

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

**Stabile und transiente Genexpression mithilfe  
 $\gamma$ -retroviraler und lentiviraler Vektoren**

### 1. Beschreibung des retroviralen Systems

Die folgenden Begriffsdefinitionen werden verwendet:

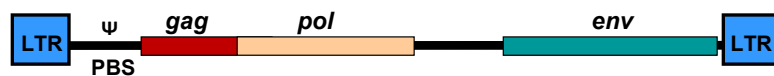
- **retrovirale Vektoren:** replikationsdefekte Virus-ähnliche Partikel, abgeleitet von murinen  $\gamma$ -Retroviren oder Lentiviren, die eine Zielzelle infizieren und dabei einen Nukleinsäureabschnitt auf diese übertragen; der Nukleinsäureabschnitt kann anschließend transient vorliegen oder in das Zellgenom integriert werden
- **Transferplasmid:** pBR-abgeleitetes Plasmid mit einem oder mehreren Fremdgenen, welches nicht für ein Hüllprotein kodiert (ggf. unter Kontrolle eines eukaryotischen oder viralen Promotors) sowie nicht-kodierenden Nukleinsäureabschnitten eines oder mehrerer muriner  $\gamma$ -Retroviren oder Lentiviren; die nicht-kodierenden Nukleinsäureabschnitte umfassen den 5'- und 3'-LTR, das Verpackungssignal  $\Psi$  (ggf. einschließlich eines überlappenden Abschnitts von *gag*), den PPT sowie ggf. das lentivirale RRE (einschließlich eines überlappenden Abschnitts von *env*) und/oder das lentivirale cPPT/cTS (einschließlich eines überlappenden Abschnitts von *pol*); ggf. sind weitere, virale oder zelluläre Nukleinsäureabschnitte zur Expressionsregulierung oder -steigerung (z. B. USE, IRES, 2A-Peptid-Sequenz, microRNA-Zielsequenzen) enthalten; kodierende Nukleinsäureabschnitte, die für ein vollständiges retrovirales Protein kodieren, sind nicht enthalten
- **Verpackungsplasmid:** pBR-abgeleitetes Plasmid mit dem Gen *gag/pol* muriner  $\gamma$ -Retroviren oder Lentiviren und/oder einem oder mehreren Genen eines beliebigen viralen Hüllproteins; das Gen des Hüllproteins kann ggf. modifiziert sein; ggf. sind die kodierenden Nukleinsäureabschnitte der lentiviralen Proteine Tat, Rev und/oder Vpr enthalten; ein Verpackungssignal ist nicht enthalten
- **Verpackungszelllinie:** stabil transduzierte Zelllinie der Risikogruppe 1, in deren Genom das Gen *gag/pol* eines murinen  $\gamma$ -Retrovirus sowie ein oder mehrere Gene eines beliebigen viralen Hüllproteins stabil integriert wurden; das Gen des Hüllproteins kann ggf. modifiziert sein; ein Verpackungssignal ist nicht enthalten
- **Infektion:** Übertragung der im retroviralen Vektor enthaltenen RNA auf eine Zielzelle
- **Transduktion:** Integration der von der im retroviralen Vektor enthaltenen RNA revers-transkribierten DNA in das Genom einer Zielzelle

## 1.1 Allgemeine Einführung

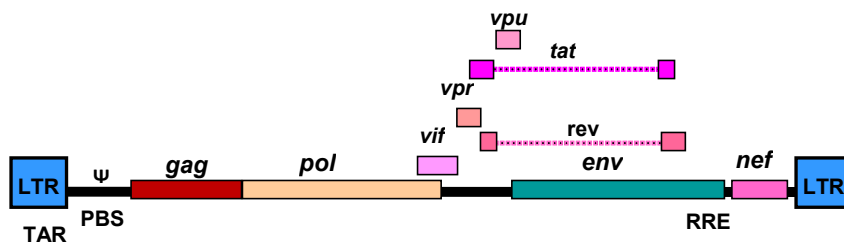
Retroviren (Familie: *Retroviridae*) sind umhüllte RNA-Viren, die durch das „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) in zwei Unterfamilien, die der Orthoretroviren und die der Spumaretroviren, mit sechs bzw. fünf Gattungen unterteilt wurden.

Das Genom replikationskompetenter Retroviren besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen mit einer Länge von 7 – 15 kb. Während einer durch die retrovirale Polymerase katalysierten reversen Transkription wird ein doppelsträngiges DNA-Intermediat gebildet, das sich anschließend stabil in das Genom der infizierten Zelle integriert (Provirus). Die drei Gene *gag*, *pol* und *env*, welche für das Matrix-, das Kapsid- und das Nukleokapsidprotein, die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase bzw. die Hüllproteine kodieren, sind die Grundbestandteile eines jeden retroviralen Genoms. Komplexe Retroviren enthalten darüber hinaus noch verschiedene weitere Leserahmen, deren Genprodukte regulatorische Funktionen übernehmen (Abb. 1). An beiden Termini des viralen Genoms befinden sich die sogenannten *long terminal repeats* (LTR), welche beim DNA-Provirus jeweils aus den Sequenzabschnitten U3 (*unique 3'*), R (*redundant*) und U5 (*unique 5'*) bestehen. Innerhalb dieser Abschnitte befinden sich der retrovirale Promotor sowie weitere *cis*-regulatorische Elemente für eine verstärkte Genexpression (*enhancer*), die Polyadenylierung und die Integration in das Wirtsgenom. Das RNA-Genom der Viren weist im Gegensatz hierzu am 5'-Ende lediglich die Abschnitte R und U5 und am 3'-Ende die Abschnitte U3 und R auf. Die LTR werden erst während der reversen Transkription vervollständigt [1].

a)



b)



**Abb. 1: Genkarten retroviraler Proviren**

a) Einfaches Retrovirus am Beispiel des *Murine leukemia virus* (MLV); PBS (*primer binding site*) bezeichnet die Bindestelle für den tRNA-Primer; Ψ kennzeichnet das Verpackungssignal; *gag* (gruppenspezifische Antigene; Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine), *pol* (Protease, Reverse Transkriptase und Integrase) und *env* (Hüllproteine) sind kodierende Regionen; LTR (*long terminal repeats*) beinhalten repetitive Sequenzabschnitte, die an beiden Termini des integrierten DNA-Provirus vorkommen. Abbildung modifiziert nach [1].

b) Komplexes Retrovirus am Beispiel des *Human immunodeficiency virus* (HIV); neben den regulatorischen Elementen, wie LTR, Verpackungssignal Ψ, PBS, dem *trans-activation response element* (TAR) und dem *rev response element* (RRE) sowie den Genen *gag*, *pol* und *env* weist HIV weitere Leserahmen auf, die für regulatorische Proteine kodieren. Abbildung modifiziert nach <http://hiv-web.lanl.gov/MAP/landmark.html>.

## 1.2 Stabiler Gentransfer mithilfe retroviraler Vektoren

Rekombinante Retroviren für den stabilen Gentransfer wurden ursprünglich auf der Basis muriner  $\gamma$ -Retroviren, vor allem dem *Murine leukemia virus* (MLV), entwickelt. Sie transduzieren ausschließlich sich teilende Zellen, da das im Zytoplasma revers-transkribierte DNA-Intermediat nicht in der Lage ist, die Kernmembran zu passieren. In sich nicht teilenden Zellen kommt es daher nicht zur Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Erst wenn sich die Kernmembran während der Zellteilung auflöst, kann der virale Replikationszyklus vollständig durchlaufen werden [2].

Um auch sich nicht teilende Zellen oder terminal differenzierte Zellen stabil zu transduzieren, wurden retrovirale Vektoren hergestellt, die sich von Lentiviren ableiten. Während die frühen lentiviralen Vektoren vom *Human immunodeficiency virus* (HIV) [3] und *Simian immunodeficiency virus* (SIV) abgeleitet wurden, sind inzwischen auch Vektorsysteme auf Grundlage des *Feline immunodeficiency virus* (FIV) [4], *Equine infectious anemia virus* (EIAV) [5], *Caprine arthritis encephalitis virus* (CAEV) [6], *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) [7] und *Visna-maedi virus* (VMV) [8] entwickelt worden.

Neben diesen weit verbreiteten Vektorsystemen wurden zudem Systeme basierend auf  $\alpha$ -Retroviren (z. B. dem *Rous sarcoma virus*, RSV) [9],  $\beta$ -Retroviren (z. B. dem *Mouse mammary tumor virus*, MMTV) [10] oder Spumaretroviren (z. B. dem *Eastern chimpanzee simian foamy virus*, SFVcpz) [11] entwickelt. Aufgrund ihrer geringen Verbreitung sind diese jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Stellungnahme.

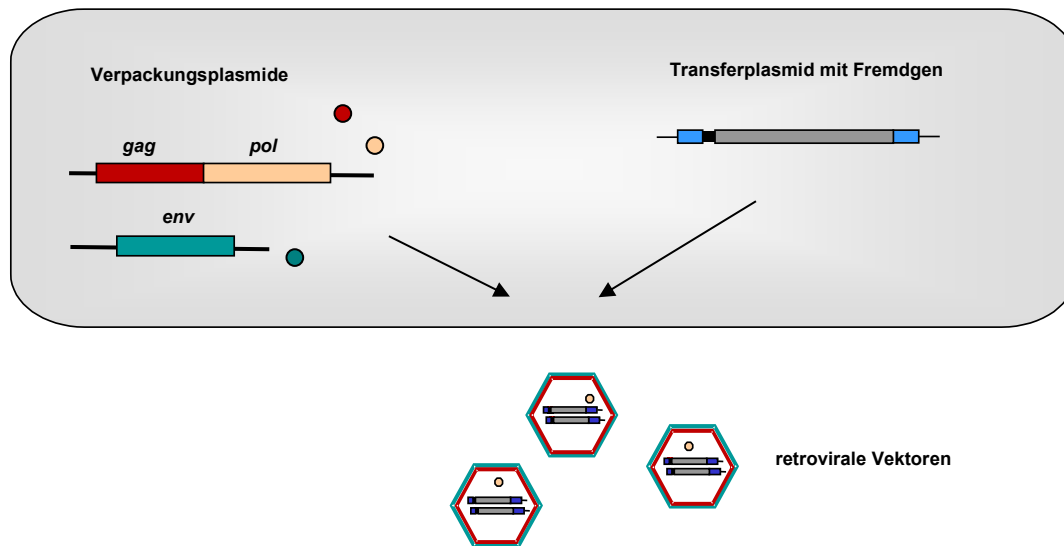
### 1.2.1 Design und Herstellung retroviraler Vektoren

Retrovirale Vektoren sind replikationsdefekte Virus-ähnliche Partikel, die eine Zielzelle infizieren (im Sinne von: Nukleinsäure auf eine Zielzelle übertragen) und dabei einen Nukleinsäureabschnitt in der Regel stabil in deren Genom integrieren. Ausgehend von dem so entstandenen Provirus können anschließend in der transduzierten Zelle ein oder mehrere Fremdgene dauerhaft exprimiert werden.

Für die Herstellung retroviraler Vektoren werden drei Komponenten benötigt: ein einem retroviralen Provirus ähnliches Transferplasmid mit dem zu übertragenden Fremdgen, (retro-)virale Strukturproteine zur Bildung Virus-ähnlicher Partikel sowie retrovirale Nichtstrukturproteine für die Integration des Fremdgens in das Genom einer Zielzelle (Abb. 2) [12].

Das typischerweise vom Vektor pBR328 abgeleitete Transferplasmid enthält neben dem Fremdgen das für die RNA-Verpackung notwendige Verpackungssignal  $\Psi$  und die für die reverse Transkription und Integration notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente. Zum einen ist dies die *primer binding site* (PBS), die die Bindung einer zellulären tRNA und so die Initiation der Minusstrang-Synthese während der reversen Transkription ermöglicht. Für die anschließende Initiation der Plusstrang-Synthese ist zudem der *polypurine tract* (PPT) notwendig. Daneben sind auch die vollständigen 5'- und 3'-LTR enthalten, welche den viralen Promotor, einen *enhancer*, das Polyadenylierungssignal und für die Integration des Provirus wichtige Sequenzen beinhalten. Zusätzlich können insbesondere bei lentiviralen Transferplasmiden verschiedene, zum Teil heterologe, virale regulatorische Elemente enthalten sein, die die Expression des Fremdgens, die Transduktionseffizienz des retroviralen Vektors oder seine Sicherheit verbessern. Häufige heterologe Elemente sind das *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) zur Steigerung der mRNA-Stabilität, des mRNA-Exports und der Translation, *upstream polyadenylation enhancer sequences* (USEs) z. B. des *Simian virus 40* (SV40) zur Erhöhung der Fremdgenexpression und der *Human cytomegalovirus major immediate-early* (HCMV MIE)-Promotor. Dieser wird oft alleine oder als Hybridpromotor in Kombination mit dem retroviralen Promotor innerhalb des 5'-LTR zur Kontrolle der Expression des Fremdgens eingesetzt. Das Fremdgen kann alternativ auch unter Kontrolle verschiedener anderer zellulärer oder viraler Promotoren stehen. Zur Erhöhung der Zielgenauigkeit der Fremdgenexpression kann neben dem Einsatz

induzierbarer oder zelltypspezifischer Promotoren zudem eine Bindestelle für eine zelluläre microRNA eingefügt werden. Hierdurch wird die Fremdgenexpression in bestimmten Zelltypen oder Differenzierungsstadien unterdrückt. Soll eine bicistronische Expressionskassette exprimiert werden, ist außerdem in der Regel eine *internal ribosome entry site* (IRES) eines Picornavirus zwischen die Fremdgene eingefügt [14].



## Abb. 2: Herstellung retroviraler Vektoren

Ein Transferplasmid mit dem zu übertragenden Fremdgen und allen für seine Integration, Expression und Verpackung notwendigen *cis*-regulatorischen Sequenzen wird in eine Zelle transfiziert, in der die essenziellen (retro-)viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine exprimiert werden. Dies wird entweder ebenfalls durch Transfektion entsprechender Verpackungsplasmide oder durch Transduktion der Zelllinie mit den Genen dieser Proteine erreicht. Ausgehend vom Transferplasmid wird anschließend eine dem Retrovirusgenom ähnliche RNA transkribiert. Zusammen mit dem Pol-Polyprotein, welches die für die spätere Integration erforderlichen Proteine Reverse Transkriptase und Integrase enthält, wird diese schließlich mithilfe der viralen Strukturproteine in Virus-ähnliche Partikel, die retroviralen Vektoren, verpackt und von der Zelle abgegeben. Abbildung modifiziert nach [13].

Das Transferplasmid, welches nicht für retrovirale Proteine kodiert, wird nach der Transfektion in eine geeignete Zelllinie durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Vermittelt durch das Verpackungssignal wird die RNA anschließend in Anwesenheit viraler Struktur- (Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid- und Hüllproteine) und Nichtstrukturproteine (mindestens Protease, Reverse Transkriptase und Integrase) in Virus-ähnliche Partikel verpackt und abgegeben. Die hierfür notwendigen (Poly-)Proteine werden in den Zellen ihrerseits entweder nach Transfektion entsprechender Verpackungsplasmide, die selbst kein Verpackungssignal besitzen, oder nach Transduktion ihrer jeweiligen Gene transient oder stabil exprimiert.

Das verwendete Hüllprotein kann hierbei vom gleichen Retrovirus oder von einem beliebigen anderen Virus stammen. Im zweiten Fall spricht man von Pseudotypisierung. Sie dient in erster Linie der Erweiterung bzw. Änderung des Wirtsbereichs oder des Zelltropismus der retroviralen Vektoren zur gezielten Infektion eines bestimmten Wirts, in der Regel des Menschen, und/oder bestimmter Zelltypen. Eine Reihe heterolog exprimierter viraler Hüllproteine wurden bereits erfolgreich für eine Pseudotypisierung verwendet. Zu den Spendern gehören z. B. Arenaviren [15], Alphaviren [16], Hepadnaviren [17], Flaviviren [18], Filoviren [19], Paramyxoviren [20] und Rhabdoviren [21]. Insbesondere wird das Glykoprotein des *Indiana vesiculovirus* (VSV-G) vielfach verwendet, um Retroviren mit einem breiten Wirtsbereich zu versehen, der humane Zellen mit einschließt. Zudem weisen einige pseudotypisierte retrovirale Vektoren, insbesondere solche mit dem VSV-G-Protein eine

höhere Partikelstabilität auf, die eine Konzentrierung durch Ultrazentrifugation erlaubt [22; 48]. Darüber hinaus kann ein spezifischer Zelltropismus erreicht werden, indem ein Bindungspartner eines zellulären Oberflächenproteins, wie z. B. die Erkennungsdomäne eines Antikörpers, mit einem viralen Hüllprotein fusioniert wird [23]. Da retrovirale Vektoren mit spezifischem Zelltropismus in erster Linie zur medizinischen Anwendung im Menschen dienen sollen, zielen diese in der Regel auf Epitope humaner Zellen ab. Der virale Fusionspartner ist oftmals das Hämagglutinin des Masernvirus (MeV-H) [20].

Werden die für die Verpackung, reverse Transkription und Integration essenziellen Gene sowie ggf. weitere regulatorische Gene mittels Transfektion übertragen, sind diese in der Regel auf zwei bis fünf Plasmide aufgeteilt. Entscheidend für die Sicherheit der retroviralen Vektoren ist hierbei, dass die Gene *gag/pol* und *env* auf zwei getrennten Verpackungsplasmiden vorliegen. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit des Entstehens replikationskompetenter re-troviraler Partikel deutlich reduziert, da dies zwei Rekombinationsereignisse zwischen drei Plasmiden erfordern würde [12]. Analog werden die Gene *gag/pol* und *env* auch bei der Herstellung stabil transduzierter Verpackungszelllinien getrennt voneinander eingeführt [24].

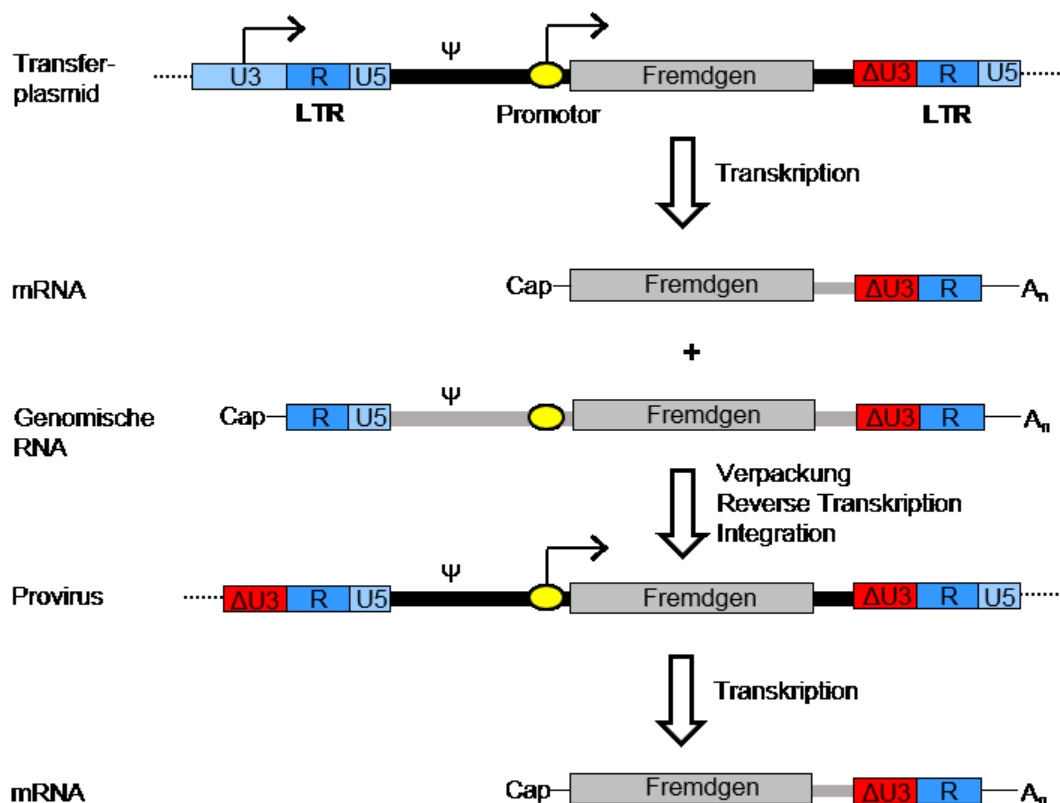
Neben der Gefahr des Entstehens replikationskompetenter Retroviren stellt die Möglichkeit einer Insertionsmutagenese das zweite Sicherheitsrisiko retroviraler Vektoren dar. Hierbei kann durch die zufällige Integration des Provirus in das zelluläre Genom ein zelluläres Proto-Onkogen aktiviert oder ein zelluläres Tumorsuppressorgen inaktiviert werden. Dies kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen: (I) das Provirus beeinflusst benachbarte *enhancer* oder Promotoren der Zelle und dadurch die Expression der von ihnen kontrollierten Gene, (II) die Anwesenheit des Provirus führt zu Veränderungen in der Chromatinstruktur regulatorischer Domänen und darüber zu einer Änderung der Genexpression, (III) der Promotor und der *enhancer* des Provirus aktivieren benachbarte zelluläre Proto-Onkogene, (IV) *transcriptional read-through* durch das retrovirale Polyadenylierungssignal führt zur Aktivierung benachbarter Proto-Onkogene, (V) alternatives Spleißen, vermittelt durch die retroviralen Spleißdonor- und -akzeptorsequenzen, führt zur Entstehung schädlicher Fusionsproteine, (VI) die Integration des Provirus innerhalb offener Leserahmen führt zur Bildung von Proteinfragmenten mit dominant-negativer Wirkung, (VII) die Integration des Provirus innerhalb offener Leseramen führt zum Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens [14; 25].

Retroviren weisen unterschiedliche Präferenzen hinsichtlich der Genregionen für ihre Integration auf. Während  $\gamma$ -Retroviren bevorzugt in CpG-Inseln, in regulatorische Elemente und in der Nähe von Transkriptionsstartstellen in 5'-flankierende Regionen integrieren, finden sich lentivirale Proviren eher innerhalb kodierender Bereiche eines Gens. Insgesamt scheint die Integration eines Lentivirus weniger genotoxisch zu sein als die eines  $\gamma$ -Retrovirus [25; 26].

Um der Gefahr einer Insertionsmutagenese zu begegnen, können verschiedene Modifikationen des Transferplasmids vorgenommen werden. Die bereits erwähnten USE- und WPRE-Elemente können z. B. die Wahrscheinlichkeit eines *read-through* in benachbarte zelluläre Gene deutlich verringern. Ebenso kann durch das Einfügen von *insulator*-Elementen die Aktivierung benachbarter Gene reduziert werden [14]. Die am weitesten verbreitete Sicherheitsmaßnahme ist jedoch das Einfügen einer Deletion innerhalb des am 3'-Ende liegenden U3-Abschnitts. Die resultierenden selbstinaktivierenden (SIN) Vektoren bieten im Vergleich zu ihren nicht-modifizierten Ausgangsvektoren mehrere Vorteile. Zum einen führt die Deletion dazu, dass das Provirus nach einmaliger Integration nicht wieder mobilisiert werden kann. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass bedingt durch den Mechanismus der reversen Transkription der unvollständige U3-Abschnitt ( $\Delta$ U3) auf das 5'-Ende des Provirus überschrieben wird. Da von der Deletion neben dem *enhancer* auch der retrovirale Promotor betroffen ist, wird hierdurch die Transkription genomischer RNA verhindert. Es kann daher selbst in Anwesenheit retroviraler Proteine nicht zu einer unkontrollierten, wiederholten Integration des rekombinanten Nukleinsäureabschnitts in das zelluläre Genom kommen (Abb. 3) [27]. Zum anderen werden durch die Deletion des retroviralen Promotors und des *enhancer* an beiden Enden des Provirus die negativen Auswirkungen auf die Expression benachbarter zellulärer Gene und auf die Elemente zur Steuerung der Transkriptionsaktivität

innerhalb des Provirus reduziert [14]. Um die Gefahr einer Insertionsmutagenese weiter zu verringern, werden inzwischen auch Ansätze verfolgt, bei denen die Integrase mit DNA-bindenden Domänen so modifiziert wird, dass die Integration gezielt in unschädliche Bereiche des zellulären Genoms erfolgt [28; 29]. Darüber hinaus wird auch durch Austausch speziell der lentiviralen Integrase gegen das Enzym von z. B.  $\alpha$ -Retroviren versucht, eine Integration in Bereiche des Genoms zu erreichen, in denen ein reduziertes Potenzial für eine Onkogenese nach Insertionsmutagenese besteht [14].

Als weitere Sicherheitsmaßnahme kann die PBS so mutiert werden, dass keine zelluläre tRNA an sie binden kann. Die reverse Transkription der Transfer-RNA ist daher von der Anwesenheit einer künstlichen tRNA abhängig, die in *trans*, entweder als synthetisierte tRNA oder als RNA-Polymerase-III-abhängiges Gen auf einem ko-transfizierten Plasmid, zur Verfügung gestellt wird [30].



**Abb. 3: Integration eines selbstinaktivierenden (SIN) Vektors**

In den U3-Abschnitt am 3'-Ende der retroviralen cDNA wird eine Deletion eingefügt ( $\Delta$ U3), die den in diesem Abschnitt enthaltenen viralen Promotor inaktiviert. Nach der Transkription des Transferplasmids durch die zelluläre RNA-Polymerase II wird ausgehend vom Promotor im intakten 5'-U3-Abschnitt die retrovirale genomische RNA gebildet. Diese wird in Anwesenheit viraler Struktur- und Nichtstrukturproteine verpackt. Die resultierenden Vektoren können anschließend zur Transduktion weiterer Zellen genutzt werden. Aufgrund des Mechanismus der reversen Transkription wird in diesen Zellen der  $\Delta$ U3-Abschnitt des 3'-Endes der genomischen RNA auf das 5'-Ende des Plusstranges der resultierenden cDNA übertragen. Das nach der Integration in das Wirtsgenom entstehende Provirus besitzt somit keinen Promotor an seinem 5'-Ende über den erneut genomische RNA transkribiert werden könnte. Das Provirus ist somit nicht mehr mobilisierbar. Die entsprechenden Vektoren sind demnach nach einmaliger Integration selbstinaktivierend. Abbildung modifiziert nach [31].

### 1.2.2 Murine $\gamma$ -retrovirale Vektoren

Murine  $\gamma$ -retrovirale Vektoren können entweder durch Ko-Transfektion des Transferplasmids und typischerweise zweier Verpackungsplasmide oder durch die Transfektion des Transferplasmids in eine Verpackungszelllinie hergestellt werden. Je nach Art der hierbei exprimierten Hüllproteine wird zwischen ecotropen, amphotropen und xenotropen murinen  $\gamma$ -

retroviralen Vektoren unterschieden. Der Wirtsbereich der ecotropen Vektoren beschränkt sich auf Zellen von Mäusen und Ratten. Amphotrope Vektoren besitzen demgegenüber einen breiteren Wirtsbereich, der sowohl murine als auch nicht-murine, einschließlich humane Zellen einschließt. Ähnlich hierzu besitzen auch xenotrope Vektoren einen breiten Wirtsbereich, einschließlich des Menschen. Sie können jedoch die meisten Mauslaborstämme nicht infizieren [31]. Zunehmend werden bei der Entwicklung retroviraler Vektoren die Hüllproteine der murinen  $\gamma$ -Retroviren modifiziert oder ausgetauscht, um einen breiteren Wirtsbereich, einen auf einen bestimmten Zelltyp ausgerichteten Tropismus oder eine höhere Stabilität des Vektors zu erzielen [32].

### 1.2.3 Lentivirale Vektoren

Da etablierte Zelllinien die Expression des lentiviralen *gag/pol*-Gens in der Regel nicht gut tolerieren, ist die Etablierung von Verpackungszelllinien für lentivirale Vektorsysteme nur in induzierbaren oder attenuierten Systemen möglich [33]. Daher werden lentivirale Vektoren typischerweise mittels Ko-Transfektion aller notwendigen Plasmide hergestellt. Je nach Produktionssystem sind dies drei bis sechs Plasmide. Auf diesen sind, wie bei den  $\gamma$ -retroviralen Vektoren, das Polyprotein Gag-Pol sowie in der Regel ein heterologes Hüllprotein zur Erweiterung des engen lentiviralen Wirtsbereichs und Zelltropismus kodiert. Daneben werden für eine effiziente Vektorproduktion und Transduktion jedoch weitere regulatorische Proteine und ihre Erkennungssequenzen benötigt. Zum einen ist dies das Protein Rev, welches in Abhängigkeit des *rev response element* (RRE) den Transport einfach gespleißter und ungespleißter viraler RNA aus dem Kern vermittelt und deren Translation im Zytoplasma ermöglicht. Zudem werden RNA-Moleküle mit dem RRE bis zu 70mal effizienter in virale Kapside verpackt [14]. Darüber hinaus kann der lentivirale Transkriptions-Transaktivator Tat auf einem der Plasmide kodiert sein. Dieser ist für die Erkennung des natürlichen lentiviralen Promotors essenziell und bindet dort an das *trans-activation response element* (TAR), eine *cis*-regulatorische Sequenz, die am 5'-Ende der viralen RNA und DNA gelegen ist. Bei neueren Systemen ist dieses Protein jedoch nicht mehr notwendig, da zunehmend Hybrid-Promotoren bestehend aus dem lentiviralen Promotor und dem von HCMV oder dem vom  $\alpha$ -Retrovirus RSV eingesetzt werden. Bei den neuesten lentiviralen Produktionssystemen kommt zudem das Protein Vpr zum Einsatz, um den Transport des Pol-Polyproteins in die Partikel zu gewährleisten (TaKaRa Lenti-X packaging system). Ein weiteres, ausschließlich Nukleinsäure basiertes, regulatorisches Element ist die Kombination aus dem *central polypurine tract* (cPPT), einer Kopie des am 3'-Ende befindlichen PPT, und der *central termination sequence* (cTS). Zusammen führen diese Elemente zu einer erhöhten Integration und damit zur Steigerung der Transduktionseffizienz der Vektoren. Dies ist möglicherweise auf einen verbesserten Zellkernimport des Präintegrationskomplexes zurückzuführen [34].

Im Gegensatz zu Produktionssystemen der 1. Generation, welche alle lentiviralen Proteine auf zwei Verpackungsplasmiden kodieren, zeichnen sich die Produktionssysteme der 2., 3. oder neuerer Generationen dadurch aus, dass die kodierenden Nukleinsäureabschnitte auf ein notwendiges Minimum reduziert wurden. Entsprechend bieten diese Systeme eine deutlich höhere Sicherheit als Systeme der 1. Generation. Aufgrund des kompakten Genomaufbaus von Lentiviren weisen Verpackungsplasmide jedoch homologe Bereiche zum Transferplasmid auf. So überlappt das Verpackungssignal  $\Psi$  mit bis zu 400 bp mit dem *gag*-Gen, wobei eine Überlappung von 40 bp essenziell ist. Ebenso beinhaltet das bis zu 850 bp lange RRE Abschnitte des *env*-Gens. Schließlich überlappt auch der cPPT mit 130 bp mit dem *pol*-Gen [12; 14]. Eine Rekombination zwischen den mindestens drei Plasmiden eines lentiviralen Produktionssystems wurde jedoch noch nie beschrieben und ist auch nicht als wahrscheinlich anzusehen [14].

### 1.2.4 Adenovirus/Retrovirus-Hybridvektoren

Um eine effiziente Genübertragung und eine dauerhafte Genexpression zu erreichen, wurden chimäre Vektoren auf der Basis adenoviraler und retroviraler Vektoren entwickelt [35; 36]. Bei diesen Vektoren übertragen drei replikationsdefekte adenovirale Vektoren nach Ko-Infektion das Transferkonstrukt mit dem Fremdgen, die retroviralen Verpackungsfunktionen (*gag/pol*-

Gen) und ein *env*-Gen auf eine Zelle, die damit zur Produzentenzelle retroviraler Vektoren wird. Die abgegebenen retroviralen Vektoren können dann weitere Zellen stabil transduzieren. Die Risikobewertung der Herstellung der hierfür notwendigen adenoviralen Vektoren erfolgt gemäß der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mithilfe von Adenovirus Typ 5 (Az.: 6790-10-28, 3. überarbeitete Fassung vom November 2011). Die Risikobewertung von Zellen nach Ko-Infektion mit den drei adenoviralen Vektoren orientiert sich, wie bei einer mit einem retroviralen Plasmid transfizierten Verpackungszelllinie, an der Art der abgegebenen retroviralen Vektoren.

### 1.3 Transiente Genexpression mithilfe retroviraler Vektoren

Angesichts der Möglichkeit einer Insertionsmutagenese bei Verwendung integrativer retroviraler Vektoren wurden in letzter Zeit retrovirale Vektoren für eine transiente Genexpression entwickelt. Bei diesen Ansätzen werden gezielt Proteine oder regulatorische Nukleinsäureabschnitte, die essenziell für die reverse Transkription oder anschließende Integration des Transferkonstrukts sind, mutiert. Die Produktion entsprechender retroviraler Vektoren erfolgt wie für die klassischen retroviralen Vektoren beschrieben.

#### 1.3.1 Integrase-defekte Vektoren

Die Integration der retroviralen cDNA wird von der viralen Integrase katalysiert. Dieses Protein, welches Teil des Pol-Polyproteins ist, verfügt sowohl über eine Endonuklease- als auch eine Ligaseaktivität. Um eine Integration zu vermeiden, sind dieses Protein und seine Erkennungssequenzen daher offensichtliche Ziele für eine Mutagenese.

Mutationen, die die Integraseaktivität inhibieren, werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse-I-Mutationen betreffen ausschließlich die Integration und haben keinen Effekt auf andere Stadien der retroviralen Replikation. Demgegenüber verursachen Klasse-II-Mutationen pleiotrope Effekte, die auch andere Abläufe der Virusreplikation beeinflussen. So können sich Klasse-II-Mutationen z. B. auch negativ auf die reverse Transkription und Partikelbildung auswirken. Sie sind für die Generierung retroviraler Vektoren daher ungeeignet [26; 37]. Unter den Klasse-I-Mutationen nehmen Mutationen der in allen Retroviren und Retrotransposons konservierten Aminosäuren der sogenannten katalytischen Triade Asp-Asp-Glu eine besondere Stellung ein. Bei der HIV-Integrase (HIV-IN) sind dies die Aminosäuren Asp64, Asp116 und Glu152; bei der MLV-Integrase die Aminosäuren Asp125, Asp184 und Glu220. Integrase-defekte retrovirale Vektoren weisen typischerweise eine Mutation dieser Aminosäuren auf, wobei bei HIV-basierten Vektoren die Mutation Asp64Val die am häufigsten eingebrachte Mutation ist [31]. Weitere mögliche Mutationen betreffen Aminosäuren, die die DNA-Bindung des Enzyms vermitteln, wie im Fall des HIV-Proteins Asn120, Gln148, Trp235, Arg262, Arg263, Lys264, Lys266 und Lys273. Auch Mutationen, die die erforderliche Multimerisierung des Enzyms verhindern, wie His12 (HIV-IN), sind denkbar [26]. Schließlich können auch die Erkennungssequenzen der Integrase, die sogenannten *attachment sites* (att), innerhalb des U3- und U5-Abschnitts durch Mutation inaktiviert werden [37].

Wird die Integration des revers-transkribierten DNA-Intermediats verhindert, kommt es aufgrund der Aktivität zellulärer DNA-Reparaturenzyme zur Anreicherung zirkulärer, doppelsträngiger DNA-Formen. Vermittelt durch den im retroviralen LTR liegenden Promotor oder zusätzliche Promotoren können diese auch bei der natürlichen Replikation eines Retrovirus vorkommenden Nebenprodukte mit etwas geringerer Effizienz als das integrierte Provirus transkribiert werden. Eine Replikation der episomalen Formen findet hingegen nicht statt. Aufgrund ihrer hohen Stabilität werden sie jedoch in der Regel erst bei fortschreitender Zellteilung durch Verdünnung aus den Zellen entfernt [38; 39]. Integrase-defekte retrovirale Vektoren können daher der transienten Genexpression dienen. Werden zusätzlich regulatorische Elemente in das Transferkonstrukt eingefügt, die eine Replikation ermöglichen, kann auch eine stabile Expression der Episome erreicht werden [12].

Obwohl die Integraseaktivität dieser Vektoren inhibiert wurde, zeigen Studien, dass es nach wie vor zu einer Integration des Transferkonstrukts kommen kann. Grund hierfür sind die



zellulären Reparaturmechanismen, die zu einer Integrase-unabhängigen Insertion des Transferkonstrukts in bestehende Doppelstrangbrüche führen [38]. Die Häufigkeit dieser unspezifischen Insertionen variiert deutlich. Je nach untersuchtem System wurde die Integrationshäufigkeit im Vergleich zu einem integrationskompetenten Vektor um das 10- bis 10000fache reduziert [26]. Unter Berücksichtigung der hohen Variabilität und der zum Teil geringen Reduktion von Integrationsereignissen kann bei Integrase-defekten retroviralen Vektoren nicht davon ausgegangen werden, dass der Gefahr einer Insertionsmutagenese hinreichend entgegengewirkt wurde. Die Möglichkeit einer Insertionsmutagenese geht daher weiter vollständig in die Sicherheitsbewertung solcher Vektoren ein.

### 1.3.2 mRNA-Transfer mithilfe retroviraler Vektoren

Ein weiterer Ansatz zur transienten Genexpression ist der sogenannte *retrovirus particle-mediated mRNA transfer* (RMT). Dieser macht sich zunutze, dass die in einem retroviralen Partikel verpackten RNA-Moleküle sowohl ein 5'-Cap als auch eine 3'-Polyadenylierung besitzen. Sie stellen daher funktionelle mRNAs dar und werden von der zellulären Maschinerie translatiert, sofern es nicht zur reversen Transkription der RNA kommt [40].

Die reverse Transkription kann prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen inhibiert werden. Zum einen kann die Reverse Transkriptase inaktiviert werden. Zum anderen kann die für die Initiation der cDNA-Minusstrang-Synthese notwendige PBS so mutiert werden, dass sie von keiner zellulären tRNA erkannt wird. Letzterer Ansatz wurde bereits aufgrund von Sicherheitsüberlegungen entwickelt und wird nun in Abwesenheit einer artifiziellen tRNA für die transiente Genexpression genutzt [31].

Da es bei diesem Ansatz nicht zur Bildung von doppelsträngiger DNA kommt, ist eine Insertionsmutagenese sicher auszuschließen. Vektoren, die eine Transfer-RNA mit einer mutierten PBS enthalten, besitzen demnach kein Gefährdungspotenzial, sofern sie in Abwesenheit der komplementären artifiziellen tRNA hergestellt wurden.

## **2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit retroviralen Vektoren**

Bei der Herstellung HIV-abgeleiteter lentiviraler Vektoren ist die Wahrscheinlichkeit des Entstehens replikationskompetenter HIV-Partikel der entscheidende Aspekt der Sicherheitsbewertung, da HIV-Partikel für den Menschen pathogen und der Risikogruppe 3\*\* zuzuordnen sind. Bei murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren spielt dieser Aspekt in der Risikobewertung hingegen eine untergeordnete Rolle, da replikationskompetente und replikationsdefekte murine  $\gamma$ -Retroviren in Abhängigkeit von ihrem Wirtsspektrum der gleichen Risikogruppe zuzuordnen sind.

Eine Vermehrungsfähigkeit eigentlich replikationsdefekter retroviraler Vektoren ist dann gegeben, wenn durch Rekombinationsereignisse zwischen homologen Sequenzen der Verpackungsplasmide bzw. des Genoms der Verpackungszelllinie und dem Transferplasmid replikationskompetente Retroviren entstehen. Die Wahrscheinlichkeit des **Entstehens replikationskompetenter Viruspartikel** ist abhängig von der Anzahl der Verpackungsplasmide, auf die die für die Bildung von retroviralen Vektoren notwendigen Gene verteilt sind. So wird die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses deutlich verringert, wenn das *gag/pol*-Gen und das Gen des Hüllproteins auf getrennten Verpackungsplasmiden vorliegen. Bei lentiviralen Produktionssystemen ist dies ab der 2. Generation der Fall. Daher ist bei der Herstellung lentiviraler Vektoren unter Verwendung von Verpackungssystemen der 2., 3. oder neuerer Generation nicht von einer Rekombination zu replikationskompetenten Lentiviren auszugehen. Zusätzlich kann durch das Verringern von Sequenzhomologien zwischen Transfer- und Verpackungsplasmiden bzw. Verpackungszelllinie, z. B. durch Kodon-Optimierung, sowie das Einbringen zusätzlicher Stoppkodons, Deletionen und Mutationen, die im Falle einer Rekombination zu einem Replikationsdefekt führen, die Sicherheit retroviraler Vektoren weiter erhöht werden.

Auch bei Bestehen eines Replikationsdefekts kann von retroviralen Vektoren ein Gefährdungspotenzial für den Menschen ausgehen. Dies ist darin begründet, dass im Verlauf

der Infektion das provirale Genom ungerichtet in das Genom der Wirtszelle integriert und so in Einzelfällen durch **Insertionsmutagenese** die Änderung der Transkriptionsaktivität regulatorischer Gene, die Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene oder die Deaktivierung zellulärer Tumorsuppressorgene verursachen kann. Das Risiko dieses Ereignisses wird durch die potenziellen Zielzellen sowie durch natürliche Abwehrmechanismen des infizierten Organismus definiert und kann durch verschiedene Modifikationen der Transferplasmids reduziert werden.

Für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren ist allein das von den Vektoren erreichte **Wirtsspektrum** maßgeblich. Bei ecotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren ist aufgrund der Restriktion des Zelltropismus in der Regel ein Gefährdungspotenzial für Menschen oder Tiere nicht anzunehmen (siehe Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung ecotroper C-Typ-Retroviren der Maus, Az. 6790-10-47, April 1996). Auch bei Kontamination dieser Vektoren mit replikationskompetenten ecotropen murinen  $\gamma$ -Retroviren liegt kein Gefährdungspotenzial für den Menschen oder Tiere vor. Bei amphotropen oder xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren kann ein geringes Gefährdungspotenzial für den Menschen nicht ausgeschlossen werden, da Primatenzellen sowohl *in vitro* als auch unter bestimmten Bedingungen *in vivo* mit diesen Vektoren infizierbar sind [1; 31; 41]. Murine  $\gamma$ -retrovirale Vektoren mit veränderten Hüllproteinen können in der Regel humane und andere Zellen infizieren. Dementsprechend ist ihr Gefährdungspotenzial dem von amphotropen und xeno-tropen Vektoren gleichzusetzen. Zudem ist beim experimentellen Umgang mit diesen Pseudotypen zu berücksichtigen, dass der Vektor auch andere Übertragungswege als die des Wildtyp-Virus benutzen könnte [32].

### 3. Anwendung retroviraler Vektoren an Tieren

Retrovirale Vektoren werden häufig verwendet, um tierische Zellen *ex vivo* zu transduzieren und diese anschließend in ein Labortier einzubringen. Alternativ kann auch eine direkte Injektion retroviraler Vektoren in Versuchstiere zur *in situ*-Transduktion erfolgen. Da es sich bei den hierfür genutzten Virus-ähnlichen Partikeln und transduzierten Zellen um gentechnisch veränderte Organismen (GVO) handelt, muss die entsprechende gentechnische Arbeit gemäß § 8 Abs. 1 GenTG in einer gentechnischen Anlage erfolgen.

Durch die Transduktion bzw. das Einbringen transduzierter somatischer Zellen wird das Versuchstier selbst jedoch nicht zu einem GVO im Sinne des § 3 Abs. 3 GenTG. Dies ist wie folgt zu begründen: Von der Transduktion sind lediglich einige somatische Zellen, nicht jedoch Keimbahnzellen betroffen. Das Tier kann die durch Transduktion eingeführte gentechnische Veränderung nicht vererben. Es liegt demnach keine Veränderung des Erbguts des Tieres vor. Werden mittels Transduktion hingegen gezielt Zellen der Keimbahn eines Versuchstiers gentechnisch verändert, sind das Tier und seine Nachkommen aufgrund der Möglichkeit einer Vererbung der gentechnischen Veränderung als GVO anzusehen.

Eine eigenständige Bewertung von Zellen ist gemäß § 3 Abs. 1a GenTG lediglich für eukaryotische Zellen in Zellkultur und damit im Kontext einer *in vitro*-Kultivierung vorgesehen. Entsprechend unterliegen die gezielte Entnahme transduzierter Zellen aus dem Tier und ihre weitere Kultivierung den Regelungen des GenTG. Die im Tier enthaltenen transduzierten Zellen sind im Kontext der biologischen Einheit Tier jedoch nicht als eigenständige GVO anzusehen. Dies gilt auch dann, wenn es sich hierbei um artfremde Zellen handelt. Die Anwesenheit transduzierter Zellen macht das Tier damit nicht zu einem Träger von GVO.

Die mit retroviralen Vektoren behandelten Tiere sind jedoch so lange als Träger von GVO anzusehen, wie die Virus-ähnlichen Partikel in diesen Tieren nachzuweisen sind. Die Frage ob und ggf. bis wann es sich bei den entsprechenden Versuchstieren um Träger von GVO handelt, ist demnach von der Stabilität der infektiösen retroviralen Vektoren abhängig. Hierzu gibt es verschiedene Studien. Für unmodifizierte retrovirale Vektoren werden je nach Produktionszelllinie und der damit einhergehenden Zusammensetzung der Zellmembran Halbwertszeiten von 2 – 8 h in Zellkulturmedium bei 37 °C angegeben [42]. Ein lentiviraler Vektor, pseudotypisiert mit dem VSV-G-Protein, zeigte demgegenüber eine Halbwertszeit von 24 h in Zellkulturmedium bei 37 °C. Nach intravenöser Injektion des gleichen Vektors in Ratten

wurde jedoch ausgehend von  $10^7$  *transduction units* (TU) bereits nach der ersten Stunde eine Reduktion infektiöser Partikel im Plasma um 4 log-Stufen beobachtet. Nach 24 h wurden keine infektiösen Partikel detektiert (Nachweisgrenze 50 TU/Tier) [43]. In einer weiteren Studie mit einem VSV-pseudotypisierten lentiviralen Vektor wurde nach intravenöser Injektion von  $10^9$  *infectious units* (IU) in Mäuse nach einem Tag keine Vektor-RNA in Blut (Nachweisgrenze 10 IU/ml), Urin oder Fäzes nachgewiesen. Es wurden außerdem zu keinem Zeitpunkt des Experiments infektiöse Partikel auf den Oberflächen der Käfiginnenseite gefunden, obwohl Kontrollexperimente zeigten, dass die retroviralen Vektoren auf Plastikoberflächen bei Raumtemperatur bis zu 24 h und auf feuchter Streu bis zu 72 h infektiös bleiben. Von der Injektionsstelle konnten infektiöse Partikel bis zu 24 h nach der Injektion isoliert werden [44]. Ausgehend von diesen Daten ist zu erwarten, dass in Tieren, die mit replikationsdefekten retroviralen Vektoren transduziert wurden, einen Tag nach der Injektion keine rekombinanten infektiösen Partikel mehr vorliegen. Auch mit einer Abgabe dieser Partikel ist demnach spätestens ab diesem Zeitpunkt nicht mehr zu rechnen. Sofern die Injektionsstelle desinfiziert wurde und ein Käfigwechsel erfolgt ist, unterliegt der Umgang mit diesen Tieren ab diesem Zeitpunkt nicht mehr den Regelungen des GenTG.

Im Gegensatz zu *in situ*-transduzierten Tieren sind Tiere, auf die *ex vivo*-transduzierte Zellen übertragen wurden, nur dann initial Träger von GVO, wenn den Zellen infektiöse retrovirale Vektoren anhaften. Um dies auszuschließen, sollten die transduzierten Zellen mehrmalig Waschschritten unterzogen werden. So führte in einer Studie mit lentiviral transduzierten 293-Zellen z. B. das zweimalige Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer 100fachen Reduktion der freien Partikel. Nach zweimaliger Passage wurde schließlich keine Vektor-RNA mehr detektiert (Nachweisgrenze 260 Kopien/ml) [45].

Ist aufgrund des Produktionssystems der retroviralen Vektoren von einer Kontamination mit replikationskompetenten Retroviren auszugehen und sind die Versuchstiere für diese potenziell permissiv, kann eine Abgabe gentechnisch veränderter Viren nicht ausgeschlossen werden. Tiere, die mit den entsprechenden Vektorlösungen infiziert wurden oder auf die mit diesen Lösungen transduzierte Zellen übertragen wurden, sind daher dauerhaft als Träger von GVO anzusehen. Darüber hinaus sind diese ggf. auch in der Lage, GVO abzugeben. Der Umgang mit solchen Tieren unterliegt demnach dauerhaft den Regelungen des GenTG.

#### 4. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit retroviralen Vektoren

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit retroviralen Vektoren zusammengefasst.

##### Einbringen eines Transfer- oder Verpackungsplasmids in *E. coli*:

- 4.1 Werden subgenomische virale oder zelluläre Nukleinsäureabschnitte mithilfe eines Transfer- oder Verpackungsplasmids in ein *E. coli* K12-Derivat eingeführt, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

##### Erzeugung ecotroper muriner $\gamma$ -retroviraler Vektoren:

- 4.2. Werden ein Transferplasmid und ein oder mehrere Verpackungsplasmide, welche auf einem murinen  $\gamma$ -Retrovirus basieren, in eine Zelllinie der **Risikogruppe 1** transfiziert, und sind die kodierten Hüllproteine ausschließlich ecotrop, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.3. Wird ein Transferplasmid in eine Verpackungszelllinie mit Genen eines murinen  $\gamma$ -Retrovirus eingeführt und sind die kodierten Hüllproteine ausschließlich ecotrop, so

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

- 4.4. Ecotrope murine  $\gamma$ -retrovirale Vektoren, die von den unter 4.2. und 4.3. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, auch wenn von einer Kontamination mit replikationskompetenten ecotropen murinen  $\gamma$ -Retroviren auszugehen ist. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

#### **Erzeugung amphotroper oder xenotroper muriner $\gamma$ -retroviraler Vektoren:**

- 4.5. Werden ein Transferplasmid und ein oder mehrere Verpackungsplasmide, welche auf einem murinen  $\gamma$ -Retrovirus basieren, in eine Zelllinie der **Risikogruppe 1** transfiziert, und sind amphotrope oder xenotrope Hüllproteine kodiert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.6. Wird ein Transferplasmid in eine Verpackungszelllinie mit Genen eines murinen  $\gamma$ -Retrovirus eingeführt, in der amphotrope oder xenotrope Hüllproteine kodiert sind, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.7. Wird ein Transferplasmid in eine Ko-Kultur zweier Verpackungszelllinien mit Genen eines murinen  $\gamma$ -Retrovirus eingeführt, in denen ecotrope und amphotrope oder xenotrope Hüllproteine kodiert sind, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.8. Werden amphotrope Verpackungszelllinien der **Risikogruppe 1** mit den unter 4.4. beschriebenen ecotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren transduziert, sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.9. Amphotrope und xenotrope murine  $\gamma$ -retrovirale Vektoren, die von den unter 4.5., 4.6., 4.7. und 4.8. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, auch wenn von einer Kontamination mit replikationskompetenten amphotropen oder xenotropen murinen  $\gamma$ -Retroviren auszugehen ist. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.10. Ist bei den wie unter 4.5., 4.6. oder 4.7. erzeugten amphotropen und xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren die Integraseaktivität durch Mutation inaktiviert, sind die mutierten Vektoren aufgrund ihrer beschriebenen Neigung zur unspezifischen Integration der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

- 4.11. Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die die unter 4.10. beschriebenen mutierten amphotropen oder xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren abgeben, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.12. Ist bei den wie unter 4.5., 4.6. oder 4.7. erzeugten amphotropen und xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren die reverse Transkription durch Mutation der PBS inhibiert, sind die mutierten Vektoren der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Infektion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.13. Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die die unter 4.12. beschriebenen mutierten amphotropen oder xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren abgeben, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

#### Erzeugung lentiviraler Vektoren:

- 4.14. Werden ein Transferplasmid und mindestens zwei Verpackungsplasmide der 2., 3. oder neuerer Generation, welche auf einem Lentivirus basieren, in eine Zelllinie der **Risikogruppe 1** transfiziert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Das Gen des Hüllproteins und das *gag/pol*-Gen müssen hierbei auf getrennten Verpackungsplasmiden vorliegen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.15. Lentivirale Vektoren, die von den unter 4.14. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Von einer Rekombination zwischen den Plasmiden zu replikationskompetenten Lentiviren ist bei Verwendung von Verpackungssystemen der 2., 3. oder neuerer Generation nicht auszugehen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.16. Ist bei den wie unter 4.14. erzeugten lentiviralen Vektoren die Integraseaktivität durch Mutation inaktiviert, sind die mutierten Vektoren aufgrund ihrer beschriebenen Neigung zur unspezifischen Integration der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.17. Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die die unter 4.16. beschriebenen mutierten lentiviralen Vektoren abgeben, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.18. Ist bei den wie unter 4.14. erzeugten lentiviralen Vektoren die reverse Transkription durch Mutation der PBS inhibiert, sind die mutierten Vektoren der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Infektion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.19. Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die die unter 4.18. beschriebenen lentiviralen Vektoren abgeben, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

Hinweis: Aufgrund seiner höheren Sicherheit wird für die Erzeugung HIV-abgeleiteter lentiviraler Vektoren die Nutzung eines SIN-Transferplasmids empfohlen.

#### **Retrovirale Vektoren mit modifizierten Hüllen:**

- 4.20. Wird bei der unter 4.14., 4.16. oder 4.18. beschriebenen Erzeugung lentiviraler Vektoren das lentivirale *env*-Gen gegen das Gen eines Hüllproteins eines ecotropen murinen  $\gamma$ -Retrovirus ausgetauscht, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.21. Pseudotypisierte lentivirale Vektoren mit ausschließlich ecotropen Hüllproteinen, die von den unter 4.20. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion bzw. Infektion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.22. Wird bei der unter 4.5., 4.6., 4.10., 4.14. oder 4.16. beschriebenen Erzeugung retroviraler Vektoren das retrovirale *env*-Gen gegen das ggf. modifizierte Gen eines Hüllproteins eines beliebigen Virus (ausgenommen unmodifizierte Proteine eines ecotropen murine  $\gamma$ -Retrovirus) ausgetauscht oder wird dieses Gen zusätzlich exprimiert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.23. Pseudotypisierte retrovirale Vektoren mit ggf. modifizierten Hüllproteinen fremder Viren, die von den unter 4.22. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, sofern es sich bei den Hüllproteinen nicht ausschließlich um nicht modifizierte Proteine ecotroper muriner  $\gamma$ -Retroviren handelt. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Transduktion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.24. Wird bei der unter 4.12. oder 4.18. beschriebenen Erzeugung retroviraler Vektoren das retrovirale *env*-Gen gegen das ggf. modifizierte Gen eines Hüllproteins eines beliebigen Virus ausgetauscht oder wird dieses Gen zusätzlich exprimiert, so sind die gentechnisch veränderten Organismen weiterhin der **Risikogruppe 1** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.25. Pseudotypisierte retrovirale Vektoren mit ggf. modifizierten Hüllproteinen fremder Viren, die von den unter 4.24. beschriebenen Zelllinien abgegeben werden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern ihre reverse Transkription durch Mutation der PBS inhibiert wurde. Gentechnische Arbeiten mit diesen Vektoren, einschließlich der Infektion weiterer Zellen der **Risikogruppe 1** sowie der Inokulation von Tieren, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

#### **Infektion von Zellen mit retroviralen Vektoren:**

- 4.26. Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit den unter 4.4. oder 4.21. beschriebenen ecotropen retroviralen Vektoren transduziert wurden, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern die transduzierten Zellen keine retroviralen Vektoren mit

erweitertem Wirtsbereich abgeben. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.

- 4.27. Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit den unter 4.9., 4.10., 4.12., 4.15., 4.16., 4.18., 4.23. oder 4.25. beschriebenen retroviralen Vektoren transduziert bzw. infiziert wurden, bei denen nicht von einer Kontamination mit replikationskompetenten Retroviren auszugehen ist, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern die Zellen den Replikationsdefekt nicht komplementieren und den Zellen keine infektiösen retroviralen Vektoren mehr anhaften. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
- 4.28. Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit den unter 4.9. beschriebenen amphotropen oder xenotropen murinen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren transduziert wurden, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen, wenn von einer Kontamination mit replikationskompetenten Retroviren auszugehen ist oder wenn die Zellen den Replikationsdefekt komplementieren. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.
- 4.29. Primäre Zellen der **Risikogruppe 2**, die mit den unter 4.4., 4.9., 4.10., 4.12., 4.15., 4.16., 4.18., 4.21., 4.23. oder 4.25. beschriebenen retroviralen Vektoren transduziert bzw. infiziert wurden, sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

#### **Hinweise zu gentechnischen Arbeiten mit retroviralen Vektoren an Tieren:**

1. Werden transduzierte Keimbahnzellen oder retrovirale Vektoren, die Keimbahnzellen transduzieren sollen, auf Tiere übertragen, sind diese Tiere und ihre Nachkommen als GVO anzusehen.
2. Bei der Übertragung von retroviralen Vektoren auf Tiere entstehen keine transgenen Tiere, wenn ausschließlich somatische Zellen transduziert werden. Sofern die Tiere den Replikationsdefekt der retroviralen Vektoren nicht komplementieren, sind sie zudem nicht in der Lage, GVO abzugeben. Aufgrund der geringen Stabilität retroviraler Vektoren sind die mit ihnen infizierten Tiere nach einem Tag und der Desinfektion der Injektionsstelle auch nicht mehr als Träger von GVO anzusehen. Nach Ablauf dieser Frist und einem Käfigwechsel unterliegt die Haltung dieser Tiere dementsprechend nicht mehr den Regelungen des GenTG.

Retrovirale Vektoren übertragen subgenomische retrovirale Nukleinsäureabschnitte und einen heterologen Nukleinsäureabschnitt. Der heterologe Nukleinsäureabschnitt komplementiert den Replikationsdefekt nicht. Sofern auch das Tier den Replikationsdefekt nicht komplementiert, erfolgt eine abortive Infektion. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und daher auch nicht auf weitere Zellen übertragen. Es entstehen keine neuen retroviralen Partikel. Die Übertragung der Nukleinsäure erfolgt auf somatische Zellen des Tieres. Es kommt lediglich zur transienten Verweildauer des Transgens im Tier. Es ist nicht davon auszugehen, dass eine Übertragung und Integration der Nukleinsäure in die Keimbahnzellen stattfindet.

3. Tiere, auf die die unter 4.26. oder 4.27. beschriebenen transduzierten Zellen übertragen wurden, sind keine GVO, sofern es sich bei den Zellen um somatische Zellen handelt. Sie sind zudem auch nicht in der Lage, GVO abzugeben. Wenn sichergestellt ist, dass den Zellen keine infektiösen retroviralen Vektoren anhaften, sind die Tiere auch nicht als Träger von GVO anzusehen. Dies gilt auch dann, wenn es sich bei den transduzierten Zellen um artfremde Zellen handelt. Unter der genannten Voraussetzung unterliegt die Haltung dieser Tiere dementsprechend nicht den Regelungen des GenTG.

Die Zellen komplementieren den viralen Replikationsdefekt nicht. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und daher auch nicht auf weitere Zellen übertragen. Es entstehen keine neuen retroviralen Partikel.

4. Tiere, auf die die unter 4.28. und 4.29. beschriebenen Zellen übertragen wurden, sind keine GVO, sofern es sich bei den Zellen um somatische Zellen handelt. Die Bewertung erfolgt auf der Grundlage des Gefährdungspotenzials der mithilfe der transduzierten Zellen eingebrachten replikationskompetenten Viren. Zum einen könnte es sich um ecotrope, amphotrope oder xenotrope replikationskompetente murine  $\gamma$ -Retroviren als Kontamination bei der Herstellung entsprechender muriner  $\gamma$ -retroviraler Vektoren (GVO der Risikogruppe 1 oder 2) handeln, zum anderen um nicht-rekombinante, replikationskompetente Viren, die schon vor der Transduktion die verwendeten primären Zellen infiziert hatten. Die Sicherheitsmaßnahmen der Tierhaltungsräume richten sich entsprechend nach dem Gefährdungspotenzial der replikationskompetenten Viren (S1 oder S2).
5. Werden gezielt transduzierte Zellen oder Gewebe, die sie enthalten, aus Tieren entnommen und *in vitro* kultiviert, sind diese Zellen und Gewebe als GVO anzusehen.

#### **Hinweise zu gentechnischen Arbeiten mit retroviralen Vektoren, die Nukleinsäureabschnitte mit onkogenem Potenzial übertragen:**

Werden Nukleinsäureabschnitte mit onkogenem Potenzial verwendet, so sind beim Umgang die Vorsichtsmaßnahmen für den Personenschutz einzuhalten, die in der „Stellungnahme der ZKBS: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial“ (Az. 6790-10-01, aktualisierte Fassung vom Dezember 2016) gefordert sind.

Werden bei gentechnischen Arbeiten zur Übertragung von Nukleinsäureabschnitten mit onkogenem Potenzial retrovirale Vektoren verwendet, welche durch Pseudotypisierung eine erhöhte Partikelstabilität aufweisen, sind ggf. zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen für den Personenschutz zu treffen, die über die Sicherheitsmaßnahmen hinausgehen, die in der „Stellungnahme der ZKBS: Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial eingeführt wurden“ (Az. 6790-10-36, aktualisierte Fassung Dezember 2014) genannt werden. Können solche pseudotypisierten retroviralen Vektoren aufgrund der Rezeptorspezifität des verwendeten Hüllproteins humane Epithelzellen der Nasen-, Mund- oder Rachenschleimhaut transduzieren, wird zur Vermeidung einer Schmier- oder Tröpfcheninfektion das Tragen eines Mund- und Nasenschutzes empfohlen. Können solche pseudotypisierten retroviralen Vektoren aufgrund der Rezeptorspezifität des verwendeten Hüllproteins hingegen humane Lungenepithelzellen transduzieren, wird zur Vermeidung einer Infektion durch Aerosole das Tragen eines Atemschutzes mit dem Rückhaltevermögen der Klasse P3 empfohlen. Hiervon ausgenommen sind VSV-G-pseudotypisierte retrovirale Vektoren, da diese die apikale Seite von humanen Lungenepithelzellen nur mit sehr geringer Effizienz transduzieren können [46, 47]. Für VSV-G-pseudotypisierte retrovirale Vektoren wird aufgrund ihres breiten Zelltropismus das Tragen eines Mund- und Nasenschutzes empfohlen.

Die Kriterien für die Bewertung einer Nukleinsäure hinsichtlich ihres onkogenen Potenzials sind in der o. g. Stellungnahme mit dem Az. 6790-10-01 festgelegt.



## 5. Literatur

1. **Levy JA** (1995). *The Retroviridae*, Plenum Press, New York.
2. **Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO** (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**(5):2099-108.
3. **Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage, FH, Verma IM, Trono D** (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* **272**(5259):263-7.
4. **Poeschla E, Wong-Staal F, Looney D** (1998). Efficient transduction of nondividing cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med.* **4**(3):354-7.
5. **Poeschla EM** (2003). Non-primate lentiviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* **5**(5):529-40.
6. **Mselli-Lakhal L, Favier C, Da Silva Teixeira MF, Chettab K, Legras C, Ronfort C, Verdier G, Mornex JF, Chebloune Y** (1998). Defective RNA packaging is responsible for low transduction efficiency of CAEV-based vectors. *Arch Virol.* **143**(4):681-95.
7. **Berkowitz R, Ilves H, Lin WY, Eckert K, Coward A, Tamaki S, Veres G, Plavec I** (2001). Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol.* **75**(7):3371-82.
8. **Berkowitz R, Ilves H, Plavec I, Veres G** (2001). Gene transfer systems derived from Visna virus: analysis of virus production and infectivity. *Virology.* **279**(1):116-29.
9. **Suerth JD, Labenski V, Schambach A** (2014). Alpharetroviral vectors: from a cancer-causing agent to a useful tool for human gene therapy. *Viruses.* **6**(12):4811-38.
10. **Konstantoulas CJ, Indik S** (2014). Mouse mammary tumor virus-based vector transduces non-dividing cells, enters the nucleus via a TNPO3-independent pathway and integrates in a less biased fashion than other retroviruses. *Retrovirology.* **11**:34.
11. **Trobridge GD** (2009). Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin Biol Ther.* **9**(11):1427-36.
12. **Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M** (2006). Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther.* **13**(6):1050-63.
13. **Mitani K, and Caskey CT** (1993). Delivering therapeutic genes - matching approach and application. *Trends Biotechnol.* **11**(5):162-6.
14. **Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C** (2013). Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* **24**(2):132-42.
15. **Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D** (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol.* **76**(3):1488-95.
16. **Kolokoltsov AA, Weaver SC, Davey RA** (2005). Efficient functional pseudotyping of oncoretroviral and lentiviral vectors by Venezuelan equine encephalitis virus envelope proteins. *J Virol.* **79**(2):756-63.
17. **Sung VM, Lai MM** (2002). Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system. *J Virol* **76**(2):912-7.
18. **Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA** (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **100**(12):7271-6.
19. **Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM** (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol.* **19**(3):225-30.
20. **Funke S, Maisner A, Mühlebach MD, Koehl U, Grez M, Cattaneo R, Cichutek K, Buchholz CJ** (2008). Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther.* **16**(8):1427-36.
21. **Yang Y, Vanin EF, Whitt MA, Fornerod M, Zwart R, Schneiderman RD, Grosveld G, Nienhuis AW** (1995). Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther.* **6**(9):1203-13.

22. **Kim SH, Lim KI** (2017). Stability of retroviral vectors against ultracentrifugation is determined by the viral internal core and envelope proteins used for pseudotyping. *Mol Cells*. **40**(5):339-45.
23. **Russell SR, Hawkins RE, Winter G** (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res*. **21**(5):1081-5.
24. **Danos O, Mulligan RC** (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(17):6460-4.
25. **David RM, Doherty AT** (2017). Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci*. **155**(2):315-25.
26. **Banasik MB, McCray PB Jr.** (2010). Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene Ther*. **17**(2):150-7.
27. **Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage F, Verma IM** (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*. **72**(10):8150-7.
28. **Bushman FD** (2002). Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol*. **261**:165-77.
29. **Tan W, Zhu K, Segal DJ, Barbas CF 3rd, Chow SA** (2004). Fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C direct integration of viral DNA into specific sites. *J Virol*. **78**(3):1301-13.
30. **Grunwald T, Pedersen FS, Wagner R, Uberla K** (2004). Reducing mobilization of simian immunodeficiency virus based vectors by primer complementation. *J. Gene Med*. **6**(2):147-154.
31. **Maetzig T, Galla M, Baum C, Schambach A** (2011). Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses*. **3**(6):677-713.
32. **Sanders DA** (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol*. **13**(5):437-42.
33. **Ikeda Y, Takeuchi Y, Martin F, Cosset FL, Mitropheanous K, Collins M** (2003). Continuous high-titer HIV-1 vector production. *Nat Biotechnol*. **21**(5):569-72.
34. **Van Maele B, De Rijck J, De Clercq E, Debyser Z** (2003). Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. *J Virol*. **77**(8):4685-94.
35. **Bilbao G, Feng M, Rancourt C, Jackson WH Jr., Curiel DT** (1997). Adenoviral/retroviral vector chimeras: a novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction in vivo. *FASEB J*. **11**(8):624-34.
36. **Duisit G, Salvetti A, Moullier P, Cosset FL** (1999). Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer lines. *Human Gene Ther*. **10**(2):189-200.
37. **Shaw A, Cornetta K** (2014). Design and Potential of Non-Integrating Lentiviral Vectors. *Biomedicines*. **2**(1):14-35.
38. **Wanisch K, Yáñez-Muñoz RJ** (2009). Integration-deficient lentiviral vectors: a slow coming of age. *Mol Ther*. **17**(8):1316-32.
39. **Liu KC, Lin BS, Gao AD, Ma HY, Zhao M, Zhang R, Yan HH, Yi XF, Lin SJ, Que JW, Lan XP** (2014). Integrase-deficient lentivirus: opportunities and challenges for human gene therapy. *Curr Gene Ther*. **14**(5):352-64.
40. **Galla M, Schambach A, Falk CS, Maetzig T, Kuehle J, Lange K, Zychlinski D, Heinz N, Brugman MH, Göhring G, Izsvák Z, Ivics Z, Baum C** (2011). Avoiding cytotoxicity of transposases by dose-controlled mRNA delivery. *Nucleic Acids Res*. **39**(16):7147-60.
41. **Cornetta K, Moen RC, Culver K, Morgan RA, McLachlin JR, Sturm S, Selegue J, London W, Blaese M, Anderson WF** (1990). Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum. Gene Ther*. **1**(1):15-30.
42. **Carmo M, Faria TQ, Falk H, Coroadinha AS, Teixeira M, Merten OW, Gény-Fiamma C, Alves PM, Danos O, Panet A, Carrondo MJ, Cruz PE** (2006). Relationship between retroviral vector membrane and vector stability. *J Gen Virol*. **87**(Pt 5):1349-56.
43. **Karlen S, Zufferey R** (2007). Declassification of Rodents Exposed to Third-Generation HIV-Based Vectors into Class 1 Animals. *Appl Biosaf*. **12**(2):93-9.

44. **Reuter JD, Fang X, Ly CS, Suter KK, Gibbs D** (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Comp Med.* **62**(5):361-70.
45. **Bagutti C, Schmidlin M, Mueller M, Brodmann P** (2012). Washout Kinetics of Viral Vectors from Cultured Mammalian Cells. *Appl Biosaf.* **17**(4):188-97.
46. **Kobinger GP, Weiner DJ, Yu QC, Wilson JM** (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol.* **19**(3):225-30.
47. **Sinn PL, Hickey MA, Staber PD, Dylla DE, Jeffers SA, Davidson BL, Sanders DA, McCray PB Jr** (2003). Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol.* **77**(10):5902-10.
48. **Joglekar AV, Sandoval S** (2017). Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. *Hum Gene Ther Methods.* **28**(6):291-301.