binnenkant van de zak en worden door een extern apparaat afgelezen. Volgens Xendo brengt het gebruik van wegwerpsensoren geen extra risico's met zich mee.

Sommige systemen maken gebruik van een roerpeddel die van bovenaf door de zak wordt gestoken. Hiermee wordt de integriteit van het systeem extra belast en wordt de kans op lekkage verhoogd. Het door Crucell gebruikte XDR systeem bevat een magnetisch aangedreven rotor op de bodem van de zak.

Operational containment risks

Onder operational containment risks vallen risico's die kunnen optreden tijdens het gebruik van de SUB. Na montage van het systeem wordt de bioreactor, via een steriele verbinding, geïnoculeerd met het ggo. Bij dit proces worden twee buizen aan elkaar gekoppeld. Wanneer deze koppeling niet goed wordt gemaakt, zou er lekkage op kunnen treden. Hetzelfde geldt voor de verbindingen die worden gemaakt tijdens het afnemen van monsters. Tevens zou er lekkage op kunnen treden wanneer de sensoren niet goed worden aangebracht.

Veel processen in de bioreactor zijn met behulp van speciale software geautomatiseerd. Problemen kunnen ontstaan wanneer de software fouten bevat of wanneer de operateur handelingen verricht die interfereren met de geautomatiseerde processen. Hierbij kan bijvoorbeeld worden gedacht aan het verkeerd plaatsen van een temperatuursensor waardoor de verkeerde temperatuur wordt gemeten, de bioreactor oververhit raakt en gaat lekken.

Na afloop van het productieproces, wanneer de inhoud uit de bioreactor is verwijderd, moet de bioreactor gesloten blijven. Vervolgens moet het achtergebleven materiaal in de bioreactorzak geïnactiveerd worden en moet de zak uiteindelijk worden weggegooid. Xendo stelt dat het gebruik

van een autoclaaf bij kleine zakken (tot 50 liter) weinig problemen oplevert, omdat deze gemakkelijk in de autoclaaf passen. Echter, grotere zakken (tot 2000 liter) zijn moeilijker in de autoclaaf te passen waardoor de kans op lekkage groter wordt.

Overweging en advies

Integriteitstest

De aanvrager geeft aan dat er op dit moment nog geen gevalideerde methode bestaat om de integriteit van de SUB te testen. Om zich ervan te verzekeren dat het systeem lekdicht is, wil de aanvrager, voordat het ggo aan het systeem wordt toegevoegd, de reactor met medium vullen en overnacht laten staan. De COGEM is van mening dat het overnacht laten staan van een met medium gevulde reactor voor deze aanvraag een redelijk inzicht geeft in de mate van lekdichtheid van de SUB. Zij kan echter niet uitsluiten dat bij druktoename tijdens het productieproces alsnog lekkage optreedt. Om dit te ondervangen stelt de COGEM als aanvullende voorwaarde dat het met medium gevulde systeem onder de maximaal toelaatbare druk wordt getest en dat zoveel mogelijk leidingen en sensoren aangesloten zijn. Op deze manier kunnen eventuele zwakke plekken in het systeem worden opgemerkt.

Overdruk tijdens pompen

De aanvrager geeft aan dat het grootste risico op lekkage ontstaat door (over)druk op het systeem tijdens het pompen. Volgens de aanvrager wordt het risico op lekkage verkleind door de aanwezigheid van een geïntegreerde druksensor die boven een bepaalde overdruk de pomp uitschakelt. Hoewel de COGEM van mening is dat de kans op verlies van ggo materiaal klein is, garandeert het gebruik van een druksensor niet dat er geen verlies optreedt. De pomp slaat af bij een bepaalde overdruk, maar dan kan er al lekkage en verlies van ggo materiaal hebben plaatsgevonden. In het geval dat er lekkage optreedt, wordt het gelekte volume binnen de productieruimte gehouden met behulp van zogenaamde 'spillage blockers'.

Afdoding ggo materiaal

De aanvrager geeft aan dat mogelijk aanwezig ggo materiaal in afval wordt afgedood met behulp van een natronloog oplossing of destructie door een autoclaaf of killtanks. Hoewel het inzetten van de autoclaaf en killtanks zijn gevalideerd volgens de geldende Good Manufacturing Practise (GMP) normen, geldt dit niet voor het gebruik van natronloog. Volgens de aanvrager blijkt uit de wetenschappelijke literatuur dat 0.1 M natronloog bacteriële sporen, adenovirussen en virussen met een lipide bilaag kan afdoden. Daardoor is het aannemelijk dat cellen ook met 0.1M natronloog worden afgedood. Alhoewel de COGEM de kans groot acht dat 0.1M natronloog het betreffende ggo afdood, is zij van mening dat het tot de standaard GMP procedure behoort om de werkzaamheid van een desinfectans te valideren.

Aard van het ggo

De door aanvrager gebruikte PER.C6 cellen zijn apathogeen en kunnen alleen onder laboratorium condities gekweekt worden. Bij lagere omgevingstemperaturen en afwezigheid van voedingsstoffen zijn deze cellen niet in staat te overleven en te reproduceren. Om die reden acht de COGEM de risico's voor mens en milieu, bij eventuele lekkage van het ggo uit de bioreactor, verwaarloosbaar klein.

Conclusie

De COGEM is van mening dat de integriteitstest van het SUB stysteem onder druk moet plaatsvinden. Gezien de aard van het ggo acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Additioneel commentaar

De COGEM wijst erop dat de aanvrager de chemische afdodingsmethode niet heeft gevalideerd, terwijl het tot de standaard GMP procedure behoort om dergelijke validatiegegevens te overleggen.

Referenties

1. PER.C6[®] description: www.crucecell.com/Description
2. XDR datasheet: www.xcellerex.com/pdf/XDR-datasheet.pdf
3. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organisme en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004)
4. Xendo (2010). GMO containment risks evaluation of single-use bioreactors.