

# Zusammenfassung des iGEM Projektes 2010 der Albert-Ludwigs Universität Freiburg

Das iGEM Team Freiburg beabsichtigt, sich im Sommer 2010 mit der Entwicklung eines Systems zu befassen, das auf dem Adeno-assoziierten Virus (AAV) vom Serotyp 2 (AAV-2) basiert, seine Handhabbarkeit verbessert und schlussendlich anderen interessierten Anwendern im biomedizinischen Bereich kostenfrei zur Verfügung gestellt werden soll.

Das AAV-2 ist ein nichtpathogenes Virus das bisher mit keiner humanen Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte und zur Familie der Parvoviridae bzw. zum Genus der Dependoviren zugeordnet wird. Eine gute Übersicht über das Gebiet der Vektorentwicklung basierend auf dem AAV-2 ist verfügbar in Büning *et al.* (2003).

Genauer sieht das Projekt vor, folgende Modifikationen in dem System zu verwirklichen und zu testen:

## Vektorplasmid

Vektorplasmid bezeichnet dasjenige der Plasmide, das später in dem Viruspartikel verpackt wird.

Als Grundlage wurde das Vektorplasmid pAAV-MCS des „AAV Helper-Free“ Systems von Stratagene (Santa Clara, Kalifornien, USA) verwendet. Die Bestandteile des Plasmids werden in die einzelnen Funktionseinheiten zerlegt und später über standardisierte Klonierstrategien wieder assembliert und getestet.

Der Ansatz, biologische Systeme in so genannte Biobricks zu überführen, ist näher beschrieben unter: [http://partsregistry.org/Help:BioBrick\\_Assembly](http://partsregistry.org/Help:BioBrick_Assembly)

Aus dem pAAV-MCS (GenBank: AF396260.1) sollen folgende Biobricks erstellt werden:

- Inverted terminal repeat Elemente (ITR)
  - Linkes ITR
  - Rechtes ITR
- Cytomegalovirus promoter (CMV)
- Beta-Globin Intron
- Poly-A-Sequenz (hGH)

Zusätzlich ist geplant, den CMV Promoter durch den tumorspezifischen Promoter **phTERT** (humaner Telomerase Reverse Transkriptase Promoter) zu ersetzen, der in Kyo *et al.* (2008) beschrieben ist. Ein solcher Promoter würde in einem Therapieansatz dazu führen, dass unerwünscht transduzierte, gesunde Zellen (Off-Targets) keine Expression des therapeutischen Gens zeigen. Durch die Verwendung wird die Spezifität und Sicherheit der Behandlung mit viralen Vektoren erhöht.

Ein Therapieansatz in der Tumorthherapie ist die Verabreichung sogenannter Wirkstoffvorstufen (**Prodrugs**). Die transduzierten Zellen werden durch die enzymatische Umwandlung der harmlosen Prodrug in eine toxische Substanz zerstört.

Dieser Ansatz soll ebenfalls in das Vektor-System integriert werden. Dazu sollen folgende therapeutische Gene in das Vektorplasmid kloniert werden:

- Thymidinkinase-Mutanten
  - **TK30** beschrieben durch Kokoris *et al.* (1999)
  - **SR39** beschrieben durch Kokoris & Black (2002)
- Fusionsprotein aus Thymidinkinase und Guanylatkinase beschrieben durch Ardiani *et al.* (2010)
- **Cytosin Deaminase** beschrieben durch Danielsen *et al.* (1992)

Die Verabreichung von Ganciclovir (Cymeven) wird durch die Thymidinkinase oder dem Fusionskonstrukt aus Thymidinkinase und Guanylatkinase zu dem toxischen Ganciclovir-Triphosphat umgewandelt und führt zum Zelltod der transduzierten Zellen.

### Targeting:

Der erste Ansatz besteht aus der N-terminalen Fusion von Peptiden an eines der drei viralen Hüllproteine des Viruspartikels mit und ohne der Verwendung eines Linkers. Die folgenden drei Moleküle sollen an den N-Terminus fusioniert werden:

1. **His-Tag** soll verwendet werden um zu klären, ob der N-Terminus überhaupt durch die viralen Poren des Kapsid der Viruspartikel herausgelangt.
2. **Darpin** (E\_01) gegen den EGF-Rezeptor beschrieben in Steiner *et al.* (2008).
3. **Affibody** ( $Z_{EGFR:1907}$ ) ebenfalls gegen EGFR beschrieben durch Friedmann *et al.* (2008).

Der zweite Ansatz beruht auf der Integration funktionaler Motive in oberflächenexponierte Loopstrukturen des Kapsids. Dabei werden die beiden am besten untersuchten Aminosäurepositionen 453 (Zählung beginnt bei der Aminosäuresequenz von VP1) und 587 der Kapsidproteine verwendet. Diese werden unter anderem in Boucas *et al.* (2009) und Shi *et al.* (2001) beschrieben. Bei diesem Ansatz sollen bereits beschriebene und gut charakterisierte Motive mit und ohne Spacer in die kodierende Sequenz der Kapsidloops insertiert werden. Als Spacer kommt an der 453-Stelle die Aminosäure Alanin vor und nach dem zu insertierenden Motiv zum Einsatz. Für die 587-Stelle dienen die Aminosäuren Threonin und Glycin vor dem Motiv, sowie die Aminosäuren Glycin, Lysin und Serin nach dem Motiv als Spacer (siehe dazu Anhang 4).

Zusätzlich zu den Insertionen an den beiden oben genannten Stellen sollen zwei Punktmutationen an den Positionen R585A und R588A getestet werden. Die Mutationen der beiden Aminosäuren schaltet, wie in Wu *et al.* (2000) beschrieben,

den natürlichen Tropismus des Viruspartikels für seinen Primärrezeptor Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) aus. Die drastische Reduktion des natürlichen Tropismus des Adeno-assoziierten-Viruspartikel ist für eine Vielzahl von möglichen Tumortherapien wichtig, da HSPG ein weit verbreiteter Oberflächenrezeptor ist und somit eine zellspezifische Transduktion durch den viralen Vektor unmöglich machen würde.

Im Einzelnen sollen folgende Motive in das System integriert und getestet werden:

- **BAP-Motiv**

**DNA-Sequenz:**

5' – GGCCTGAACGATATTTTTGAAGCGCAGAAAATTGAATGGCATGAA – 3'

**Aminosäure-Sequenz:**

- GLNDIFEAQKIEWHE -

Dieses Motiv wurde in Chen *et al.* (2005) beschrieben und ermöglicht ein Protein spezifisch mit Biotin zu versehen. Daran können dann über die Bindung von Streptavidin gewünschte Moleküle gekoppelt werden. Dieser Ansatz wurde schon erfolgreich am AAV-2 durch Stachler *et al.* (2008) getestet.

- **RGD-Motiv**

**DNA-Sequenz:**

5' – TGCGATTGCCGTGGCGATTGCTTTTGC – 3'

**Aminosäure-Sequenz:**

- CDCRGDCFC -

Das zyklische RGD Motiv wurde in Pasqualini *et al.* (1997) beschrieben und bindet an Integrinrezeptoren. In Kombination mit dem HSPG Knockout kann der Tropismus des Vektors auf Integrine umgewandelt werden. Dies wurde bereits an AAV-2 von Shi & Bartlett (2003) verwirklicht.

- **(His)6-Tag**

**DNA-Sequenz:**

5' – CATCATCATCATCATCAT – 3'

**Aminosäure-Sequenz:**

- HHHHHH -

Dieses Motiv gehört zu den meist genutzten Tags in der Proteinbiochemie. Aufgrund der Affinität von Poly-Histidinen zu zweiwertigen Ionen, können Proteine mit His-Tag über immobilisierte Affinitätschromatografie-Säulen aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde der His-Tag auch schon in das Kapsid des AAV-2 integriert. Weitere Informationen unter Koerber *et al.* (2007).

- **Z34C-Motiv**

**DNA-Sequenz:**

5' - TTTAACATGCAGTGCCAGCGTCGTTTTTATGAAGCGCTGCATGATCCGAACCTG  
AACGAAGAACAGCGTAACGCGAAAATTAAGCATTTCGTGATGATTGC - 3'

**Aminosäure-Sequenz:**

- FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC -

Dieses Motiv wurde in Starovasnik *et al.* (1997) erstmals beschrieben und ist eine auf wenig Aminosäuren reduzierte Version der Bindedomäne des aus *Staphylococcus aureus* stammenden Protein As. Diese bindet hochaffin an den Fc-Teil von IgG Antikörpern bindet. Die Insertion wurde bereits erfolgreich in den AAV-2 integriert durch Ried *et al.* (2002).

Die exakten Kombinationen an Insertionen und ihren Sequenzen können Anhang 4 entnommen werden.

Durch Insertion von verschiedenen Motiven in die beiden Loops oder die Kombination von Loop-Insertion und N-terminaler Fusion, lassen sich auch mehrfach modifizierte Vektoren produzieren. Beispielsweise ist es sinnvoll einen Vektor zu produzieren, der an Position 453 einen His-Tag zur Aufreinigung trägt und an Position 587 das Z34C Motiv zur gezielten Veränderung des Tropismus.

Um optimale Transduktions- und Assemblierungsraten zu garantieren, werden Zellen, sowohl mit Plasmiden mit unveränderten Kapsidproteinen als auch mit Plasmiden mit modifizierten Kapsiden, transfeziert. Man erhält die sogenannten Mosaik Virenpartikel, die nicht in allen Kapsid-Untereinheiten die Modifikation tragen. Dies ist wünschenswert um den optimalen Kompromiss, zwischen der destabilisierenden Wirkung des modifizierten Kapsidproteins auf den gesamten Vektor und der Verbesserung der Eigenschaften des Vektors durch die Modifizierung, zu finden. Wie ein solcher Ansatz aussehen kann und welche Wichtigkeit ihm zugemessen werden sollte, ist in Stachler *et al.* (2008) und Gigout *et al.* (2005) beschrieben.

## Literatur:

**Ardiani et al.** (2010). Fusion enzymes containing HSV-1 thymidine kinase mutants and guanylate kinase enhance prodrug sensitivity in vitro and in vivo.

**Büning et al.** (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors.

**Boucas et al.** (2009). Engineering adeno-associated virus serotype 2-based targeting vectors using a new insertion site-position 453-and single point mutations.

**Chen et al.** (2005). Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase.

**Danielsen et al.** (1992) Characterization of the Escherichia coli codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase.

**Gigout et al.** (2005). Altering AAV Tropism with Mosaic Viral Capsids

**Koerber et al.** (2007). Engineering adeno-associated virus for one-step purification via immobilized metal affinity chromatography.

**Kokoris et al.** (1999). Enhancement of tumor ablation by a selected HSV-1 thymidine kinase mutant.

**Kokoris & Black** (2002). Characterization of Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity.

**Kyo et al.** (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers.

**Pasqualini et al.** (1997).  $\alpha_v$  integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands.

**Ried et al.** (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors.

**Shi et al.** (2001). Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors.

**Shi & Bartlett** (2003). RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism.

**Stachler et al.** (2008). Site-specific modification of AAV vector particles with biophysical probes and targeting ligands using biotin ligase.

**Starovasnik et al.** (1997). Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain.

**Steiner et al.** (2008) Efficient Selection of DARPinS with Sub-nanomolar Affinities using SRP Phage Display.

**Wu et al.** (2000). Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Construction of AAV2 Vectors with Altered Tropism.

## Anhang 1:

Az. 6790-10-73 Oktober 2001

### **Stellungnahme der ZKBS**

#### **zur Risikobewertung humaner Adeno-assoziiierter Viren**

Adeno-assoziierte Viren (AAV) lassen sich sowohl aus Säugetieren als auch aus Vögeln isolieren. Sie gehören als Untergruppe der defekten Viren (Dependoviren) zur Familie der Parvoviren und enthalten als Genom einzelsträngige DNA beider Polaritäten. Sie benötigen für eine produktive (lytische) Infektion Helferfunktionen, die von Helferviren (Adenovirus, Herpes simplex Virus Typ I und Typ II, Cytomegalovirus oder humanes Herpesvirus-6) zur Verfügung gestellt werden. In Abwesenheit dieser Helferfunktionen in den Zielzellen wird eine Zelle zwar von AAV infiziert, ruht aber als spezifisch integriertes Genom in dieser Zelle (latente Infektion). Die Integration zeigt keinen Effekt auf Zell- Wachstum oder Morphologie. Das latente Virus ist durch Überinfektion mit Adenoviren oder Herpesviren wieder mobilisierbar (1, 2).

AAV kommen bei Tieren und Menschen weit verbreitet vor. Obwohl 80 – 90 % der Erwachsenen seropositiv für humane AAV der Serotypen 2, 3, und 5 sind, wurden keine durch diese Infektionen hervorgerufenen Krankheiten festgestellt. Auch bei Tieren sind durch AAV verursachte Erkrankungen nicht bekannt. AAV-1 und AAV-4 werden als Affen-Viren betrachtet, da sie aus Affen isoliert wurden.

Sie sind in der Lage humane Zellen *in vitro* zu infizieren, aber sie wurden weder bislang beim Menschen isoliert noch werden beim Menschen Antikörper spezifisch gegen diese Serotypen gefunden. Das natürliche Vorkommen von AAV-6 ist unklar. Es wurde als Kontamination eines Laborbestands von Adenoviren isoliert und könnte durch Rekombination zwischen AAV-1 und AAV-2 entstanden sein (3).

Parvoviren mit Ausnahme der speziell genannten Spezies werden gemäß § 5 Absatz 2 in Verbindung mit Anhang I Teil B Nr. 1 GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Zu den speziell genannten Parvoviren zählen die humanen Adeno-assoziierten Viren AAV-2, -3 und -5, die der **Risikogruppe 1** zugeordnet werden. Diese Risikobewertung wird in der gemäß § 5 Absatz 6 GenTSV vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlichten Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten aufgeführt.

AAV-2, -3, und -5 kommen weit verbreitet vor, eine durch diese Infektion hervorgerufene Erkrankung ist nicht bekannt. Durch AAV-1 -4 und -6 hervorgerufene Erkrankungen sind bislang auch nicht bekannt, da aber natürliche Infektionen beim Menschen nicht vorkommen, kann bei diesen Serotypen nicht gesichert von einer Apathogenität ausgegangen werden. Die ZKBS empfiehlt daher gemäß § 5 Absatz 2 in Verbindung mit Anhang I Teil B Nr. 1 GenTSV folgende Einstufung: **AAV-2, AAV-3, und AAV-5: Risikogruppe 1**

**AAV-1, AAV-4 und AAV-6: Risikogruppe 2**

### Literatur:

1. **Grimm, D. (2000).** Adeno-associated (AAV) serotypes as vectors for human gene therapy. Res. Adv. in Virology, 1: p. 91 – 114.
2. **Berns, K.I., and Giraud, C. (1996).** Biology of Adeno-associated virus. Current. Top. Microbiol. Immunol. 218: p. 1 – 23.
3. **Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. (1999).** Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J. Virol. 73: p.3994-4003

## Anhang 2:

Az. 6790-10-83 Dezember 2004

### **Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Vektoren mit Zellzyklus-regulierenden Genen**

Die ZKBS empfiehlt, gentechnische Arbeiten mit rekombinanten adenoviralen oder AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Vektoren, die durch das übertragene Gen transformierendes Potenzial aufweisen können, der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen **und besondere Maßnahmen zum Personenschutz** einzuhalten. Um den beabsichtigten Personenschutz bei diesen Arbeiten zu erreichen, sind folgende Sicherheitsmaßnahmen zusätzlich zu den Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 einzuhalten:

Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen können, sind in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchzuführen, Gefäße und Geräte, die aus der Sicherheitswerkbank entfernt werden, sind zuvor von außen zu desinfizieren, die Vektoren müssen in dicht verschlossenen, bruch sicheren und außen desinfizierten Behältern transportiert werden, die Belüftung von Zellkulturflaschen, in denen die Vektoren vorliegen, erfolgt erst im CO<sub>2</sub>-Brutschrank, um das Austreten von Kulturflüssigkeit zu vermeiden, das Laboratorium sowie die Sicherheitswerkbank, in denen die Arbeiten durchgeführt werden, sind entsprechend zu kennzeichnen, Zutritt zum Labor hat außer unmittelbar an den Arbeiten beteiligten Personen nur ausreichend unterrichtetes Personal.

Während der Arbeiten sind Schutzhandschuhe zu tragen, die Schutzhandschuhe sind regelmäßig zu desinfizieren oder zu wechseln, bei den Arbeiten ist eine Atemschutzmaske mit FFP3-Filter zu tragen. Alternativ können gentechnische Arbeiten mit den o.g. Vektoren unter folgenden Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt werden:

Gentechnische Arbeiten mit den Vektoren, bei denen Aerosole entstehen können, sind in einer Sicherheitswerkbank Klasse III durchzuführen, die Vektoren müssen in dicht verschlossenen, bruch sicheren und außen desinfizierten Behältern eingeschlossen sein. Das Öffnen, Verschließen und Desinfizieren hat in der Werkbank Klasse III zu erfolgen.

Diese Empfehlung gilt für solche Gene, die unter Kontrolle eines eukaryoten Promotors stehen.

Das transformierende Potenzial eines zellulären oder viralen Gens wird belegt durch den Nachweis, dass

das Gen von Tumorigenen für das onkogene Potenzial des Virus verantwortlich ist,

das Gen maßgeblich an der Entstehung humaner Tumore beteiligt ist,

das Gen *in vitro* Säugierzellen transformiert,

das Gen im Tierversuch Tumore erzeugt.

Um diese Information zu erhalten, sollen folgende Datenbanken ausgewertet werden:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi>

<http://caroll.vjf.cnrs.fr/cancergene/RETR11.html>

<http://condor.bcm.tmc.edu/ermb/tgdb/tgdb.html>



## Anhang 3:

Az. 6790-10-73 Dezember 2005

### **Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung humaner Adeno-assoziiierter Viren und AAV-abgeleiteter Vektoren**

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind bei Tieren und Menschen weit verbreitet. Sie gehören als Untergruppe der defekten Viren (Dependoviren) zur Familie der Parvoviren. Das einzelsträngige DNA-Genom besteht aus den zwei offenen Leserahmen *rep* und *cap*. Die durch *rep* kodierten vier Nichtstrukturproteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 sind wichtig für die Replikation des Virus und Integration in das Genom der Wirtszelle. Die drei Kapsidproteine Vp1, Vp2 und Vp3 werden durch *cap* kodiert und bilden das ikosaedrische Nukleokapsid. Je ein „inverted terminal repeat“ (ITR) begrenzt das Genom am 5´- und am 3´-Ende. Die ITR enthalten die *cis*-aktiven Elemente für die Replikation des Virusgenoms, das Verpackungssignal und die Integration des Virus ins Wirtsgenom. Für eine produktive (lytische) Infektion benötigen die AAV Helferfunktionen, die von Helferviren (Adenovirus, Herpes simplex Virus Typ I und Typ II, Cytomegalovirus oder humanes Herpesvirus-6) zur Verfügung gestellt werden. In Abwesenheit der Helferfunktionen in den Zielzellen wird eine Zelle zwar von AAV infiziert, allerdings ruht das übertragene AAV-Genom nach spezifischer Integration im Wirtsgenom (latente Infektion). Das latente Virus ist durch Überinfektion mit Adenoviren oder Herpesviren wieder mobilisierbar (1, 2).

Die bekannten Serotypen 2, 3, und 5 wurden als humane AAV von der ZKBS in die Risikogruppe 1 eingestuft (3). Die aus Affen isolierten Serotypen 1, 4 und 6 wurden in die Risikogruppe 2 eingestuft, weil ihre Apathogenität nicht nachgewiesen ist.

Kürzlich wurde AAV-9 über PCR aus humanem Gewebe isoliert und mit Hilfe von serologischen Kreuzexperimenten als neuer Serotyp beschrieben (4). Ebenfalls als neue Serotypen identifiziert wurden AAV-7, AAV-8, AAV-10 und AAV-11, die aus Affen isoliert wurden (5, 6). Sie sind in der Lage humane Zellen *in vitro* zu infizieren, bislang aber wurden sie beim Menschen nicht isoliert.

#### Risikobewertung:

Die Risikoanalyse für die zuvor bewerteten AAV hat sich durch neue wissenschaftliche Daten nicht verändert, weshalb die bisherige Einstufung beibehalten wird. Über die Verbreitung von AAV-9 und seine mögliche Assoziation mit Krankheitssymptomen ist bisher nichts bekannt. Obgleich natürliche Infektionen durch AAV-7, -8, -10 und -11 beim Menschen nicht nachgewiesen sind, kann bei diesen aus Affen isolierten Serotypen nicht gesichert von einer Apathogenität ausgegangen werden. Die ZKBS empfiehlt daher gemäß § 5 Abs. 1 in Verbindung mit Anhang I GenTSV folgende Einstufung:

**AAV-2, AAV-3, und AAV-5: Risikogruppe 1**

**AAV-1, AAV-4, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 und AAV-11: Risikogruppe 2**

#### AAV-abgeleitete Vektorsysteme:

Ein herkömmliches AAV-Vektorsystem besteht aus zwei, meistens von pBR322-abgeleiteten Plasmiden und einem Helfervirus. Das Vektorplasmid trägt von AAV nur die ITR´s, die stromaufwärts und -abwärts der zu übertragenden Nukleinsäure liegen. Auf dem Helferplasmid liegen aus AAV nur die Nukleotidsequenzen der Leserahmen *rep* und *cap* vor. Eine Überlappung von homologen AAV-Nukleotidsequenzen zwischen Vektorplasmid und Helferplasmid ist nicht beschrieben, somit ist eine homologe Rekombination zwischen AAV- 2 - Nukleotidsequenzen der Plasmide nicht zu erwarten.

Zur Produktion von rekombinanten, AAV-abgeleiteten Vektorpartikeln werden Wirtszellen, neben der Kotransfektion mit Vektor- und Helferplasmid, mit einem Helfervirus überinfiziert, da dieser die essentiellen viralen Helferfunktionen zur Vermehrung von AAV kodiert.

Bei weiterentwickelten AAV-Vektorsystemen werden die viralen Helferfunktionen unabhängig vom Helfervirus bereitgestellt, sodass eine Koinfektion mit einem replikationskompetenten Helfervirus nicht mehr notwendig ist. Von den als Helferviren genutzten Adenoviren sind die Proteine E1a, E1b, E2a, E4 und VA notwendig für die Produktion von AAV-Partikeln (7). Durch die Verwendung der HEK293-Zelllinie als Wirtszelle, die die adenoviralen E1-Proteine zur Verfügung stellt, brauchen auf dem Helferplasmid, neben den *rep*- und *cap*-Nukleotidsequenzen, nur die Gene für die adenoviralen Proteine E2a, E4 und VA vorhanden zu sein (8).

Dadurch wird auch die Produktion von replikationskompetenten Helferviren verhindert.

#### Risikobewertung:

1. Rekombinante, AAV-abgeleitete Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäuresequenzen von AAV und keine Nukleinsäureabschnitte mit Gefährdungspotential enthalten, auch wenn diese pseudotypisiert sind, werden in die **Risikogruppe 1** eingeordnet. Die Einstufung ist davon unabhängig von welchem AAV die verwendeten ITR's stammen.

Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

2. Zellen oder Zelllinien der Risikogruppe 1, die mit den unter Punkt 1 genannten, rekombinanten, AAV-abgeleiteten Vektorpartikeln infiziert werden, werden in die **Risikogruppe 1** eingeordnet. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

Bei Zellen, die Organismen höherer Risikogruppen abgeben, geht das Gefährdungspotential der Organismen voll in die Risikobewertung ein.

#### Begründung:

AAV besitzen einen breiten Wirtsbereich, der den Menschen mit einschließt. In einer klinischen Studie mit AAV2-Vektoren im Menschen ist gezeigt worden, dass die Vektoren nicht in die Keimbahn übertragen werden. Auch sind die Vektorsequenzen nach 48 h in Blut und Urin nicht mehr nachweisbar, weshalb die Verbreitung von infektiösen AAV-Vektorpartikeln eingeschränkt ist (9). Innerhalb der Wirtszelle liegt die Vektor-DNA extrachromosomal vor und kann durch das Fehlen der Rep-Proteine nur noch in Einzelfällen in das Genom integrieren. Die Vektoren sind replikationsdefekt und außer den AAV-ITR liegen keine weiteren Gene von AAV oder den Helferviren in den Vektoren vor. Zudem entsprechen die unter Punkt 2 beschriebenen Vektor- Empfänger-Systeme biologischen Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 6 Abs. 4 und 5 GenTSV.

#### Hinweis:

1. Bei Kontaminationen der unter Punkt 1 beschriebenen, rekombinanten, AAV-abgeleiteten Vektorpopulationen mit Helferviren, geht das Gefährdungspotential dieser Viren vollständig in die Risikobewertung ein.

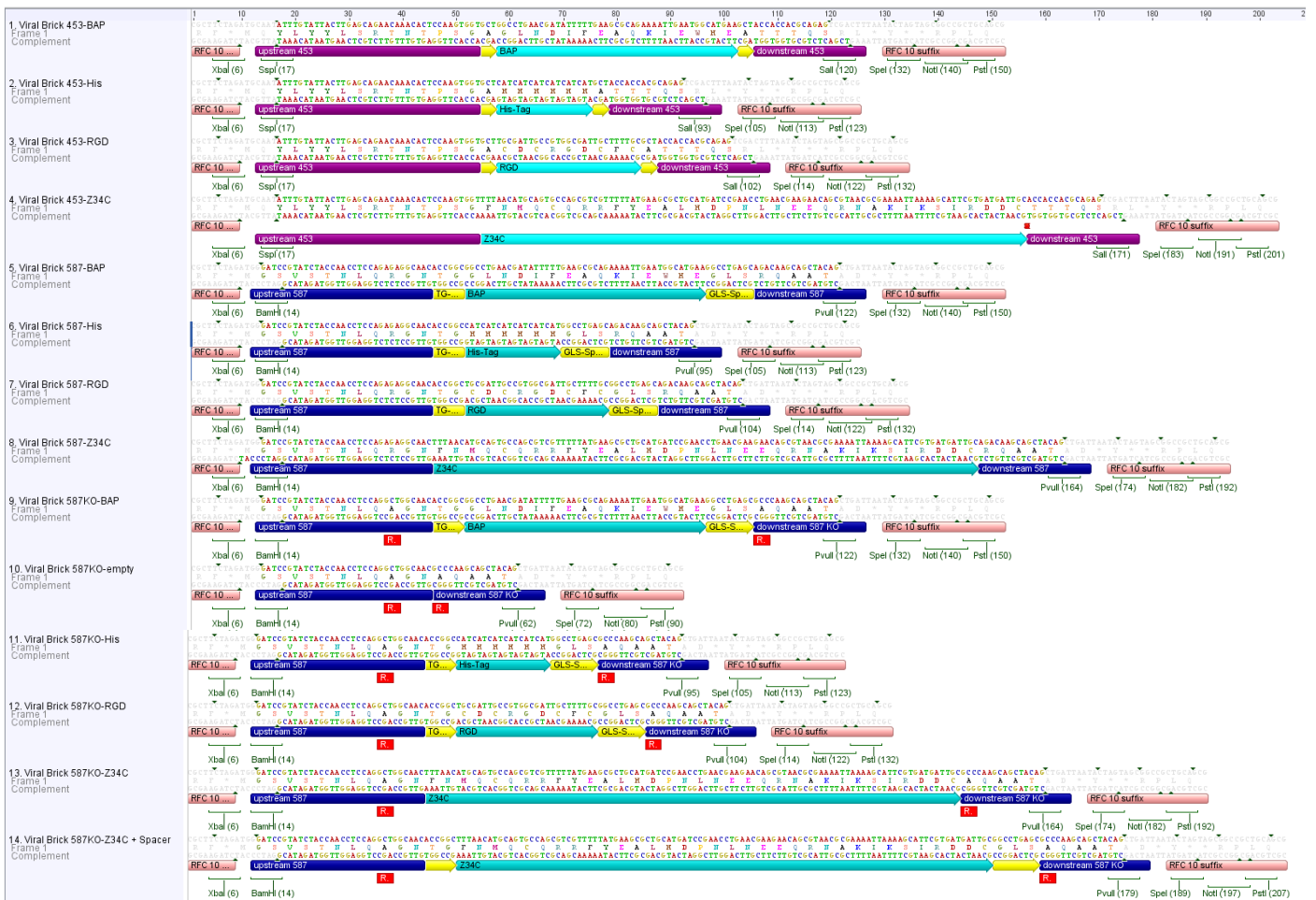
2. Besteht die Möglichkeit, dass durch überlappende AAV-Nukleinsäuresequenzen auf dem Vektor- und Helferplasmid vollständige, ggf. chimäre AAV entstehen oder werden solche

AAV gezielt erzeugt, sind die AAV, von denen die Nukleotidsequenzen für die Rep-Proteine stammen, maßgeblich für die Risikobewertung.

## Literatur:

1. **Grimm, D. (2000).** Adeno-associated (AAV) serotypes as vectors for human gene therapy. *Res. Adv. in Virology*, 1: p. 91 – 114.
2. **Berns, K.I., and Giraud, C. (1996).** Biology of Adeno-associated virus. *Current. Top. Microbiol. Immunol.* 218: p. 1 – 23.
3. **Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit. (2002).** Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung humaner Adeno-assoziiierter Viren. *Bundesgesundheitsblatt*, 45: p 58
4. **Gao G., Vandenberghe L.H., Alvira M.R., Lu, Y., Calcedo R., Zhou X., Wilson, J.M. (2004).** Clades of Adeno-associated virus are widely disseminated in human tissues. *J. Virol.* 78: p. 6381 – 6388
5. **Gao G., Alvira M.R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., and Wilson J.M. (2002).** Novel Adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *PNAS*, 99: p. 11854 – 11859
6. **Mori S., Wang L., Takeuchi T., Kanda, T. (2004).** Two novel Adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virol.* 330: p. 375 – 383
7. **Matsushita T., Elliger S., Elliger C., Podsakoff G., Villarreal L., Kurtzman G.J., Iwaki Y., Colosi P. (1998).** Adenoassociated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* 5: p. 938 - 945
8. **Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt JA. (2003).** Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of Adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther.*, 7: p. 839-850
9. **Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni M.V., Larson P.J., Couto L.B., McClelland A., Glader B., Chew A.J., Shing J.T., Herzog R.W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Skarsgard E., Flake A.W., High K.A. (2000).** Evidence for gene transfer and expression of a factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature genetics*, 24:257 - 261

# Anhang 4:



**Abbildung 1:** Zusammenfassung der geplanten Loop Insertionen, wobei Motive in Türkis, Spacer in Gelb und HSPG Knock-out Mutationen in Rot dargestellt sind. In Violett bzw. Dunkelblau sind die viralen Gensequenzen der Loop-Regionen gezeigt.