

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung
von *Mycobacterium bovis* BCG
mit dem Listeriolysin-Gen aus *Listeria monocytogenes***

Allgemeines

Der attenuierte Bakterienstamm *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) wird seit 1928 als Lebendvakzine gegen die durch das nahverwandte Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* verursachte Tuberkulose bei Kindern verwendet. In seltenen Fällen kann es, v. a. bei immunsupprimierten Impflingen, zu disseminierten BCG-Infektionen bzw. auch bei Immunkompetenten sehr selten zur Bildung von Geschwüren kommen, die nur durch chirurgische Eingriffe geheilt werden können. Daher wird die BCG-Impfung von der WHO nur noch für Tuberkulose-Endemiegebiete empfohlen. Die ZKBS hat *M. bovis* BCG 2018 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der Risikogruppe 2 zugeordnet, da es beim Umgang mit *M. bovis* BCG z. B. durch Nadelstichverletzungen zu schwer therapierbaren Infektionen kommen kann (Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von *Mycobacterium bovis* BCG-Stämmen, geänderte Fassung Juni 2018, Az. 45241.0147).

Die protektive Wirkung der BCG-Impfung gegen die Tuberkulose ist gering. Aus diesem Grund werden alternative Vakzinen entwickelt, die immunogener und zugleich sicherer sind. Ein Impfstoffkandidat ist das Prüfpräparat VPM1002, das zurzeit in klinischen Studien der Phase 2 u. a. an HIV-exponierten Neugeborenen, aber auch an Blasenkrebspatienten zur Immuntherapie durch Instillation von VPM1002 in die Blase untersucht wird. VPM1002 ist ein Impfstoff, bei dem rekombinante Stämme von *M. bovis* BCG Listeriolysin O (LLO) von *Listeria monocytogenes* exprimieren.

Die Immunogenität von *M. bovis* BCG ist vglw. eingeschränkt, da *M. bovis* BCG intrazellulär nur in den Phagosomen von Makrophagen repliziert. Aus diesem Grund wurden rekombinante Stämme von *M. bovis* BCG entwickelt, die das LLO exprimieren. LLO ist einer der Hauptvirulenzfaktoren von *L. monocytogenes* und gehört zu den Poren-formenden Hämolysinen mit einem pH-Optimum bei pH 5,5 [1]. Wird LLO durch *M. bovis* BCG exprimiert, lagert es sich in die Membran der Phagosomen ein und bildet Poren, durch die mykobakterielle Antigene und DNA ins Zytosol gelangen. Hierdurch werden Inflammasomen aktiviert und Autophagie und Apoptose ausgelöst, wodurch die Immunantwort gegen Mykobakterien verstärkt wird [4; 8].

Es wurden verschiedene rekombinante Stämme von *M. bovis* BCG erzeugt, die das Gen *hly* exprimieren, das für LLO kodiert. Zur Insertion von *hly* wurde ein Konstrukt geschaffen, das aus Nukleinsäureabschnitten besteht, die für das BCG-spezifische Signalpeptid Ag85B, den HlyA-Peptidlinker aus *E. coli* sowie für LLO von *L. monocytogenes* ohne Signalpeptid kodieren und unter der Kontrolle des mykobakteriellen *hsp60*-Promotors stehen [5]. Im Genom des Stammes rBCG::*hly* ist dieses Konstrukt an der *attP*-site des mykobakteriellen Phagen L5 integriert [4]. Im Genom des Stammes rBCGΔ*ureC*::*hly* dagegen ist das *hly*-Konstrukt so integriert, dass ein Teil des *ureC*-Gens von *M. bovis* gegen das Konstrukt ausgetauscht wurde.

Dies führt dazu, dass das *ureC*-Gen inaktiviert ist. *ureC* kodiert für eine Untereinheit der Urease [4]. Bei *M. bovis* BCG bewirkt die Sekretion der Urease und ihr Abbau von Harnstoff in Kohlendioxid und Ammonium, dass der pH-Wert im Phagosom erhöht wird und die Phagosomenreifung behindert wird. Wird *ureC* inaktiviert, ist der pH-Wert im Phagosom bei der Infektion niedriger, wodurch die Aktivität von LLO verbessert wird [4]. Der Stamm rBCG Δ *ureC*::*hly* entspricht dem klinischen Prüfpräparat VPM1002.

Die Urease von *M. bovis* BCG ist nicht essentiell für die Vermehrung und das Überleben des Bakteriums im Phagosom [7]. Vielmehr scheint dieses Enzym an der Deaktivierung der Expression von MHCII-Komplexen und der CD8⁺-spezifischen Antigenpräsentation beteiligt zu sein [9]. Die Deletion von *ureC* hat daher neben der Optimierung des pH-Wertes für die Aktivität von LLO zusätzlich den Effekt, dass die Antigenpräsentation über MHCII-Komplexe im Vergleich zu *M. bovis* BCG verbessert ist.

Entscheidend für die Risikobewertung von *M. bovis* rBCG::*hly* und rBCG Δ *ureC*::*hly* ist der Einfluss von LLO auf die Persistenz und die Pathogenität von *M. bovis* BCG.

Die ZKBS hatte rBCG::*hly* und rBCG Δ *ureC*::*hly* bereits 2005 der Risikogruppe 1 zugeordnet, da sich durch die Übertragung des *hly*-Gens die Pathogenität von *M. bovis* BCG nicht erhöht. Da *M. bovis* BCG im Jahr 2018 durch die ZKBS der Risikogruppe 2 zugeordnet wurde, wird die Einstufung von *M. bovis* rBCG::*hly* und *M. bovis* rBCG Δ *ureC*::*hly* mit dieser Stellungnahme unter Einbeziehung weiterer, in der Zwischenzeit erhobener Daten zur möglichen Pathogenität der beiden Stämme überprüft.

Persistenz von rBCG::*hly* und rBCG Δ *ureC*::*hly* in Zellkultur und im Tiermodell

In vitro-Experimente mit Makrophagen-Zelllinien zeigten, dass die Persistenz von rBCG::*hly* über einen Zeitraum von 15 Tagen im Vergleich zu *M. bovis* BCG signifikant verschlechtert war. Zytotoxizitätstests, bei denen die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase im Überstand der Wirtszellen über einen Zeitraum von 24 h gemessen wurde, ergaben keine erhöhte Lyse nach Infektion mit rBCG::*hly*. Die Daten legen nahe, dass die Sekretion von LLO die Pathogenität von rBCG::*hly* nicht erhöht [5].

In Infektionsversuchen mit BALB/c- und immunsupprimierten RAG1^{-/-}-Mäusen unterschied sich die Zellzahl von rBCG::*hly* und rBCG Δ *ureC*::*hly* in Lunge und Milz nicht von der von *M. bovis* BCG [4]. In anderen Versuchen persistierte rBCG Δ *ureC*::*hly* jedoch deutlich weniger lang als *M. bovis* BCG in Lymphknoten, Milz und Leber von C57BL/6-Mäusen, denen 0,5 – 1 x 10⁶ colony forming units (CFU) rBCG Δ *ureC*::*hly* bzw. *M. bovis* BCG subkutan verabreicht worden war. rBCG Δ *ureC*::*hly* war nach ca. 8 Tagen (Lunge) bzw. ca. 25 Tagen (Lymphknoten, Milz) nicht mehr im Homogenisat der Organe nachweisbar, während *M. bovis* BCG erst nach 60 Tagen nicht mehr nachweisbar (Lunge) bzw. noch bis zum Ende des Probenahmezeitraums von 90 Tagen (Lymphknoten, Milz) nachweisbar war [12].

Pathogenität von rBCG::*hly* und rBCG Δ *ureC*::*hly* im Tiermodell

In Überlebensexperimenten wurden *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Mäuse intravenös mit 0,5 – 1 x 10⁸ CFU *M. bovis* BCG, rBCG::*hly* oder rBCG Δ *ureC*::*hly* infiziert und die mittlere Überlebenszeit der infizierten Tiere ermittelt. Die Tiere, die mit einer der beiden rBCG-Varianten infiziert waren, überlebten deutlich länger als die Tiere, die mit *M. bovis* BCG infiziert wurden (65 und 80 Tage gegenüber unter 25 Tagen) [4]. In Immunisierungsversuchen mit SCID-Mäusen wurden die Tiere intravenös mit 10⁶ CFU *M. bovis* rBCG::*hly* oder

rBCG Δ ureC::*hly* infiziert, einem 20-fachen der für den Menschen subkutan verwendeten Dosis. Innerhalb dieser Immunisierungszeit starb keines der Tiere durch die Infektion [2].

Ähnliche Versuche wurden am niederländischen Primatenzentrum mit den gleichen Stämmen an Rhesusaffen durchgeführt. Die Rhesusaffen zeigten leichte Symptome an der Einstichstelle wie Rötungen, Schwellungen oder Krustenbildungen, die jedoch selbstlimitierend waren und ohne medizinische Intervention verheilten [2].

Im Rahmen des *TB Vaccine Cluster Project* der EU wurden Immunisierungsversuche mit Meerschweinchen durchgeführt, denen 5×10^4 CFU rBCG::*hly* oder rBCG Δ ureC::*hly* subkutan verabreicht wurden. Auch hier starb keines der Versuchstiere während der Immunisierungsphase [13]. In einem weiteren Versuch überlebten alle Meerschweinchen den Untersuchungszeitraum, die subkutan mit 1×10^4 CFU rBCG Δ ureC::*hly* infiziert wurden. Es wurden keine lebensfähigen Bakterien in Lunge, Lymphknoten oder Leber nachgewiesen [11].

Neugeborene Kaninchen, denen $1 - 4 \times 10^5$ CFU *M. bovis* BCG subkutan am 3. Lebenstag verabreicht worden war, zeigten eine geringere Gewichtszunahme als unbehandelte oder mit rBCG Δ ureC::*hly* infizierte Tiere [11].

In klinischen Studien der Phase 1 wurden bis zu 5×10^5 CFU rBCG Δ ureC::*hly* an gesunde, erwachsene Probanden subkutan verabreicht. Die Dosis erwies sich als sicher und wurde bis auf lokale Reaktionen an der Einstichstelle gut vertragen [3; 10]. In klinischen Studien der Phase 2 wurden $1 - 4 \times 10^5$ CFU an Neugeborene subkutan verabreicht. Bei keinem der 36 Neugeborenen, denen rBCG Δ ureC::*hly* verabreicht worden war, wurden schwerwiegende Nebenwirkungen festgestellt, die auf die Verabreichung von rBCG Δ ureC::*hly* zurückzuführen waren. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe, in der zwölf Neugeborenen *M. bovis* BCG verabreicht worden war, ein Fall einer schwerwiegenden Nebenwirkung festgestellt (Bildung eines schweren Abszesses). Bei allen Teilnehmern beider Gruppen wurden jedoch weniger schwere Nebenwirkungen der Verabreichung festgestellt, bei denen es sich um lokale Reaktionen an der Einstichstelle wie Verhärtungen, Narbenbildungen, Schwellungen, Abszesse, Ulkus, Rötungen oder Krustenbildungen handelte [6].

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Pathogenität und die Persistenz von *M. bovis* rBCG::*hly* und *M. bovis* rBCG Δ ureC::*hly* durch die Insertion des Hauptvirulenzfaktors Listeriolysin O von *L. monocytogenes* nicht erhöhen, sondern verringern.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *M. bovis* rBCG::*hly* und *M. bovis* rBCG Δ ureC::*hly* als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Die mittlerweile zur Verfügung stehenden wissenschaftlichen Daten belegen, dass nicht von einer Gefährdung für Mensch und Umwelt durch die gentechnisch veränderten Stämme *M. bovis* rBCG::*hly* und *M. bovis* rBCG Δ ureC::*hly* auszugehen ist. Eine Vielzahl von präklinischen und klinischen Daten zeigen, dass ihre Persistenz und Pathogenität im Vergleich zu der von *M. bovis* BCG reduziert ist.

Literatur

1. **Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA** (2002). The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol.* **156**(6):1029-38.
2. **Grode, L.** Persönliche Kommunikation.
3. **Grode L, Ganoza C, Brohm C, Weiner J3, Eisele B, Kaufmann S** (2013). Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine.* **31**(9):1340-8.
4. **Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Eddine AN, Mann P, Goosmann C, Bandermann S, Smith D** (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* **115**(9):2472-9.
5. **Hess J, Miko D, Catic A, Lehmsiek V, Russell DG, Kaufmann SH** (1998). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Nat Acad Sci.* **95**(9):5299-304.
6. **Loxton AG, Knaul JK, Grode L, Gutschmidt A, Meller C, Eisele B, Johnstone H, van der Spuy G, Maertzdorf J, Kaufmann SH** (2017). Safety and immunogenicity of the recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine VPM1002 in HIV-unexposed newborn infants in South Africa. *Clin Vaccine Immunol.* **24**(2):e00439-16.
7. **Reyrat JM, Lopez-Ramirez G, Ofredo C, Gicquel B, Winter N** (1996). Urease activity does not contribute dramatically to persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Infect Immun.* **64**(9):3934-6.
8. **Saiga H, Nieuwenhuizen N, Gengenbacher M, Koehler AB, Schuerer S, Moura-Alves P, Wagner I, Mollenkopf HJ, Dorhoi A, Kaufmann SH** (2014). The Recombinant BCG $\Delta ureC::hly$ vaccine targets the AIM2 inflammasome to induce autophagy and inflammation. *J Infect Dis.* **211**(11):1831-41.
9. **Sendide K, Deghmane AE, Reyrat JM, Talal A, Hmama Z** (2004). *Mycobacterium bovis* BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface. *Infect Immun.* **72**(7):4200-9.
10. **US National Library of Medicine** (2010). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01113281>. 8-10-2018.
11. **Velmurugan K, Grode L, Chang R, Fitzpatrick M, Laddy D, Hokey D, Derrick S, Morris S, McCown D, Kidd R** (2013). Nonclinical development of BCG replacement vaccine candidates. *Vaccines.* **1**(2):120-38.
12. **Vogelzang A, Perdomo C, Zedler U, Kuhlmann S, Hurwitz R, Gengenbacher M, Kaufmann SH** (2014). Central Memory CD4+ T Cells Are Responsible for the Recombinant Bacillus Calmette-Guérin $\Delta ureC::hly$ Vaccine's Superior Protection Against Tuberculosis. *J Infect Dis.* **210**(12):1928-37.
13. **Williams A, Hatch GJ, Clark SO, Gooch KE, Hatch KA, Hall GA, Huygen K, Ottenhoff TH, Franken KL, Andersen P** (2005). Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis.* **85**(1-2):29-38.