

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
dhr. J.J. Atsma  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 28 oktober 2010  
**KENMERK** CGM/101028-03  
**ONDERWERP** Advies 'Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-use bioreactor'

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de ontwerpbeschikking DGM/RB IG 01-001 en de vergunningaanvraag, getiteld 'Vervaardiging en handelingen met genetisch gemodificeerde dierlijke cellen tot 1000 L' van DSM Biologics, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

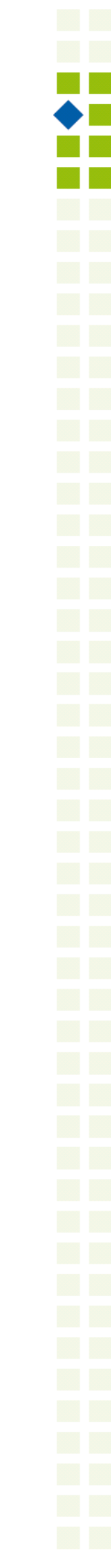
De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde (gg) dierlijke cellen in een bioreactor voor eenmalig gebruik (de zogenaamde Single-Use Bioreactor, hierna SUB). Bij SUB's wordt gebruik gemaakt van kunststof zakken in plaats van stalen reactoren.

De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning. De vergunning is flexibel van opzet zodat diverse gg-cellijnen het kweekproces kunnen doorlopen. De werkzaamheden vinden onder MI-III inperkingsniveau plaats.

Bij de risicoanalyse van de huidige aanvraag zijn twee aspecten van belang: de kans op lekkage van het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) en de aard van het ggo.

De COGEM is van mening dat indien de werkzaamheden worden verricht onder de door de aanvrager aangeleverde procedures de verspreiding van ggo's wordt voorkomen. De COGEM raadt aan de integriteitstest van het SUB systeem 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.

De door de aanvrager toegepaste ggo's zijn apathogeen en niet in staat om buiten de reactor te overleven of te vermenigvuldigen. Indien lekkage van ggo's optreedt, acht de COGEM, gezien de aard van het ggo, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. 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,



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

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

# Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een ‘Single-Use Bioreactor’

## COGEM advies CGM/101028-03

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag door DSM Biologics (DSM-B) voor de grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde (gg) dierlijke cellijnen met behulp van een bioreactor voor eenmalig gebruik, de zogenaamde ‘Single-Use Bioreactor’ (SUB). DSM-B is een ‘Contract Manufacturing Organisation’ die in opdracht van externe partijen biofarmaceutische producten produceert.

Onderhavige aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning. Onder die vergunning vindt grootschalige kweek van de gg-dierlijke cellijnen plaats (tot 1000 L) in conventionele bioreactoren van staal onder cGMP (current Good Manufacturing Practice) condities. De vergunning is flexibel van opzet zodat diverse gg-cellijnen het kweekproces kunnen doorlopen. Bij SUB’s wordt gebruik gemaakt van kunststof zakken in plaats van stalen reactoren. Vanwege het eenmalige gebruik bieden SUB’s het voordeel dat het risico op kruiscontaminatie bij opeenvolgende productieprocessen is uitgesloten. Daarnaast behoeven zij na inactivatie niet schoongemaakt te worden.

### Eerder afgegeven COGEM advies

Onlangs heeft de COGEM voor het eerst advies uitgebracht over het toepassen van SUB’s bij de grootschalige productie van monoklonale antistoffen.<sup>1</sup> De adviesvraag was vergelijkbaar met de huidige aanvraag met het verschil dat er gebruik gemaakt werd van een ander type SUB met een magnetisch aangedreven roerder. Daarnaast was de toepassing beperkt tot een enkele gg-celijn (PER.C6) voor de productie van monoklonale antistoffen.

Gezien de aard van het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) achtte de COGEM de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Omdat bij het toepassen van SUB’s de kans op lekkage mogelijk is verhoogd, stelde de COGEM de aanvullende voorwaarde dat het systeem voorafgaand aan de in gebruik name onder druk werd getest met zoveel mogelijk aangesloten leidingen en sensoren.

### SUB’s en risicoanalyse

SUB systemen voor grootschalige productie (> 20 L) bestaan doorgaans uit een kunststof zak die wordt opgehangen in een roestvrijstalen omhulsel.<sup>2</sup> 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 de biofarmaceutische industrie. Hoewel er veel ervaring is met de risicoanalyse van conventionele stalen reactoren in combinatie met het toepassen van ggo’s, is dit bij het gebruik van SUB’s nog niet het geval.

Onlangs 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 kan morsen van ggo's optreden bij alle 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.

#### *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.

De kans op lekkage wordt tevens vergroot wanneer in de reactor voor het meten van bijvoorbeeld de pH of partiële zuurstofdruk gebruik gemaakt wordt van conventionele sensoren. Deze sensoren moeten door de wand van de zak worden gestoken. Een alternatief is het gebruik van SUB's met wegwerpsensoren. Deze sensoren zitten aan de binnenkant van de zak en worden door een extern apparaat afgelezen.

Sommige systemen maken gebruik van een roerpeddel die van bovenaf door de wand van de zak wordt gestoken. Hiermee wordt de integriteit van het systeem extra belast en wordt de kans op lekkage verhoogd.

#### *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. Voor al deze toepassingen zijn speciale koppelingsmechanismen en –systemen ontwikkeld (zogenaamde 'Kleenpak' en 'tube welder' systeem).

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.

Na afloop van het kweekproces, wanneer de inhoud uit de bioreactor geoogst is, moet de bioreactor gesloten blijven. Vervolgens wordt het achtergebleven materiaal in de bioreactorzak geïnactiveerd. In het onderzoeksrapport van Xendo wordt gesteld 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.

#### *Referentiekader voor de risicoanalyse*

De risicoanalyse kan uitgevoerd worden met behulp van een 'Hazard and Operability Study' (HAZOP). Bij een dergelijke studie wordt in kaart gebracht bij welke situaties ggo's vrij kunnen komen. Vervolgens worden preventieve maatregelen genomen om geïdentificeerde risico's uit te

sluiten dan wel zoveel mogelijk te beperken. Een HAZOP kan alleen uitgevoerd worden als een gedetailleerde technische beschrijving van het systeem voor handen is en de operationele handelingen goed gedefinieerd zijn.

Het Xendo rapport bevat een *checklist* die voor de uitvoerder als leidraad kan dienen om te controleren of aan alle Nederlandse ggo regelgeving wordt voldaan. De checklist is opgesplitst in een *material qualification assessment* (ten dienste van het analyseren van de *construction containment risks*) en een *handling risk assessment* (ten dienste van het analyseren van de *operational containment risks*). Ter ondersteuning van de material qualification assessment geeft het rapport een overzicht van *Single-Use Product Qualification Tests* specifiek van toepassing voor systemen waarmee al dan niet op grote schaal ggo's geproduceerd worden. Deze kwaliteitstesten zijn vastgelegd in een consensus document opgesteld door de Bio-Process Systems Alliance (BPSA), een federatie van producenten van SUB's en daaraan gerelateerde onderdelen. De testen zijn inzetbaar op het SUB systeem zelf of op de individuele onderdelen waaruit een SUB is opgebouwd.

## **Eigenschappen van het ggo**

### *Vectoren*

De aanvrager past vectoren toe vermeld in bijlage 2.1.2 van de regeling ggo. Dergelijke vectoren zijn geschikt voor de vervaardiging van ggo's in animale cellen in cultuur die behoren tot groep I.<sup>3</sup> Daarnaast worden vectoren toegepast die niet vermeld staan in deze bijlage. Volgens de aanvrager zijn deze vectoren van niet-virale herkomst, integreren ze in het genoom van de gastheercel en zijn deze niet zelfoverdraagbaar. Tevens geeft de aanvrager aan dat er geen (gedeelten) van transposons en geen voor eukaryoten infectieuze onderdelen op aanwezig zijn en dat de vectoren vrij zijn van schadelijke sequenties.

### *Donorsequenties*

In de vectoren zijn synthetisch vervaardigde sequenties danwel cDNA en genomisch DNA afkomstig van mensen, zoogdieren, landbouw-, tuinbouw-, fruitgewassen en niet-pathogene micro-organismen gekloneerd. De aanvrager geeft aan dat de gekloneerde inserties genen betreffen waarvan de sequentie volledig gekarakteriseerd is. Bij expressie van deze genen worden geen schadelijke producten geproduceerd.

### *Cellijnen*

De cellijnen toegepast in onderhavige aanvraag betreffen BHK 2254-62.2, BHK tk-ts-13, BHK-21, CHO/dhfr-, CHO-K1, CHO-DG44, HEK-293, PER.C6 en een rhabdomyosarcoma cellijn. Al deze cellijnen zijn van humane of dierlijke herkomst en kunnen alleen in aanwezigheid van kweekmedium overleven en reproduceren. Bij lagere omgevingstemperatuur, afwezigheid van voedingstoffen of afwezigheid van aanvullende beluchting zijn de cellen niet in staat te overleven. Baby hamster kidney (BHK) cellijnen, Chinese hamster ovary (CHO) cellijnen, de HEK-293 cellijn en de PER.C6 cellijn worden sinds vele jaren in laboratoria gebruikt voor onderzoeks-doeleinden. De lijnen zijn goed gekarakteriseerd en staan bekend om hun lange historie van veilig gebruik.

BHK cellijnen zijn fibroblasten voortgekomen uit niercellen van één dag oude hamsters. BHK- 21 is hierbij de voorlopercel, BHK 2254-62.2 en BHK tk-ts 13 zijn van BHK-21 afgeleide mutanten. Door de American type Culture Collection (ATCC) worden deze BHK cellijnen ingedeeld in biosafety level 1.<sup>4</sup>

CHO cellijnen zijn epitheelcellen voortgekomen uit de eierstokken van volwassen Chinese hamsters. CHO-K1 is hierbij de voorlopercel, CHO/dhfr- en CHO DG44 zijn van CHO-K1 afgeleide mutanten. Door de ATCC wordt CHO-K1 ingedeeld in biosafety level 1.<sup>4</sup>

HEK-293 is een humane embryonale kidney cellijn. Door de ATCC wordt HEK-293 ingedeeld in biosafety level 2 met de aanvullende opmerking dat *Adenovirus* type 5 chromosomaal geïntegreerd is maar dat dit alleen de early region 1 (E1) gen sequentie van het virus betreft.<sup>4</sup>

PER.C6 is een humane cellijn voortgekomen uit een embryonale retinacel.<sup>5</sup> De cellen zijn geïmmortaliseerd met behulp van *Adenovirus* type 5 E1A en E1B gen sequenties.

De aanvrager geeft aan dat de rhabdomyosarcoma cellijn een humane cellijn is. Rhabdomyosarcoma is een tumor ontstaan in de embryonale voorlopers van dwarsgestreepte spiercellen.

#### *Gg-cellijnen*

De onder de onderhavige vergunning vallende gg-cellijnen mogen bij laboratorium omstandigheden gehanteerd worden onder ML-I condities. Grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de regeling ggo.<sup>3</sup> Omdat de ggo's in onderhavige vergunning geen zogenaamde IA of IAB erkenning hebben, moeten de werkzaamheden op inperkingsniveau MI-III plaatsvinden.<sup>3</sup> De aanvrager geeft aan dat voor betreffende ggo's aan alle veiligheidseisen gesteld aan de vergunning wordt voldaan.

#### **Overweging en advies**

De aanvrager geeft aan dat alle grootschalige kweekprocessen onder cGMP condities plaatsvinden en voert standaard HAZOP's uit als nieuwe systemen ingevoerd worden. Daarnaast heeft de aanvrager de door Xendo opgestelde checklist ingevuld en de bevindingen geëvalueerd. Tevens merkt de aanvrager op dat binnen DSM-B met een Thermo Scientific Hyclone SUB systeem meer dan 40 productieprocessen zonder lekkages zijn voltooid.

Voor de risicoanalyse zijn twee aspecten van belang: de kans op lekkage en de aard van het ggo.

#### *Integriteit SUB systeem*

Voor de grootschalige kweek van de gg-cellijnen voor onderhavige aanvraag wil de aanvrager 50, 250 en 1000 L SUB's van producent Thermo Scientific Hyclone gebruiken. Voor de material qualification assessment verwijst de aanvrager naar de producent van het SUB systeem. Deze voert standaard materiaal kwaliteitstesten uit op de volledige reeks beschikbare SUB's (50, 250 en 1000 L) waaronder enkele door de BPSA aanbevolen testen.<sup>2,7</sup>

De aanvrager geeft aan tijdens het opblazen van de bioreactorzak gebruik te maken van gelimiteerde ingaande druk om te voorkomen dat de integriteit van de zak in gevaar wordt gebracht. De integriteit van de bioreactorzak wordt door middel van een lekttest getest. Voordat het kweekproces start, wordt de zak gevuld met kweekmedium en overnacht geïncubeerd. De

aanvrager geeft niet aan onder welke condities deze incubatie plaatsvindt en tot welk volume de zak wordt gevuld. De COGEM is van mening dat het over nacht laten staan van een met medium gevulde bioreactorzak een redelijk inzicht geeft in de mate van lektheid.

Het systeem maakt gebruik van een elektrisch aangedreven roerpeddel.<sup>6,7</sup> De aanvrager geeft aan dat deze roerpeddel via een opening aan de bovenzijde van de zak aan een aandrijfmechanisme gemonteerd wordt. In dit aandrijfmechanisme zijn 'seals' aangebracht om lekkage te voorkomen.<sup>7</sup> Volgens de aanvrager zijn testen uitgevoerd om de robuustheid van het aandrijfmechanisme aan te tonen. De COGEM is van mening dat er niet op voorhand uitgesloten kan worden dat bij druktoename tijdens het kweekproces geen lekkage via het aandrijfmechanisme optreedt.

De maximale temperatuur van het verwarmingselement is gelimiteerd op 70°C. Volgens de aanvrager kan deze temperatuur de integriteit van de zak niet in gevaar brengen. Voor de pH meting wordt gebruik gemaakt van een wegwerpsensor.

De aanvrager meldt dat de aansluiting van sensoren door middel van speciaal voor SUB systemen ontwikkelde 'Kleenpak' connectoren plaatsvindt. Voor het maken van steriele verbindingen wordt gebruik gemaakt van een gevalideerde 'tube welding' procedure.

Blokkeren van uitlaatfilters door condensatie van de uitgaande gassen wordt voorkomen door middel van verwarming van de filters. Blokkeren van uitlaatfilters door overmatige schuimvorming wordt voorkomen door gebruik te maken van schuimremmende middelen.

Indien een bepaalde (over)druk in de bioreactorzak ontstaat, is volgens de aanvrager het risico op lekkage verkleind door de aanwezigheid van een geïntegreerde druksensor die via een interlock beveiligingssysteem alle ingaande gas- en vloeistofstromen uitschakelt. Hoewel de COGEM van mening is dat het risico op verlies van ggo's bij overdruk klein is, garandeert het gebruik van een druksensor en een interlock beveiligingssysteem niet dat er geen verlies optreedt. Gas- en vloeistofstromen worden uitgeschakeld bij een bepaalde overdruk, maar dan kan er al lekkage en verlies van ggo's hebben plaats gevonden. Om lekkage ten gevolge van overdruk en de daarmee gepaard gaande bedrijfstechnische gevolgen te voorkomen, raadt de COGEM aan het systeem voorafgaand aan het kweekproces met medium te vullen en onder de maximaal toelaatbare druk overnacht te testen. Daarbij worden zoveel mogelijk leidingen en sensoren aangesloten en is de roerpeddel in werking gezet. De druktest wordt uitgevoerd met het volume waarmee de kweek wordt verricht. Op deze manier kunnen eventuele zwakke plekken in het systeem optimaal worden opgemerkt.

De aanvrager geeft aan dat de kweekprocessen onder controle van een softwarematig alarmeringssysteem staan waarmee een actief alarmeringssysteem voor kritische parameters is gerealiseerd. Bij alarmerende situaties kunnen 'operators', die in ploegendienst werken en zodoende voortdurend aanwezig zijn, reactief ingrijpen in het proces.

Indien er lekkage optreedt, kunnen kleinere volumina in een roestvrij stalen lekbak onder het systeem worden opgevangen. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat de productieruimtes zodanig ingericht zijn dat de volledige inhoud van het gesloten systeem (1000 L) binnen de productieruimtes kan worden gehouden.

### *Afdoding ggo's*

Na beëindiging van het kweekproces worden cellen en kweekmedium van elkaar gescheiden en wordt het medium ten behoeve van verdere opzuivering van het product geogst. De aanvrager geeft aan dat afdoding van de cellen plaatsvindt door middel van een voor de gastheer gevalideerde methode met 0,1 M NaOH bij kamertemperatuur voor minimaal 8 uur. Daartoe wordt eerst het celdebris opgenomen in water tot het voor de betreffende SUB bestemde eindvolume waarna de NaOH wordt toegevoegd. Na inactivatie wordt het materiaal geloosd en worden de lege afgesloten bioreactorzak en overige disposables die in aanraking zijn gekomen met ggo's verzameld in een biowaste container. De container wordt na verzegeling ter verbranding aangeboden.

Hoewel de aanvrager niet voor alle gebruikte gg-cellijnen gevalideerde documentatie met betrekking tot de afdoding aanlevert, is de COGEM van mening dat de aanvrager op voldoende wijze aannemelijk maakt dat de gg-cellijnen geïnactiveerd worden. Ten eerste zijn verschillende zoogdiercellijnen getest. Daarnaast geeft de mengtest aan dat de inhoud van de bioreactorzak binnen enkele minuten volledig gemengd zijn, ook bij een volume van 1000 L.<sup>7</sup> Daarom kan er van worden uitgegaan dat de gg-cellijnen zich in een 1000 L kweek net zo zullen gedragen als andere zoogdiercellen in andere volumina.

### *Vrijkomen van ggo's*

Bij lagere omgevingstemperatuur, afwezigheid van voedingstoffen of afwezigheid van aanvullende beluchting zijn de gekweekte cellen niet in staat te overleven en te reproduceren. Daarnaast zijn er voldoende maatregelen genomen om lekkages te voorkomen en kan eventueel nog levend materiaal niet buiten de productieruimte komen. De COGEM is van mening dat ook bij eventuele lekkage van nog levende ggo's de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

### **Conclusie**

De COGEM is van mening dat indien de werkzaamheden worden verricht onder de door de aanvrager aangeleverde procedures de verspreiding van ggo's wordt voorkomen. De COGEM raadt aan de integriteitstest van het SUB systeem 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. Ook indien lekkage van ggo's zou optreden, acht de COGEM, gezien de aard van het ggo, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### **Referenties**

1. COGEM 2010. Advies grootschalige productie monoklonale antistoffen in een SUB. COGEM advies CGM/100503-01
2. Xendo (2010). GMO containment risks evaluation of single-use bioreactors



3. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2008)
4. ATCC. American Type culture Collection.  
[www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas](http://www.atcc.org/CulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas)
5. Crucell PER.C6<sup>®</sup> technology. [www.crucell.com/Technology%20-%20Cell%20Technology](http://www.crucell.com/Technology%20-%20Cell%20Technology)
6. [www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile\\_50234.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_50234.pdf)
7. Thermo Scientific HyClone Single-Use Bioreactor Systems Validation Guide Rev. 1.0. Versie 15 september 2009