

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 1 februari 2024
KENMERK CGM/240201-02
ONDERWERP Advies omlaagschaling transfectie van cellen met gelineariseerd HPV16 of -18


Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 23-186_2.8-000 getiteld 'Transfectie en immortalisatie van primaire zoogdiercellen met gelineariseerd full length humaan papilloma virus DNA', dat is ingediend door Stichting VU Medisch Centrum (VUmc), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-)virussen *Alphapapillomavirus 9* en *Alphapapillomavirus 7*. Deze virussen staan beter bekend als respectievelijk humaan papillomavirus (HPV) 16 en 18. De virussen verspreiden zich via seksueel contact. Infectie met deze twee virussen kan (genitale) wratten, maar soms ook o.a. baarmoederhalskanker veroorzaken. Deze virussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, en werkzaamheden hiermee moeten op ML-II plaatsvinden. Hierbij moeten open handelingen met de virussen in een kabinet van veiligheidsklasse 2 uitgevoerd worden en moeten altijd handschoenen gedragen worden. HPV heeft een circulair DNA genoom. De aanvrager is voornemens om primaire zoogdiercellen te transfecteren met het genoom van HPV16 of -18, door een plasmide te gebruiken met daarin een gelineariseerd HPV16 of -18 genoom.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de transfectie en immortalisatie op ML-I, met aanvullende voorwaarden, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Wel moet zijn aangetoond dat er geen humane papillomavirussen aanwezig zijn in de primaire zoogdiercellen.



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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. A.T. Das niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Omlaagschaling van transfectie van cellen met gelineariseerd humaan papillomavirus 16 of 18

COGEM advies CGM/240201-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)humaan papillomavirus 16 en 18 in primaire zoogdiercellen. De adviesvraag is gesteld naar aanleiding van een vergunningsaanvraag van de Stichting VUmc (IG 23-186). De COGEM is gevraagd of er op basis van de door de aanvrager aangeleverde informatie uitgesloten kan worden dat er infectieuze virusdeeltjes worden gevormd tijdens de voorgenomen werkzaamheden. Ook is de COGEM gevraagd of zij kan instemmen met de inschaling van de werkzaamheden op ML-I en de voorgestelde aanvullende voorschriften.

2. Humane papillomavirussen

De humane papillomavirussen (HPV's) behoren tot de subfamilie *Firstpapillomavirinae*, binnen de familie van *Papillomaviridae*. Binnen deze subfamilie worden 52 genera onderscheiden.¹ De HPV's zijn ondergebracht in vijf genera; de andere genera bevatten dierlijke papillomavirussen. Papillomavirussen komen voor bij vertebraten en zijn soort- en weefsel-specifiek.² HPV16 (*Alphapapillomavirus 9*) en HPV18 (*Alphapapillomavirus 7*) behoren tot het genus van *Alphapapillomavirus*.¹

2.1 Genoomorganisatie van HPV16 en -18

Het genoom van papillomavirussen bestaat uit een circulair, dubbelstrengs DNA-molecuul van ongeveer 8 kb lang. Het genoom van HPV16 en -18 codeert voor 9 eiwitten: 7 'early' (E) en 2 'late' (L) eiwitten.³ De eiwitmantel van het virusdeeltje is opgebouwd uit de L1- en L2-eiwitten. De E1- en E2-eiwitten zijn betrokken bij de replicatie en genoomintegratie.^{4,5} Het E1^{E4} eiwit kan binden aan het cytoskelet en is betrokken bij het vrijkomen van virusdeeltjes uit cellen.^{6,7,8} Replicatie van viraal DNA wordt gefaciliteerd door de interacties tussen de E5-, E6- en E7-eiwitten en verschillende cellulaire eiwitten. Deze interacties leiden tot immortalisatie van de gastheer cel en transformatie van het HPV genoom. Deze drie virale eiwitten worden geassocieerd met de oncogene eigenschappen van HPV16 en -18.^{9,10,11} E2^{E8} remt virale genexpressie en virale genoomreplicatie.¹² Het E3-eiwit is niet aanwezig in alphapapillomavirussen zoals HPV16 en -18.

2.2 Gevolgen van infectie met HPV-16 en -18

Infecties met HPV komen wereldwijd voor.⁹ Ongeveer 80% van de bevolking wordt gedurende diens leven geïnfecteerd met een van de verschillende HPV-typen.¹³ HPV wordt overgedragen door direct epitheelcontact van huid of slijmvliezen. Een infectie met HPV kan voet-, hand- of genitale wratten veroorzaken.^{14,15,16} Voor de HPV's die de slijmvliezen infecteren – zoals HPV16 en -18 – vormt seksueel contact de belangrijkste transmissieroute. Hoewel de transmissie van deze HPV-typen via andere routes, zoals de vingers, waarschijnlijk ook tot de mogelijkheden behoort, wordt de bijdrage van deze routes op de totale natuurlijke transmissie zeer klein geacht.^{16,17} De transmissiekans tijdens een enkel seksueel contact met een HPV-geïnfecteerde partner wordt geschat op 60%.¹⁸

Bij mucosale infecties van de baarmoederhals met een oncogeen HPV treedt in 70-80% van de gevallen geen klinische afwijking op en wordt de infectie binnen twee jaar door het eigen immuunsysteem opgeruimd.¹⁹ Echter, in een beperkt aantal gevallen (5%) veroorzaakt een infectie met een oncogeen HPV kanker en leidt daarmee tot een ernstig ziektebeeld.²⁰ Infectie met HPV16 en -18 kan baarmoederhalskanker, kanker aan het anogenitale gebied (onder andere anus, vulva, vagina en penis) en kanker in het hoofd-hals gebied (mondholte, amandelen, strottenhoofd) veroorzaken. HPV16 en -18 zijn de meest voorkomende type HPV's, en veroorzaken zo'n 70% van de gevallen van HPV-gerelateerde baarmoederhalskanker.²¹ In Europa wordt daarnaast 20 tot 90% van de orofaryngeale tumoren aan HPV toegeschreven, waarbij HPV16 het vaakst gevonden wordt.^{22,23,24} Er is sinds 2009 een vaccin opgenomen in het Nederlands Rijksvaccinatieprogramma dat gericht is tegen zowel HPV16 als -18.²⁵

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om primaire zoogdiercellen te transfecteren met plasmiden met daarin gelineariseerd HPV16 of -18. De plasmideklonen met gelineariseerd HPV16 of -18 zijn gecreëerd door het circulaire HPV-genoom te knippen in een essentieel gen. HPV16 is gelineariseerd middels een knip in het L1-gen, HPV18 is geknipt in het E1-gen. De klonering is, na ligatie en amplificatie, bevestigd met restrictieanalyse. De circulaire plasmideklonen zullen worden gebruikt om de primaire zoogdiercellen te transfecteren en zogenoemde "onsterfelijke" cellen te maken (immortalisatie). Vooraf zal bevestigd worden dat de primaire zoogdiercellen geen HPV bevatten.

De aanvrager verzoekt bovenstaande werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-I, waarbij alle open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) worden uitgevoerd. Tevens stelt de aanvrager voor dat er handschoenen gedragen zullen worden tijdens deze werkzaamheden.

4. Eerdere COGEM adviezen over humaan papillomavirus

De COGEM heeft in 2015 geadviseerd HPV16 en -18 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.²⁶ Tevens is geadviseerd om bij werkzaamheden met alle humane papillomavirussen handschoenen te dragen en tijdens open handelingen in een VK-II te werken. In het advies uit 2015 is het minderheidsstandpunt opgenomen om HPV16 en -18 in pathogeniteitsklasse 3 in te delen. Naar aanleiding van vragen van Bureau GGO heeft de COGEM in 2016 een nadere toelichting gegeven op dit advies.²⁷ In 2017 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden om vaccinmateriaal te produceren met gg-influenzavirus en sequenties van onder andere HPV16.²⁸

5. Overweging en advies

De aanvrager is voornemens om primaire zoogdiercellen te transfecteren met plasmiden met daarin gelineariseerd HPV16 of -18. De genomen van HPV16 en -18 zijn gelineariseerd door een knip in respectievelijk het L1- en E1-gen. Het L1 gen codeert voor een eiwit in de eiwitmantel. Het E1-eiwit is betrokken bij virale replicatie.^{4,5} Zonder werkend L1- of E1-eiwit is vorming van virusdeeltjes of replicatie niet mogelijk.²⁹ Bovendien kan HPV16 en -18 enkel repliceren wanneer het virus episomaal aanwezig is in gedifferentieerde cellen.²⁹ Door transfectie met het circulaire plasmide-DNA wordt het gelineariseerde

HPV16 of -18 genoom geïntroduceerd in een gastheercel. (Delen van) het HPV genoom kunnen hierdoor mogelijk integreren in het genoom van de gastheer. Vanwege de knip in een essentieel gen en verstoring die dit veroorzaakt voor de infectiecyclus van HPV acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat replicatie-competent HPV16 of -18 kan ontstaan wanneer (delen van) het HPV16 of -18 genoom geïntegreerd zijn in dat van de gastheercel.

Wanneer het plasmide niet integreert in het DNA van de gastheer zal het plasmide-DNA uiteindelijk verdwijnen. Door de knip in een gen dat essentieel is voor replicatie, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er uit niet-geïntegreerd plasmide-DNA replicatie-competent HPV16 of -18 gevormd kan worden. De COGEM acht de kans op recircularisatie van het HPV16 of -18 genoom verwaarloosbaar klein als het plasmide-DNA circulair wordt toegediend.

Complementatie tussen het gelineariseerde genoom van HPV16 of -18 en andere HPV's in de cel is niet geheel uit te sluiten. De primaire zoogdiercellen dienen derhalve vrij te zijn van humane papillomavirussen. Een PCR analyse is afdoende om de afwezigheid van HPV's aan te tonen.

Concluderend is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu op inperkingsniveau ML-I verwaarloosbaar klein zijn bij transfectie van primaire zoogdiercellen met plasmideklonen met gelineariseerd HPV16 of -18, en de daaropvolgende instandhouding van de cellijnen voor mogelijke immortalisatie. Daarbij stelt de COGEM de randvoorwaarde op dat de primaire zoogdiercellen die worden getransfecteerd vrij zijn van humane papillomavirussen. Daarnaast stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. Dit betreft het uitvoeren van open handelingen in een VK-II en het dragen van handschoenen.

6. Signalerende opmerking

De COGEM signaleert dat vanuit ARBO-overwegingen handschoenen gedragen dienen te worden bij het hanteren van het gezuiverde plasmide-DNA. Dit is vanwege de aanwezigheid van oncogene sequenties in het plasmide.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). Virus Taxonomy: 2022 Release <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (bezocht: 19 januari 2024)
2. Bernard HU *et al.* (2012). Family *Papillomaviridae*. 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
3. Yu L *et al.* (2022). HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 4943
4. Zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350
5. McBride AA *et al.* (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: Same idea, different targets. *Cell Cycle* 5: 1499-1502

6. Doorbar J *et al.* (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-827
7. Wang Q *et al.* (2009). Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1-E4 protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. *J. Virol.* 83: 3668-3683
8. McIntosh PB *et al.* (2010). E1-E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: A mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J. Cell Sci.* 123: 2810-2822
9. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (2012). Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 100B 255-313
10. Howley PM *et al.* (2013). Papillomaviruses. In: Fields Virology, volume 2, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
11. Moody CA & Laimonis AL (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Rev.* 10: 550-560
12. Dreer M *et al.* (2017). Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. *Virus Res.* 231: 96-102
13. Einstein MH *et al.* (2009). Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knows and unknowns. *Lancet Infect Dis.* 60: 347-356
14. Centers for Disease Control and Prevention (2015). Human papillomavirus. www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hpv.html (bezocht 22 januari 2024)
15. Cardoso JC & Calonje E (2011). Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta Derm.* 20: 145-154
16. RIVM. LCI richtlijn – Humaan papillomavirusinfectie - anogenitale wratten. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/humaanpapillomavirusinfectie-anogenitale-wratten> (bezocht: 22 januari 2024)
17. RIVM. LCI richtlijn – Humaan papillomavirusinfectie – cervixkanker. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/humaanpapillomavirusinfectie-cervixkanker> (bezocht: 22 januari 2024)
18. Bruchell AN *et al.* (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24 Suppl 3: S52-61
19. Trottier H & Franco EL (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 Suppl 1: S1-S15
20. Snijders PJ *et al.* (2006). HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J. Pathol.* 208: 152-164
21. Muñoz N *et al.* (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348: 518-527
22. Betiol J *et al.* (2013). Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46: 217-226
23. Martin-Hernan F *et al.* (2013). Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med. Oral Patol. Cir. Bucal.* 18: e439-444
24. Gillison M (2014). Chapter 8. HPV vaccines and potential prevention of HPV-positive head and neck cancer. In Primary End-points for prophylactic HPV vaccine trials. IARC Working Group Reports, No 7
25. RIVM. Start vaccinatie tegen baarmoederhalskanker. <https://www.rivm.nl/nieuws/start-vaccinatie-tegen-baarmoederhalskanker-0> (bezocht: 22 januari 2024)
26. COGEM (2015). Classificatie van humane papillomavirussen. COGEM advies CGM/151216-02

27. COGEM (2016). Vervolgadvies classificatie van humane papillomavirussen. COGEM advies CGM/160503-01
28. COGEM (2017). Advies over inschaling werkzaamheden met gg-influenzavirus met eiwitten van het humaan papillomavirus. COGEM advies CGM/171127-01
29. Kajitani *et al.* (2012). Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front. Microbiol.* 3:152