

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

Gentransfer mit Mastadenoviren aus Primaten

1	Begriffsbestimmungen.....	2
2	Adenoviren.....	2
2.1	Taxonomie und Vorkommen.....	2
2.2	Empfehlung	3
2.3	Genomorganisation	4
3	Adenovirale Vektorsysteme.....	5
3.1	Herstellung rekombinanter AdV-Vektorpartikel	7
3.2	Helferzell-abhängige Herstellung mittels homologer Rekombination.....	7
3.3	Herstellung von <i>gutless</i> -Vektorpartikeln mittels AdV-Helfervirus	8
3.4	Herstellung von <i>gutless</i> -Vektorpartikeln mittels Helferplasmid	10
3.5	Sicherheit der Helferzelllinien.....	11
3.6	Sicherheit von AdV-Vektoren anderer <i>Mastadenovirus</i> -Spezies	12
3.7	Biodistribution, Stabilität und Ausscheidung (<i>shedding</i>) von Viruspartikeln.....	12
4	Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektoren. 13	
5	Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektoren.....	15
5.1	Übertragung von Plasmiden mit adenoviraler DNA auf <i>E. coli</i> K12-Derivate	15
5.2	Herstellung adenoviraler Vektorpartikel in eukaryotischen Zellen	15
5.3	Transduktion eukaryotischer Zellen mit adenoviralen Vektorpartikeln	16
6	Hinweise.....	17
7	Literatur.....	19

1 Begriffsbestimmungen

- **Expressionskassette:** Prokaryotischer, eukaryotischer oder viraler Nukleinsäureabschnitt, der einen Promotor, das Transgen und ein Stopp-/Polyadenylierungssignal enthält. Die Expressionskassette kann die Funktion der adenoviralen E1-Region nicht ersetzen.
- **Rekombinationsplasmid:** pBR-abgeleitetes Plasmid mit einer Expressionskassette, welche von adenoviralen Nukleinsäureabschnitten flankiert wird, die i. d. R. zu den nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereichen der AdV-E1-Region homolog sind (siehe Abb. 2).
- **Adenoviraler Vektor (AdV-Vektor):** Replikationsdefekte adenovirale Partikel, die eine Zelle transduzieren können und dabei einen Nukleinsäureabschnitt übertragen.
- **Helfervirus:** Adenovirus, das Proteine bereitstellt, welche für die Vermehrung eines replikationsdefekten viralen Genoms und seine Verpackung notwendig sind. Ein Helfervirus kann replikationskompetent sein, aber auch durch eine Deletion der E1-Region replikationsdefekt. Ggf. liegen im Genom eines replikationsdefekten Helfervirus weitere Deletionen oder Modifikationen vor.
- **stuffer:** Funktionslose auffüllende Nukleinsäureabschnitte.

2 Adenoviren

In der vorliegenden Stellungnahme wird der Gentransfer mit Mastadenoviren aus Primaten (humane Adenoviren, HAdV) und nicht-humanen Primaten (SAdV) beschrieben. Zur Vereinfachung werden HAdV und SAdV in der Stellungnahme als **AdV** zusammengefasst.

2.1 Taxonomie und Vorkommen

Die Familie der *Adenoviridae* ist in sechs Gattungen unterteilt: *Aviadenovirus*, *Barthadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus* und *Testadenovirus*.

HAdV werden verschiedenen Spezies der Gattung *Mastadenovirus* zugeordnet. Sie wurden erstmals 1953 aus adenoidem Gewebe (hyperplastischen Tonsillen) isoliert [1]. Die einzelnen Adenovirus- (Sero-) Typen wurden in der Reihenfolge ihrer Erstisolierung nummeriert. HAdV sind weit verbreitet, was am Vorliegen spezifischer Antikörper gegen HAdV-Typen abzulesen ist. In der Regel weisen Kinder nach dem ersten Lebensjahr Antikörper gegen mindestens einen Adenovirus-Typ auf. Adenovirus Typ 5 (AdV5) und andere Typen (z. B. 1, 2 oder 6) können in lymphoidem Gewebe über längere Zeit persistieren. HAdV verursachen beim Menschen häufig milde Atemwegsinfektionen, können aber auch Keratokonjunktivitis, Meningitis oder Pneumonie hervorrufen [2, 3]. In seltenen Fällen sind einzelne AdV (wie z. B. AdV-F41), ggf. im Zusammenspiel mit anderen Viren, ursächlich für eine akute Hepatitis bei Kindern [4].

Adenoviren sind in einigen Fällen in der Lage, die Barriere zwischen verschiedenen Spezies zu überwinden. Dies wurde insbesondere für HAdV und SAdV beobachtet, wobei angenommen wird, dass ein enger Kontakt Voraussetzung für eine erfolgreiche Transmission auf eine andere Spezies ist. Ob eine produktive virale Replikation in bestimmten Wirten bzw. Zelltypen erfolgt, wird jedoch durch eine Reihe von Faktoren bestimmt, wie z. B. dem Vorhandensein spezifischer Rezeptoren, *uncoating*-Mechanismen oder Virus-Wirt-Interaktionen während der Replikation [5, 6]. So sind humane Zellen i. d. R. permissiv für HAdV, ihre Infektion verläuft produktiv. Nagerzellen hingegen sind entweder nicht permissiv oder für manche HAdV semi-permissiv [2, 3, 7–9].

Heute erfolgt die Zuordnung zum Genus *Mastadenovirus* bzw. zu einer Spezies v. a. anhand von Daten zur Phylogenie und zur Genomorganisation. Entsprechend dieser Kriterien werden die HAdV-Serotypen sieben Spezies der Gattung *Mastadenovirus* zugeordnet [10]. Viele der aus nicht-humanen Primaten isolierten AdV werden ebenfalls den HAdV zugeordnet, z. B. AdV aus Schimpansen, Gorillas und Bonobos [10]. Eine klare Abgrenzung der aus dem Menschen und aus nicht-humanen Primaten isolierten Spezies ist jedoch nicht immer möglich, aufgrund der hohen Sequenzidentität von HAdV und SAdV. In der Natur kommen chimäre AdV vor, die durch Rekombinationsereignisse bei Mischinfektionen entstehen [11–13]. Zudem führt das Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren, ICTV, neun Spezies, in denen ausschließlich SAdV zu finden sind [10].

2.2 Empfehlung

Gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV werden Adenoviren als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten den folgenden Risikogruppen zugeordnet:

– Adenoviren beim Pferd, Schaf, Schwein, bei Vögeln und Fischen **Risikogruppe 1**

– Adenoviren der Reptilien (Az.: 6790-05-02-0057) **Risikogruppe 2**

Begründung: Die Adenoviren der Reptilien weisen eine hohe Wirtsspezifität auf und können eine potenziell tödliche Erkrankung infizierter Tiere auslösen. Die Übertragung der Viren erfolgt vermutlich durch Tröpfcheninfektion.

– Mastadenoviren **Risikogruppe 2**

Mastadenovirus adami

Mastadenovirus blackbeardi

Mastadenovirus caesari, *M. caesari* Impfstamm ONRAB

Mastadenovirus caviae

Mastadenovirus dominans

Mastadenovirus exoticum

Mastadenovirus faecale

Mastadenovirus russeli

– Rekombinante replikationsdefekte Mastadenoviren ohne Gefährdungspotenzial: **Risikogruppe 1**

Mastadenovirus caesari rAd5-S-CoV2, Impfstamm „Sputnik V“ und

Mastadenovirus dominans rAD26-S-CoV2 (Az.: 45242.0193)

Begründung: Die rekombinanten Adenoviren rAd5-S-CoV2 und rAd26-S-CoV2 sind replikationsdefekte Viren, die ein Gen von SARS-CoV-2 ohne eigenes Gefährdungspotenzial tragen und als Bestandteile eines Kombinationsimpfstoffs gegen SARS-CoV-2 außerhalb der EU zugelassen sind. Die zwei Impfviren waren in klinischen Studien gut verträglich und riefen meist nur milde oder moderate Nebenwirkung hervor.

Mastadenovirus dominans Ad26.Mos2S.Env, Ad26.Mos1.Env, Ad26.Mos1.Gag-Pol und Ad26.Mos2.Gag-Pol, Ad26.RSV.preF (Az.: 45242.0188)

Begründung: Die rekombinanten Adenoviren Ad26.Mos2S.Env, Ad26.Mos1.Env, Ad26.Mos1.Gag-Pol und Ad26.Mos2.Gag-Pol sowie Ad26.RSV.preF sind replikationsdefekte Viren, die Nukleinsäureabschnitte ohne Gefährdungspotential von HIV-1 bzw. RSV tragen. Rekombinante Viren mit demselben Vektorrückgrat, die als Impfstoffe gegen das Zaire Ebolavirus und gegen SARS-CoV-2 eingesetzt werden, sind bereits als Arzneimittel in der EU zugelassen. Diese Impfstoffe wie auch Ad26.Mos4.HIV und Ad26.RSV.preF waren in klinischen Studien gut verträglich und riefen meist nur milde oder moderate unerwünschte Ereignisse hervor.

Mastadenovirus dominans Ad26.COVS1 (Az.: 45242.0180)

Begründung: Das rekombinante Adenovirus Ad26.COVS1 ist ein replikationsdefektes Virus, welches ein Gen von SARS-CoV-2 ohne eigenes Gefährdungspotenzial trägt und als Impfstoff gegen SARS-CoV-2 getestet werden soll. Ein Ad26-basierter Impfstoff gegen das Zaire Ebolavirus wurde 2020 durch die EU-Kommission zugelassen. Dieser und andere Ad26-basierte Impfstoffe waren in klinischen Studien gut verträglich und riefen meist nur milde oder moderate unerwünschte Ereignisse hervor.

Mastadenovirus exoticum ChAdOx1 nCoV-19 (Az.: 45242.0181)

Begründung: Das rekombinante replikationsdefekte Adenovirus ChAdOx1 nCoV-19, welches sich von ChAdY25 ableitet, ist ein Virus, welches ein Gen von SARS-CoV-2 ohne eigenes Gefährdungspotenzial trägt und als Impfstoff gegen SARS-CoV-2 getestet werden soll. Impfstoffe basierend auf dem Vektor ChAdOx1 sind präklinisch bereits gut erforscht. Es liegen zudem klinische Daten von ChAdOx1-basierten Impfstoffen gegen FLUAV, *Mycobacterium tuberculosis* und MERS-CoV von derzeit 154 Prüfungsteilnehmern vor. Die ChAdOx1-basierten Impfstoffe waren gut verträglich, mit meist milden oder moderaten unerwünschten Ereignissen.

2.3 Genomorganisation

Das Genom von AdV aus Primaten besteht aus einer doppelsträngigen linearen DNA mit einer Länge von 32 bis 36 kb (Abb. 1a). An den Enden der DNA befinden sich inverse repetitive Bereiche (*inverted terminal repeats*, ITR), wobei der 5'-ITR die Polymerase-Bindestellen für den Start der DNA-Replikation und das DNA-Verpackungssignal Ψ enthält. Die frühen (*early*, E) Ereignisse des produktiven Infektionszyklus umfassen auch die Transkription des E1a-Gens, dessen Genprodukt die Expression der anderen frühen viralen Gene E1b, E2, E3 und E4 transaktiviert. Der frühen Transkription folgt die DNA-Replikation, mit der die späte (*late*, L) Phase des produktiven Infektionszyklus einsetzt. In der späten Phase werden die späten Gene exprimiert, die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids kodieren, und Viruspartikel entstehen. Der produktive Zyklus führt zur Lyse der infizierten Wirtszelle [2, 3].

Neben der Transaktivierung der frühen Gene interagiert E1a mit einer Vielzahl zellulärer Proteine. So können ruhende Zellen der G₀- oder G₁-Phase durch E1a dazu stimuliert werden, in die S-Phase überzugehen [14]. Während bestimmte HAdV (z. B. AdV12) für neugeborene Nagetiere ein neoplastisch transformierendes Potenzial aufweisen können [15], ist für AdV5 und AdV26 gezeigt, dass diese nicht mit einer Tumorgenese assoziiert sind [23]. Für ChAdY25-

basierte Vektoren wurde bislang ebenfalls keine Kausalität zu einer Tumorgenese beschrieben. Demnach kann für diese AdV-Vektoren das Risiko eines neoplastisch transformierenden Potenzials ausgeschlossen werden [23].

Die durch E1b kodierten Genprodukte hemmen die p53-abhängige Induktion der Apoptose [2, 3]. Die E2-Region kodiert für drei Proteine, die für die Replikation der viralen DNA benötigt werden: das präterminale Protein pTP, die DNA-Polymerase (Ad Pol) und ein ssDNA-bindendes Protein (DBP) [3]. Die durch die E3-Region kodierten Genprodukte sind für die Replikation *in vitro* nicht essenziell, aber an der Immunevasion beteiligt. E3 kodiert für mehrere Proteine, die u. a. den Transport des Haupthistokompatibilitätskomplexes an die Plasmamembran blockieren und die Lyse Adenovirus-infizierter Zellen durch den Tumornekrosefaktor inhibieren [2, 3]. Die E4-Region kodiert für mehrere gespleißte mRNAs, wobei die exprimierten Proteine nach den offenen Leserahmen (ORF) der E4-Region (z. B. E4orf1 oder E4orf2) benannt werden. Sie stimulieren die Proteinsynthese durch die Aktivierung der Proteinkinase mTOR, schützen die AdV-Genomenden durch Inhibierung der zelleigenen Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche oder stimulieren die Transkription der E2-ORFs [3].

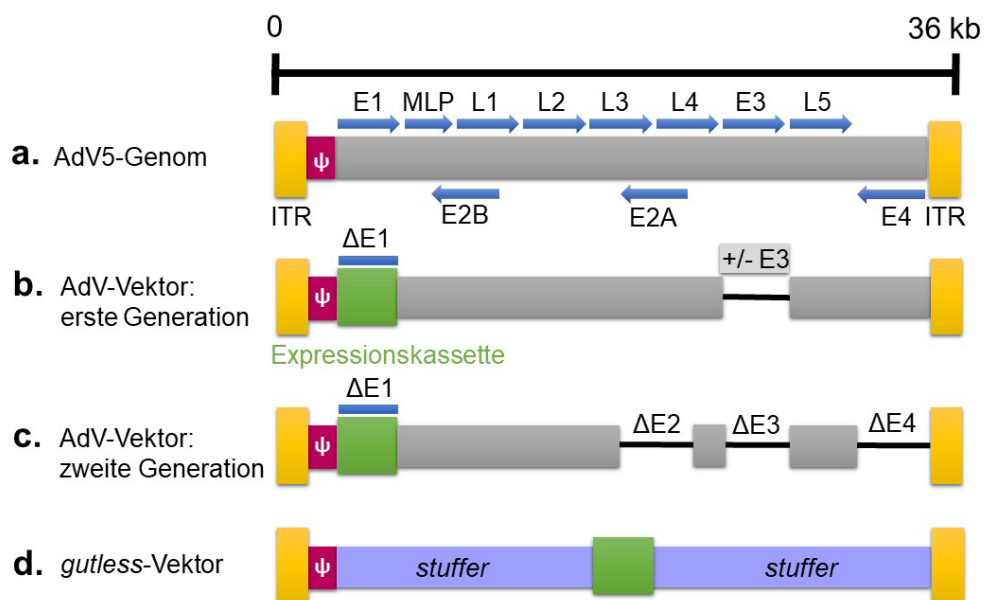


Abb. 1: Genomkarte von Adenoviren und davon abgeleiteten Vektoren. **a.** Genomkarte von Adenoviren. Die frühen Transkriptionseinheiten E1, E2, E3, E4 sind zusammen mit dem *major late promoter* (MLP) und der Region der späten Gene (L1 bis L5) in Transkriptionsrichtung dargestellt, die ITR und das Verpackungssignal ψ sind gekennzeichnet. **b.** Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren der ersten Generation mit Expressionskassette. Die E1-Region ist deletiert und ersetzt durch eine Expressionskassette. Die E3-Region kann zusätzlich deletiert sein. **c.** Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren der zweiten Generation mit Expressionskassette. Die E1-Region ist deletiert und ersetzt durch eine Expressionskassette. Die E2-, die E3- und die E4-Region sind zusätzlich deletiert. **d.** Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter *gutless*-Vektoren mit Expressionskassette. Alle viralen kodierenden Nukleinsäureabschnitte sind deletiert und ersetzt durch eine Expressionskassette sowie *stuffer*-Abschnitte. Abbildung modifiziert nach [16, 17].

3 Adenovirale Vektorsysteme

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

AdV-Vektoren sind vielseitig verwendbar; sie weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Transduktionseffizienz auf, infizieren eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, einschließlich sich nicht-teilender Zellen, und können hochtitrig angezüchtet werden. AdV-Vektorpartikel werden sowohl *in vitro* zur Übertragung heterologer Gene als auch *in vivo* als Vakzine oder im Rahmen von somatischen Gentherapien genutzt [18–24]. Das Adenoviruskapsid kann bis zu 105 % der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken; das bedeutet bei AdV5 mit einer Genomlänge von ca. 36 kb eine Aufnahmekapazität von ungefähr 1,8 bis 2,0 kb fremder DNA für Vektoren der 1. Generation [25]. Bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren der 2. Generation bzw. *gutless*-Vektoren können entsprechend größere DNA-Fragmente von bis zu 33 kb in das AdV-Genom eingeführt werden [26].

Die für den Gentransfer verwendeten adenoviralen Vektoren werden aktuell in drei Generationen eingeteilt [17] (siehe Abb. 1):

- Vektoren der ersten Generation weisen eine Deletion der E1-Region auf, die dazu führt, dass die adenoviralen Vektorpartikel replikationsdefekt sind. Diese Region dient als Insertionsstelle für die Expressionskassette. Zur Erhöhung der Aufnahmekapazität wurde bei manchen dieser Vektoren zusätzlich noch die E3-Region deletiert, was eine weitere Attenuierung zur Folge hat. Sie enthalten jedoch noch die anderen frühen und die späten viralen Gene, die in geringen Mengen nach der Infektion exprimiert werden können [27, 28]. Bei einer klinischen Anwendung oder auch bei einer akzidentellen Inokulation können die viralen Genprodukte eine Immunantwort gegen die transduzierte Zelle induzieren, was eine Entzündungsreaktion und eine verkürzte Expressionsdauer der Expressionskassette zur Folge haben kann. Auch die beobachtete geringfügige Vermehrung der viralen DNA in den Zielzellen ist auf eine schwache Expression viraler Gene zurückzuführen [29–31].
- Vektoren der zweiten Generation weisen neben der E1- und der E3-Region eine Deletion der E2- und der E4-Region auf. Es liegen weiterhin die späten Gene vor. Im Vergleich zu den Vektoren der ersten Generation erhöhen die zusätzlichen Deletionen die Verpackungskapazität und reduzieren die Immunogenität [17]. Aufgrund der Deletion der E1-Region sind sie ebenfalls replikationsdefekt.
- *gutless*-Vektoren (dritte Generation) enthalten als adenovirale Sequenzen lediglich die flankierenden ITRs und das Verpackungssignal Ψ , wodurch sie die größte Verpackungskapazität aufweisen. Um die Genomgröße an das virale Kapsid anzupassen, enthalten die Vektoren in der Regel sog. *stuffer*. Die Vektoren sind durch die Deletion sämtlicher adenoviraler Gene weniger immunogen als Vektoren der zweiten Generation [17] und ebenfalls replikationsdefekt.

Das von AdV-Vektorpartikeln auf nicht-komplementierende Zielzellen übertragene defekte virale Genom verbleibt i. d. R. episomal, wodurch die übertragene Expressionskassette lediglich transient exprimiert wird [32]. Es erfolgt keine Produktion neuer viraler Partikel.

1993 wurde erstmals ein Patient mit Zystischer Fibrose mit einer Gentherapie basierend auf einem rekombinanten AdV-Vektor behandelt und in den letzten Jahrzehnten hat die Zahl klinischer Studien basierend auf AdV-Vektoren stetig zugenommen. Heute basieren etwa die Hälfte aller Gentherapien in klinischen Studien auf AdV-Vektoren, wobei sie v. a. als Impfstoffe und in der Krebstherapie eingesetzt werden. AdV-Vektoren kommen aber auch in der regenerativen Medizin und Stammzellforschung zum Einsatz [24].

Krebstherapien auf Basis defekter AdV verfolgen das Ziel immunstimulierende, Tumorsuppressor- oder Suizid-Gene in die Tumorzelle zu transferieren. So führt z. B. das in den Tumor eingebrachte Suizid-Gen zur Expression eines Enzyms, das ein inaktives Pro-Drug in zytotoxische Metabolite umwandelt, die zum Zelltod führen [24].

Die Therapie mit onkolytischen AdV basiert auf der Replikationskompetenz der Viren in Tumorzellen und der damit verbundenen Lyse. Die dabei freigesetzten Viren zerstören im Anschluss kaskadenartig weitere umliegende Tumorzellen.

Rekombinante replikationsdefekte AdV sind als Impfvektoren zugelassen und werden in großem Umfang eingesetzt. Bereits zugelassene AdV-Impfvektoren basieren auf AdV5, AdV26 oder ChAdY25, sind gut verträglich und verursachen meist nur milde oder moderate Impfreaktionen (siehe ZKBS-Empfehlung in Kapitel 2.2). So basiert z. B. ein zugelassener Ebola-Impfstoff auf AdV26. Zwei Impfstoffe zur Prävention von SARS-CoV-2 basieren auf AdV5.

3.1 Herstellung rekombinanter AdV-Vektorpartikel

Rekombinante AdV-Vektorpartikel können mit verschiedenen Verfahren hergestellt werden. Die Expressionskassette kann durch direkte Ligation oder über homologe Rekombination in das AdV-Genom inseriert werden.

3.2 Helferzell-abhängige Herstellung mittels homologer Rekombination

I. d. R. erfolgt die Insertion der Expressionskassette mittels homologer Rekombination zwischen dem Rekombinationsplasmid und dem viralen Genom. Sehr häufig wird dafür eine humane Zelllinie verwendet, die für die adenovirale Replikation permissiv ist.

Ein AdV-Genom der ersten oder der zweiten Generation wird zusammen mit einem pBR-abgeleiteten Rekombinationsplasmid auf humane Zellen übertragen. Der Integrationsort der Expressionskassette ist i. d. R. die deletierte E1-Region des replikationsdefekten AdV-Genoms, welches entweder in einem Vektorpartikel oder integriert in einem Plasmid vorliegen kann. Die für die virale DNA-Replikation benötigten E1-Genprodukte werden zumeist über permissive rekombinante Zelllinien *in trans* zur Verfügung gestellt, die das E1-Gen konstitutiv exprimieren. Das rekombinante virale Genom wird von den viralen Strukturproteinen verpackt und als AdV-Vektorpartikel mit Expressionskassette von der Zelllinie abgegeben (Abb. 2) [33–35].

Für die homologe Rekombination zur Übertragung der Expressionskassette auf das AdV-Genom kann auch das effiziente Rekombinationssystem des *E. coli* K12-Derivats BJ5183 (*recBC sbcBC*) genutzt werden [36]. In diesem als AdEasy bezeichneten Ansatz werden ein DNA-Konstrukt mit dem AdV-Genom sowie ein DNA-Konstrukt mit der Expressionskassette flankiert von homologen AdV-Nukleinsäureabschnitten des Integrationsortes im AdV-Genom gemeinsam auf *E. coli* BJ5183 übertragen. Im AdV-Genom ist die E1-Region oder auch die E3-Region deletiert.

Die Expressionskassette wird zumeist anstelle der E1-Region eingefügt, wodurch die AdV-Vektorpartikel replikationsdefekt sind. Es entsteht ein rekombinantes Plasmid mit einem AdV-Genom, in welchem die Expressionskassette inseriert vorliegt [37, 38]. Das Plasmid wird isoliert und in eine Helferzelllinie transfiziert, welche die für die virale Replikation notwendigen E1-Proteine zur Verfügung stellt. In der Helferzelllinie werden replikationsdefekte AdV-Vektorpartikel mit Expressionskassette erzeugt und abgegeben. Jedoch können durch homologe Rekombination zwischen dem im Genom der Zelle integrierten E1-Gen und dem Helfervirusgenom replikationskompetente Viruspartikel entstehen (siehe Kapitel 3.5 „Sicherheit der Helferzelllinien“).

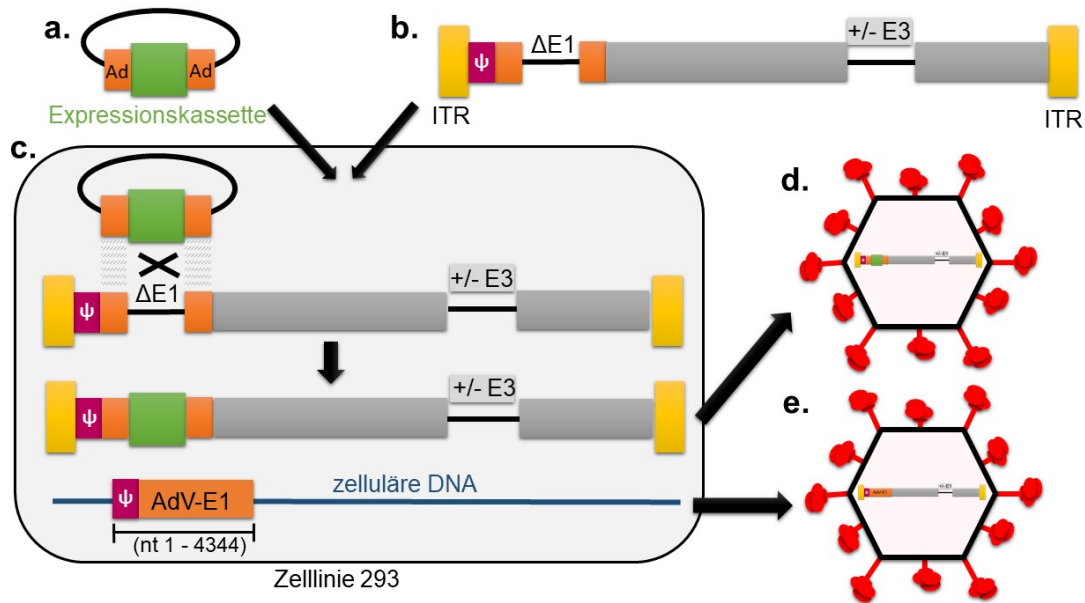


Abb. 2: Beispielhafte Herstellung eines replikationsdefekten AdV-Vektorpartikels der ersten Generation mit Expressionskassette in einer Helferzelllinie. a. Rekombinationsplasmid mit Expressionskassette. b. AdV-Genom mit Deletion der kodierenden Nukleinsäureabschnitte der frühen Gene E1a, E1b und ggf. E3. c. Das defekte AdV-Genom wird mit dem Rekombinationsplasmid gemeinsam in eine Helferzelllinie eingeführt. Das Genom der Helferzelllinie enthält das 5'-Ende des AdV-Genoms mit der E1-Region und exprimiert die E1-Genprodukte, wodurch der Replikationsdefekt des ko-transfizierten AdV-Genoms komplementiert wird. Im Verlauf der viralen DNA-Replikation kommt es über die DNA-Sequenzhomologien der nicht-kodierenden Regionen von E1 zur Rekombination zwischen dem Rekombinationsplasmid und dem defekten AdV-Genom. Es entsteht ein replikationsdefektes AdV-Genom, bei in der deletierten E1-Region die inserierte Expressionskassette vorliegt. d. Die im AdV-Genom noch vorhandenen späten Gene werden exprimiert. Ihre Genprodukte verpacken die AdV-Genome mit und ohne Expressionskassette zu infektiösen, replikationsdefekten Partikeln, die von der Helferzelllinie abgegeben werden. e. Durch homologe Rekombination zwischen dem im Genom der Zelle integrierten E1-Gen und dem Helfervirusgenom können replikationskompetente Viruspartikel entstehen.

3.3 Herstellung von *gutless*-Vektorpartikeln mittels AdV-Helfervirus

Bei den *gutless*- oder *high capacity*-Vektoren wurden sämtliche viralen Gene deletiert, sodass die Immunantwort gegen den Vektor vermindert und die Aufnahmekapazität für fremde DNA erhöht ist [39–43]. Bei diesen Vektoren sind lediglich noch virale Nukleinsäureabschnitte vorhanden, die in *cis* wirken und für die DNA-Replikation sowie die Verpackung der viralen DNA essenziell sind, wie die ITRs mit den Polymerase-Bindungsstellen für den Start der DNA-Replikation und das DNA-Verpackungssignal Ψ . Der Abschnitt zwischen beiden ITRs enthält anstatt der adenoviralen Gene nun nicht-kodierende *stuffer*-Sequenzen. Bei den daraus hergestellten Vektorpartikeln wird die Expressionskassette innerhalb der *stuffer*-DNA eingefügt (siehe Abb. 1c und Abb. 3b).

Die *gutless*-Vektoren sind prinzipiell auf ein Helfervirus angewiesen, welches die Proteine bereitstellt, die für die Vermehrung des viralen Genoms und seine Verpackung notwendig sind. Ist ein solches Helfervirus replikationskompetent, so liegt es als Kontamination der erzeugten Vektorpartikel vor und muss anschließend abgetrennt werden.

Eine weitere Methode zur Herstellung von *gutless*-Vektorpartikeln ist das vom Bakteriophagen P1 abgeleitete Cre/*loxP*-Helfer-abhängige System (siehe Abb. 3). Dieses hat den Vorteil, dass

ein replikationsdefektes Helfervirus verwendet werden kann, was zu einer Erhöhung der Sicherheit des Systems beiträgt [41, 42].

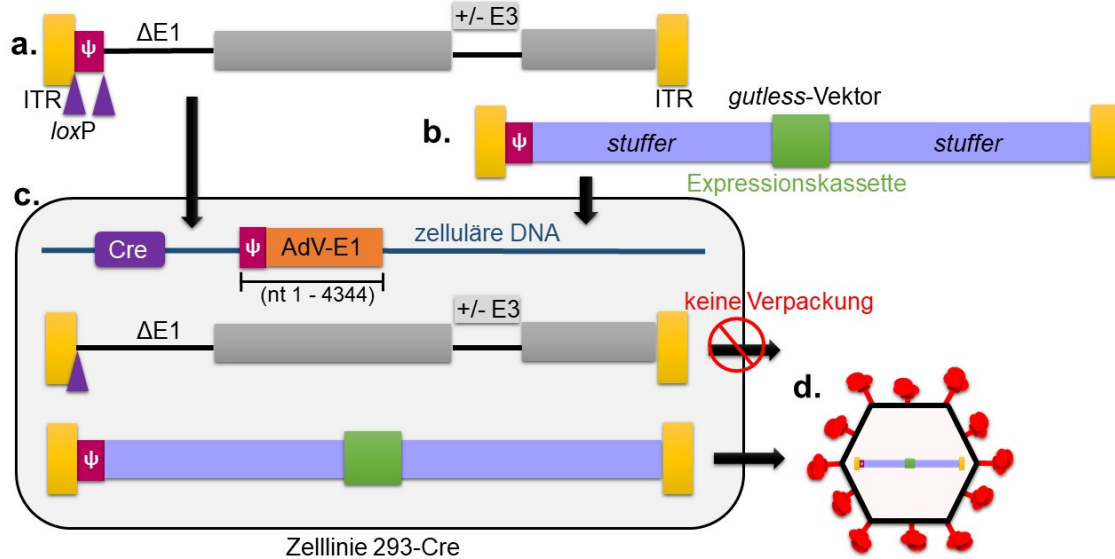


Abb. 3: Herstellung von *gutless*-Vektorpartikeln mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Systems.

a. Das Verpackungssignal ψ eines AdV-Helfervirus-Genoms (AdV-Genom) wird von zwei *loxP*-Nukleinsäureabschnitten flankiert, die von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Die E1-Region und ggf. auch die E3-Region sind deletiert, alle anderen adenoviralen Gene sind noch vorhanden. **b.** Die zu übertragende Expressionskassette wurde in die *gutless*-Vektor-DNA eingeführt und liegt dort neben den *stuffer*-Sequenzen, den ITRs des AdV sowie dem Verpackungssignal Ψ vor. **c.** Das AdV-Helfervirus-Genom **a.** und die *gutless*-Vektor-DNA **b.** werden gemeinsam in die Helferszelllinie 293-Cre **c.** eingeführt. Im Genom dieser Helferszelllinie liegen die Gene der Cre-Rekombinase (Cre) und ein AdV-Genomabschnitt einschließlich des Verpackungssignals Ψ sowie der für E1 kodierenden Region (Nukleotide 1 – 4344 [34]) integriert vor und werden konstitutiv exprimiert. AdV-E1 komplementiert das im Helfervirus-Genom deletierte E1. Damit werden die verbliebenen adenoviralen Gene des Helfervirus-Genoms exprimiert. Sowohl das Helfervirus-Genom als auch die *gutless*-Vektor-DNA replizieren. Die Cre-Rekombinase schneidet das Verpackungssignal Ψ des Helfervirus-Genoms aus, wodurch Helfervirus-Genome nicht mehr verpackbar sind, hingegen *gutless*-Vektoren mit Verpackungssignal Ψ verpackt werden. **d.** Die *gutless*-Vektorpartikel mit Expressionskassette werden von der Helferszelllinie abgegeben. Die Abbildung wurde modifiziert nach [41].

Das Cre/*loxP*-Helfer-abhängige System verwendet drei Komponenten: ein AdV-Helfervirus, eine *gutless*-Vektor-DNA und eine Helferszelllinie. Bei dem AdV-Helfervirus handelt es sich um ein E1- und ggf. E3 deletiertes AdV, bei dessen Genom das Verpackungssignal Ψ von *loxP*-Nukleinsäureabschnitten flankiert wird. Meist liegt zwischen den *loxP*-Nukleinsäureabschnitten neben dem Verpackungssignal Ψ noch ein Markergen vor. Die *loxP*-Nukleinsäureabschnitte sind Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, ein Enzym des Bakteriophagen P1. Als Helferszelllinie wird z. B. die Zelllinie 293-Cre verwendet, die stabil die Cre-Rekombinase exprimiert. Nach Infektion der Helferszelllinie werden das Verpackungssignal Ψ der Helfervirus-DNA sowie ggf. das Markergen ausgeschnitten.

Durch das E1-Gen der Helferszelllinie werden sämtliche auf dem Helfervirus-Genom noch vorhandenen viralen Gene transkribiert und das Helfervirus-Genom repliziert.

In die Helferszelllinie wird eine *gutless*-Vektor-DNA übertragen, die neben der Expressionskassette und den *stuffer*-Sequenzen (siehe Abb. 1 und 3) die ITRs und das Verpackungssignal Ψ eines AdV enthält, die durch die vom Helfervirus bereitgestellten viralen Proteine repliziert. Da

die *gutless*-Vektor-DNA noch über das Verpackungssignal Ψ verfügt, wird nur diese DNA von den vom Helfervirus bereitgestellten viralen Kapsidproteinen verpackt. Die Helfervirus-DNA hingegen kann nicht mehr verpackt werden, da ihr Verpackungssignal Ψ von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten worden ist (siehe Abb. 3). Neben den Vektorpartikeln können im Zellkulturüberstand Helferviruspartikel vorliegen. Außerdem können durch homologe Rekombination zwischen dem im Genom der Zelle integrierten E1-Gen und dem Helfervirusgenom replikationskompetente Viruspartikel entstehen (siehe Kapitel 3.5 „Sicherheit der Helferzelllinien“). Die Aufreinigung der *gutless*-Vektorpartikel erfolgt mittels CsCl-Gradienten-Zentrifugation. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte sedimentieren Helferviruspartikel und *gutless*-Vektorpartikel in unterschiedlichen Abschnitten des Gradienten [44]. Dadurch können die *gutless*-Vektorpartikel weitestgehend aber nicht vollständig von residualen Helferviren abgetrennt werden [44].

3.4 Herstellung von *gutless*-Vektorpartikeln mittels Helferplasmid

Die Herstellungsmethode von *gutless*-Vektorpartikeln mittels AdV-Helfervirus-Genom wurde weiterentwickelt, indem das Helfervirus durch ein Helferplasmid ersetzt wird, das die fehlenden essenziellen Gene für die Partikelherstellung trägt [45, 17]. Im Helferplasmid liegen weder das E1-Gen, noch die flankierenden ITRs oder das Verpackungssignal Ψ vor (siehe Abb. 4). Außerdem wurde das E3-Gen entfernt.

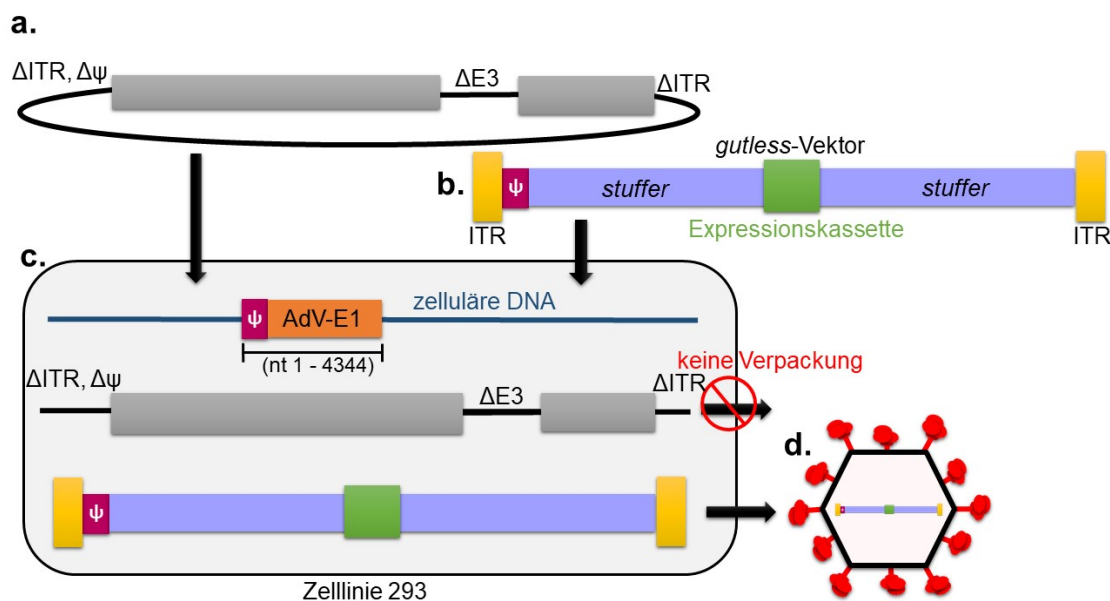


Abb. 4: Herstellung von *gutless*-Vektorpartikeln mit Hilfe eines Helferplasmid-Systems. Aus dem AdV-Helfervirus-Genom (siehe Abb. 3a) mit *loxP*-Nukleinsäureabschnitten wurden zusätzlich die flankierenden ITR, das Verpackungssignal Ψ und das E3-Gen entfernt, um ein AdV-Helferplasmid **a.** zu generieren. Die zu übertragende Expressionskassette wird in die *gutless*-Vektor-DNA **b.** eingeführt, welche zudem die ITRs sowie das Verpackungssignal Ψ von AdV enthält. Zur Erzeugung adenoviraler Vektoren wird eine *gutless*-Vektor-DNA mit dem AdV-Helferplasmid in eine Helferzelllinie (hier 293) **c.** ko-transfiziert, welche anschließend die viralen Vektoren **d.** abgibt.

Nach wie vor ist bei diesem System eine homologe Rekombination zwischen dem zellulär integrierten Adenovirus-Nukleinsäureabschnitt und dem Helferplasmid möglich (Nukleotide 3034 – 5015 = 1428 bp, pIX-AdV-Genomsegment). Eine Bildung von AdV-Partikeln ist jedoch nicht zu erwarten, da mehrere illegitime Rekombinationsereignisse nötig wären, um aus dem

Helferplasmid ein verpackungsfähiges Genom zu generieren. So müssten zum einen zwei Rekombinationsereignisse mit dem in der Zelle vorliegenden Adenovirus-Nukleinsäureabschnitt erfolgen, um den linken ITR, Ψ und das E1-Gen zu integrieren (illegitim am 5'-Ende, homolog am 3'-Ende des Abschnittes). Zum anderen wären zwei weitere illegitime Rekombinationsereignisse mit der *gutless*-Vektor-DNA notwendig, um den rechten ITR zu integrieren. Von der Entstehung replikationskompetenter Partikel durch homologe Rekombination ist somit nicht auszugehen. Maßnahmen zur Abtrennung der replikationsdefekten *gutless*-Vektorpartikel sind somit nicht notwendig.

3.5 Sicherheit der Helferzelllinien

Den replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikeln und den replikationsdefekten Helferviren fehlt die E1-Region. Zu ihrer Erzeugung und Vermehrung werden permissive Zellen benötigt, die die Gene der E1-Region zur Verfügung stellen.

Eine häufig verwendete Helferzelllinie ist die humane Zelllinie 293, die durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit fragmentierter AdV5-DNA entstanden ist [33]. In ihrem Genom liegt eine Kopie des linken Endes (Nukleotide 1 bis 4344) des AdV5-Genoms vor, in der neben dem ITR das Verpackungssignal Ψ , das späte pIX-Gen sowie die E1a- und E1b-Gene enthalten sind, welche konstitutiv exprimiert werden [33, 34].

Viele AdV-Vektoren der ersten Generation, aber auch Helferviren enthalten Nukleinsäureabschnitte, die homolog zur integrierten Kopie des linken AdV-Genombereiches sind (siehe Abb. 5a).

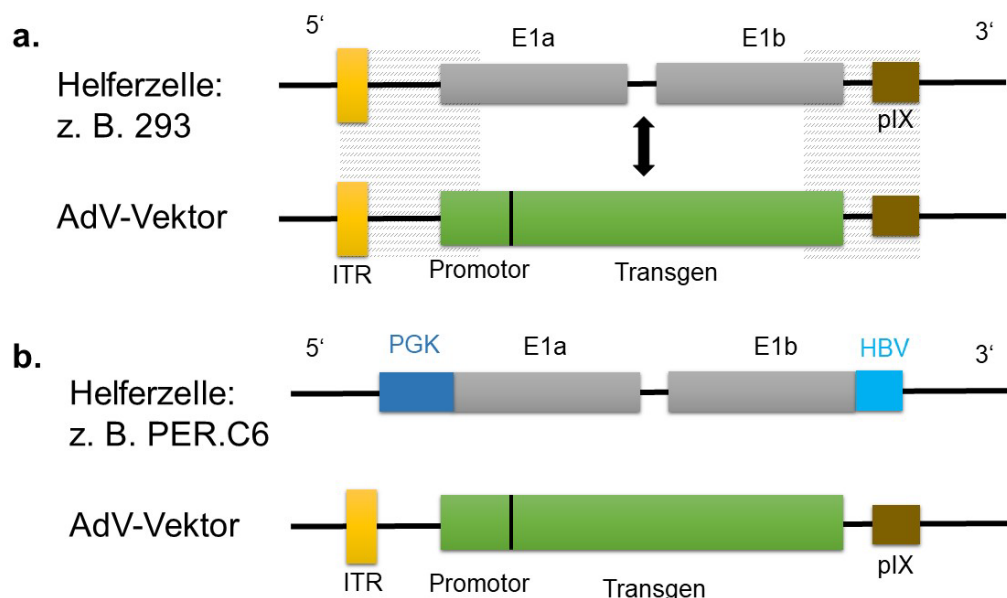


Abb. 5: AdV-DNA in Helferzelllinien und im Vektor mit Expressionskassette. a. Helferzelllinien wie 293 enthalten zumeist 5'-Bereiche des AdV5-Genoms: ITR, Verpackungssignal Ψ sowie die Gene E1a, E1b und pIX. Die AdV-Vektor-DNA enthält die Expressionskassette aus Promotor und Transgen anstelle der kodierenden Region von E1a und E1b, jedoch flankiert von E1-Nukleinsäureabschnitten, die homolog zum integrierten AdV-Genombereich der Helferzelllinie sind (schraffiert gekennzeichnete Bereiche), so dass homologe Rekombinationsereignisse möglich sind. b. In den neuen Helferzelllinien wie z. B. PER.C6 ist das E1-Gen auf die E1a- und E1b-Leserahmen reduziert und steht unter Kontrolle eines heterologen Promotors wie des Promotors des humanen Phosphoglycerat-Kinase-(PGK)-Gens und des Polyadenylierungssignals des Gens für das Oberflächenprotein des Hepatitis-B-Virus (HBV). Die Abbildung wurde modifiziert nach [46].

Es konnte gezeigt werden, dass homologe Rekombinationsereignisse dazu führen können, dass das E1-Gen wieder in die Vektor- oder Helfervirusgenome integriert werden kann, und diese so replikationskompetent werden. Replikationskompetente AdV-Vektorpartikel sind in den ersten Passagen noch selten, bei der Herstellung großer Virusmengen mit vielen Passagen kann es jedoch zu einer hohen Kontaminationsrate kommen [47–49]. Eine weitere Helferzelllinie mit vergleichbarem E1-Integrationsmuster ist 911, eine Zelllinie etabliert aus humanen embryonalen Retinoblasten [35].

PER.C6 ist ebenfalls eine Zelllinie, die aus humanen embryonalen Retinoblasten etabliert worden ist. Das Genom dieser Zelllinie enthält eine verkürzte E1-Region (Nukleotide 459 bis 3510) unter der Kontrolle eines heterologen Phosphoglycerat-Kinase-(PGK)-Promotors und eines heterologen Polyadenylierungssignals (siehe Abb. 5) [46]. Es bestehen keine Homologien zwischen dem PER.C6-Genom und dem von AdV-Vektoren [46, 50]. Werden Zelllinien wie PER.C6 in Kombination mit AdV-Vektoren verwendet, denen die Nukleinsäureabschnitte für E1a und E1b fehlen, können keine replikationskompetenten Adenoviruspartikel entstehen.

3.6 Sicherheit von AdV-Vektoren anderer *Mastadenovirus*-Spezies

Die Entstehung replikationskompetenter AdV-Partikel kann auch durch die Verwendung von AdV-Vektoren anderer *Mastadenovirus*-Spezies verhindert werden, wie z. B. dem Subtyp ChAdY25, der der Spezies *Mastadenovirus exoticum* zugeordnet wird [51]. Besteht zwischen der in der Helferzelllinie vorliegenden AdV-Region und den Nukleinsäureabschnitten des AdV-Vektors nur eine geringe oder keine Sequenzhomologie, ist nicht von einer homologen Rekombination und Abgabe replikationskompetenter AdV-Partikel auszugehen [51]. Für ChAdY25 und 293-abgeleitete Zelllinien ist dies der Fall.

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

Die Biodistribution sowie das Vorkommen und die Dauer von *shedding* adenoviraler Vektoren sind abhängig vom Serotyp, der Art der Verabreichung und der Dosis [52]. Es ist bekannt, dass die adenoviralen Partikel nach der Verabreichung für mehrere Tage bis Wochen an der Injektionsstelle verbleiben können [53]. Im Rahmen der Biodistribution gelangen AdV5-Partikel vor allem in die Leber und Milz. In anderen Geweben wie Herz, Knochenmark, Lunge, Niere, Darm oder den Keimdrüsen sind AdV5-Vektorpartikel deutlich seltener nachweisbar [54–56]. Nach Verabreichung von 10^{11} AdV35-Partikel wurden nach drei Monaten vereinzelt Partikel in iliakalen Lymphknoten nachgewiesen [55]. Balb/c-Mäuse, die den vom Schimpansen-Adenovirus abgeleiteten Impfstoff ChAdOx1-HBV mit einer Dosis von $2,4 \times 10^{10}$ Vektorpartikel intramuskulär erhalten hatten, wiesen an Tag 2 und 29 nach Verabreichung in allen untersuchten Organen (Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Lymphknoten, Ovarien, Skelettmuskel, Milz und Testis) Vektorgenomkopien auf. An Tag 56 war die Anzahl Vektorgenom-positiver Proben deutlich geringer (9 von 56 Organproben) [57].

Der Tropismus von AdV hängt u.a. davon ab, an welchen zellulären Rezeptor der jeweilige Serotyp bindet. Während der *Coxsackievirus-Adenovirus receptor* (CAR) eine Affinität zu den meisten humanen Serotypen besitzt, dringen bovine, porcine und ovine AdV CAR-unabhängig in Wirtszellen ein [58]. Gewebe wie Leber, Magen und Gallenblase, sowie einige Tumorgewebe (Lunge, Ovarien und Gebärmutter) weisen eine hohe CAR-Expression auf. Nieren-, Prostata- und Ohrspeicheldrüse-Tumore weisen hingegen eine herabregulierte CAR-Expression auf [59]. Einige Spezies wie Maus, Ratte, Hund und Schwein besitzen Rezeptoren mit hoher Sequenzhomologie zu humanem CAR. Fast alle HAdVs besitzen im Fiberprotein (*fiber*

knot) das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv, welches möglicherweise mit Integrinen als Co-Rezeptoren interagiert. Weitere bekannte Rezeptoren verschiedener AdV-Typen sind CD46, CD80/86, Sialinsäure, Proteoglykane, *major histocompatibility complex* (MHC)-I und *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 [58]. Adenoviren sind generell nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Unter Verwendung des Melanotransferrin (MTf)/P97-Transzytosewegs konnte gezeigt werden, dass mithilfe eines generierten Fusionsproteins CAR-MTf eine Transzytose von AdV5 über die Blut-Hirn-Schranke möglich ist [60].

Shedding bezeichnet die Ausscheidung von Viruspartikeln durch den behandelten Patienten oder des Versuchstieres über Urin, Fäzes, Schweiß, Speichel, nasopharyngeale, Tränen- oder Samenflüssigkeit. Generell erfolgt die Bestimmung möglicher abgegebener Viruspartikel anhand des Nachweises ihrer Genome über nicht-quantitative oder quantitative PCR (qPCR) oder seltener über den Nachweis von Protein über *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) [61]. Die Infektiosität von Vektorpartikeln wird mithilfe von biologischen *assays* bestimmt. Zur Erhebung von Daten zum *shedding* wird am häufigsten das Xenograft-Maus-Modell verwendet. Die Autoren einer Mausstudie argumentieren, dass das Laborpersonal am Tag vier nach intravenöser Verabreichung eines AdV5 keiner Expositionsfahr mit infektiösen Partikeln ausgesetzt sind, da drei Tage nach der Verabreichung keine oder nur geringfügige Plaquebildung in Mundschleimhaut-, Urin- und Fäzesproben oder in Hautproben, entnommen aus dem Bereich über dem Tumorgewebe, detektiert wurde. Daher könne eine Herabstufung von *biosafety level 2* zu *biosafety level 1* in den Biosafety Guidelines des NIH der USA in Erwägung gezogen werden [62].

Daten zum *shedding* nach oraler oder subkutaner Verabreichung liegen bisher kaum vor, jedoch konnte vereinzelt in den ersten Tagen nach der oralen Verabreichung hoher Dosen des Tollwutimpfstoffes AdRG1.3-ONRAB®, basierend auf replikationskompetenten AdV5-Partikeln, Virus-DNA mittels qPCR in Fäzes und Speichel von Waschbären (3 Tage), Füchsen (4 Tage) und Stinktieren (14 Tage) detektiert werden [56].

Eine umfangreiche Auswertung der Ergebnisse klinischer Prüfungen in 2007 ergab, dass in 29 von 50 Publikationen *shedding* von Vektor-DNA oder infektiösen Partikeln in Sekreten bei verschiedenen Applikationswegen auftrat. Langanhaltendes *shedding* über 90 Tage im Sputum wurde u. a. bei Lungenkrebspatienten nach intratumoraler Verabreichung beobachtet [63]. In einigen Studien wurden ebenfalls Blut, Fäzes oder Rachenabstriche von medizinischem Personal, das in engem Kontakt mit Patienten stand, analysiert. Dabei wurden weder Vektorgenome noch Viruspartikel nachgewiesen [61, 64].

Zusammenfassend lässt sich keine allgemeine Aussage über die Biodistribution treffen, sowie ab welchem Zeitpunkt behandelte Versuchstiere keine infektiösen AdV-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 AdV-Vektorpartikeln inokuliert wurden, die unter Kapitel 6 Punkte 3 und 4 genannten Hinweise zu beachten.

4 Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektoren

Bei der Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten mit E1-deletierten AdV-Genomen in *E. coli* K12 und seinen Derivaten wird – sofern keine weiteren Nukleinsäureabschnitte mit Gefährdungspotenzial eingeführt werden – nach dem Stand von Wissenschaft und Technik kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt angenommen. Wird hingegen das voll-

ständige oder ein replikationskompetentes (z. B. nur E3-deletiertes) Genom eines AdV amplifiziert, auch wenn es durch Nukleinsäureabschnitte des Plasmids unterbrochen wird, ist das Gefährdungspotenzial des AdV vollständig in die Risikobewertung einzubeziehen (Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus, Az. 6790-10-89).

Werden eukaryotische Zellen mit amplifizierten rekombinanten Plasmiden transfiziert, ist entscheidend für die Sicherheitsbewertung, ob AdV-Vektorpartikel entstehen können und welches Gefährdungspotenzial diese haben. Dabei wird ein geringes Gefährdungspotenzial für den Menschen angenommen, sofern keine heterologen Nukleinsäureabschnitte im AdV-Genom inseriert vorliegen, die das Gefährdungspotenzial des AdV erhöhen. Von einem geringen Risiko wird beim Umgang mit AdV-Vektorpartikeln ausgegangen, da sie menschliche Zellen effizient infizieren, und da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das virale Genom – als seltenes Ereignis – in das Wirtsgenom integriert. Die Möglichkeit einer solchen Integration ist insbesondere deshalb in Betracht zu ziehen, weil die Adenovirus-Vektor-DNA aufgrund der noch vorhandenen viralen Genprodukte in der Lage sein kann, geringfügig zu replizieren. Für AdV5, AdV26 oder ChAdY25 wird aufgrund der klinischen Daten auch bei einer möglichen Integration kein Gefährdungspotenzial angenommen (siehe Kapitel 2.2).

Je nach Generation der verwendeten AdV-Vektoren (siehe Abb. 1) können nach Ko-Infektion einer Zelle mit einem AdV und einem AdV-Vektor replikationskompetente AdV gebildet und abgegeben werden.

Bei AdV-Vektoren der ersten Generation, bei denen i. d. R. die E1-Region im Genom des AdV deletiert wurde, besteht wie in Kapitel 3.2 beschrieben die Möglichkeit, dass durch homologe Rekombination replikationskompetente Wildtyp-Adenoviruspartikel gebildet werden, deren Gefährdungspotenzial dem des ursprünglichen AdV entspricht.

Für AdV-Vektoren der nachfolgenden Generationen (siehe Abb. 1) ist nicht davon auszugehen, dass replikationskompetente AdV *in vivo* gebildet werden. Entweder sind mehrere essentielle Regionen des viralen Genoms deletiert, so dass der Replikationsdefekt nur über mehrere Rekombinationsereignisse aufgehoben werden kann oder es liegen in der Helferzelllinie keine homologen Nukleinsäureabschnitte zum AdV-Genom mehr vor. Bislang wurde im Zuge klinischer Studien noch kein Fall beschrieben, bei dem es zu einer Rekombination zwischen AdV und AdV-Vektor gekommen ist [65].

Werden Helferzelllinien verwendet, bei denen das Entstehen replikationskompetenter AdV-Partikel durch homologe Rekombination nicht ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 3.5 „Sicherheit der Helferzelllinien“), ist von einer Kontamination mit solchen Viren auszugehen.

Bei den neu entwickelten Helferzelllinien, in denen die Helfergene der E1-Region auf die kodierenden Nukleinsäureabschnitte reduziert sind und bei denen nicht von homologer Rekombination mit dem replikationsdefekten AdV-Genom auszugehen ist, wäre lediglich eine illegitime Rekombination denkbar. Diese ist aber als äußerst seltenes Ereignis bei der Risikobewertung solcher Arbeiten nicht zu berücksichtigen.

Nach Infektion von Zellkulturen oder Tieren ist allein die Replikationskompetenz der AdV-Vektorpartikel zu bewerten:

- Nach Infektion mit replikationskompetenten AdV-Vektorpartikeln inkl. Expressionskassette bzw. nach entsprechender Transfektion entstehen neue rekombinante, replikationskompetente AdV-Vektorpartikel, die für die Bewertung der gentechnischen Arbeit sicherheitsrelevant sind.

- Nach abortiver Infektion mit replikationsdefekten AdV-Vektorpartikeln inkl. Expressionskassette bzw. nach entsprechender Transfektion entstehen keine neuen AdV-Vektorpartikel, sofern die infizierten Zellen oder das infizierte Tier den Replikationsdefekt von AdV nicht aufheben. Die virale Nukleinsäure wird nicht mobilisiert und auf weitere Zellen übertragen. Beim Umgang mit diesen Zellen oder Tieren ist zu beachten, dass diese die verabreichten Vektorpartikel ggf. wieder abgeben können, weil eine Aufnahme in eine Zelle ausgeblieben ist (siehe Kapitel 6 Punkt 2. und 3.).

Bei Infektion von Versuchstieren mit AdV-Vektoren können eine homologe Rekombination zwischen AdV und AdV-Vektoren und die Bildung replikationskompetenter AdV ausgeschlossen werden, insofern die Versuchstiere einer spezifisch pathogenfreien Haltung (SPF) gemäß *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA)-Richtlinien entstammen [66].

5 Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektoren

Im Folgenden werden allgemeine Kriterien der Vergleichbarkeit bei gentechnischen Arbeiten mit adenoviralen Vektorpartikeln zusammengefasst. Gentechnische Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO), die die genannten Kriterien erfüllen, sind miteinander vergleichbar und der Sicherheitsstufe zuzuordnen, die der Risikogruppe des GVO entspricht.

Sollen mithilfe adenoviraler Vektoren Gene für Prionproteine oder Toxine übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.

5.1 Übertragung von Plasmiden mit adenoviraler DNA auf *E. coli* K12-Derivate

1. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Rekombinationsplasmides mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten von AdV sind GVO der **Risikogruppe 1**.
2. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Rekombinationsplasmides sowie ggf. eines Helferplasmids mit subgenomischen adenoviralen Nukleinsäureabschnitten sind GVO der **Risikogruppe 1**.
3. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Plasmids mit einem E1-deletierten (replikationsdefekten) adenoviralen Genom sind GVO der **Risikogruppe 1**.
4. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Plasmids mit der vollständigen genomischen DNA eines AdV sind GVO der **Risikogruppe 2**.

5.2 Herstellung adenoviraler Vektorpartikel in eukaryotischen Zellen

1. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Rekombinationsplasmid bzw. subgenomische Nukleinsäureabschnitte von AdV übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**.
2. Eukaryotische Zellen, einschließlich Helferzelllinien, der **Risikogruppe 1**, auf die die vollständige genomische DNA eines AdV übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Es werden replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** gebildet und abgegeben.
3. Eukaryotische Helferzelllinien der **Risikogruppe 1**, auf die E1-deletierte AdV5, AdV26 oder ChAdY25-Genome und ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern ausgeschlossen werden kann, dass durch

homologe Rekombination replikationskompetente adenovirale Viruspartikel gebildet werden. Es werden replikationsdefekte adenovirale Vektorpartikel der **Risikogruppe 1** abgegeben. Falls nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch homologe Rekombination replikationskompetente adenovirale Vektorpartikel gebildet werden, sind diese in die Risikobewertung einzubeziehen. Ist eine vollständige Abtrennung replikationskompetenter AdV-Partikel nicht möglich, ist das Gemisch der Partikel der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

4. Eukaryotische Helferzelllinien der **Risikogruppe 1**, auf die E1-deletierte AdV-Genome (außer AdV5, AdV26 oder ChAdY25) sowie ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Falls nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch homologe Rekombination replikationskompetente adenovirale Vektorpartikel gebildet werden, sind diese in die Risikobewertung einzubeziehen. Es werden replikationsdefekte adenovirale Vektorpartikel und ggf. replikationskompetente adenovirale Viruspartikel der **Risikogruppe 2** abgegeben.
5. Eukaryotische Helferzelllinien der **Risikogruppe 1**, die mit einem replikationskompetenten Helfervirus infiziert wurden und auf die zusätzlich nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV sowie ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Es werden replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** und replikationsdefekte adenovirale *gutless*-Vektorpartikel (ggf. mit Transgen) der **Risikogruppe 1** gebildet und abgegeben. Sofern die replikationskompetenten Helferviren nicht von den replikationsdefekten adenoviralen *gutless*-Vektorpartikel abgetrennt werden können, ist das Partikelgemisch der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.
6. Eukaryotische Helferzelllinien der **Risikogruppe 1**, die mit einem replikationsdefekten Helfervirus infiziert oder mit einem Helferplasmid transfiziert wurden und auf die zusätzlich nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV sowie ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern (i) nicht von einer Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit des Helfervirus durch homologe Rekombination auszugehen ist. Werden in den Zellen die Proteine der adenoviralen E1-Region exprimiert, kommt es zur Bildung und Abgabe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel der **Risikogruppe 1**.
7. Eukaryotische Helferzelllinien der **Risikogruppe 1**, auf die E1-deletierte AdV-Genome, einschließlich eines replikationsdefektes Helfervirus oder ein Helferplasmid in Kombination mit nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV übertragen wurden sowie ein Transgen mit neoplastisch transformierendem Potenzial, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Es werden rekombinante, replikationsdefekte AdV-Partikel oder replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel abgegeben, die ein Gen mit Gefährdungspotenzial übertragen können. Beim Umgang mit diesen GVO sind zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten (siehe Kapitel 6).

5.3 Transduktion eukaryotischer Zellen mit adenoviralen Vektorpartikeln

1. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die DNA mithilfe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel der **Risikogruppe 1** übertragen wurde, sind GVO der **Risikogruppe 1**. Es werden keine replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikel oder replikationskompetenten Viruspartikel gebildet und abgegeben.
2. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch-transformierendem Potenzial mithilfe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel der **Risikogruppe 2** übertragen wurde, sind nach Abschluss der Transduktion GVO der **Risikogruppe 1**, sofern die Zellen nicht mit einem Helfervirus infiziert sind. Es

werden keine replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikel oder replikationskompetenten Viruspartikel gebildet und abgegeben.

3. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial oder mit neoplastisch transformierendem Potenzial mithilfe replikationsdefekter adenoviraler Vektorpartikel der **Risikogruppe 1** oder **2** übertragen wurde, bei denen nicht von einer Kontamination mit replikationskompetenten Viruspartikeln der **Risikogruppe 2** auszugehen ist, sind nach Abschluss der Transduktion GVO der **Risikogruppe 1**, sofern ausgeschlossen werden kann, dass (i) eine homologe Rekombination mit ggf. in der Zelle vorliegenden adenoviralen Nukleinsäureabschnitten den Replikationsdefekt aufhebt und (ii) im Genom der Zellen die adenovirale E1-Region vorliegt. Es werden keine replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikel oder replikationskompetenten Viruspartikel gebildet und abgegeben.
4. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die DNA mithilfe replikationsdefekter adenoviraler Vektorpartikel der **Risikogruppe 1** übertragen wurde, bei denen eine Kontamination mit replikationskompetenten Viruspartikeln der **Risikogruppe 2** nicht auszuschließen ist, sind auch nach Abschluss der Transduktion GVO der **Risikogruppe 2**. Ggf. werden replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** gebildet und abgegeben.
5. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 2**, auf die ein Transgen ohne Gefährdungspotenzial oder mit neoplastisch-transformierendem Potenzial mithilfe adenoviraler Vektorpartikel übertragen wurde, sind auch nach Abschluss der Transduktion GVO der **Risikogruppe 2**, da das Gefährdungspotential der Empfängerorganismen vollständig in die Risikobewertung einbezogen wird.

6 Hinweise

1. Sind AdV-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. Für den Umgang mit adenoviralen Vektorpartikeln mit Nukleinsäureabschnitten mit neoplastisch transformierendem Potenzial wird auf die folgenden allgemeinen Stellungnahmen der ZKBS hingewiesen:
 - Stellungnahme der ZKBS: Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit neoplastisch transformierendem Potenzial (Az. 6790-10-01, aktualisiert Dezember 2016)
 - Empfehlung der ZKBS zu adenoviralen und AAV-abgeleiteten replikationsdefekten Partikeln, die einen Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen (Az. 6790-10-83, aktualisiert April 2020)
 - Stellungnahme der ZKBS – Bewertung von gentechnisch veränderten Organismen, in die Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial eingeführt wurden (Az. 6790-10-36, aktualisiert Februar 2025)
3. Versuchstiere aus einer SPF-Haltung, auf die die unter Kapitel 5.3 Punkt 1. und 2. beschriebenen transduzierten Zellen übertragen wurden, wobei eine Verunreinigung dieser Zellen mit rcAdV ausgeschlossen werden kann, sind keine GVO und auch nicht in der Lage, GVO abzugeben. Die Tiere sind auch nicht als Träger von GVO anzusehen.
4. Versuchstiere, die mit replikationsdefekten AdV-Partikeln inokuliert 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, verwendeter Serotyp, Immunkompetenz des Versuchstieres). 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. Die Risikogruppe der vorliegenden rekombinanten AdV-Vektorpartikel bestimmt die erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen.

Wird mithilfe von Daten, gewonnen wie z. B. in [51, 65, 66] oder geeigneter Literatur für den Einzelfall oder vergleichbare experimentelle Ansätze belegt, dass das behandelte Tier nach einer bestimmten Zeit keine AdV-Vektorpartikel mehr abgibt, kann die für den Vollzug des Gentechnikrechts zuständige Landesbehörde, orientiert an diesen Daten Fristen festlegen, nach deren Ablauf nicht mehr von einer Abgabe von GVO auszugehen ist. Es wird zudem auf § 24 Abs. 1 Satz 3 b GenTSV hingewiesen, wonach flüssiger und fester Abfall (z. B. Einstreu) aus Anlagen der Sicherheitsstufe 1 auch ohne Vorbehandlung entsorgt werden kann, wenn er so gering kontaminiert ist, dass schädliche Auswirkungen auf die Schutzziele des GenTG nicht zu erwarten sind.

5. **Gewebe und Zellen** von Versuchstieren, die mit AdV-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 [51, 65, 66], 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 AdV-Vektorpartikeln auszugehen ist und ggf. die gentechnischen Arbeiten herabgestuft werden kann.
6. **Kadaver von Versuchstieren**, die mit AdV-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 AdV-Vektorpartikeln eine deutliche Abreicherung der Partikel erreicht ist [51, 65, 66]. Auch **Kadaver von Versuchstieren**, die mit AdV-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 sicherzustellen, dass die in diesem Hinweis genannten Kadaver nicht in die Nahrungs- und Futtermittelkette gelangen.

7 Literatur

1. **Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**(3):570–3.
2. **Cooper M, Goebel W, Hofschneider PH, Koprowski H, Melchers F, Oldstone M, Rott R, Schweiger HG, Vogt PK, Zinkernagel R, Doerfler W** (1983). The Molecular Biology of Adenoviruses 1. Current topics in Microbiology and Immunology, vol. 109. Springer, Berlin, Heidelberg.
3. **Knipe DM** (2015). Fields Virology, 6. Auflage. Wolters Kluwer, Philadelphia.
4. **Jong YP de, Herzog RW** (2022). AAV and hepatitis: Cause or coincidence? *Mol Ther* **30**(9):2875–6.
5. **Lucher LA** (1995). Abortive adenovirus infection and host range determinants. *Curr Top Microbiol Immunol* **199** (Pt 1):119–52.
6. **Doerfler W** (1996). Medical Microbiology. Adenoviruses, 4th Ed. Springer, Galveston (TX).
7. **Braithwaite Aw** (1986). Semipermissive replication of adenovirus 5 in rat brain cells and evidence for an induction of cellular DNA replication in vivo. *J Gen Virol* **67** (Pt 2):391–6.
8. **Eggerding FA, Pierce WC** (1986). Molecular biology of adenovirus type 2 semipermissive infections. I. Viral growth and expression of viral replicative functions during restricted adenovirus infection. *Virology* **148**(1):97–113.
9. **Murray JD, Bellett AJ, Braithwaite Aw, Waldron LK, Taylor IW** (1982). Altered cell cycle progression and aberrant mitosis in adenovirus-infected rodent cells. *J Cell Physiol* **111**(1):89–96.
10. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. ICTV - Taxonomy. <https://ictv.global/>. Geprüft am 03.07.2024.
11. **Dehghan S, Seto J, Liu EB, Ismail AM, Madupu R, Heim A, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J, Seto D** (2019). A Zoonotic Adenoviral Human Pathogen Emerged through Genomic Recombination among Human and Nonhuman Simian Hosts. *J Virol* **93**(18).
12. **Pinski AN, Gan T, Lin S-C, Droit L, Diamond M, Barouch DH, Wang D** (2024). Isolation of a recombinant simian adenovirus encoding the human adenovirus G52 hexon suggests a simian origin for human adenovirus G52. *J Virol* **98**(4):e0004324.
13. **Kosoltanapiwat N, van der Hoek L, Kinsella CM, Tongshoob J, Prasittichai L, Klein M, Jebbink MF, Deijs M, Reamtong O, Boonnak K, Khongsiri W, Phadungsombat J, Tongthainan D, Tulayakul P, Yindee M** (2023). A Novel Simian Adenovirus Associating with Human Adenovirus Species G Isolated from Long-Tailed Macaque Feces. *Viruses* **15**(6).
14. **Stacey DW, Dobrowolski SF, Piotrkowski A, Harter ML** (1994). The adenovirus E1A protein overrides the requirement for cellular ras in initiating DNA synthesis. *EMBO J* **13**(24):6107–14.
15. **Ogawa K** (1989). Embryonal neuroepithelial tumors induced by human adenovirus type 12 in rodents. 2. Tumor induction in the central nervous system. *Acta Neuropathol* **78**(3):232–44.
16. **Robbins PD, Ghivizzani SC** (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* **80**(1):35–47.
17. **Liu J, Seol D-W** (2020). Helper virus-free gutless adenovirus (HF-GLAd): a new platform for gene therapy. *BMB Rep* **53**(11):565–75.
18. **Chavda VP, Bezbaruah R, Valu D, Patel B, Kumar A, Prasad S, Kakoti BB, Kaushik A, Jesawadawala M** (2023). Adenoviral Vector-Based Vaccine Platform for COVID-19: Current Status. *Vaccines (Basel)* **11**(2):432.
19. **Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC** (1996). A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* **219**(1):220–7.
20. **Gluzman Y** (1982). Eukaryotic viral vectors. Helper-free Adenovirus type 5 vectors. p. 187–92. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, N.Y..

21. **Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Brinkley P, Rudy J, Graham FL** (1986). Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* **50**(1-3):161–71.
22. **Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M** (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* **10**(5):440–7.
23. **Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR** (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* **7**(1):2–8.
24. **Trivedi PD, Byrne BJ, Corti M** (2023). Evolving Horizons: Adenovirus Vectors' Timeless Influence on Cancer, Gene Therapy and Vaccines. *Viruses* **15**(12):2378.
25. **Bett AJ, Prevec L, Graham FL** (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**(10):5911–21.
26. **Parks RJ, Graham FL** (1997). A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol* **71**(4):3293–8.
27. **Engelhardt JF, Simon RH, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Doranz B, Grossman M, Wilson JM** (1993). Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study. *Hum Gene Ther* **4**(6):759–69.
28. **Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM** (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10):4407–11.
29. **Nelson JE, Kay MA** (1997). Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol* **71**(11):8902–7.
30. **Goldsmith KT, Dion LD, Curriel DT, Garver RI** (1998). trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus. *Virology* **248**(2):406–19.
31. **Steinwaerder DS, Carlson CA, Lieber A** (2000). DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum Gene Ther* **11**(13):1933–48.
32. **Ehrhardt A, Xu H, Kay MA** (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J Virol* **77**(13):7689–95.
33. **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1):59–74.
34. **Louis N, Eveleigh C, Graham FL** (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**(2):423–9.
35. **Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, van Ormondt H, Hoeben RC, van der Eb AJ** (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**(2):215–22.
36. **Hanahan D** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4):557–80.
37. **Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M** (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* **70**(7):4805–10.
38. **He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *PNAS* **95**(5):2509–14.
39. **Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT** (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12):5731–6.
40. **Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM** (1996). Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* **217**(1):11–22.

41. **Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL** (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24):13565–70.
42. **Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S** (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* **18**(2):180–3.
43. **Kochanek S** (1999). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**(15):2451–9.
44. **Jager L, Hausl MA, Rauschhuber C, Wolf NM, Kay MA, Ehrhardt A** (2009). A rapid protocol for construction and production of high-capacity adenoviral vectors. *Nat Protoc* **4**(4):547–64.
45. **Lee D, Liu J, Junn HJ, Lee E-J, Jeong K-S, Seol D-W** (2019). No more helper adenovirus: production of gutless adenovirus (GLAd) free of adenovirus and replication-competent adenovirus (RCA) contaminants. *Exp Mol Med* **51**(10):1–18.
46. **Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC** (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**(13):1909–17.
47. **Lochmüller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G** (1994). Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* **5**(12):1485–91.
48. **Zhang WW, Koch PE, Roth JA** (1995). Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *Biotechniques* **18**(3):444–7.
49. **Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC** (1996). Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol* **70**(12):8459–67.
50. **Genzel Y** (2015). Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand? *Biotechnol J* **10**(5):728–40.
51. **Almuqrin A, Davidson AD, Williamson MK, Lewis PA, Heesom KJ, Morris S, Gilbert SC, Matthews DA** (2021). SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals low levels of viral backbone gene transcription alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein gene transcription. *Genome Med* **13**(1):43.
52. **Baldo A, Leunda A, Willemarck N, Pauwels K** (2021). Environmental Risk Assessment of Recombinant Viral Vector Vaccines against SARS-Cov-2. *Vaccines (Basel)* **9**(5).
53. **Shimada M, Wang H, Ichino M, Ura T, Mizuki N, Okuda K** (2022). Biodistribution and immunity of adenovirus 5/35 and modified vaccinia Ankara vector vaccines against human immunodeficiency virus 1 clade C. *Gene Ther* **29**(10-11):636–42.
54. **Veneziale RW, Bral CM, Sinha DP, Watkins RW, Cartwright ME, Rosenblum IY, Treinen KA, Kishnani NS, Nelson J, Chen Z, Faha B, Maneval D, Munger RJ, Cai X-Y, Cullen C, Arezzo JC** (2007). SCH 412499: biodistribution and safety of an adenovirus containing P21(WAF-1/CIP-1) following subconjunctival injection in Cynomolgus monkeys. *Cutan Ocul Toxicol* **26**(2):83–105.
55. **Sheets RL, Stein J, Bailer RT, Koup RA, Andrews C, Nason M, He B, Koo E, Trotter H, Duffy C, Manetz TS, Gomez P** (2008). Biodistribution and toxicological safety of adenovirus type 5 and type 35 vectored vaccines against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1), Ebola, or Marburg are similar despite differing adenovirus serotype vector, manufacturer's construct, or gene inserts. *J Immunotoxicol* **5**(3):315–35.
56. **Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A** (2009). Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB) in target and non-target species. *Vaccine* **27**(47):6619–26.

57. **Australian Government Department of Health, Therapeutic Goods Administration.** Nonclinical Evaluation Report. ChAdOx1 S COVID-19 Vaccine [COVID-19 Vaccine AstraZeneca]
58. **Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK** (2009). Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* **143**(2):184–94.
59. **Hensen LCM, Hoeben RC, Bots STF** (2020). Adenovirus Receptor Expression in Cancer and Its Multifaceted Role in Oncolytic Adenovirus Therapy. *Int J Mol Sci* **21**(18).
60. **Tang Y, Han T, Everts M, Zhu ZB, Gillespie GY, Curiel DT, Wu H** (2007). Directing adenovirus across the blood-brain barrier via melanotransferrin (P97) transcytosis pathway in an in vitro model. *Gene Ther* **14**(6):523–32.
61. **Schenk-Braat EAM, van Mierlo MMKB, Wagemaker G, Bangma CH, Kaptein LCM** (2007). An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials. *J Gene Med* **9**(10):910–21.
62. **LaRocca CJ, Jacobsen KL, Inoko K, Zakharkin SO, Yamamoto M, Davydova J** (2023). Viral Shedding in Mice following Intravenous Adenovirus Injection: Impact on Biosafety Classification. *Viruses* **15**(7):1495.
63. **Griscelli F, Opolon P, Saulnier P, Mami-Chouaib F, Gautier E, Echchakir H, Angevin E, Le Chevalier T, Bataille V, Squiban P, Tursz T, Escudier B** (2003). Recombinant adenovirus shedding after intratumoral gene transfer in lung cancer patients. *Gene Ther* **10**(5):386–95.
64. **Tursz T, Cesne AL, Baldeyrou P, Gautier E, Opolon P, Schatz C, Pavirani A, Courtney M, Lamy D, Ragot T, Saulnier P, Andreumont A, Monier R, Perricaudet M, Le Chevalier T** (1996). Phase I study of a recombinant adenovirus-mediated gene transfer in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **88**(24):1857–63.
65. **Wold WSM, Toth K** (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* **13**(6):421–33.
66. **Guillen J** (2012). FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **51**(3):311–21.