

Dezember 2022

In Abschnitt 3 der vorliegenden Stellungnahme wird erläutert, dass epigenetische Veränderungen am Genom der Zelle nach § 3 Nr. 3 GenTG nicht als gentechnische Veränderungen zu bewerten sind. Liegt ein Nachweis dafür vor, dass die mithilfe Sendaivirus-abgeleiteter Vektoren (SeV) hergestellten, induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) keine SeV-Genome mehr enthalten, ist die nach dem Stand der Wissenschaft folgerichtige Bewertung, dass es sich bei den Zellen nicht um gentechnisch veränderte Organismen (GVO) handelt. Ihre Nukleinsäuresequenz weist keine Veränderungen auf, die auf gentechnische Arbeiten zurückzuführen sind. Eine weitere Kultivierung dieser iPSC ist somit keine gentechnische Arbeit.

Aufgrund des Urteils des EuGH zur gentechnikrechtlichen Einordnung von Mutageneseverfahren (Case C-528/16) vom 25. Juli 2018 folgen nicht alle Landesregierungen sowie die ihnen unterstellten und für den Vollzug des Gentechnikgesetzes zuständigen Landesbehörden dieser ZKBS-Bewertung. Diese der ZKBS-Bewertung nicht folgenden Behörden betrachten die mit SeV generierten iPSC als GMO.

Projektleitern und Beauftragten für die biologische Sicherheit wird daher empfohlen, den Kontakt mit den zuständigen Vertretern der Landesbehörden zu suchen, insbesondere, wenn sie Experimente mit iPSC in einem Labor durchführen wollen, bei dem es sich nicht um eine gentechnische Anlage handelt.

Az. 45310.0119

Juni 2021

**Allgemeine Stellungnahme der ZKBS
zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten
mit den zugrundeliegenden Kriterien der Vergleichbarkeit:**

**Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) mittels
Sendaivirus-abgeleiteter replikationsdefekter Vektoren**

1 Beschreibung des Sendaivirus (SeV), von ihm abgeleiteter Vektoren und induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSC)

1.1 Sendaivirus

Das Sendaivirus (Spezies: *Murine respirovirus*) aus der Gattung *Respirovirus* ist ein behülltes Minusstrang-RNA-Virus, welches zur Familie *Paramyxoviridae* gehört [1]. Das respiratorische Pathogen SeV ist in Nagetierpopulationen verschiedener Spezies weltweit endemisch. Nachgewiesen wurde das Virus vor allem in Mäusen [2–4], aber auch in Ratten, Hamstern und

Meerschweinchen [5]. Während sich SeV in den Atemwegen nicht-humaner Primaten vermehren kann, wurde eine effektive Vermehrung in humanen respiratorischen Zellen trotz großer Sequenzähnlichkeit zu dem humanpathogenen Parainfluenzavirus 1 (Spezies: *Human respirovirus*) [6] nicht beobachtet [7]. Ebenso ist es bisher nicht belegt, dass es zur Infektionen des Menschen kommen kann. Vereinzelt wurde SeV aus humanen Proben der Lunge isoliert. Dies ist nach derzeitigem Kenntnisstand jedoch eher auf Kontaminationen zurückzuführen, da für die Anzucht der Viren Labormäuse genutzt wurden, bei denen eine SeV-Infektion nicht ausgeschlossen werden kann [8, 1]. SeV ist für den Menschen vermutlich deswegen nicht infektiös, da es gegenüber der humanen Interferon-beta vermittelten Immunreaktion sensitiv ist und eine für die Reifungsspaltung von SeV benötigte spezifische Protease (*trypsin-like protease*, Trypsinase Clara) beim Menschen fehlt [9, 10].

Das 15 – 16 kb umfassende SeV-Genom ist unsegmentiert und enthält *open reading frames* für sechs Strukturproteine [1, 11–15]:

- Hämagglutinin/Neuraminidase (HN) und Fusionsprotein (F): Membranproteine
- Nukleoprotein (NP), Phosphoprotein (P) und RNA-Polymerase (*large protein*, L): bilden zusammen den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex)
- Matrixprotein (M)

Als ersten Schritt der viralen Infektion vermittelt das HN die Bindung des SeV an Sialinsäurereste auf der Oberfläche der Zielzellen. Diese Sialinsäurereste werden später auf neu gebildeten Viruspartikeln durch die Neuraminidase-Aktivität von HN abgespalten, um eine Selbstaggregation zu verhindern und eine effektivere Virusverbreitung zu ermöglichen [16]. Das F ist an der Virus-Anheftung beteiligt, vermittelt die Fusion zwischen Virus- und Zellmembran und kann somit auch die Bildung von Synzytien verursachen [14]. Das auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht lokalisierte M vermittelt die Konzentration von HN, F und dem Nukleokapsid und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Partikel-Assemblierung und der Knospung [17, 18]. Die Proteine des RNP-Komplexes sind vor allem für die virale Replikation entscheidend. NP bindet die virale RNA, verpackt sie in ein helikales Nukleokapsid und schützt das Virusgenom dadurch vor einem Abbau durch Ribonukleasen. Zusätzlich beeinflusst es die virale Transkription und RNA-Replikation [19]. L ist der enzymatisch aktive Teil des RNA-abhängigen-RNA-Polymerase-Komplexes und ist entscheidend an der viralen Transkription und RNA-Replikation sowie der Modifizierung viraler mRNAs (z. B. *5'-capping*) beteiligt [20, 21]. P ermöglicht durch die Bindung an L die korrekte Funktionsweise des Polymerasekomplexes und vermittelt dessen Bindung an das Nukleokapsid [22, 19]. Weitere Proteine, die die virale RNA-Synthese steuern und darüber hinaus die Immunantwort des Wirtes beeinflussen, werden von der für P kodierenden Region mithilfe alternativer Leserahmen und ko-transkriptionaler mRNA-Editierung exprimiert [23–26].

In der TRBA 462 „Einstufung von Viren in Risikogruppen“ ist das replikationskompetente SeV in die Risikogruppe 1 mit dem Zusatz „t2“¹ eingestuft.

Das SeV ist in der Organismenliste der ZKBS als Spender- und Empfängerorganismus bei gentechnischen Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

1.2 SeV-abgeleitete Vektoren

SeV-Vektoren werden inzwischen in verschiedenen Anwendungsbereichen eingesetzt. Sie kommen bei der Entwicklung von Vakzinen [27], Gentherapien [28] und Tumorthérapien [29] zum Einsatz. Besonders für die *in vitro*-Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) [30] haben sich SeV-Vektoren etabliert und werden für diese Zwecke

¹ Wegen der Wirbeltierpathogenität können aus tierseuchenrechtlicher Sicht Sicherheitsmaßnahmen erforderlich werden, die vergleichbar mit den Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 2 ein Entweichen des Virus in die äußere Umgebung bzw. in andere Arbeitsbereiche minimieren (siehe auch TRBA 120).

auch kommerziell vermarktet. Zusätzlich finden reprogrammierende SeV-Vektoren auch *in vivo* Anwendung [31].

Vorteile von SeV-Vektoren sind ihre schnelle Aufnahme in die Zielzellen, eine starke und steuerbare Expression von Fremdgenen, die hohe Infektionsrate diverser Säugerzellen sowie ein ausschließlich zytoplasmatischer Replikationszyklus ohne die Insertion viraler Nukleinsäureabschnitte in das Wirtsgenom [32].

Da SeV in der Lage ist, zusätzlich zum eigenen Genom Fremdgene einer Größe von bis zu 3 kb [11] zu verpacken, wurden in SeV-Vektoren der ersten Generation Fremdgene einkloniert, ohne virale Gene zu deletieren. Bei diesen SeV-Vektoren blieb somit die Replikationsfähigkeit erhalten [32]. In replikationsdefekten SeV-Vektoren der neueren Generation sind ein oder mehrere virale Gene mutiert oder vollständig deletiert, wobei diese meist für ein oder mehrere Bestandteile der Virushülle kodieren [33]. So sind ΔM - [34, 35], ΔF - [36–38] und ΔHN - [39, 40], aber auch $\Delta M/\Delta F$ - [41] und $\Delta M/\Delta F/\Delta HN$ - [42, 43] Deletionsmutanten bekannt. Das deletierte Gen wird in der Produktionszelllinie jeweils *in trans* komplementiert. Nach der initialen Transduktion können die Vektoren entweder keine neuen Zellen infizieren (ΔF , ΔHN) oder es werden keine neuen Vektorpartikel gebildet (ΔM). Zusätzlich gibt es replikationsdefekte SeV-Vektoren, bei denen das P-Gen deletiert (ΔP) oder mutiert ist, sodass keine effektive virale RNA-Synthese stattfinden kann [44, 27]. Verschiedene bekannte Punktmutationen im P- und L-Gen beeinflussen die Verweildauer von SeV in den transduzierten Zellen. Sie können entweder eine Persistenz des SeV-Genoms bedingen, indem sie die Induktion von IFN- β beeinträchtigen oder verhindern [42] oder die Expression viraler Gene bei leicht erhöhten Temperaturen (38 – 39 °C) stoppen, so dass das Genom in der Folge abgebaut wird [30].

Da die viralen Gene von SeV als eigenständige Transkriptionseinheiten organisiert sind, besteht die Möglichkeit, zu übertragende Fremdgene an unterschiedlichen Stellen im Genom zu platzieren. Bei SeV-Vektoren der ersten Generation wurde das Fremdgen i. d. R. an die erste Position (Plusstrang-Orientierung), vor die SeV-Gene, kloniert. Allerdings ist auch eine Positionierung zwischen den viralen Genen möglich. Die Position bestimmt dabei die Expressionsstärke des jeweiligen Gens. Je näher die Transkriptionseinheit am 5'-Ende (Plusstrang-Orientierung) positioniert ist, umso stärker ist auch die Expression. In den replikationsdefekten SeV-Vektoren ist aufgrund der Deletionen im viralen Genom die Verpackungskapazität für Fremdgene erhöht, sodass mehrere dieser Gene als separate Transkriptionseinheiten integriert werden können.

Rekombinante, replikationsdefekte SeV-Vektoren werden mittlerweile Plasmid-basiert in Zellkultur erzeugt und vermehrt [45]. Dabei wird ein Plasmid mit der cDNA des viralen Genoms mit den entsprechenden Deletionen unter der Kontrolle des T7-Promotors in permissive Zelllinien (z. B. LLC-MK2) übertragen. Zusätzlich werden die Proteine des RNP-Komplexes (NP, P und L) sowie die T7-Polymerase wie auch die im viralen Genom deletierten Gene durch transiente oder stabile Genexpression *in trans* bereitgestellt, um die virale Replikation zu initiieren [46, 47]. Dies kann durch Transfektion von Expressionsplasmiden oder mRNA, Transduktion durch virale Vektoren oder auch Infektion der Zelle mit einem Helfervirus gewährleistet werden. Die Verpackungszelllinie gibt infektiöse, rekombinante, replikationsdefekte SeV-Vektorpartikel ab, wobei im Vektor-Genom mindestens ein für die Replikation bzw. Infektion essenzielles Gen deletiert ist.

1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)

Die Reprogrammierung ausdifferenzierter somatischer Zellen in einen Zustand ähnlich der Pluripotenz durch retrovirale Übertragung spezifischer Transkriptionsfaktoren konnte sowohl für murine [48] als auch für humane Zellen [49] gezeigt werden. Die so generierten iPSC haben sich zu einem sehr wichtigen Bestandteil der biologischen und medizinischen Forschung entwickelt.

Für die Reprogrammierung werden Transkriptionsfaktoren genutzt, die den Zustand und somit die Zugänglichkeit des Chromatins epigenetisch verändern bzw. die Expression von

Tumorsuppressor- und Protoonkogenen beeinflussen [50]. Die Veränderung des Genoms ist daher nicht vererbbar. Neben den am häufigsten genutzten Faktoren Oct3/4, Sox-2, c-Myc und Klf4 kommen auch Lin28, Nanog, L-Myc, Tert u. v. m. zum Einsatz [51]. Einige dieser genutzten Faktoren besitzen neoplastisch transformierendes Potenzial (siehe [Onkogenatenbank](#) ZKBS).

Im Gegensatz zu den anfänglich für die Übertragung von Reprogrammierungsfaktoren genutzten retro- und lentiviralen Vektoren besteht bei SeV nicht das Problem einer genomischen Integration, da dieses ausschließlich zytoplasmatisch repliziert und keine reverse Transkription der SeV-RNA erfolgt [52]. Da die Transgene nur transient exprimiert werden, das Genom der Zellen nicht verändert wird und das virale Genom der replikationsdefekten SeV mit der Zeit abgebaut wird, werden als Endprodukt transgenfreie iPSC generiert, die somit keine gentechnisch veränderten Organismen (GVO) darstellen (siehe Punkt 3.) [38]. Dieser Zustand ist nach ~10 Passagen erreicht [30, 53]. Bestimmte Punktmutationen im viralen Genom können diesen Zeitrahmen verkürzen oder verlängern [30, 42]. Daher ist für die Beurteilung, ob es sich um einen GVO handelt oder nicht, ein Nachweis nötig, ob SeV-RNA in der Zellkultur verblieben ist.

2 Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten zur Generierung von iPSC mit SeV-Vektoren

Für andere als hier beschriebene Anwendungen von SeV-Vektoren wird auf die allgemeine Stellungnahme der ZKBS für „Gentechnische Arbeiten mit von RNA-Viren abgeleiteten Minigenomen, Replikons und virusähnlichen Partikeln zum Einbringen in humane oder tierische Zellen“ (Az.: 45310.0118, Februar 2021) verwiesen.

Zur Herstellung von SeV-Vektoren werden subgenomische virale Nukleinsäureabschnitte zunächst Plasmid-basiert in ihrer cDNA-Form in *Escherichia coli* K12-Derivaten amplifiziert. Die Expression dieser Nukleinsäureabschnitte wird dabei zumeist von einem T7- oder SP6-Phagenpromotor kontrolliert. Alternativ können auch virale oder eukaryotische Promotoren verwendet werden. Diese Promotoren sind in *E. coli* i. d. R. nicht aktiv. Ebenso wenig ist von einer Vervollständigung des viralen Genoms durch Rekombination mit dem Genom von *E. coli* auszugehen. Sofern es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt, besitzen diese gentechnischen Arbeiten somit kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt. Die übertragenen Nukleinsäureabschnitte können ggf., wie im Falle der Reprogrammierungsfaktoren, ein neoplastisch transformierendes Potenzial aufweisen. In dem Zusammenhang wird auf die allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS Az. 6790-10-01 und Az. 6790-10-36 (siehe 5. Hinweise) hingewiesen.

Für die Sicherheitsbewertung von humanen und tierischen Zellen der Risikogruppe 1, auf die mittels Transfektion oder Transduktion ein deletiertes SeV-Genom übertragen wird, ist maßgeblich, ob virale Partikel entstehen können. Die ggf. abgegebenen Partikel bestimmen das Gefährdungspotenzial der Zellen.

Bei der Herstellung von replikationsdefekten SeV-Vektoren werden verschiedene virale Gene *in trans* zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um die Proteine des RNP-Komplexes, die für die Initiierung der Replikation benötigt werden, sowie das oder die im RNA-Genom deletierten Strukturproteine (HN, F, M). Dies kann durch Transfektion von Expressionsplasmiden und mRNA oder durch Transduktion mittels viraler Vektoren gewährleistet werden. Es werden sogenannte *single round infectious particles* gebildet, die eine Zielzelle einmalig infizieren können, in dieser aber aufgrund der verschiedenen Deletionen von Genen nicht zur erneuten Bildung infektiöser Vektorpartikel (ΔF oder ΔHN) führen, keine neuen Vektorpartikel (ΔM) bilden oder keine effektive RNA-Synthese ermöglichen (ΔP). Zu beachten ist hierbei, dass der Replikationsdefekt auf einer Deletion eines funktional bedeutsamen Teils des HN-, F-, M- oder P-Gens beruhen muss. Zum Erhalt regulatorischer Funktionen können jedoch ggf. Nukleinsäureabschnitte enthalten sein, die für

nicht-funktionale Teile solcher Proteine kodieren. Von einem stabilen Replikationsdefekt ist hingegen aufgrund der hohen Mutationsrate viraler RNA-Polymerasen nicht auszugehen, wenn dieser ausschließlich auf dem Einfügen inaktivierender Punktmutationen, artifizierender Stoppkodons oder *frameshift*-Mutationen beruht. Ebenso ist zu beachten, dass im SeV-Vektorgenom und den über Transfektion oder Transduktion zur Transkomplementierung bereitgestellten Nukleinsäureabschnitten keine homologen Bereiche vorhanden sein dürfen, die es ermöglichen, dass durch homologe Rekombination ein replikationsfähiges SeV-Genom wiederhergestellt wird.

Ist von einem sicheren Replikationsdefekt der SeV-Vektorpartikel auszugehen, entscheidet das enthaltene Fremdgen über das Gefährdungspotenzial der Vektorpartikel. Bei der Generierung von iPSC mittels SeV-Vektoren kommen Gene von Transkriptionsfaktoren zum Einsatz, die ein neoplastisch transformierendes Potenzial aufweisen können. Beim Umgang mit solchen SeV-Vektoren bzw. Gemischen mit diesen Vektoren ist daher vorsorglich ein geringes Gefährdungspotenzial für den Menschen anzunehmen.

Zellen der Risikogruppe 1, die mit SeV-Vektoren transduziert wurden, geben in der Regel keine weiteren infektiösen viralen Partikel ab. Solche Zellen besitzen daher kein Gefährdungspotenzial, wenn die zur Transduktion eingesetzten Vektorpartikel aufgenommen oder durch Waschen entfernt wurden. Von einer weiteren Abgabe von infektiösen viralen Partikeln ist nur dann auszugehen, wenn in den Zellen bereits vor der Transduktion komplementierende Nukleinsäureabschnitte von SeV oder einem anderen Virus vorgelegen haben.

3 Gentechnikrechtliche Bewertung von mit SeV-Vektoren hergestellten iPSC

Für die rechtliche Bewertung der mittels SeV-Vektoren generierten iPSC ist die gentechnische Veränderung der entsprechenden Zellen und die Anwesenheit des rekombinanten SeV-Vektorgenoms ausschlaggebend. Durch die SeV-Vektoren kommt es zu einer transienten Expression der übertragenen Transkriptionsfaktorgene. Durch die ausschließlich zytoplasmatische Replikation und das Fehlen einer reversen Transkription ist eine Integration rekombinanter Nukleinsäureabschnitte in das Genom der Zelle nicht zu erwarten. Das virale Genom verbleibt nur zeitlich begrenzt in der Zelle, sodass nach ~10 Passagen die so generierten iPSC frei von SeV-Vektorgenomen sind, sofern der zeitliche Verbleib der Vektorgenome nicht durch verschiedene Mutationen beeinflusst wurde.

Mögliche epigenetische Veränderungen am Genom der Zelle, die aus der Aktivität der eingebrachten Transkriptionsfaktoren resultieren (z. B. Methylierung der DNA), sind nach § 3 Nr. 3 GenTG nicht als gentechnische Veränderungen zu bewerten. Die generierten iPSC sind dann nicht als GVO anzusehen, wenn sie nachweislich keine SeV-Vektorgenome mehr enthalten. Im Gegensatz zur Herstellung der SeV-Vektoren und ihrer Anwendung stellt die weitere Kultivierung von iPSC somit keine gentechnische Arbeit dar.

4 Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten zur Generierung von iPSC mit SeV-Vektoren

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten zur Generierung von iPSC mit SeV-Vektoren zusammengefasst. Gentechnische Arbeiten mit GVO, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe zuzuordnen, die der Risikogruppe des GVO entspricht.

Die folgenden Begriffsdefinitionen werden verwendet:

- **defektes SeV-Genom:** subgenomischer Nukleinsäureabschnitt eines SeV, der alle *cis*-regulatorischen viralen Sequenzen enthält und für alle viralen Proteine kodiert, die für

seine Vermehrung (RNA-Synthese) und ggf. Transkription notwendig sind. Bei SeV müssen für den erstmaligen Start der viralen RNA-Synthese die Proteine des Replikationskomplexes *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Die anschließende RNA-Synthese erfolgt jedoch autonom. Mindestens eines der Proteine, das für die Bildung von Partikeln, die Bindung an einen zellulären Rezeptor **oder** die Übertragung der viralen RNA auf eine Zelle erforderlich ist, wird nicht kodiert; zusätzlich können ein oder mehrere Fremdgene enthalten sein.

Hinweis: Der Replikationsdefekt muss auf einer Deletion eines funktional bedeutsamen Teils des viralen Nukleinsäureabschnitts beruhen, der für das Protein kodiert, das die Bildung von Partikeln, die Rezeptorbindung **oder** die Fusion des Viruspartikels mit der Zielzelle ermöglicht. Zum Erhalt regulatorischer Funktionen können jedoch ggf. Nukleinsäureabschnitte enthalten sein, die für nicht-funktionale Teile eines solchen Strukturproteins kodieren. Von einem stabilen Replikationsdefekt ist hingegen aufgrund der hohen Mutationsrate viraler RNA-Polymerasen nicht auszugehen, wenn dieser ausschließlich auf dem Einfügen inaktivierender Punktmutationen, artifiziieller Stoppkodons oder *frameshift*-Mutationen beruht.

- **Helferplasmide und äquivalente Nukleinsäureabschnitte:** eukaryotische Expressionsplasmide oder Nukleinsäuren mit subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitten, die nach Transfektion oder Transduktion in der Zelle virale Proteine zur Verfügung stellen, die für die Vermehrung eines Replikons oder die Verpackung einer RNA notwendig sind. Es sind keine viralen *cis*-regulatorischen Sequenzen und Verpackungssignale enthalten, außer solchen, die mit den für die beschriebenen Funktionen notwendigen kodierenden Regionen überlappen; zwischen Helferplasmiden und mutiertem SeV-Genom liegen keine homologen Nukleinsäureabschnitte vor, die die Wiederherstellung eines replikationsfähigen SeV-Genoms ermöglichen.
- **RNP-Komplex:** Bestehend aus Nukleoprotein (NP), Phosphoprotein (P) und RNA-Polymerase (*large protein*, L); benötigt für die Initiierung der viralen RNA-Replikation; muss bei defekten SeV-Genomen *in trans* zur Verfügung gestellt werden.

Übertragung von Plasmiden mit subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitten auf *E. coli* K12-Derivate

- 4.1. *E. coli* K12-Derivate der **Risikogruppe 1** einschließlich eines Plasmids mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten des SeV und ggf. weiterer zellulärer subgenomischer Nukleinsäureabschnitte sind GVO der **Risikogruppe 1**. Weisen die übertragenen Nukleinsäureabschnitte ein neoplastisch transformierendes Potential auf, sind die GVO dann der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, wenn es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 7 Abs. 2 GenTSV handelt. Handelt es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System nicht um eine biologische Sicherheitsmaßnahme, so ist eine Einzelfallbewertung nötig.

Transfektion subgenomischer viraler Nukleinsäureabschnitte in humane oder tierische Zellen

- 4.2. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die durch Transfektion die *in vitro*-transkribierte RNA oder ein Plasmid mit der cDNA eines defekten SeV-Genoms übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts auszugehen ist. Es kommt nicht zur Abgabe viraler Partikel.

- 4.3. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die durch Transfektion die *in vitro*-transkribierte RNA oder ein Plasmid mit der cDNA eines durch Deletion im HN-, F- und/oder M-Gen defekten SeV-Genoms und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte übertragen wurden, die für die Proteine des viralen RNP-Komplexes kodieren, sind GVO der **Risikogruppe 1**. Es kommt ggf. zur Abgabe nichtinfektöser virusähnlicher Partikel ohne Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die ggf. abgegebenen virusähnlichen Partikel mit Deletionen in HN und/oder F können Zellen nicht infizieren und somit weder genetisches Material übertragen noch sich vermehren. Aus diesem Grund sind sie keine Organismen gemäß § 3 Nr. 1 GenTG und somit auch keine GVO.

Erzeugung von SeV-Vektorpartikeln

- 4.4. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, in denen nach ausschließlicher Übertragung von Helferplasmiden oder hierzu äquivalenten Nukleinsäureabschnitten virale Strukturproteine und/oder Nicht-Strukturproteine exprimiert werden, sind ggf. GVO der **Risikogruppe 1** (bei Übertragung von Plasmiden). Es kommt ggf. zur Abgabe virusähnlicher Partikel ohne Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die ggf. abgegebenen virusähnlichen Partikel sind keine Organismen im Sinne des § 3 Nr. 1 GenTG, da sie kein genetisches Material enthalten und sich nicht vermehren können. Somit sind sie auch keine GVO.

- 4.5. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, transfiziert mit *in vitro*-transkribierter RNA oder einem Plasmid mit der cDNA eines defekten SeV-Genoms und ein oder mehreren Helferplasmiden oder hierzu äquivalenten Nukleinsäureabschnitten, die für die Proteine des viralen RNP-Komplexes und ggf. virale Strukturproteine kodieren, die die Expression des deletierten Gens des SeV-Genoms komplementieren, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern das SeV-Genom nicht für ein Protein mit neoplastisch transformierendem Potenzial kodiert. Es kommt zur Abgabe infektiöser SeV-Vektorpartikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1**.

- 4.6. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, transfiziert mit *in vitro*-transkribierter RNA oder einem Plasmid mit der cDNA eines deletierten SeV-Genoms und ein oder mehreren Helferplasmiden oder hierzu äquivalenten Nukleinsäureabschnitten, die für die Proteine des viralen RNP-Komplexes und ggf. virale Strukturproteine kodieren, die die Expression des deletierten Gens des SeV-Genoms komplementieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**, sofern das SeV-Genom einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthält. Es kommt zur Abgabe infektiöser SeV-Vektorpartikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 2**.

Transduktion von humanen oder tierischen Zellen mit SeV-Vektorpartikeln

- 4.7. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die RNA mithilfe von SeV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 1** übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 1**. Ggf. kommt es zur Abgabe virusähnlicher Partikel.
- 4.8. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die RNA mithilfe von SeV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 2** übertragen wurde, sind nach Abschluss der

Transduktion GVO der **Risikogruppe 1**, sofern keine viralen Proteine exprimiert werden, die die Deletion des SeV-Genoms komplementieren. Ggf. kommt es bei Nutzung von Δ HN- oder Δ F-Vektorpartikeln zur Abgabe nicht-infektöser virusähnlicher Partikel ohne Gefährdungspotenzial.

- 4.9.** Humane und tierische iPSC der **Risikogruppe 1**, die nach ~10 Passagen nachweislich keine SeV-Vektorgenome mehr enthalten, besitzen kein Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die iPSC, welche nachweislich frei von SeV-Vektorgenomen sind, sind keine GVO im Sinne des § 3 Nr. 3 GenTG, da keine Veränderung des Zellgenoms vorgenommen wurde und kein fremdes genetisches Material vorliegt.

5 Hinweise

Weiterführende Erklärungen zu gentechnischen Arbeiten mit SeV-Vektoren sind in der folgenden allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu finden:

- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentechnische Arbeiten mit von RNA-Viren abgeleiteten Minigenomen, Replikons und virusähnlichen Partikeln zum Einbringen in humane oder tierische Zellen (Az.: 45310.0118, Februar 2021)

Es wird zudem auf die Empfehlungen folgender allgemeiner Stellungnahmen der ZKBS hingewiesen:

- Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016)
- Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potential eingeführt wurden (Az. 6790-10-36, aktualisiert Dezember 2014)

6 Literatur

1. **Faisca P, Desmecht D** (2007). Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* **82**(1):115–25.
2. **Fukumi H, Nishikawa F, Kitayama T** (1954). A pneumotropic virus from mice causing hemagglutination. *Jpn J Med Sci Biol* **7**(4):345–63.
3. **Parker JC, Tennant RW, Ward TG, Rowe WP** (1964). Enzootic sendai virus infections in mouse breeder colonies within the united states. *Science* **146**(3646):936–8.
4. **Zurcher C, Burek JD, van Nunen MC, Meihuizen SP** (1977). A naturally occurring epizootic caused by Sendai virus in breeding and aging rodent colonies. I. Infection in the mouse. *Lab Anim Sci* **27**(6):955–62.
5. **Parker JC, Reynolds RK** (1968). Natural history of Sendai virus infection in mice. *Am J Epidemiol* **88**(1):112–25.
6. **Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Elkins WR, St Claire M, Nishio M, Garcin D, Kolakofsky D, Collins PL, Murphy BR** (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**(1):153–60.

7. **Bousse T, Chambers RL, Scroggs RA, Portner A, Takimoto T** (2006). Human parainfluenza virus type 1 but not Sendai virus replicates in human respiratory cells despite IFN treatment. *Virus Res* **121**(1).
8. **Ishida N, Homma M** (1978). Sendai Virus . p. 349–83. *In* Lauffer MA (ed), Advances in virus research, vol. 23. Academic Press, New York, London.
9. **Zimmermann M, Armeanu-Ebinger S, Bossow S, Lampe J, Smirnow I, Schenk A, Lange S, Weiss TS, Neubert W, Lauer UM, Bitzer M** (2014). Attenuated and protease-profile modified sendai virus vectors as a new tool for virotherapy of solid tumors. *PLoS One* **9**(3):e90508.
10. **Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N** (1992). Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* **267**(19):13573–9.
11. **Sakai Y, Kiyotani K, Fukumura M, Asakawa M, Kato A, Shioda T, Yoshida T, Tanaka A, Hasegawa M, Nagai Y** (1999). Accommodation of foreign genes into the Sendai virus genome: sizes of inserted genes and viral replication. *FEBS Letters* **456**(2):221–6.
12. **Blanchard L, Tarbouriech N, Blackledge M, Timmins P, Burmeister WP, Ruigrok RW, Marion D** (2004). Structure and dynamics of the nucleocapsid-binding domain of the Sendai virus phosphoprotein in solution. *Virology* **319**(2).
13. **Hidaka Y, Kanda T, Iwasaki K, Nomoto A, Shioda T, Shibuta H** (1984). Nucleotide sequence of a Sendai virus genome region covering the entire M gene and the 3' proximal 1013 nucleotides of the F gene. *Nucleic Acids Res* **12**(21):7965–73.
14. **Scheid A, Choppin PW** (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* **57**(2):475–90.
15. **Shioda T, Hidaka Y, Kanda T, Shibuta H, Nomoto A, Iwasaki K** (1983). Sequence of 3,687 nucleotides from the 3' end of Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequences of viral NP, P and C proteins. *Nucleic Acids Res* **11**(21):7317–30.
16. **Villar E, Barroso IM** (2006). Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: a minireview. *Glycoconj J* **23**(1-2):5–17.
17. **Ali A, Nayak DP** (2000). Assembly of Sendai virus: M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of F protein. *Virology* **276**(2):289–303.
18. **Coronel EC, Takimoto T, Murti KG, Varich N, Portner A** (2001). Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *J Virol* **75**(3):1117–23.
19. **Longhi S, Bloyet L-M, Gianni S, Gerlier D** (2017). How order and disorder within paramyxoviral nucleoproteins and phosphoproteins orchestrate the molecular interplay of transcription and replication. *Cell Mol Life Sci* **74**(17):3091–118.
20. **Morgan EM, Rakestraw KM** (1986). Sequence of the Sendai virus L gene: Open reading frames upstream of the main coding region suggest that the gene may be polycistronic. *Virology* **154**(1):31–40.
21. **Murphy AM, Grdzlishvili VZ** (2009). Identification of sendai virus L protein amino acid residues affecting viral mRNA cap methylation. *J Virol* **83**(4):1669–81.
22. **Bowman MC, Smallwood S, Moyer SA** (1999). Dissection of individual functions of the Sendai virus phosphoprotein in transcription. *J Virol* **73**(8):6474–83.
23. **Curran J, Kolakofsky D** (1988). Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *EMBO J* **7**(1):245–51.
24. **Dillon PJ, Gupta KC** (1989). Expression of five proteins from the Sendai virus P/C mRNA in infected cells. *J Virol* **63**(2):974–7.
25. **Breyne S de, Simonet V, Pelet T, Curran J** (2003). Identification of a cis-acting element required for shunt-mediated translational initiation of the Sendai virus Y proteins. *Nucleic Acids Res* **31**(2):608–18.
26. **Garcin D, Curran J, Itoh M, Kolakofsky D** (2001). Longer and shorter forms of Sendai virus C proteins play different roles in modulating the cellular antiviral response. *J Virol* **75**(15):6800–7.
27. **Kiener R, Fleischmann M, Wiegand MA, Lemmermann NAW, Schwegler C, Kaufmann C, Renzaho A, Thomas S, Felder E, Niller HH, Asbach B, Wagner R** (2018). Efficient Delivery of Human Cytomegalovirus T Cell Antigens by Attenuated Sendai Virus Vectors. *J Virol* **92**(15).

28. **Park A, Hong P, Won ST, Thibault PA, Vigant F, Oguntuyo KY, Taft JD, Lee B** (2016). Sendai virus, an RNA virus with no risk of genomic integration, delivers CRISPR/Cas9 for efficient gene editing. *Mol Ther Methods Clin Dev* **3**, p16057
29. **Kinoh H, Inoue M** (2008). New cancer therapy using genetically-engineered oncolytic Sendai virus vector. *Front Biosci* **13**:2327–34.
30. **Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S-I** (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(34):14234–9.
31. **Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, Isomi M, Yamakawa H, Sadahiro T, Muraoka N, Kojima H, Haginiwa S, Kurotsu S, Tani H, Wang L, Qian L, Inoue M, Ide Y, Kurokawa J, Yamamoto T, Seki T, Aeba R, Yamagishi H, Fukuda K, Ieda M** (2018). Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell* **22**(1):91-103.e5.
32. **Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, Neubert WJ** (2003). Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J Gene Med* **5**(7).
33. **Nakanishi M, Otsu M** (2012). Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr Gene Ther* **12**(5):410–6.
34. **Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Shirakura M, Tokusumi T, Hirata T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M** (2003). A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *J Virol* **77**(11):6419–29.
35. **Mottet-Osman G, Iseni F, Pelet T, Wiznerowicz M, Garcin D, Roux L** (2007). Suppression of the Sendai virus M protein through a novel short interfering RNA approach inhibits viral particle production but does not affect viral RNA synthesis. *J Virol* **81**(6):2861–8.
36. **Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M** (2000). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol* **74**(14):6564–9.
37. **Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Tokusumi T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M** (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**(5):3238–46.
38. **Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M** (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 Phys Biol Sci* **85**(8):348–62.
39. **Stricker R, Roux L** (1991). The major glycoprotein of Sendai virus is dispensable for efficient virus particle budding. *J Gen Virol* **72** (Pt 7):1703–7.
40. **Bernloehr C, Bossow S, Ungerechts G, Armeanu S, Neubert WJ, Lauer UM, Bitzer M** (2004). Efficient propagation of single gene deleted recombinant Sendai virus vectors. *Virus Res* **99**(2).
41. **Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Shirakura M, Kanaya T, Yoshizaki M, Hironaka T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M** (2004). Recombinant Sendai virus vectors deleted in both the matrix and the fusion genes: efficient gene transfer with preferable properties. *J Gene Med* **6**(10):1069–81.
42. **Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M** (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* **286**(6):4760–71.
43. **Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, Ban H, Tokusumi Y, Iida A, Nagai Y, Hasegawa M, Inoue M** (2006). Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes: reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J Gene Med* **8**(9):1151–9.
44. **Abe T, Masuda S, Ban H, Hayashi S, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y** (2011). Ex vivo expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation. *Exp Hematol* **39**(1).
45. **Iida A, Inoue M** (2013). Concept and Technology Underlying Sendai Virus (SeV) Vector Development . p. 69–89. *In* Nagai Y (ed), Sendai Virus Vector. Advantages and Applications. Springer Japan, Tokyo, s.l..
46. **Ban H, Inoue M, Griesenbach U, Munkonge F, Chan M, Iida A, Alton EFWF, Hasegawa M** (2007). Expression and maturation of Sendai virus vector-derived CFTR protein: functional and biochemical evidence using a GFP-CFTR fusion protein. *Gene Ther* **14**(24):1688–94.

47. **Leyrer S, Neubert WJ, Sedlmeier R** (1998). Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol Methods* **75**(1):47–58.
48. **Takahashi K, Yamanaka S** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4):663–76.
49. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**(5):861–72.
50. **Yamanaka S** (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1**(1).
51. **Mochiduki Y, Okita K** (2012). Methods for iPSC cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J* **7**(6).
52. **Haridhasapavalan KK, Borgohain MP, Dey C, Saha B, Narayan G, Kumar S, Thummer RP** (2019). An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene* **686**:146–59.
53. **Malik N, Rao MS** (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol* **997**:23–33.