

Aan de staatssecretaris  
van Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 29 maart 2013  
**KENMERK** CGM/130329-01  
**ONDERWERP** Advies: Inschaling werkzaamheden gg-*Sendai virus*


Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging van de vergunning IG 07-157 met de titel "Regulatie en functie van de TGF super family en hun receptoren tijdens embryogenese" van het LUMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Sendai virus* (gg-SeV). De aanvrager wil het gg-SeV gebruiken voor zijn onderzoek naar de ontwikkeling van pluripotente stamcellen. Deze werkzaamheden zijn vergund op ML-II inperkingsniveau. Enkele dagen na toevoeging van het gg-SeV aan de cellen gebruikt de aanvrager zogenaamd siRNA om het gg-SeV actief uit de celkweek te verwijderen. Hij verzoekt de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau uit te mogen voeren als uit de analyse van de celkweek blijkt dat er geen gg-SeV meer aanwezig is. Om hiervoor voldoende bewijs te kunnen verzamelen wil de aanvrager vier testen uit voeren.

Het *Sendai virus* is een diervirus dat ernstige luchtweginfecties veroorzaakt in muizen ratten en hamsters. Het *Sendai virus* wordt voor mensen als apathogeen beschouwd. Op basis van deze eigenschappen is de COGEM van mening dat het *Sendai virus* in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld zou moeten worden. In lijn met deze classificatie adviseert zij de infectie van animale cellen met betreffende gg-SeV vectoren en de daaropvolgende laboratorium werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Alleen als op overtuigende wijze aangetoond wordt dat het gg-SeV uit de celkweek is verwijderd, is de COGEM van mening dat de laboratoriumwerkzaamheden omlaag geschaald kunnen worden. Voor betreffend onderzoek met gg-SeV acht de COGEM een routinematige microscopiecontrole van de celkweek, immunofluorescentie assay en kwantitatieve real time PCR voldoende om te kunnen concluderen of er nog gg-SeV in de celkweek aanwezig is. Als geen van deze assays wijst op de aanwezigheid van gg-SeV, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de omlaagschaling van beschreven werkzaamheden met getransduceerde animale cellen verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,



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

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
               Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

*Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.J. Hoeben niet betrokken geweest bij de totstandkoming van dit advies*

# Inschaling van werkzaamheden met gg-*Sendai virus*

## COGEM advies CGM/130329-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een aanvraag tot wijziging van de vergunning IG 07-157 van het LUMC. De aanvrager doet onderzoek naar het vervaardigen van pluripotente stamcellen uit somatische cellen van muis en mens. Voor dit onderzoek maakt de aanvrager gebruik van genetisch gemodificeerde *Sendai virus* (gg-SeV). Het onderzoek is momenteel vergund op inperkingsniveau ML-II. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden met animale cellen die getransduceerd zijn met het gg-SeV over te mogen brengen naar ML-I inperkingsniveau en proefdierexperimenten met deze cellen op D-I niveau uit te mogen voeren. Het moment van omlaagschaling is hierbij afhankelijk van het niet meer aantoonbaar zijn van gg-SeV. Pas als er geen mRNA of eiwit van het gg-SeV meer gedetecteerd kan worden, wil de aanvrager de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau gaan uitvoeren.

De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de beoogde omlaagschaling als wordt aangetoond dat gg-SeV afwezig is en te beoordelen of met de door de aanvrager voorgestelde methoden hiervoor afdoende bewijs wordt verkregen.

### Het *Sendai virus*

Het *Sendai virus* (SeV), ook wel bekend onder de naam ‘Murine parainfluenza virus type 1’ of ‘Hemagglutinating virus of Japan’ is ingedeeld in het genus *Respirovirus* behorend tot de familie van de *Paramyxoviridae*.<sup>1</sup> Ratten, muizen en hamsters vormen de natuurlijke gastheer van het SeV. Het virus veroorzaakt een ernstige luchtweginfectie of longontsteking in deze dieren en treft met name zeer jonge, oudere en immuungecompromiteerde muizen en ratten.<sup>2</sup> Het SeV kan echter ook in cavia's en incidenteel in varkens een luchtweginfectie veroorzaken. In muizen leidt een infectie met SeV in vele gevallen tot sterfte, vooral als de infectie gepaard gaat met een bacteriële infectie van de longen. Het SeV wordt wereldwijd aangetroffen. Het SeV vertoont grote mate van sequentieovereenkomst met het *Human parainfluenza virus 1* en resulteert in antigene kruisreactiviteit. Tot op heden is SeV niet in verband gebracht met ziekte in de mens.<sup>2,3,4</sup>

### Genomische organisatie en replicatie van *Sendaivirussen*

Het SeV bestaat uit een niet-gesegmenteerd, negatief-strengig RNA genoom dat zich bevindt in een eiwitmantel. Dit wordt samen de nucleocapside genoemd en wordt omgeven door een lipide membraan (envelop). Het SeV genoom bevat 6 cistronen (NP, P/C/V, M, F, HN en L) die coderen voor 8 verschillende eiwitten.<sup>1,5</sup>

Het membraan van SeV bevat zowel het hemagglutinine-neuraminidase (HN) eiwit als het fusie (F) eiwit. Het SeV bindt aan de gastheercel via het HN eiwit, waarna het virale membraan fuseert met het celmembraan door het F eiwit. In het cytoplasma van de gastheercel aangekomen, vindt expressie van de virale eiwitten en replicatie van het virale genoom plaats. Het nucleoproteïne (NP), fosfoproteïne (P) en large RNA-dependent RNA-polymerase proteïne (L) vormen samen met het SeV genoom het nucleocapside van het virus. De assemblage en budding van het uiteindelijke virusdeeltje wordt gefaciliteerd door het matrix proteïne (M). Het M eiwit bindt daartoe aan het nucleocapside en aan de HN en F eiwitten die na synthese in het celmembraan van de gastheercel aanwezig zijn. Naast de functie van het F-eiwit in virus-cel fusie, zorgt het F-eiwit ook voor fusie van de gastheercel met

naburige cellen. Dit leidt tot zogenaamde syncytia, een grote cel met meerdere kernen. Afgezien van bovengenoemde eiwitten codeert het genoom ook voor C en V eiwitten. Het C eiwit gaat het effect van interferon tegen, speelt een rol bij de virale transcriptie en is van belang bij de assemblage van virusdeeltjes.<sup>3</sup> De functie van het V eiwit is nog niet precies bekend, maar lijkt betrokken bij de aspecifieke afweerreactie tegen het virus.

### ***Sendavirusvector***

Het gg-SeV, SeVdp(KOSM), dat de aanvrager wil gebruiken voor zijn onderzoek is gebaseerd op de Cl.151 stam.<sup>6</sup> Deze stam geeft een persistente infectie. Voor constructie van de vector zijn de structurele genen *M*, *F* en *HN* vervangen door de coderende sequentie van de transcriptie factoren: Klf4, Oct4, Sox2 en c-Myc. Deze vier transcriptie factoren zijn nodig om de animale cellen tot pluripotente stammen cellen te her-programmeren. Door verwijdering van de structurele genen is de vector na infectie van een gastheercel niet meer in staat nieuwe virusdeeltjes te produceren.

Naast deze vector wil de aanvrager ook gebruik maken van een tweede SeV vector, SeVdp(KOSM)302L. Afgezien van bovengenoemde aanpassingen bevat deze vector een targetsequentie voor een zogenaamd microRNA 302. Dit microRNA wordt specifiek tot expressie gebracht in pluripotente stamcellen en grijpt aan op het RNA van het L gen. Hierdoor verdwijnt het virus uit de her-geprogrammeerde cellen.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft nooit eerder geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met het *Sendai virus*. In 2006 heeft de COGEM advies uitgebracht over de classificatie van dierpathogene virussen.<sup>7</sup> Hierin heeft zij ook twee vertegenwoordigers van de familie van de *Paramyxoviridae* geïdentificeerd. Het *Newcastle disease virus*, dat grote sterfte kan veroorzaken onder kippen heeft zij geadviseerd om als dierpathogeen virus van klasse 3 te beschouwen. Ook het *Peste-des-petits-ruminants virus*, dat met name ziekte en sterfte veroorzaakt bij schapen en geiten heeft de COGEM in deze pathogeniteitsklasse ingedeeld.

De COGEM heeft vaker geadviseerd over de omlaagschaling van werkzaamheden met gg-virussen en de voorwaarden waaraan voldaan moet worden. Het advies over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lenitivirale vectoren gaat hier uitvoerig op in.<sup>8</sup>

### **Overweging**

#### *Classificatie Sendai virus*

Het *Sendai virus* is een virus dat hoofdzakelijk ziekte veroorzaakt bij muizen, ratten en hamsters. In deze dieren leidt het SeV tot ernstige luchtweginfecties, waaronder longontsteking. Het SeV wordt ook aangetroffen in cavia's en varkens. Het SeV wordt gemakkelijk overgedragen van dier op dier via aërosolen of contact met besmette dieren. Onlangs is experimenteel aangetoond dat SeV ook in de luchtwegen van primaten zoals 'African green monkeys' en chimpansees kan repliceren.<sup>9</sup> Een dergelijke infectie verloopt asymptomatisch. Tot op heden is SeV nooit geassocieerd met ziekte in de mens en wordt daarom voor de mens als apathogeen aangemerkt. Het SeV komt wereldwijd voor en kan ook in Nederland als een endemisch virus worden beschouwd. Er is geen effectieve profylaxe of behandeling tegen een infectie met het SeV voor handen.

Op basis van het feit dat het SeV als diervirus aangemerkt wordt, er geen aanwijzingen zijn dat het ziekte veroorzaakt in de mens, en het virus endemisch in Nederland aanwezig is, adviseert de COGEM het Sendavirus in pathogeniteitsklasse 2 in te delen.

### *Inschaling van werkzaamheden met gg-SeV*

Conform de indeling van het Sendaivirus in pathogeniteitsklasse 2 is de COGEM van mening dat laboratoriumwerkzaamheden met gg-SeV op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd zouden moeten worden. De aanvrager heeft aangegeven de transductie van animale cellen met beschreven gg-SeV vectoren en daaropvolgende werkzaamheden op dit inperkingsniveau uit te voeren. Echter, zodra het gg-SeV uit de betreffende celculturen is verwijderd, verzoekt de aanvrager de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau uit te mogen voeren.

Om het gg-SeV actief uit de celcultuur te verwijderen, zal de aanvrager tien dagen na transductie de cellen met 'small interfering RNA' (siRNA) behandelen. Het siRNA is gericht tegen de coderende sequentie voor het RNA-polymerase L. Uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat dit type siRNA, van de geteste siRNA's, het aanwezige gg-SeV het meest effectief verwijderd.<sup>4</sup> Daarnaast draagt in het geval van de vector SeVdp(KOSM)302L ook de in het vectorgenoom aanwezige sequentie voor het microRNA 302L bij aan de eliminatie van de vector. Vanaf het moment dat de kolonies van pluripotente stamcellen verschijnen, worden de cellen bovendien wekelijks geogst en in vers kweekmedium uitgezaaid.

Voordat de cellen overgebracht worden naar een lager inperkingsniveau zal de aanvrager de kweek controleren op aanwezigheid van SeV mRNA en eiwit expressie. Daartoe zal de aanvrager gebruik maken van een immunofluorescentie assay gericht tegen het SeV NP eiwit, een semi-kwantitatieve PCR en een kwantitatieve PCR specifiek voor het SeV NP mRNA. Tevens wordt de celkweek gecontroleerd op de aanwezigheid van syncytia met behulp van microscopie. Pas als alle controles wijzen op afwezigheid van SeV, wil de aanvrager de werkzaamheden op een lager inperkingsniveau uit voeren.

De COGEM merkt op dat de gg-SeV vectoren die de aanvrager wil gebruiken drie structurele genen missen. Zonder complementatie van deze genen zijn betreffende vectoren niet in staat om in animale cellen nieuwe infectieuze virusdeeltjes te produceren.<sup>4</sup> Voor de productie van het gg-SeV is complementatie van de structurele genen nodig, waardoor tijdens de productie in theorie replicatiecompetent gg-SeV kan ontstaan. Gezien de wijze waarop de structurele genen F, NH en M worden gecomplementeerd in het productiesysteem, is de COGEM van mening dat verschillende niet-homologe recombinatie events nodig zijn voordat replicatiecompetent gg-SeV kan ontstaan. De COGEM acht de kans zeer klein dat dit zal optreden. Hierbij wijst zij erop dat de aanwezigheid van replicatiecompetent gg-SeV zich direct zal openbaren door het ontstaan van syncytia in de celkweek. De aanvrager voert routinematige visuele inspecties uit van de celpopulatie waardoor de kans op aanwezigheid van replicatie-competent gg-SeV wordt geminimaliseerd. Dit geldt ook voor de aanwezigheid van *wild-type Sendai virus* dat de ontbrekende structurele genen *in trans* zou kunnen completeren.

Om een omlaagschaling van de werkzaamheden te kunnen rechtvaardigen is de COGEM van mening dat afdoende aangetoond moet worden dat er geen gg-SeV meer in de celkweek aanwezig is. De aanvrager baseert zich hiervoor op de uitkomsten van drie assays. Met de eerste wordt de aanwezigheid van SeV NP eiwit in de celkweek gemeten. Met de andere twee wordt de aanwezigheid van mRNA van het SeV NP gedetecteerd. Als de uitkomsten van deze assays inclusief de eerder genoemde microscopische analyse op syncytia negatief zijn, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er nog gg-SeV in de celkweek aanwezig is.

De COGEM merkt hierbij echter op dat de aanvrager voor de controle op mRNA van het SeV NP twee vergelijkbare assays gebruikt. Het betreft een zogenaamde semi-kwantitatieve RT-PCR en een kwantitatieve realtime PCR. Van deze twee assays biedt de kwantitatieve realtime PCR inzicht in de relatieve hoeveelheid aanwezig mRNA en blijkt uit de aangeleverde informatie dat met deze assay in ieder geval 2 tot 3 SeV NP positieve cellen kunnen worden gedetecteerd. De door de aanvrager als semi-kwantitatieve RT-PCR aangemerkte assay biedt feitelijk geen (semi)kwantitatieve informatie over de hoeveelheid mRNA. Bovendien is er geen informatie aangeleverd over de detectielimiet van deze assay. Gezien deze verschillen is de COGEM van mening dat de zogenaamde semi-kwantitatieve RT-PCR ten opzichte van de kwantitatieve realtime PCR geen toegevoegde waarde heeft voor de onderbouwing van de afwezigheid van SeV in betreffende celweek.

### Advies

In lijn met de classificatie van het SeV in pathogeniteitsklasse 2 adviseert de COGEM de infectie van animale cellen met betreffende gg-SeV vectoren en daaropvolgende laboratorium werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen. Om deze laboratorium werkzaamheden omlaag te kunnen schalen naar ML-I of D-I moet op overtuigende wijze aangetoond zijn dat het gg-SeV uit de celweek is verwijderd. Gebaseerd op bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat een routinematige microscopiecontrole van de celweek op syncytia, de beschreven immunofluorescentie assay en kwantitatieve realtime PCR samen voldoende bewijs leveren om te kunnen concluderen of er nog gg-SeV in de celweek aanwezig is. Als geen van de assays wijst op de aanwezigheid van gg-SeV, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de omlaagschaling van beschreven werkzaamheden met getransduceerde animale cellen verwaarloosbaar klein.

### Referenties

---

- 1 Wang L-F *et al.* (2012). Family *Paramyxoviridae*. In: Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Edited by: King AMQ *et al.* San Diego, Elsevier Academic Press: 672-685
- 2 Koppers-Lalic D and Hoeben RC (2010). Replication-competent non-human viruses for use in clinical gene therapy: an inventory study. COGEM onderzoeksrapport: CGM 2010-10
- 3 Bitzer M *et al.* (2003). Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* 5: 543-553
- 4 Nishimura K *et al.* (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector. *J. Biol. Chem.* 286: 4760-4771.
- 5 Lamb RA and Kolakofsky D (2001). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields virology, volume one, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1305-1340
- 6 Nishimura K (2007). Persistent and stable gene expression by a cytoplasmic RNA replicon based on a noncytopathic variant Sendai virus. *J Biol. Chem.* 282: 27383-27391
- 7 COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen: Criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. Advies: CGM/060420-04
- 8 COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. Advies CGM/090331-03
- 9 Skiadopoulos MH *et al.* (2002). Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African Green Monkeys and Chimpanzees. *Virology* 297:153-160