

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 27 november 2017

KENMERK CGM/171127-01

ONDERWERP Advies over inschaling werkzaamheden met gg-influenzavirus met eiwitten van het humaan papillomavirus

Geachte mevrouw van Veldhoven-van der Meer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 17-181_2.8-000 getiteld 'Het onder GMP produceren van vaccinmateriaal ten behoeve van een klinische trial', ingediend door HALIX B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) influenzavirus H1N1 NS106-16E6E7sh. Dit virus mist een deel van het gen dat codeert voor een niet-structureel eiwit (NS1). Ter plekke van deze deletie zijn sequenties ingebracht die coderen voor de kanker geassocieerde eiwitten E6 en E7 van het humaan papillomavirus. In deze sequenties zijn een aantal mutaties aangebracht, waardoor de eiwitten in gehusselde vorm als een gefuseerd eiwit tot expressie worden gebracht. H1N1 NS106-16E6E7sh zal als vaccin toegepast gaan worden in een klinische studie. De aanvrager wil het vaccinmateriaal gaan produceren. Eerder heeft de COGEM geadviseerd dat werkzaamheden met bepaalde influenzavirus stammen op ML-II niveau ingeschaald kunnen worden, mits de uitgangsstam sterk verzwakt is. H1N1 NS106-16E6E7sh is grotendeels gebaseerd op de verzwakte influenzavirus stam Puerto Rico/8/34. Bovendien is het NS1 coderende gen van het gg-virus gedeeltelijk gedeleteerd. Hierdoor is H1N1 NS106-16E6E7sh minder goed in staat de antivirale respons te onderdrukken dan het ouderorganisme Puerto Rico/8/34. De COGEM is daarom van oordeel dat H1N1 NS106-16E6E7sh verzwakt is ten op zichte van de - in pathogeniteitsklasse 2 ingedeelde - stam Puerto Rico/8/34. Op grond hiervan adviseert zij de voorgenomen werkzaamheden onder inachtneming van enkele aanvullende voorschriften uit te voeren op ML-II niveau.

Op bovengenoemd inperkingsniveau en onder navolging van de gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's 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. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Influenza A virus* met eiwitten van het humaan papillomavirus type 16

COGEM advies CGM/171127-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van vergunningaanvraag (IG 17-094) ingediend door HALIX B.V., is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) *Influenza A virus* (FLUAV) stam H1N1 NS106-16E6E7sh. In het virus is een deel van het NS1 gen gedeleteerd. Ter plekke van de deletie zijn sequenties van het humaan papillomavirus type 16 (HPV-16) en het Porcine teschovirus ingebracht. De aanvrager wil vaccinmateriaal gaan produceren ten behoeve van een klinische studie.

2. *Influenza A virus* (FLUAV)

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als het griepvirus, behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en kent vier genera: *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C* en *Influenza virus D*. FLUAV behoort tot het genus *Influenza virus A*.¹ FLUAV kan mensen, vogels en zoogdieren infecteren. Bij gezonde mensen kan een infectie zonder ziekteverschijnselen verlopen, maar meestal wordt infectie geassocieerd met milde tot matige symptomen, zoals koorts en koude rillingen, hoesten, spierpijn, hoofdpijn, en moeheid (griep). Deze klachten duren enkele dagen tot een week. Bij ouderen en mensen met een onderliggende ziekte, kan een FLUAV infectie leiden tot ernstigere ziekteverschijnselen en tot een verhoogde kans op overlijden. Jaarlijkse griepepidemieën zijn verantwoordelijk voor 3 tot 5 miljoen ernstige ziektegevallen en 250.000 tot 500.000 doden wereldwijd.²

FLUAV wordt door de lucht via aerosolen overgedragen, maar overdracht kan ook plaatsvinden via direct contact met besmette oppervlakten. Het virus infecteert luchtwegepitheelcellen en kan in deze cellen repliceren. Bij het vrijkomen van nieuwe virusdeeltjes sterven de besmette epitheelcellen af. Door deze beschadigingen aan het epitheel kunnen secundaire bacteriële infecties ontstaan, die een belangrijke oorzaak zijn van overlijden na infectie met het influenza virus.³

FLUAV heeft een negatief enkelstrengs RNA genoom dat bestaat uit acht unieke genoomsegmenten. Deze coderen voor minstens 10 eiwitten, waaronder drie eiwitten die het RNA-polymerase vormen (PB1, PB2 en PA), het nucleoproteïne (NP), de matrixeiwitten M1 en M2, de niet-structurele eiwitten NS1 en NS2, haemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).^{4,5} Het HA eiwit is betrokken bij de aanhechting van het virus aan een gastheer cel, terwijl het NA eiwit een rol speelt bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit een geïnfecteerde cel. Beide eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen FLUAV.^{6,7} Er bestaan 18 HA subtypes en 11 NA subtypes.^{5,8,9} Drie combinaties (H1N1, H2N2 en H3N2) hebben dusver tot een grieppandemie bij de mens geleid.⁵

De pathogeniteit van FLUAV wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten, die bijdragen aan de virulentie zijn het niet-structurele eiwit NS1, de polymerase-eiwitten PA, PB1 en PB2, en de HA en NA eiwitten.⁵ Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong laagvirulente virusstam virulent te maken.^{6,10,11,12} Ook is uit de influenzavirus-uitbraken in het verleden gebleken dat de aanwezigheid van een polybasische klievingplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing is voor de pathogeniteit van het virus.^{13,14} Aan de andere kant is dit kenmerk niet altijd noodzakelijk voor het veroorzaken van hoogpathogeniteit.⁵ Zo bezit bijvoorbeeld de hoogpathogene influenzastam uit 1918 (type H1N1), die verantwoordelijk was voor de Spaanse griep, geen polybasische klievingssite in het HA eiwit.^{15,16,17,18}

Wanneer een cel op hetzelfde moment door verschillende influenza A virussen wordt geïnfecteerd, kunnen genomsegmenten of delen van genomsegmenten tussen de virussen uitwisselen. Hierdoor kunnen virussen ontstaan die segmenten van verschillende virussen bevatten, zogenaamde 'reassortanten'. Dit proces wordt 'antigene shift' genoemd en kan ervoor zorgen dat er nieuwe virussen ontstaan die niet eerder bij mensen voorkwamen en waartegen de meeste mensen geen immuniteit hebben. 'Antigene drift' is een continu proces waarbij mutaties optreden in het virale RNA tijdens replicatie, waardoor het virus niet meer herkend wordt door de antistoffen van het afweersysteem. Om deze reden is het noodzakelijk dat het griepvaccin ieder jaar aangepast wordt aan de verwachte circulerende griepvirussen.

3. Humaan papillomavirus type 16 (HPV-16)

HPV-16 behoort tot de familie *Papillomaviridae* en het genus *Alphapapillomavirus*. Het virus is in 2012 ondergebracht bij het species *Alphapapillomavirus 9*.¹⁹ HPV-16 infecteert de slijmvliezen en kan baarmoederhalskanker, kanker aan het anogenitale gebied (onder andere penis, anus, vagina en vulva) en kanker in het hoofd-hals gebied (mondholte, amandelen, strottenhoofd) veroorzaken.^{20,21} Het virus komt wereldwijd voor en wordt via seksueel contact overgedragen.²⁰

Het genoom van HPV bestaat uit circulair dubbelstrengs DNA dat codeert voor 8 tot 10 eiwitten: twee 'late' (L) eiwitten en 6 tot 8 'early' (E) eiwitten.²² Het DNA wordt omgeven door een eiwitmantel, die is opgebouwd uit de L1 en L2 eiwitten. De E1 en E2 eiwitten zijn betrokken bij de replicatie en integratie in het genoom van de gastheercel. Het E4 eiwit kan aan het cytoskelet binden en is waarschijnlijk betrokken bij het vermeerderen van het virale DNA en het vrijkomen van virusdeeltjes uit cellen. De E5, E6 en E7 eiwitten faciliteren de virale DNA replicatie door een interactie met cellulaire eiwitten en worden geassocieerd met de oncogene eigenschappen van het virus.^{20,21,22,23} De functies van E3 en E8 zijn nog niet bekend. Deze twee eiwitten zijn niet in alle papillomavirussen aanwezig.

4. Beschrijving van het gg-virus

Gg-influenza A H1N1 NS106-16E6E7sh is door middel van 'reverse genetics' gegenereerd. Hiertoe zijn Vero-cellen co-getransfecteerd met 8 plasmiden die de sequenties van de verschillende virale segmenten bevatten (PA, PB1, PB2, NP, M, NS, HA en NA).²⁴ Het gg-organisme (ggo) is gebaseerd op de 5:2:1 'high growth reassortant' IVR-116. Voor de constructie van het ggo, is gebruik gemaakt

van vijf genoomsegmenten afkomstig van de geattenueerde stam A/Puerto Rico/8/34 (PA, PB2, NP, M, en een partieel NS segment), de NA en HA genoomsegmenten afkomstig van de stam A/New Caledonia/20/99 (H1N1), en één genoomsegment (PB1) afkomstig van de stam A/Texas/1/77. De aanvrager stelt dat FLUAV stam New Caledonia/20/99 (H1N1) een humaan isolaat is en dat humane FLUAV stammen met een H1 subtype niet beschikken over een polybasische klievingssite in het HA.

De aanvrager geeft aan dat in het NS genoomsegment de sequentie, coderend voor de 124 aminozuren aan de C-terminale zijde van het NS1 eiwit, is verwijderd. Daardoor worden alleen de N-terminale 106 aminozuren tot expressie gebracht. Aan deze NS106 coderende sequentie zijn - in frame - de 'self-cleaving 2A peptide' (P2A) coderende sequentie van het Porcine teschovirus, en de sequenties coderend voor de E6- en E7-eiwitten van het HPV-16 toegevoegd. Dit resulteert in de afzonderlijke expressie van het NS106-eiwit en een E6E7-fusie-eiwit.²⁵ De E6- en E7-eiwitten zijn gemodificeerd door de N- en C-terminale delen van de twee eiwitten te husselen (E6E7sh).

5. Voorgenomen werkzaamheden

Het gg- influenza A H1N1 NS106-16E6E7sh zal als vaccin in een klinische studie getest worden. De klinische studie zelf vormt geen onderdeel van de voorliggende aanvraag.

De aanvrager is van plan H1N1 NS106-16E6E7sh 'master virus seed' stock te produceren en het vaccinmateriaal uit te vullen in ampullen. Hij geeft aan dat de werkzaamheden onder 'good manufacturing practice' (GMP) condities zullen plaatsvinden. De gehele faciliteit heeft een eigen luchtbehandelingssysteem en er heerst onderdruk. De aanvrager is daarom van mening dat, gezien de attenuatie van het ggo, de activiteiten op ML-II niveau uitgevoerd kunnen worden. Hij geeft tevens aan dat handelingen waarbij aerosolen vrij kunnen komen, uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet. Tijdens de werkzaamheden zullen standaard volledig beschermende kleding (coveralls) en handschoenen gedragen worden.

6. Eerdere COGEM adviezen

6.1 Adviezen betreffende Influenza A virus (FLUAV)

De COGEM heeft FLUAV sinds 2004 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.^{26,27} De geattenueerde FLUAV stammen A/Puerto Rico/8/34, WSN/33, en Port Chalmers/1/73 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{27,28,29}

In een advies uit 2005, waarin de COGEM stam Puerto Rico/8/34 als avirulent en sterk geattenueerd voor mensen heeft aangemerkt, stelde de COGEM dat eerdere experimenten hebben aangetoond dat recombinante virussen, bestaande uit 6 genoomsegmenten van Puerto Rico /8/34 en 2 genoomsegmenten (HA en NA) van een wildtype (wt) humaan influenza virus, niet virulent zijn voor mensen.²⁸

In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-FLUAV.³⁰ Zij adviseerde dat de laboratoriumwerkzaamheden met deze gg-virussen minimaal op ML-III plaats moeten vinden, maar voegde hier aan toe dat specifieke activiteiten, zoals werkzaamheden met sterk verzwakte virusstammen, op een lager niveau (ML-II)

uitgevoerd kunnen worden. Wel stelde ze daarbij de voorwaarde dat verspreiding dient te worden tegen gegaan en contact met deze virussen geminimaliseerd dient te worden. Na 2006 heeft de COGEM nog diverse keren geadviseerd over de omlaagschaling van laboratoriumwerkzaamheden met recombinant FLUAV.^{31,32,33,34} Samengevat is in al deze adviezen als voorwaarden voor omlaagschaling genoemd dat:

- De recombinante virussen uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente, verzwakte laboratoriumstam moeten bestaan in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen;
- Voor heterologe HA-coderende genoomsegmenten een polybaische klievingsplaats uitgesloten moet zijn;
- De heterologe genoomsegmenten volledig gekarakteriseerd zijn en er geen ongedefinieerde mutaties aangebracht mogen zijn.

Om de risico's met het hierboven beschreven recombinant FLUAV tijdens de werkzaamheden op ML-II niveau verder te beperken, heeft de COGEM de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Medewerkers dienen een mond- en neuskapje te dragen (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) óf tegen griep gevaccineerd te zijn.

In juli 2017 heeft de COGEM advies uitgebracht over een NS1 deletiemutant van een 5:2:1 FLUAV reassortant.³⁵ Het gg-virus (influenza A H3N2 delNS1) bestond uit vijf genoomsegmenten (PA, PB2, NP, M, en een partieel NS segment) van A/Puerto Rico/8/34, één genoomsegment (PB1) van de stam A/Texas/1/77, en de NA en HA genoomsegmenten van de stam A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). In het gg-virus was het NS1 genoomsegment nagenoeg geheel gedeleteerd, waardoor het virus zich niet of nauwelijks in interferon-competente cellen kon repliceren. De COGEM was van oordeel dat het ggo als geattenuëerd virus kon worden beschouwd omdat er geen polybaische klievingsplaats in het HA aanwezig was en het virus door de deletie in het NS1 gen minder goed in staat was de interferon gemedieerde antivirale respons te onderdrukken. Bovendien was in (klinische) studies aangetoond dat delNS1 stammen veilig in gebruik waren. De COGEM adviseerde daarom de werkzaamheden op ML-II in te schalen, maar daarbij wel de volgende aanvullende voorschriften in acht te nemen:

- Open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet van klasse II;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;

- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen de actueel circulerende humane FLUAV stammen.

6.2 Adviezen betreffende Humaan papilloma virus (HPV)

De COGEM heeft in 2015 geadviseerd HPV in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en tevens geadviseerd om bij werkzaamheden met oncogene gg-papillomavirussen, handschoenen te dragen.³⁶ In het advies was ook het minderheidsstandpunt opgenomen om HPV-16 in te delen in pathogeniteitsklasse 3. In 2016 heeft de COGEM vervolgens - naar aanleiding van vragen van Bureau ggo - een nadere toelichting op dit advies gegeven.³⁷

De COGEM heeft twee keer geadviseerd over klinische studies met naakt DNA vaccins die gehusselde versies van de E6 en E7 oncoproteïnen van HPV-16 tot expressie brachten.^{38,39} Daarbij werden verschillende regionen van deze eiwitten op een afwijkende (niet-natuurlijke) volgorde achter elkaar gezet. De vaccins werden door middel van tatoeage lokaal in de opperhuid aangebracht. De COGEM was van oordeel dat de meervoudig gehusselde E6 en E7 eiwitten geen transformerende eigenschappen op cellen hebben omdat zij hun oorspronkelijke functionaliteit verloren hadden.

7. Overwegingen

Laboratoriumhandelingen met gg-influenza A virussen worden over het algemeen op ML-III inperkingsniveau ingeschaald. Echter, voor laagpathogene influenza A virussen, of voor geattenuerde virussen, kan een lagere inperking worden gehanteerd.

De aanvrager wil werkzaamheden verrichten met gg-influenza A H1N1 NS106-16E6E7sh. Het ggo is een 5:2:1 FLUAV reassortant, die gebaseerd is op vijf gensegmenten van de geattenuerde FLUAV stam Puerto Rico/8/34, de NA en HA genoomsegmenten van de FLUAV stam New Caledonia/20/99 (H1N1), en één genoomsegment van de FLUAV stam Texas/1/77. Een deel van het NS1 gen van de virale vector is gedeleteerd. Ter plekke van de deletie zijn in frame sequenties coderend voor gehusselde E6 en E7 oncoproteïnen van HPV-16, en het P2A van Porcine teschovirus ingebracht. Dit resulteert in de afzonderlijke expressie van het NS106-eiwit van FLUAV en een gehusseld E6E7-fusie-eiwit van HPV-16 (16E6E7sh).

7.1 Overwegingen met betrekking tot de deletie in het NS1 gen

De aanvrager geeft aan dat H1N1 NS106-16E6E7sh als een geattenuerd virus beschouwd kan worden, omdat het NS1 gen een deletie bevat. Hij verwijst hiervoor naar verscheidene (klinische) studies in de wetenschappelijke literatuur en niet-gepubliceerde data van *in vitro* experimenten.^{40,41,42,43} Het NS1 eiwit is onder andere betrokken bij het onderdrukken van de interferon (IFN)-gemedieerde antivirale respons van de gastheer.^{40,44} FLUAV stammen met een deletie in het NS1 gen kunnen hierdoor minder goed repliceren in interferon-competente cellen.^{40,41}

Op basis van de aangeleverde (literatuur) gegevens merkt de COGEM op dat deletiemutanten met NS1 deleties, die vergelijkbaar zijn met die van deletiemutant H1N1 NS106-16E6E7sh, een attenuatie ten opzichte van wt virus laten zien.^{40,41} Overigens laten de door de aanvrager aangeleverde niet-gepubliceerde data van *in vitro* experimenten en een vaccinatiestudie bij muizen zien, dat deze attenuatie minder sterk is dan die bij deletiemutanten waarvan het gehele NS1 fragment gedeleteerd

is.⁴¹ De COGEM is van mening dat de gegevens van de klinische studies waar de aanvrager naar refereert en waar de biologische veiligheid van H1N1 NS106-16E6E7sh uit zou moeten blijken, niet rechtstreeks geëxtrapoleerd kunnen worden. Bij deze studies zijn deletiemutanten gebruikt waarbij het gehele NS1 fragment gedeleteerd is,^{42,43} geen deletie-mutanten waarvan de grootte van de NS1 deletie vergelijkbaar is met die van H1N1 NS106-16E6E7sh.

7.2 Overwegingen met betrekking tot de 16E6E7sh insertie

In het ggo zijn genen aangebracht die coderen voor de E6 en E7 oncoproteïnen van HPV-16. De aanvrager beargumenteert aan de hand van literatuurgegevens dat voor een oncogeen effect de E6 en E7 coderende genen in het genoom van de gastheercel moeten integreren en constitutief tot expressie moeten komen.^{45,46} FLUAV is een RNA virus dat geen DNA-intermediëren in zijn replicatiecyclus kent. Volgens de aanvrager is het daarom uitgesloten dat het ggo in het gastheercel genoom integreert en er constitutieve expressie van het 16E6E7sh fusie-eiwit plaatsvindt.

Daarnaast beargumenteert de aanvrager dat een eventueel transformerend effect van de E6 en E7 eiwitten ook teniet wordt gedaan door de apoptose (geprogrammeerde celdood) inducerende eigenschappen van FLUAV.⁴⁷ De COGEM merkt op dat E6 en E7 eiwitten interacteren met cellulaire tumorsuppressie-eiwitten.^{23,46} Daardoor wordt onder meer de celcyclus (S-fase) gestimuleerd en de apoptose geremd.²³

H1N1 NS106-16E6E7sh brengt een gehusseld 16E6E7 fusie-eiwit tot expressie. In de literatuur worden diverse E6 en E7 gehusselde constructen beschreven, onder meer als toepassing in vaccins, en van veel van deze constructen is bekend hoe en in welke mate de functionaliteit van deze eiwitten door de 'reshuffling' wordt beïnvloed.^{48,49,50} De COGEM wijst er op dat de aanvrager in zijn risicobeoordeling niet in gaat op de apoptose remmende eigenschappen van het 16E6E7 fusie-eiwit. Ook bespreekt de aanvrager niet hoe de oorspronkelijke transformerende eigenschappen van E6 en E7 door de modificatie in 16E6E7sh zijn beïnvloed. Tevens is de aangebrachte modificatie niet aan de hand van sequentiegegevens, een figuur of een wetenschappelijke publicatie inzichtelijk gemaakt. De COGEM beschouwt deze drie punten als een omissie in de vergunningaanvraag.

Tenslotte meldt de aanvrager dat muizenvaccinatie-experimenten met vergelijkbare gg-FLUAV-constructen die of een functioneel E6E7 fusie-eiwit, of partieel gedeleteerde E6E7 fusie-eiwitten tot expressie brachten, geen schadelijke effecten lieten zien.⁵¹ De COGEM merkt op dat de muizenvaccinatie-experimenten gebruik maakten van deletiemutanten waarvan vrijwel het gehele NS1 gen gedeleteerd is. Zij is, zoals in sectie 7.1 benoemd, van oordeel dat de biologische veiligheidsgegevens uit deze experimenten niet rechtstreeks naar H1N1 NS106-16E6E7sh geëxtrapoleerd kunnen worden. Wel acht zij het op basis van de resultaten van deze studie waarschijnlijk, dat het 16E6E7sh fusie-eiwit sneller in het proteasoom afgebroken zal worden dan E6 en E7 eiwitten, die in hun natuurlijke conformatie voorkomen.

8. Conclusie en advies

Eenzijds kan de COGEM geen exacte inschatting maken van het netto apoptotisch effect en de uiteindelijk transformerende eigenschappen van het ggo, omdat de aanvrager niet inzichtelijk heeft gemaakt hoe de functionaliteit van de E6 en E7 oncoproteïnen is verstoord. Anderzijds betreft het hier

(i) de productie van vaccinemateriaal dat toegepast zal gaan worden in een klinische studie, (ii) is het doel van het vaccin om de immunogeniteit van de eiwitten te behouden maar de biologische activiteit te elimineren, (iii) zal het fusie-eiwit kortstondig tot expressie gebracht worden wat niet in verhouding staat tot de continue expressie van de E6 en E7 oncoproteïnen tijdens een HPV-16 infectie, en (iv) zal het fusie-eiwit waarschijnlijk versneld worden afgebroken. Alles in overweging nemende, schat de COGEM de netto bijdrage van het transformerend effect van 16E6E7sh in als gering.

H1N1 NS106-16E6E7sh is grotendeels gebaseerd op de geattenuerde FLUAV stam Puerto Rico/8/34. De 5:2:1 reassortant beschikt niet over een polybasische klievingssite in het HA, en het NS1 gen is gedeeltelijk gedeleteerd, waardoor het ggo minder goed in staat is de interferon gemedieerde antivirale respons te onderdrukken dan het ouderorganisme. De COGEM is daarom van oordeel dat H1N1 NS106-16E6E7sh geattenuerd is ten op zichte van FLUAV stam Puerto Rico/8/34, welke de COGEM ingedeeld heeft in pathogeniteitsklasse 2.

Het bovenstaande en de aard van de voorgenomen werkzaamheden in overweging nemende, adviseert de COGEM in te schalen op ML-II niveau. Om eventuele risico's te beperken adviseert de COGEM bij activiteiten met H1N1 NS106-16E6E7sh, de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden;
- Medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
- Het dragen van handschoenen is verplicht;
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen de actueel humane FLUAV stammen óf een mond- en neuskapje te dragen (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2)

Onder bovengenoemd inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2016 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 21 november 2017)
2. World Health Organisation (WHO; 2016). Influenza (seasonal) fact sheet. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/ (bezocht: 27 november 2017)
3. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). LCI-richtlijn Influenza. www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Influenza (bezocht: 27 november 2017)
4. McCauley JW *et al.* (2012). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses. Family *Orthomyxoviridae*. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam

5. Wright PF *et al.* (2013). *Orthomyxoviruses*. In: Fields Virology, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
6. Brown EG (2000). Influenza virus genetics. *Biomed. Pharmacother.* 54: 196-209
7. Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev. Med. Virol.* 11: 227-241
8. Tong S *et al.* (2012) A distinct lineage of *Influenza A virus* from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109: 4269-4274
9. Tong S *et al.* (2013). New world bats harbor diverse Influenza A viruses. *PLoS Pathog.*: e1003657
10. Flint SJ *et al.* (2004). Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press, Washington, D.C.
11. Hatta M *et al.* (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842
12. Horimoto, T en Kawaoka, Y (2001). Pandemic threat posed by avian Influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 129-149
13. Garten W & Klenk HD (1999). Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends in Microbiology* 7: 99-100
14. Perdue MI (2008). Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In: Avian influenza. Edited by Swayne DE, Blackwell Ames IA, 23-41
15. Stevens J *et al.* (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303: 1866-1870
16. Reid AH *et al.* (1999). Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1651-1656
17. Goto H & Kawaoka Y (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human *Influenza A virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10224-10228
18. Kobasa D *et al.* (2004). Enhanced virulence of Influenza A viruses with the hemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431: 703-707
19. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).
<https://data.ictvonline.org/proposals/2010.001a-kkkV.A.v2.Papillomaviridae.pdf> (bezocht: 22 november 2017)
20. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (2012). Human papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 100B: 255-313
21. Centers for Disease Control and Prevention (2016). Human papillomavirus.
www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hpv.html (bezocht: 22 november 2017)
22. Howley PM *et al.* (2013). Papillomaviruses. In: Fields Virology, volume 2, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
23. Moody CA & Laimonis AL (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews* 10: 550-560
24. Hoffmann E *et al.* (2000). A DNA transfection system for generation of *Influenza A virus* from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 6108-6113
25. Kim JH *et al.* (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from Porcine teschovirus-1 in human cell Lines, zebrafish and mice *PLoS ONE* 6: e18556

26. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advies CGM/040326-03
27. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2017). COGEM advies CGM/170522-03
28. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
29. COGEM (2006). Ontwikkeling van recombinante influenza virussen met behulp van een 'reverse genetics' systeem. COGEM advies CGM/060724-03
30. COGEM (2006). Aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met genetisch gemodificeerde influenza A virussen. COGEM advies CGM/061214-01
31. COGEM (2006). Handelingen met laag pathogene H5N1 in serologisch onderzoek (IG 06-052). COGEM advies CGM/060724-04
32. COGEM (2006). Handelingen met recombinant H7N7 in serologisch onderzoek (IG 06-052/01). COGEM advies CGM/061218-01
33. COGEM (2007). Inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
34. COGEM (2010). Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72. COGEM advies CGM/100830-02
35. COGEM (2017). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) *Influenza A virus* COGEM advies CGM/170712-01
36. COGEM (2015). Classificatie van humane papillomavirussen. COGEM advies CGM/151216-02
37. COGEM (2016). Vervolgadvies classificatie van humane papillomavirussen. COGEM advies CGM/160503-01
38. COGEM (2013). Klinische studie met naakt DNA tegen plaveiselcelcarcinoom veroorzaakt door Humaan papillomavirus. COGEM advies CGM/130603-04
39. COGEM (2015). Fase I/II klinische studie met naakt DNA vaccin tegen Humaan papillomavirus geïnduceerde (pre)maligniteiten. COGEM advies CGM/150901-01
40. Egorov A *et al.* (1998). Transfectant Influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 72: 6437-6441
41. Ferko B *et al.* (2004). Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient Influenza A viruses with altered NS1 Genes. *J. Virol.* 78: 13037-13045
42. Mössler C *et al.* (2013). Phase I/II trial of a replication-deficient trivalent influenza virus vaccine lacking NS1. *Vaccine* 31: 6194-6200
43. Wacheck V *et al.* (2010). A novel type of influenza vaccine: Safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J. Infect. Dis.* 201:354-362
44. García-Sastre A *et al.* (1998). *Influenza A virus* lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252: 324-330
45. Williams VM *et al.* (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 6: 45-57

46. Yim E-K & Park J-S (2005). The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res. Treat.* 37: 319-324
47. Tran AT *et al.* (2013). Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation. *J. Virol.* 87: 1049-1060
48. Osen W *et al.* (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the Human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19: 4276–4286
49. Ohlschläger P *et al.* (2006). An improved rearranged Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response. *Vaccine* 24: 2880–2893
50. Almajhdi FN *et al.* (2014). Design of a highly effective therapeutic HPV16 E6/E7-specific DNA Vaccine: Optimization by different ways of sequence rearrangements (shuffling). *PLoS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0113461
51. Jindra C *et al.* (2015). Attenuated recombinant *Influenza A virus* expressing HPV16 E6 and E7 as a novel therapeutic vaccine approach. *PLoS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0138722