



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-

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. *Virology*. 330: p. 375 – 383
7. **Matsushita T., Elliger S., Elliger C., Podsakoff G., Villarreal L., Kurtzman G.J., Iwaki Y., Colosi P. (1998).** Adeno-associated 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