

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

**Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5**

**1. Beschreibung des adenoviralen Systems**

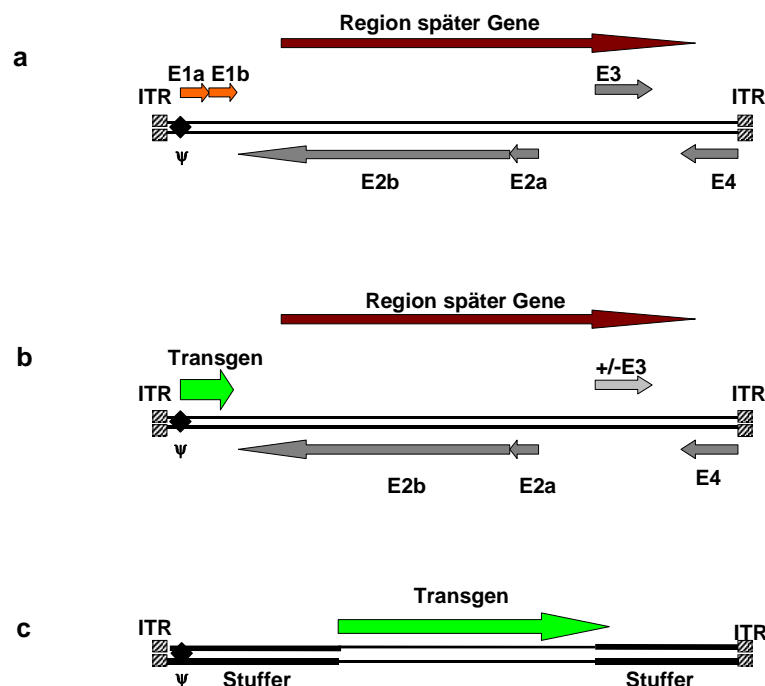
**1.1. Allgemeine Einführung**

Humane Adenoviren kommen weit verbreitet vor. Bisher wurden ca. 50 unterschiedliche Serotypen klassifiziert. In der Regel haben Kinder nach dem ersten Lebensjahr bereits Antikörper gegen mindestens einen Serotyp, nach dem 15. Lebensjahr weisen die meisten Personen bereits gegen mehrere unterschiedliche Adeno-Serotypen Antikörper auf. Adenovirus Typ 5 (Ad5) und andere Serotypen (z.B. 1, 2 oder 6) können in lymphoidem Gewebe über längere Zeit persistieren. Das Vorkommen solcher Infektionen ist die Ursache für den bei den meisten Personen vorhandenen sehr hohen Antikörpertiter gegen diese Serotypen. Erkrankungen des Menschen, die durch Adenoviren hervorgerufen werden können, sind neben selteneren Krankheitsbildern wie der epidemischen Keratokonjunktivitis (meistens hervorgerufen durch Adenovirus Typ 8) Infektionen des Respirationstraktes (1, 2).

Humane Zellen sind normalerweise permissiv für Adenoviren, ihre Infektion verläuft produktiv, Nagerzellen sind entweder nicht permissiv oder für manche humane Adenoviren semipermissiv (1, 2, 3, 4, 5). Für neugeborene Nagetiere können bestimmte Adenoviren onkogen sein. Entsprechend der Onkogenität für Nagetiere werden die Adenoviren in drei Untergruppen aufgeteilt. Die "stark" onkogenen Adenoviren (z.B. Typ 12) induzieren nach kurzer Latenzperiode Tumorwachstum in Tieren und werden in die Onkogenitätssubgruppe A eingestuft. Zur Subgruppe B zählen "schwach" onkogene Adenoviren (z.B. Typ 7), die bei nur wenigen der infizierten Tiere nach einer langen Latenzperiode Tumorwachstum hervorrufen können. Adenoviren wie Ad5, bei denen kein onkogenes Potenzial festgestellt wurde, gehören zur Subgruppe C. Obwohl Ad5 nicht onkogen für Tiere ist, können Ratten- und Hamsterzellen *in vitro* durch Ad5 transformiert werden. In Tumorzellen oder transformierten Zellen liegen die viralen Genome - entweder als vollständiges Genom oder teilweise deletiert - im Wirtsgenom integriert vor (1, 2).

Adenoviren enthalten eine doppelsträngige lineare DNA als Genom mit einer Länge von 32 – 36 kb. Abbildung 1a zeigt schematisch das virale Genom und seine Transkriptionskarte. An den Enden der DNA liegen inverse terminale Repetitionen (ITR) mit den Polymerase-Bindungssequenzen für den Start der DNA-Replikation, gefolgt vom DNA-Verpackungssignal  $\Psi$ . Die "frühen" Ereignisse des produktiven Infektionszyklus beginnen mit der Transkription des E1a-Gens, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1b, E2, E3 und E4 wirkt und eine Expressionskaskade der frühen Gene einleitet. Der frühen Transkription folgt die DNA-Replikation, mit der die "späte" Phase des produktiven Infektionszyklus einsetzt, in welcher die "späten" Gene, die in der Hauptsache für Strukturproteine des ikosaedrischen Virions kodieren, exprimiert werden und in der Virionen entstehen. Der produktive Zyklus führt zur Lyse der infizierten Wirtszelle (1, 2).

Die E1a- und E1b-Gene sind nicht nur für die produktive Infektion humaner Zellen essentiell, sie sind auch an der Transformation beteiligt. Ihre Gen-Produkte kooperieren mit den Protoonkogenen *ras* und *myc* und binden die Tumorsuppressorproteine pRb und p53 (1, 2). Die E2-Region ist ebenfalls in zwei separate Transkriptionseinheiten unterteilt. E2a kodiert für ein Protein, welches an einzelsträngige DNA bindet (DBP) und für die DNA-Replikation benötigt wird. E2b kodiert für einen Vorläufer des terminalen kovalent gebundenen Proteins sowie für eine DNA Polymerase (1, 2). Die E3-Region ist an der Modulation der Infektionsabwehr durch den Wirt beteiligt. Sie ist für die Replikation nicht essentiell, sie kodiert für ein Protein, welches den MHC-Transport an die Plasmamembran blockiert, und für ein Protein, welches die Lyse Adenovirus-infizierter Zellen durch den Tumornekrosefaktor TNF inhibiert (1, 2). Die E4-Region ist an der Anschaltung der späten Funktionen beteiligt (6). Die Deletion der E4-Region führt zu einem Defekt in der späten Proteinsynthese.



**Abb. 1 Genomkarte von Adenoviren und davon abgeleiteter Vektoren**

- Genomkarte humaner Adenoviren. Die frühen Transkriptionseinheiten E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4 und die Region der späten Gene sind in Transkriptionsrichtung dargestellt, die inversen terminalen Repetitionen (ITR) und das Verpackungssignal  $\psi$  sind gekennzeichnet.
- Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren der ersten Generation. Die E1-Region ist deletiert und ersetzt durch ein heterologes Gen, das Transgen. Die E3-Region kann zusätzlich deletiert sein.
- Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren. Sämtliche viralen kodierenden Sequenzen sind deletiert (*gutless*-Vektoren) und ersetzt durch ein Transgen sowie durch funktionslose Füllsequenzen (*stuffer*).

Abbildung modifiziert nach (7).

## 1.2. Gentransfer mit Hilfe von rekombinantem Adenovirus Typ 5

Die vielseitige Verwendung Adenovirus-abgeleiteter Vektoren gründet sich auf deren günstige Eigenschaften. Sie weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Transduktionseffizienz auf, sie infizieren eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, einschließlich nicht-teilender Zellen, und sie können hochtitrig angezüchtet werden. Diese Vektoren – in der Regel von Ad5 abgeleitet – werden zur Übertragung heterologer Gene nicht nur *in vitro* eingesetzt, sondern sie werden auch als Vakzine oder für den Einsatz in der somatischen Gentherapie entwickelt (8, 9, 10, 11, 12). Das Adenovirion kann bis zu 105% der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken; das bedeutet

bei Ad5 mit einer Genomlänge von ca. 36 kb eine Aufnahmekapazität von ungefähr 1,8 - 2,0 kb fremder DNA (13). Bei der Verwendung von Deletionsmutanten können entsprechend größere DNA-Fragmente in das Ad-Genom eingeführt werden. Je nach Funktion des deletierten Bereichs resultieren replikationsdefekte oder replikationskompetente Ad5-Deletionsmutanten. Für den Gentransfer werden zur Zeit noch überwiegend Ad5-Vektoren verwendet, deren E1-Region deletiert ist, bei manchen dieser Vektoren wird zur Erhöhung der Aufnahmekapazität für fremde DNA noch zusätzlich die E3-Region deletiert („adenovirale Vektoren der ersten Generation“, siehe Abbildung 1b). Die Deletion des E1-Bereichs führt zu replikationsdefekten adenoviralen Vektoren. Das von replikationsdefekten rekombinanten adenoviralen Vektoren auf nicht-komplementierende Zielzellen übertragene defekte virale Genom verweilt normalerweise episomal, wodurch das übertragene Gen (Transgen) lediglich transient exprimiert wird. Es erfolgt keine Produktion neuer viraler Partikel.

### **1.3 Herstellung rekombinanter Adenoviren**

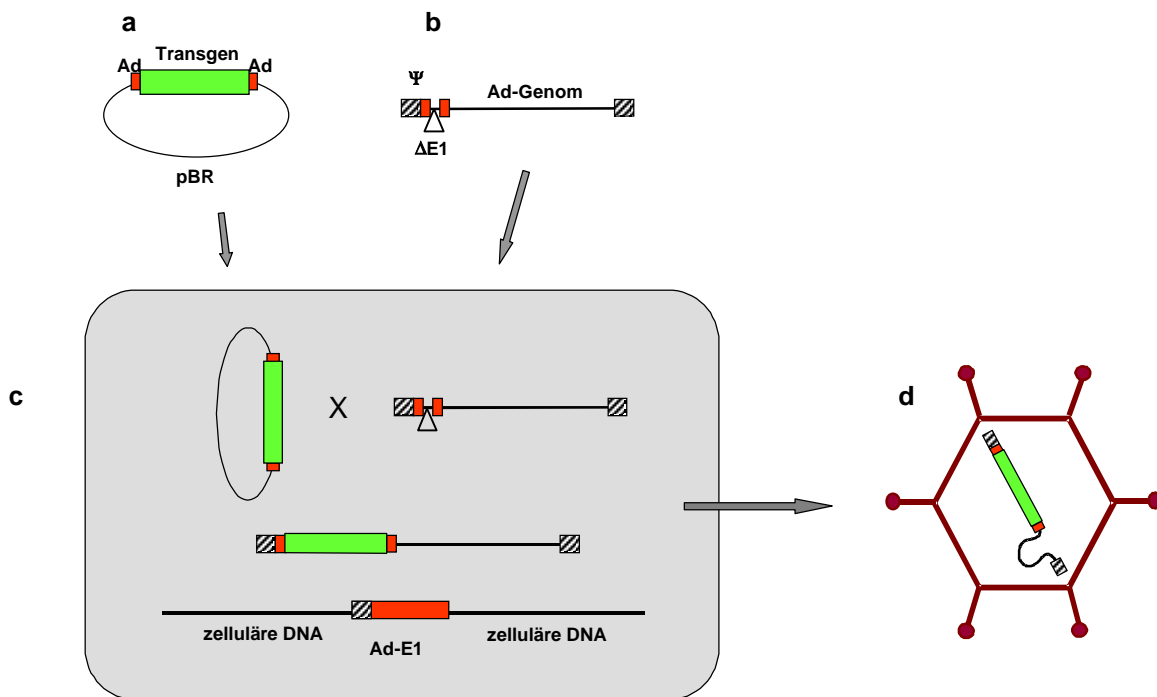
Rekombinante Adenoviren können mit verschiedenen Verfahren hergestellt werden. Der zu übertragende Nukleinsäureabschnitt kann durch direkte Ligation in das Adenovirus-Genom inseriert werden, in der Regel jedoch liegt eine homologe Rekombination zwischen dem zu übertragenden Nukleinsäureabschnitt und dem viralen Genom zugrunde.

#### Homologe Rekombination in einer Helferzelllinie

Sehr häufig wird die homologe Rekombination in einer humanen Zelllinie, die für adenovirale Replikation permissiv ist, herbeigeführt. Hierbei wird entweder ein vollständiges, ein E1-deletiertes oder ein noch zusätzliche Deletionen früherer Gene aufweisendes Ad5-Genom gemeinsam mit einem Rekombinationsplasmid, welches das Transgen - flankiert von Ad5-DNA-Sequenzen – enthält, auf die humane Zelllinie übertragen. Die virale DNA repliziert, und es kommt über die DNA-Sequenzhomologien zur Rekombination zwischen dem Rekombinationsplasmid und dem viralen Genom. Damit wird das Transgen an diejenige Stelle im viralen Genom integriert, welche durch die das Transgen flankierenden DNA-Sequenzen vorgegeben ist. Das rekombinante virale Genom wird von den nach Beginn der DNA-Replikation exprimierten späten viralen Proteinen eingepackt, und als rekombinantes Ad5 (Ad5-abgeleiteter Vektor) von der Zelllinie abgegeben. Das Transgen wird zumeist an die Stelle des im Wildtyp-Genom ursprünglich vorhandenen E1-Gens eingeführt.

Die üblicherweise hergestellten Ad5-abgeleiteten Vektoren enthalten kein E1-Gen und sind somit replikationsdefekt. Für die virale DNA-Replikation werden jedoch die E1-Genprodukte benötigt. Zur Komplementation E1-deletierter Ad5-Genome werden permissive Zelllinien verwendet, in die zuvor das E1-Gen eingeführt wurde, welches dort konstitutiv exprimiert wird (14, 15, 16). Diese Helferzelllinien ermöglichen nicht nur die Herstellung E1-deletierter adenoviraler Vektoren, sie werden auch für die Vermehrung dieser Vektoren benötigt.

Abbildung 2 fasst schematisch und beispielhaft einzelne Schritte zur Herstellung eines rekombinanten replikationsdefekten adenoviralen Vektors zusammen.



**Abb. 2 Herstellung eines replikationsdefekten adenoviralen Vektors in einer Helferzelllinie**

Die Herstellung adenoviraler Vektoren (d) erfolgt in mehreren Teilschritten:

- Das auf das Ad5-Genom (Ad-Genom) des viralen Vektors (b) zu übertragende heterologe Gen (Transgen) wird zunächst in ein pBR-abgeleitetes Rekombinationsplasmid (a) eingeführt und wird dort flankiert von DNA-Sequenzen (Ad), die zu den nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereichen der Ad5-E1-Region homolog sind.
- Im Ad5-Genom sind die kodierenden DNA-Sequenzen der frühen Gene E1a und E1b deletiert ( $\Delta E1$ ), benachbarte nicht-kodierende 5'- und 3'-Bereiche sind noch vorhanden. Das defekte Ad5-Genom kann entweder in einem Viruspartikel oder integriert in einem Plasmid vorliegen.
- Das Rekombinationsplasmid einschließlich des Ad5-DNA-flankierten Transgens (a) wird gemeinsam mit dem defekten Ad5-Genom (b) in eine Helferzelllinie eingeführt. Die Helferzelllinie enthält integriert das linke Ende der Ad5-DNA mit der E1-Region und exprimiert die E1-Genprodukte, wodurch der Replikationsdefekt des ko-transfizierten Ad-Genoms komplementiert wird. Im Verlaufe der viralen DNA-Replikation kommt es über die DNA-Sequenzhomologien der nicht-kodierenden E1-Regionen zur Rekombination zwischen dem Transgen und dem defekten Ad5-Genom. Es entsteht ein rekombinantes replikationsdefektes Ad5-Genom, bei dem anstelle der deletierten E1-Region jetzt das Transgen vorliegt.
- Die im Ad5-Genom noch vorhandenen späten Gene werden exprimiert und sie verpacken die rekombinanten Ad5-Genome zu replikationsdefekten Ad5-Viruspartikeln, die von der Helferzelllinie abgegeben werden.

### Homologe Rekombination in *Escherichia coli*

Bei dieser Methode wird zur Übertragung des Transgens auf das Ad-Genom das effiziente Rekombinationssystem von *E. coli* BJ5183 recBCsbcBC (17), ein K12-Derivat, ausgenutzt. Zwei unterschiedliche DNA-Konstrukte, die miteinander rekombinieren sollen, werden gemeinsam auf *E. coli* BJ5183 übertragen. Eines dieser DNA-Konstrukte trägt das Genom von Ad5, auf welches das Transgen übertragen werden soll. Dieses liegt entweder als vollständiges Genom oder mit einer Deletion nur des E1-Bereichs oder auch einer zusätzlichen Deletion des E3-Bereichs vor. Das andere DNA-Konstrukt enthält das Transgen. Es wird flankiert von Ad5-Sequenzen, die aus demjenigen Gen-Bereich stammen, an dessen Stelle das Transgen übertragen werden soll. Durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 entsteht ein Plasmid mit einem Ad5-Genom, bei welchem das Transgen inseriert vorliegt (18, 19). In der Regel werden auch hier rekombinante Ad5-Genome erzeugt, denen die E1-Region fehlt.

Die Ad5-Genome werden aus den in *E. coli* BJ5183 erzeugten rekombinanten Plasmide ausgeschnitten und in eine Helferezelllinie transfiziert, welche die für die virale Replikation notwendigen E1-Proteine zur Verfügung stellt. Es werden rekombinante replikationsdefekte Ad5 erzeugt und abgegeben.

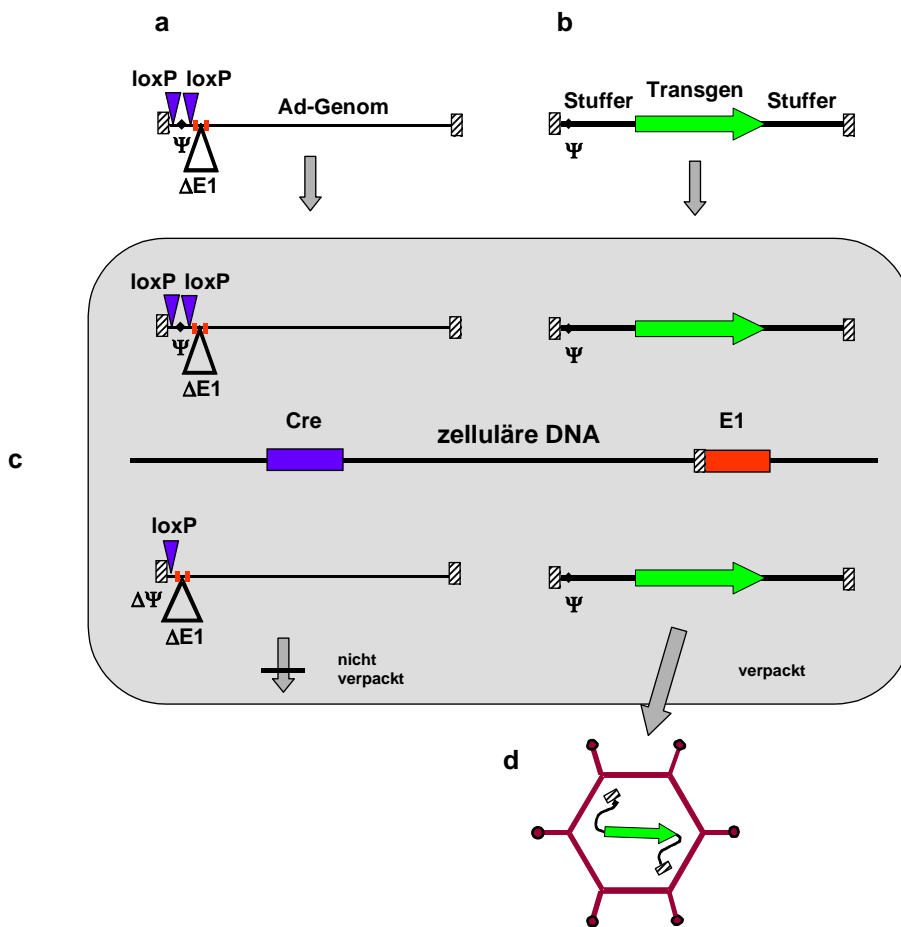
### gutless-Vektoren

Der Replikationsdefekt adenoviraler Vektoren der ersten Generation wurde durch die Deletion der E1a- und E1b-Gene erreicht. Zur Erhöhung der Aufnahmekapazität wurde bei manchen dieser Vektoren zusätzlich noch das E3-Gen deletiert. Sie enthalten jedoch noch die anderen frühen und die späten viralen Gene, die in geringen Mengen nach Infektion exprimiert werden können (20, 21). Bei den adenoviralen Vektoren der zweiten Generation, die zusätzlich Deletionen der E2- und E4-Region aufweisen, liegen noch die späten Gene vor. Bei einer klinischen Anwendung induzieren die viralen Genprodukte eine Immunantwort gegen die transduzierte Zelle, was eine Entzündung und eine verkürzte Expressionsdauer des Transgens zur Folge hat. Auch die beobachtete geringfügige Replikation der Vektor-DNA in den Zielzellen ist auf eine schwache Expression viraler Gene zurückzuführen (22, 23, 24).

Die neuen Strategien zur Vektorverbesserung zielen auf die Verminderung der Immunantwort und die Erhöhung der Aufnahmekapazität fremder DNA. So wurden Adenovirus-Vektoren entwickelt, bei denen sämtliche viralen Leserahmen deletiert wurden, die sogenannten *gutless*-Vektoren oder *high capacity*-Vektoren (25, 26, 27, 28, 29). Bei diesen Vektoren sind lediglich noch virale DNA-Sequenzen vorhanden, die *in cis* wirken und für die DNA-Replikation sowie die Verpackung der viralen DNA essentiell sind: die inversen terminalen Repetitionen (ITR) mit den Polymerase-Bindungssequenzen für den Start der DNA-Replikation und dem DNA-Verpackungssignal  $\Psi$ . Zwischen den beiden ITR ist der ursprüngliche Bereich der adenoviralen Gene ausgetauscht gegen nicht-kodierende Fremd-DNA, bei den daraus hergestellten rekombinanten Vektoren ersetzt das Transgen teilweise deren Platz (siehe Abbildung 1c und Abbildung 3b).

Die *gutless*- oder *high capacity*-Vektoren sind bei ihrer Herstellung auf ein Helfervirus angewiesen, welches die für die virale Replikation und Verpackung notwendigen Proteine bereit stellt. Ein solches Helfervirus liegt dann erwartungsgemäß als Kontamination des erzeugten Vektors vor und muss abgetrennt werden.

Eine Methode zur Herstellung von *gutless*-Vektoren, bei der Helferviren bereits durch ihre Replikationsdefizienz zur Sicherheit beitragen, die aber außerdem noch sehr effizient abgetrennt werden können, ist die Verwendung des vom Bakteriophagen P1 abgeleiteten Cre/loxP-Helfer-abhängigen Systems (27, 28), siehe Abbildung 3.



**Abb. 3 Erzeugung der Gutless-Vektoren mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Systems**

- Bei dem Ad5-Helfervirus-Genom (Ad-Genom) wird das Verpackungssignal flankiert von zwei *loxP*-DNA-Sequenzen (*loxP*), welche von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Bei dem Helfervirusgenom ist die kodierende E1-Region deletiert ( $\Delta E1$ ), ggf. auch E3, alle anderen adenoviralen Gene sind noch vorhanden.
  - Das zu übertragende Gen (Transgen) wurde in den *gutless*-Vektor eingeführt und liegt dort neben nicht-kodierenden auffüllenden DNA-Sequenzen (*stuffer*), den ITR von Ad5 sowie dem Verpackungssignal  $\Psi$ . vor.
  - Das Ad5-Helfer-Genom (a) und die Gutless-Vektor-DNA (b) werden gemeinsam in die Helferzelllinie 293-Cre eingeführt. Im Genom der Helferzelllinie (zelluläre DNA) liegen die Gene der Cre-Rekombinase (Cre) und von Ad5-E1 (E1) integriert vor und werden konstitutiv exprimiert. Ad5-E1 komplementiert das im Helfervirus-Genom deletierte E1. Damit werden die verbliebenen adenoviralen Gene des Helfervirus-Genoms exprimiert. Sowohl das Helfervirus-Genom als auch die *gutless*-Vektor-DNA replizieren. Die Cre-Rekombinase schneidet das Verpackungssignal  $\Psi$  des Helfer-Virus-Genoms aus, wodurch Helfervirus-Genome nicht mehr verpackbar sind, hingegen *gutless*-Moleküle mit Verpackungssignal  $\Psi$  zu Viruspartikeln verpackt werden.
  - Die viralen *gutless*-Vektoren werden von der Helferzelllinie abgegeben.
- Die Abbildung wurde modifiziert nach (27).

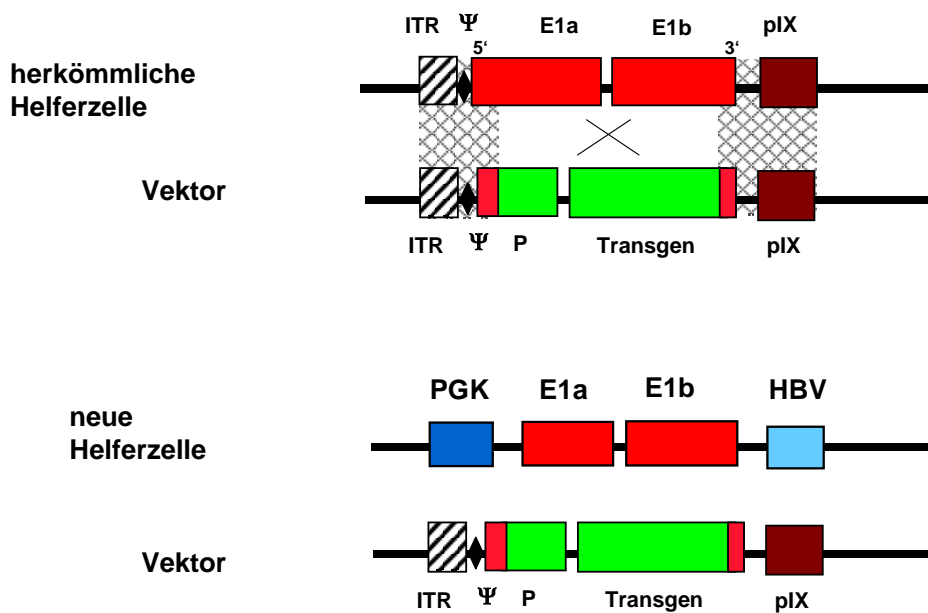
Dieses System verwendet drei Komponenten: ein Ad5-Helfervirus, einen Gutless-Vektor und eine Helferzelllinie. Bei dem Ad5-Helfervirus handelt es sich um ein E1-deletiertes Ad5, bei dessen Genom das Verpackungssignal  $\Psi$  von *loxP*-DNA-Sequenzen flankiert wird. Meist liegt zwischen den *loxP*-DNA-Sequenzen neben dem Verpackungssignal  $\Psi$  noch ein Markergen inseriert vor. Die *loxP*-DNA-Sequenzen sind Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, ein Enzym des Bakteriophagen P1. Nach Infektion einer Helferzelllinie (293-Cre), auf die das Pha-

gen-Gen übertragen wurde und welche Cre-Rekombinase exprimiert, werden das Verpackungssignal  $\Psi$  der Helfervirus-DNA sowie das Markergen ausgeschnitten. Liegen in dieser Helferzelllinie darüber hinaus noch die Genprodukte des dem Helfervirus fehlenden E1-Gens vor, werden sämtliche auf dem Helfervirus-Genom noch vorhandenen viralen Gene angeschaltet und das Helfervirus-Genom repliziert. Wird in diese Helferzelllinie zusätzlich noch ein Gutless-Vektor, der neben dem Transgen und den auffüllenden nicht-kodierenden Stuffer-Sequenzen (siehe Abbildung 1 und 3) die ITR und das Verpackungssignal  $\Psi$  von Ad5 enthält, übertragen, wird auch die Gutless-Vektor-DNA durch die vom Helfervirus bereitgestellten viralen Proteine repliziert. Da der Gutless-Vektor noch über das Verpackungssignal  $\Psi$  verfügt, wird seine DNA von den vom Helfervirus bereitgestellten viralen Hüllproteinen zum Viruspartikel eingepackt, die Helfervirus-DNA hingegen kann nicht mehr verpackt werden, da ihr Verpackungssignal  $\Psi$  von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten worden ist (siehe Abbildung 3). Durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation besteht darüber hinaus eine weitere Möglichkeit, noch vorhandene kontaminierende Helferviren abzutrennen, da sie bei einer höheren Dichte sedimentieren als die Vektor-Partikel.

### Sicherheit der Helferzelllinien

Bei den replikationsdefekten adenoviralen Vektoren und bei den replikationsdefekten Helferviren fehlt die E1-Region. Sowohl zu ihrer Erzeugung als auch zu ihrer Vermehrung werden permissive Zellen benötigt, die das dem defekten Adenovirus fehlende Genprodukt zur Verfügung stellen. Die am häufigsten hierfür verwendete Helferzelllinie ist die humane Zelllinie 293, die durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit fragmentierter Ad5-DNA entstanden ist (14). Im Genom dieser Zelllinie liegt integriert eine Kopie des linken Ad5-Endes vor, in der neben der ITR das Verpackungssignal  $\Psi$ , das späte pIX-Gen sowie die E1a- und E1b-Gene enthalten sind, welche konstitutiv exprimiert werden (14, 15). Eine weitere Helferzelllinie mit vergleichbarem E1-Integrationsmuster ist 911 (16).

Die in diesen Helferzelllinien integriert vorliegenden Ad5-DNA-Sequenzen überlappen mit DNA-Sequenzen im üblicherweise verwendeten Ad5-abgeleiteten Vektor (siehe Abbildung 4) oder im Helfervirus. Dadurch besteht die Möglichkeit einer homologen Rekombination in der Helferzelle, wodurch das E1-Gen in den Vektor oder das Helfervirus zurückübertragen wird und diesen replikationskompetent werden lässt. Solche homologen Rekombinationen wurden für 293-Zellen bereits gezeigt (30, 31, 32). Das Vorliegen replikationskompetenter Ad5 in den Vektorpräparaten stellt sowohl für die Anwendung am Menschen, als auch für die Arbeiten im Laboratorium ein Sicherheitsrisiko dar. Die in diesen Helferzellen erzeugten Ad5-Vektoren sind auf das Vorliegen replikationskompetenter Ad5 zu überprüfen. Zur Vermeidung der homologen Rekombination zwischen Vektor oder zwischen dem Helfervirus und den in der Zelllinie vorliegenden E1-Genen werden Helferzelllinien entwickelt, die die kodierende Region des E1-Bereichs enthalten, bei denen jedoch die 5'- und 3'-DNA-Sequenzen, die Transkriptionskontrollelemente enthalten und mit dem Vektor oder dem Helfervirus-Genom überlappen, gegen andere 5'- und 3'-Transkriptionskontrollelemente ausgetauscht sind (33, 34), siehe Abbildung 4. Solche „sicheren“ Helferzelllinien, die darüberhinaus auch Cre-Rekombinase exprimieren, werden derzeit entwickelt (S. Kochanek, persönliche Mitteilung).



**Abb. 4 Ad5-DNA in Helferzelllinien und im Vektor**

Die herkömmliche Helferzelllinie enthält vom linken Ad5-Genom die inverse terminale Repetition (ITR) sowie die Gene E1a, E1b und pIX. Die nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereiche sind gekennzeichnet. Der Adenovirus-Vektor enthält das Transgen mit einem eigenen Promotor (P) anstelle der kodierenden Region von E1a und E1b, jedoch flankiert von E1-DNA-Sequenzen, die homolog zur viralen DNA der Helferzelllinie sind (schraffiert gekennzeichnete Bereiche).

Die neuen Helferzelllinien enthalten zur Komplementation E1-deletierter defekter Ad5 die kodierenden Bereiche der E1a- und E1b-Gene unter heterologer Expressionskontrolle, z.B. dem Promotor des humanen Phosphoglycerat Kinase-(PGK)-Gens und der Polyadenylierungssequenz vom Gen des Oberflächenproteins vom humanen Hepatitis B Virus (HBV).

Die Abbildung wurde modifiziert nach [33].

#### 1.4 Gentransfer durch Adenovirus Typ 5-Partikel in Gentransfer-Komplexen

Ad5-Partikel werden wegen ihrer endosomolytischen Aktivität auch als Bestandteil von Gentransfer-Komplexen eingesetzt, ohne dass sie selbst das zu übertragende Gen inseriert enthalten (35). Solche Aggregate enthalten neben Ad5-Partikeln ein Expressionsplasmid mit der zu übertragenden Nukleinsäure, ein Polykation wie Polylysin sowie Transferrin zur Bindung an die Zelle. Häufig kommen hierbei Ad5-Mutanten zur Anwendung, die im E4-Gen deletiert sind. Diese E4-defekten Ad5-Mutanten werden auf Zellen, die die E4-Region konstitutiv exprimieren, komplementiert und vermehrt.

## 2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit rekombinanten Adenoviren Typ 5

Bei der Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten mit subgenomischen und replikationsdefekten Nukleinsäureabschnitten von Ad5 in *E. coli* K12 und seinen Derivaten wird - sofern keine weiteren Nukleinsäureabschnitte mit Gefährdungspotenzial eingeführt werden - nach dem Stand von Wissenschaft und Technik kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt angenommen. Wird hingegen das vollständige oder ein replikationskompetentes (z.B. nur E3-deletiertes) Genom von Ad5 amplifiziert, auch wenn es durch Vektorsequenzen unterbrochen wird, so ist das Gefährdungspotenzial von Ad5 vollständig in die Risikobetrachtung einzu beziehen.



Werden die amplifizierten rekombinanten Plasmide in eukaryote Zellen transfiziert, so ist die Möglichkeit der Entstehung von Ad5-Virionen entscheidend für die Sicherheitsbewertung. Dabei wird ein geringes Risiko für den Menschen angenommen, sofern keine heterologen Nukleinsäureabschnitte im Ad5-Genom inseriert vorliegen, die das Gefährdungspotenzial von Ad5 erhöhen. Von einem geringen Risiko wird beim Umgang mit rekombinanten replikationsdefekten Ad5 ausgegangen, da sie menschliche Zellen effizient infizieren und da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die virale Nukleinsäure - als seltenes Ereignis - in das Wirtsgenom integriert. Die Möglichkeit einer solchen Integration ist insbesondere dann in Betracht zu ziehen, wenn die Adenovirus-Vektor-DNA aufgrund der noch vorhandenen viralen Gene in der Lage sein kann, geringfügig zu replizieren.

Bei Verwendung von Helferzelllinien, bei denen die Möglichkeit der Rekombination zu replikationskompetenten Adenoviren nicht ausgeschlossen ist, ist von einer Kontamination mit solchen Viren auszugehen.

Bei den neu entwickelten Helferzelllinien, in denen die Helfergene der E1-Region auf die kodierenden Nukleotidsequenzen reduziert sind und von einer homologen Rekombination mit dem replikationsdefekten Ad5 nicht auszugehen ist, wäre lediglich eine illegitime Rekombination denkbar, aber als äußerst seltenes Ereignis in der Risikobewertung von Forschungsarbeiten nicht zu berücksichtigen.

Nach Infektion von Zellkulturen oder Tieren ist allein die Replikationskompetenz des rekombinanten Ad5 zu bewerten:

- Nach Infektion mit replikationskompetenten rekombinanten Ad5 bzw. nach Transfektion ihrer Nukleinsäure entstehen neue replikationskompetente rekombinante Ad5, die für die Bewertung der gentechnischen Arbeit sicherheitsrelevant sind.
- Nach abortiver Infektion mit replikationsdefekten rekombinanten Ad5 bzw. nach Transfektion ihrer Nukleinsäure entstehen keine neuen Ad5-Viruspartikel, sofern die infizierten Zellen oder das infizierte Tier den Replikationsdefekt von Ad5 nicht komplementiert. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und auf weitere Zellen übertragen. Beim Umgang mit diesen Zellen oder Tieren wird nach dem Stand von Wissenschaft und Technik nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt ausgegangen.

### **3. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit rekombinanten Adenovirus Typ 5**

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit diesem System zusammengefasst.

- 3.1.** Werden subgenomische, replikationsdefekte oder subgenische Nukleinsäureabschnitte von Ad5, auch mit weiteren Nukleinsäureabschnitten ohne Gefährdungspotenzial, in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt, der nicht in der Lage ist, die fehlenden Ad5-Sequenzen zu komplementieren, und entspricht das Vektor-Empfänger-System einer biologischen Sicherheitsmaßnahme, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.2.** Wird die gesamte genomische Information von Ad5 oder ein replikationskompetentes Genom in einen Empfängerorganismus der Risikogruppe 1 eingeführt, ist der gentechnisch veränderte Organismus der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, wenn die übertragene Nukleinsäure sich darin vermehren kann. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

- 3.3. Werden permissive Zellen der Risikogruppe 1 mit replikationsdefekten Ad5-Mutanten infiziert oder mit deren Nukleinsäure transfiziert und ggf. zusätzlich mit den unter 3.1. genannten Plasmiden transfiziert, und sind die Zellen in der Lage, den Replikationsdefekt der Ad5-Mutante zu komplementieren, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.4. Werden permissive Zellen der Risikogruppe 1 mit replikationskompetenten Ad5-Deletionsmutanten infiziert oder mit deren Nukleinsäure transfiziert und zusätzlich mit den unter 3.1. genannten Plasmiden transfiziert, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.5. Werden Zellen der Risikogruppe 1 mit verschiedenen unter 3.1. genannten Plasmiden kotransfiziert und besteht die Möglichkeit, dass durch Rekombination der Nukleinsäuren Ad5-Virionen ausgebildet werden können, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.6. Werden permissive Zellen der Risikogruppe 1 mit den unter 3.1. und 3.2. genannten Plasmiden kotransfiziert, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.7. Replikationsdefekte Ad5-Deletionsmutanten, die noch Ad5-virale Gene enthalten, (auch mit Insertion eines heterologen Nukleinsäureabschnitts ohne Gefährdungspotenzial) sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, einschließlich der Vermehrung der rekombinanten, replikationsdefekten Ad5 auf komplementierenden Zellen der Risikogruppe 1, der Infektion weiterer Zellen der Risikogruppe 1 sowie der Inokulation von Tieren, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.8. Rekombinante replikationsdefekte Ad5-abgeleitete Vektoren, bei denen sämtliche adenovirale Gene deletiert sind, und die subgenomische Nukleinsäureabschnitte ohne Gefährdungspotenzial enthalten, sind dann der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, wenn sie auf Helferzelllinien erzeugt wurden, bei denen nicht von einer homologen Rekombination zwischen integrierten Helfergenen und Helfervirus auszugehen ist, wenn die Verpackung der Helfervirus-DNA minimiert ist und wenn durch Dichtegradientenzentrifugation der Ad5-abgeleitete Vektor von kontaminierendem Helfervirus abgetrennt ist. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 3.9. Replikationskompetente Ad5-Mutanten (auch mit Insertion eines heterologen Nukleinsäureabschnitts ohne Gefährdungspotenzial) sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, einschließlich der Vermehrung der rekombinanten, replikationskompetenten Ad5 auf Zellen der Risikogruppe 1, der Infektion weiterer Zellen der Risikogruppe 1 sowie der Inokulation von Tieren, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 3.10. Zellen der Risikogruppe 1, die mit den unter 3.7. oder 3.8. beschriebenen rekombinanten, replikationsdefekten Ad5 infiziert worden sind und die nicht in der Lage sind, den Replikationsdefekt zu komplementieren, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

## Hinweise:

1. Bei replikationsdefekten rekombinanten Adenoviren, die auf Helferzelllinien erzeugt wurden, bei denen die Möglichkeit der homologen Rekombination zwischen dem defekten Adenovirus-Genom und dem dort integrierten E1-Gen besteht, ist der Ausschluss replikationskompetenter Adenoviren zu führen, bevor die gentechnischen Arbeiten nach Infektion weiterer Zellen in die Sicherheitsstufe 1 herabgestuft werden.

### Begründung:

Die Möglichkeit einer Rekombination in solchen Zellen wurde beschrieben. Würden replikationskompetente Adenoviren vorliegen, würden sie sich bei der Infektion weiterer Zellen vermehren können.

2. Tiere, die mit den unter 3.7. oder 3.8. beschriebenen rekombinanten, replikationsdefekten Ad5 infiziert worden sind und die nicht in der Lage sind, den Replikationsdefekt zu komplementieren, sind keine GVO und auch nicht in der Lage, GVO abzugeben.

### Begründung:

Rekombinante replikationsdefekte Ad5 übertragen einen heterologen Nukleinsäureabschnitt und subgenomische Nukleinsäureabschnitte von Ad5. Der heterologe Nukleinsäureabschnitt komplementiert nicht den Replikationsdefekt. Sofern auch das infizierte Tier den Replikationsdefekt von Ad5 nicht komplementiert, erfolgt eine abortive Infektion. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und auf weitere Zellen übertragen. Es entstehen keine neuen Ad5-Virionen. Die Übertragung der Nukleinsäure erfolgt auf somatische Zellen des Tieres. Aufgrund des im Regelfall extrachromosomalen Vorliegens der übertragenen Nukleinsäure sowie aufgrund der Immunogenität infizierter Zellen kommt es lediglich zu einer transienten Verweildauer des Transgens. Es ist nicht davon auszugehen, daß eine Übertragung und Integration der Nukleinsäure in die Keimbahnzellen stattfindet. Die Tiere geben keine gentechnisch veränderten Organismen ab und erzeugen keine gentechnisch veränderten Nachkommen.

3. Tiere, auf welche die unter 3.10. beschriebenen Zellen übertragen worden sind, sind keine GVO und auch nicht in der Lage, GVO abzugeben.

### Begründung:

Die Zellen komplementieren den viralen Replikationsdefekt nicht. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und auf weitere Zellen übertragen. Es entstehen keine neuen Ad5-Virionen.

## Literatur

1. **The molecular biology of Adenoviruses (1983).**  
ed. Doerfler, W. Current Topics in Microbiology and Immunology 109, 110, 111. Springer Verlag.
2. **Fields Virology, (1996).**  
eds. Fields, B.N. and Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., and Straus, S.E. (Lippincott, Philadelphia).
3. **Murray, J.D., Bellett, A.J.D., Braithwaite, A.W., Waldron, L.K., and Taylor, I.W. (1982).**  
Altered cell cycle progression and aberrant mitosis in Adenovirus-infected rodent cells. J. Cell. Phys. 111: 89 – 96.
4. **Braithwaite, A.W. (1986).**  
Semipermissive replication of Adenovirus type 5 in rat brain cells and evidence for an induction of cellular DNA replication *in vivo*. J. gen. Virol. 67: 391 – 396.
5. **Eggerding, F.A., and Pierce, W.C. (1986).**  
Molecular biology of Adenovirus type 2 semipermissive infections. Virology 148: 97 – 118.

6. **Bridge, E. and Ketner, G. (1989).**  
Redundant control of Adenovirus late gene expression by early region 4. *J. Virol.* 63: 631 - 638.
7. **Robbins, P.D., Tahara, H., and Ghivizzani, S.C. (1998).**  
Viral vectors for gene therapy. *TibTech* 16: 35 – 40.
8. **Xiang, Z.Q., Yang, Y., Wilson, J.M., and Ertl, H.C. (1996).**  
A replication-defective human Adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 219: 220 – 227.
9. **Gluzman, Y., Reichl, H., and Solnick, D. (1985).**  
Helper-free Adenovirus type 5 vectors. *Eukaryotic Viral Vectors*. Cold Spring Harbor, New York.
10. **Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y., Brinkley, P., Rudy, J., and Graham, F.L. (1986).**  
Human Adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene*, 50: 161 - 171.
11. **Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M. (1999).**  
Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 440 – 447.
12. **Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR. (2000).**  
Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* 1:2 - 8
13. **Bett, A.J., Prevec, L., and Graham, F.L. (1993).**  
Packaging capacity and stability of human Adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67: 5911 - 5921.
14. **Graham, F.L., Smiley, J.S., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977).**  
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59 – 72.
15. **Louis, N., Eveleigh, C., and Graham, F.L. (1997).**  
Cloning and sequencing of the cellular – viral junctions from the human Adenovirus Type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233: 423 – 429.
16. **Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., van Ormondt, H., Hoeben, R.C., and van der Eb, A.J. (1996).**  
Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7: 215 – 222.
17. **Hanahan, D. (1983).**  
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 557 – 580.
18. **Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996).**  
Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70: 4805 – 4810.
19. **He, T.-C., Zhou, S., de Cost, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998).**  
A simplified system, for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 2509 – 2514.
20. **Engelhardt, J.F., Simon, R.H., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Doranz, B., Grossman, M., and Wilson, J.M. (1993).**  
Adenovirus-mediated transfer of the CFTR-gene to lung of nonhuman primates: Biological efficacy study. *Hum. Gene Ther.* 4: 759 – 769.
21. **Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E. and Wilson, J.M. (1994).**  
Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4407 – 4411.
22. **Nelson, J.E., and Kay, M.A. (1997).**  
Persistence of recombinant adenovirus *in vivo* is not dependent on vector replication. *J. Virol.* 71: 8902 – 8907.
23. **Goldsmith, K.T., Dion, L.D., Curiel, D.T., and Garver, R.I. Jr. (1998).**  
Trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus. *Virology* 248: 406 – 419.
24. **Steinwaerder, D.S., Carlson, C.A., and Lieber A. (2000).**  
DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum. Gene Ther.* 11:1933 – 1948.
25. **Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.H., Chan, S., and Caskey, C.T. (1996).**  
A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length cystotrophin and  $\beta$ -Galaktosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5731 –5736.

26. **Fisher, K.J., Choi, H., Burda, J., Chen, S.J., and Wilson, J.M. (1996).**  
Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217: 11 – 22.
27. **Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A., Graham, F.L. (1996).**  
A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13565 – 13570.
28. **Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S., Langston, C., Graham, F.L., Beudet, A., and Kochanek, S. (1998).**  
Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18: 180 – 183.
29. **Kochanek, S. (1999).**  
High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 10: 2451 – 2459.
30. **Lochmueller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G., and Acsadi, G. (1994).**  
Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants ( $\square$ E1 +  $\square$ E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* 5: 1485 – 1491.
31. **Zhang, W.W., Koch, P.E., and Roth, J.A. (1995).**  
Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *BioTechniques* 18: 444 – 447.
32. **Hehir, K.M., Armentano, D., Cardoza, L.M., Choquette, T.L., Berthelette, P.B., White, G.A., Couture, L.A., Everton, M.B., Keegan, J., Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC. (1996).**  
Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J. Virol.* 70: 8459 – 8467.
33. **Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J.M., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D., and Hoeben, R.C. (1998).**  
New helper cells and matched early region 1-deleted Adenovirus vectors prevent generation of replication-competent Adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9: 1909 – 1917.
34. **Schiedner, G., Hertel, S. and Kochanek, S. (2000).**  
Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: Generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11: 2105 – 2116.
35. **Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Phillips, S., Curiel, D.T., and Birnstiel, M.L. (1992).**  
High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 Kb) gene constructs using the endosome-disrupting activity of chemically inactivated Adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5383 - 5386.