

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 AAV 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 und als auch aus dem Menschen isoliert [5].

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

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; 14-16]. Etwa 45 % weisen Antikörper gegen AAV-5 und -6 auf [2; 14]. Etwas niedriger (~ 38 %) ist die Seroprävalenz für AAV-8 und -9 [2; 14-16]. Die Seroprävalenz für AAV-7 liegt bei etwa 10 % und für AAV-4 bei unter 2 % [15; 17]. 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

von homologen AAV-Nukleotidsequenzen zwischen Transfer- und Helferplasmid liegt nicht vor, somit ist eine homologe Rekombination nicht zu erwarten.

Zur Produktion von rekombinanten, AAV-abgeleiteten Vektoren werden Wirtszellen mit Transfer- und Helferplasmid ko-transfiziert und mit einem Helfervirus infiziert, da dieses die essenziellen viralen Helferfunktionen zur Vermehrung von AAV bereitstellt.

Bei weiterentwickelten AAV-Vektorsystemen 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-Partikeln. 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 [23].

Risikobewertung:

1. Rekombinante, AAV-abgeleitete Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäuresequenzen von AAV und keine Nukleinsäureabschnitte mit Gefährdungspotenzial enthalten, werden in die **Risikogruppe 1** eingeordnet, 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-abgeleiteten Vektorpartikeln transduziert 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 Gefährdungspotenzial der Organismen vollständig in die Risikobewertung ein.

Begründung:

In zahlreichen klinischen Studien mit AAV-Vektoren verschiedener Serotypen im Menschen ist gezeigt worden, dass die Vektoren nicht in die Keimbahn gelangen [24]. Eine Ausscheidung von AAV-Vektoren durch die Prüfungsteilnehmer, beispielsweise über Urin und Speichel, erfolgte abhängig von der Administrationsroute und -dosis [24]. Die Ausscheidung erfolgt jedoch in nur geringem Ausmaß und transient, weshalb die Verbreitung der infektiösen AAV-Vektorpartikel eingeschränkt ist [25].

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

Die Vektoren sind replikationsdefekt, und außer den AAV-ITR liegen keine weiteren Gene von AAV oder den Helferviren auf dem Transfervektor vor. Zudem entsprechen die unter Punkt 2 beschriebenen Vektor-Empfänger-Systeme biologischen Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 6 Abs. 4 und 5 GenTSV.

Hinweise:

1. Bei Kontaminationen der unter Punkt 1 beschriebenen, rekombinanten, AAV-abgeleiteten Vektoren 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 vollständige, 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.

Es wird auf die „Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten viralen Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen“ hingewiesen (Az. 6790-10-83; aktualisierte Fassung vom Dezember 2016).

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 Adenoassociated 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; doi:10.1038/srep28965.
- 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**; doi:10.1128/microbiolspec.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, **volume 2, 6th edition**. Edited by Knipe DM and 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**:1399-406.
- 14 **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.
- 15 **Calcedo R & Wilson JM** (2013). Humoral immune response to AAV. *Front Immunol* **4**(341); doi: 10.3389/fimmu.2013.00341.
- 16 **Leborgne C et al.** (2018). Prevalence and long-term monitoring of humoral immunity against adeno-associated virus in Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Cell Immunol* pii:S0008-8749(18)30114-X; doi: 10.1016/j.cellimm.2018.03.004.
- 17 **Calcedo R et al.** (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* **199**(3):381-90.
- 18 **Naso MF et al.** (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**:317–334.
- 19 **Srivastava A & Carter BJ** (2017). AAV infection: protection from cancer. *Hum Gene Ther* **28**:323-7.
- 20 **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.
- 21 **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://www.cogem.net/showdownload.cfm?objectId=5D56EDA9-CCFE-BE80>

AAEF71E90046B812&objectType=mark.hive.contentobjects.download.pdf (abgerufen am 21 November 2018)

- 22 National Institutes of Health** (2016). NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. http://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/2013/06/NIH_Guidelines.pdf (abgerufen am 21 November 2018)
- 23 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.
- 24 Salmon F et al.** (2014). Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera). *Expert Rev Clin Pharmacol* **7(1)**:53–65.
- 25 Wadsworth S** (2007). AAV specific issues pertaining to vector shedding in gene therapy clinical trials. Genzyme Corporation. Presentation from EMA Workshop on Viral/Vector Shedding.