

**Allgemeine Stellungnahme der ZKBS
zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den
zugrundeliegenden Kriterien der Vergleichbarkeit:
Risikobewertung Adeno-assoziiierter Viren aus Primaten
und davon abgeleiteter Vektoren**

1	Adeno-assoziierte Viren.....	2
1.1	Taxonomie	2
1.2	Genomorganisation von AAV	2
1.3	Pathogenität von AAV	3
1.3.1	Genotoxizität von AAV	4
1.3.2	Einstufung von AAV nach TRBA 462 bzw. in anderen Ländern.....	4
1.4	Empfehlung	5
1.5	Begründung	5
2	AAV-abgeleitete Vektorsysteme.....	5
2.1	Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel.....	5
2.2	Biodistribution, Stabilität und Ausscheidung (<i>shedding</i>) von Viruspartikeln	7
2.3	Rekombination von AAV-Vektoren	8
2.4	Genotoxizität von AAV-Vektoren	8
2.5	Bewertung gentechnischer Arbeiten mit AAV-Vektoren und Kriterien für die Einstufung ...	9
2.6	Hinweise zu gentechnischen Arbeiten mit AAV-Vektoren	9
3	Literatur	10

1 Adeno-assoziierte Viren

1.1 Taxonomie

Die Subfamilie der *Parvovirinae* innerhalb der Familie *Parvoviridae* ist in 11 Gattungen unterteilt¹. Die Adeno-assoziierten Viren (AAV) sind als Helfervirus-abhängige Viren der Gattung *Dependoparvovirus* zugeordnet [1, 2]. Bisher wurden über hundert Isolate von AAV isoliert, die 13 Serotypen zugeordnet werden [3, 4]. Diese gehören entweder zu den Spezies *Dependoparvovirus mammalian1* (ehemals Adeno-associated dependoparvovirus B, Dependoparvovirus B) oder *Dependoparvovirus primate1* (ehemals Adeno-associated dependoparvovirus A, Dependoparvovirus A) [3, 5–10]:

- *D. mammalian1*: Serotyp **AAV5** (isoliert aus Affen),
- *D. primate1*: Serotypen **AAV1** (isoliert sowohl aus Affen als auch aus dem Menschen), **AAV2, -3, -6 und -9** (isoliert aus dem Menschen) und **AAV4 sowie AAV7, -8 und AAV10 bis -13** (isoliert aus Affen)

Weitere AAV-Isolate sind noch keiner AAV-Spezies zugeordnet (z. B. AAV rh.74, AAV po 1 und AAVrh-10).

Die Viren sind trotz des jeweils engen Wirtsspektrums der einzelnen Serotypen ubiquitär bei Primaten und dem Menschen verbreitet [2, 11]. Sie können sowohl durch Kontaktinfektion als auch über Aerosole übertragen werden [12–14]. Eine vertikale Transmission von der Mutter auf den Fötus wird ebenfalls diskutiert [12]. AAV wurden erstmals 1965 als Kontamination bei der Herstellung von Adenoviren beschrieben [15–17]. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 22 nm, sind nicht umhüllt und in ein ikosaedrisches Nukleokapsid verpackt, das sehr stabil gegen Umwelteinflüsse ist [18].

1.2 Genomorganisation von AAV

Das lineare, einzelsträngige DNA-Genom besteht aus den zwei offenen Leserahmen *rep* und *cap* (siehe Abb.1a). Die durch *rep* kodierten vier Nichtstrukturproteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 sind wichtig für die Replikation des Virus, die Expression der Strukturproteine und die Integration des Virusgenoms in das Genom der Wirtszelle. Die drei Kapsid- bzw. Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 werden durch *cap* kodiert und bilden das ikosaedrische Nukleokapsid. Hypervariable Regionen der Kapsidproteine beeinflussen die Gewebespezifität, die für die verschiedenen AAV-Serotypen sehr unterschiedlich ist [3, 19].

Der kodierende Bereich des Genoms wird von je einem *inverted terminal repeat* (ITR) flankiert. Die ITR enthalten die *cis*-aktiven Elemente für die Replikation des Virusgenoms und dessen Integration ins Wirtsgenom sowie das Verpackungssignal. Für eine produktive, lytische Infektion benötigen AAV Helferfunktionen, die von Helferviren (wie z. B. Vertretern der Gattung *Mastadenovirus* oder der Familie *Orthoherpesviridae*) zur Verfügung gestellt werden.

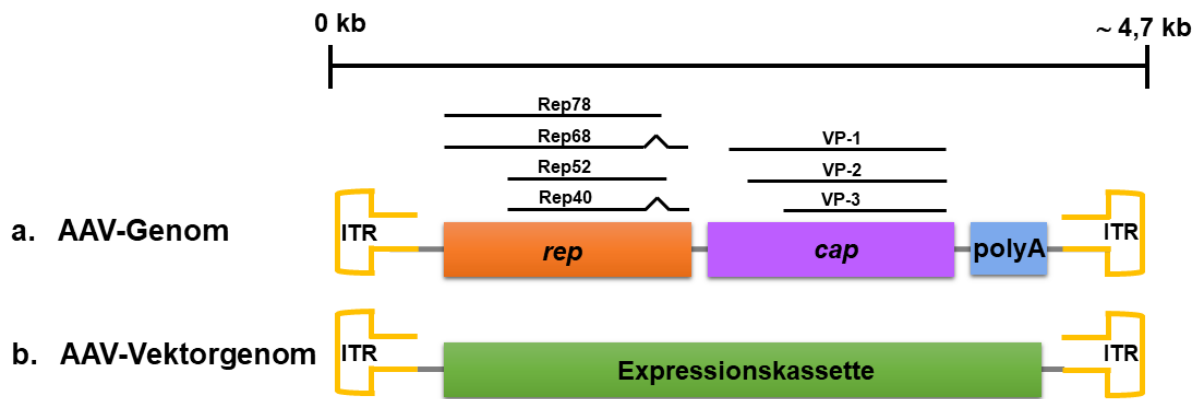


Abb. 1 Genomkarte AAV-abgeleiteter Vektoren. a. Genomkarte von AAV. Die offenen Leserahmen für die Nichtstrukturproteine (*rep*) und die Strukturproteine (*cap*) sowie die Polyadenylierungsregion (*polyA*) und die *inverted terminal repeats* (ITR) sind gekennzeichnet. Die Exons und herausgespleißten Introns sind kenntlich gemacht. **b. Genomkarte AAV-abgeleiteter Vektoren mit Expressionskassette.** Alle viralen kodierenden Nukleinsäureabschnitte sind deletiert und i. d. R. durch eine Expressionskassette zur Expression eines Transgens ersetzt. Abbildung modifiziert nach [20].

1.3 Pathogenität von AAV

Verschiedene AAV-Serotypen sind beim Menschen weit verbreitet. Dies spiegelt sich in einer hohen Seroprävalenz für diese AAV-Serotypen bzw. davon abgeleitete Kapside wider [21]. Abhängig vom Alter und der geografischen Region besitzen etwa 80 % der Menschen Antikörper gegen einige AAV-Serotypen [11]. Diese zeigen eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber anderen AAV-Serotypen [22].

Insgesamt sind 70 % der Menschen seropositiv für AAV1, -2 und -3 [11, 23–25]. Etwa 45 % weisen Antikörper gegen AAV5 und -6 auf [11, 23]. Niedriger ist die Seroprävalenz für AAV8 und -9 (~ 38 %, [11, 23–25]), AAV7 (10 %) und AAV4 (unter 2 %, [24, 26]). Für die AAV-Serotypen AAV10 bis -13 sind keine natürlichen Infektionen beim Menschen beschrieben, so dass ihre Seroprävalenz niedrig oder unbekannt ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese AAV für den Menschen pathogen sind, ist sehr gering. Auch in nicht-humanen Primaten können hohe Antikörpertiter für bestimmte AAV-Serotypen nachgewiesen werden [27, 28], ohne dass eine Pathogenität von AAV für nicht-humane Primaten bekannt ist.

Publikationen aus dem Jahr 2023 diskutierten, dass AAV2 eventuell an der Entstehung akuter Hepatitiden bei Kindern mit schwerem Verlauf beteiligt ist. Der Mobilisierung des latent vorliegenden AAV2-Genoms ging jedoch immer eine Infektion von Leberzellen mit einem oder mehreren Helferviren (z. B. der Gattung *Mastadenovirus*) voraus. Dabei kam es zu einer pathologischen Immunreaktion, bei der B- und T-Zellen in der Leber akkumulierten [29, 30]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine bestimmte Zusammensetzung des *human leukocyte antigen* (HLA-Typ) der Klasse II die Ausprägung der Immunpathologie begünstigt, da in einer Studie bei 93 % der Patienten mit der o. g. Hepatitis das Allel HLA-DRB1*04:01 nachgewiesen werden konnte, das jedoch nur bei 16 % der Normalbevölkerung vorliegt [31]. Es ist somit nicht zu erwarten, dass AAV2 ursächlich für die Entstehung der schweren akuten Hepatitiden ist, da zwar AAV2-Genome, aber keine viralen Proteine in Leberbiopsien und im Blut betroffener Patienten nachgewiesen werden konnten [30].

AAV sind in der Lage, eine Reihe von Gewebetypen zu infizieren. Dabei ergaben sich Hinweise, dass AAV2 beim Menschen sowohl den Gebärmutterhals als auch den Uterus infizieren kann [32]. In Biopsieproben des Gebärmutterhalses von Frauen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie konnten neben der genomischen DNA von AAV2 auch infektiöse AAV-Partikel nachgewiesen werden [33]. Diese lagen i. d. R. jedoch zusammen mit Partikeln des Humanen Papillomavirus Typ 16 vor [33]. Auch in Plazentaprobe aus Spontanaborten konnten sowohl die genomische DNA von AAV2 als auch virale Proteine in verschiedenen Zellschichten nachgewiesen werden [32]. Genomische DNA und infektiöse AAV-Partikel konnten bei einem geringen Anteil der untersuchten Fruchtwasserproben schwangerer Frauen nachgewiesen werden (infektiöse AAV-Partikel nachgewiesen bei 30 % der AAV-Genom-positiven Fruchtwasserproben) [32]. Auch hier lagen infektiöse AAV-Partikel i. d. R. zusammen mit Helferviruspartikeln vor [32].

In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass AAV2-DNA signifikant häufiger in extravillösen Trophoblasten von Präeklampsiepatientinnen nachgewiesen wurde (n = 22/40) als in extravillösen Trophoblasten von Müttern, deren Schwangerschaft unproblematisch verlaufen war (n = 5/27). Es wurde vermutet, dass die AAV2-Infektion die Invasion der Gebärmutter Schleimhaut durch die extravillösen Trophoblasten behindert, so dass die Funktion der Plazenta beeinträchtigt wird [34]. Seit diesen Veröffentlichungen Ende der 90er bzw. in den 2000er Jahren gibt es keine neuen Erkenntnisse dazu, dass eine AAV-Infektion Schwangerschaften negativ beeinflussen kann.

1.3.1 Genotoxizität von AAV

In der Regel liegt das Genom von AAV nach Infektion einer Wirtszelle in episomaler Form vor. Jedoch können AAV mit einer Frequenz von ca. 0,1 % der in der infizierten Zelle vorliegenden AAV-Genome in das Wirtsgenom integrieren [13, 22, 35, 36]. Üblicherweise kommt es dabei zu einer Rep78/68-vermittelten, ortsspezifischen Integration am AAVS1-Locus im humanen Chromosom 19 [22, 35, 37]. Von einer auf der Integration des AAV-Genoms basierenden Onkogenese ist beim Menschen nicht auszugehen, da die Integration nicht unspezifisch erfolgt. Vielmehr ist für verschiedene AAV beschrieben, dass die Integration des Genoms vor einer Onkogenese schützt, da sie die zelluläre Transformation durch andere Viren (z. B. Adenoviren) inhibiert [38, 39].

1.3.2 Einstufung von AAV nach TRBA 462 bzw. in anderen Ländern

Bisher wurden die AAV-Serotypen AAV1 bis -3, AAV3b, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 und AAVrh10 in die Risikogruppe 1 eingestuft. AAV der Serotypen AAV4, AAV7 und AAV10 bis -13 sowie AAV po 1 und AAV rh.74 wurden der Risikogruppe 2 zugeordnet. Dies wurde damit begründet, dass aufgrund der geringen Seroprävalenz dieser Serotypen nicht hinreichend sicher war, dass sie apathogen sind.

In der TRBA 462 „Einstufung von Viren und TSE-Agenzien in Risikogruppen“ sind die AAV-Serotypen 1 bis 5 in die Risikogruppe 2 eingestuft [40].

Die niederländische *Commissie Genetische Modificatie* (COGEM) stuft die Serotypen AAV10 bis -12 sowie AAVrh10 in die Risikogruppe 1 ein [41]. Darüber hinaus empfahl sie, generell alle AAV der Spezies *D. primate1* und *D. mammalian1* der Risikogruppe 1 zuzuordnen [41]. Begründet wurde dies mit der ubiquitären Verbreitung, der Abhängigkeit von einem Helfervirus sowie dem Fehlen jeglicher Hinweise auf eine Pathogenität.

Der belgische *Service Biosécurité et Biotechnologie* (SBB) ordnet AAV2 und AAV2-abgeleitete virale Vektoren der Risikogruppe 1 zu [42].

Die *US National Institutes of Health* (NIH) haben alle AAV-Serotypen aufgrund ihrer Apathogenität der Risikogruppe 1 zugeordnet [43].

1.4 Empfehlung

Gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV werden *D. mammalian1* und *D. primate1* sowie die AAVrh-10, AAV po 1 und AAV rh74 als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

1.5 Begründung

Obwohl AAV ubiquitär verbreitet sind und häufig den Menschen infizieren, wurde bislang kein kausaler Zusammenhang zwischen einer AAV-Infektion und einer hierdurch hervorgerufenen Pathogenität für den Menschen oder nicht-humane Primaten nachgewiesen. Die Hinweise auf einen mögliche Pathologie von AAV2 in der Schwangerschaft haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten nicht weiter konkretisiert. Von einer eigenen Pathogenität von AAV2 ist daher nach wie vor nicht auszugehen. Zudem ist nicht davon auszugehen, dass die Integration von AAV-Genomen eine Onkogenese beim Menschen hervorruft.

2 AAV-abgeleitete Vektorsysteme

Bei AAV-abgeleiteten Vektoren handelt es sich um infektiöse, replikationsdefekte Partikel, bei denen die viralen kodierenden Nukleinsäureabschnitte deletiert und i. d. R. durch eine Expressionskassette zur Expression eines Transgens ersetzt wurden (siehe Abb. 1).

Der Anwendungsbereich für rekombinante AAV-Vektoren ist dabei sehr vielfältig. So werden AAV-Vektoren u. a. als virale *tracer* eingesetzt, um die Konnektivität von Neuronen zu untersuchen [44], oder dienen der Analyse der Biodistribution [45]. Darüber hinaus werden AAV-Vektoren inzwischen in zahlreichen klinischen Studien als Therapeutika für verschiedenste Erkrankungen geprüft [3, 39, 46, 47]. Einige AAV-basierte Arzneimittel wurden in Europa bereits zugelassen (Glybera®, Luxturna™, Hemgenix®, Roctavian®, Upstaza®, Durveqtix® [48]).

2.1 Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel

Zur Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel können verschiedene Systeme verwendet werden. Das klassische System zur Herstellung rekombinanter AAV-Vektorpartikel besteht aus zwei, meist von pBR322 abgeleiteten Plasmiden und einem Helfervirus [22]. Das Transferplasmid trägt von AAV nur die ITR, die stromaufwärts und -abwärts des zu übertragenden Nukleinsäureabschnitts liegen. Auf dem Helferplasmid liegen von AAV nur die Leserahmen *rep* und *cap* vor. Homologe AAV-Nukleotidsequenzen liegen in Transfer- und Helferplasmiden nicht vor, so dass keine homologe Rekombination zu erwarten ist.

Zur Produktion von AAV-Vektorpartikeln werden Wirtszellen mit den Transfer- und Helferplasmiden ko-transfiziert und, je nach Herstellungssystem, ggf. mit einem Helfervirus infiziert, das die zur Vermehrung von AAV essenziellen viralen Helferfunktionen bereitstellt. Alternativ werden die viralen Helferfunktionen unabhängig vom Helfervirus auf einem weiteren Plasmid bereitgestellt, sodass eine Infektion mit einem replikationskompetenten Helfervirus nicht mehr notwendig ist [22]. Dadurch ist ausgeschlossen, dass die auf diese Weise hergestellten rekombinanten AAV-Vektorpartikel ggf. mit replikationskompetenten Helferviren kontaminiert sind. Von dem früher häufig als Helfervirus genutzten *Mastadenovirus caesari* (Humanes Adenovirus Typ 5) sind die Proteine E1a, E1b, E2a, E4 und VA für die Produktion von AAV-Vektorpartikeln notwendig. Durch die Verwendung einer 293-abgeleiteten Zelllinie 293 die die adenoviralen E1-Proteine zur Verfügung stellt, sind auf den Helferplasmiden, abgesehen von den *rep*- und *cap*-Nukleotidsequenzen, nur die Gene für die adenoviralen Proteine E2a, E4 und VA erforderlich [49] (s. Abb. 2).

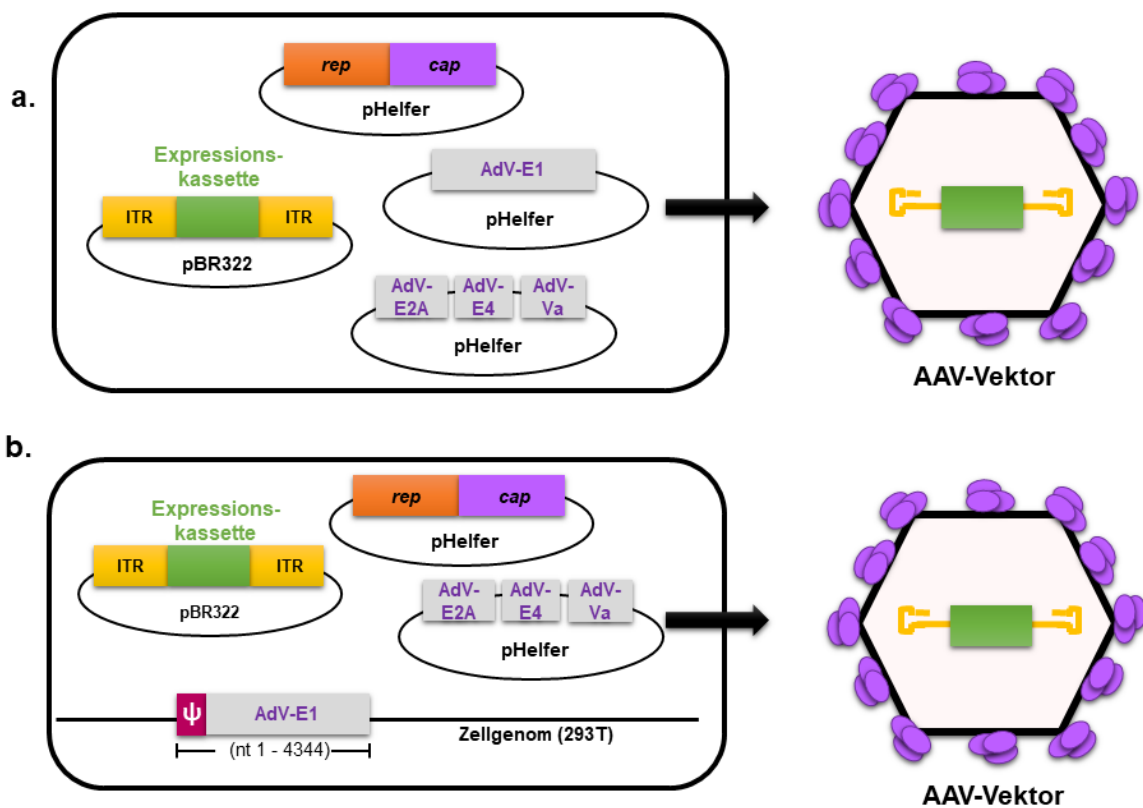


Abb. 2 Herstellung replikationsdefekter AAV-Vektorpartikel. a. Eine eukaryotische Zelle wird mit einem von pBR322-abgeleiteten Transferplasmid und drei Helferplasmiden transfiziert. Das Transferplasmid enthält dabei das Transgen, flankiert von den AAV-ITR. Eines der Helferplasmide trägt die Genabschnitte der AAV-Proteine und die anderen beiden die notwendigen Gene eines Helfervirus (z. B. E1-, E2A-, E4- und Va-Gene von Adenovirus (AdV)), welche die für die AAV-Partikelbildung benötigten Genfunktionen zur Verfügung stellen. Es werden replikationsdefekte, infektiöse AAV-Partikel von den Zellen abgegeben. **b.** Im Genom der Helferzelllinie (häufig 293T) liegt das 5'-Ende des AdV-Genoms mit der E1-Region integriert vor und exprimiert die E1-Genprodukte. Die Leserahmen der AAV-Proteine und die E2A-, E4- und Va-Gene von AdV werden durch Ko-Transfektion der Helferplasmide bereitgestellt. *rep/cap* und die adenoviralen Helfergene können auch auf einem kombinierten Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden.

Die Vektorpartikel sind replikationsdefekt. Außer den AAV-ITR liegen keine genetischen Elemente von AAV oder den Helferviren auf dem Transfektor vor.

Häufig werden auch AAV-Vektorpartikel hergestellt, die die ITR eines AAV-Serotyps enthalten, aber das Kapsid eines anderen Serotyps, eines anderen Virus der Gattung *Dependoparvovirus* oder ein chimäres Kapsid mit Anteilen von Kapsiden unterschiedlicher AAV-Serotype (pseudotypisierte AAV-Partikel). Auf diese Weise kann der Zelltropismus der AAV-Vektorpartikel beeinflusst werden [50]. Neben dem oben geschildertem Verfahren können AAV-Vektorpartikel auch mit Verfahren hergestellt werden, für die virale Funktionen von Herpes- oder Baculoviren genutzt werden [51, 52].

2.2 Biodistribution, Stabilität und Ausscheidung (*shedding*) von Viruspartikeln

Die meisten der bekannten AAV-Serotypen wurden bezüglich ihres Tropismus hinlänglich untersucht. Für einige der AAV-Serotypen lassen sich, auch wenn in den Studien voneinander abweichende Parameter (Dosis, Promotor, Transgen, Spezies) verwendet wurden, generelle Aussagen treffen [46, 53]. So ist u. a. für AAV2 und -9 bekannt, dass beide eine Reihe unterschiedlichster Gewebetypen infizieren können, wie z. B. Leber, Muskulatur, Lunge, Niere und Gehirn [53]. AAV1 und -7 infizieren hingegen effizient Skelettmuskelzellen [53]. Bestimmte AAV-Serotypen (z. B. AAV2) sind in der Lage, sowohl die Blut-Hirn- als auch die Plazenta-Schranke zu überwinden [32, 54]. Der Tropismus von AAV hängt u. a. davon ab, an welchen zellulären Rezeptor der jeweilige Serotyp bindet [55]. Während AAV2 Heparansulfat-Proteoglykan als primären Rezeptor bevorzugt, bindet AAV1 u. a. an α -3-verknüpfte Sialinsäuren. AAV9 hingegen bevorzugt die *terminal N-linked galactose* [55].

Wie lange und wie viele infektiöse AAV-Partikel in bestimmten Geweben verbleiben, hängt von mehreren Faktoren ab, wie z. B. der Spezies, der verwendeten Dosis, der Art und dem Durchblutungsgrad des Gewebes und dem Status des Immunsystems. Eine pauschalisierende Aussage lässt sich hierzu nicht treffen, insbesondere bei Verwendung pseudotypisierter AAV-Partikel [56]. Durch die Pseudotypisierung kann sich der Zelltropismus und damit auch die Verweildauer der Partikel und ihr *shedding* verändern. Untersuchungen an Mäusen deuten zudem darauf hin, dass unter gleichen Bedingungen (intravenöse Applikation von 4×10^{11} viralen Genomen/kg Körpergewicht) unterschiedliche AAV-Serotypen unterschiedlich schnell aus dem vaskulären System eliminiert werden [57]. Während für AAV2 bereits nach 24 Stunden keine infektiösen Partikel im Blut der Mäuse mehr nachweisbar waren, blieben AAV8 und -9 bis zu drei Tage stabil und infektiös [57]. Ein genereller Rückschluss darauf, ob und wie lange residuale infektiöse AAV-Partikel im Blut und in den Geweben verbleiben, kann hieraus nicht gezogen werden.

Das *shedding* infektiöser viraler Partikel wird, wie der Verbleib der AAV-Partikel in Gewebetypen, durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Auch wenn in klinischen Studien der Nachweis (infektiöser) viraler Partikel i. d. R. nur indirekt durch qPCR zur Detektion von Genomen rekombinanter AAV-Vektoren erfolgt, legen die Daten der Studien nahe, dass stabile AAV-Partikel vorliegen können. Dies ist anzunehmen, da AAV-Genome über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden, obwohl AAV-DNA außerhalb von Zellen üblicherweise schnell abgebaut wird. So wurden, unabhängig von der Administrationsroute, Genome rekombinanter AAV-Vektoren über mehrere Wochen im Serum von Patienten nachgewiesen [58]. Abhängig vom Weg der Verabreichung und vom AAV-Serotyp kam es nach intravenöser Verabreichung in Kaninchen zu einer

Verbreitung des AAV-Vektors in die Gonaden, was zu einem mehrere Wochen anhaltenden *shedding* über die Samenflüssigkeit führte [59–63]. Die Dauer des *sheddings* variierte dabei abhängig vom AAV-Serotyp [61]. Aus Studien an Mäusen, denen $8,4 \times 10^8$ AAV2/-8-Genome intra-zerebral injiziert worden war, ist bekannt, dass die Genome der viralen Vektoren in Fäkalien, Urin und Speichel bis zu fünf Tage lang detektiert werden konnten. Dabei waren jedoch zu keinem Zeitpunkt infektiöse Partikel nachweisbar [64]. Im Gegensatz dazu wurde, nach intravenöser Applikation von 2×10^{12} viralen Genomen/kg Körpergewicht von AAV2/-8 in Mäuse, ein bis zu 14 Wochen anhaltendes *shedding* von AAV-Vektorgenomen beobachtet [62].

Zusammenfassend lässt sich keine allgemeine Aussage treffen, ab welchem Zeitpunkt behandelte Versuchstiere keine infektiösen AAV-Partikel mehr abgeben und somit nicht mehr als Träger von GVO anzusehen sind. Daher sind bei Tierversuchen für die Entsorgung von Einstreu und Tierkadavern bzw. den Umgang mit Gewebe von Versuchstieren, die mit AAV-Vektorpartikel inokuliert wurden, die unter 3. in Abschnitt 2.6 genannten Hinweise zu beachten.

2.3 Rekombination von AAV-Vektoren

Prinzipiell ist es möglich, dass AAV-Vektoren mit Wildtyp-AAV rekombinieren. Rekombinante replikationsdefekte AAV-Vektoren enthalten jedoch lediglich die flankierenden ITR mit einer dazwischenliegenden Expressionskassette für ein Transgen, so dass sich die homologen Bereiche zwischen wtAAV und AAV-Vektor auf die ITR beschränken. Ein Austausch der ITR durch homologe Rekombination führt nicht zur Aufhebung des Replikationsdefektes der AAV-Vektoren und erhöht demnach nicht ihr Gefährdungspotenzial.

2.4 Genotoxizität von AAV-Vektoren

In der Regel liegt das Genom von AAV-Vektoren nach Infektion einer Wirtszelle in episomaler Form vor. Eine Integration in den AAVS1-Locus im humanen Genom ist nicht zu erwarten, da im AAV-Vektorgenom die genetische Information für Rep78/68 fehlt (s. auch Abschnitt 1.3.1). Jedoch können AAV-Vektoren mit einer Frequenz von ca. 0,1 % der in der infizierten Zelle vorliegenden AAV-Genome unspezifisch in das Wirtsgenom integrieren [13, 22, 35, 36]. Dies kann sowohl zufällig als auch in sog. *hot spots* im Mitochondriengenom erfolgen [31]. Zwar wurde in einer Studie an neonatalen Mäusen eine höhere Integrationsrate von bis zu 10 % beobachtet, die auch mit einer Onkogenese verbunden sein konnte [37]. Im Gegensatz dazu ist aus einer Vielzahl klinischer Studien bekannt, dass Integrationsereignisse beim Menschen äußerst selten sind. Bislang wurde im Zusammenhang mit klinischen Studien oder der Anwendung von Gentherapeutika lediglich ein einziges Integrationsereignis beschrieben, das jedoch nicht zu einer Onkogenese führte [65]. Somit wurde bislang kein Fall einer Tumorbildung nach Applikation mit rekombinanten AAV-Vektorpartikeln beschrieben [21]. Von einer durch die Integration der AAV-Vektoren verursachten Onkogenese ist beim Menschen demnach nicht auszugehen.

2.5 Bewertung gentechnischer Arbeiten mit AAV-Vektoren und Kriterien für die Einstufung

1. Rekombinante AAV-Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäureabschnitte von AAV und zusätzlich nur Nukleinsäureabschnitte ohne Gefährdungspotenzial enthalten, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft, auch wenn sie pseudotypisiert sind. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
2. Zellen oder Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die mit den unter Punkt 1 genannten, rekombinanten AAV-Vektorpartikeln transduziert worden sind, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
3. Rekombinante AAV-Vektorpartikel, die außer den ITR keine Nukleinsäureabschnitte von AAV, jedoch zusätzlich Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial enthalten, werden in die **Risikogruppe 2** eingestuft. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 2** zuzuordnen.

Bei gentechnischen Arbeiten mit solchen AAV-Partikeln sind zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen zu beachten (s. Stellungnahme der ZKBS: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016), Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen (Az. 6790-10-83, aktualisiert April 2020)).

4. Zellen oder Zelllinien der **Risikogruppe 1**, die mit den unter Punkt 3 genannten, rekombinanten AAV-Vektorpartikeln transduziert worden sind, werden in die **Risikogruppe 1** eingestuft, wenn die Transduktion abgeschlossen ist. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind der **Sicherheitsstufe 1** zuzuordnen.
5. Sollen mithilfe von AAV-Vektoren Gene für Prionproteine oder Toxine übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.

2.6 Hinweise zu gentechnischen Arbeiten mit AAV-Vektoren

1. Sind AAV-Vektorpartikel bedingt durch das System, das zu ihrer Herstellung verwendet wurde, mit **Helferviren kontaminiert**, geht das Gefährdungspotenzial der Helferviren vollständig in die Risikobewertung ein.
2. AAV sind sehr unempfindlich gegenüber alkoholischen **Desinfektionsmitteln**. Bei gentechnischen Arbeiten mit AAV oder AAV-Vektoren sind daher die Empfehlungen zur Hände- und Flächendesinfektion bei gentechnischen Arbeiten mit Parvoviren zu beachten, die in der Stellungnahme der ZKBS zu Hände- und Flächendesinfektionsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten mit Viren bis Sicherheitsstufe 4 (Az. 6790-10-49, aktualisiert November 2023, Abschnitt 2.2.1) getroffen werden.
3. Tierversuche mit AAV-Vektorpartikeln:

- 3.1. Versuchstiere, deren somatische Zellen mithilfe rekombinanter, replikationsdefekter AAV-Vektorpartikel transduziert wurden, sind **keine GVO**. Die Tiere sind jedoch grundsätzlich als **Träger von GVO** anzusehen, solange die Vektorpartikel vorliegen. Auch transduzierte somatische Zellen im Tier sind keine GVO, da tierische Zellen im Organismus keine Mikroorganismen nach § 3 Nr. 1 Gentechnikgesetz sind, solange sie nicht in Zellkultur vermehrt werden. Der Zeitraum, in dem infektiöse Vektorpartikel im Tier verbleiben, hängt von mehreren Faktoren ab (z. B. Dosis, Applikationsroute). Zudem können die Tiere die verabreichten Vektorpartikel ggf. wieder abgeben. In diesem Fall sind auch Einstreu und ggf. mit den Ausscheidungen in Kontakt gekommene Oberflächen als GVO-kontaminiert anzusehen.

Wird mithilfe von Daten, gewonnen wie z. B. in [64], oder geeigneter Literatur für den Einzelfall oder vergleichbare experimentelle Ansätze belegt, dass das behandelte Tier nach einer bestimmten Zeit keine AAV-Vektorpartikel mehr abgibt, kann die für den Vollzug des Gentechnikrechts zuständige Landesbehörde orientiert an diesen Daten entsprechende Fristen festlegen, nach deren Ablauf nicht mehr von einer **Abgabe von GVO** auszugehen ist.

- 3.2. Gewebe und Zellen von Versuchstieren, die mit AAV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 1 oder 2** inokuliert worden sind, können Vektorpartikel der **Risikogruppe 1 oder 2** enthalten, auch über den Nachweis hinaus, dass die Versuchstiere keine Partikel mehr abgeben. Für den Umgang mit entnommenem Gewebe oder Zellen sind Maßnahmen der **Sicherheitsstufe 1 bzw. 2** erforderlich. Kann mithilfe von Daten, gewonnen wie z. B. in [64], oder geeigneter Literatur für den Einzelfall oder vergleichbare Systeme belegt werden, dass in dem betroffenen Gewebe keine Viruspartikel vorliegen, kann die zuständige Landesbehörde Fristen festlegen, nach denen nicht von der Kontamination mit AAV-Vektorpartikeln auszugehen ist und ggf. die gentechnischen Arbeiten herabgestuft bzw. auf spezifische Sicherheitsmaßnahmen für den Umgang mit AAV-Vektorpartikeln verzichtet werden kann.
- 3.3. **Kadaver von Versuchstieren**, die mit AAV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 1** inokuliert worden sind, können gemäß § 24 Abs. 1 Nr. 3 GenTSV der Versuchstierentsorgung zugeführt werden, ohne sie vorher zu autoklavieren. Es ist davon auszugehen, dass der Schutz der Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz auch in diesem Fall gewährleistet ist, da die Tiere keinen aktiven Stoffwechsel betreiben und verbliebene Partikel ohne Gefährdungspotenzial sind.

Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass sieben Tage nach der Inokulation von Versuchstieren mit AAV-Vektorpartikeln eine deutliche Abreicherung der Partikel erreicht ist. Auch **Kadaver von Versuchstieren**, die mit AAV-Vektorpartikeln der **Risikogruppe 2** inokuliert worden sind, können daher ab diesem Zeitpunkt gemäß § 2 Abs. 2 Satz 2 GenTSV der Versuchstierentsorgung zugeführt werden, ohne sie vorher zu autoklavieren. Arbeiten mit den Kadavern dieser Tiere weisen kein Gefährdungspotenzial auf, das über das der Sicherheitsstufe 1 hinausgeht, so dass auch dann der Schutz der Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz gewährleistet ist

Es ist dabei sicher zu stellen, dass die in diesem Hinweis genannten Kadaver nicht in die Nahrungs- und Futtermittelkette gelangen.

3 Literatur

1. **Smith RH, Hallwirth CV, Westerman M, Hetherington NA, Tseng Y-S, Cecchini S, Virag T, Ziegler M-L, Rogozin IB, Koonin EV, Agbandje-McKenna M, Kotin RM, Alexander IE** (2016). Germline

viral "fossils" guide in silico reconstruction of a mid-Cenozoic era marsupial adeno-associated virus. *Sci Rep* **6**:28965.

2. **Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger A-M, Hughes J, Mieztsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénczes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Ictv RC** (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol* **100**(3):367–8.
3. **Lisowski L, Tay SS, Alexander IE** (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **24**:59–67.
4. **Srivastava A** (2016). *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* **21**:75–80.
5. **Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T** (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330**(2):375–83.
6. **Gao G-P, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM** (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18):11854–9.
7. **Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA** (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol* **82**(3):1399–406.
8. **Schmidt M, Govindasamy L, Afione S, Kaludov N, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA** (2008). Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV(VR-942). *J Virol* **82**(17):8911–6.
9. **Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM** (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**(12):6381–8.
10. **ICTV** (2024). Current ICTV Taxonomy Release. <https://ictv.global/taxonomy>. Besucht am 23.10.2024.
11. **Hüser D, Khalid D, Lutter T, Hammer E-M, Weger S, Heßler M, Kalus U, Tauchmann Y, Hensel-Wiegel K, Lassner D, Heilbronn R** (2017). High Prevalence of Infectious Adeno-associated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence. *J Virol* **91**(4):e02137-16.
12. **Sant'Anna TB, Araujo NM** (2022). Adeno-associated virus infection and its impact in human health: an overview. *Virology* **19**(1):173.
13. **Berns KI, Muzyczka N** (2017). AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther* **28**(4):308–13.
14. **Knipe DM, Howley PM** (2013). *Fields. Virology*, 6. ed.. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA.
15. **Atchinson RW, Casto BC, Hammon WM** (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* **149**(3685):754–6.
16. **Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP** (1966). Studies of small DNA viruses found in various adeno-virus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6):1467–74.
17. **Kilham L, Olivier LJ** (1959). A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7**(4):428–37.
18. **Rayaprolu V, Kruse S, Kant R, Venkatakrisnan B, Movahed N, Brooke D, Lins B, Bennett A, Potter T, McKenna R, Agbandje-McKenna M, Bothner B** (2013). Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics. *J Virol* **87**(24):13150–60.
19. **Gao G, Alvira MR, Somanathan S, Lu Y, Vandenberghe LH, Rux JJ, Calcedo R, Sanmiguel J, Abbas Z, Wilson JM** (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10):6081–6.
20. **Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H** (2010). *Molekulare Virologie*, 3. Aufl. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
21. **Dhungel BP, Winburn I, Pereira CdF, Huang K, Chhabra A, Rasko JEJ** (2024). Understanding AAV vector immunogenicity: from particle to patient. *Theranostics* **14**(3):1260–88.
22. **Salganik M, Hirsch ML, Samulski RJ** (2015). Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector. *Microbiol Spectr* **3**(4):52–2014.

23. **Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C** (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* **21**(6):704–12.
24. **Calcedo R, Wilson JM** (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Front Immunol* **4**:341.
25. **Leborgne C, Latournerie V, Boutin S, Desgue D, Quéré A, Pignot E, Collaud F, Charles S, Simon Sola M, Masat E, Jouen F, Boyer O, Masurier C, Mingozzi F, Veron P** (2019). Prevalence and long-term monitoring of humoral immunity against adeno-associated virus in Duchenne Muscular Dystrophy patients. *Cell Immunol* **342**:103780.
26. **Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM** (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* **199**(3):381–90.
27. **Herzog RW, Davidoff AM, Markusic DM, Nathwani AC** (2011). AAV vector biology in primates: finding the missing link? *Mol Ther* **19**(11):1923–4.
28. **Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenberghe LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM** (2009). The Pleiotropic Effects of Natural AAV Infections on Liver-directed Gene Transfer in Macaques. *Mol Ther* **18**(1):126–34.
29. **Servellita V, Sotomayor Gonzalez A, Lamson DM, Foresythe A, Huh HJ, Bazinet AL, Bergman NH, Bull RL, Garcia KY, Goodrich JS, Lovett SP, Parker K, Radune D, Hatada A, Pan C-Y, Rizzo K, Bertumen JB, Morales C, Oluniyi PE, Nguyen J, Tan J, Stryke D, Jaber R, Leslie MT, Lyons Z, Hedman HD, Parashar U, Sullivan M, Wroblewski K, Oberste MS, Tate JE, Baker JM, Sugerman D, Potts C, Lu X, Chhabra P, Ingram LA, Shiau H, Britt W, Gutierrez Sanchez LH, Ciric C, Rostad CA, Vinjé J, Kirking HL, Wadford DA, Raborn RT, St George K, Chiu CY** (2023). Adeno-associated virus type 2 in US children with acute severe hepatitis. *Nature* **617**(7961):574–80.
30. **Morfopoulou S, Buddle S, Torres Montaguth OE, Atkinson L, Guerra-Assunção JA, Moradi Marjaneh M, Zenezini Chiozzi R, Storey N, Campos L, Hutchinson JC, Counsell JR, Pollara G, Roy S, Venturini C, Antinao Diaz JF, Siam A'a, Tappouni LJ, Asgarian Z, Ng J, Hanlon KS, Lennon A, McArdle A, Czap A, Rosenheim J, Andrade C, Anderson G, Lee JCD, Williams R, Williams CA, Tutill H, Bayzid N, Martin Bernal LM, Macpherson H, Montgomery K-A, Moore C, Templeton K, Neill C, Holden M, Gunson R, Shepherd SJ, Shah P, Cooray S, Voice M, Steele M, Fink C, Whittaker TE, Santilli G, Gissen P, Kaufer BB, Reich J, Andreani J, Simmonds P, Alrabiah DK, Castellano S, Chikowore P, Odam M, Rampling T, Houlihan C, Hoschler K, Talts T, Celma C, Gonzalez S, Gallagher E, Simmons R, Watson C, Mandal S, Zambon M, Chand M, Hatcher J, De S, Baillie K, Semple MG, Martin J, Ushiro-Lumb I, Noursadeghi M, Deheragoda M, Hadzic N, Grammatikopoulos T, Brown R, Kelgeri C, Thalassinos K, Waddington SN, Jacques TS, Thomson E, Levin M, Brown JR, Breuer J** (2023). Genomic investigations of unexplained acute hepatitis in children. *Nature* **617**(7961):564–73.
31. **Ho A, Orton R, Tayler R, Asamaphan P, Herder V, Davis C, Tong L, Smollett K, Manali M, Allan J, Rawlik K, McDonald SE, Vink E, Pollock L, Gannon L, Evans C, McMEnamin J, Roy K, Marsh K, Divala T, Holden MTG, Lockhart M, Yirrell D, Currie S, O'Leary M, Henderson D, Shepherd SJ, Jackson C, Gunson R, MacLean A, McInnes N, Bradley-Stewart A, Battle R, Hollenbach JA, Henderson P, Odam M, Chikowore P, Oosthuyzen W, Chand M, Hamilton MS, Estrada-Rivadeneira D, Levin M, Avramidis N, Pairo-Castineira E, Vitart V, Wilkie C, Palmarini M, Ray S, Robertson DL, da Silva Filipe A, Willett BJ, Breuer J, Semple MG, Turner D, Baillie JK, Thomson EC** (2023). Adeno-associated virus 2 infection in children with non-A-E hepatitis. *Nature* **617**(7961):555–63.
32. **Burguete T, Rabreau M, Fontanges-Darriet M, Roset E, Hager HD, Köppel A, Bischof P, Schlehofer JR** (1999). Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod* **14**(9):2396–401.
33. **Walz CM, Anisi TR, Schlehofer JR, Gissmann L, Schneider A, Müller M** (1998). Detection of infectious adeno-associated virus particles in human cervical biopsies. *Virology* **247**(1):97–105.
34. **Arechavaleta-Velasco F, Ma Y, Zhang J, McGrath CM, Parry S** (2006). Adeno-associated virus-2 (AAV-2) causes trophoblast dysfunction, and placental AAV-2 infection is associated with preeclampsia. *Am J Pathol* **168**(6):1951–9.
35. **Brommel CM, Cooney AL, Sinn PL** (2020). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for Life-long Correction of Genetic Disease. *Hum Gene Ther* **31**(17-18):985–95.

36. **Deyle DR, Russell DW** (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* **11**(4):442–7.
37. **Sabatino DE, Bushman FD, Chandler RJ, Crystal RG, Davidson BL, Dolmetsch R, Eggan KC, Gao G, Gil-Farina I, Kay MA, McCarty DM, Montini E, Ndu A, Yuan J** (2022). Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther* **30**(8):2646–63.
38. **Srivastava A, Carter BJ** (2017). AAV Infection: Protection from Cancer. *Hum Gene Ther* **28**(4):323–7.
39. **Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR** (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**(4):317–34.
40. **TRBA** (2024). Einstufung von Viren und TSE-Agenzien in Risikogruppen (TRBA 462). <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-462.html>. Besucht am 23.04.2024.
41. **Commissie Genetische Modificatie** (2018). Adeno-associated dependoparvovirus A and Adeno-associated dependoparvovirus B assigned to pathogenicity class 1. <https://cogem.net/en/>. Besucht am 09.07.2024.
42. **Belgian Biosafety Server** (2017). Utilisation confinée - Risques associés à l'utilisation de vecteurs viraux. <https://www.biosecurite.be/content/utilisation-confinee-risques-associes-lutilisation-de-vecteurs-viraux>. Besucht am 24.09.2024.
43. **National Institutes of Health**. (NIH). <https://www.nih.gov/>. Besucht am 09.07.2024.
44. **Zingg B, Chou X-L, Zhang Z-G, Mesik L, Liang F, Tao HW, Zhang LI** (2017). AAV-Mediated Anterograde Transsynaptic Tagging: Mapping Corticocollicular Input-Defined Neural Pathways for Defense Behaviors. *Neuron* **93**(1):33–47.
45. **Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X** (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**(3):321–8.
46. **Wang J-H, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G** (2024). Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther* **9**(1):78.
47. **NIH** (2024). Clinical Trials. <https://www.clinicaltrials.gov/>. Besucht am 23.10.2024.
48. **Verband der forschenden Pharma-Unternehmen in Deutschland** (2024). ATMP mit EU-Zulassung. <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/datenbanken-zu-arzneimitteln/amzulassungen-gentec.html>. Besucht am 23.10.2024.
49. **Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA** (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* **7**(6):839–50.
50. **Gao G, Zhong L, Danos O** (2011). Exploiting Natural Diversity of AAV for the Design of Vectors with Novel Properties. In Snyder RO, Moullier P (Hrsg.), Adeno-Associated Virus. Methods and Protocols, S. 93–118. Humana Press, Totowa, NJ.
51. **Kang W, Wang L, Harrell H, Liu J, Thomas DL, Mayfield TL, Scotti MM, Ye GJ, Veres G, Knop DR** (2009). An efficient rHSV-based complementation system for the production of multiple rAAV vector serotypes. *Gene Ther* **16**(2):229–39.
52. **Smith RH, Levy JR, Kotin RM** (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* **17**(11):1888–96.
53. **Wu Z, Asokan A, Samulski RJ** (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **14**(3):316–27.
54. **Liu D, Zhu M, Zhang Y, Diao Y** (2021). Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors. *Metab Brain Dis* **36**(1):45–52.
55. **Lopez-Gordo E, Chamberlain K, Riyad JM, Kohlbrenner E, Weber T** (2024). Natural Adeno-Associated Virus Serotypes and Engineered Adeno-Associated Virus Capsid Variants: Tropism Differences and Mechanistic Insights. *Viruses* **16**(3):442.
56. **Yu DL, van Lieshout LP, Stevens BAY, Near KJJ, Stodola JK, Stinson KJ, Slavic D, Wootton SK** (2023). AAV Vectors Pseudotyped with Capsids from Porcine and Bovine Species Mediate In Vitro and In Vivo Gene Delivery. *Viruses* **16**(1):57.

57. **Kotchey NM, Adachi K, Zahid M, Inagaki K, Charan R, Parker RS, Nakai H** (2011). A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction. *Mol Ther* **19**(6):1079–89.
58. **Le Guiner C, Moullier P, Arruda VR** (2011). Biodistribution and Shedding of AAV Vectors. *In* Snyder RO, Moullier P (Hrsg.), *Adeno-Associated Virus. Methods and Protocols*, S. 339–60. Humana Press, Totowa, NJ.
59. **Adachi K, Enoki T, Kawano Y, Veraz M, Nakai H** (2014). Drawing a high-resolution functional map of adeno-associated virus capsid by massively parallel sequencing. *Nat Commun* **5**:3075.
60. **Favaro P, Downey HD, Zhou JS, Wright JF, Hauck B, Mingozi F, High KA, Arruda VR** (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther* **17**(6):1022–30.
61. **Favaro P, Finn JD, Siner JI, Wright JF, High KA, Arruda VR** (2011). Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum Gene Ther* **22**(7):843–52.
62. **Ferla R, Alliegro M, Marteau J-B, Dell'Anno M, Nusco E, Pouillot S, Galimberti S, Valsecchi MG, Zuliani V, Auricchio A** (2017). Non-clinical Safety and Efficacy of an AAV2/8 Vector Administered Intravenously for Treatment of Mucopolysaccharidosis Type VI. *Mol Ther Methods Clin Dev* **6**:143–58.
63. **Schuettrumpf J, Liu J-H, Couto LB, Addya K, Leonard DGB, Zhen Z, Sommer J, Arruda VR** (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* **13**(6):1064–73.
64. **Krause F, Schmidtke K, Vasconcelos MF de, Schmidt D, Cansiz B, Theisen F, Mark MD, Rybarski MO** (2024). A shedding analysis after AAV8 CNS injection revealed fragmented viral DNA without evidence of functional AAV particles in mice. *Gene Ther* **31**(5-6):345–51.
65. **Kaepfel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, Wolf S, Nowrouzi A, Glimm H, Kalle C von, Petry H, Gaudet D, Schmidt M** (2013). A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* **19**(7):889–91.