

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu  
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat  
Ch.A. Jansen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 21 oktober 2024  
**KENMERK** CGM/241021-02  
**ONDERWERP** Advies generieke MRB voor gebruik iPSC's voor lenti- of retrovirale transductie

Geachte heer Jansen,

Teneinde de vergunningverlening rond klinische studies met ggo's verder te stroomlijnen, heeft de COGEM de risico's voor mens en milieu van het gebruik van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's) in klinische studies met lenti- en retrovirale vectoren, in kaart gebracht.

**Samenvatting:**

Voor klinische studies waarbij lichaamscellen genetisch gemodificeerd worden met behulp van zogenaamde retro- of lentivirale vectoren, bestaat een vereenvoudigde vergunning-procedure (VoV). Deze VoV geldt thans niet voor zogenaamde geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's). Van gewone lichaamscellen kunnen iPSC's worden gemaakt, die zich tot bijna ieder gewenst celtype kunnen ontwikkelen. Als iPSC's met behulp van genetische modificatie vervaardigd worden, worden zij als genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) beschouwd. Zij vallen daarmee buiten de reikwijdte van de VoV. Vanwege het toenemende gebruik van iPSC's in klinisch onderzoek heeft de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling uitgevoerd teneinde te onderzoeken of ze onder de VoV gebracht kunnen worden. De risico's voor mens en milieu van lenti- of retrovirale transductie van iPSC's blijken verwaarloosbaar klein te zijn als de vectoren die gebruikt zijn om de iPSC's te produceren en de vectoren die gebruikt zijn om de iPSC's te modificeren, geen sequenties bevatten die tot complementatie of recombinatie tussen de gebruikte vectoren kunnen leiden. De COGEM signaleert dat klinische studies met iPSC's die met behulp van lenti- en retrovirale vectoren worden gemodificeerd, onder de VoV kunnen vallen, mits aan de in dit advies gestelde randvoorwaarden wordt voldaan.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

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

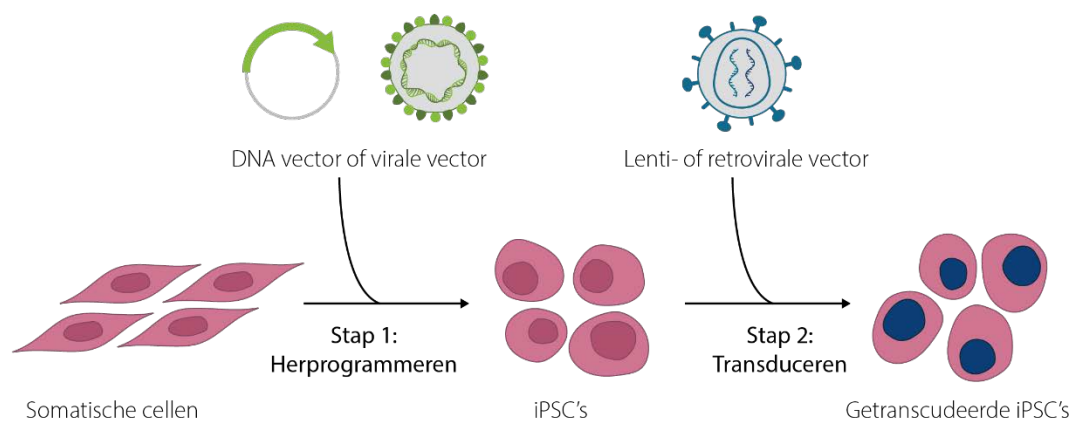
# Generiek advies over het gebruik van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's) voor ex vivo transductie met retro- of lentivirale vectoren in klinische studies

## COGEM advies CGM/241021-02

### 1. Inleiding

De COGEM heeft in 2019 een generieke milieurisicobeoordeling gepubliceerd voor klinische studies die gebruik maken van *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen.<sup>1</sup> Dit advies heeft de basis gevormd voor een vereenvoudigde vergunningprocedure (vergunning onder vaste voorwaarden, VoV) voor klinische studies die gebruik maken van dergelijke genetisch gemodificeerde (gg-)cellen.<sup>2</sup> Eén van de uitgangspunten voor deze VoV is dat de te modificeren (i.e. te transduceren) lichaamscellen humaan en niet-genetisch gemodificeerd zijn. Er wordt de laatste jaren echter in toenemende mate gebruik gemaakt van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's).<sup>3</sup> Omdat iPSC's vaak met recombinant DNA-technieken vervaardigd worden, dienen deze volgens het 'Besluit genetisch gemodificeerde organismen' (Besluit ggo) beschouwd te worden als ggo's<sup>4</sup> en vallen daarmee buiten de reikwijdte van de VoV. Om in te spelen op het toenemende gebruik van iPSC's in klinische studies wordt in dit advies de *ex vivo* transductie van iPSC's met retro- en lentivirale vectoren voor toepassing in klinische studies aan een generieke milieurisicobeoordeling onderworpen.

In het advies wordt ingegaan op verschillende technieken om iPSC's te genereren en de mogelijke milieurisico's die bij opvolgende transductie van iPSC's met retro- en lentivirale vectoren kunnen spelen. In deze generieke milieurisicobeoordeling worden niet de milieurisico's van (het reprogrammeren van) de iPSC's beoordeeld (stap 1 in Figuur 1), maar wordt enkel gekeken naar de potentiële milieurisico's bij opvolgende transductie van de iPSC's met lenti- en retrovirale vectoren (stap 2 in Figuur 1).



**Figuur 1.** Illustratie van het proces om iPSC's te genereren en transduceren. Om een somatische cel te herprogrammeren (stap 1) kunnen verschillende technieken gebruikt worden, waaronder virale vectoren en DNA-vectoren (zie appendix 1). Technieken die niet onder de ggo-regelgeving vallen zijn hier buiten beschouwing gelaten. Voor transductie van de iPSC's wordt gebruik gemaakt van lenti- of retrovirale vectoren (stap 2). Deze worden in paragraaf 3 verder toegelicht.

## 2. Geïnduceerde pluripotente stamcellen

Geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's) worden verkregen door lichaamscellen (i.e., somatische cellen) te herprogrammeren. Dit wordt gedaan door bepaalde transcriptiefactoren (zogenaamde herprogrammeerfactoren) die in embryonale stamcellen betrokken zijn bij het behoud van pluripotentie, in de cellen tot expressie te brengen.<sup>5</sup> Door transcriptie expressie van de herprogrammeerfactoren wordt het genexpressieprofiel in de somatische cellen aangepast en veranderen de cellen van een gedifferentieerde naar een pluripotente staat.<sup>6,7</sup> Deze geïnduceerde pluripotente cellen gedragen zich als stamcellen en kunnen differentiëren in verschillende weefseltypen.

In de experimenten waarin voor het eerst humane iPSC's werden gegenereerd, zijn de herprogrammeerfactoren Oct3/4, Sox2, Klf4, en Myc (ook wel Yamanaka-factoren genoemd, of afgekort tot OSKM)<sup>6</sup>, of Oct4, Sox2, Nanog, en Lin28<sup>8</sup> gebruikt. Deze combinaties van herprogrammeerfactoren worden nog steeds veel gebruikt, maar er worden ook variaties hierop toegepast.

iPSC's kunnen voor onderzoeksdoeleinden ontwikkeld worden. Ook kunnen in iPSC's aanvullende genetische modificaties aangebracht worden, bijvoorbeeld voor toepassing als celtherapie voor de behandeling van complexe ziekten. Om iPSC's te verkrijgen moet tijdelijk een consistente hoge expressie van de herprogrammeerfactoren plaatsvinden. Vanwege de oncogene eigenschappen van bepaalde herprogrammeerfactoren is het (met name voor klinische toepassingen van iPSC's) onwenselijk om na het genereren van iPSC's residuele expressie van de herprogrammeerfactoren te hebben, die tot tumorvorming in de gegenereerde iPSC's kan leiden.<sup>9</sup>

Er worden in het biomedische onderzoek verschillende methoden toegepast om de herprogrammeerfactoren tot expressie te brengen en iPSC's te genereren.<sup>10,11,12,13,14,15,16,17</sup> De verschillende technieken om iPSC's te genereren worden in Appendix I verder toelicht. Hierbij kan onderscheid worden gemaakt tussen technieken waarbij recombinant DNA, RNA of eiwitten worden gebruikt om herprogrammeerfactoren in de cel te brengen, en technieken waarbij vectoren worden gebruikt die afgeleid zijn van virussen. Ook transfectie van somatische cellen met mRNA coderend voor herprogrammeerfactoren, of met de eiwitten zelf, wordt in het onderhavige advies buiten beschouwing gelaten. iPSC's die op deze wijze zijn gegenereerd, worden volgens de Regeling ggo namelijk niet als ggo beschouwd. iPSC's kunnen ook chemisch geïnduceerd worden door gebruik te maken van 'small molecules', maar ook deze techniek wordt om dezelfde reden in dit advies buiten beschouwing gelaten.<sup>17</sup>

DNA-vectoren die veel toegepast worden voor het ontwikkelen van iPSC's zijn zogenaamde episomale EBNA/oriP-plasmiden, minicircles en transposons. Het gebruik van episomale plasmiden en minicircles wordt gecategoriseerd als niet-integratieve methode, terwijl bij het gebruik van transposons integratie in het genoom van de cellen onderdeel uitmaakt van de techniek.

Met betrekking tot de virale vectoren wordt onderscheid gemaakt tussen vectoren die actief integreren in het DNA van de gastheer, en vectoren die niet actief integreren in het gastheergenoom. Bij de eerste

experimenten waarbij humane iPSC's zijn gegenereerd, is gebruik gemaakt van replicatiedeficiënte lenti- en retrovirale vectoren (meer informatie over dergelijke vectoren in paragraaf 3.1). Deze vectoren integreren in het genoom van de gastheercel, waardoor herprogrammeerfactoren stabiel tot expressie kunnen komen. Omdat integratie in het gastheergenoom en voortdurende expressie van de herprogrammeerfactoren onwenselijk is voor klinische toepassingen, is later gebruik gemaakt van verschillende virale vectoren waarbij integratie in het gastheergenoom geen onderdeel uitmaakt van de levenscyclus. Dergelijke vectoren betreffen adenovirale vectoren, Sendai virus (SeV)-vectoren en virale replicons afgeleid van alfavirussen (met name Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV). Een kenmerk van deze vectoren is dat er verdunning optreedt door celdeling van de iPSC's, waardoor deze vectoren gradueel uit de celpopulatie verdwijnen.

Van een aantal beschreven niet-integratieve methoden om iPSC's te genereren, namelijk de episomale EBNA/oriP-plasmiden, SeV-vectoren en VEEV-replicons, zijn commerciële herprogrammeerkits beschikbaar.<sup>18,19,20,21</sup>

### **3. Klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen**

Voor genterapiestudies waarbij cellen *ex vivo* genetisch gemodificeerd worden, wordt veelal gebruik gemaakt van lenti- en retrovirale vectoren, omdat het genetische materiaal van deze vectoren in het DNA van de gastheercellen integreert.

#### **3.1 Informatie over lenti- en retrovirale vectoren**

Lentivirussen en gammaretrovirussen behoren tot verschillende genera binnen de familie van de *Retroviridae* en subfamilie *Orthoretrovirinae*.<sup>22</sup> De virussen bezitten een enkelstrengs RNA-genoom dat door een virus-specifiek polymerase, het reverse transcriptase, wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA (het provirale genoom) dat integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel.<sup>23,24</sup> Door vectoren te gebruiken die gebaseerd zijn op lenti- en gammaretrovirussen, kunnen transgenen in het genoom van een cel geïntegreerd worden. Meestal wordt hierbij gebruik gemaakt van replicatiedeficiënte vectoren afgeleid van het lentivirus human immunodeficiency virus (HIV, species *Lentivirus humimdef1*) en van het muizen gammaretrovirus Moloney murine leukemia virus (MoMLV; een virus binnen de species *Gammaretrovirus murleu*).

Voor de productie van replicatiedeficiënte lentivirale vectordeeltjes wordt gebruik gemaakt van zogenaamde 'split packaging' systemen. Daarbij worden de verschillende virale genen en sequenties opgesplitst, en *in trans* over meerdere vectoren verdeeld. De volgende vectoren moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te produceren:

- 1) De 'transfervector'. Dit construct bevat het gewenste transgen en het packagingsignaal, geflankeerd door virale LTR's.
- 2) De 'pseudotyping vector'. Dit is een expressievector voor een envelopeiwit. Meestal wordt VSV-G als envelopeiwit gebruikt, waardoor de resulterende lenti- of retrovirale vector een breder spectrum van doelwitcellen kan infecteren.

- 3) Het 'packagingconstruct'. Deze vector (of set van vectoren) codeert de lenti- of retrovirale eiwitten die nodig zijn voor de productie van virusdeeltjes. De *gag*- en *pol*-genen (en voor lentivirale vectoren ook het *rev*-gen) zijn de minimale componenten. Daarnaast kan voor productie van lentivirale vectoren ook het *tat*-gen aanwezig zijn. Bij een 3<sup>e</sup> generatie lentiviraal vectorsysteem zijn de *gag*- en *pol*-genen op één packagingconstruct aanwezig, ontbreekt het *tat*-gen, en is het *rev*-gen aanwezig op een afzonderlijk plasmide. Het packaging signaal en de LTR's ontbreken in de packagingconstructen.

Omdat de essentiële genen zich niet in het vectorgenoom bevinden, is de vector niet meer in staat om zelfstandig te repliceren. Om tijdens de vectorproductie een replicatie-competente vector te verkrijgen zijn meerdere recombinaties nodig. Dit vermindert de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus, die tevens verder kan worden verkleind door de sequentieovereenkomst tussen de vectoren te minimaliseren. Daarnaast zijn er zelf-inactiverende ('self inactivating'; SIN) transfervectoren ontwikkeld.<sup>25,26</sup> In deze vectoren ontbreekt het domein van de 3' LTR dat de promotor- en enhancerelementen van de LTR bevat. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor de in het DNA geïntegreerde vector geen functionele LTR-promotor/enhanceractiviteit meer bezit. Hierdoor wordt de initiatie van transcriptie verhinderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk.

### **3.2 Randvoorwaarden klinische studies met ex vivo retro- of lentiviraal getransduceerde cellen**

De COGEM heeft regelmatig geadviseerd over klinische studies waarbij lichaamseigen (autologe) of donor (allogene) cellen *ex vivo* getransduceerd werden met behulp van retro- of lentivirale vectoren. In 2019 heeft de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen opgesteld en geoordeeld dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze gg-cellen verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan.<sup>1</sup> Deze randvoorwaarden zijn in 2020 geüpdatet.<sup>27</sup> Hierbij is ook het uitsluiten van HIV-1 en HIV-2 patiënten bij klinische studies met lentivirale vectoren komen te vervallen als randvoorwaarde van de generieke milieurisicobeoordeling.

## **4. Eerdere COGEM adviezen over iPSC's**

De COGEM heeft tweemaal advies uitgebracht over klinische studies naar de toepassing van celproducten afgeleid van iPSC's.<sup>28,29</sup> In beide studies werd gebruik gemaakt van episomale plasmiden om iPSC's te genereren en is gecontroleerd op aanwezigheid van plasmidesequenties en op integratie van het plasmide (of fragmenten daarvan). Het doel van deze studies was om patiënten te behandelen met gedifferentieerde iPSC's; er vond geen verdere transductie plaats met retro- of lentivirale vectoren. Tevens heeft de COGEM eerder geadviseerd over onderzoek naar het vervaardigen van iPSC's uit somatische cellen van muizen en mensen met SeV-vectoren<sup>30,31</sup> of VEEV-replicons<sup>32</sup>.

## **5. Generieke milieurisicobeoordeling ex vivo lenti- of retrovirale transductie van iPSC's**

De onderhavige generieke milieurisicobeoordeling betreft het *ex vivo* transduceren van reeds verkregen iPSC's met replicatiedeficiënte lenti- of retrovirale vectoren (stap 2 in Figuur 1). Deze

milieurisicobeoordeling dient gezien te worden als aanvulling op de eerdere generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met *ex vivo* getransduceerde cellen waarbij gebruik gemaakt wordt van retrovirale vectoren gebaseerd op het MoMLV, of 3<sup>e</sup> generatie lentivirale SIN-vectoren afgeleid van HIV-1.<sup>1,27</sup>

iPSC's kunnen op verschillende manieren gegenereerd worden, waarbij gebruik gemaakt kan worden van DNA-plasmiden alsook van vectoren die zijn afgeleid van DNA- of RNA-virussen. Een potentieel milieurisico kan ontstaan wanneer in dezelfde cel zowel de vectoren aanwezig zijn die gebruikt zijn om de iPSC's te genereren, als de lenti- of retrovirale vectoren om de iPSC's te transduceren. In die gevallen zou door recombinatie of complementatie, mobilisatie en verspreiding van de vectoren kunnen optreden.

De COGEM merkt hierbij op dat aanhoudende expressie van herprogrammeerfactorsequenties in reeds verkregen iPSC's vanwege patiëntrisico's ongewenst is; om die reden zullen in de meeste gevallen de gebruikte plasmiden of virale vectoren niet meer aanwezig zijn in de iPSC's op het moment van retro- of lentivirale transductie. In de onderhavige milieurisicobeoordeling wordt echter rekening gehouden met het scenario dat (al dan niet geïntegreerde) gehele of gedeeltelijke sequenties afkomstig van de plasmiden of virale vectoren, nog wel aanwezig zijn op het moment van *ex vivo* transductie met de retro- of lentivirale vectoren. Dit zou zich kunnen voordoen bij methoden om iPSC's te genereren waarbij (onbedoelde) integratie in het gastheergenoom optreedt (bijvoorbeeld bij gebruik van plasmiden, minicircles, adenovirale of AAV-vectoren), eventuele excisie van de sequenties niet volledig is (bijvoorbeeld bij gebruik van transposons of lenti- of retrovirale vectoren), of wanneer residuele plasmiden of vectoren onbedoeld aanwezig zijn in de iPSC's.

Wanneer in de aanwezige plasmiden of virale vectoren die gebruikt zijn om iPSC's te genereren (stap 1 in Figuur 1), sequenties zijn ingebracht die de latere replicatiedeficiënte retro- of lentivirale vectoren (stap 2 in Figuur 1) kunnen complementeren of hiermee kunnen recombineren, kan dit leiden tot verdere verspreiding van de voorheen biologisch ingeperkte retro- of lentivirale vectoren. Eenzelfde scenario kan zich voordoen wanneer in de lenti- of retrovirale vectoren (stap 2 in Figuur 1) sequenties zijn ingebracht die met residueel in de iPSC's aanwezige virale vectoren (uit stap 1 in Figuur 1) kunnen recombineren of deze kunnen complementeren. Complementatie van of recombinatie bij episomale plasmiden vormt geen risico met betrekking tot verdere verspreiding, omdat deze DNA-structuren niet ingepakt worden en hulpmiddelen nodig zijn om transfectie van een volgende cel teweeg te brengen.

De COGEM benadrukt dat in deze generieke milieurisicobeoordeling niet de potentiële milieurisico's van de aanwezigheid van residuele vectoren of vectorsequenties in de iPSC's beoordeeld worden, maar enkel gekeken wordt naar potentiële milieurisico's hiervan bij opvolgende transductie van iPSC's met lenti- en retrovirale vectoren.

## 6. Conclusie

De risico's van *ex vivo* retro- of lentivirale transductie van iPSC's verschillen niet van *ex vivo* retro- of lentivirale transductie van reguliere cellen. Een uitzondering geldt wanneer in de iPSC's residuele

vectoren of vectorsequenties aanwezig zijn. In het onderhavige advies wordt derhalve een milieurisico-beoordeling uitgevoerd voor de situatie waarbij tijdens retro- of lentivirale transductie van iPSC's nog residuele vectoren of vectorsequenties aanwezig zijn. Om in een dergelijke situatie het risico op recombinatie, complementatie, en daaropvolgende mobilisatie en verdere verspreiding van virale vectoren bij retro- of lentivirale transductie van iPSC's in te perken, adviseert de COGEM de volgende voorwaarden te hanteren:

- Bij de gebruikte methode voor het genereren van iPSC's (stap 1 in Figuur 1) mogen geen sequenties zijn gebruikt die tot complementatie of recombinatie en daaropvolgende mobilisatie en verspreiding van de lenti- of retrovirale vectoren (stap 2 in Figuur 1) kunnen leiden.
- Wanneer voor het genereren van iPSC's virale vectoren worden gebruikt, dienen bij transductie met lenti- of retrovirale vectoren (stap 2 in Figuur 1) geen sequenties in deze lenti- of retrovirale vectoren aanwezig te zijn die tot complementatie of recombinatie en daaropvolgende mobilisatie en verspreiding van residueel aanwezige virale vectoren in de iPSC's (uit stap 1 in Figuur 1) kunnen leiden.

Wanneer aan deze voorwaarden wordt voldaan, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van *ex vivo* lenti- of retrovirale transductie van iPSC's verkregen met de in Appendix I genoemde methoden, verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM signaleert dat klinische studies met iPSC's die met behulp van lenti- en retrovirale vectoren worden gemodificeerd en waarbij aan de in dit advies gestelde randvoorwaarden wordt voldaan, onder de VoV kunnen vallen.

## Referenties

1. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
2. Loket Gentherapie. Aanvraagformulier Retro/lentivirale vectoren zonder deeltjes – VoV. <https://www.loketgentherapie.nl/aanvraagformulier-retrovirale-vectoren-vov> (bezoekt: 1 mei 2024)
3. Kobold S *et al.* (2020). A manually curated database on clinical studies involving cell products derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 15: 546-555
4. Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035090/2024-01-01#Bijlage1> (bezoekt: 1 mei 2024)
5. Takahasi K & Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
6. Takahashi K *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872
7. Takahashi K & Yamanaka S (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 183-193
8. Yu J *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920



9. Okita K *et al.* (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317
10. Malik N & Rao MS (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol.* 997: 23-33
11. Cerneckis J *et al.* (2024). Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct. Target Ther.* 9: 112
12. Moy AB *et al.* (2023). The challenges to advancing induced pluripotent stem cell-dependent cell replacement therapy. *Med. Res. Arch.* 11: 4784
13. Hu K (2014). Vectorology and factor delivery in induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells Dev.* 23:1301-1315
14. Scesa G *et al.* (2021). iPSC preparation and epigenetic memory: does the tissue origin matter? *Cells* 10: 1470
15. Haridhasapavalan KK *et al.* (2019). An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene* 686: 146-159
16. Hu K (2014). All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation. *Stem cells Dev.* 23: 1285-1300
17. Guan J *et al.* (2022). Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605: 325-331
18. ThermoFisher Scientific. Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit. [Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit \(thermofisher.com\)](https://www.thermofisher.com) (bezoekt: 14 augustus 2024)
19. ThermoFisher Scientific. Cytotune-iPS Sendai Reprogramming. [CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit | Thermo Fisher Scientific - NL](https://www.thermofisher.com) (bezoekt: 8 mei 2024)
20. Merck. Simplicon™ in vivo Protein Expression System. <https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-expression/simplicon-rna-reprogramming> (bezoekt: 7 mei 2024)
21. Stem Cell Technologies. ReproRNA™-OKSGM. <https://www.stemcell.com/products/reproRNA-oksgm.html> (bezoekt: 6 juni 2024)
22. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2023 Release. <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt: 15 augustus 2024)
23. Goff SP (2013). Retroviridae. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
24. Freed EO & Martin MA (2013). Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
25. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
26. Kappes JC & Wu X (2002). Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
27. COGEM (2020). Advies betreffende procedures van markttoelatingen van medische ggo-producten die onder de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies vallen. COGEM advies CGM/201214-02
28. COGEM (2020). Klinische studie naar de toepassing van celproducten afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC). COGEM advies CGM/201210-01

29. COGEM (2021). Klinische studie naar behandeling met mesenchymale stromale cellen (iMSC) afgeleid van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC). COGEM advies CGM/210617-01
30. COGEM (2013). Inschaling van werkzaamheden met gg-Sendai virus. COGEM advies CGM/130329-01
31. COGEM (2021). Omlaagschaling van werkzaamheden met gg-Sendai virus getransduceerde humane cellen. COGEM advies CGM/210715-01
32. COGEM (2015). Inschaling van werkzaamheden met replicons afgeleid van het Venezuelan equine encephalitis virus. COGEM advies CGM/150715-01



## Appendix I - Technieken om iPSC's te genereren

### 1. Niet-virale methoden

Om iPSC's te genereren kunnen herprogrammeerfactorsequenties als DNA of mRNA in de cel worden getransfecteerd, of kunnen de herprogrammeerfactoren als eiwit in de cellen worden gebracht. Transfectie van somatische cellen met mRNA coderend voor herprogrammeerfactoren, of met de eiwitten zelf, wordt in het onderhavige advies buiten beschouwing gelaten. iPSC's die op deze wijze zijn gegenereerd, worden volgens de Regeling ggo niet als ggo beschouwd.

#### 1.1 Episomale DNA-plasmiden en minicircles

Een veelgebruikte methode voor het genereren van iPSC's is door *ex vivo* transfectie met episomale plasmiden die humane herprogrammeerfactorsequenties bevatten.<sup>1,2</sup> Vaak worden hiervoor plasmiden gebruikt met een 'origin of replication' van het Epstein-Barr virus (oriP) en het 'Epstein-Barr nuclear antigen 1' (EBNA-1). Het EBNA-1 eiwit zorgt voor synchronisatie met de replicatie van de celcyclus, waardoor eenmalige replicatie van het plasmide per celcyclus optreedt.<sup>3</sup> Hierdoor kunnen OriP/EBNA-plasmiden episomaal amplificeren, waardoor er langdurige expressie van de herprogrammeerfactoren plaats kan vinden, in tegenstelling tot reguliere plasmiden.<sup>4,2</sup> De herprogrammeerfactoren worden in veel gevallen verdeeld over verschillende plasmiden, die meestal door middel van electroporatie in de cel worden gebracht. Ook kunnen de herprogrammeerfactoren gezamenlijk op één plasmide worden gebracht, die met elkaar verbonden zijn met 2A-peptidesequenties.<sup>5</sup> Door aanwezigheid van de 2A-sequenties, die zorgen voor 'ribosomale skipping', worden de individuele herprogrammeereiwitten gevormd. Door vermeerdering van de getransfecteerde iPSC's zullen de episomale plasmiden in de loop der tijd verloren raken vanwege defecten in de synthese en partitionering van de plasmiden. Het gebruik van deze OriP/EBNA-plasmiden wordt als niet-integratieve methode beschouwd om iPSC's te genereren.<sup>6</sup> Episomale plasmiden zijn succesvol toegepast voor het genereren van iPSC's van verschillende humane somatische cellen, en zijn ook als herprogrammeer-kit commercieel verkrijgbaar.<sup>7</sup>

Er wordt ook onderzoek gedaan naar het gebruik van plasmiden zonder virale elementen voor het produceren van iPSC's, waarbij de functionaliteit van de oriP/EBNA-elementen wordt nagebootst door humane 'Scaffold/Matrix Attachment Regions' (S/MARs). Dergelijke vectoren worden ook wel SMAR-vectoren genoemd.<sup>8,9</sup> Ook wordt onderzoek gedaan naar het gebruik van 'minicircles' om iPSC's te genereren.<sup>10,11</sup> Minicircles zijn circulaire DNA-vectoren waarin geen bacteriële backbone-sequenties aanwezig zijn, en die vrijwel uitsluitend het gen van interesse bevatten. Door afwezigheid van de bacteriële backbone-sequenties – die een immuunrespons kunnen uitlokken in cellen, of silencing van het transgen teweeg kunnen brengen<sup>12</sup> – kunnen minicircles langer tot expressie komen dan reguliere plasmiden.<sup>13</sup> Minicircles worden overigens nog niet op grote schaal gebruikt, omdat het productieproces intensief, moeilijk en inefficiënt is.<sup>6</sup> In minicircles kunnen ook SMAR-elementen toegepast worden om transgenen nog langer tot expressie te brengen.<sup>14</sup> Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er nog geen iPSC's gegenereerd met SMAR-minicircles.



## 1.2 Transposons

Transposons zijn mobiele genetische elementen die van plaats kunnen veranderen ('springen') in het DNA van de gastheer. Er zijn twee systemen, PiggyBac en Sleeping Beauty, die reeds toegepast zijn om iPSC's te genereren van humane of muizencellen.<sup>15,16,17</sup> De transposons bestaan uit een polycistronisch transcript met de herprogrammeerfactorsequenties die met elkaar verbonden zijn met 2A-peptidesequenties. Door aanwezigheid van de 2A-sequenties, die zorgen voor 'ribosomale skipping', worden de individuele herprogrammeerfactoren gevormd. De transposons kunnen in aanwezigheid van een transposase in het DNA integreren, of juist verwijderd worden. Integratie van het PiggyBac transposon vindt plaats op specifieke locaties in het chromosoom (TTAA-elementen). Het Sleeping Beauty transposonsysteem heeft, in tegenstelling tot PiggyBac, geen voorkeur voor integratie op specifieke locaties in het genoom. Omdat het transposon integreert in het genoom, kan langdurige expressie bewerkstelligd worden zonder herhaalde transfectie. Omdat integratie en excisie van het transposon door hetzelfde enzym gebeurt, bestaat de kans op onbedoelde re-integratie van het transposon. Daarom is een goede screening vereist om zeker te zijn dat de herprogrammeersequenties verwijderd zijn na het ontwikkelen van de iPSC's.<sup>18</sup>

## 2. Virale vectoren die integreren in het gastheergenoom: lenti- of retrovirale vectoren

Bij de eerste experimenten waarbij humane iPSC's zijn gegenereerd, is gebruik gemaakt van replicatiedeficiënte lenti- en retrovirale vectoren, afgeleid van lenti- en gammaretrovirussen (familie *Retroviridae*). Integratie van virale sequenties is onderdeel van de virale levenscyclus bij deze virussen. Deze enkelstrengs RNA-virussen zetten hun virale genoom met een virus-specifiek polymerase (het reverse transcriptase) om naar dubbelstrengs DNA, dat vervolgens integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel.

In replicatiedeficiënte lenti- of retrovirale vectoren zijn de genen die essentieel zijn voor de levenscyclus van het virus, i.e., de genen *gag*, (*pro*)/*pol* en *env*, en bij lentivirale vectoren ook (het merendeel van) de accessoire en regulatoire genen *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* en *nef*, verwijderd. Omdat de essentiële genen zich niet in het vectorgenoom bevinden, is de vector niet meer in staat om zelfstandig te repliceren. Retrovirale vectoren kunnen enkel delende cellen transduceren, maar lentivirale vectoren zijn in staat ook niet-delende cellen te transduceren. Wanneer in retro- of lentivirale vectoren herprogrammeerfactorsequenties worden opgenomen, kunnen deze integreren in het genoom van de gastheercel en stabiel tot expressie komen.<sup>19,20</sup>

Bij de eerste experimenten om humane iPSC's te genereren, werden de herprogrammeersequenties op verschillende vectoren aangeboden.<sup>20,21</sup> Bij integratie van het vectorgenoom in de gastheercel bestaat het risico op insertionele mutagenese, waardoor tumorvorming geïnduceerd kan worden. Om het aantal integraties in het gastheergenoom te reduceren (en daarmee het risico op insertionele mutagenese te beperken) kan gebruik gemaakt worden van vectoren waarbij alle benodigde herprogrammeerfactorsequenties multicistronisch in één (lentivirale) vector opgenomen zijn.<sup>22</sup>



Een ander nadeel van de integratie van het vectorgenoom is dat residuele expressie of latere heractivatie van de geïntegreerde herprogrammeerfactoren plaats kan vinden nadat pluripotentie geïnduceerd is. Vanwege de oncogene eigenschappen van bepaalde herprogrammeerfactoren kan dit leiden tot tumorvorming. Om dit te voorkomen zijn verschillende methoden ontwikkeld om de geïntegreerde transgenen te verwijderen (excisie) of uit te schakelen (silencing). Excisie kan bewerkstelligd worden door gebruik te maken van het Cre-lox recombinase systeem. Hierbij worden aan weerszijden van het vectorgenoom loxP-sequenties opgenomen, waarna door transiënte expressie van het eiwit Cre-recombinase (geïntroduceerd via een episomale plasmide, adenovirale vector, mRNA, of als eiwit) de geïntegreerde transgenen uit het gastheergenoom verwijderd kunnen worden.<sup>23,24</sup> Hierbij kunnen echter alsnog residuele vectorsequenties achterblijven in het genoom. Ook kunnen doxycycline- of tetracycline-induceerbare promotoren toegepast worden, waardoor het geïntegreerde transgen alleen tot expressie komt wanneer tetracycline of doxycycline in het kweekmedium aanwezig is.<sup>22,25</sup>


Om het risico op insertionele mutagenese in te perken, zijn niet-integrerende lentivirale vectoren (NILV) ontwikkeld. In deze vectoren zijn mutaties in het virale integrase-enzym of aanpassingen aan de LTR-sequenties aangebracht om integratie van het vectorgenoom tegen te gaan, waardoor het DNA episomaal aanwezig blijft.<sup>26</sup> NILV's zijn echter nog niet toegepast voor het genereren van iPSC's.

### **3. Niet-integrerende virale vectoren**

In tegenstelling tot integrerende virale vectoren, kunnen ook vectoren toegepast worden afgeleid van virussen waarvan integratie in het gastheergenoom geen onderdeel uitmaakt van de levenscyclus. Dergelijke vectoren betreffen adenovirale vectoren, Sendai virus-vectoren en virale replicons afgeleid van alfavirussen. Een kenmerk van deze vectoren is dat er verdunning optreedt door celdeling, waardoor deze vectoren gradueel uit de populatie iPSC's verdwijnen.

#### **3.1 Adenovirale vectoren**

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (familie *Adenoviridae*) en worden veel gebruikt in klinisch onderzoek. Replicatie van het adenovirale dubbelstrengs DNA-genoom vindt plaats in de celkern van de gastheer, waar het episomaal aanwezig is. Bij replicatie-deficiënte AdV-vectoren is minimaal het E1-gebied – dat essentieel is voor replicatie van het virale genoom – uit het virale genoom verwijderd, waardoor de vectoren niet in staat zijn zelfstandig te repliceren en biologisch ingeperkt zijn. Door transductie van replicatiedeficiënte adenovirale vectoren waarin herprogrammeersequenties zijn opgenomen, kan men bepaalde muizen- en humane cellen tot iPSC's laten ontwikkelen.<sup>27,28</sup> De herprogrammeersequenties zijn hierbij opgesplitst over meerdere adenovirale vectoren. Het gebruik van één polycistronische vector waarin alle herprogrammeersequenties opgenomen zijn, is niet succesvol gebleken.<sup>29</sup> In lage frequentie kan integratie van het adenovirale vectorgenoom in de gastheercel optreden.



### 3.2 Adeno-associated virus (AAV-)vectoren

Adeno-associated virus (AAV-)vectoren worden ook veel gebruikt in klinisch onderzoek. Adeno-associated virussen (genus *Dependoparvovirus*) hebben een enkelstrengs DNA-genoom en zijn van nature afhankelijk van een helpervirus voor replicatie. Bij AAV-vectoren zijn de virale genen *rep* en *cap/AAP* vervangen door een transgene expressiecassette. Door afwezigheid van de Rep- en Cap-eiwitten, kunnen dergelijke vectoren ook in aanwezigheid van een helpervirus niet repliceren. AAV-vectoren kunnen niet efficiënt in het genoom integreren, en zijn voornamelijk episomaal in de celkern aanwezig, onder meer in de vorm van concatameren. Hierdoor persisteren zij niet in actief delende cellen. AAV-vectoren hebben een beperkte packagingcapaciteit, waardoor bij toepassing voor iPSC's de herprogrammeerfactorsequenties over verschillende vectoren verdeeld moeten worden. Tot dusver is het alleen mogelijk gebleken om muizencellen te herprogrammeren echter integratie van vectorsequenties bleek op te treden tijdens herprogrammering. Met dezelfde vectoren is het niet gelukt om humane cellen te herprogrammeren.<sup>30</sup> Aanpassingen aan de AAV-vectoren zijn nodig alvorens zij efficiënt toegepast kunnen worden voor het genereren van humane iPSC's.<sup>31</sup>

### 3.3 Sendai virus-vectoren

Het Sendai virus (SeV, species *Respirovirus muris*) is een negatief enkelstrengs RNA-virus. SeV-vectoren worden veelvuldig gebruikt in het onderzoek. Er zijn verschillende generaties vectoren ontwikkeld, die verschillen in het aantal virale genen dat nog in het genoom aanwezig is. Het RNA-genoom van SeV bevindt zich in een nucleocapside, dat is opgebouwd uit nucleoproteïnen (NP), fosfoproteïnen (P) en 'large' proteïne (L). Het virusdeeltje bevat een virale envelop waarin zich het virale fusie-eiwit (F) en hemagglutinine-neuraminidase eiwit (HN) bevinden, die een belangrijke rol spelen bij de infectie van cellen. Tussen de virale envelop en de nucleocapside bevindt zich het matrix (M) eiwit. De accessoire genen zijn als overlappende openleesramen in het P-gen aanwezig, waardoor het P-gen voor tot wel zeven verschillende eiwitten kan coderen (P, V, W, C', C, Y1 en Y2).<sup>32</sup> Expressie van virale eiwitten en replicatie van het virale genoom vinden plaats in het cytoplasma van de gastheercel.<sup>33</sup>

De meest gebruikte SeV-vectoren voor het genereren van iPSC's zijn de vectoren waarin het F-gen is gedeleteerd. SeV $\Delta$ F-vectoren kunnen nog wel virus-achtige deeltjes (virus-like-particles, VLP's) vormen vanuit het celmembraan van de gastheer, maar deze zijn vaak niet meer infectieus.<sup>34,35</sup> Door herprogrammeerfactoren in SeV-vectoren op te nemen, kunnen deze gebruikt worden om iPSC's te genereren.<sup>36,37</sup> Om vier herprogrammeerfactoren tot expressie te brengen, zijn echter vier individuele SeV-vectoren nodig.<sup>38</sup> Deze vectoren repliceren in het cytoplasma en integratie van het vectorgenoom in het gastheergenoom treedt niet op. Vanwege deze eigenschap zal de aanwezigheid van SeV-vectoren na herhaalde passage van cellen uitdoven.<sup>4,18</sup> Om de veiligheid van SeV-vectoren te verbeteren en deze vectoren gemakkelijker uit iPSC's te kunnen verwijderen, zijn ook temperatuur-sensitieve varianten ontwikkeld.<sup>38,39,40</sup> Dergelijke SeV-vectoren zijn commercieel verkrijgbaar in zogenaamde herprogrammeer-kits.<sup>41</sup> In de meest geavanceerde SeV-vectoren zijn zowel F, HN als M gedeleteerd.<sup>42</sup> Bij deze vectoren kunnen de herprogrammeerfactoren gezamenlijk in één vectordeeltje worden opgenomen.<sup>43</sup>



### 3.4 VEEV-replicons

Virale replicons zijn RNA-moleculen die zelfstandig kunnen repliceren en afgeleid zijn van RNA-virussen.<sup>a</sup> In virale replicons zijn één of meerdere essentiële structurele genen uit het virale genoom verwijderd en vervangen door een transgen. De niet-structurele genen en RNA-sequenties die noodzakelijk zijn voor genoomrepletatie zijn nog wel aanwezig, wat maakt dat het replicon-RNA zelfstandig kan repliceren en langere tijd in de cel aanwezig kan blijven. Door afwezigheid van de structurele genen kunnen geen nieuwe virusdeeltjes geproduceerd worden. RNA-replicons kunnen door middel van electroporatie of transfectie in de cel worden gebracht. Ook kan het RNA ingepakt worden in niet-virale of synthetische deeltjes (zoals nanopartikels) die via endocytose door de cel opgenomen kunnen worden, of door virale structurele eiwitten waardoor de ingepakte deeltjes cellen kunnen infecteren (dan spreekt men van ‘viral replicon particles’). Een andere manier van toedienen betreft de productie van een RNA-replicon vanaf een DNA-plasmide dat daartoe in de cel wordt gebracht, ook wel ‘DNA-launched RNA replicon’ (DREP) genoemd. Door herprogrammeerfactor-sequenties op te nemen in virale RNA-replicons, kunnen deze gebruikt worden om iPSC’s te genereren. Al dan niet ingepakte RNA-replicons kennen geen DNA-intermediair en repliceren in het cytoplasma, waardoor de replicons verloren gaan bij celdeling. Bij een DREP wordt het plasmide naar de nucleus getransporteerd, waar het replicon-RNA getranscribeerd wordt en naar het cytoplasma getransporteerd. In het cytoplasma vindt de verdere replicatie van het replicon plaats.

Het gebruik van replicons voor de productie van iPSC’s is effectief gebleken bij replicons afgeleid van Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV, species *Alphavirus venezuelan*).<sup>44</sup> VEEV heeft een positief enkelstrengs RNA-genoom. In de VEEV-replicons wordt het 3’-ORF, dat codeert voor de structurele eiwitten, vervangen door herprogrammeerfactor-sequenties. Met één replicondeeltje kunnen alle herprogrammeerfactoren in de cel tot expressie komen. Door replicatie van het RNA door de eiwitten gecodeerd door het 5’-ORF kunnen de herprogrammeerfactoren langdurig tot expressie komen. In het replicon-RNA kan ook een antibioticaresistentiegen toegevoegd worden, voor selectie en behoud van cellen met het replicon-RNA. Om de immunreactie tegen het replicon te beperken en daarmee de expressie te bevorderen, kan tegelijkertijd mRNA gecotransfecteerd worden dat codeert voor een eiwit dat type I interferon (IFN) bindt en neutraliseert (B18R van het Western Vaccinia virus). Bij afwezigheid van dit eiwit verdwijnt het VEEV-replicon na meerdere passages uit de celcultuur, waardoor de replicons relatief makkelijk uit de celcultuur verwijderd kunnen worden. Dergelijke VEEV-replicons zijn ook commercieel verkrijgbaar in kits (inclusief B18R RNA en antibioticumresistentiegenen in het replicon RNA) voor de productie van iPSC’s.<sup>45,46</sup>

### Referenties

1. Okita K *et al.* (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* 8: 409-412
- a. Replicons kunnen ook afgeleid zijn van DNA-virussen. Deze DNA-replicons worden in onderhavige milieुरisicobeoordeling buiten beschouwing gelaten.



2. Yu J *et al.* (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324: 797-801
3. Yates JL *et al.* (2000). The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J. Virol.* 74: 4512-4522
4. Malik N & Rao MS (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol.* 997: 23-33
5. Gonzalez F. *et al.* (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 8918–8922
6. Wang AYL & Loh CYY (2019). Episomal induced pluripotent stem cells: functional and potential therapeutic applications. *Cell Transplant* 28: 112S-131S
7. ThermoFisher Scientific. Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit. [Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit \(thermofisher.com\)](https://www.thermofisher.com) (bezocht: 14 augustus 2024)
8. Hartley A *et al.* (2024). A simple nonviral method to generate human induced pluripotent stem cells using SMAR DNA vectors. *Genes (Basel)* 15: 575
9. Roig-Merino A *et al.* (2022). An episomal DNA vector platform for the persistent genetic modification of pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *Stem Cell Rep.* 17: 143-158
10. Jia F *et al.* (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Methods* 7: 197-199
11. Narsinh KH *et al.* (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat. Protoc.* 6: 78-88
12. Chen ZY *et al.* (2008). Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol. Ther.* 16: 548-556
13. Chen ZY *et al.* (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol. Ther.* 8: 495-500
14. Argyros O *et al.* (2011). Development of S/MAR minicircles for enhanced and persistent transgene expression in the mouse liver. *J. Mol. Med.* 89: 515-529
15. Woltjen K *et al.* (2009). PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458: 766-770
16. Kaji K *et al.* (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771–775
17. Davis RP *et al.* (2013). Generation of induced pluripotent stem cells from human foetal fibroblasts using the Sleeping Beauty transposon gene delivery system. *Differentiation* 86: 30-37
18. Scesa G *et al.* (2021). iPSC preparation and epigenetic memory: does the tissue origin matter? *Cells* 10: 1470
19. Takahasi K & Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
20. Yu J *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
21. Takahashi K *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872
22. Sommer CA *et al.* (2009). iPSC cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27: 543-549





23. Kadari A *et al.* (2014). Excision of viral reprogramming cassettes by Cre protein transduction enables rapid, robust and efficient derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 5: 47
24. Chang CW *et al.* (2009). Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27: 1042-1049
25. Yamaguchi T *et al.* (2012). Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming. *PLoS One* 7: e41007
26. Gurumoorthy N *et al.* (2022). Non-integrating lentiviral vectors in clinical applications: a glance through. *Biomedicines* 107: doi: 10.3390/biomedicines10010107
27. Stadtfeld M *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949
28. Zhou W & Freed CR (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27: 2667-3674
29. Shao L & Wu WS (2010). Gene-delivery systems for iPS cell generation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10: 231-242
30. Weltner J *et al.* (2012). Induced pluripotent stem cell clones reprogrammed via recombinant adeno-associated virus-mediated transduction contain integrated vector sequences. *J. Virol.* 86: 4463-4467
31. Haridhasapavalan KK *et al.* (2019). An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene* 686: 146-159
32. Lamb RA & Parks GD (2013). Chapter 33: Paramyxoviridae. In: *Fields virology*, volume one, 6th edition. Ed. Knipe DM & Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
33. Rima B *et al.* (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* 100: 1593–1594
34. Bitzer M *et al.* (2003). Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* 5: 543-553
35. Li HO *et al.* (2000). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* 74: 6564-6569
36. Fusaki N *et al.* (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 85: 348-362
37. Seki T *et al.* (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7: 11-14
38. Ban H *et al.* (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *PNAS* 108: 14234-14239
39. Inoue M *et al.* (2003). Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *J. Virol.* 77: 3238-3246
40. Kunitomi A *et al.* (2022). Improved Sendai viral system for reprogramming to naive pluripotency. *Cell Rep. Methods* 2: 100317
41. ThermoFisher Scientific. Cytotune-iPS Sendai Reprogramming. [Cytotune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit | Thermo Fisher Scientific - NL](#) (bezocht: 8 mei 2024)
42. Yoshizaki M *et al.* (2006). Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J. Gene Med.* 8: 1151-1159



- 
43. Nishimura K *et al.* (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* 286: 4760-4771
  44. Yoshioka N *et al.* (2013). Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell.* 13: 246-254
  45. Merck. Simplicon™ in vivo Protein Expression System. <https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-expression/simplicon-rna-reprogramming> (bezocht: 7 mei 2024)
  46. Stem Cell Technologies. ReproRNA™-OKSGM. <https://www.stemcell.com/products/reproRNA-oksgm.html> (bezocht: 6 juni 2024)