

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 15 juli 2021  
**KENMERK** CGM/210715-01  
**ONDERWERP** Advies omlaagschaling werkzaamheden gg-Sendai virus getransduceerde cellen


Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 19-329\_2.8-001 getiteld 'Omlaagschaling van Sendai-virus getransduceerde humane cellen van ML-II naar ML-I' van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met menselijke stamcellen die verkregen zijn door lichaamscellen te behandelen met biologisch ingeperkte genetisch gemodificeerde Sendai virus (gg-SeV) vectoren. Deze vectoren dragen specifieke genen met zich mee, die ervoor zorgen dat de lichaamscellen zich als stamcellen gaan ontwikkelen. Werkzaamheden met deze cellen zijn eerder vergund op ML-I inperkingsniveau, mits uit een drietal testen blijkt dat er geen gg-SeV meer aanwezig is in de stamcellen. In de onderhavige adviesvraag verzoekt de aanvrager één van de drie testen te laten vervallen.

De drie testen betreffen een kleuring met behulp van antilichamen (immunocytochemische kleuring), microscopische analyse van de celkweek op afwijkende cellen (zogenaamde syncytia), en RT-qPCR om de aanwezigheid van het SeV genoom (RNA) te detecteren in de stamcellen. De aanvrager verzoekt de immunocytochemische kleuring te laten vervallen, omdat deze geen meerwaarde zou hebben wanneer de uitslagen van de microscopische analyse en RT-qPCR negatief zijn. De COGEM merkt op dat de microscopische analyse name geschikt is om aanwezigheid van wildtype Sendai virus of eventueel aanwezig replicatie-competent gg-SeV te detecteren, maar niet voor het aantonen van gg-SeV, omdat niet duidelijk is of de gebruikte vectoren werkelijk syncytia kunnen vormen. De COGEM is van oordeel dat met behulp van een RT-qPCR de aanwezigheid van (gg-)SeV uitgesloten kan worden en dat de immunocytochemische kleuring geen toegevoegde waarde heeft. Bij omlaagschaling van de werkzaamheden met iPSCs op basis van een negatieve RT-qPCR zijn derhalve de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Hierbij merkt de COGEM op dat de door de aanvrager voorgesteld RT-qPCR test geen correcte positieve controle bevat en dat deze aangepast moet worden.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

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

# Omlaagschaling van werkzaamheden met gg-Sendai virus getransduceerde humane cellen

## COGEM advies CGM/210715-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd Sendai virus (gg-SeV) getransduceerde humane cellen (IG 19-329). De aanvrager is voornemens humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs) te verkrijgen door middel van transductie van humane cellen met Sendai virus vectoren die humane transcriptiefactoren tot expressie brengen. Deze vectoren zijn biologisch ingeperkt, en kunnen zich na één infectieronde niet verder verspreiden. Transductie met de SeV-vectoren zal plaatsvinden op ML-II niveau. Vervolgens zullen de getransduceerde cellen die als gevolg van de expressie van de transcriptiefactoren ontwikkelen als iPSCs, overgebracht worden naar inperkingsniveau ML-I, nadat is aangetoond dat er geen gg-SeV meer aanwezig is in deze cellen. De aanvrager beschikt reeds over een vergunning voor omlaagschaling van werkzaamheden met de iPSCs van ML-II naar ML-I, onder de voorwaarde dat met drie verschillende assays wordt aangetoond dat de iPSCs vrij zijn van gg-SeV. Dit is gebaseerd op een eerder COGEM advies uit 2013, waarin ingestemd is met de uitvoering van 3 verschillende assays om aanwezigheid van gg-SeV uit te sluiten en omlaagschaling te rechtvaardigen: een routinematige microscopie-controle van de celkweek op syncytia, een immunofluorescentie assay, en een kwantitatieve PCR. In onderhavige aanvulling op de eerdere vergunning, verzoekt de aanvrager om één van de drie assays, de immunofluorescentie assay, te laten vervallen wanneer de andere twee assays negatief blijken.

### 2. Sendai virus

Het Sendai virus (SeV), tegenwoordig *Murine respirovirus* genoemd, behoort tot het genus *Respirovirus*, subfamilie *Orthoparamyxovirinae*, en de familie van de *Paramyxoviridae*.<sup>1</sup> SeV is een negatief enkelstrengs RNA virus, dat hoofdzakelijk ziekte veroorzaakt bij muizen, ratten, cavia's en hamsters.<sup>2</sup> Het RNA genoom bevindt zich in een nucleocapside, dat verder is opgebouwd uit nucleoproteïnen (NP), fosfoproteïnen (P) en 'large' proteïnen (L), die de replicatie van het genoom initiëren. Het virusdeeltje bevat een virale envelop, bestaand uit een lipidemembraan waarin zich het virale fusie-eiwit (F) en hemagglutinine-neuraminidase eiwit (HN) bevinden. Tussen de virale envelop en de nucleocapside bevindt zich het matrix (M) eiwit. Paramyxovirussen bevatten naast deze structurele genen ook accessoire genen, die als overlappende openleesramen in het P-gen aanwezig zijn. Het SeV P-gen kan voor tot wel zeven verschillende eiwitten coderen, P, V, W, C', C, Y1 en Y2.<sup>3</sup>

Het SeV bindt aan de sialzuurreceptor van de gastheercel via het HN-eiwit, waarna fusie van het virale membraan met het celmembraan wordt geïnduceerd door het F-eiwit. Expressie van virale eiwitten en replicatie van het virale genoom vinden plaats in het cytoplasma van de gastheercel.<sup>4</sup> De assemblage en budding van het uiteindelijke virusdeeltje wordt gefaciliteerd door het M-eiwit. 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.<sup>5</sup> Het F-eiwit kan naast fusie van de virale envelop met

het membraan van de gastheercel ook fusie van de gastheercel met naburige cellen veroorzaken. Dit leidt tot zogenaamde syncytia, een grote cel met meerdere kernen.

### **3. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft het Sendai virus als diervirus ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>6</sup> De COGEM heeft eerder geadviseerd over onderzoek naar het vervaardigen van pluripotente stamcellen uit somatische cellen van muizen en mensen met behulp van SeV-vectoren.<sup>6</sup> Hiervoor werd gebruik gemaakt van SeV-vectoren waarin de structurele genen M, F en HN vervangen zijn door de coderende sequenties van de transcriptie factoren Klf4, Oct4, Sox2 en c-Myc, waarmee de cellen geherprogrammeerd kunnen worden. Door verwijdering van de M, F en HM genen is de vector na infectie van een gastheercel niet meer in staat nieuwe virusdeeltjes te produceren. Daarnaast werd een tweede vector gebruikt waarin aanvullend een targetsequentie voor een microRNA 302 is geïnsereerd. Voor omlaagschaling van de werkzaamheden was de COGEM van oordeel dat afdoende aangetoond moet worden dat er geen gg-SeV meer in de celkweek aanwezig is. De aanvrager baseerde zich hiervoor op de uitkomsten van verschillende assays. De COGEM achtte de risico's voor mens en milieu van de omlaagschaling van beschreven werkzaamheden met getransduceerde animale cellen verwaarloosbaar klein, indien op basis van drie assays aanwezigheid van gg-SeV uitgesloten kan worden: routinematige microscopiecontrole van de celkweek op syncytia, immunofluorescentie assay, en kwantitatieve reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR) specifiek voor het SeV NP mRNA.

### **4. Voorgenomen werkzaamheden**

De werkzaamheden in de huidige aanvraag betreffen SeV-vectoren afkomstig van de commercieel verkrijgbare integratievrije CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit van ThermoFisher Scientific.<sup>7,8</sup> Deze kit bevat een drietal SeV-afgeleide vectoren die geoptimaliseerd zijn om humane somatische cellen te herprogrammeren naar iPSCs. Deze SeV-vectoren bevatten de NP, P, M, F, HN en L eiwitten, maar het gen dat codeert voor het F-eiwit is gedeleteerd (gg-SeV $\Delta$ F). Hierdoor wordt geen infectieus virus gevormd na infectie van de gastheercel. Ook zijn functionele mutaties aangebracht waardoor de vectoren onder andere een verhoogde temperatuurgevoeligheid hebben. Deze vectoren dragen de reprogrammeerfactoren Oct, Sox2, Klf4 en c-Myc bij zich, waarmee cellen geherprogrammeerd kunnen worden. Het vervaardigen van de iPSCs met gg-SeV zal op ML-II plaatsvinden, conform de pathogeniteitsklasse van het Sendai virus.

De aanvrager beschikt reeds over een vergunning om activiteiten met gg-SeV getransduceerde cellen op ML-I uit te voeren, wanneer op basis van drie assays aangetoond kan worden dat er geen gg-SeV meer aanwezig is in de gekweekte humane iPSCs, analoog aan het eerdere COGEM advies:

1. Kwantitatieve reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR) om de aanwezigheid van mRNA van SeV NP te meten in de iPSC;
2. Immunocytochemische kleuring op de iPSCs met een SeV NP antilichaam om het SeV NP eiwit te kunnen visualiseren;
3. Microscopische analyse van de celkweek op syncytia-vorming.

De aanvrager verzoekt om assay 2, de immunocytochemische kleuring, te laten vervallen. De aanvrager is van mening dat de immunocytochemische kleuring met een SeV NP antilichaam geen toegevoegde

waarde heeft wanneer zowel de RT-qPCR als de microscopische analyse op syncytia negatief zijn. In de oorspronkelijke vergunningaanvraag heeft de aanvrager de uitkomsten van de drie assays aangeleverd. Hierbij wordt aangetoond dat er 6 mRNA kopieën SeV afkomstig uit circa 500 cellen betrouwbaar gedetecteerd kunnen worden met de RT-qPCR. De immunocytochemische analyse is minder gevoelig dan een RT-qPCR en wordt volgens de aanvrager normaliter toegepast om de lokalisatie en niet hoeveelheid van een eiwit aan te tonen. Ook geeft de aanvrager aan dat het lastig is een positieve controle (SeV getransduceerde cellen) te verkrijgen, omdat deze verkregen moet worden van externe partijen en vaak langere tijd in kweek zijn geweest, waardoor deze bij aankomst al vrij kunnen zijn van SeV.

## **5. Overweging en advies**

De aanvrager is voornemens met behulp van een commercieel verkrijgbare gg-SeV Reprogramming kit, bestaande uit drie gg-SeV $\Delta$ F vectoren, humane cellen te transformeren naar pluripotente stamcellen (iPSCs). Door deletie van het F-gen zijn de vectoren biologisch ingeperkt, en kunnen slechts éénmalig cellen infecteren.<sup>5</sup> Hierdoor zal de aanwezigheid van de SeV-vectoren met de tijd afnemen. Daarnaast bevat de Reprogramming kit SeV-vectoren met een hogere temperatuurgevoeligheid, waardoor deze gemakkelijker uit de celkweek verwijderd kunnen worden. Het verzoek voor omlaagschaling van de werkzaamheden naar ML-I heeft alleen betrekking op de handelingen met de getransduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). De transductie van de cellen met de SeV-vectoren zal plaatsvinden op inperkingsniveau ML-II.

De werkzaamheden met iPSCs van de aanvrager zijn eerder vergund op ML-I, op voorwaarde dat een immunocytochemische kleuring, microscopische analyse van de celkweek op syncytia, en RT-qPCR om de aanwezigheid van SeV NP mRNA te detecteren in de iPSCs, negatief blijken. De aanvrager stelt dat de immunocytochemische kleuring op de iPSCs geen meerwaarde heeft wanneer de uitslagen van een microscopische analyse en RT-qPCR, negatief zijn. Uit eerdere analyses bij de oorspronkelijke vergunningaanvraag blijkt dat de RT-qPCR 1SeV mRNA kopie in bijna 100 cellen kan detecteren, en laten de resultaten zien dat er na 17 passages geen SeV NP RNA gedetecteerd kon worden in de cellen. De aanvrager stelt dat als positieve controle een DNA sequentie complementair aan het SeV NP is gebruikt, in verschillende verdunningen (152.000, 15.200, 1.520, 60, 6 en 0 kopieën per qPCR reactie), waarmee een calibratiecurve is opgesteld. Uit de microscopische analyse bleken geen syncytia waarneembaar.

De COGEM is het eens met de aanvrager dat de immunocytochemische kleuring minder gevoelig is dan een RT-qPCR. Met betrekking tot de microscopische analyse op syncytia is de COGEM van oordeel dat deze test met name geschikt is om aanwezigheid van wildtype Sendai virus of eventueel aanwezig replicatie-competent gg-SeV (die door recombinatie het F-gen weer verkregen heeft), uit te sluiten. Deze zullen echter ook met de RT-qPCR gedetecteerd worden. De COGEM acht het echter onwaarschijnlijk dat de SeV-vectoren syncytia vormen, vanwege de deletie van het F-gen. Daarnaast zou eventuele syncytia-vorming een ongunstig uitwerking hebben op de productie van iPSCs. De COGEM acht deze test derhalve niet geschikt voor het detecteren van F-gedeleteerde SeV-vectoren.

Aangaande de RT-qPCR is de COGEM van oordeel dat de door de aanvrager gehanteerde positieve controle (op basis van de gesynthetiseerde oligonucleotide sequenties complementair aan SeV NP) niet geschikt is, aangezien hiervoor geen reverse transcriptie plaats hoeft te vinden. Hiermee kan wel de specificiteit aangetoond worden, maar niet de gevoeligheid van de test. Wanneer als positieve controle bijvoorbeeld een reeks verdunningen van RNA van gg-SeV getransduceerde cellen gebruikt wordt, of door cellulair RNA te 'spiken' met verschillende hoeveelheden Sendai vector RNA template, zal snel duidelijk worden wanneer de RT reactie minder effectief is.

De COGEM is van oordeel dat een RT-qPCR test voldoende gevoelig is om uit te sluiten dat er nog (gg-)SeV in de celkweek aanwezig is. Zij merkt daarbij op dat de RT-qPCR test gevalideerd moet zijn en de positieve controle uit SeV RNA sequenties moet bestaan. De immunocytochemische kleuring heeft daarbij geen toegevoegde waarde.

Op basis van een negatieve uitslag van de RT-qPCR met aangepaste positieve controle, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van omlaagschaling van de werkzaamheden met iPSCs op ML-I, verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy browser. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 5 juli 2021)
2. Koppers-Lalic D & Hoeben RC (2010). Replication-competent non-human viruses for use in clinical gene therapy: an inventory study. COGEM onderzoeksrapport: CGM 2010-10
3. Lamb RA & Parks GD (2013). Chapter 33: Paramyxoviridae. In: Fields virology, volume one, 6<sup>th</sup> edition. Ed. Knipe DM & Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
4. Rima B *et al.* (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* 100: 1593–1594
5. Bitzer M *et al.* (2003). Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* 5: 543-553
6. COGEM (2013). Inschaling van werkzaamheden met gg-Sendai virus. COGEM advies CGM/130329-01
7. ThermoFisher Scientific. CytoTune-iPS Sendai Reprogramming. <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/stem-cell-research/induced-pluripotent-stem-cells/sendai-virus-reprogramming.html>
8. CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit User Guide (2016). [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cytotune\\_ips\\_2\\_0\\_sendai\\_reprog\\_kit\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cytotune_ips_2_0_sendai_reprog_kit_man.pdf)