

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

**Gentechnische Arbeiten mit von RNA-Viren abgeleiteten
Minigenomen, Replikons und virusähnlichen Partikeln
zum Einbringen in humane oder tierische Zellen**

1. Beschreibung viraler Minigenome, viraler Replikons und virusähnlicher Partikel

1.1. Allgemeine Einführung

Zur Erforschung von RNA-Viren wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche plasmidbasierte Reverse-Genetik-Systeme etabliert. Entstehen bei der Anwendung dieser Systeme replikationskompetente¹ Viruspartikel, ist der Umgang mit ihnen ggf. nur unter aufwendigen Sicherheitsmaßnahmen möglich. Bei Forschungsansätzen, bei denen das vollständige Durchlaufen des viralen Replikationszyklus nicht zwingend erforderlich ist, wird daher häufig auf Systeme zurückgegriffen, die nur einzelne Aspekte des viralen Lebenszyklus widerspiegeln. Der Umgang mit solchen replikationsdefekten Systemen kann i. d. R. unter deutlich reduzierten Sicherheitsmaßnahmen erfolgen. Je nach Forschungsansatz oder Anwendungsbereich liegt der Fokus dabei auf der Fähigkeit zur autonomen Synthese viraler RNA, auf der Expression und Interaktion viraler Proteine oder auf der Bildung und Abgabe virusähnlicher Partikel und deren Infektiosität. Dies lässt eine Unterscheidung der Systeme in verschiedene Gruppen zu.

1.2. Virale Minigenome

Virale Minigenome sind lineare einzelsträngige RNA-Moleküle, die die *cis*-regulatorischen Sequenzen des entsprechenden viralen Genoms und im einfachsten Fall ein einzelnes Reportergen enthalten. In Sonderfällen können auch weitere Fremdgene ohne Reportergenfunktion inkloniert sein. Bei den *cis*-regulatorischen Sequenzen handelt es sich um Bereiche am 5'- und 3'-Ende des Genoms, welche seine Transkription und Vermehrung durch viral kodierte Faktoren steuern. Die offenen Leserahmen (ORFs) dieser viralen Faktoren liegen im Minigenom allerdings nicht vor, so dass die Transkription und Vermehrung der viralen RNA nur bei Bereitstellung dieser Faktoren in den Zielzellen erfolgt. Dies kann durch Transfektion von Expressionsplasmiden oder mRNA, der Transduktion durch virale Vektoren oder auch die Infektion der Zelle mit einem Helfervirus gewährleistet werden. Werden darüber hinaus auch virale Strukturproteine in den Zellen exprimiert, kann es zur Abgabe replikationsdefekter virusähnlicher Partikel kommen, die in der Folge das Minigenom auf weitere Zellen übertragen können (siehe Punkt 1.4.). Minigenome stellen somit das am stärksten reduzierte System zum Studium der viralen RNA-Synthese und Identifikation der Faktoren dar, die in diesen Prozess eingreifen.

¹ Zur besseren sprachlichen Abgrenzung bezeichnet „replikationskompetent“ in dieser Stellungnahme die Fähigkeit, den viralen Replikationszyklus vollständig zu durchlaufen, einschließlich der wiederholten Abgabe infektiöser Viruspartikel nach Infektion von Zellen. Virale Partikel, die aufgrund der in ihnen enthaltenen RNA hierzu nicht in der Lage sind, werden als „replikationsdefekt“ bezeichnet.

Häufig kommen Minigenome hochpathogener Negativstrang-RNA-Viren zum Einsatz, beispielsweise von Ebolaviren [1].

1.3. Virale Replikons

Wie virale Minigenome besitzen auch virale Replikons alle für die virale RNA-Synthese notwendigen *cis*-regulatorischen Sequenzen. In dem linearen einzelsträngigen RNA-Molekül sind jedoch zudem die ORFs aller Proteine enthalten, die für die RNA-Synthese essenziell sind. Die RNA kann sich somit in suszeptiblen Zellen selbstständig ohne die Hilfe weiterer *in trans* exprimierter Proteine vermehren. Da der RNA jedoch weiterhin mindestens ein ORF eines Proteins fehlt, das an der Bildung von infektiösen Viruspartikeln beteiligt ist, werden keine infektiösen viralen Partikel gebildet. Dieser Defekt kann durch die Expression der fehlenden Strukturproteine *in trans* kompensiert werden. In diesem Fall entstehen sogenannte *single round infectious particles*, die eine Zielzelle einmalig infizieren können, in dieser aber nicht zur erneuten Bildung infektiöser Partikel führen. Die im Partikel enthaltene RNA wird hingegen erneut vermehrt und translatiert. Derart hergestellte Replikonpartikel sind den virusähnlichen Partikeln zuzuordnen (siehe Punkt 1.4.).

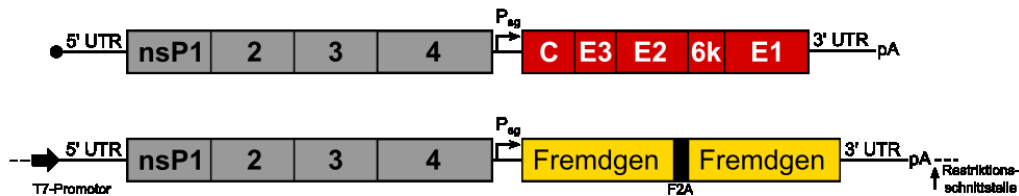
An die Stelle des deletierten ORFs des Strukturproteins ist i. d. R. ein Fremdgen, typischerweise ein Reportergen, einkloniert. In Zellen, die mit Replikon-RNA oder einem Plasmid mit einem entsprechenden cDNA-Konstrukt transfiziert wurden, kommt es somit zur Expression des Reporterproteins und viraler Proteine. Diese Expression ist typischerweise von längerer Dauer als bei der Transfektion einer nicht vermehrungsfähigen mRNA. Da jedoch die Vermehrung der viralen RNA und die kodierten Proteine zu einem zytopathischen Effekt führen können, der zum Teil auf intrazelluläre Immunabwehrreaktionen zurückzuführen ist, ist auch die Proteinexpression mithilfe eines Replikons zeitlich begrenzt. Mit den häufig verwendeten alphaviralen Replikons kann zum Beispiel eine Expression für drei bis fünf Tage erreicht werden [2]. Bei neueren Replikon-Systemen wird jedoch durch das Einfügen spezifischer Punktmutationen oder Deletionen versucht, den zytopathischen Effekt des Replikons zu reduzieren und damit seine Persistenz in Zellen zu erhöhen. Die Expression des Reportergens eines mit diesem Ansatz entwickelten Sendaivirus-Replikons dauerte in Zellkultur mehr als sechs Monate an [3]. Ebenso kann das Einfügen eines Selektionsmarkers, z. B. eines Puromycin-Resistenzgens, zu einer verlängerten Persistenz in Zellen unter entsprechendem Selektionsdruck führen. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Persistenz besteht in der Expression immun-suppressiver Proteine mithilfe separater Expressionsplasmide oder direkt über das Replikon. Eine Integration des Replikons in die zelluläre DNA ist jedoch auch bei einer erhöhten Persistenz nicht zu erwarten, da das RNA-Replikon nicht revers transkribiert wird, sofern dies nicht explizit durch das Einfügen eines für eine Reverse Transkriptase kodierenden Nukleinsäureabschnitts herbeigeführt wird. Die am häufigsten verwendeten Replikons basieren auf Alphaviren (z. B. Semliki-Forest-Virus, Sindbisvirus, Venezolanisches Pferdeenzephalitis-Virus), Flaviviren (z. B. Kunjinvirus, West-Nil-Virus, Denguevirus), Paramyxoviren (z. B. Masernvirus, Sendaivirus) oder Rhabdoviren (z. B. Vesikuläre Stomatitis-Virus, Tollwutvirus) (Abbildung 1).

1.4. Virusähnliche Partikel

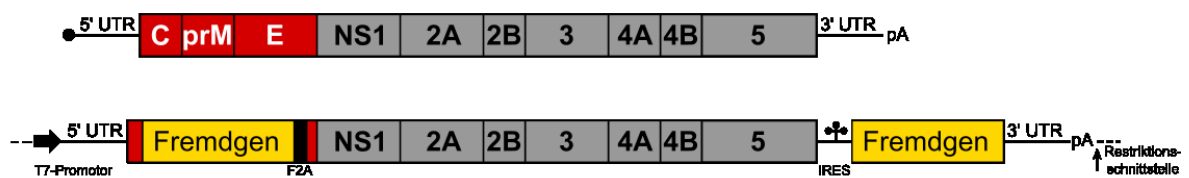
Bei der Überexpression bestimmter Proteine von RNA-Viren in eukaryotischen Zellen kann es zur spontanen Assemblierung von Partikeln kommen. Diese können reine Proteinkomplexe oder Membranvesikel sein, in denen virale Membranproteine eingelagert sind. Typische Proteine, die diese Eigenschaft aufweisen, sind virale (Nukleo)kapsid-, Matrix- und Hüllproteine. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu natürlichen Viruspartikeln werden solche Partikel als virusähnliche Partikel bezeichnet. Werden in einer Zelle ein oder mehrere dieser Proteine in Anwesenheit biologischer Makromoleküle oder z. B. pharmazeutischer Wirkstoffe überexprimiert, kann es zudem zum Einschluss dieser (Makro)moleküle in das Lumen der Partikel kommen. Hierfür kommen insbesondere RNA-Moleküle sowie Proteine in Frage, sofern deren Größe die virusspezifische Verpackungskapazität der Partikel nicht übersteigt. Virusähnliche Partikel mit Komponenten für eine spezifische Rezeptorbindung und den Eintritt in eine Zielzelle können somit der gezielten Übertragung der eingeschlossenen (Makro)moleküle

auf Zellen dienen. Die Effizienz der Bildung solcher Partikel ist hoch, wenn eines der exprimierten viralen Proteine das (Makro)molekül spezifisch bindet. Eine solche Interaktion kann, wie z. B. im Fall von Nukleokapsidproteinen und dem hierzu passenden viralen Verpackungssignal, natürlicherweise möglich sein. Sie kann jedoch ebenso durch Modifikation des viralen Proteins und/oder des gewünschten Bindungspartners künstlich erzeugt werden. Virusähnliche Partikel gewinnen insbesondere in der Tumorthherapie und der Impfstoffentwicklung zunehmend an Bedeutung [5].

(A) Alphavirales Genom und Replikon (hier: Semliki-Forest-Virus)



(B) Flavivirales Genom und Replikon (hier: Kunjinvirus)



(C) Rhabdovirales Genom und Replikon (hier: Vesikuläre-Stomatitis-Virus)

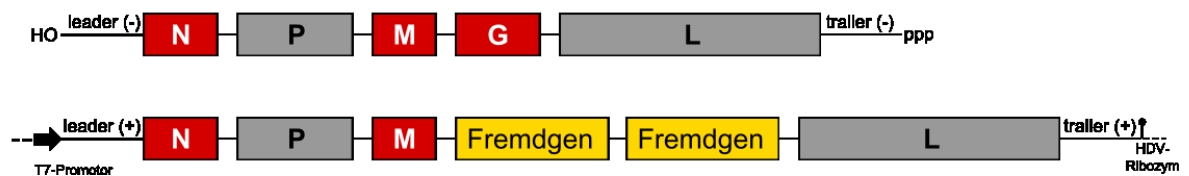


Abbildung 1: Schematische Darstellung typischer Replikonkonstrukte (jeweils in ihrer Plasmidform) und der viralen Genome, von denen sie abgeleitet sind. ORFs von Nichtstrukturproteinen sind grau, von Strukturproteinen rot und Fremdgene gelb dargestellt. Die Transkription der viralen RNA steht i. d. R. unter Kontrolle eines Phagenpromotors. Zum Erhalt des korrekten viralen 3'-Endes ist entweder eine Restriktionsschnittstelle (bei *in vitro*-Transkription) oder ein Hepatitis-Delta-Virus (HDV)-Ribozym (für die *in vivo*-Transkription) *downstream* der viralen cDNA einkloniert. **(A)** Alphavirales Replikon: Fremdgene werden typischerweise anstelle des strukturellen ORF hinter den subgenomischen Promotor (P_{sg}) eingefügt. Das Einfügen zusätzlicher Transkriptionseinheiten unter Kontrolle eines weiteren subgenomischen Promotors ist möglich. Sollen mehrere Fremdproteine in einem ORF kodiert werden, sind diese durch eine picornvirale 2A-Peptidsequenz (F2A) getrennt, um die Expression separater Proteine zu ermöglichen. **(B)** Flavivirales Replikon: Fremdgene können anstelle der kodierenden Region der Strukturproteine oder als separate ORFs *upstream* der nicht-kodierenden Region am 3'-Ende eingefügt sein. In diesem Fall ist eine *internal ribosome entry site* (IRES) für die erneute Translationsinitiation eingefügt. Aufgrund überlappender regulatorischer Sequenzen bzw. des Signalpeptids von NS1 müssen Teilstücke der für C und E kodierenden Regionen erhalten bleiben. **(C)** Rhabdovirales Replikon: Fremdgene bei Replikons von Viren der Ordnung *Mononegavirales* sind oftmals anstelle des Gens des Proteins eingefügt, das die Rezeptorbindung und/oder die Fusion vermittelt (hier beides G). Weitere Insertionsorte vollständiger Transkriptionseinheiten zwischen den übrigen Genen sind möglich. Im Gegensatz zu Replikons von Plusstrang-RNA-Viren müssen für den erstmaligen Start der viralen RNA-Synthese die Proteine des Replikationskomplexes *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Die anschließende RNA-Synthese erfolgt jedoch autonom. Abbildung adaptiert von [4].

Hinweis zur gentechnikrechtlichen Einordnung:

Gemäß § 3 Nr. 1 GenTG sind „Organismen“ als biologische Einheiten definiert, die fähig sind, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen. Virusähnliche Partikel, die keine Nukleinsäuren enthalten, also z. B. ausschließlich aus Proteinen bestehen, erfüllen demnach nicht die Definition eines „Organismus“ und können folglich keine „gentechnisch veränderten Organismen“ (GVO) im Sinne des GenTG sein. Sind in einem virusähnlichen Partikel hingegen Nukleinsäuren enthalten, hängt die rechtliche Einordnung dieser Partikel von der Art der Nukleinsäure ab. Nicht-kodierende RNAs, wie z. B. *guide*-RNAs oder siRNAs, und mRNAs (außer vermehrungsfähige mRNA von Plusstrang-RNA- und Retroviren) sind nicht die vererbaren Nukleinsäuren eines Organismus. Diese RNAs sind somit kein genetisches Material im engeren Sinne. Ebenso sind diese RNAs in einer Zelle nicht vermehrungsfähig. Virusähnliche Partikel, die solche RNAs enthalten, sind demnach keine GMO.

Werden virusähnliche Partikel, die selbst keine GMO sind, zur Transduktion von eukaryotischen Zellen verwendet, sind die mit ihnen übertragenen RNAs, Proteine und/oder sonstigen (Makro)moleküle vorübergehend in der Zelle nachweisbar. Übertragene nicht vermehrungsfähige mRNAs werden zudem vorübergehend translatiert. Eine Veränderung des Erbguts der transduzierten Zellen erfolgt jedoch i. d. R. nicht. Die Übertragung der beschriebenen RNAs oder von Proteinen und sonstigen (Makro)molekülen stellt in diesen Fällen kein Verfahren zur Veränderung des zellulären Erbguts dar. Ursprünglich nicht-rekombinante Zellen, die mit den beschriebenen virusähnlichen Partikeln transduziert wurden, sind keine GMO. Unter der Voraussetzung, dass die für die Produktion eingesetzten rekombinanten Zellen durch Filtration oder Zentrifugation von den beschriebenen virusähnlichen Partikeln abgetrennt wurden, stellt der Umgang mit diesen Partikeln somit keine gentechnische Arbeit dar.

Die Verwendung **virusähnlicher Partikel, die Proteine oder für diese kodierende mRNAs enthalten, die das Genom der Zielzelle gerichtet verändern** können, stellt ein Mutageneseverfahren dar. Der Europäische Gerichtshof (EuGH) hat am 25. Juli 2018 entschieden, dass Organismen, die mit neuen Verfahren der Mutagenese erzeugt wurden, die erst nach dem Erlass der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG im Jahr 2001 hauptsächlich entwickelt wurden, GMO im Sinne der Freisetzungsrichtlinie sind. Die Entscheidung, ob dieses Urteil auch im Geltungsbereich der Richtlinie 2009/41/EG zum Umgang mit Mikroorganismen im geschlossenen System auf mit solchen Mutageneseverfahren veränderte Organismen anzuwenden ist, obliegt den jeweils zuständigen Behörden der Bundesländer.

2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit viralen Minigenomen, viralen Replikons und virusähnlichen Partikeln

2.1. Gefährdungspotenzial gentechnischer Arbeiten mit *Escherichia coli*

Zur Herstellung viraler Minigenome, viraler Replikons und virusähnlicher Partikel werden subgenomische Nukleinsäureabschnitte von RNA-Viren zunächst in ihrer cDNA-Form mithilfe von Vektoren in *E. coli* K12-Derivaten amplifiziert. Die Expression des viralen Nukleinsäureabschnitts wird dabei zumeist von einem T7- oder SP6-Phagenpromotor kontrolliert. Alternativ können auch virale oder eukaryotische Promotoren verwendet werden. Diese Promotoren sind in *E. coli* i. d. R. nicht aktiv. Die viralen Nukleinsäureabschnitte besitzen zudem kein eigenes Gefährdungspotenzial. Ebenso wenig ist von einer Vervollständigung des viralen Genoms durch Rekombination mit dem Genom von *E. coli* auszugehen. Sofern es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt, be-

sitzen gentechnische Arbeiten, bei denen Plasmide mit subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitten in *E. coli* K12-Derivate der Risikogruppe 1 eingebracht werden, somit kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt.

2.2. Gefährdungspotenzial von humanen und tierischen Zellen mit viralem Minigenom oder Replikon

Für die Sicherheitsbewertung von humanen und tierischen Zellen der Risikogruppe 1, auf die mittels Transfektion oder Transduktion ein virales Minigenom oder Replikon übertragen wurde, ist die Möglichkeit der Entstehung viraler oder virusähnlicher Partikel von maßgeblicher Bedeutung. Solange in der Zelle kein virales Strukturprotein (oder eine Kombination von Strukturproteinen) exprimiert wird, das die Partikelbildung ermöglicht, können weder replikationsdefekte virusähnliche Partikel noch replikationskompetente Viruspartikel abgegeben werden. Wurde kein Gen eines Prions oder Toxins übertragen, ist beim Umgang mit solchen Zellen nicht von einem Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt auszugehen.

Werden hingegen nach Ko-Transfektion weiterer Plasmide oder mRNAs bzw. aufgrund einer Transduktion der Zelllinie oder deren Infektion mit einem Helfervirus virale Strukturproteine exprimiert, die prinzipiell geeignet sind, das Minigenom oder Replikon spezifisch oder unspezifisch zu verpacken oder kann dies nicht ausgeschlossen werden, bestimmen die ggf. abgegebenen Partikel das Gefährdungspotenzial der Zellen. Dies ist insbesondere auch dann zu berücksichtigen, wenn die transfizierten Zellen mindestens der Risikogruppe 2 zugeordnet sind, da solche Zellen i. d. R. replikationskompetente Virusgenome einschließlich struktureller Gene enthalten. Bei solchen Zellen ist darüber hinaus ggf. eine Wechselwirkung zwischen den viralen Proteinen bzw. Nukleinsäureabschnitten zu bewerten.

Von untergeordneter Relevanz für die Risikobewertung ist i. d. R., ob das Minigenom oder Replikon und die ggf. weiteren subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitte als *in vitro*-transkribierte RNA übertragen wurden oder ob diese erst nach Übertragung eines Plasmids mit der viralen cDNA in der Zelle transkribiert wird. Hierbei ist lediglich zu beachten, dass aufgrund der mechanistischen Unterschiede zwischen homologer RNA- und homologer DNA-Rekombination ggf. das Entstehen unterschiedlicher Rekombinationsprodukte zu erwarten ist.

2.3. Gefährdungspotenzial von virusähnlichen Partikeln

Bei der Bewertung des Gefährdungspotenzials von virusähnlichen Partikeln, die von Zellen abgegeben werden, in denen ein virales Minigenom, virales Replikon oder ggf. eine sonstige verpackbare RNA vorliegt, sind neben den Eigenschaften des enthaltenen Fremdgens (siehe Punkt 2.4.) drei Aspekte zu betrachten: die Infektiosität der Partikel, die Möglichkeit der Aufhebung ihres Replikationsdefekts sowie eine mögliche Kontamination mit replikationskompetenten Helferviren.

Bei virusähnlichen Partikeln handelt es sich um replikationsdefekte Partikel. Diese können, müssen jedoch nicht, in der Lage sein, die in ihnen enthaltene RNA auf eine Zielzelle zu übertragen; d. h. virusähnliche Partikel können infektiös oder nicht-infektiös sein.

Ein Replikationsdefekt ist bei fehlender Infektiosität immer gegeben und beruht auf der Abwesenheit von viralen Proteinen, die die Bindung an einen zellulären Rezeptor und/oder den anschließenden Eintritt oder die Fusion des Partikels in die bzw. mit der Zelle vermitteln. Nicht-infektiöse virusähnliche Partikel besitzen unabhängig von der in ihnen enthaltenen RNA kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt.

Die meisten virusähnlichen Partikel sind jedoch infektiös. Werden humane oder tierische Zellen mit diesen Partikeln transduziert, kommt es jedoch nicht zur weiteren Abgabe dieser Partikel. Hiervon ist immer dann auszugehen, wenn die verpackte RNA entweder in der Zelle nicht vermehrt wird oder wenn in der transduzierten Zelle keine viralen Proteine vorliegen, die eine erneute Verpackung der RNA in infektiöse Partikel ermöglichen. Dabei ist zu beachten, dass bei Vorliegen von Strukturproteinen heterologer Viren eine Komplementierung oftmals nicht auszuschließen ist. Das Gefährdungspotenzial infektiöser virusähnlicher Partikel ist abhängig von der in ihnen enthaltenen RNA.

Abhängig vom Herstellungssystem können humane und tierische Zellen mit einem viralen Minigenom oder Replikon neben replikationsdefekten virusähnlichen Partikeln ggf. auch replikationskompetente Viruspartikel abgeben. Diese können in Folge von RNA- oder DNA-Rekombination mit den für die Verpackung eingesetzten Helferkonstrukten entstehen. Hinsichtlich der Risikobewertung ist dabei die Wahrscheinlichkeit von Bedeutung, mit der solche Rekombinationsereignisse stattfinden und zu einer korrekten, replikationsfähigen Genomstruktur führen. Es ist davon auszugehen, dass eine korrekte Genomstruktur vornehmlich durch homologe Rekombinationsereignisse entsteht. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein replikationskompetentes Genom durch eine mindestens zweifache illegitime (d. h. nicht-homologe) Rekombination entsteht, ist hingegen als sehr gering anzusehen. Die Möglichkeit der illegitimen Rekombination geht daher aufgrund der Schwere des hierdurch entstehenden Schadens nur bei Viren der Risikogruppe 4 in die Risikobewertung ein. Um die Wahrscheinlichkeit einer Wiederherstellung des Genoms durch Rekombination zu verringern, sollten Helferfunktionen, soweit möglich, auf separaten Nukleinsäureabschnitten in die Produktionszellen eingebracht werden. Zudem sollten homologe Bereiche zwischen Minigenom bzw. Replikon und den Helferkonstrukten weitestgehend vermieden werden. Schließlich kann die Entstehung replikationskompetenter Viruspartikel auch verhindert werden, indem kodierende oder regulatorische Nukleinsäureabschnitte entfernt werden, die für den spezifischen Forschungszweck nicht benötigt werden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass zum Teil auch unvollständige Virusgenome zur Bildung von replikationskompetenten, ggf. attenuierten viralen Partikeln führen können (z. B. bei alphaviralen Replikons). Ist es aufgrund des eingefügten Fremdgens oder der Kombination von Minigenom bzw. Replikon und Helferkonstrukten nicht auszuschließen, dass ggf. nach Rekombination replikationskompetente Viruspartikel abgegeben werden, bestimmen diese das Gefährdungspotenzial des Gemisches der viralen Partikel. Dabei ist zu beachten, dass auch Strukturproteine heterologer Viren ein fehlendes Strukturprotein ggf. funktional ersetzen und so den Replikationsdefekt aufheben können.

Werden virusähnliche Partikel mithilfe eines replikationskompetenten Helfervirus hergestellt, ist prinzipiell zunächst vom Vorliegen eines Gemisches von replikationsdefekten virusähnlichen Partikeln und replikationskompetenten Viruspartikeln im Zellkulturüberstand auszugehen. Das Gefährdungspotenzial dieses Gemisches wird außer im Fall eines Helfervirus der Risikogruppe 1 von den replikationskompetenten Viruspartikeln bestimmt. Auch in diesem Fall sind die Rekombinationsmöglichkeiten zwischen dem viralen Helfergenom und einem eingebrachten Minigenom oder Replikon zu beachten.

2.4. Gefährdungspotenzial des Fremdgens

Da es sich bei den beschriebenen Minigenomen und Replikons um verkürzte virale Genome handelt, die bestimmte Funktionen innerhalb des viralen Replikationszyklus nicht selbstständig ausführen können, ist bei Einfügen fremder, i. d. R. viraler Nukleinsäureabschnitte zu beachten, ob der Replikationsdefekt des Minigenoms oder Replikons bzw. von virusähnlichen Partikeln, die diese enthalten, aufgehoben werden kann. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn Nukleinsäureabschnitte, die für **fremde Strukturproteine** kodieren, in Replikons eingefügt werden und dadurch die Bildung replikationskompetenter Viruspartikel ermöglichen oder ermöglichen könnten.

Virusähnliche Partikel, die humane Zellen transduzieren können und RNA mit **neoplastisch transformierendem Potenzial** enthalten, können ein Gefährdungspotenzial für den Menschen besitzen. Davon ist immer dann auszugehen, wenn es aufgrund der Transduktion in einer humanen Zelle zu einer langanhaltenden Überexpression eines Onkogens, der langanhaltenden Suppression eines Tumorsuppressorgens oder der gezielten Mutation eines Proto-Onkogens oder Tumorsuppressorgens bzw. ihrer mRNA kommt. Eine langhaltende Expression der hierfür verantwortlichen Proteine ist dabei generell nur bei Transduktion mit virusähnlichen Partikeln zu erwarten, die ein Replikon enthalten. Grund hierfür ist die geringe Stabilität von RNA in biologischen Medien, die sich in kurzen Halbwertszeiten von einigen Stunden äußert. Da sich Replikons auch unabhängig von einer Komplementierung in nativen suszeptiblen Zellen vermehren können, ist bei Transduktion einer solchen RNA trotz kurzer Halbwertszeit der einzelnen RNA-Moleküle von einer länger anhaltenden Expression der kodierten Proteine

auszugehen. Bei virusähnlichen Partikeln, die ein Replikon einschließlich eines Nukleinsäureabschnitts mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthalten, ist daher vorsorglich ein geringes Gefährdungspotenzial für den Menschen anzunehmen. Ein geringes Gefährdungspotenzial von virusähnlichen Partikeln für den Menschen ist ebenfalls nicht auszuschließen, wenn die Partikel ein Protein oder eine nicht vermehrungsfähige mRNA enthalten, die für ein solches Protein kodiert, das bereits bei kurzfristiger Expression durch Mutation oder epigenetische Veränderung zur Transformation einer Zelle führen kann. Zu diesen Proteinen zählen solche, die ein zelluläres Proto-Onkogen oder Tumorsuppressorgen gezielt nachteilig verändern bzw. die Expression eines Onkogens dauerhaft erhöhen oder die eines Tumorsuppressors dauerhaft herabsetzen. Als Beispiele sind hierbei insbesondere Reprogrammierungsfaktoren und Komplexe zwischen der Endonuklease Cas9 und einer gegen einen Tumorsuppressor gerichteten *guide*-RNA zu nennen. Demgegenüber wird ein Minigenom in Abwesenheit komplementierender Faktoren weder translatiert noch transkribiert oder vermehrt. Virusähnliche Partikel, die ein Minigenom einschließlich eines Nukleinsäureabschnitts mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthalten, besitzen demnach kein Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und Umwelt.

Ein weiteres Kriterium bei der Risikobewertung von virusähnlichen Partikeln, die humane Zellen transduzieren können, ist, ob eine im Partikel vorliegende RNA revers-transkribiert und die resultierende DNA in das humane Genom integriert werden kann. Bei einer akzidentellen Exposition des Experimentators mit solchen virusähnlichen Partikeln ist eine Insertionsmutagenese nicht völlig auszuschließen. Daher ist bei virusähnlichen Partikeln, die humane Zellen transduzieren können und eine **Reverse Transkriptase und Integrase** enthalten bzw. zur Expression dieser Enzyme führen, von einem geringen Gefährdungspotenzial für den Menschen auszugehen.

Werden mithilfe von viralen Minigenomen oder Replikons **Prionen oder Toxine** exprimiert oder die entsprechenden Gene mittels virusähnlicher Partikel übertragen, hängt das Gefährdungspotenzial dieser gentechnischen Arbeiten u. a. von den spezifischen Eigenschaften der Prionen und Toxine und der zu erwartenden Expressionsstärke ab. Eine Bewertung des Gefährdungspotenzials dieser Arbeiten muss daher im Einzelfall durch die ZKBS erfolgen.

3. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit viralen Minigenomen, viralen Replikons und virusähnlichen Partikeln

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit viralen Minigenomen, viralen Replikons und virusähnlichen Partikeln, die von einem RNA-Virus abgeleitet sind, zusammengefasst. Gentechnische Arbeiten mit GVO, die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe zuzuordnen, die der Risikogruppe des GVO entspricht. **Diese Stellungnahme gilt nicht für gentechnische Arbeiten mit dem Hepatitis-D-Virus und anderen Viren der Gattung *Deltavirus*.**

Sollen **Prionen oder Toxine** exprimiert bzw. ihre Gene übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.

Sollen Nukleinsäureabschnitte mit **neoplastisch transformierendem Potenzial** übertragen werden, sind die hierzu unter Punkt 4. aufgeführten Hinweise zu beachten.

Werden für die Vermehrung von Minigenomen oder die Herstellung virusähnlicher Partikel replikationskompetente **Helferviren** eingesetzt, ist deren Gefährdungspotenzial bei der Risikobewertung der gentechnischen Arbeiten zu berücksichtigen.

Die folgenden Begriffsdefinitionen werden verwendet:

- **Minigenom:** subgenomischer Nukleinsäureabschnitt eines RNA-Virus, der alle *cis*-regulatorischen viralen Sequenzen enthält, die für seine Vermehrung und ggf. Transkription notwendig sind; mindestens ein virales Protein, das für die Vermehrung der RNA notwendig ist, wird nicht kodiert; zusätzlich können ein oder mehrere Fremdgene enthalten sein.

- **Replikon:** subgenomischer Nukleinsäureabschnitt eines RNA-Virus, der alle *cis*-regulatorischen viralen Sequenzen enthält und für alle viralen Proteine kodiert, die für seine Vermehrung und ggf. Transkription notwendig sind (Bei Minusstrang-RNA-Viren müssen für den erstmaligen Start der viralen RNA-Synthese die Proteine des Replikationskomplexes *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Die anschließende RNA-Synthese erfolgt jedoch autonom.); mindestens eines der Proteine, das für die Bildung von Partikeln, die Bindung an einen zellulären Rezeptor **oder** die Übertragung der viralen RNA auf eine Zelle erforderlich ist, wird nicht kodiert; zusätzlich können ein oder mehrere Fremdgene enthalten sein.

Hinweis: Der Replikationsdefekt muss auf einer Deletion eines funktional bedeutsamen Teils des viralen Nukleinsäureabschnitts beruhen, der für das Protein kodiert, das die Bildung von Partikeln, die Rezeptorbindung **oder** den Eintritt bzw. die Fusion des Viruspartikels in die bzw. mit der Zielzelle ermöglicht. Zum Erhalt regulatorischer Funktionen können jedoch ggf. Nukleinsäureabschnitte enthalten sein, die für nicht-funktionale Teile eines solchen Strukturproteins kodieren. Von einem stabilen Replikationsdefekt ist hingegen aufgrund der hohen Mutationsrate viraler RNA-Polymerasen nicht auszugehen, wenn dieser ausschließlich auf dem Einfügen inaktivierender Punktmutationen, artifiziieller Stoppkodons oder *frameshift*-Mutationen beruht.

- **Virusähnliche Partikel:** von einem RNA-Virus abgeleitete replikationsdefekte Protein-komplexe oder Membranvesikel mit eingelagerten Proteinen, die ggf. RNA enthalten und diese ggf. auf humane oder tierische Zellen übertragen können.
- **Helferplasmide und äquivalente Nukleinsäureabschnitte:** eukaryotische Expressionsplasmide oder Nukleinsäuren mit subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitten, die nach Transfektion oder Transduktion in der Zelle virale Proteine zur Verfügung stellen, die für die Vermehrung eines Minigenoms oder Replikons (nur bei Minusstrang-RNA-Viren) oder die Verpackung einer RNA notwendig sind; es sind keine viralen *cis*-regulatorischen Sequenzen und Verpackungssignale enthalten, außer solchen, die mit den für die beschriebenen Funktionen notwendigen kodierenden Regionen überlappen.

Übertragung von Plasmiden mit subgenomischen viralen Nukleinsäureabschnitten auf *E. coli* K12-Derivate

- 3.1. *E. coli* K12-Derivate der **Risikogruppe 1** einschließlich eines Plasmids mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten eines RNA-Virus und ggf. weiterer Nukleinsäureabschnitte sind GVO der **Risikogruppe 1**. Umfassen die Nukleinsäureabschnitte ein Onkogen, sind die GVO der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, sofern es sich bei dem verwendeten Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt.

Transfektion eines Minigenoms oder Replikons in humane oder tierische Zellen

- 3.2. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die durch Transfektion ein Minigenom übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms auszugehen ist. Es kommt nicht zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.3. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die durch Transfektion ein Replikon und ggf. ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte übertragen wurden, die für die Proteine des viralen Replikationskomplexes kodieren (nur bei Minusstrang-RNA-Viren), sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Replikons auszugehen ist. Es kommt ggf. zur Abgabe nicht-infektiöser virusähnlicher Partikel ohne Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die ggf. abgegebenen virusähnlichen Partikel sind keine GVO im Sinne des § 3 GenTG, da sie keine Zellen infizieren können und somit weder genetisches Material übertragen noch sich vermehren können.

- 3.4. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die durch Transfektion ein Minigenom oder Replikon übertragen wurde und bei denen eine Aufhebung des Replikationsdefekts der viralen RNA aufgrund eines Fremdgens nicht ausgeschlossen werden kann, sind als GVO im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten. Die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel ist nicht auszuschließen.

Vermehrung von Minigenomen in humanen oder tierischen Zellen

- 3.5. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, in denen nach ausschließlicher Übertragung von Helferplasmiden oder äquivalenten Nukleinsäureabschnitten virale Nichtstrukturproteine exprimiert werden, sind ggf. GVO der **Risikogruppe 1**. Es kommt nicht zur Abgabe virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.6. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Minigenom und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte übertragen wurden, die für virale Nichtstrukturproteine kodieren, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms auszugehen ist und nicht alle für die Bildung infektiöser Partikel notwendigen Strukturproteine im Minigenom kodiert werden. Es kommt nicht zur Abgabe virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.7. Bei humanen und tierischen Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Minigenom übertragen wurde und die mit einem replikationskompetenten Helfervirus infiziert wurden, bestimmt die Risikogruppe des Helfervirus die Risikogruppe der GVO. Dabei ist eine mögliche Rekombination zwischen dem Genom des Helfervirus und dem Minigenom zu berücksichtigen. Es kommt zur Abgabe replikationskompetenter Partikel des Helfervirus.
- 3.8. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die ein Minigenom und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte übertragen wurden, die für virale Nichtstrukturproteine kodieren, und bei denen eine Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms aufgrund von homologer Rekombination nicht ausgeschlossen werden kann, sind als GVO im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten. Die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel ist nicht auszuschließen.

Erzeugung von virusähnlichen Partikeln

- 3.9. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, in denen nach ausschließlicher Übertragung von Helferplasmiden oder äquivalenten Nukleinsäureabschnitten virale Strukturproteine exprimiert werden, sind ggf. GVO der **Risikogruppe 1**. Es kommt ggf. zur Abgabe nicht-infektiöser oder infektiöser virusähnlicher Partikel ohne Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die ggf. abgegebenen virusähnlichen Partikel sind keine GVO im Sinne des § 3 GenTG, da sie kein genetisches Material enthalten und sich nicht vermehren können.

- 3.10. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Replikon eines Virus der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, welches kein Onkogen und keine Funktionen für eine reverse Transkription und Integration seiner revers-transkribierten DNA enthält, und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und ggf. Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Replikons aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1**.
- 3.11. Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Replikon eines Virus der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, welches ein Onkogen oder Funktionen für eine reverse Transkription und Integration seiner revers-transkribierten DNA enthält, und ein oder

mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und ggf. Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Replikons aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 2**.

- 3.12.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Replikon eines Virus der **Risikogruppe 4** und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und ggf. Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 3**, sofern eine illegitime (d. h. nicht-homologe) Rekombination mit einem einzelnen Helferkonstrukt den Replikationsdefekt des Replikons aufheben könnte und nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Replikons aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1** oder **2**. Mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit können jedoch nach einer mindestens zweifachen illegitimen Rekombination auch replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 4** entstehen. Aufgrund der sehr geringen Eintrittswahrscheinlichkeit dieses Ereignisses werden für diese Arbeiten **Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3** als ausreichend angesehen.
- 3.13.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die ein Replikon und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und ggf. Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden und bei denen eine Aufhebung des Replikationsdefekts des Replikons aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens nicht ausgeschlossen werden kann, sind als GVO im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1** oder **2**. Zudem ist die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel nicht auszuschließen.

Hinweis: Die in der allgemeinen Stellungnahme der ZKBS mit Az. 6790-10-50 durchgeführte Bewertung von Sindbis- und Semliki-Forest-Virus abgeleiteten Replikonpartikeln ersetzt eine Einzelfallbewertung, sofern die darin genannten Kriterien erfüllt werden.

- 3.14.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Minigenom eines Virus der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3** oder eine nicht onkogene verpackbare RNA, die kein Minigenom oder Replikon ist, und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und ggf. Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind ggf. GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist und das Minigenom keine Funktionen für eine reverse Transkription oder Integration seiner revers-transkribierten DNA enthält. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind ggf. GVO der **Risikogruppe 1**.
- 3.15.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Minigenom eines Virus der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, welches Funktionen für eine reverse Transkription und Integration seiner revers-transkribierten DNA enthält, und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**, sofern nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 2**.
- 3.16.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die eine verpackbare RNA, die kein Minigenom oder Replikon ist, und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Strukturproteine kodieren, übertragen wur-

den, sind GVO der **Risikogruppe 2**, sofern die RNA für ein sequenzspezifisches Protein mit dauerhafter onkogener Wirkung kodiert oder zusammen mit einem solchen Protein verpackt wird und dessen Sequenzspezifität vermittelt. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel mit geringem Gefährdungspotenzial.

Hinweis: Die abgegebenen virusähnlichen Partikel sind keine GVO im Sinne des § 3 GenTG, da sie kein genetisches Material enthalten und sich nicht vermehren können.

- 3.17.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Minigenom eines Virus der **Risikogruppe 4** und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 3**, sofern eine illegitime (d. h. nicht-homologe) Rekombination mit einem einzelnen Helferkonstrukt den Replikationsdefekt des Minigenoms aufheben könnte und nicht von einer Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens auszugehen ist. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1** oder **2**. Mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit können jedoch nach einer mindestens zweifachen illegitimen Rekombination auch replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 4** entstehen. Aufgrund der sehr geringen Eintrittswahrscheinlichkeit dieses Ereignisses werden für diese Arbeiten **Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3** als ausreichend angesehen.
- 3.18.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die ein Minigenom und ein oder mehrere Helferplasmide oder äquivalente Nukleinsäureabschnitte, die für virale Struktur- und Nichtstrukturproteine kodieren, übertragen wurden und bei denen eine Aufhebung des Replikationsdefekts des Minigenoms aufgrund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens nicht ausgeschlossen werden kann, sind als GVO im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten. Es kommt zur Abgabe infektiöser virusähnlicher Partikel. Diese sind GVO der **Risikogruppe 1** oder **2**. Zudem ist die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel nicht auszuschließen.

Transduktion von humanen oder tierischen Zellen mit virusähnlichen Partikeln

- 3.19.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die RNA mithilfe virusähnlicher Partikel der **Risikogruppe 1** übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern die replikationsdefekten Partikel nicht im Gemisch mit replikationskompetenten Viruspartikeln vorliegen und der Replikationsdefekt der virusähnlichen Partikel nicht aufgehoben wird. In Abwesenheit viraler Strukturproteine kommt es nicht zur Abgabe virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.20.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die RNA mithilfe virusähnlicher Partikel der **Risikogruppe 2** übertragen wurde, sind nach Abschluss der Transduktion GVO der **Risikogruppe 1**, sofern die replikationsdefekten Partikel nicht im Gemisch mit replikationskompetenten Viruspartikeln vorliegen und keine viralen Strukturproteine exprimiert werden. Es kommt nicht zur Abgabe virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.21.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 2, 3**** oder **3**, in denen bereits virale Genome vorliegen und auf die RNA mithilfe virusähnlicher Partikel der **Risikogruppe 1** oder **2** übertragen wurde, sind GVO und der Risikogruppe der nicht-transduzierten Zellen zuzuordnen, sofern die replikationsdefekten Partikel nicht im Gemisch mit replikationskompetenten Viruspartikeln vorliegen und nicht von homologer Rekombination zwischen einer bereits anfänglich vorliegenden und der eingebrachten viralen RNA auszugehen ist. Es kommt ggf. zur Abgabe virusähnlicher Partikel oder replikationskompetenter Viruspartikel.
- 3.22.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die RNA mithilfe virusähnlicher Partikel der **Risikogruppe 1** oder **2** übertragen wurde, bei denen auf-

grund von homologer Rekombination oder eines Fremdgens eine Mischung mit replikationskompetenten Viruspartikeln nicht ausgeschlossen werden kann, sind als GVO im **Einzelfall** durch die ZKBS zu bewerten. Die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel ist nicht auszuschließen.

- 3.23.** Humane und tierische Zellen der **Risikogruppe 1, 2, 3**** oder **3**, auf die RNA eines Virus der **Risikogruppe 4** mithilfe virusähnlicher Partikel der **Risikogruppe 1** oder **2** übertragen wurde, bei denen aufgrund von illegitimer Rekombination eine Mischung mit replikationskompetenten Viruspartikeln nicht ausgeschlossen werden kann, sind GVO der **Risikogruppe 3**. Die Abgabe replikationskompetenter Viruspartikel ist nicht auszuschließen. Aufgrund der sehr geringen Eintrittswahrscheinlichkeit der Bildung replikationskompetenter Viruspartikel werden für diese Arbeiten **Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3** als ausreichend angesehen.

4. Hinweise

Weiterführende Erklärungen zu spezifischen viralen Minigenomen, viralen Replikons und/oder virusähnlichen Partikeln sind in den folgenden allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS zu finden:

- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Stabile und transiente Genexpression mithilfe γ -retroviraler und lentiviraler Vektoren (Az. 6790-10-41, aktualisiert Februar 2020)
- Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentechnische Arbeiten mit dem Sindbis-Virus und dem Semliki-Forest-Virus-Expressionssystem (Az. 6790-10-50, aktualisiert Mai 2017)
- Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung von Replikonkonstrukten des HCV in eukaryonten Zellen (Az. 6790-10-78, März 2003)
- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung rekombinanter Rabies- und Vesikuläre-Stomatitis-Viren (Az. 45310.0117, aktualisiert September 2019)

Beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial sowie mit *E. coli*, eukaryotischen Zellen und virusähnlichen Partikeln, in denen diese Nukleinsäuren episomal vorliegen bzw. die diese enthalten, sind die folgenden zusätzlichen Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten:

- Es sind Einmalhandschuhe zu tragen und regelmäßig zu wechseln.
- Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit einer ausgeprägten Verrucosis (Warzenausbildung) sollten keine Arbeiten mit o. g. Nukleinsäuren, Zellen oder Partikeln durchführen.
- Der Gebrauch von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborgegenständen soll nach Möglichkeit vermieden werden.
- Arbeitsplatz und Laborgeräte, die mit o. g. Nukleinsäuren, Zellen oder Partikeln in Berührung kommen, sind nach Beendigung der Tätigkeit sorgfältig zu reinigen.
- Laborabfälle, die o. g. Nukleinsäuren, Zellen oder Partikel enthalten, sind durch Autoklavieren oder chemisch zu denaturieren bzw. zu inaktivieren.

Zudem sind beim Umgang mit virusähnlichen Partikeln, die Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthalten und diese auf humane Zellen übertragen können, die folgenden Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten:

- Die Sicherheitswerkbank, in der diese Arbeiten durchgeführt werden, ist entsprechend zu kennzeichnen.

- Gefäße und Geräte, die aus der Sicherheitswerkbank entfernt werden, sind zuvor von außen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel zu desinfizieren.
- Zellkulturflaschen, in denen die virusähnlichen Partikel vorliegen, sind vorzugsweise mit Filterschraubverschluss zu verschließen. Werden keine Filterschraubverschlüsse genutzt, sind die Zellkulturflaschen, in denen die virusähnlichen Partikel vorliegen, nur soweit zu öffnen, dass ein Gasaustausch gewährleistet ist. Zudem hat die Belüftung zum Gasaustausch erst im CO₂-Brutschrank zu erfolgen, um das Austreten von Kulturflüssigkeit während des Transports zu vermeiden.
- Beim Umgang mit virusähnlichen Partikeln, die nicht über die Luft übertragen werden, ist zur Vermeidung einer Schmierinfektion ein Mund- und Nasenschutz zu tragen.
- Beim Umgang mit virusähnlichen Partikeln, die über die Luft übertragen werden können, ist ein Atemschutz mit einem Rückhaltevermögen der Klasse P3 zu tragen. Über ein solches Rückhaltevermögen verfügen beispielsweise FFP3-Atemschutzmasken, Respiratoren mit P3-Filter und TH3P-Atemschutzhauben. Dabei sind TH3P-Atemschutzhauben als besonders geeignet anzusehen, da sie für den Träger weniger belastend sind und zudem geringere Leckageprobleme bestehen.

Es wird zudem 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)
- Stellungnahme der ZKBS: Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potential eingeführt wurden (Az. 6790-10-36, aktualisiert Dezember 2014)

5. Literatur

1. **Hoenen T, Groseth A, Kok-Mercado F de, Kuhn JH, Wahl-Jensen V** (2011). Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res* **91**(2):195–208.
2. **Lundstrom K** (2016). Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines. *Vaccines (Basel)* **4**(4):39.
3. **Schott JW, Morgan M, Galla M, Schambach A** (2016). Viral and Synthetic RNA Vector Technologies and Applications. *Mol Ther* **24**(9):1513–27.
4. **Fernandes RS, Freire MCLC, Bueno RV, Godoy AS, Gil LHV, Oliva G** (2020). Reporter Replicons for Antiviral Drug Discovery against Positive Single-Stranded RNA Viruses. *Viruses* **12**(6):598.
5. **Roldão A, Silva AC, Mellado MCM, Alves PM, Carrondo MJT** (2019). Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications. *Comprehensive Biotechnology* **2017**:633–56.