

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

Gentransfer mit Mastadenoviren aus Primaten

1. Beschreibung des adenoviralen Systems

1.1 Allgemeine Einführung

Humane Adenoviren kommen weit verbreitet vor. In der Regel haben Kinder nach dem ersten Lebensjahr bereits Antikörper gegen mindestens einen Adenovirus-Typ, nach dem 15. Lebensjahr weisen die meisten Personen gegen mehrere unterschiedliche Adenovirus-Typen Antikörper auf. Adenovirus Typ 5 (Ad5) und andere Typen (z. B. 1, 2 oder 6) können in lymphoidem Gewebe über längere Zeit persistieren. Das Vorkommen solcher Infektionen ist die Ursache für den bei den meisten Personen vorhandenen, sehr hohen Antikörpertiter gegen diese Typen. Adenoviren (AdV) verursachen beim Menschen häufig Infektionen des Respirationstrakts, können aber auch seltenere Krankheitsbilder wie Keratokonjunktivitis, Meningitis oder Pneumonie hervorrufen [1, 2].

Humane Zellen sind normalerweise permissiv für AdV, ihre Infektion verläuft produktiv. Nagerzellen sind entweder nicht permissiv oder für manche humane AdV semipermissiv [1–5]. Für neugeborene Nagetiere können bestimmte AdV neoplastisch transformierendes Potenzial haben. Diese Eigenschaft wurde früher neben serologischen Kriterien zur Klassifizierung genutzt [1, 2]. Seit einiger Zeit wird für die Zuordnung zum Genus *Mastadenovirus* und auch für die Zuordnung zu einer Spezies mehr und mehr auf Daten zur Phylogenie und zur Genomorganisation zurückgegriffen. Eine eindeutige Klassifizierung ist jedoch laut der *Human Adenovirus Working Group* (HAdV Working Group) schwierig [6]. Das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) empfiehlt zur Unterscheidung zweier AdV-Spezies eine phylogenetische Distanz von > 5 – 15 % als Voraussetzung. Dazu kommen weitere Kriterien wie der GC-Gehalt, das neoplastisch transformierende Potenzial in Nagetieren, der Wirtstropismus, die Kreuz-Neutralisierung, die Fähigkeit zu rekombinieren, die Anzahl der Gene für die *virus associated* (VA) RNA und die Hämagglutination. Entsprechend dieser Kriterien werden die humanen Adenoviren (HAdV) in sieben Spezies (*Human mastadenovirus A bis G*) eingeteilt, denen jeweils mehrere Typen angehören. Viele der aus nicht-humanen Primaten isolierten AdV (*Simian mastadenovirus*, SAdV) werden ebenfalls den HAdV zugeordnet, z. B. AdV aus Schimpansen, Gorillas und Bonobos [7]. Zudem führt das ICTV neun Spezies, in denen ausschließlich aus nicht-humanen Primaten isolierte AdV zu finden sind (*Simian mastadenovirus A bis I*) [8]. Eine klare Abgrenzung der aus dem Menschen und aus nicht-humanen Primaten isolierten Spezies ist jedoch nicht immer zielführend, da es auch zu Rekombinanten zwischen humanen und simianen AdV kommen kann [9]. In der

vorliegenden Stellungnahme wird demnach der Gentransfer mit Mastadenoviren aus Primaten (HAdV und SAdV) beschrieben, die im folgenden Text zur Vereinfachung unter AdV zusammengefasst werden.

Das Genom von AdV aus Primaten besteht aus einer doppelsträngigen linearen DNA mit einer Länge von 32 – 36 kb (Abb. 1a.). An den Enden der DNA liegen inverse terminale Repetitionen (ITR) mit den Polymerase-Bindestellen für den Start der DNA-Replikation, gefolgt vom DNA-Verpackungssignal Ψ . Die „frühen“ Ereignisse des produktiven Infektionszyklus beginnen mit der Transkription des E1a-Gens, dessen Genprodukt die Expression der anderen frühen viralen Gene E1b, E2, E3 und E4 transaktiviert und eine Expressionskaskade der frühen Gene einleitet. Der frühen Transkription folgt die DNA-Replikation, mit der die „späte“ Phase des produktiven Infektionszyklus einsetzt. In der „späten“ Phase werden die „späten“ Gene exprimiert, die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids kodieren, und Partikel entstehen. Der produktive Zyklus führt zur Lyse der infizierten Wirtszelle [1, 2].

Die E1a-Proteine interagieren mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen und haben während der Adenovirus-Infektion verschiedene Funktionen. Sie aktivieren die Transkription der frühen Gene E1b, E2 und E3, führen zur neoplastischen Transformation in Nagerzellen und können ruhende Zellen der G₀- oder G₁-Phase dazu stimulieren, in die S-Phase überzugehen. Die durch E1b kodierten Gene hemmen die p53-abhängige Induktion der Apoptose [1, 2]. Die E2-Region kodiert 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) [2]. Die durch die E3-Region kodierten Genprodukte sind für die Replikation *in vitro* nicht essenziell, sind jedoch an der Modulation der Infektionsabwehr durch den Wirt beteiligt. E3 kodiert für mehrere Proteine, die u. a. den Transport des Haupthistokompatibilitätskomplexes an die Plasmamembran blockieren oder die Lyse Adenovirus-infizierter Zellen durch den Tumornekrosefaktor TNF inhibieren [1, 2]. Die E4-Region kodiert für mehrere gespleißte mRNA, wobei die exprimierten Proteine nach den ORF der E4-Region (z. B. E4orf1 oder E4orf2) benannt werden. Sie haben ebenfalls verschiedene Funktionen wie die Stimulierung der Proteinsynthese durch die Aktivierung der Proteinkinase mTOR, den Schutz der Genomenden durch Inhibierung der zelleigenen Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche oder eine Stimulierung der Transkription der E2-ORFs [2].

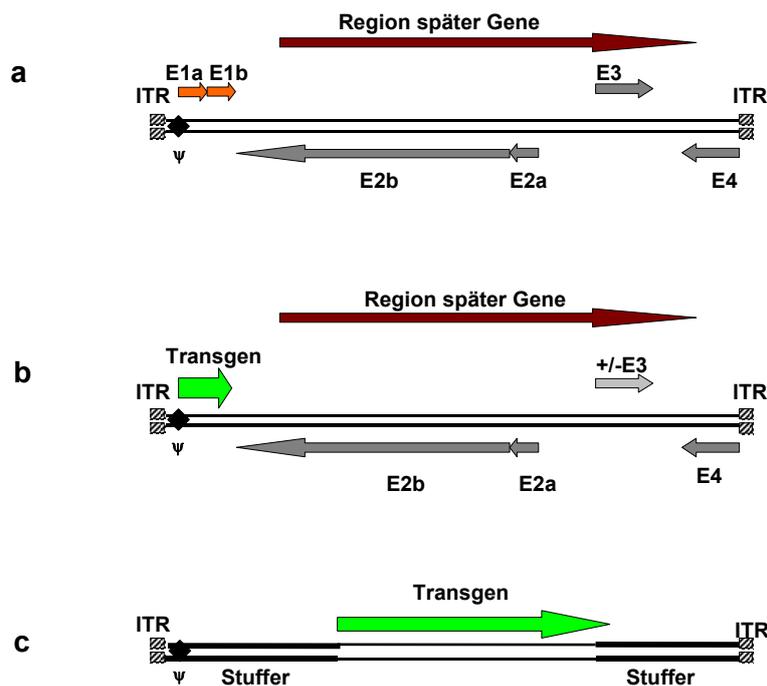


Abb. 1 Genomkarte von Adenoviren und davon abgeleiteter Vektoren

- Genomkarte von Adenoviren. Die frühen Transkriptionseinheiten E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4 und die Region der späten Gene sind in Transkriptionsrichtung dargestellt, die inversen terminalen Repetitionen (ITR) und das Verpackungssignal ψ sind gekennzeichnet.
- Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter Vektoren mit Fremdgen der ersten Generation. Die E1-Region ist deletiert und ersetzt durch ein Fremdgen (Transgen). Die E3-Region kann zusätzlich deletiert sein.
- Genomkarte Adenovirus-abgeleiteter *gutless*-Vektoren mit Fremdgen. Alle viralen kodierenden Nukleinsäureabschnitte sind deletiert (*gutless*-Vektoren) und durch ein Fremdgen sowie durch funktionslose auffüllende Nukleinsäureabschnitte (*stuffer*) ersetzt.

Abbildung modifiziert nach [10].

1.2. Gentransfer mit Hilfe von AdV-Vektoren

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

Die vielseitige Verwendung von AdV-Vektoren gründet sich auf deren günstige Eigenschaften. 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 einer somatischen Gentherapie genutzt [11–15]. Das Adenoviruskapsid kann bis zu 105 % der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken; das bedeutet bei Ad5 mit einer Genomlänge von ca. 36 kb eine Aufnahmekapazität von ungefähr 1,8 – 2,0 kb fremder DNA [16]. Bei der Verwendung von Deletionsmutanten können entsprechend größere DNA-Fragmente in das AdV-Genom eingeführt werden. Für den Gentransfer werden oft AdV-Vektoren verwendet, deren E1-Region deletiert ist. Zusätzlich ist bei manchen dieser Vektoren zur Erhöhung der Aufnahmekapazität die E3-Region deletiert („adenovirale Vektoren der ersten Generation“, siehe Abbildung 1b). Die Deletion des E1-Bereichs führt zu replikationsdefekten adenoviralen Vektoren. Das von adenoviralen

Vektorpartikeln auf nicht-komplementierende Zielzellen übertragene defekte virale Genom verweilt normalerweise episomal, wodurch das übertragene Gen (Fremdgen) lediglich transient exprimiert wird. Es erfolgt keine Produktion neuer viraler Partikel.

1.3 Herstellung von AdV-Vektorpartikeln

Rekombinante adenovirale Vektorpartikel können mit verschiedenen Verfahren hergestellt werden. Der zu übertragende Nukleinsäureabschnitt kann durch direkte Ligation in das AdV-Genom inseriert werden. In der Regel jedoch liegt homologe Rekombination zwischen dem zu übertragenden Nukleinsäureabschnitt und dem viralen Genom zugrunde.

Homologe Rekombination in einer Helferzelllinie

Sehr häufig wird die homologe Rekombination in einer humanen Zelllinie herbeigeführt, die für die adenovirale Replikation permissiv ist. Hierbei wird ein AdV-Genom zusammen mit einem Rekombinationsplasmid auf humane Zellen übertragen, welches das Fremdgen flankiert von AdV-Nukleinsäureabschnitten enthält. Dabei kann ein vollständiges, ein E1-deletiertes oder ein AdV-Genom übertragen werden, welches neben der E1-Deletion noch weitere Deletionen früher Gene aufweist. Die virale DNA repliziert durch eine ggf. separat bereitgestellte E1-Region und es kommt über die DNA-Sequenzhomologien zur Rekombination zwischen dem Rekombinationsplasmid und dem viralen Genom. Damit wird das Fremdgen an diejenige Stelle im viralen Genom integriert, welche durch die DNA-Sequenzen vorgegeben ist, die das Fremdgen flankieren. Das rekombinante virale Genom wird von den späten viralen Proteinen verpackt und als AdV-Vektorpartikel mit Fremdgen von der Zelllinie abgegeben (Abb. 2).

Das Fremdgen wird zumeist anstelle der E1-Region eingefügt, wodurch die AdV-Vektorpartikel replikationsdefekt sind. Für die virale DNA-Replikation werden jedoch die E1-Genprodukte benötigt, die in *trans* zur Verfügung gestellt werden müssen. Dazu werden permissive Zelllinien verwendet, in die zuvor das E1-Gen genomisch eingeführt wurde und die daraufhin das E1-Gen konstitutiv exprimieren [17–19]. Diese Helferzelllinien ermöglichen nicht nur die Herstellung E1-deletierter adenoviraler Vektorpartikel, sie werden auch für die Vermehrung dieser Partikel benötigt.

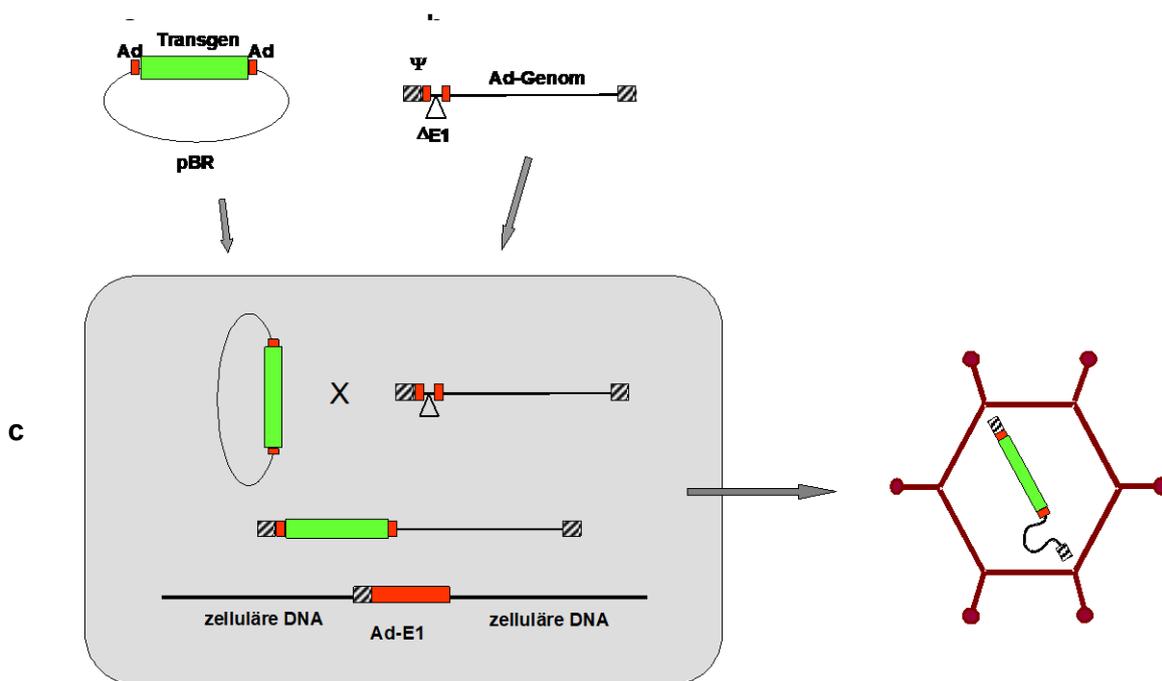


Abb. 2 Herstellung eines replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikels mit Fremdgen in einer Helferzelllinie

Die Herstellung adenoviraler Vektorpartikel (d) erfolgt in mehreren Teilschritten:

- Das Fremdgen (Transgen), das in das AdV-Genom (Ad-Genom) des viralen Vektors (b) integriert werden soll, wird zunächst in ein pBR-abgeleitetes Rekombinationsplasmid (a) eingeführt. Dort wird es flankiert von Nukleinsäureabschnitten (Ad), die zu den nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereichen der AdV-E1-Region homolog sind.
- Im AdV-Genom sind die kodierenden Nukleinsäureabschnitte der frühen Gene E1a und E1b deletiert ($\Delta E1$). Benachbarte nicht-kodierende 5'- und 3'-Bereiche sind noch vorhanden. Das defekte AdV-Genom kann entweder in einem Vektorpartikel oder integriert in einem Plasmid vorliegen.
- Das Rekombinationsplasmid mit dem Transgen (a) wird gemeinsam mit dem defekten AdV-Genom (b) in eine Helferzelllinie eingeführt. Die Helferzelllinie enthält integriert 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 dem anstelle der deletierten E1-Region jetzt das Transgen vorliegt.
- Die im AdV-Genom noch vorhandenen späten Gene werden exprimiert. Ihre Genprodukte verpacken die AdV-Genome mit und ohne Fremdgen zu replikationsdefekten infektiösen Partikeln, die von der Helferzelllinie abgegeben werden.

Homologe Rekombination in *Escherichia coli*

Bei dieser Methode wird zur Übertragung des Fremdgens auf das AdV-Genom das effiziente Rekombinationssystem des *E. coli* K12-Derivats BJ5183 (*recBC sbcBC*) [20] genutzt. Zwei unterschiedliche DNA-Konstrukte, die miteinander rekombinieren sollen, werden gemeinsam auf *E. coli* BJ5183 übertragen. Eines dieser DNA-Konstrukte trägt das Genom eines AdV, auf welches das Fremdgen übertragen werden soll. Das Genom liegt entweder vollständig, mit einer Deletion der E1-Region oder mit Deletionen der E1- und E3-Regionen vor. Das andere DNA-Konstrukt enthält das Fremdgen. Es wird flankiert von AdV-Nukleinsäureabschnitten, die aus dem Genom-Bereich stammen, auf den das Fremdgen übertragen werden soll. Das Fremdgen wird zumeist anstelle der E1-Region eingefügt, wodurch die AdV-Vektorpartikel replikationsdefekt sind. Durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 entsteht ein Plasmid mit einem AdV-Genom, in welchem das Fremdgen inseriert vorliegt [21, 22].

Die AdV-Genome werden aus den in *E. coli* BJ5183 erzeugten rekombinanten Plasmiden ausgeschnitten und in eine Helferezelllinie transfiziert, welche die für die virale Replikation notwendigen E1-Proteine zur Verfügung stellt. Es werden replikationsdefekte AdV-Vektorpartikel mit Fremdgen erzeugt und abgegeben.

gutless-Vektoren

Der Replikationsdefekt adenoviraler Vektoren der ersten Generation wurde durch die Deletion der E1a- und E1b-Gene erreicht. Zur Erhöhung der Aufnahmekapazität wurde bei manchen dieser Vektoren zusätzlich noch das E3-Gen deletiert. Sie enthalten jedoch noch die anderen frühen und die späten viralen Gene, die in geringen Mengen nach der Infektion exprimiert werden können [23, 24]. Bei den adenoviralen Vektoren der zweiten Generation, die zusätzlich Deletionen der E2- und E4-Region aufweisen, liegen noch die späten Gene vor. Bei einer klinischen Anwendung induzieren die viralen Genprodukte eine Immunantwort gegen die transduzierte Zelle, was eine Entzündung und eine verkürzte Expressionsdauer des Fremdgens zur Folge hat. Auch die beobachtete geringfügige Replikation der Vektor-DNA in den Zielzellen ist auf eine schwache Expression viraler Gene zurückzuführen [25–27].

Bei den sogenannten *gutless*- oder *high capacity*-Vektoren wurden sämtliche virale Leseramen deletiert, sodass die Immunantwort gegen den Vektor vermindert und die Aufnahmekapazität für fremde DNA erhöht ist [28–32]. Bei diesen Vektoren sind lediglich noch virale Nu-kleinsäureabschnitte vorhanden, die in *cis* wirken und für die DNA-Replikation sowie die Verpackung der viralen DNA essenziell sind: Die ITRs mit den Polymerase-Bindungsstellen für den Start der DNA-Replikation und das DNA-Verpackungssignal Ψ . Zwischen den beiden ITRs ist der ursprüngliche Bereich der adenoviralen Gene ausgetauscht gegen nicht-kodierende auffüllende DNA (*stuffer*). Bei den daraus hergestellten Vektorpartikeln wird das Fremdgen teilweise anstelle der *stuffer*-DNA eingefügt (siehe Abbildung 1c und Abbildung 3b).

Die *gutless*- oder *high capacity*-Vektoren sind bei ihrer Herstellung auf ein Helfervirus angewiesen, welches die für die virale Replikation und Verpackung notwendigen Proteine bereitstellt. Ein solches Helfervirus liegt dann erwartungsgemäß als Kontamination des erzeugten Vektorpartikels vor und kann effizient abgetrennt werden.

Eine Methode zur Herstellung von *gutless*-Vektoren ist das vom Bakteriophagen P1 abgeleitete *Cre/loxP*-Helfer-abhängige System. Dieses hat den Vorteil, dass ein replikationsdefektes Helfervirus verwendet werden kann, welches sehr effizient abgetrennt werden kann. Zudem trägt der Replikationsdefekt zur Sicherheit des Systems bei [30, 31].

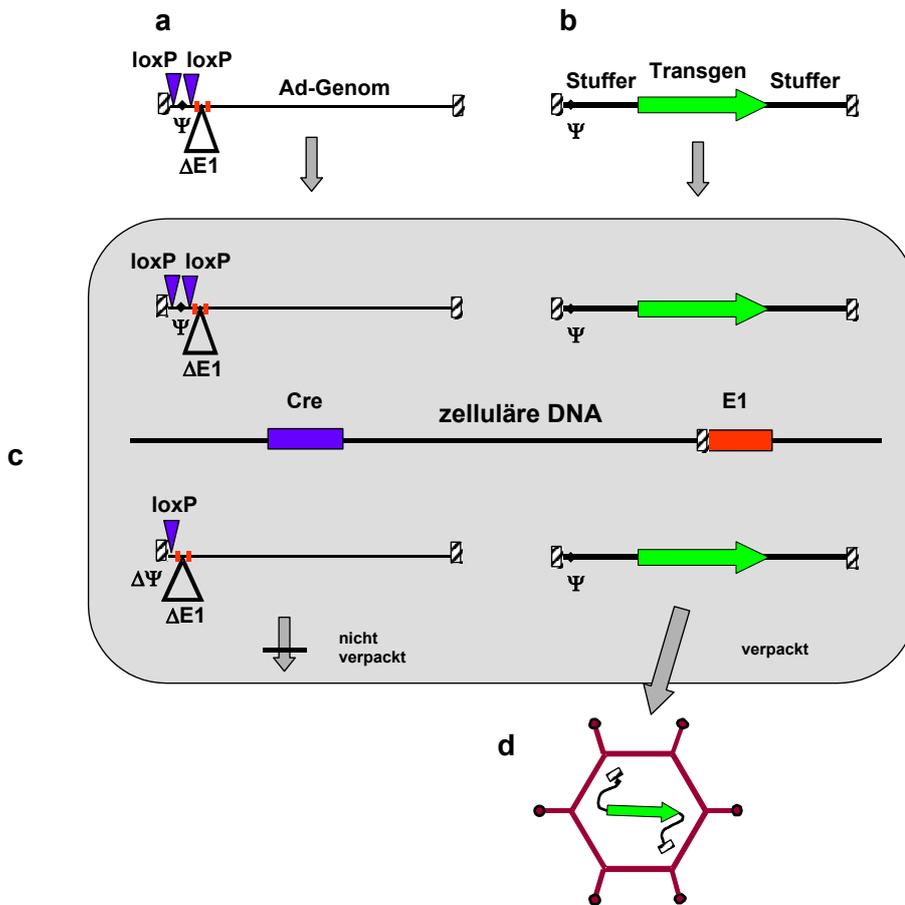


Abb. 3 Erzeugung von *gutless*-Vektorpartikeln mit Fremdgen mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Systems

- Das Verpackungssignal eines AdV-Helfervirus-Genoms (Ad-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.
- Das zu übertragende Fremdgen (Transgen) wurde in die *gutless*-Vektor-DNA eingeführt und liegt dort neben nicht-kodierenden auffüllenden Nukleinsäureabschnitten (*stuffer*), den ITRs des AdV sowie dem Verpackungssignal Ψ vor.
- Das AdV-Helfer-Genom (a) und die *gutless*-Vektor-DNA (b) werden gemeinsam in die Helferzelllinie 293-Cre eingeführt. Im Genom der Helferzelllinie liegen die Gene der Cre-Rekombinase (Cre) und eines AdV-E1 (E1) 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*-Moleküle mit Verpackungssignal Ψ zu Viruspartikeln verpackt werden.
- Die viralen *gutless*-Vektorpartikel mit Fremdgen werden von der Helferzelllinie abgegeben.

Die Abbildung wurde modifiziert nach [30].

Das Cre/loxP-Helfer-abhängige System verwendet drei Komponenten: ein AdV-Helfervirus, eine *gutless*-Vektor-DNA und eine Helferzelllinie. Bei dem AdV-Helfervirus handelt es sich um ein E1-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 inseriert vor. Die loxP-Nukleinsäureabschnitte sind Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, ein Enzym des Bakteriophagen P1. Nach Infektion einer Helferzelllinie (293-Cre), auf die das *cre*-Gen übertragen wurde und welche die Cre-Rekombinase exprimiert, werden das Verpackungssignal Ψ der Helfervirus-DNA sowie das Markergen ausgeschnitten. Liegen in dieser Helferzelllinie darüber hinaus noch die Genprodukte des dem Helfervirus fehlenden E1-Gens vor, werden sämtliche auf dem Helfervirus-Genom noch vorhandenen viralen Gene transkribiert und das Helfervirus-Genom repliziert. Wird in diese Helferzelllinie zusätzlich noch eine *gutless*-Vektor-DNA übertragen, die neben dem Fremdgen und den auffällenden nicht-kodierenden *stuffer*-Sequenzen (siehe Abbildung 1 und 3) die ITRs und das Verpackungssignal Ψ eines AdV enthält, wird auch die *gutless*-Vektor-DNA 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 zum Viruspartikel eingepackt. Die Helfervirus-DNA hingegen kann nicht mehr verpackt werden, da ihr Verpackungssignal Ψ von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten worden ist (siehe Abbildung 3). Durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation besteht darüber hinaus die Möglichkeit, noch vorhandene kontaminierende Partikel des Helfervirus weitestgehend abzutrennen, da sie bei einer höheren Dichte sedimentieren als die *gutless*-Vektorpartikel.

Sicherheit der Helferzelllinien

Den replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikeln und den replikationsdefekten Helferviren fehlt die E1-Region. Sowohl zu ihrer Erzeugung als auch zu ihrer 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 Ad5-DNA entstanden ist [17]. Im Genom dieser Zelllinie liegt integriert eine Kopie des linken Ad5-Endes vor, in der neben der ITR das Verpackungssignal Ψ , das späte pIX-Gen sowie die E1a- und E1b-Gene enthalten sind, welche konstitutiv exprimiert werden [17, 18]. Eine weitere Helferzelllinie mit vergleichbarem E1-Integrationsmuster ist 911 [19].

Die in diesen Helferzelllinien integriert vorliegenden Ad5-Nukleinsäureabschnitte überlappen mit Nukleinsäureabschnitten in Ad5-abgeleiteten, aber auch anderen AdV-Vektoren (siehe Abbildung 4) oder im Helfervirus. Dadurch besteht die Möglichkeit einer homologen Rekombination in der Helferzelle, wodurch das E1-Gen in die DNA des Vektors oder des Helfervirus zurückübertragen wird, sodass der Vektor bzw. das Helfervirus replikationskompetent werden. Solche homologen Rekombinationen wurden für 293-Zellen bereits gezeigt [33–35]. Das Vorliegen replikationskompetenter AdV-Partikel in den Vektorpräparaten stellt sowohl für die Anwendung am Menschen als auch für die Arbeiten im Labor ein Sicherheitsrisiko dar. Die in diesen Helferzellen erzeugten AdV-Vektorpartikel ohne oder mit Fremdgen sind auf das Vorliegen replikationskompetenter AdV-Partikel zu überprüfen. Bei Verwendung von Zelllinien wie der Linie PER.C6 kann es nicht zur Entstehung von replikationskompetenten Adenoviruspartikeln kommen. Diese Zellen enthalten die E1-Region unter der Kontrolle eines heterologen Promotors und eines heterologen Polyadenylierungssignals (siehe Abb. 4). Sie werden zusammen mit AdV-Vektoren verwendet,

denen die Nukleinsäureabschnitte für E1a und E1b fehlen, sodass keine Homologie zwischen der Helferzelllinie und dem AdV-Vektor besteht [36, 37].

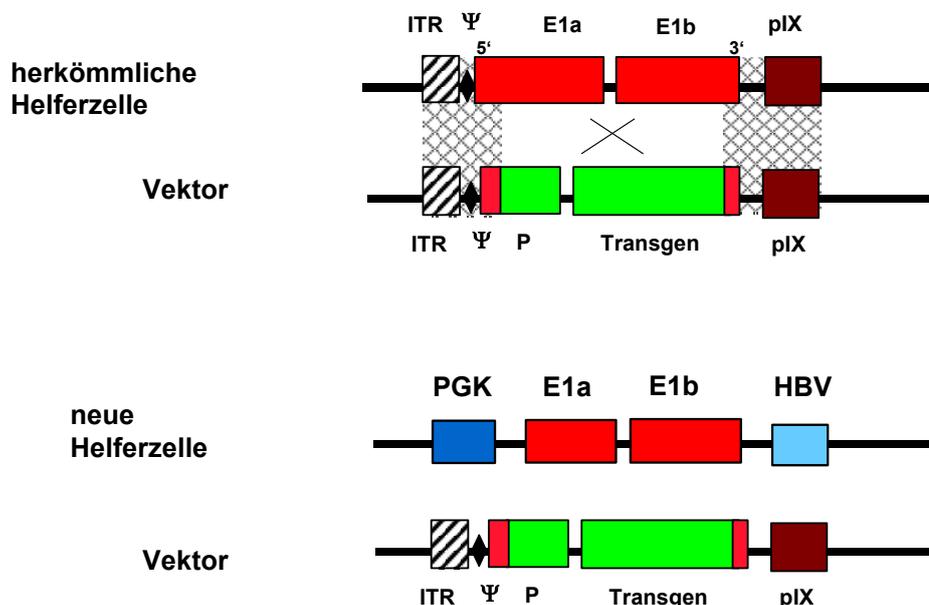


Abb. 4 AdV-DNA in Helferzelllinien und im Vektor mit Fremdgen

Helferzelllinien wie 293 enthalten zumeist 5'-Bereiche des Ad5-Genoms: ITR sowie die Gene E1a, E1b und pIX. Die nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereiche sind gekennzeichnet. Die Adenovirus-Vektor-DNA enthält das Fremdgen (Transgen) mit einem eigenen Promotor (P) anstelle der kodierenden Region von E1a und E1b, jedoch flankiert von E1-Nukleinsäureabschnitten, die homolog zur viralen DNA der Helferzelllinie sind (schraffiert gekennzeichnete Bereiche), so dass Rekombination möglich ist.

Die neuen Helferzelllinien wie z. B. PER.C6 stellen die kodierenden Bereiche der E1a- und E1b-Gene unter heterologe Expressionskontrolle, z. B. durch den Promotor des humanen Phosphoglycerat Kinase-(PGK)-Gens und das Polyadenylierungssignal des Gens für das Oberflächenprotein des humanen Hepatitis-B-Virus (HBV), in *trans* zur Verfügung.

Die Abbildung wurde modifiziert nach [36].

1.4 Gentransfer durch AdV-Vektoren in Gentransfer-Komplexen

AdV-Vektorpartikel werden wegen ihrer endosomolytischen Aktivität auch als Bestandteil von Gentransfer-Komplexen eingesetzt, ohne dass sie selbst das zu übertragende Gen inseriert enthalten [38]. Solche Aggregate enthalten neben AdV-Partikeln ein Expressionsplasmid mit der zu übertragenden Nukleinsäure, ein Polykation wie Polylysin sowie Transferrin zur Bindung an die Zelle. Häufig kommen hierbei AdV-Mutanten zur Anwendung, die im E4-Gen deletiert sind. Diese E4-defekten AdV-Mutanten werden auf Zellen, die die E4-Region konstitutiv exprimieren, komplementiert und vermehrt.

2. Zusammenfassung relevanter Kriterien für die Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektoren

Bei der Sicherheitsbewertung gentechnischer Arbeiten mit subgenomischen und replikationsdefekten Nukleinsäureabschnitten von AdV 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 vollständige 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.

Werden die amplifizierten rekombinanten Plasmide in eukaryotische Zellen transfiziert, ist entscheidend für die Sicherheitsbewertung, ob AdV-Vektorpartikel entstehen können. 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 Gene in der Lage sein kann, geringfügig zu replizieren. Bei *gutless*-Vektoren ist aufgrund der fehlenden adenoviralen Gene keine Integration zu erwarten.

Bei Verwendung von Helferzelllinien, bei denen das Entstehen replikationskompetenter Adenoviruspartikel durch Rekombination nicht ausgeschlossen ist, 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 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. Fremdgen bzw. nach entsprechender Transfektion entstehen neue replikationskompetente rekombinante AdV-Vektorpartikel, die für die Bewertung der gentechnischen Arbeit sicherheitsrelevant sind.
- Nach abortiver Infektion mit nicht replikationskompetenten AdV-Vektorpartikeln inkl. Fremdgen 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 die verabreichten Vektorpartikel ggf. wieder abgegeben werden können, weil der Eintritt in eine Zelle ausgeblieben ist (siehe Punkt 4.3.).

3. Kriterien der Vergleichbarkeit gentechnischer Arbeiten mit AdV-Vektorpartikeln

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 von Prionen oder Toxine übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.

Sollen Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen werden, sind die hierzu unter Punkt 4.6. aufgeführten allgemeinen Stellungnahmen zu beachten.

Die folgenden Begriffsdefinitionen werden verwendet:

- **Fremdgen:** prokaryotischer, eukaryotischer oder viraler Nukleinsäureabschnitt, der die Funktion der Proteine der adenoviralen E1-Region nicht funktional ersetzen kann und nicht für ein Prion oder Toxin kodiert.
- **Rekombinationsplasmid:** pBR-abgeleitetes Plasmid mit einem Fremdgen, welches von adenoviralen Nukleinsäureabschnitten flankiert wird, die bspw. zu den nicht-kodierenden 5'- und 3'-Bereichen der AdV-E1-Region homolog sind (siehe S.4 und S.6).

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

- 3.1. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines oder mehrerer Plasmide mit subgenomischen Nukleinsäureabschnitten eines AdV sowie eines Fremdgens sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern es sich beim verwendeten Vektor-Empfänger-System um eine biologische Sicherheitsmaßnahme handelt und die adenoviralen DNA nicht zur Bildung replikationskompetenter Viruspartikel in permissiven eukaryotischen Zellen führen kann.
- 3.2. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Plasmids mit der genomischen DNA eines AdV und ggf. eines weiteren Plasmids mit einem Fremdgen sind GVO der **Risikogruppe 2**.
- 3.3. *E. coli* K12-Derivate einschließlich eines Rekombinationsplasmids sind GVO der **Risikogruppe 1**.

Erzeugung von adenoviralen Vektorpartikeln

- 3.4. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die mittels Transfektion oder Infektion subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV und ein Fremdgen übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern die adenovirale E1-Region weder in der viralen DNA noch in anderer Weise in der Zelle vorliegt. Es werden keine replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikel oder replikationskompetenten Viruspartikel gebildet und abgegeben.
- 3.5. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die mittels Transfektion oder Infektion die genomische DNA eines AdV übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Es werden replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** gebildet und abgegeben.
- 3.6. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, die ausschließlich mit einem Rekombinationsplasmid transfiziert wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**.
- 3.7. Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die mittels Transfektion oder Infektion kodierende subgenomische oder genomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV und ein Fremdgen sowie ggf. ein Rekombinationsplasmid übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**, sofern in den Zellen die Proteine der adenoviralen E1-Region exprimiert werden. Es werden replikationsdefekte adenovirale Vektorpartikel der **Risikogruppe 2** und ggf. replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** gebildet und abgegeben.

- 3.8.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit einem replikationskompetenten Helfervirus infiziert wurden und auf die zusätzlich nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV sowie ein Fremdgen mittels Transfektion oder Infektion übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Es werden replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** und replikationsdefekte adenovirale *gutless*-Vektorpartikel ggf. mit Fremdgen der **Risikogruppe 1** gebildet und abgegeben. Sofern die replikationskompetenten Viruspartikel nicht durch z. B. Dichtegradientenzentrifugation von den replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikeln abgetrennt werden, ist das Gemisch der Partikel der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.
- 3.9.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit einem replikationsdefekten Helfervirus infiziert wurden und auf die zusätzlich nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV sowie ein Fremdgen, welches keine Nukleinsäure mit neoplastisch transformierendem Potenzial ist, mittels Transfektion oder Infektion übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 1**, sofern nicht von einer Wiederherstellung der Replikationskompetenz des Helfervirus durch Rekombination auszugehen ist und die Verpackung der replikationsdefekten Helferviren aufgrund der Exzision des Verpackungssignals verhindert wurde. Werden in den Zellen die Proteine der adenoviralen E1-Region exprimiert, kommt es zur Bildung und Abgabe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel der **Risikogruppe 1**.
- 3.10.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, die mit einem replikationsdefekten Helfervirus infiziert und auf die zusätzlich nicht-kodierende subgenomische Nukleinsäureabschnitte eines AdV und ein Nukleinsäureabschnitt mit neoplastisch transformierendem Potenzial mittels Transfektion oder Infektion übertragen wurden, sind GVO der **Risikogruppe 2**. Werden in den Zellen die Proteine der adenoviralen E1-Region exprimiert, kommt es zur Bildung und Abgabe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel mit Fremdgen (mit neoplastisch transformierendem Potenzial) der **Risikogruppe 2**. Beim Umgang mit diesen GVO sind zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen zu ergreifen (siehe 4.6).

Transduktion von eukaryotischen Zellen mit adenoviralen Vektorpartikeln

- 3.11.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die DNA mithilfe replikationsdefekter adenoviraler *gutless*-Vektorpartikel der **Risikogruppe 1** oder **2** übertragen wurde, bei denen nicht von einer Kontamination mit Partikeln eines Helfervirus der **Risikogruppe 2** auszugehen ist, sind 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.
- 3.12.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die DNA mithilfe replikationsdefekter adenoviraler Vektorpartikel der **Risikogruppe 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 im Genom der Zellen die adenovirale E1-Region nicht vorliegt. Es werden keine replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikel oder replikationskompetenten Viruspartikel gebildet und abgegeben.
- 3.13.** Eukaryotische Zellen der **Risikogruppe 1**, auf die DNA mithilfe replikationsdefekter adenoviraler Vektorpartikel der **Risikogruppe 2** 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.

4. Hinweise:

- 4.1.** Werden AdV-susceptible Zellen mit replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikeln transduziert, bei denen aufgrund des Produktionssystems eine Wiederherstellung der Replikationskompetenz durch Rekombination mit dem Genom eines Helfervirus oder der im zellulären Genom enthaltenen adenoviralen E1-Region nicht auszuschließen ist, ist die Abwesenheit replikationskompetenter Viruspartikel vor der Herabstufung der Arbeiten in die Sicherheitsstufe 1 zu belegen.
- 4.2.** Sollen mithilfe adenoviraler Vektoren Gene von Prionen oder Toxinen übertragen werden, ist eine Einzelfallbewertung durch die ZKBS erforderlich.
- 4.3.** Versuchstiere, deren somatische Zellen mithilfe replikationsdefekter adenoviraler Vektorpartikel transduziert wurden, sind keine GVO. Die Tiere sind jedoch grundsätzlich als Träger von GVO anzusehen. Der Zeitraum, in dem infektiöse Vektorpartikel im Tier verbleiben, hängt dabei stark von der verabreichten Dosis und der Inokulationsroute ab. Zudem können die Tiere die verabreichten Vektorpartikel ggf. wieder abgeben. Kann jedoch mithilfe von Daten oder geeigneter Literatur für vergleichbare Systeme belegt werden, dass nach einer bestimmten Zeit keine adenoviralen Vektorpartikel mehr vom behandelten Tier abgegeben werden, ist es sicherheitstechnisch unbedenklich, wenn die Landesbehörden nach Einzelfallprüfung eigenverantwortlich entsprechende Fristen festlegen, nach deren Ablauf die Tiere nicht mehr als Träger von GVO behandelt werden.
- 4.4.** Bei Versuchstieren, die mit replikationsdefekten adenoviralen Vektorpartikeln inokuliert wurden und für die die unter 4.3. genannten Daten nicht vorgebracht wurden, ist davon auszugehen, dass sieben Tage nach der Inokulation eine deutliche Abreicherung der adenoviralen Partikel erreicht ist, sodass Arbeiten mit den Kadavern dieser Tiere ein über die Sicherheitsstufe 1 hinausgehendes Gefährdungspotenzial nicht aufweisen. Der Schutz der Rechtsgüter nach § 1 Nr. 1 Gentechnikgesetz ist auch dann gewährleistet, wenn die Tierkadaver ohne vorheriges Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden. Sofern nicht bereits § 24 Abs. 1 Nr. 3 GenTSV anwendbar ist, kann die jeweils zuständige Genehmigungs- und Überwachungsbehörde gemäß § 2 Abs. 2 GenTSV entscheiden, dass diese Tierkadaver ohne ein Autoklavieren der in der Versuchstierhaltung üblichen Entsorgung zugeführt werden, wenn gewährleistet ist, dass die Tierkadaver nicht in die Nahrungs- und Futtermittelkette gelangen.
- 4.5.** Tiere, auf die die unter 3.11. und 3.12. beschriebenen transduzierten Zellen übertragen wurden, sind keine GVO und auch nicht in der Lage, GVO abzugeben.
- 4.6.** Sollen mithilfe adenoviraler Vektorpartikel Nukleinsäureabschnitte mit neoplastisch transformierendem Potenzial übertragen werden, wird in dem Zusammenhang 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)

Literatur

1. **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., vol. 109. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
2. **Knipe DM, Howley P** (2015). Fields Virology. Wolters Kluwer, Philadelphia. <http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=3418302>
3. **Murray JD, Bellett AJ, Braithwaite A, Waldron LK, Taylor IW** (1982). Altered cell cycle progression and aberrant mitosis in adenovirus-infected rodent cells. *Journal of cellular physiology* **111**(1).
4. **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.
5. **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.
6. **Human Adenovirus Working Group**. Human Adenovirus Working Group. <http://hadvwg.gmu.edu/>. Besucht am 22. Oktober 2020.
7. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. ICTV - Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Besucht am 26. Oktober 2020.
8. **International Committee on Taxonomy of Viruses** (2009). ICTV 9th report; 2009 Taxonomy Release. <https://ictv.global/taxonomy/>. Besucht am 21. Oktober 2020.
9. **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).
10. **Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC** (1998). Viral vectors for gene therapy. *Trends in biotechnology* **16**(1).
11. **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.
12. **(Gluzman, Y, Reichl, H, Solnick, D)**. Helper-free Adenovirus type 5 vectors. p. 187–92. *In* Eukaryotic viral vectors.
13. **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.
14. **Benihoud K** (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology* **10**(5):440–7.
15. **Vile RG, Russell SJ, Lemoine NR** (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* **7**(1):2–8.
16. **Bett AJ, Prevec L, Graham FL** (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**(10):5911–21.
17. **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.
18. **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).
19. **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.
20. **Hanahan D** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**(4):557–80.

21. **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.
22. **He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5):2509–14.
23. **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.
24. **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.
25. **Nelson JE, Kay MA** (1997). Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol* **71**(11).
26. **Goldsmith KT, Dion LD, Curiel DT, Garver RI** (1998). trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus. *Virology* **248**(2):406–19.
27. **Steinwaerder DS, Carlson CA, Lieber A** (2000). DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum Gene Ther* **11**(13):1933–48.
28. **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.
29. **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.
30. **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.
31. **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. *Nature genetics* **18**(2).
32. **Kochanek S** (1999). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**(15):2451–9.
33. **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.
34. **Zhang WW, Koch PE, Roth JA** (1995). Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *Biotechniques* **18**(3):444–7.
35. **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.
36. **Fallaux FJ, Bout A, van dVI, van dWD, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van OH, van dEA, 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).
37. **Genzel Y** (2015). Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?. *Biotechnol J* **10**(5):728–40.
38. **Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML** (1992). High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13):6094–8.