



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bionanotechnologie – een verkenning

RIVM Briefrapport 2019-0001
A.G. Oomen et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Bionanotechnologie – een verkenning

RIVM Briefrapport 2019-0001
A.G. Oomen et al.

Colofon

© RIVM 2019

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2019-0001

A.G. Oomen (auteur), RIVM
C.J.B. van der Vlugt (auteur), RIVM
F.A. van Broekhuizen (auteur), RIVM
P.C.E. van Kesteren (auteur), RIVM
C.P.E. van Rijn (auteur), RIVM
J. Westra (auteur), RIVM

Contact:
Jaco Westra
Jaco.westra@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van IenW in het kader van de opdracht 'Veiligheid Biotechnologie, onderdeel beleidsondersteuning'.

Dit is een uitgave van:
**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publieksamenvatting

Bionanotechnologie – een verkenning

DNA en RNA (draggers van erfelijke informatie) en eiwitten (vervullen veel functies) komen van nature voor in planten, mensen en dieren. Ze kunnen ook worden gebruikt voor 'slimme' technologische toepassingen op zeer kleine schaal, bijvoorbeeld voor medisch en industrieel gebruik of voor consumentenproducten. Het RIVM onderzocht wat de stand van deze bionanotechnologie is, welke toepassingen in het verschiet liggen, in welke mate de producten van deze technologie al rijp zijn om op de markt te worden gebracht, wat bekend is over mogelijke risico's voor mens en milieu, en in hoeverre het huidige scala aan wetgeving hiervoor voldoende houvast biedt.

Veel toepassingen zijn nog in de onderzoeks- en ontwikkelingsfase, maar de technologie ontwikkelt zich snel. Het RIVM vindt dit type ontwikkelingen interessant en nuttig, bijvoorbeeld omdat ze een medicijn heel gericht naar een bepaalde plek in het lichaam kunnen brengen. Wel is het van belang om in een vroeg stadium van de ontwikkeling van een nieuw product expliciete aandacht te hebben voor veiligheid en duurzaamheid. Zo'n Safe-by-Design aanpak maakt het mogelijk om tijdig ongewenste effecten te signaleren en te voorkomen. Momenteel ligt de nadruk op de technologische kant van de ontwikkelingen en is de aandacht voor de mogelijk nadelige effecten zeer beperkt. Een eerste screening van mogelijke nadelige effecten laat zien dat bio-nanostructuren, of onderdelen daarvan, immunoreacties en andere nadelige effecten kunnen oproepen.

Uit een eerste screening van de relevante wetgeving over stoffen (REACH) en producten (zoals cosmetica en biociden) blijkt dat de gesignaleerde effecten niet automatisch worden 'opgepakt' via de vereiste informatie over veilig gebruik. Daarbij komt dat de hoeveelheid bionanostructuren in toepassingen naar verwachting klein zal zijn. Als er kleine hoeveelheden van een stof op de markt worden gebracht, dan vraagt de wetgeving maar om beperkte informatie. Methoden zoals die nu worden gebruikt om stoffen op schadelijkheid te testen, zijn naar verwachting onvoldoende geschikt.

Kernwoorden: bionanotechnologie, DNA-origami, RNA-origami, eiwitten, nanodeeltjes, biotechnologie, advanced materials, toepassingen, risico's, wetgeving, Safe-by-Design

Synopsis

Bionanotechnology – an initial survey

DNA and RNA (carriers of hereditary information) and proteins (multifunctional compounds) are found naturally in plants, humans, and animals. They can also be used for “smart” technological applications on a very small scale, including medical and industrial applications as well as consumer products. RIVM carried out a survey of the present state of bionanotechnology, which applications are on the horizon, to what extent the products that can be produced with this technology are ripe for market introduction, what is known about the potential associated risks for humans and the environment, and to what extent the range of existing legislation can deal effectively with such issues.

A great many of applications are still in the research and development phase, but the relevant technology is developing very rapidly. RIVM views such developments as interesting and useful, for example since it has the potential to deliver drugs to a specific site in the human body. However, it is important to focus explicitly on safety and sustainability issues at an early stage of such new product developments. Such a Safe-by-Design approach makes it possible to identify and prevent undesirable effects in a timely fashion. At present, the focus is squarely on the technological side of developments, and there is only a very limited focus on the potential drawbacks. An initial screening of such potentially undesirable effects indicates that bionanostructures, or components of such structures, can lead to immune reactions and other undesirable effects.

An initial screening of the relevant legislation that applies to substances (REACH) and products (such as cosmetics and biocides) makes it clear that the (undesirable) effects identified are not automatically dealt with appropriately via the required information on safe use. In addition, the quantity of bionanostructures present in applications is expected to be very small. If small quantities of a substance are introduced to the market, the applicable legislation requires only limited information. The methods presently being used to test substances for negative effects are expected to be inadequate in this regard.

Keywords: bionanotechnology, DNA-origami, RNA-origami, proteins, nanoparticles, biotechnology, advanced materials, applications, risks, legislation, Safe-by-Design

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

- 1.1 Aanleiding en doel — 11
- 1.2 Bionanotechnologie — 11
- 1.3 Leeswijzer — 12

2 Toepassingsrichtingen — 13

- 2.1 Inleiding — 13
- 2.2 DNA-Origami — 14
- 2.3 RNA-Origami — 16
- 2.4 Eiwitten — 16

3 Omvang technologie en marktnabijheid — 19

- 3.1 Inleiding — 19
- 3.2 Aantallen publicaties — 19
- 3.3 Octrooianalyse — 20
- 3.4 Inhoudelijke ontwikkelingen — 21
- 3.5 Tussenconclusies — 22

4 Mogelijke risico's — 23

- 4.1 Mogelijke onbedoelde effecten — 23
- 4.2 Blootstelling — 25
- 4.3 Risico's — 25
- 4.4 Tussenconclusie — 26

5 Bruikbaarheid wettelijke kaders — 27

- 5.1 De scope van de wettelijke kaders — 27
 - 5.1.1 Scope REACH — 27
 - 5.1.2 Scope productregelgeving — 29
 - 5.1.3 Scope Besluit ggo (genetisch gemodificeerde organismen) — 29
 - 5.1.4 Scope arbeidsomstandigheden wetgeving — 30
- 5.2 Informatievereisten wettelijke kaders — 30
 - 5.2.1 REACH — 30
 - 5.2.2 Productregelgeving — 32
 - 5.2.3 Besluit ggo — 33
 - 5.2.4 Arbeidsomstandighedenregelgeving — 33
 - 5.2.5 Tussenconclusies — 34

6 Discussie — 35

- 6.1 Inleiding — 35
- 6.2 Kanttekeningen bij het onderzoek — 35
- 6.3 Hoe wordt een bionanomateriaal in wettelijke kaders aangemerkt? — 35
- 6.4 Aspecten relevant voor risico's en dekking wettelijke kaders — 37
- 6.5 Veilig aan de voorkant — 39

7 Conclusies — 41

- 7.1 Conclusies — 41
 - 7.1.1 Algemene observaties — 41
 - 7.1.2 Technologische ontwikkeling — 41

7.1.3	Gevolgen voor mens en milieu — 42
7.1.4	Aspecten van wetgeving — 43
7.2	Slotoverwegingen — 43

Samenvatting

Bionanotechnologie verbindt nanotechnologie met biotechnologie. Het is een relatief nieuwe wetenschappelijke ontwikkeling die zich richt op het ontwikkelen en toepassen van biologische structuren op nanometerschaal. In de wetenschappelijke literatuur komt een aantal specifieke toepassingstechnieken naar voren - o.a. origami (het gecontroleerd vouwen met/van moleculen) met DNA en RNA. De inzet is het ontwikkelen van 3D-structuren met een gewenste, specifieke functionaliteit. Daarnaast wordt er gewerkt aan door de mens ontworpen eiwitten en 3D eiwit-structuren. Deze signalering gaat in op deze ontwikkelingen.

Op wetenschappelijk gebied is er volop aandacht voor ontwikkeling van potentieel veel verschillende, interessante markttoepassingen. Deze bevinden zich vooral nog in de R&D fase, maar het veld lijkt zich meer en meer richting markttoepassingen te bewegen.

Er lijkt tot op heden weinig tot geen aandacht voor eventuele gezondheids- en milieurisico's. Een screening van de mogelijke effecten laat zien dat dit wel aandacht behoeft. Bijvoorbeeld, verder onderzoek naar eventueel bionano specifieke effecten op het immuunsysteem en mogelijke integratie van stukjes DNA van DNA origami structuren in het genoom. Ook is het voor RNA origami structuren theoretisch mogelijk dat RNA interferentie optreedt waardoor processen in een cel worden verstoord. Voor eiwitten is het zinvol om aandacht te hebben voor eventuele nadelige gevolgen van eiwitaggregatie. Tot slot is het van belang om te letten op de persistentie van bionanostructuren. Indien deze structuren niet of slecht worden afgebroken kunnen ze ophopen, wat de kans op nadelige gevolgen vergroot.

Een scan van wettelijke kaders laat zien dat, gezien de hierboven genoemde effecten, de gevraagde informatie over mogelijke nadelige gevolgen waarschijnlijk onvoldoende is om de eventuele bionano-specifieke risico's goed te kunnen beoordelen. Dit geldt voor zowel voor de wetgeving voor stoffen (REACH) als voor de wetgeving voor verschillende soorten producten zoals cosmetica en voedsel. Daarbij dient zich ook de vraag aan of de bestaande (toxicologische) testmethoden geschikt zijn voor dit type structuren.

Gezien de hoge specificiteit van bionanomaterialen zijn toekomstige productievolumina per materiaal waarschijnlijk klein, en is de gevraagde informatie over eventuele effecten binnen de stoffenwetgeving REACH naar verwachting zeer beperkt.

Nieuwe innovatieve ontwikkelingen, waar bionanotechnologie een voorbeeld van is, maken tal van nieuwe toepassingen mogelijk. Juist bij dit soort innovaties is het van belang om het denken over veiligheid en veiligheidsaspecten in een vroeg stadium van ontwikkeling mee te nemen om eventuele problemen in een latere fase zo veel mogelijk te voorkomen. De invalshoek van 'safe-by-design' of 'safe-innovation' biedt deze mogelijkheid. Een voorwaarde om relevante veiligheidsvragen goed te kunnen adresseren is dat er voldoende kennis en informatie aanwezig is om een oordeel over de schadelijkheid en de blootstelling te kunnen vellen.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding en doel

Wetenschappelijke ontwikkelingen in de biotechnologie en de nanotechnologie gaan snel en de technologieën integreren in toenemende mate (OECD 2018). In de wetenschappelijke literatuur spreekt men al over bionanotechnologie of nanobiotechnologie. Een bionano-richting die sterk lijkt op te komen is het bouwen van nanostructuren uit biologische bouwstenen (zoals DNA, RNA en eiwitten) die bewust worden ontwikkeld, aangepast en/of toegepast met een bepaalde functie of bepaald doel. Nanostructuren zijn complexe moleculaire structuren op nanometerschaal, met een van te voren bepaalde, specifieke ruimtelijke vorm. Naast nanostructuren worden ook (bio)sensoren en zelforganiserende biologische materialen tot de bionanotechnologie gerekend. De ontwikkelingen zijn nog zeer divers en er is geen heldere definitie van het begrip bionanotechnologie.

Doel

In een eerste verkenning (interne RIVM rapportage februari 2017) is door het RIVM een basale screening gemaakt van de wetenschappelijke ontwikkelingen. Naar aanleiding hiervan is het RIVM door het Ministerie van IenW verzocht dit onderwerp nader uit te diepen. Doel van deze verdieping is een beter inzicht te krijgen in

- de huidige stand van de wetenschap en de mogelijke markttoepassingen,
- de mogelijke elementen van zorg voor mens en milieu en de beschikbare kennis voor het beoordelen van eventuele risico's, en
- de geschiktheid van de huidige wettelijke kaders om (markt)toepassingen te kunnen reguleren.

1.2 Bionanotechnologie

'Bionanotechnologie' is een zich ontwikkelende wetenschappelijke discipline en is nog geen goed gedefinieerd begrip. In heel brede zin is het een tak van wetenschap gericht op het ontwikkelen en toepassen van moleculaire structuren op nanometerschaal, waarbij gebruik gemaakt wordt van 'biologische' moleculen¹. Het gaat dus om het bedrijven van nanochemie en nanofysica met moleculen, vaak polymeren, zoals we die kennen uit de biologie. Denk hierbij aan DNA, RNA, en eiwitten. De grote mate van beheersing van materie op nanometerschaal gekoppeld aan eigenschappen zoals zelforganisatie, energieoverdracht en luminescentie maken in principe een breed scala aan toepassingen mogelijk in bijv. medische toepassingen (zoals afgiftesystemen voor medicijnen), diagnostiek, biosensing (sensoren voor allerlei toepassingen) en bioimaging (het zichtbaar maken van allerlei biologische processen).

¹ Met 'biologische' moleculen wordt hier bedoeld, moleculen die qua bouw en samenstellende onderdelen voorkomen in de natuur. Denk hierbij aan DNA, RNA, eiwitten, koolhydraten, vetten. Echter, de herkomst van de moleculen of onderdelen daar van kan synthetisch zijn.

In de wetenschappelijke literatuur komt een aantal specifieke toepassingstechnieken naar voren - o.a. origami (het gecontroleerd vouwen met/van moleculen) met zowel DNA als RNA. De inzet is hier het ontwikkelen van 3D-structuren met een specifieke functionaliteit, zie kader over DNA in hoofdstuk 2. Daarnaast wordt er gewerkt aan het ontwerpen van niet-natuurlijke, functionele eiwitstructuren. De nadruk in deze signalering ligt op dit type ontwikkelingen.

Andere ontwikkelingen die ook tot het gebied van de bionanotechnologie gerekend (kunnen) worden, zijn: biosensoren, DNA-dataopslag, chemische productiesystemen op nanoschaal (voor in vivo/in situ productie)², assembly lines voor geautomatiseerde handelingen op nanoschaal, genetische gemodificeerde micro-organismen als productie-eenheid voor 3D eiwitstructuren. Toepassingen van veel van deze ontwikkelingen liggen, naar huidige inschatting, nog ver weg in de tijd (>5 jaar).

De verwachting is dat het gebruik van DNA als fysiek medium voor dataopslag een snelle ontwikkeling zal doormaken. Vooral omdat grote bedrijven zoals Microsoft en Google hierin fors investeren, waardoor daadwerkelijke toepassingen op kortere termijn kunnen worden verwacht.

1.3 Leeswijzer

Hoofdstuk 2 schetst het beeld van de verschillende toepassingsrichtingen. Hoofdstuk 3 geeft inzicht in de huidige omvang van de technologie en de marktnabijheid. In hoofdstuk 4 gaan we in op mogelijke risico's voor mens en milieu. Hoofdstuk 5 beschrijft de bruikbaarheid van de wettelijke kaders. Na de discussie in hoofdstuk 6 eindigen we in hoofdstuk 7 met de conclusies en aanbevelingen.

De inhoudelijke basisstukken waarop dit rapport is gebaseerd zijn, op verzoek, als extra materiaal beschikbaar.

² Met ontworpen nanostructuren is het in principe mogelijk om bijv. kleine chemische fabriekjes te maken (op nanoschaal dus). Daarmee is *in-situ* productie van een stof mogelijk (op nanoschaal).

2 Toepassingsrichtingen

2.1 Inleiding

Dit hoofdstuk geeft een overzicht van soorten toepassingen zoals die in de wetenschappelijke literatuur worden beschreven.

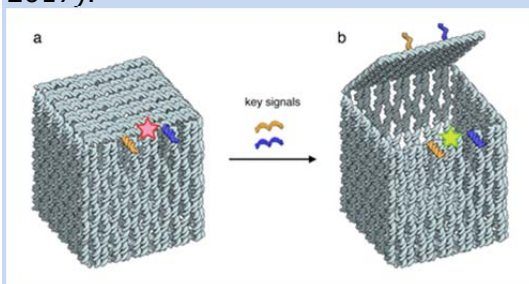
Commerciële toepassingen van DNA-origami, RNA-origami of zelfontworpen nieuwe eiwitten (die voorheen niet bestonden) zijn niet gevonden. Wel is duidelijk dat technologisch heel veel mogelijk is en daadwerkelijke toepassing lijkt een kwestie van tijd. Het tijdperk van de maakbaarheid op de nanoschaal is nu echt begonnen.

Kader: DNA-origami, inclusief een voorbeeld

DNA-origami maakt gebruik van het zelf assembleren van DNA moleculen. Meestal wordt een lange DNA-streng als 'steiger' gebruikt waaraan een groot aantal kleinere DNA-strengen kunnen hechten en interne bindingen maken zodat een gewenste – van tevoren bepaalde - 2- of 3-dimensionale vorm en grootte ontstaat (Saaem and LaBean 2013). Een DNA-origami structuur wordt normaliter verkregen door de lange DNA-streng en de kortere ketens bij hoge temperatuur (90 °C) in een gebufferde oplossing te mengen en vervolgens af te laten koelen. Typische DNA-origami structuren zijn 25 tot 150 nm groot (Okholm and Kjems 2016). Aan het oppervlak kunnen op gewenste plekken weer moleculen of nanomaterialen worden gekoppeld (Tintore et al. 2014, Zhang et al. 2014).

Diverse open-source computer programma's - bijvoorbeeld caDNano, CanDo, SARSE-DNA en DAEDALUS - bestaan die het ontwerpen van DNA-origami structuren vereenvoudigen (Saaem and LaBean 2013, Tintore et al. 2014, Lim 2017).

Recente ontwikkelingen hebben de kosten voor het produceren van DNA-origami structuren verlaagd van circa US\$ 200 per milligram tot circa € 0,20 (Praetorius et al. 2017). Ook zijn er ontwikkelingen op het gebied van het verhogen van de zuiverheid van geproduceerde DNA-origami structuren (Halvorsen et al. 2017) en het produceren bij kamertemperatuur (Saaem and LaBean 2013). Made-to-order DNA-origami structuren en kits zijn inmiddels commercieel verkrijgbaar (Lim 2017).



Bovenstaande figuur toont een voorbeeld van DNA-origami: een kubusstructuur waarvan het deksel geopend kan worden door een stimulus van buitenaf (licht, chemische stof). De kubus kan gevuld worden met een stof (bijv. medicijn). Dit is een voorbeeld van een

structuur op nanoschaal gemaakt van DNA strengen. Ook de buitenkant van de structuur (in dit geval de zijden van de kubus) kan zo worden aangepast dat de kubus graag hecht aan bijvoorbeeld tumorcellen. Ook deze karakteristiek is van te voren te bepalen en aan te passen. (*Figuur uit Andersen et al. (2009)*)

In de literatuur worden medische toepassingen op dit moment het meest concreet beschreven, maar toekomstige toepassing in allerlei producten en kaders is zeker mogelijk. Hieronder worden toepassingsrichtingen van DNA-origami, RNA-origami en zelf ontworpen eiwitten kort beschreven. Extra informatie met meer detail is op verzoek beschikbaar.

2.2 DNA-Origami

Toepassingsrichtingen van DNA-origami en een indicatie van hun marktnabijheid zijn:

- **Encapsulation**
De precieze 3-dimensionale structuren die met DNA-origami gemaakt kunnen worden lenen zich voor het op maat inpakken van andere materialen/stoffen (Lim 2017). Deze bouwsels kunnen zo gemaakt worden dat er een structuurverandering optreedt als gevolg van een externe stimulus zoals een verandering in pH, temperatuur of doordat een molecuul aan een receptor bindt. Hiermee kan de inhoud van een DNA-origami structuur gecontroleerd vrijkomen. De vorm, grootte en eventuele moleculen die aan de DNA-origami structuur zijn gekoppeld beïnvloeden of en in welke mate deze structuren in weefsels terecht komen (Tintore et al. 2014, Zhang et al. 2014). De tot nu toe in de literatuur genoemde voorbeelden richten zich vooral op het ter plekke vrijkomen van kankergeneesmiddelen in tumoren uit het DNA-origami, waarvan in ieder geval al een aantal succesvolle dierstudies zijn beschreven (Pinheiro et al. 2011, Zhang et al. 2014, Wang et al. 2017, Li et al. 2018). Zo bleek in een dierstudie dat een DNA-origami structuur met een antikankergeneesmiddel (doxorubine) beter te werken dan het niet-ingekapselde product (Zhang et al. 2014). Ook het in de tumor vrijkomen van bloedstollingsfactoren, waardoor bloedvaten naar de tumor worden afgesloten (Li et al. 2018) en inkapselen van fluorescentiemoleculen voor mogelijke toepassing op het gebied van medische scans (Bhatia et al. 2011), wordt onderzocht. De eerste toepassingen van encapsulation in DNA-origami structuren lijken aanstaande en in de toekomst zijn vele andere toepassingen denkbaar.
- **Nanoscale assembly line/nanoreactor**
Met DNA-origami kan een 2- (bv. een rooster) of 3-dimensionale (bv. een buisje) opstelling worden gebouwd waar (bio)chemische reacties optimaal kunnen plaatsvinden (Pinheiro et al. 2011, Tintore et al. 2014, Wang et al. 2017). In dat geval worden de benodigde katalysatoren of enzymen aan het DNA-origami gekoppeld en zo georiënteerd dat kan een reactie efficiënter plaatsvinden. Dit is een wetenschappelijke ontwikkeling die in de toekomst toepassing kan vinden in de synthese van (fijn)chemicaliën.

Het organiseren van de locatie van moleculen op een 2-dimensionale plaat kan ook worden gedaan door een DNA origami 'loper' of robot (Gu et al. 2010, Saaem and LaBean 2013, Thubagere et al. 2017). De ontwikkeling van dergelijke systemen lijkt nog in de onderzoeksfase te zitten.

- **Moleculaire gereedschappen**
De DNA-origami structuren bieden allerlei mogelijkheden om gereedschappen op nanoschaal (moleculaire schaal) te maken die nuttig zijn in wetenschappelijke laboratoria, in de R&D of kwaliteitscontrole van bedrijven. Hierbij kan gedacht worden aan een liniaal op nanoschaal, een nanothermometer, een nanopincet etc. (Saaem and LaBean 2013, Gareau et al. 2016). Ook kunnen mallen worden gemaakt om liposomen of nanodeeltjes van specifieke vorm en grootte te maken (Yang et al. 2016, Lim 2017, Wang et al. 2017, Bayrak et al. 2018). Hiervan zijn al diverse voorbeelden beschreven. Deze toepassingen zijn mogelijk al beschikbaar, maar grootschalige toepassing is onwaarschijnlijk omdat het zich tot specifieke laboratoriumachtige omgevingen beperkt waarbij de bionano structuren waarschijnlijk niet in (consumenten)producten terecht komen.
- **Sensoren en biomarkers**
DNA-origami biedt mogelijkheden om heel gevoelige sensoren en biomarkers te ontwikkelen (Wang et al. 2017). Aan een DNA-origami structuur kan een stof of nanomateriaal worden gehecht. Deze binding kan bijvoorbeeld een structuurverandering teweeg brengen die de uitslag van de sensor of biomarker bepaalt. Ook zijn er poriën ontwikkeld die alleen toegankelijk zijn voor bepaalde stoffen zoals sucrose, lactaat en citraat (Howorka 2017). In hoeverre er al commercieel verkrijgbare sensoren en biomarkers met DNA-origami bestaan is niet bekend, maar deze toepassing lijkt al mogelijk.
- **Biometrische systemen**
DNA-origami kan gebruikt worden als bouw materiaal bij de ontwikkeling van kunstmatige cellen, bijvoorbeeld om specifieke onderdelen te maken zoals poriën (Pinheiro et al. 2011, Tintore et al. 2014). De ontwikkeling van kunstmatige cellen staat wetenschappelijke in de belangstelling. Ohmann et al. (Ohmann et al. 2018) heeft een kunstmatig enzym gemaakt waarvan de basisstructuur met DNA-origami was gemaakt. Dit enzym zorgt dat de verschillen in samenstelling van de twee lipide bi-lagen van een dierlijke cel teniet wordt gedaan, wat tot celdood leidt. Volgens de auteurs biedt dit enzym een aangrijpingspunt voor mogelijke kankerbehandeling.
- **DNA nano-machinetjes en nano-apparaten**
In het verlengde van het werk van Prof. Dr. B. Feringa, die in 2016 de Nobelprijs voor de Scheikunde won, wordt er gewerkt aan de assemblage van moleculaire nanosystemen, zoals de nano-auto die over metaaloppervlakken kan bewegen. De wetenschap rondom de ontwikkeling van nano-machinetjes en nano-apparaten waarbij moleculaire lading met aandrijfsystemen naar een bepaalde plek wordt gebracht is momenteel vooral nog fundamenteel, maar wel sterk in ontwikkeling (Kuzuya and Ohya 2014, Tintore et al. 2014).

Aan DNA-origami structuren kunnen, op gewenste plekken, verschillende biomoleculen en nanodeeltjes worden gekoppeld. Dit draagt bij aan de veelzijdigheid en maakbaarheid van structuren op de nanoschaal en daarmee aan toekomstige mogelijkheden met DNA-origami.

De hier genoemde ontwikkelingen zijn tot nu toe gebaseerd op het natuurlijk voorkomende DNA met de basen A, C, G en T. Er wordt ook gewerkt aan xeno-DNA waarbij afwijkende basen of suikergroepen gebruikt worden (Pinheiro and Holliger 2014). Dit zal ook nieuwe mogelijkheden voor DNA-origami bieden.

Ook kan DNA worden gebruikt als een compact medium voor dataopslag (De Silva and Ganegoda 2016). Ter illustratie, er is uitgerekend dat de informatie van het hele internet zo zou passen in een volume van 2,5 cm³. In de ontwikkeling van DNA voor dataopslag wordt fors geïnvesteerd en zal naar verwachting op afzienbare termijn commerciële toepassing gaan vinden.

2.3 RNA-Origami

De toepassingsrichtingen van RNA-origami komen overeen met die van DNA-origami (zie kader). De ontwikkeling van RNA-origami zijn minder ver ontwikkeld dan die van DNA-origami en toepassingen zijn daarom minder marktnabij. RNA-origami biedt vanwege zijn andere chemische samenstelling net andere mogelijkheden om verbindingen aan te koppelen en zijn makkelijker in grote hoeveelheden te produceren (Li et al. 2015, Wang et al. 2017). Ook voor RNA-origami zijn de eerste stappen gezet om structuren met computer programma's te ontwerpen, en bestaat er een catalogus voor specifieke vormen (Parlea et al. 2016). Daarnaast zal al hybride RNA/DNA constructen ontwikkeld, wat de veelzijdigheid van de technologie vergroot.

2.4 Eiwitten

Toepassingsrichtingen van door de mens zelf ontworpen eiwitten en hun marktnabijheid zijn:

- **Eiwit-origami**
Vergelijkbaar met DNA- en RNA-origami kunnen met eiwitten 3-dimensionale structuren worden gemaakt (Ljubetic et al. 2017, Ross et al. 2017). Deze eiwitstructuren zijn doorgaans groter dan die van DNA en RNA. Door de fundamenteel andere chemische samenstelling van eiwit zijn ook andere functionaliteiten mogelijk dan met DNA en RNA mogelijk zijn. De huidige ontwikkeling op het gebied van eiwit-origami is vooralsnog gericht op de technische vervaardiging van deze structuren.
- **Hydrogelen**
Hydrogelen van eiwitten zijn een nieuwe ontwikkeling, in tegenstelling tot bijvoorbeeld hydrogelen van alginaat, die al langer bestaan (Gahawar *et al.*, 2014). Het is mogelijk de eiwitten aan te passen door er bijvoorbeeld andere groepen aan te koppelen, wat een nieuwe functionaliteit met zich mee kan brengen. Diverse toepassingen worden in de literatuur genoemd, zoals voor medicijn afgifte (Yu et al. 2015), het maken van een matrix om cellen in te laten groeien, cosmetica en voor

bemesting van planten via de bladeren (Meurer et al. 2017). Deze toepassingen zijn nog in de R&D fase, maar toepassingen zoals 'matrix voor celgroei' zijn wel op de korte termijn te verwachten.

- **(Textiel)vezels**

Eiwitten kunnen gebruikt worden als (textiel)vezels. Eiwitten zoals 'spider silk' (spinrag) worden al door diverse bedrijven commercieel geproduceerd, gebruik makend van genetisch gemodificeerde celfabrieken, met toepassingen zoals kogelwerende kleding (Agnarsson et al. 2010) medische technologie (Petzhold *et al.*, 2017), cosmetica (DeFransesco, 2017) en biologisch afbreekbare kleding. De huidige toepassing van deze eiwitvezels maakt gebruik van bestaande eiwitten zoals die in spinrag voorkomen, maar dan kunstmatig gemaakt. Producten op basis van door de mens geproduceerd spinrag zijn reeds op de markt.

Uit de literatuur blijkt dat er steeds meer mogelijkheden zijn om eiwitten aan te passen (Sandhya et al. 2016, Marcos et al. 2017). Denk hierbij aan het gebruik van nieuwe aminozuren en het zelf ontwerpen van eiwitketens. Ook is er steeds meer kennis om koppelingen te maken met andere eiwitten of chemische groepen (Churchfield *et al.*, 2017). Dit laat zien dat de maakbaarheid van eiwitten op de nano- tot microschaal toeneemt, en daarmee de toekomstige mogelijkheden.

3 Omvang technologie en marktnabijheid

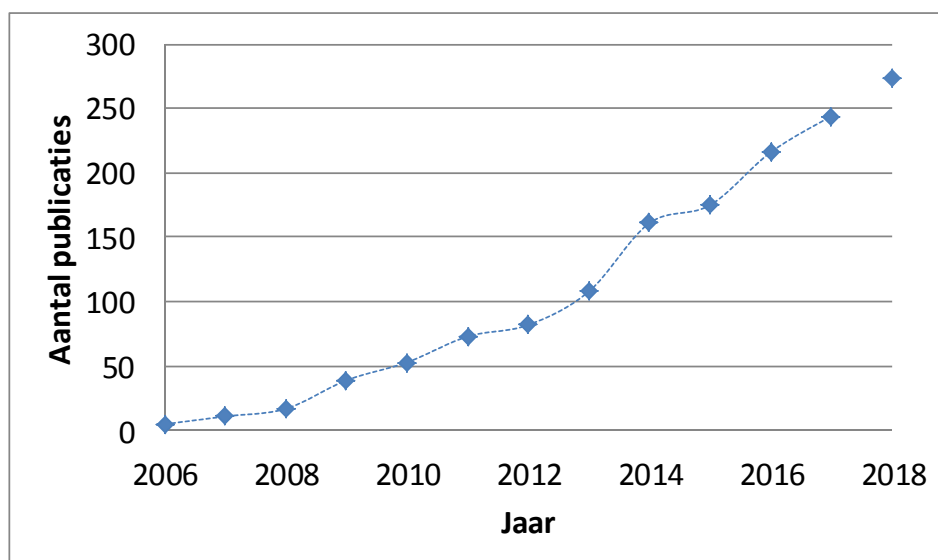
3.1 Inleiding

Om zicht te krijgen op de omvang van de gesignaleerde ontwikkeling en de nabijheid tot de markt is er gekeken naar:

- de aantallen wetenschappelijke publicaties;
- de ontwikkelingen in de octrooiaanvragen;
- inhoudelijke ontwikkelingen op basis van de literatuur en interviews met experts.

3.2 Aantallen publicaties

Het verloop van het aantal publicaties in de tijd over DNA-origami is weergegeven in figuur 3.1. Het gaat hierbij om publicaties met het begrip DNA-origami en gerelateerde zoektermen in de titel en het abstract. RNA-origami volgt eenzelfde trend, maar is in absolute aantallen kleiner. De bibliometrische analyse van ontwikkelingen op het gebied van door de mens zelf ontworpen eiwitten bleek niet goed mogelijk, omdat in dit vakgebied een te grote en te diverse set aan begripsomschrijvingen wordt gebruikt. Onze indruk is dat ook op het gebied van door de mens ontworpen eiwitten zich veel inhoudelijke ontwikkelingen voordoen.

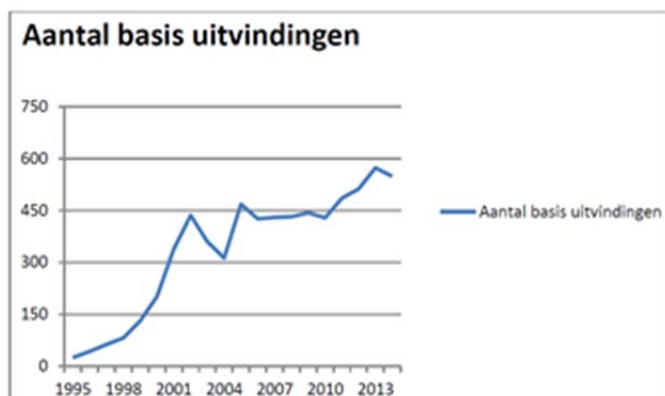


Figuur 3.1. Aantal publicaties tussen 2006 en 2018 (tot 23 oktober 2018) met "DNA-origami", "DNA-nanostructure", "DNA-nanotechnology" of "DNA-nanoconstruct" in de titel en abstract.

Vergeleken met het aantal publicaties met alleen het woord 'nano' in de titel of het abstract - meer dan 5000 stuks in 2017 - is het absolute aantal bescheiden. Echter, de groei van het aantal publicaties is significant en laat zien dat er meerdere groepen actief werken aan dit onderwerp en dat de interesse en kennis toeneemt.

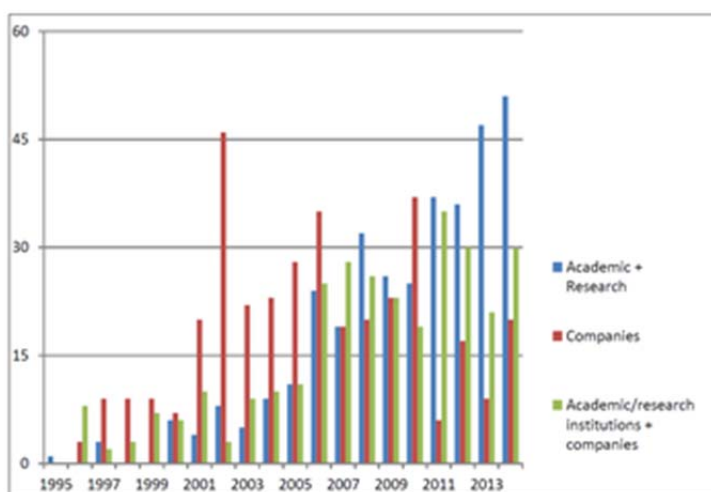
3.3 Octrooianalyse

De Rijksdienst voor ondernemend Nederland voerde een octrooianalyse uit (Tak, 2017). Hierbij is een op trefwoorden gebaseerde zoekopdracht uitgevoerd, die is beperkt tot de medische en medisch-veterinaire ontwikkelingen. Figuur 3.2 geeft het aantal basisuitvindingen in de tijd weer dat met deze zoekstrategie is gevonden. Hoewel niet in detail is nagegaan of deze basisuitvindingen daadwerkelijk passen binnen de huidige interpretatie van het begrip bionanotechnologie, verwachten we op basis van de keuze van de zoektermen dat de resultaten voldoende representatief zijn¹. Daarmee geeft deze manier van zoeken een indicatie van de interesse in het commercialiseren van bionanotoepassingen.



Figuur 3.2. Overzicht van de toename in het aantal basisuitvindingen in de context van bionanotechnologie in de periode 1995-2014 (Tak, 2017). Gemiddeld bestaat een basisuitvinding weer uit 7 tot 8 uitvindingen.

In veel gevallen staan bij de registratie van de basisuitvindingen meerdere namen vermeld. Figuur 3.3 laat een analyse zien van de gevonden relaties tussen de samenwerkende partijen van de basisuitvindingen.



Figuur 3.3. Overzicht van het aantal gevonden relaties tussen universiteiten en onderzoeksinstituten en bedrijven. 'Academic + research' (blauw) aantal relaties tussen instellingen die geen winstoogmerk hebben; 'companies' (rood) aantal relaties tussen bedrijven; 'academic/research institutions + companies'

(groen) aantal relaties tussen universiteiten/onderzoeksinstituten en bedrijven (Tak, 2017).

Uit de analyse van Tak (2017) blijkt dat bedrijven in de beginjaren (tot circa 2006) onderling meer samenwerkten dan in de afgelopen paar jaar. Een mogelijke verklaring is dat er een verschuiving is opgetreden van niet-concurrerend onderzoek naar commercieel gericht onderzoek. De nadruk ligt dan meer op het ontwikkelen van commerciële toepassingen waardoor er meer samengewerkt wordt met onderzoeksinstituten en minder met concurrerende bedrijven. Het is ook mogelijk dat universiteiten actiever zijn geworden op het gebied van kennistransfer.

Aanvragers komen vooral uit Noord-Amerika en in mindere mate uit Europa en Azië (Japan, Korea en Singapore) te zitten. Nederland neemt als land de 9e positie in. Verdere informatie over de belangrijkste aanvragers wereldwijd en in Nederland, en de landen waarin de aanvragen zijn gedaan is te vinden in Tak (2017).

3.4 Inhoudelijke ontwikkelingen

De toenemende beheersing van de materie op nanoschaal, maakt dat er ook steeds meer mogelijk is met biologische moleculen. Ook het veld van DNA-origami lijkt zich te ontwikkelen van fundamenteel wetenschappelijk naar het ontwikkelen van toepassingen en toepassingsrichtingen. De laatste jaren groeit, in het kielzog van DNA-origami, het veld van RNA-origami. RNA is gelijksoortig aan DNA maar biedt net andere mogelijkheden dan DNA.

Computer ontwerpsoftware maakt het intussen technisch mogelijk om niet alleen DNA en RNA structuren, maar ook eiwitten (een polymeer van aminozuren) zelf te ontwerpen. Dit wordt bijvoorbeeld al toegepast om bestaande eiwitketens zoals spinrag ('spider silk') op alternatieve wijze te produceren. Diverse startups zijn hier al mee bezig en hebben afspraken gemaakt met grote multinationals over toepassing in bijvoorbeeld sportartikelen. Het is ook mogelijk om nieuwe, nog niet bestaande eiwitten te ontwikkelen. De verwachting is dat dit in de nabije toekomst een gang naar de markt zal vinden.

Ook vindt er ontwikkeling plaats om tot verbeterde productiemethoden te komen, om zo bijvoorbeeld de opbrengst en zuiverheid van het maken van DNA-origami structuren te verbeteren. Bovendien zijn er 'building blocks' van DNA-origami commercieel verkrijgbaar waarmee weer grotere structuren kunnen worden gebouwd. Bij de huidige manier van het maken van DNA-origami structuren is de productie nog laag en daarmee beperkt geschikt voor grootschalige, commerciële toepassingen. Echter, recente ontwikkelingen lijken daar een forse verbetering in aan te brengen (Praetorius et al., 2017; zie ook kader bij 2.1).

De commerciële interesse voor mogelijke bionano toepassingen blijkt uit het aantal en het soort wetenschappelijke publicaties en het aantal basisuitvindingen dat uit de scan van de octrooiliteratuur naar voren komt. Hoewel de huidige gegevensbasis beperkt is, lijkt de analyse van de relaties binnen octrooiaanvragen de veronderstelling te onderbouwen

dat de nadruk bij bedrijven meer bij commerciële toepassing komt te liggen.

De trend richting toepassing en integratie van technologieën die zichtbaar is voor bionanotechnologie komt overeen met de algemene bevindingen op het gebied van nanotechnologie en biotechnologie die recent zijn beschreven in een rapport van de OECD (OECD 2018). Dit rapport laat op basis van tekstanalyses in wetenschappelijke publicaties en patentonderzoek zien dat de velden biotechnologie en nanotechnologie in toenemende mate overlappen. Nanotechnologie wordt steeds meer gebruikt als een technologie die nieuwe ontwikkelingen in de biotechnologie mogelijk maakt, bijvoorbeeld middels de ontwikkeling van instrumenten ('enabling technology'). Het onderzoek van de OECD geeft ook aan dat het onderzoek op dit grensvlak meer toepassingsgericht wordt.

Extra materiaal met een meer gedetailleerde beschrijving geeft van de (wetenschappelijke) stand van zaken op het gebied van DNA-origami, RNA-origami en door de mens zelf ontworpen eiwitten, is op verzoek beschikbaar. Vooral op het nog jonge en in ontwikkeling zijnde vlak van DNA-origami zijn veel wetenschappelijke ontwikkelingen en mogelijke toepassingen gevonden.

3.5 Tussenconclusies

- Er is een duidelijke toename in de wetenschappelijke interesse in moleculaire origami als onderzoeksgebied.
- De octrooiliteratuur lijkt een verschuiving te laten zien van puur wetenschappelijk onderzoek naar meer toepassingsgericht onderzoek.
- Computersoftware is beschikbaar die het ontwerpen van de moleculaire origamistructuren versimpelt.
- De productiemethodes voor het maken van dit soort structuren worden steeds beter, efficiënter en goedkoper.

4 Mogelijke risico's

Om iets te kunnen zeggen over mogelijke risico's van bionanomaterialen wordt in dit hoofdstuk ingegaan op mogelijke (onbedoelde) effecten van en blootstelling aan bionanomaterialen voor de mens. Dit is gebaseerd op beperkte wetenschappelijke informatie in combinatie met 'expert judgement'. Voor het milieu is nog minder informatie beschikbaar waardoor alleen geconcludeerd kan worden dat bij organismen in het milieu vergelijkbare aspecten kunnen spelen als bij de mens.

In paragraaf 4.1 gaan we dieper in op de mogelijk onbedoelde effecten. In 4.2 wordt ingegaan op blootstelling, en vervolgens in 4.3 kort op de risico's. De meeste informatie komt van DNA-origami structuren.

4.1 Mogelijke onbedoelde effecten

Om inzicht te krijgen in de mogelijke effecten van bionanomaterialen is nagegaan wat er bekend is over de kinetiek en toxiciteit van bionanomaterialen.

Er is geen informatie over de mate van opname in het lichaam na orale, inhalatoire of dermale blootstelling. Wel laten meerdere studies met *in vitro* cel-systemen en uit dieren geïsoleerde cellen zien dat DNA-origami structuren worden opgenomen door cellen (Schuller et al. 2011, Okholm and Kjems 2016). Zo werden DNA-origami buisjes opgenomen door cellen afkomstig van de milt van muizen (Schüller et al., 2011). Het is waarschijnlijk dat, eenmaal opgenomen in het lichaam, DNA-origami structuren voor een groot deel worden afgevangen door fagocyterende cellen (Okholm and Kjems 2016), die bijvoorbeeld veel aanwezig zijn in de milt, lever en long. Driehoekvormige DNA-origami structuren beladen met een antikanker medicijn (doxorubicine) zijn na intraveneuze toediening in muizen inderdaad teruggevonden in de tumor, lever, nier, milt en long, en in mindere mate in hersenen en hart (Lee et al. 2012, Zhang et al. 2014). Wel moet deze informatie over verdeling in het lichaam met enige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd omdat gebruik werd gemaakt van een complex van DNA-origami met een fluorescent label, wat in de loop van de tijd uiteen kan vallen. Volgens Wang et al. (Wang et al. 2017) en Okholm en Kjems (Okholm and Kjems 2016) worden DNA-origami structuren uiteindelijk getransporteerd naar lysosomen in de fagocyterende cellen, waar ze verder worden afgebroken.

De vorm en compactheid van de structuren lijken bepalend voor de stabiliteit, waarschijnlijk omdat dit de toegankelijkheid voor enzymen (nucleases) beïnvloedt (Surana et al. 2015). Vaak worden bewust stabielere DNA-origami structuren gemaakt die minder eenvoudig kunnen worden afgebroken door lichaamseigen enzymen.

Desalniettemin desintegreert de structuur na verloop van tijd, meestal binnen een tijdsframe in de orde van dagen (Shen et al. 2012). Bepaalde aanpassingen zouden de afbraak echter verder kunnen verminderen of verhinderen en daarmee de structuren stabiel en persistenter maken. Bijvoorbeeld zouden niet-natuurlijke basen (in

plaats van de A, C, G en T) of niet-natuurlijke suikergroepen gebruikt kunnen worden (Surana et al. 2015), waar nucleases mogelijk geen grip op hebben. Ook bij RNA-origami wordt gewerkt aan dergelijke aanpassingen van het RNA waardoor het RNA-origami minder gevoelig is voor afbraak door enzymen (Parlea et al. 2016). In geval van structuren met hoge stabiliteit is extra aandacht nodig om na te gaan of lange termijn effecten kunnen optreden.

Het onderscheiden van lichaamsvreemde stoffen is een essentieel aspect van het afweersysteem. Dit geldt in het bijzonder voor lichaamsvreemd DNA, RNA of eiwitten omdat dit kan duiden op bacteriële of virale indringers in het lichaam. Een sterke reactie op dergelijke lichaamsvreemde stoffen is zodoende evolutionair gegroeid (Surana et al. 2015). DNA-origami structuren die in het lichaam komen kunnen daarom een sterke immunogene reactie teweeg brengen. Dit is ook waargenomen in *in vitro* celsystemen (Schuller et al. 2011, Surana et al. 2015). De sterkte van de immunoreactie is afhankelijk van specifieke eigenschappen van de structuur; een afhankelijkheid die gebruikt kan worden om minder immunogene structuren te ontwikkelen. Een zeer sterke immunoreactie is gevonden voor DNA buisjes met daarop een nucleïnezuurvolgorde die typisch is voor bacterieel DNA, wat gebruikt zou kunnen worden voor de ontwikkeling van adjuvans in vaccins (Schuller et al. 2011). Ook het DNA-origami zonder deze specifieke nucleïnezuurvolgorde activeerde een immunoreactie, al was die minder sterk (Schuller et al. 2011). Volgens Surana et al. (2015) zouden ook deels afgebroken DNA-origami structuren een immunoreactie kunnen opwekken. Een immunogene reactie kan tot immunotoxiciteit leiden. Immunotoxiciteit is daarom een belangrijk aspect om mee te nemen in bij de beoordeling van risico's wanneer opname in het lichaam mogelijk is.

Een ander mogelijk effect dat kan optreden als DNA-origami structuren in het lichaam komen is dat stukjes DNA, afkomstig van een DNA-origami structuur, onbedoeld worden ingebouwd in het DNA van een blootgesteld persoon (gebaseerd op 'expert judgement'). Opname in het genoom kan consequenties hebben voor het functioneren van de cel waarin dit gebeurt. Omdat weefsels uit heel veel cellen bestaan is er op dit moment geen reden om aan te nemen dat veel cellen op dezelfde manier gaan disfunctioneren. Extra oplettendheid is geboden als dergelijke veranderingen kunnen plaatsvinden in snel-delende cellen of kiembaancellen. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat de opname van een stukje DNA in het genoom op een plaats gebeurt waardoor de cel tot tumorvorming wordt aangezet. Dit gebeurt alleen als de stukjes DNA op specifieke plekken worden ingebouwd. Hoewel opname van enkelstrengs DNA in het (dubbelstrengs) genoom niet heel makkelijk kan plaatsvinden, is het goed om bij dit soort moleculen die een interactie kunnen aangaan met DNA, extra aandacht te hebben voor eventuele (genotoxische) carcinogeniteit.

RNA-origami structuren zouden tevens effecten gelinkt aan de genexpressie kunnen hebben. Dit zou het gevolg kunnen zijn van interferentie van RNA-origami fragmenten met het in de cel van nature voorkomende RNA. Deze interferentie zou dan weer invloed kunnen

hebben op de genregulering en productie van specifieke eiwitten door de cel.

Een aspect dat bij eiwit-structuren in de gaten gehouden moet worden, naast het mogelijk voorkomen van immunotoxiciteit, is eiwit-aggregatie (samenklonteren). In sommige gevallen kan een initiële samenklontering verdere aggregatie van eiwitten induceren. Afhankelijk van de plek in het lichaam kan de aggregatie nadelige gevolgen hebben. Aandoeningen als Parkinson en Alzheimer zijn in verband gebracht met eiwit-aggregatie. Ook kunnen deze aggregaten een immunogene reactie tot gevolg hebben.

4.2 Blootstelling

Zoals eerder aangegeven zijn er voor zover bekend nog geen/weinig DNA- en RNA-origami bionano-producten op de markt en kan alleen over eventuele toekomstige blootstelling worden gesproken. Op basis van de huidige ontwikkelingen is de inschatting dat humane blootstelling in eerste instantie zal plaatsvinden bij medische toepassingen.

De wijze van toepassing (crème, pil, textiel) en de specifieke condities bepalen de mate van blootstelling en de meest relevante blootstellingsroute. De blootstelling bij medische toepassingen is over het algemeen veel gecontroleerder en bekender dan bij gebruik van consumentenartikelen. Een bionanomateriaal zal voordat het in het lichaam terecht komt eerst een barrière moeten passeren, zoals de huid, het longepitheel of het maagdarmkanaal. Bij medische toepassingen die direct (intraveneus) in het lichaam worden gebracht is deze barrière al geslecht. Net als bij (andere) nanomaterialen is het goed mogelijk dat deze barrières een groot deel van de bionanomaterialen tegenhouden, en maar een beperkt deel wordt opgenomen. Ook is het mogelijk dat de bionanomaterialen in het maagdarmkanaal afbreken. Kortom, humane blootstelling aan bionanomaterialen is afhankelijk van het product en het gebruik. In de dierstudies zijn bionanomaterialen tot nu toe alleen intraveneus toegediend (zie 4.1 voor verdere details).

Medische en consumententoepassingen zijn ook relevant voor eventuele emissie naar het milieu, waar bionanomaterialen tijdens gebruik, via uitscheiding of via de afvalfase van producten in het milieu terecht komen. Bionanomaterialen kunnen daarnaast direct in het milieu worden toegepast. Gezien de ontwikkeling van 'release systems' kan gedacht worden aan toepassing in bijvoorbeeld gewasbeschermingsmiddelen of meststoffen. Wat er vervolgens met de bionanomaterialen gebeurt – hoe ze zich in het milieu verspreiden en hoe lang ze aanwezig blijven – is onbekend.

4.3 Risico's

Vanwege de beperkte informatie over blootstelling, kinetiek en effecten is het niet mogelijk een beeld van eventuele risico's te schetsen. Meer inzicht in de mate van opname, stapeling en effecten – waaronder in ieder geval immunotoxiciteit en genotoxiciteit – lijkt daarom relevant. Dit geldt ook voor het volgen van toepassing van bionano.

4.4 Tussenconclusie

Op basis van de huidige informatie is er een aantal potentiële milieu- en gezondheidseffecten geïdentificeerd die in een risicobeoordeling geadresseerd moeten worden.

- Voor zowel DNA-origami als RNA-origami geldt dat er rekening gehouden moet worden met immunotoxiciteit.
- Voor DNA-origami is in principe integratie van fragmenten in het genoom mogelijk. Het is daarom raadzaam om aandacht te hebben voor genotoxische of niet-genotoxische carcinogeniteit.
- Bij stabiele DNA- en RNA-origamistructuren – die structuren waar enzymen (nucleases) slecht grip op hebben – moet er aandacht zijn voor eventuele lange-termijn effecten.
- Voor RNA-origami bestaat de mogelijkheid van interferentie met de reguleringsprocessen in de cel, waardoor de interne werking van een cel verandert en daarmee bijv. de hoeveelheid van een eiwit die in een cel wordt geproduceerd.
- Lichaamsvreemde eiwitten kunnen ook immunogene reacties – en dus eventueel immunotoxiciteit – opwekken. Daarnaast lijkt aandacht voor de mogelijkheid van samenklonteren van eiwitten op ongewenste locaties (in het lichaam) relevant.
- Effecten op het milieu zijn nog onbekend. Vergelijkbaar met humane blootstelling zijn immunogene reacties en inbouwen van stukjes DNA in het genoom van planten en dieren niet uit te sluiten.
- Over eventuele omvang van de blootstelling en/of emissie naar het milieu is nog weinig bekend.
- Er zijn maar zeer beperkt gegevens bekend over de opname door het lichaam van bionanomaterialen.

5 Bruikbaarheid wettelijke kaders

Op basis van het verwachte type toepassingen (zie hoofdstuk 2) is een eerste inschatting gemaakt van de bruikbaarheid en geschiktheid van mogelijke relevante wettelijke kaders voor de beoordeling van de veiligheid van bionano materialen of producten zoals beschreven in dit rapport. Dit is gedaan met behulp van een select aantal diepte interviews met RIVM experts. Bekeken kaders zijn:

- Stoffenwetgeving (REACH)
- Productregelgeving voor:
 - medische toepassingen (geneesmiddelen (MDP) en medische hulpmiddelen (MDD))
 - Biociden (BPR)
 - Gewasbeschermingsmiddelen (PPP)
 - Cosmetica
- Regelgeving voor genetische gemodificeerde organismen (ggo) (Besluit ggo)
- Arbeidsomstandigheden regelgeving.

Binnen deze wettelijke kaders is gekeken naar het toepassingsbereik (de scope) en naar de geschiktheid van de specifieke informatievereisten binnen die wettelijke kaders. Op verzoek is een meer uitgebreide beschrijving beschikbaar.

5.1 De scope van de wettelijke kaders

5.1.1

Scope REACH

REACH is van toepassing op stoffen, mengsels van stoffen en stoffen in voorwerpen (artikelen). REACH stelt informatievereisten ten behoeve van veilig gebruik van deze stoffen. Het gaat hierbij om informatie over nadelige effecten op de gezondheid en milieu, en informatie over gebruik en blootstelling. Deze informatie wordt vervolgens gedeeld met gebruikers via het Veiligheidsinformatieblad zodat er veilig met deze stoffen gewerkt kan worden. Daarnaast wordt deze informatie gebruikt om waar nodig risicobeheersmaatregelen te treffen.

Kader – stoffenwetgeving REACH

REACH is de overkoepelende stoffenwetgeving in Europa. Daarnaast bestaan er diverse productwetgevingen (zie elders in dit hoofdstuk). Belangrijke instrumenten uit de REACH wetgeving zijn:

- Producenten moeten veilig gebruik aantonen en dit aantoonbaar maken door het overleggen van de juiste gegevens over schadelijkheid en blootstelling. Welke en hoeveel gegevens overlegd moeten worden hangt af van het productievolume van de stof en of de stof zich in de R&D ontwikkelingsfase bevindt (of niet).
- De overheid (bevoegde autoriteit) kan, mits goed onderbouwd, de producent om meer informatie vragen wanneer er zorg is dat de risico's van de stof mogelijk groter zijn dan op basis van de beschikbare informatie kan worden aangetoond.
- De Europese overheid kan op basis van een goede onderbouwing het gebruik van een stof beperken of zelfs geheel

- verbieden via een restrictie of autorisatie.
- Producenten kunnen voor gevaarlijke stoffen waarvoor verder gebruik verboden is via autorisatie een ontheffing aanvragen als aangetoond kan worden dat het gebruik veilig kan of dat de maatschappelijk baten groter zijn dan de mogelijke nadelige effecten.

Buiten REACH kader kan de informatie gebruikt worden voor verdere communicatie over gevaren van stoffen, bijvoorbeeld binnen de regelgeving voor classificatie, labelling en verpakking van stoffen en mengsels (CLP, (EC) No 1272/2008), of voor het vast stellen van limietwaarden voor veilig gebruik van deze stoffen in producten binnen de betreffende productregelgeving.

De REACH regelgeving kent een opdeling in verschillende categorieën stoffen die relevant zijn voor de scope van de regelgeving.

Tabel 1 Verschillende definities voor categorieën van stoffen onder REACH

REACH indeling	Definitie
(Enkelvoudige chemische) stof	Een stof wordt gezien als een chemisch element en de verbindingen ervan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit ervan en alle onzuiverheden ten gevolge van het toegepaste procedé. Oplosmiddelen maken typisch geen onderdeel uit van een stof. Zie art. 3(1) van de REACH wettelijke tekst voor de volledige definitie.
Nanomateriaal	Nanomaterialen zijn chemische stoffen of materialen met een deeltjesgrootte tussen 1 en 100 nanometer (nm) in ten minste één dimensie. Binnen Europa bestaat een aanbeveling inzake de definitie van nanomateriaal (EU696 2011).
Polymeer	Een polymeer bestaat uit minimaal drie monomeereenheden met een minimale variatie van molecuulgewichten per afzonderlijke polymeer keten. Polymeren zijn covalent gebonden eenheden. Zie art. 3(5) van de REACH wettelijke tekst voor de volledige definitie.
UVCB	UVCB staat voor "substance of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials". UVCB is een categorie stoffen van onbekende of variabele samenstelling, complexe reactie producten of biologische macromoleculen.
Mengsel	REACH verstaat onder een mengsel "een mengsel of oplossing bestaande uit twee of meer stoffen". Zie art. 3(2) van de REACH wettelijke tekst voor de volledige definitie.
Voorwerp (EN; article)	Een voorwerp is een object waaraan tijdens de productie een speciale vorm, oppervlak of patroon wordt gegeven, wat zijn functie in hogere mate bepaalt dan de chemische samenstelling. Zie art. 3(3) van de REACH wettelijke tekst voor de volledige definitie.

Tot welke van deze categorieën een *specifieke* bionanostructuur gerekend gaat worden is nu nog niet eenduidig vast te leggen. Hoe dit doorwerkt in de mogelijke informatievereisten is samengevat in **Error! Reference source not found..**

De huidige nanomaterialen worden gezien als stof, ook als het hierbij gaat om meer complexere structuren. Voorbeelden van zulke complex samengestelde nanomaterialen zijn transport-moleculen (carriers) voor medicijn distributie in het lichaam, of meerwandige gefunctionaliseerde nanomaterialen. Afgaande op hoe de huidige nanomaterialen ingedeeld, zouden bionanomaterialen ook als stof kunnen worden geïdentificeerd, bijvoorbeeld als UVCB (DNA, RNA en eiwitten zijn immers biologische macromoleculen). Het is ook goed mogelijk dat een bionanostructuur dat een complex is van verschillende macromoleculen geïdentificeerd wordt als mengsel van individuele stoffen (individuele UVCBs). Alternatief zou een bionanostructuur als polymeer kunnen worden gezien. Immers, DNA, RNA en eiwitten zijn in chemische zin polymeren. Binnen REACH kaders echter zijn polymeren gedefinieerd met een zekere minimale grootte verdeling. De verwachting is dat bionanomaterialen zodanig specifiek worden ontworpen dat ze niet aan de polymeer definitie zullen voldoen. Wanneer uit bionanomaterialen fabriekjes of machientjes worden opgebouwd wordt verwacht dat deze fabriekjes of machientjes mogelijk als voorwerp of artikel worden beschouwd.

5.1.2 *Scope productregelgeving*

De verschillende soorten productregelgeving richten zich op veilig gebruik van de betreffende producten, zoals een gewasbeschermingsmiddel, een biocide, een cosmetica product, een medisch hulpmiddel of een medicijn. Beoordeling van de veiligheid richt zich in deze regelgevingen niet alleen op de afzonderlijke ingrediënten (stoffen) in het product, maar in belangrijke mate ook op de veiligheid van het product als geheel in de toepassing waarvoor deze is bedoeld. Dit betekent dat de veiligheid van het bionanomateriaal in principe als onderdeel/ingrediënt van het product wordt beoordeeld.

5.1.3 *Scope Besluit ggo (genetisch gemodificeerde organismen)*

Het Besluit ggo richt zich op levende organismen waarbij veranderingen in het DNA worden aangebracht. De in dit rapport beschouwde DNA structuren zijn door de mens vervaardigde macromoleculaire structuren die niet het doel hebben om het DNA van een organisme te veranderen. Het Besluit ggo lijkt daarmee niet van toepassing. Omdat het toedienen van DNA in de vorm van DNA-origami onbedoeld mogelijk wel tot verandering in het DNA van een organisme kan leiden, is het van belang om over dit risico na te denken. De hazards die onder het Besluit ggo in ogenschouw genomen worden, zoals het inbouwen van stukjes DNA in het genoom zijn wel bruikbaar om na te denken over de risico's van bionanomaterialen.

Indien genetische gemodificeerde micro-organismen worden ingezet voor bijvoorbeeld de productie van DNA-, RNA- of eiwitten dan is het Besluit van toepassing op het productieproces. De regelgeving regelt in dat geval een verantwoorde toepassing en gebruik van het genetisch gemodificeerde organisme maar niet het materiaal dat wordt geproduceerd.

5.1.4 *Scope arbeidsomstandigheden wetgeving*

Voor de arbeidsomstandigheden wetgeving geldt dat de scope bepaald wordt door een specifieke activiteit – in dit geval het werken met bionanostructuren.

5.2 **Informatievereisten wettelijke kaders**

Voor de verschillende wettelijke kaders geldt dat elk kader specifieke informatievereisten oplegt. Die informatie is nodig om een oordeel te vormen over de mogelijke nadelige effecten voor mens en/of milieu en de omvang van eventuele risico's.

De vraag is of de informatievereisten zoals die zijn vastgelegd in de verschillende wettelijke kaders volstaan om een oordeel over mogelijk 'bionano' specifieke nadelige effecten en de mogelijke blootstelling te kunnen vormen. Voor bionanomaterialen is het op basis van een eerste screening van belang om gegevens te genereren over de a) immunotoxische potentie van het materiaal bij potentiële interne blootstelling en b) genotoxische carcinogeniteit. Daarnaast zijn er gegevens nodig over de mogelijke effecten door RNA-interferentie en eiwitaggregatie.

5.2.1 *REACH*

Informatievereisten bij diverse indelingen binnen REACH

Er zijn verschillende mogelijkheden waarop bionanotoepassingen onder de stoffenwetgeving REACH kunnen vallen. Deze mogelijkheden en de gevolgen voor de informatievereisten zijn weergegeven in onderstaande tabel. Ook de waarschijnlijkheid dat bionanotoepassingen hieronder vallen is hieronder beschreven.

Tabel 2 Informatievereisten onder REACH per stofcategorie en de mogelijke relevantie voor bionanomaterialen

REACH indeling	Informatievereisten	Relevantie met betrekking tot bionanomaterialen
(Enkelvoudige chemische) stof	De standaard REACH informatievereisten zijn in principe van toepassing. De hoeveelheid informatie over nadelige effecten op mens en milieu wordt mede bepaald door het volume (tonnage) waarmee de stof jaarlijks op de markt wordt gebracht. Informatie over blootstelling wordt verder ook bepaald door aanwezigheid van nadelige effecten. Voor stoffen die zich in de R&D fase bevinden hoeft maar weinig informatie te worden gegeven. Voor deze stoffen gelden <u>aangepaste informatievereisten</u> .	Bionanomaterialen zouden kunnen worden gekarakteriseerd als stof. Vraag hierbij is of, in het geval van een complex, het gehele complex als stof wordt aangemerkt of dat de afzonderlijke onderdelen van het complex elk afzonderlijk als stof worden aangemerkt, en het complex als een mengsel (zie ook informatievereisten van mengsel hieronder).
Nanomateriaal	De REACH informatievereisten voor nanomaterialen (van kracht in 2020) zijn in principe van toepassing (mits de stof zich niet	De aanvullende informatie-eisen voor nanomaterialen zijn alleen van toepassing op een bionanomateriaal indien deze

REACH indeling	Informatievereisten	Relevantie met betrekking tot bionanomaterialen
	in de R&D fase bevindt). Deze zijn aanvullend op de standaard eisen voor enkelvoudige chemische stoffen.	voldoet aan de definitie van een nanomateriaal. Dit zal naar verwachting niet altijd het geval zijn.
Polymeer	De standaard informatievereisten voor stoffen gelden ook voor monomeren, maar niet voor polymeren. Voor polymeren wordt veel minder informatie vereist dan voor de individuele monomeer eenheden.	Bionanomaterialen zijn in chemische zin polymeren (een herhaling van repeterende kleinere bouwblokken). Verwachting is dat bionanomaterialen niet zullen voldoen aan de REACH-definitie van een polymeer. Het huidige overzicht suggereert dat bionanomaterialen zeer nauw gedefinieerd zijn en dat er waarschijnlijk per structuur een zeer kleine variatie zal zijn in molecuulgewicht, te klein om te voldoen aan de definitie voor een polymeer.
UVCB	De standaard REACH informatievereisten voor stoffen gelden ook voor UVCBs.	DNA, RNA en eiwitten zouden als biologische materialen aangemerkt kunnen worden, en mogelijk zelfs als onderdeel van deze categorie worden gezien.
Mengsel	De standaard REACH informatievereisten zijn van toepassing op stoffen in een mengsel. Voor mengsels moet op het veiligheidsinformatieblad worden aangegeven hoe veilig gewerkt kan worden.	Omdat het bij bionanomaterialen gaat om niet-covalent ¹ gebonden complexen, is het – in principe – mogelijk dat het complex als mengsel wordt gezien. Als de bionanomateriaal wordt gezien als een mengsel dan zijn de informatievereisten voor stoffen in principe van toepassing op de individuele onderdelen.
Voorwerp (EN; article)	De standaard informatievereisten voor stoffen in REACH zijn <u>niet</u> van toepassing op voorwerpen.	Bij een bionanostructuur is juist de vorm en het oppervlak van de 3D-structuur bepalend voor de functionaliteit. Daarmee is het, in principe, mogelijk dat een bionanostructuur als voorwerp wordt aangemerkt.

Informatievereisten REACH i.r.t. bionano structuren

Voor bionanomaterialen lijkt het dat er, op basis van de huidige screening, aandacht nodig is voor de immunotoxische potentie bij

(eventuele) blootstelling en voor eventuele genotoxische effecten. In de huidige informatievereisten van REACH voor stoffen is slechts beperkt aandacht voor immunotoxiciteit. Daarbij is de vraag naar en de diepgang van deze informatie sterk afhankelijk van het jaarlijkse volume waarmee stoffen op de markt worden gebracht. Doordat de jaarlijkse volumes waarmee bionanomaterialen op de markt komen per bionanomateriaal waarschijnlijk laag zijn vanwege de hoge specificiteit en de meeste materialen nog in de ontwikkelingsfase zitten, is de verwachting dat informatie over nadelige effecten zeer beperkt zal zijn.

Testen op genotoxiciteit op basis van in vitro studies is een standaard informatievereiste. Omdat het hier echter om een heel specifiek werkingsmechanisme gaat, is het op dit moment nog niet duidelijk of de gebruikte standaard testen adequaat en voorspellend zijn. Voor de groep nanomaterialen blijkt bijvoorbeeld dat de huidige testmethoden voor in vitro genotoxiciteit niet geschikt zijn of aangepast moeten worden.

Ook effecten die optreden als gevolg van RNA interferentie of via eiwitaggregatie vragen om een heel specifiek testregiem. De inschatting is dat de huidige testen onvoldoende specifiek zijn om dit type effecten zichtbaar te maken.

Ook in het algemeen geldt dat nagegaan zal moeten worden of de huidige testmethoden geschikt zijn voor bionanomaterialen of, analoog aan nanomaterialen, aanpassing behoeven.

5.2.2 *Productregelgeving*

Voor alle productregelgeving geldt in principe dat de veiligheid zowel op individueel stofniveau als op productniveau wordt beoordeeld. Informatie die binnen REACH kader wordt gegenereerd wordt hierbij meegenomen.

Cosmetica

Omdat de beoordeling van producten sterk afhangt van de specifieke toepassing hangt ook de risicobeoordeling af van de blootstellingsroute. Voor cosmetica toepassingen betekent dit dat voornamelijk gekeken wordt naar mogelijke effecten bij uitwendige blootstelling. De cosmetica regelgeving kent een wetenschappelijk comité (SCCS) dat – indien er reden tot zorg is – nadere evaluatie van een ingrediënt kan doen. Ook kan er indien relevant, naar additionele blootstellingsroutes worden gekeken.

Gewasbeschermingsmiddelen en biociden

Voor biociden en gewasbeschermingsmiddelen wordt blootstelling aan het product en het aanwezige residu op het gewas via de huid, via inademing en door opeten beoordeeld. Hierbij worden zowel de eventueel nadelige effecten van de actieve stoffen en preparaten (in het geval van gewasbeschermingsmiddelen) als de nadelige effecten van het product als geheel in beschouwing genomen. Waar nodig kan de beoordeling van nadelige effecten worden uitgebreid naar een aanvullende beoordeling van individuele stoffen die in de formulering van producten worden gebruikt. De informatievereisten voor de beoordeling van veilig gebruik van actieve stoffen is in het algemeen

uitgebreider dan de vereisten onder de REACH regelgeving en zijn niet afhankelijk van het jaarlijkse productievolume van de stof. Voor gewasbeschermingsmiddelen moet deze informatie bijvoorbeeld voldoende zijn om, indien van toepassing, de stof te kunnen classificeren onder CLP (zie verder (EU) No 283/2013). Voor biociden staan de informatievereisten beschreven in (EU) No 528/2012 Annex II, III en IV. Echter, ook voor deze wettelijke kaders is de informatie over effecten op het immuunsysteem beperkt. Informatie over genotoxiciteit wordt wel standaard gevraagd.

Medische hulpmiddelen en geneesmiddelen

Voor de wetgeving voor medische hulpmiddelen en geneesmiddelen wordt de interne en externe blootstelling beoordeeld afhankelijk van het specifieke product en wordt een uitgebreide analyse gemaakt van mogelijke effecten van de actieve stoffen en hulpstoffen in de geneesmiddelen als mede van de eventuele blootstelling aan stoffen vanuit medische hulpmiddelen. Binnen de medische hoek is relatief veel kennis op het gebied van mogelijke (bij-)effecten van gen-therapie waarbij het de verwachting is dat deze betreffende wetgeving relatief gevoelig is voor het oppikken van eventuele immunotoxische effecten, genotoxiciteit, en effecten gerelateerd aan RNA interferentie en eiwitaggregatie.

Voor de overige productwetgevingen geldt dat de aandacht voor specifieke immunotoxiciteit beperkt zal zijn. Daarnaast geldt voor alle wetgeving dat het op dit moment nog niet duidelijk is of de gebruikte standaard testen voor genotoxiciteit adequaat en voorspellend zijn. Dit geldt ook voor effecten die gerelateerd zijn aan RNA interferentie en eiwitaggregatie.

Nanomaterialen in productregelgeving

De gewasbeschermingsmiddelen regelgeving en de regelgeving voor farmaceutica heeft geen specifieke informatie of beoordelingsvereisten voor nanomaterialen, wat gebruikt zou kunnen worden bij de analyse van de adequaatheid van de beschikbare testen voor bionanomaterialen. De regelgeving voor biociden, medische hulpmiddelen en cosmetica hebben dat wel. Voor farmaceutica geldt wel dat de regelgeving op Advanced Therapy Medical Products (ATMP's) voldoende aanknopingspunten zou moeten leveren om eventuele nadelige effecten van nanomaterialen te signaleren.

5.2.3 *Besluit ggo*

Het Besluit ggo regelt veilige toepassing van genetisch gemodificeerde organismen. Daarmee is het Besluit ggo niet het geschikte kader om bionanomaterialen te beoordelen. Bij het beoordelen van bionanomaterialen kan wel gebruik gemaakt worden van de kennis en expertise die nodig is voor het beoordelen van de mogelijke risico's van vreemd DNA, RNA en eiwit in een organisme.

5.2.4 *Arbeidsomstandighedenregelgeving*

De arbowetgeving regelt in generieke zin de veiligheid van de werknemer en vraagt om een risicobeoordeling indien er gewerkt wordt met een gevaarlijk chemisch agens. Het begrip gevaarlijk chemisch agens verwijst enerzijds naar de definitie van gevaarlijke stof uit de

verordening voor Classification, Labeling and Packaging (CLP) Verordening (EG) 1272/2008 voor de classificatie en labelling van stoffen en preparaten en de stoffenwetgeving REACH, maar kent ook een bepaling die die definitie verder verbreedt.

Bij de risicobeoordeling (RI&E, Risico inventarisatie en evaluatie) geldt dat de risico's en de mogelijk beperkende maatregelen in kaart moeten worden gebracht. Die verplichting is generiek en moet gebaseerd zijn op beschikbare informatie. Dit zal dus niet leiden tot extra informatievereisten, maar vraagt voor een goede uitvoering wel om meer algemene kennis over eventuele risico's van bionanostructuren.

5.2.5 *Tussenconclusies*

Op grond van een eerste verkenning van een aantal wetgevende kaders trekken we de volgende conclusies

- De scope van zowel de stoffenwetgeving, de verschillende productregelgevingen en de arbeidsomstandighedenwetgeving is naar verwachting dekkend voor hier besproken toepassingen van bionanotechnologie.
- Bionanomaterialen zullen onder de chemische stoffen wetgeving waarschijnlijk worden gezien als mengsel, nanomateriaal en/of UVCB.
- Gezien de verwachte hoge specificiteit van bionanomaterialen zijn toekomstige productievolumina waarschijnlijk klein, en is de gevraagde informatie over eventuele effecten naar verwachting zeer beperkt.
- Voor alle soorten wetgeving geldt dat de bestaande informatievereisten waarschijnlijk niet voldoende zijn om een uitspraak te kunnen doen over de te verwachten hazards. Expertise vanuit het ggo kader kan nuttig zijn om bepaalde risico's te duiden.
- Het is op dit moment onduidelijk of de huidige gebruikte en voorgeschreven testen voldoende geschikt zijn om de benodigde gegevens over de specifieke hazards te kunnen bepalen.

6 Discussie

6.1 Inleiding

In het onderstaande bespreken we een aantal onderdelen nader, nl

- Kanttekeningen bij het onderzoek
- Beschikbaarheid van informatie en wettelijke kaders
- Risicoaspecten en dekking door wettelijke kaders
- Veilig aan de voorkant.

6.2 Kanttekeningen bij het onderzoek

De opbrengsten van dit onderzoek zijn gebaseerd op literatuuronderzoek en een aantal gesprekken met inhoudelijk experts en kennishouders op het gebied van wet- en regelgeving. Daarnaast is door RVO (Rijksdienst voor Ondernemend Nederland) een analyse gemaakt van patentaanvragen. Op basis van de ruwe resultaten is een inschatting gemaakt van de snelheid van de ontwikkeling, de verwachte toepassingsgebieden, de mogelijke schadelijke effecten en de toereikendheid van de huidige wetgevende kaders.

Doel van het onderzoek is een indicatie te geven van de ontwikkelingen in de bionanotechnologie en de mogelijke aandachtspunten voor de effecten op mens en milieu. Enkele kanttekeningen bij het onderzoek zijn

- 'Bionanotechnologie' is geen helder gedefinieerde term. Dat maakt dat in de zoekstrategie keuzes moesten worden gemaakt.
- De opbouw van de patentendatabase maakt dat het doorzoeken met andere zoekingen en -termen noodzakelijk was.
- De interviews zijn gedaan met een beperkt aantal experts.
- De informatie uit de literatuur over gezondheids- en milieueffecten van dit type verbindingen is beperkt. De interpretatie is dan ook veelal gebaseerd op expert judgement.

6.3 Hoe wordt een bionanomateriaal in wettelijke kaders aangemerkt?

Of en welke gegevens over fysische-chemische eigenschappen of schadelijkheid voor mens en milieu vereist worden voor toelating van een stof of product tot de markt, hangt in belangrijke mate af van hoe een bionanomateriaal wordt aangemerkt in een wettelijke kader. Voor bionanomaterialen zijn er een aantal mogelijke interpretaties die gevolgen hebben voor de informatievoorziening. In het onderstaande lichten we dat verder toe.

Uit een eerste verkenning van de wet- en regelgeving rond stoffen en producten ontstaat het beeld dat deze wet- en regelgevingen geschikt zou kunnen zijn om veilig gebruik van bionanomaterialen mogelijk te maken. Wel zijn enkele kanttekeningen te plaatsen, waardoor naar verwachting in veel gevallen niet voldoende informatie beschikbaar komt om een uitspraak over het risico te doen.

Welke indelingscategorie?

Binnen REACH geldt dat deze bionanomaterialen waarschijnlijk worden gezien als stof, nanomateriaal, UVCB of als mengsel van stoffen, waardoor de informatievereisten op een vergelijkbare manier van toepassing zal zijn als voor "andere" stoffen. Echter, afhankelijk van de verdere ontwikkeling van de bionanotechnologie bestaat ook de mogelijkheid dat een bionanomateriaal onder REACH als polymeer of als artikel wordt aangemerkt. Als dit gebeurt dan zal dit een effect hebben op de informatievereisten (deze zullen minder worden). Dit is samengevat in **Error! Reference source not found..** Op dit moment is het nog niet duidelijk tot welke indeling bionanomaterialen uiteindelijk zullen worden gerekend.

Voor stoffen die alleen in cosmetica toegepast worden zal typisch de minste kennis over eventuele risico's gegenereerd worden. Dit komt omdat proefdier studies daar niet langer mogen worden uitgevoerd. Vooral voor het signaleren van nog onbekende effecten is dit een mogelijke zorg. Dit geldt overigens ook voor andere stoffen.

Informatievereisten volgens diverse wettelijke kaders

Hoe een bionanomateriaal zal worden beoordeeld, welke informatie door producenten verplicht geleverd moet worden en welke beheersmaatregelen getroffen kunnen worden hangt af van de ontwikkelingsfase van de bionanomateriaal, de toepassing en het tonnage waarmee de structuur jaarlijks op de markt gebracht wordt. Zo gelden er voor actieve stoffen onder de Biociden en Gewasbeschermingsmiddelen regelgeving uitgebreidere informatievereisten dan voor stoffen die onder de REACH regelgeving gereguleerd worden.

Omdat het overgrote deel van de bionanotechnologie zich nu nog in de ontwikkelingsfase bevindt en in deze fase nog geen informatie over nadelige effecten hoeft te worden aangeleverd, zal er op dit moment nog nauwelijks informatie over eventuele risico's worden verzameld.

Voor stoffen die onder REACH geregistreerd worden zal de vereiste informatie afhangen van het jaarlijks op de markt gebrachte tonnage. Hoe meer er op de markt komt, des te uitgebreider de informatievereisten en des te meer er bekend zal zijn over eventuele risico's. Onder de 1000 kg (1ton) per jaar hoeft een stof enkel genotificeerd te worden en hoeft er voor de stof geen informatie over nadelige effecten worden gegeven. Vanwege de vele mogelijkheden om bionanomaterialen aan te passen (3-dimensionale structuur, koppeling met andere stoffen, DNA/RNA/eiwit zelf) is het goed mogelijk dat er veel verschillende nanobio toepassingen in kleine hoeveelheden (onder de 1000 kg per jaar) zullen gaan worden geproduceerd. Voor deze structuren zal dus onder REACH weinig informatie beschikbaar komen om een risicobeoordeling uit te voeren.

Voor biociden, gewasbeschermingsmiddelen, cosmetica, medische hulpmiddelen en medicijnen zijn de informatievereisten niet afhankelijk van de jaarlijks op de markt gebrachte hoeveelheid. Voor deze toepassing is daarom wel de verwachting dat er informatie beschikbaar komt om een risicobeoordeling uit te voeren.

Overige aspecten

Voor bionanomaterialen die onder de biociden en gewasbeschermingsmiddelen regelgeving als mede de regelgeving voor medische hulpmiddelen en medicijnen zullen worden gereguleerd zal typisch de meeste informatie over eventuele risico's beschikbaar komen omdat daar in veel gevallen niet alleen naar de effecten op de gezondheid maar ook (in meer of minder detail) naar het gedrag van een stof in het lichaam en in het milieu gekeken wordt. Alleen in het geval van regelgeving voor medicijnen wordt er standaard ruime informatie over eventuele immunotoxiciteit aangeleverd. Het verdient daarom aanbeveling om de mogelijkheden voor het delen van kennis tussen wettelijke kaders verder te onderzoeken zodat optimaal gebruik kan worden gemaakt van de beschikbare informatie en waar nodig tijdig actie kan worden ondernomen binnen alle productgroepen. Naast de informatie is het ook van belang de kennis en ervaring over risicobeoordeling uit verschillende kaders te combineren. Zo kan de kennis en ervaring over beoordeling van risico's binnen het kader van de ggo wetgeving behulpzaam zijn bij het inschatten van risico's van inbouwen van stukjes DNA in het genoom, RNA interferentie en de aggregatie van eiwitten.

6.4 Aspecten relevant voor risico's en dekking wettelijke kaders

De aspecten die op basis van de huidige, beperkte informatie van belang worden geacht voor eventuele risico's voor mens en milieu zijn immunotoxische effecten, genotoxiciteit, RNA interferentie, eiwitaggregatie en stabiliteit van de bionanomaterialen (zie hoofdstuk 4).

Immunotoxiciteit

Immunotoxiciteit lijkt een reële mogelijkheid voor bionanostructuren omdat immunologische effecten gerelateerd kunnen zijn aan het deeltjesaspect en -formaat (analoog aan nanomaterialen) en omdat het aanpassing van biologische moleculen betreft die als lichaamsvreemd kunnen worden gezien. In de diverse wettelijke kaders voor stoffen is weinig aandacht voor immunotoxiciteit. Vanwege het uitgebreide dossier dat voor een specifiek product volgens medische wetgeving moet worden aangeleverd is het aannemelijk dat immunologische aspecten hier wel opgemerkt worden. In REACH is daarentegen pas een informatievereiste voor stoffen waarvan meer dan 1000 ton per jaar op de markt komt en die niet langer in de R&D fase zitten. Het testen van normale chemische stoffen op immunotoxiciteit is al lastig omdat er nauwelijks gestandaardiseerde (in vivo) testen beschikbaar zijn. In hoeverre bionano-structuren goed kunnen worden getest is niet duidelijk, en vereist verder onderzoek. Ook is niet duidelijk hoe voorspellend *in vitro* assays voor immunotoxiciteit zijn.

Genotoxiciteit

Genotoxiciteit van bionanomaterialen kan niet worden uitgesloten, met name omdat onbedoeld stukjes DNA in het genoom zouden kunnen worden opgenomen. In alle wettelijke kaders wordt gevraagd om enige informatie over de genotoxiciteit. In REACH moet al bij het laagste productieniveau een *in vitro* assay worden gedaan, en indien deze positief is moet verder onderzoek worden gedaan *in vivo*. Ook als meer

van een stof wordt geproduceerd moet in vivo naar genotoxiciteit worden gekeken. De testmethodes voor genotoxiciteit, zowel in vitro en in vivo, zijn nog niet gestandaardiseerd voor nanomaterialen. Vanwege de waarschijnlijk vergelijkbare problematiek - zoals voldoende opname van de deeltjes in de cellen van de in vitro assays en het voorkomen van sedimentatie van samengeklonterde deeltjes, drijven op een vloeistofoppervlak of adsorptie aan oppervlakten - is de toepasbaarheid van in vitro en in vivo genotoxiciteit methoden een aspect dat relevant is voor onderzoek naar mogelijke risico's van bionanomaterialen.

RNA Interferentie

Ook RNA interferentie kan niet uitgesloten worden, waardoor het interne werkingsmechanisme van een cel op fundamenteel niveau kan worden verstoord. Hierdoor kunnen bijvoorbeeld specifieke eiwitten in een cel niet meer worden aangemaakt, waardoor interne processen in de cel verstoord worden. Het is niet waarschijnlijk dat de huidige regulatoire toxiciteitstesten dergelijke effecten zichtbaar kunnen maken. Daarbij komt dat dit soort systemische effecten in de REACH regelgeving alleen voor hoge productie tonnages wordt gevraagd (>1000 ton/jaar).

Eiwitaggregatie

In sommige gevallen kan een initiële samenklontering verdere aggregatie van eiwitten induceren. Afhankelijk van de plek in het lichaam kan de aggregatie nadelige gevolgen hebben (bijv. de ziekte van alzheimer). Ook hier is de inschatting dat de bestaande testen onvoldoende zijn om dergelijke effecten op te pikken. En ook hier geldt dat dit soort systemische effecten in de bestaande regulatoire kaders pas gevraagd worden bij zeer hoge productie tonnages.

Stabiliteit

Er zijn enkele ontwikkelingen om bionanomaterialen stabiel te maken. In sommige gevallen zou de enzymatisch afbraak vrijwel onmogelijk kunnen zijn, bijvoorbeeld door gebruik te maken van niet-natuurlijke nucleotiden, hele dichte structuren of bepaalde coatings. Bij dergelijke persistente bionanomaterialen is meer aandacht nodig voor eventuele accumulatie bij herhaalde blootstelling en lange termijn effecten. Informatie over de afbreekbaarheid door enzymen zoals nucleases, RNases en proteases is daarom van belang. Dit zijn vooralsnog geen informatievereisten in wettelijke kaders en er zijn geen gestandaardiseerde testmethodes.

Definitie

De huidige analyse laat zien dat voor bionano structuren bepaalde effecten mogelijk kunnen zijn die in betreffende wettelijke kaders niet zijn ondervangen. Het gaat hierbij om mogelijk effecten in geval van het inbouwen van stukjes DNA in het genoom, RNA interferentie en om eiwitaggregatie. Ook is de hoeveelheid informatie die nu van producenten gevraagd wordt afhankelijkheid van het productievolume. Indien het wenselijk wordt geacht om door middel van wetgeving (bij andere productievolumes) informatie van fabrikanten te vragen om het risico op deze effecten te beoordelen, dan kan worden overwogen om bionanomaterialen te definiëren. Hiermee kan worden ingekaderd wanneer voor welke materialen welke (aanvullende) informatie gewenst is.

6.5 Veilig aan de voorkant

De huidige ontwikkelingen in de bionanotechnologie bevinden zich in een 'intermediate' stadium. In termen van Technology Readiness Level¹ is de inschatting dat hier sprake is van een niveau 4 tot 6, dat wil zeggen voorbij het fundamentele onderzoek en er is sprake van toepassingsontwikkeling in een laboratoriumsetting.

Dit verkennende onderzoek laat zien dat het gebied van bionanotechnologie relatief nieuw is en zich snel ontwikkelt. Er doen zich vragen voor op het gebied van veiligheid en gezondheid en of dergelijke toepassingen op basis van de huidige wettelijke kaders goed kunnen worden beoordeeld.

Op dit moment is de beschikbare informatie over bionanotechnologie beperkt. Een uitspraak doen over de mogelijke omvang van de (eventuele) zorg is dan ook lastig. Op basis van de huidige informatie in combinatie met expert judgement stellen we vast dat er a) voorstelbare routes zijn die voor mens of milieu tot schadelijke effecten kunnen leiden en b) dat we twijfel hebben of de huidige wettelijke informatievereisten en testmethoden deze mogelijk effecten bij toelating van stoffen en producten ook voldoende goed in beeld kunnen brengen. Om versneld inzicht te krijgen in mogelijke risico's is het belangrijk om gericht aan bovenstaande effecten te werken, waarbij zowel informatie over het effect als op mechanistisch niveau wordt verkregen.

Voor het maken van een inschatting van het risico is naast informatie over eventuele effecten ook informatie nodig over de mogelijke blootstelling en de mate van opname. Omdat het hier gaat om effecten van bionanomaterialen in het lichaam is het essentieel dat die structuren (of delen hiervan) ook daadwerkelijk in het lichaam terecht kunnen komen. Het is daarom belangrijk nader vast te stellen of opname in het lichaam mogelijk is, bijvoorbeeld door transport over de barrière van de huid of het longepitheel. Ook is het van belang inzicht te krijgen in de stabiliteit van dit soort structuren en de mogelijke opname in en door het maag-darm kanaal.

Omdat toepassingen nog niet op de markt zijn en omdat zich op het gebied van veiligheid en gezondheid nieuwe vragen voordoen, en de toepasbaarheid en geschiktheid van de verschillende regelgevende kaders aandacht behoeft, leent deze bionano-ontwikkeling zich voor een aanpak waarbij veiligheidsdenken in een vroeg stadium van de innovatie wordt geïntegreerd. Verbinding met de Safe Innovation Approach zoals die is ontwikkeld in de NANoREG en NanoReg2 projecten³, waarbij zowel aandacht is voor safe-by-design als voor regulatory preparedness, d.w.z. oog voor aspecten die van belang zijn vanuit een regelgevings- en beleidsperspectief, biedt hiertoe kansen.

De bevindingen zoals beschreven in dit rapport zijn mogelijk een beginpunt om verder vorm en inhoud te geven aan een safe-by-design en safe innovation aanpak.

³ <http://www.nanoreg.eu/>; <http://www.nanoreg2.eu/about>;

7 Conclusies

In deze signalering is gekeken naar de ontwikkelingen in de bionanotechnologie, en met name die op het gebied van DNA-origami, RNA-origami en eiwit-engineering. De conclusies en aanbevelingen zijn hieronder beschreven.

7.1 Conclusies

7.1.1 *Algemene observaties*

- Bionanotechnologie is een voorbeeld van convergerende technologieën. De maakbaarheid van structuren met biomoleculen op de nanoschaal creëert veel mogelijkheden, waarvan we als maatschappij waarschijnlijk in de toekomst de vruchten kunnen plukken. Hierbij kan gedacht worden aan effectieve geneesmiddelen met weinig bijwerkingen, betere vaccins, nieuwe materialen bijvoorbeeld op basis van nog niet bestaande eiwitten, schonere en minder energie consumerende productie van chemicaliën, maar ook toepassing in textiel, het gecontroleerd vrijkomen van stoffen ten behoeve van (landbouw)gewassen, cosmetica, biosensoren, data opslag, opvang van zonne-energie etc.
- Het aantal wetenschappelijke publicaties en een octrooi-analyse geeft aan dat de omvang van het bionano veld aanzienlijk is en toeneemt. De octrooi-analyse geeft indicaties voor een verschuiving naar meer marktgerichte toepassingen.
- Het huidige onderzoek op het gebied van bionanotechnologie is gericht op de technische mogelijkheden, zoals het maken van steeds ingewikkelder en dynamische structuren. De ontwikkeling van DNA-origami structuren lijkt enkele jaren voor te lopen op die van RNA-origami en door de mens zelf ontworpen eiwitten. Er is nog weinig aandacht voor eventuele gezondheids- en milieurisico's.

7.1.2 *Technologische ontwikkeling*

- Technische barrières om grootschalige toepassing mogelijk te maken worden in rap tempo geslecht.
 - De open-source computer programma's om DNA-structuren te ontwerpen en recente ontwikkelingen zoals de mogelijkheid om DNA-origami op grote schaal te produceren en een enorme reductie in productiekosten, laten zien dat toepassingen op korte(re) termijn realiseerbaar zijn.
 - DNA-origami, RNA-origami en eiwit-structuren kunnen zowel zelf-assembleren en zelf-organiseren, waardoor meerdere structuren zich organiseren in grotere structuren ('supra-moleculaire chemie'). Ook hybride toepassingen zijn mogelijk, zoals DNA-origami gekoppeld aan specifieke stoffen, RNA-origami, een eiwit of aan nanomaterialen. Dit vergroot de mogelijkheden en maakbaarheid.
 - Op dit moment zijn er, voor zover bekend, nog maar weinig bionano toepassingen op de markt. Huidige toepassingen

voor eiwittenstructuren zijn heel vergelijkbaar met bestaande eiwitten ('close to nature'). Ook kleinschalige toepassing van moleculaire gereedschappen voor in laboratoria bestaande uit DNA-origami structuren lijkt al mogelijk. Omdat dergelijke toepassingen niet gemeld of gelabeld hoeven te worden is het moeilijk om te bepalen of er al toepassingen op de markt zijn. Zowel de wetenschappelijke literatuur als een octrooianalyse suggereren dat er een verschuiving is van fundamenteel wetenschappelijk naar de ontwikkeling van meer marktgericht toepassingen. De verwachting is dat nieuwe toepassingen – buiten specifieke toepassingen binnen laboratoria – waarschijnlijk het eerst zullen worden ontwikkeld in het medische domein, waarbij bestaande (kanker)geneesmiddelen in DNA-origami structuren worden verpakt en op de juiste plek afgegeven. Vanwege de potentie van bionano lijkt het reëel dat andersoortige toepassingen zullen volgen.

7.1.3 *Gevolgen voor mens en milieu*

Op basis van de huidige informatie is er een aantal potentiële risico's (mogelijke effecten) geïdentificeerd die in een risicobeoordeling geadresseerd moeten worden.

- Omdat het afweersysteem sterk ontwikkeld is om niet-eigen DNA te herkennen, geldt voor DNA-origami dat er rekening gehouden moet worden met immunotoxiciteit. Daarnaast is in principe integratie van fragmenten in het genoom mogelijk. Vanwege deze mogelijke integratie is het raadzaam om aandacht te hebben voor genotoxische of niet-genotoxische carcinogeniteit. Vooral als stabiele structuren worden gemaakt, bijvoorbeeld door gebruik van compacte structuren of niet-natuurlijke nucleotiden waar nucleases slecht grip op hebben, moet er aandacht zijn voor eventuele lange-termijn effecten.
- Voor RNA-origami geldt, vergelijkbaar met DNA-origami, naast mogelijke immunotoxiciteit ook nog de mogelijkheid van interferentie in de reguleringsprocessen in de cel, waardoor bijvoorbeeld de hoeveelheid van een eiwit die in een cel wordt geproduceerd veranderd. Ook voor RNA-origami zijn specifieke modificaties mogelijk die de structuren stabiel maken, in welk geval meer aandacht nodig is voor eventuele lange-termijn effecten.
- Lichaamsvreemde eiwitten kunnen ook immunogene reacties – en dus immunotoxiciteit – opwekken. Daarnaast lijkt aandacht voor de mogelijkheid van samenklonteren van eiwitten op ongewenste locaties (in het lichaam) relevant.
- Effecten op het milieu zijn nog onbekend. Vergelijkbaar met humane blootstelling zijn immunotoxische effecten en inbouwen van stukjes DNA in het genoom van planten en dieren niet uit te sluiten.
- Opname van bionanomaterialen in het lichaam kan beperkt zijn door de barrière functies van huid, longepitheel en maagdarmkanaal. Hier is echter niets over bekend.
- Over het algemeen worden bionanostructuren gemaakt die stabiel zijn dan het 'gewone' DNA. Als dergelijke DNA-structuren lang in het lichaam aanwezig blijven is de kans op

effecten groter, zeker als er stapeling kan optreden door herhaalde blootstelling. De huidige informatie suggereert dat de meeste structuren binnen enkele dagen worden afgebroken, wat op een beperkte stabiliteit duidt. Er zijn echter mogelijkheden om de stabiliteit sterk te vergroten, bijvoorbeeld door het maken van compacte structuren of wanneer niet-natuurlijke basen worden gebruikt.

7.1.4 *Aspecten van wetgeving*

Op grond van een verkenning van een aantal wetgevende kaders trekken we de volgende conclusies

- De scope van zowel de stoffenwetgeving, de verschillende productregelgevingen en de arbeidsomstandighedenwetgeving is naar verwachting dekkend voor de hier besproken toepassingen van bionanotechnologie.
- Bionanomaterialen zullen onder de chemische stoffen wetgeving REACH waarschijnlijk worden gezien als stof, mengsel, nanomateriaal en/of UVCB.
- Gezien de verwachte hoge specificiteit van bionanomaterialen zijn toekomstige productievolumina waarschijnlijk klein, en is de vereiste informatie over eventuele effecten binnen de stoffenwetgeving REACH daardoor naar verwachting zeer beperkt.
- Voor alle soorten wetgeving geldt dat de bestaande informatievereisten waarschijnlijk niet voldoende zijn om een uitspraak te kunnen doen over de te verwachten hazards. Expertise vanuit het ggo kader kan nuttig zijn om bepaalde risico's te duiden.
- Het is op dit moment onduidelijk of de huidige gebruikte en voorgeschreven testen voldoende geschikt zijn om de benodigde gegevens over de specifieke hazards te kunnen bepalen.

7.2 **Slotoverwegingen**

Deze signalering laat zien dat de wereld van de bionanotechnologie zich snel ontwikkelt aan de hand van de wetenschappelijke aandacht en vooruitgang op het gebied van DNA, RNA en eiwit origami. Echter, ook in bredere zin lijken er meer en meer ontwikkelingen zichtbaar waarbij 'biologische' moleculen ingezet worden voor specifieke technologische doeleinden zoals data-opslag.

Een andere observatie is dat, in het huidige stadium van onderzoek, feitelijk geen of nauwelijks aandacht is voor aspecten die raken aan veiligheid. De eerste identificatie van hazards laat zien dat er wel degelijk sprake is van zorgvragen die nadere duiding en onderzoek noodzakelijk maken, zeker als meer grootschalige toepassingen aan de horizon gloren.

Het is van belang het onderwerp 'veiligheid' van bionanomaterialen internationaal (wetenschappelijk) te agenderen. Doel hiervan is

- bewustwording dat bij dit soort (wetenschappelijk) onderzoek ook veiligheidsaspecten van belang zijn. Een eerste stap kan zijn de huidige opbrengsten van dit RIVM rapport publiceren in een wetenschappelijk artikel.

- het positioneren van 'safe-by-design' en 'safe innovation' als denk- en werkkader waarbinnen ontwikkelingen horen plaats te vinden. Hierbij staat voorop dat gedurende het ontwikkel- en innovatieproces voldoende informatie en inzicht over o.a. veiligheid beschikbaar komt.
- Stimuleren van kennis- en methodieontwikkeling om o.a. identificatie van en versneld inzicht in risicovraagstukken mogelijk te maken. Dit zou gericht een plaats kunnen krijgen en in (bijv. EU) projecten waar gewerkt wordt aan specifieke bionano toepassingen en/of verantwoord innoveren. Daarnaast kan worden geprobeerd het onderwerp bionanotechnologie een rol te laten spelen in nog te ontwikkelen (onderzoeks)programma's, bijv. het 9^e EU kaderprogramma.
- Naast het aspect veiligheid verdient het ook aanbeveling om aandacht te vragen voor andere aspecten die relevant zijn in het kader van verantwoord innoveren en aansluiten bij processen rond 'responsible research and innovation'. Het aspect 'veiligheidsgevoel' kan hierin ook een plek vinden.
- Het stimuleren van onderzoek naar de geschiktheid van testmethoden die worden gehanteerd in wettelijke kaders om informatie over de veiligheid van de bionano structuren te verkrijgen.

Dankwoord

De interviews met een groot aantal mensen zijn essentieel geweest bij het tot stand komen van dit rapport, waarbij wetenschappelijke expertise of kennis over wetgevende kaders is ingebracht. Onze waardering gaat daarom uit naar Prof. T. Lebean (North Carolina State University, Raleigh, NC), Prof. Dr. Ir. M. W. J. Prins (Technische Universiteit Eindhoven), Prof. A. Velders (Wageningen Universiteit), Dr. B. Albada (Wageningen Universiteit), Dr. M. Luijten, Dr. B. Glandorf, Dr. R. Geertsema, Dr. W. Brand, Dr. S.W.P. Wijnhoven, Dr. Ir. C.T.A. Moermond, Drs. J.M. Wezenbeek, Drs. D. Theodori, Dr. M. Groenewold en Dr. A.J.A.M. Sips (allen RIVM).

Daarnaast gaat onze grote dank uit naar Dr. H.S. Tak van de Rijksdienst voor Ondernemend Nederland voor het uitvoeren van een uitgebreide scan van de patentliteratuur.

Tot slot spreken onze waardering uit voor de inhoudelijke discussies met en terugkoppeling van Mevrouw E. Karhu van het Europese Chemicaliën Agentschap (ECHA) en diverse personen bij het Ministerie van IenW, en het constructieve commentaar van de interne toetsers Dr. M. Beekman, Dr. D. Horst, en Dr. M. Groenewold (allen RIVM).

Literatuur

- Agnarsson, I., M. Kuntner and T. A. Blackledge (2010). "Bioprospecting finds the toughest biological material: extraordinary silk from a giant riverine orb spider." *PLoS One* **5**(9): e11234.
- Andersen, E. S., M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf and J. Kjems (2009). "Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid." *Nature* **459**(7243): 73-76.
- Bayrak, T., S. Helmi, J. Ye, D. Kauert, J. Kelling, T. Schonherr, R. Weichelt, A. Erbe and R. Seidel (2018). "DNA-Mold Templated Assembly of Conductive Gold Nanowires." *Nano Lett* **18**(3): 2116-2123.
- Bhatia, D., S. Surana, S. Chakraborty, S. P. Koushika and Y. Krishnan (2011). "A synthetic icosahedral DNA-based host-cargo complex for functional in vivo imaging." *Nat Commun* **2**: 339.
- De Silva, P. Y. and G. U. Ganegoda (2016). "New Trends of Digital Data Storage in DNA." *Biomed Res Int* **2016**: 8072463.
- EU696 (2011). "Aanbeveling van de Commissie inzake de definitie van nanomateriaal. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=EN>".
- Gareau, D., A. Desrosiers and A. Vallee-Belisle (2016). "Programmable Quantitative DNA Nanothermometers." *Nano Lett* **16**(7): 3976-3981.
- Gu, H., J. Chao, S. J. Xiao and N. C. Seeman (2010). "A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line." *Nature* **465**(7295): 202-205.
- Halvorsen, K., M. E. Kizer, X. Wang, A. R. Chandrasekaran and M. Basanta-Sanchez (2017). "Shear Dependent LC Purification of an Engineered DNA Nanoswitch and Implications for DNA Origami." *Anal Chem* **89**(11): 5673-5677.
- Howorka, S. (2017). "Building membrane nanopores." *Nat Nanotechnol* **12**(7): 619-630.
- Kuzuya, A. and Y. Ohya (2014). "Nanomechanical molecular devices made of DNA origami." *Acc Chem Res* **47**(6): 1742-1749.
- Lee, H., A. K. Lytton-Jean, Y. Chen, K. T. Love, A. I. Park, E. D. Karagiannis, A. Sehgal, W. Querbes, C. S. Zurenko, M. Jayaraman, C. G. Peng, K. Charisse, A. Borodovsky, M. Manoharan, J. S. Donahoe, J. Truelove, M. Nahrendorf, R. Langer and D. G. Anderson (2012). "Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery." *Nat Nanotechnol* **7**(6): 389-393.
- Li, H., T. Lee, T. Dziubla, F. Pi, S. Guo, J. Xu, C. Li, F. Haque, X. J. Liang and P. Guo (2015). "RNA as a stable polymer to build controllable and defined nanostructures for material and biomedical applications." *Nano Today* **10**(5): 631-655.
- Li, S., Q. Jiang, S. Liu, Y. Zhang, Y. Tian, C. Song, J. Wang, Y. Zou, G. J. Anderson, J. Y. Han, Y. Chang, Y. Liu, C. Zhang, L. Chen, G. Zhou, G. Nie, H. Yan, B. Ding and Y. Zhao (2018). "A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo." *Nat Biotechnol* **36**(3): 258-264.
- Lim, X. (2017). "The architecture of structured DNA." *Nature* **546**(7660): 687-689.

- Ljubetic, A., F. Lapenta, H. Gradisar, I. Drobnak, J. Aupic, Z. Strmsek, D. Lainscek, I. Hafner-Bratkovic, A. Majerle, N. Krivec, M. Bencina, T. Pisanski, T. C. Velickovic, A. Round, J. M. Carazo, R. Melero and R. Jerala (2017). "Design of coiled-coil protein-origami cages that self-assemble in vitro and in vivo." *Nat Biotechnol* **35**(11): 1094-1101.
- Marcos, E., B. Basanta, T. M. Chidyausiku, Y. Tang, G. Oberdorfer, G. Liu, G. V. Swapna, R. Guan, D. A. Silva, J. Dou, J. H. Pereira, R. Xiao, B. Sankaran, P. H. Zwart, G. T. Montelione and D. Baker (2017). "Principles for designing proteins with cavities formed by curved beta sheets." *Science* **355**(6321): 201-206.
- Meurer, R. A., S. Kemper, S. Knopp, T. Eichert, F. Jakob, H. E. Goldbach, U. Schwaneberg and A. Pich (2017). "Biofunctional Microgel-Based Fertilizers for Controlled Foliar Delivery of Nutrients to Plants." *Angew Chem Int Ed Engl* **56**(26): 7380-7386.
- OECD (2018). "Friedrichs, S. Report on statistics and indicators of biotechnology and nanotechnology." *OECD Science, Technology and Industry Working Papers, 2018/06*, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/3c70afa7-en>.
- Ohmann, A., C. Y. Li, C. Maffeo, K. Al Nahas, K. N. Baumann, K. Gopfrich, J. Yoo, U. F. Keyser and A. Aksimentiev (2018). "A synthetic enzyme built from DNA flips 10(7) lipids per second in biological membranes." *Nat Commun* **9**(1): 2426.
- Okholm, A. H. and J. Kjems (2016). "DNA nanovehicles and the biological barriers." *Adv Drug Deliv Rev* **106**(Pt A): 183-191.
- Parlea, L., E. Bindewald, R. Sharan, N. Bartlett, D. Moriarty, J. Oliver, K. A. Afonin and B. A. Shapiro (2016). "Ring Catalog: A resource for designing self-assembling RNA nanostructures." *Methods* **103**: 128-137.
- Parlea, L., A. Puri, W. Kasprzak, E. Bindewald, P. Zakrevsky, E. Satterwhite, K. Joseph, K. A. Afonin and B. A. Shapiro (2016). "Cellular Delivery of RNA Nanoparticles." *ACS Comb Sci* **18**(9): 527-547.
- Pinheiro, A. V., D. Han, W. M. Shih and H. Yan (2011). "Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology." *Nat Nanotechnol* **6**(12): 763-772.
- Pinheiro, V. B. and P. Holliger (2014). "Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers." *Trends Biotechnol* **32**(6): 321-328.
- Praetorius, F., B. Kick, K. L. Behler, M. N. Honemann, D. Weuster-Botz and H. Dietz (2017). "Biotechnological mass production of DNA origami." *Nature* **552**(7683): 84-87.
- Ross, J. F., A. Bridges, J. M. Fletcher, D. Shoemark, D. Alibhai, H. E. V. Bray, J. L. Beesley, W. M. Dawson, L. R. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade, C. M. Edge, R. B. Sessions, D. Tew and D. N. Woolfson (2017). "Decorating Self-Assembled Peptide Cages with Proteins." *ACS Nano* **11**(8): 7901-7914.
- Saaem, I. and T. H. LaBean (2013). "Overview of DNA origami for molecular self-assembly." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **5**(2): 150-162.
- Sandhya, S., R. Mudgal, G. Kumar, R. Sowdhamini and N. Srinivasan (2016). "Protein sequence design and its applications." *Curr Opin Struct Biol* **37**: 71-80.

- Schuller, V. J., S. Heidegger, N. Sandholzer, P. C. Nickels, N. A. Suhartha, S. Endres, C. Bourquin and T. Liedl (2011). "Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures." *ACS Nano* **5**(12): 9696-9702.
- Shen, X., Q. Jiang, J. Wang, L. Dai, G. Zou, Z. G. Wang, W. Q. Chen, W. Jiang and B. Ding (2012). "Visualization of the intracellular location and stability of DNA origami with a label-free fluorescent probe." *Chem Commun (Camb)* **48**(92): 11301-11303.
- Surana, S., A. R. Shenoy and Y. Krishnan (2015). "Designing DNA nanodevices for compatibility with the immune system of higher organisms." *Nat Nanotechnol* **10**(9): 741-747.
- Thubagere, A. J., W. Li, R. F. Johnson, Z. Chen, S. Doroudi, Y. L. Lee, G. Izatt, S. Wittman, N. Srinivas, D. Woods, E. Winfree and L. Qian (2017). "A cargo-sorting DNA robot." *Science* **357**(6356).
- Tintore, M., R. Eritja and C. Fabrega (2014). "DNA nanoarchitectures: steps towards biological applications." *Chembiochem* **15**(10): 1374-1390.
- Wang, H., T. A. Meyer, V. Pan, P. K. Dutta and Y. Ke (2017). "The beauty and utility of DNA origami." *Chem* **2**: 359-382.
- Yang, Y., J. Wang, H. Shigematsu, W. Xu, W. M. Shih, J. E. Rothman and C. Lin (2016). "Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates." *Nat Chem* **8**(5): 476-483.
- Yu, Z., Q. Xu, C. Dong, S. S. Lee, L. Gao, Y. Li, M. D'Ortenzio and J. Wu (2015). "Self-Assembling Peptide Nanofibrous Hydrogel as a Versatile Drug Delivery Platform." *Curr Pharm Des* **21**(29): 4342-4354.
- Zhang, Q., Q. Jiang, N. Li, L. Dai, Q. Liu, L. Song, J. Wang, Y. Li, J. Tian, B. Ding and Y. Du (2014). "DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy." *ACS Nano* **8**(7): 6633-6643.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag