

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung Adeno-assoziiierter Viren aus Primaten und davon abgeleiteter Vektoren

Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind bei einer Vielzahl von Tieren und dem Menschen ubiquitär verbreitet, wobei der Wirtsbereich der einzelnen Serotypen sehr eng ist [1; 2]. Sie gehören als Untergruppe der defekten Viren (Gattung *Dependoparvovirus*) zur Familie der *Parvoviridae* [3].

AAV-Partikel sind nicht umhüllt und in der Umwelt selbst bei Austrocknen relativ stabil. 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, die Expression der Strukturproteine und die Integration in das Genom der Wirtszelle. Die drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 werden durch *cap* kodiert und bilden das ikosaedrische Nukleokapsid. Hypervariable Regionen der Kapsidproteine beeinflussen die Gewebespezifität, die für die verschiedenen AAV-Typen mitunter sehr divers ist [4; 5].

Je ein *inverted terminal repeat* (ITR) begrenzt das Genom am 5'- bzw. am 3'-Ende. Die ITR enthalten die *cis*-aktiven Elemente für die Replikation des Virusgenoms und dessen Integration ins Wirtsgenom sowie das Verpackungssignal. Für eine produktive, lytische Infektion benötigen AAV Helferfunktionen, die von Helferviren (wie beispielsweise Adenovirus, Herpes-simplex-Virus Typ I und Typ II, Cytomegalovirus oder Humanes Herpesvirus-6) zur Verfügung gestellt werden. In Abwesenheit der Helferfunktionen wird eine Zelle zwar von AAV infiziert, allerdings ruht das übertragene AAV-Genom im Zellkern der Wirtszelle (latente Infektion), hauptsächlich als extrachromosomales Episom. Es kann jedoch auch im Wirtsgenom integriert vorliegen [6; 7]. Im Menschen wird die AAV-DNA als einziges bekanntes Virusgenom spezifisch in das Genom der Wirtszelle integriert. Diese Integration erfolgt für gewöhnlich im AAVS1-Lokus von Chromosom 19 [6]. Das latente Virus ist durch Überinfektion mit Adeno- oder Herpesviren wieder mobilisierbar.

AAV werden vermutlich über die Atemwege und fäkal-oral übertragen [7; 8]. Die bisher aus Primaten isolierten mehr als hundert AAVs lassen sich in 13 Serotypen unterteilen [5; 9].

Die Serotypen **AAV-2, -3, -5, -6** und **-9** wurden dabei aus dem Menschen isoliert [5; 10; 12].

Der Serotyp **AAV-1** wurde hingegen sowohl aus Affen als auch aus dem Menschen isoliert [5].

Die Serotypen **AAV-4, -7, -8, -10, -11, -12** und **-13** wurden aus Affen isoliert [5; 11-14].

Abhängig vom Alter und der geografischen Region besitzen etwa 80 % der Menschen Antikörper gegen AAV [2]. Diese zeigen eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber anderen AAV-Serotypen [6]. Insgesamt ist für 70 % der untersuchten Menschen eine Seropositivität für AAV-1, -2 und -3 beschrieben [2; 15-17]. Etwa 45 % weisen Antikörper gegen AAV-5 und -6 auf [2; 15]. Etwas niedriger (~ 38 %) ist die Seroprävalenz für AAV-8 und -9 [2; 15-17]. Die Seroprävalenz für AAV-7 liegt bei etwa 10 % und für AAV-4 bei unter 2 % [16; 18]. Die Seroprävalenzen für die Serotypen AAV-10, -11, -12 und -13 sind unbekannt.

Trotz der ubiquitären Verbreitung der AAV und der hohen Durchseuchung sind bis zum heutigen Tage weder beim Menschen noch beim Tier AAV-assoziierte Erkrankungen bekannt, weshalb man davon ausgeht, dass AAV apathogen sind [2; 6; 7]. Es wird zudem ein protektiver Effekt von AAV, beispielsweise gegen die Ausbildung von Tumoren/Krebserkrankungen, diskutiert [19; 20].

Im Jahr 2001 wurden die AAV-Serotypen AAV-2, -3, und -5 durch die ZKBS der Risikogruppe 1 zugeordnet, die AAV-Serotypen AAV-1, -4 und -6 bis -12 der Risikogruppe 2. Ferner wurde das von AAV-3 abgeleitete Isolat **AAV-3b** in die Risikogruppe 1 eingestuft. **AAV-rh10** wurde im Jahr 2003 aus Rhesusaffen-Gewebe isoliert [4] und der Risikogruppe 2 zugeordnet. In einer späteren Studie zeigte sich, dass 59 % der Menschen Antikörper gegen AAVrh10 besitzen [21].

In der TRBA 462 „Einstufung von Viren in Risikogruppen“ sind die AAV-Serotypen 2, 3 und 5 in die Risikogruppe 1 eingestuft. Die AAV-Serotypen 1, 4 und 6 – 11 sind in die Risikogruppe 2 eingestuft.

Die niederländische *Commissie Genetische Modificatie* (COGEM) stufte kürzlich die Serotypen AAV-10 bis -12 sowie AAVrh10 in die Risikogruppe 1 ein [22]. Darüber hinaus empfahl sie, generell alle AAV der Spezies *Adeno-associated dependoparvovirus A* und *B* der Risikogruppe 1 zuzuordnen. Begründet wurde dies mit der ubiquitären Verbreitung, der Abhängigkeit von einem Helfervirus sowie dem Fehlen jeglicher Hinweise auf eine Pathogenität.

Die *US National Institutes of Health* (NIH) haben alle AAV-Serotypen als nicht-pathogen der Risikogruppe 1 zugeordnet [23].

Risikobewertung:

AAV sind aufgrund ihrer hohen Infektiosität weit verbreitet in verschiedensten Vertebraten, einschließlich des Menschen. Aufgrund der hohen Seroprävalenz für verschiedene AAV im Menschen ist davon auszugehen, dass die Infektion jedoch nicht mit einer Pathogenität verbunden ist. Für einige AAV-Serotypen sind keine natürlichen Infektionen beim Menschen beschrieben, auch die Seroprävalenz ist niedrig oder unbekannt. Auch für diese AAV ist eine Pathogenität sehr unwahrscheinlich, kann jedoch letztlich nicht sicher ausgeschlossen werden.

Aufgrund der neuen Erkenntnisse seit der ZKBS-Stellungnahmen zur Einstufung von AAV der Jahre 2001 und 2005 werden Herabstufungen einzelner AAV-Serotypen vorgenommen.

Die ZKBS empfiehlt gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV folgende Einstufung der verschiedenen AAV-Serotypen als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten:

AAV-1 bis -3, AAV-3b, AAV-5, AAV-6, AAV-8, AAV-9 und AAV-rh10: Risikogruppe 1

AAV-4, AAV-7, AAV-10 bis -13: Risikogruppe 2

Hinweis:

Bei Vorlage entsprechender Daten kann ggf. eine Herabstufung weiterer AAV-Serotypen erfolgen.

AAV-abgeleitete Vektorsysteme

Bei AAV-abgeleiteten Vektoren handelt es sich um infektiöse, replikationsdefekte Partikel mit DNA-Anteilen von AAV, die Fremd-DNA übertragen können.

Rekombinante AAV-Vektorpartikel werden inzwischen in zahlreichen klinischen Studien als Therapeutika für verschiedenste Erkrankungen geprüft [5; 19]. Erste AAV-basierte Arzneimittel wurden in Europa bereits zugelassen (Glybera[®], LuxturnaTM).

Ein herkömmliches System zur Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel besteht aus zwei, meist von pBR322 abgeleiteten Plasmiden und einem Helfervirus [6]. Das Transferplasmid trägt von AAV nur die ITR, die stromaufwärts und -abwärts des zu übertragenden Nukleinsäureabschnitts liegen. Auf dem Helferplasmid liegen von AAV nur die Nukleotidsequenzen der Leseramen *rep* und *cap* vor. Eine Überlappung von homologen AAV-Nukleotidsequenzen zwischen Transfer- und Helferplasmid liegt nicht vor, somit ist eine homologe Rekombination nicht zu erwarten.

Zur Produktion von AAV-Vektorpartikeln werden Wirtszellen mit Transfer- und Helferplasmid kointrophiert und mit einem Helfervirus infiziert, da dieses die essenziellen viralen Helferfunktionen zur Vermehrung von AAV bereitstellt.

Bei weiterentwickelten Systemen zur Herstellung von AAV-Vektorpartikeln werden die viralen Helferfunktionen unabhängig vom Helfervirus auf einem dritten Plasmid bereitgestellt, sodass eine Infektion mit einem replikationskompetenten Helfervirus nicht mehr notwendig ist [6]. Dadurch wird auch die Produktion von replikationskompetenten Helferviren verhindert. Von den früher als Helferviren genutzten Adenoviren sind die Proteine E1a, E1b, E2a, E4 und VA notwendig für die Produktion von AAV-Vektorpartikeln. Durch die Verwendung der 293T-Zelllinie, die die adenoviralen E1-Proteine zur Verfügung stellt, sind auf den Helferplasmiden, neben den *rep*- und *cap*-Nukleotidsequenzen, nur die Gene für die adenoviralen Proteine E2a, E4 und VA erforderlich [24].

In zahlreichen klinischen Studien mit AAV-Vektorpartikeln verschiedener Serotypen im Menschen ist gezeigt worden, dass die Vektor-DNA nicht in die Keimbahn gelangt [25]. Eine Ausscheidung von AAV-Vektorpartikeln durch die Prüfungsteilnehmer, beispielsweise über Urin und Speichel, erfolgte abhängig von der Administrationsroute und -dosis [25]. Die Ausscheidung erfolgt jedoch in nur geringem Ausmaß und transient, weshalb die Verbreitung der infektiösen AAV-Vektorpartikel eingeschränkt ist [26].

Innerhalb der Wirtszelle liegt die Transfer-DNA hauptsächlich extrachromosomal vor.

Die Vektorpartikel sind replikationsdefekt, und außer den AAV-ITR liegen keine weiteren Gene von AAV oder den Helferviren auf dem Transfervektor vor. Zudem entsprechen die unter Risikobewertung Punkt 2 und 4 beschriebenen Vektor-Empfänger-Systeme biologischen Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 Abs. 1 und 2 GenTSV.

Risikobewertung:

1. Rekombinante AAV-Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäureabschnitte von AAV und zusätzlich nur Nukleinsäureabschnitte ohne Gefährdungspotenzial enthalten, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft, auch wenn sie pseudotypisiert sind. Die Einstufung ist davon unabhängig, von welchem AAV die verwendeten ITR 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-Vektorpartikeln transduziert worden sind, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft. 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 Gefährdungspotenzial der Organismen vollständig in die Risikobewertung ein.
3. Rekombinante AAV-Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäureabschnitte von AAV, jedoch zusätzlich Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthalten, werden in die **Risikogruppe 2** eingestuft. Die Einstufung ist davon unabhängig, von welchem AAV die verwendeten ITR stammen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
4. Zellen oder Zelllinien der Risikogruppe 1, die mit den unter Punkt 3 genannten, rekombinanten AAV-Vektorpartikeln transduziert worden sind, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft. 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 Gefährdungspotenzial der Organismen vollständig in die Risikobewertung ein.
5. Sollen mithilfe von AAV-Vektoren Gene von Prionen oder Toxinen übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.

Hinweise:

1. Bei Kontaminationen der unter Risikobewertung Punkt 1 beschriebenen, rekombinanten AAV-Vektorpartikel mit Helferviren geht das Gefährdungspotenzial dieser Viren vollständig in die Risikobewertung ein.
2. Besteht die Möglichkeit, dass durch überlappende AAV-Nukleinsäureabschnitte auf dem Transfer- und Helferplasmid replikationskompetente, ggf. chimäre AAV entstehen, oder werden solche AAV gezielt erzeugt, sind die AAV maßgeblich für die Risikobewertung, von denen die Nukleinsäureabschnitte für die Rep-Proteine stammen.
3. Versuchstiere, deren somatische Zellen mithilfe rekombinanter, replikationsdefekter AAV-Vektorpartikel transduziert wurden, sind keine GVO. Die Tiere sind jedoch grundsätzlich als Träger von GVO anzusehen. Der Zeitraum, in dem infektiöse Vektorpartikel im Tier verbleiben, hängt dabei stark von der verabreichten Dosis und der Inokulationsroute ab. Zudem können die Tiere die verabreichten Vektorpartikel ggf. wieder abgeben. Kann jedoch mithilfe von Daten oder geeigneter Literatur für vergleichbare Systeme belegt werden, dass nach einer bestimmten Zeit keine AAV-Vektorpartikel mehr vom behandelten Tier abgegeben werden, ist es sicherheitstechnisch unbedenklich, wenn die Landesbehörden nach Einzelfallprüfung eigenverantwortlich entsprechende Fristen festlegen, nach deren Ablauf die Tiere nicht mehr als Träger von GVO behandelt werden.
4. Es ist davon auszugehen, dass der Schutz der Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz auch dann gewährleistet ist, wenn die Tierkadaver von mit AAV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 1** inokulierten Versuchstieren, für die entsprechende Daten des Hinweis 3. nicht vorgebracht wurden, ohne vorheriges Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden. Sofern nicht bereits § 24 Abs. 1 Nr. 3 GenTSV anwendbar ist, kann die jeweils zuständige Genehmigungs- und Überwachungsbehörde gemäß § 2 Abs. 2 GenTSV entscheiden, dass diese Tierkadaver ohne ein Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden, wenn gewährleistet ist, dass die Tierkadaver nicht in die Nahrungs- und Futtermittelkette gelangen.
5. Bei Versuchstieren, die mit AAV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 2** inokuliert wurden und für die die unter Hinweis 3. genannten Daten nicht vorgebracht wurden, ist davon auszugehen, dass sieben Tage nach der Inokulation eine deutliche Abreicherung der AAV-Vektorpartikel erreicht ist, sodass Arbeiten mit den Kadavern dieser Tiere kein über die Sicherheitsstufe 1 hinausgehendes Gefährdungspotenzial aufweisen. Der Schutz der Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz ist auch dann gewährleistet, wenn die Tierkadaver ohne vorheriges Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden. Sofern nicht bereits § 24 Abs. 1 Nr. 3 GenTSV anwendbar ist, kann die jeweils zuständige Genehmigungs- und Überwachungsbehörde gemäß § 2 Abs. 2 GenTSV entscheiden, dass diese Tierkadaver ohne ein Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden, wenn gewährleistet ist, dass die Tierkadaver nicht in die Nahrungs- und Futtermittelkette gelangen.
6. Parvoviren sind sehr unempfindlich gegenüber alkoholischen Desinfektionsmitteln. Wegen ihrer besseren Verträglichkeit bzw. geringeren Toxizität sind jedoch ausschließlich Hände-Desinfektionsmittel erhältlich, deren Wirksamkeit auf Alkoholen basiert. Aus diesem Grund sind keine gegen AAV wirksamen Hände-Desinfektionsmittel verfügbar [27]. Bei gentechnischen Arbeiten mit AAV oder AAV-Vektoren der Risikogruppe 2 sind daher Einmal-Schutzhandschuhe zu tragen, die regelmäßig zu wechseln sind und die Hände sind häufig zu waschen. Bei der Auswahl von Flächen-Desinfektionsmitteln ist zu berücksichtigen, dass die Wirksamkeit der Mittel auch gegen Parvoviren überprüft wurde. Für Desinfektionsmittel, die in der Liste der vom [Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren](#) und in der [Desinfektionsmittel-Liste des Verbundes für angewandte Hygiene](#) mit dem Wirkungsbereich „viruzid“ gelistet sind, ist dies der Fall.
7. Sollen mithilfe von AAV-Vektoren Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen werden, wird in dem Zusammenhang auf die folgenden allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS hingewiesen:
 - Stellungnahme der ZKBS: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016)

- Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen (Az. 6790-10-83, aktualisiert April 2020)

Literatur

- 1 **Tijssen P et al.** (2012). Family Parvoviridae. In: Virus taxonomy, ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Ed. King AMQ et al., Elsevier Academic Press, Amsterdam
- 2 **Hülser D et al.** (2017). High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence. *J Virol* **91**:e02137-16.
- 3 **Smith et al.** (2016). Germline viral “fossils” guide in silico reconstruction of a mid-Cenozoic era marsupial adeno-associated virus. *Sci Rep* **6**:28965.
- 4 **Gao G et al.** (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *PNAS* **100**:6081-6.
- 5 **Lisowski L et al.** (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **24**:59–67.
- 6 **Salganik M et al.** (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol Spectr* **3**(4):MDNA3-0052-2014
- 7 **Berns KI & Muzyczka N** (2017). AAV: An overview of unanswered questions. *Hum Gene Ther* **28**:308-13
- 8 **Berns KI & Parrish CR** (2013). *Parvoviridae*. In: Fields Virology (6th edition). Edited by Knipe DM & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
- 9 **Srivastava A** (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* **21**:75–80.
- 10 **Gao G et al.** (2004). Clades of Adeno-associated virus are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**:6381-8.
- 11 **Gao G et al.** (2002). Novel Adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *PNAS* **99**:11854-9.
- 12 **Mori S et al.** (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330**:375-83.
- 13 **Schmidt M et al.** (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparin sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* **82**(3):1399-406.
- 14 **Schmidt M. et al.** (2008). Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV (VR-942). *J Virol* **82**(17):8911-6.
- 15 **Boutin S et al.** (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum Gene Ther* **21**:704-12.
- 16 **Calcedo R & Wilson JM** (2013). Humoral immune response to AAV. *Front Immunol* **4**:341.
- 17 **Leborgne C et al.** (2019). Prevalence and long-term monitoring of humoral immunity against adeno-associated virus in Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Cell Immunol* **342**:103780.
- 18 **Calcedo R et al.** (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* **199**(3):381-90.
- 19 **Naso MF et al.** (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**:317–334.
- 20 **Srivastava A & Carter BJ** (2017). AAV infection: protection from cancer. *Hum Gene Ther* **28**:323-7.
- 21 **Twaihe R et al.** (2015). AAVrh.10 immunogenicity in mice and humans. Relevance of antibody cross-reactivity in human gene therapy. *Gene Ther* **22**:196-201.
- 22 **Commission on Genetic Modification (COGEM)** (2018). Adeno-associated dependoparvovirus A and Adeno-associated dependoparvovirus B assigned to pathogenicity class 1. COGEM report CGM/180316-01. <https://cogem.net/en/publication/adeno-associated-dependoparvovirus-a-and-a-deno-associated-dependoparvovirus-b-assigned-to-pathogenicity-class-1/> (abgerufen am 15. September 2021).

- 23 **National Institutes of Health** (2016). NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. <https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/> (abgerufen am 15. September 2021).
- 24 **Grimm D et al.** (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of Adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* **7**:839-50.
- 25 **Salmon F et al.** (2014). Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on ali-pogene tiparvovec (Glybera). *Expert Rev Clin Pharmacol* **7(1)**:53–65.
- 26 **Wadsworth S** (2007). AAV specific issues pertaining to vector shedding in gene therapy clinical trials. Genzyme Corporation. Presentation from EMA/ICH Workshop on Viral/Vector Shedding. https://www.ema.europa.eu/documents/presentation/aav-specific-issues-pertaining-vector-shedding-gene-therapy-clinical-trials-samuel-wadsworth_en.pdf (abgerufen am 15. September 2021).
- 27 **Eggers M et al.** (2020). Einsatz geeigneter Desinfektionsmittel bei gentechnisch veränderten Viren und viralen Vektoren – Stellungnahme der Kommission für Virusdesinfektion der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und der Gesellschaft für Virologie (GfV) e. V.. *Epid Bull* **35**:3–14.