Az. 45110.2123

Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten *Chikungunya virus* Δ5nsP3 gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Das *Chikungunya virus* (CHIKV) gehört in der Gattung *Alphavirus* zur Familie *Togaviridae*. Es handelt sich um ein behülltes Virus mit einem linearen, einzelsträngigen RNA-Genom positiver Polarität. CHIKV wird von Mücken der Gattung *Aedes* übertragen, natürliche Wirte sind beispielsweise der Mensch, Affen, Nagetiere und Vögel. Zu den Symptomen einer Infektion mit CHIKV beim Menschen zählen abrupt einsetzendes Fieber, Ausschlag und Gelenkschmerzen, wobei letztere mehrere Monate lang anhalten können. Vor allem bei Neugeborenen und Menschen mit Vorerkrankungen kann es in seltenen Fällen zum Tod kommen (Letalitätsrate 0,1 %). 5 – 15 % der Infektionen verlaufen asymptomatisch [1, 2]. CHIKV ist in der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten nach § 6 GenTSV der Risikogruppe 3** zugeordnet.

Bei dem rekombinanten CHIKV Δ5nsP3 handelt es sich um ein attenuiertes Virus, welches auf einem infektiösen Klon des CHIKV La Réunion-Stammes (LR-CHIKV-Klon LR2006-OPY1) des East Central South African (ECSA)-Genotyps basiert. Zur Herstellung von CHIKV Δ5nsP3 wurde in das Nichtstrukturprotein 3 (nsP3) eine Deletion eingeführt. In das virale Genom wurde an dieser Stelle ein Nukleinsäureabschnitt eingefügt, der für einen Linker kodiert [3]. Die Deletion im *nsP3*-Gen reduziert die Replikationsfähigkeit des Virus, wie es auch bereits für das *Semliki Forest virus* gezeigt wurde, da nsP3 eine wichtige Rolle für die Replikation und Bildung der Viruspartikel spielt [4]. Eine Subpopulation von CHIKV Δ5nsP3-Viren enthält zudem einen Aminosäureaustausch, der mit einer Attenuierung einhergeht [3, 5, 6]. CHIKV Δ5nsP3 befindet sich derzeit in der Entwicklung als Impfstoffkandidat.

Die genetische Stabilität von CHIKV Δ5nsP3 wurde in einer veröffentlichten Studie [7] und in einer Studie des Impfstoffherstellers [3] untersucht. Das Virus wurde dazu jeweils auf Vero-Zellen passagiert und wies nach 15 bzw. 20 Passagen keine Veränderungen im Genom auf. Bei mehr als 20 Passagen wurde jedoch eine Verringerung der Immunogenität beobachtet, weswegen CHIKV Δ5nsP3 für die Impfstoffherstellung nur dreimal passagiert werden soll. *In vivo* wurde die genetische Stabilität an Serumproben von Prüfungsteilnehmern einer Studie der Phase I untersucht, denen CHIKV Δ5nsP3 verabreicht worden war. Dazu wurde in 20 Serumproben die Region der eingeführten Aminosäurendeletion im *nsP3*-Gen und in zwei Proben das Gesamtgenom aus dem Serum gewonnener CHIKV Δ5nsP3-Partikel untersucht. In allen Proben waren die Aminosäuren deletiert. Die Gesamtgenome wiesen keine weiteren,

BVL_FO_05_4100_402_V1.8

eventuell kompensierenden Mutationen auf, sondern nur geringe Sequenzheterogenitäten, wie sie auch bei einer Passagierung in Zellkultur auftreten [3].

Die Attenuierung von CHIKV Δ5nsP3 wurde in C57BL/6-Mäusen, Javaneraffen und Kaninchen untersucht. Bei einer subkutanen Infektion der Mäuse mit 10^4 *plaque forming units* (PFU) konnte im Gegensatz zu einer Infektion mit Wildtypviren keine Virämie beobachtet werden. Das Impfvirus rief bei einer Immunisierung mit 10^5 PFU eine humorale und zelluläre Immunantwort hervor. Eine anschließende *challenge*-Infektion mit 10^5 PFU Wildtyp-CHIKV führte in den geimpften Tieren nicht zu einer Virämie. Die schützende Wirkung war nach 20 Wochen noch nachzuweisen [7]. Die Javaneraffen wurden mit 10^5 PFU CHIKV Δ5nsP3 immunisiert. Die Tiere hatten danach einen im Vergleich zu einer Infektion mit dem Wildtypvirus um mehrere Logstufen verringerten viralen Titer und zeigten keine Krankheitssymptome. CHIKV Δ5nsP3 induzierte eine starke, langanhaltende und schützende Antikörperantwort nach einer einzelnen Impfung. Die Antikörpertiter nahmen auch über die Zeit (zwei Untersuchungen über 81 bzw. 294 Tage) nicht ab. Nach einer *challenge*-Infektion zeigten die Tiere keine anamnestische Reaktion und kein Fieber [8]. Die Kaninchen, die wiederholt eine Dosis von $3{,}8 \times 10^5$ $TCID_{50}$ CHIKV Δ5nsP3 erhalten hatten, vertrugen CHIKV Δ5nsP3 sowohl lokal als auch systemisch gut. Leichte entzündliche Reaktionen an der Injektionsstelle waren vorübergehend und wurden nach der 30-tägigen Erholungsphase nicht mehr beobachtet [3].

CHIKV Δ5nsP3 wurde bereits in mehreren klinischen Studien untersucht. In einer Studie der Phase I zur Dosisfindung wurde 120 gesunden Erwachsenen zwischen 18 und 45 Jahren zunächst eine von drei Dosierungen ($3{,}2 \times 10^3$ $TCID_{50}$/0,1mL; $3{,}2 \times 10^4$ $TCID_{50}$/0,1mL oder $3{,}2 \times 10^5$ $TCID_{50}$/0,1mL) und nach sechs oder zwölf Monaten eine weitere Impfung mit der höchsten Dosis intramuskulär verabreicht. CHIKV Δ5nsP3 erwies sich als generell sicher und wurde in den beiden niedrigeren Dosisgruppen gut vertragen. Es konnte eine Serokonversion von 100 % an Tag 14 nach der Impfung gezeigt werden, die auch nach einem Jahr noch vorhanden war. Bereits eine einfache Impfung führte zu hohen Titern neutralisierender Antikörper, was durch das Fehlen einer anamnestischen Reaktion bei der Auffrischungsimpfung deutlich wurde. Es wurden keine mit der Impfung in Verbindung gebrachten schweren unerwünschten Ereignisse beobachtet. Lokale unerwünschte Ereignisse wie Schmerzen an der Einstichstelle kamen bei 7 % der mit der höchsten Dosis geimpften Prüfungsteilnehmer vor. Systemische unerwünschte Ereignisse wie Kopfschmerzen, Fieber, Müdigkeit, und Muskelschmerzen traten in allen Dosisgruppen auf (bei 36, 40 und 68 % bei niedriger, mittlerer respektive hoher Dosis), und waren zumeist mild bis moderat und transient. Bei einem Drittel der Prüfungsteilnehmer traten Neutropenie, Leukopenie und/oder Lymphozytopenie auf, die jedoch nicht mit klinischen Symptomen einhergingen. In allen Dosisgruppen wurde eine Virämie mit einem Maximalwert an Tag drei detektiert, die jeweils nach 14 Tagen abgeklungen war [9]. In zwei weiteren Studien der Phase III wurden 3082 bzw. 408 Prüfungsteilnehmer mit 1×10^4 $TCID_{50}$/0,5 mL CHIKV Δ5nsP3 immunisiert. Dabei wurden auch ältere Prüfungsteilnehmer (≥ 65 Jahre) untersucht. In beiden Studien wurden unerwünschte Ereignisse, die mit der Verabreichung von CHIKV Δ5nsP3 in Verbindung gebracht wurden, notiert. Diese kamen bei 58,8 bzw. 72,5 % der Prüfungsteilnehmer vor, waren meistens mild bis moderat und transient. Wie bei der Phase I-Studie handelte es sich um systemische Ereignisse wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie lokale Reaktionen an der Einstichstelle (Empfindlichkeit,

BVL_FO_05_4100_402_V1.8

Schmerzen oder Rötung). In der Studie mit der größten Teilnehmerzahl (3082) traten bei 1,5 % der geimpften Prüfungsteilnehmer und bei 0,8 % der Teilnehmer, die ein Placebo erhalten hatten, schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auf. Dieser Unterschied wurde als nicht signifikant beschrieben. Auch eine Neutropenie konnte bei 0,1 % der Prüfungsteilnehmer dieser Studie beobachtet werden. In beiden Studien erwies sich CHIKV Δ5nsP3 ebenfalls als sehr immunogen. Es kam bei 99,2 % bzw. 97,5 % der Prüfungsteilnehmer zu einer Serokonversion [10].

In einer Studie an Stechmücken konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung des Impfvirus von immunisierten Menschen auf Stechmücken und im Anschluss zurück auf den Menschen sehr unwahrscheinlich ist. Stechmücken der Spezies *Aedes albopictus* erhielten dazu Blutmahlzeiten mit verschiedenen Titern von CHIKV Δ5nsP3. Für eine Übertragung von Stechmücken auf einen anderen Wirt muss in den Speicheldrüsen der Stechmücken ein Titer von 7,1 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/mL erreicht werden. Ein entsprechend hoher Titer in den Speicheldrüsen wurde erst ab einem Titer von ≥ 3,875 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/mL in der Blutmahlzeit erreicht. Die Prüfungsteilnehmer der klinischen Studien wiesen einen Maximal-Titer von $8{,}9 \times 10^4$ *genome copy equivalents* auf, was in etwa 2,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/mL entspricht. Der Titer im Blut der mit CHIKV Δ5nsP3 geimpften Prüfungsteilnehmer war somit deutlich niedriger als der minimale Titer, der für eine Übertragung über eine Blutmahlzeit nötig ist [3].

CHIKV Δ5nsP3 wurde sowohl in Österreich als auch in Brasilien bereits in die Risikogruppe 1 eingestuft [11, 12].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird das rekombinante *Chikungunya virus* Δ5nsP3 der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Das rekombinante Chikungunyavirus Δ5nsP3 ist im Gegensatz zum Wildtypvirus aufgrund einer Deletion im *nsP3*-Gen stark attenuiert. Das Virus bleibt für bis zu 20 Passagen in der Zellkultur genetisch stabil und es ist nicht davon auszugehen, dass es zu einer Reversion der Deletion kommt. CHIKV Δ5nsP3 rief in präklinischen Studien an Mäusen, Affen und Kaninchen keine Infektion hervor und schützte die immunisierten Tiere vor einer *challenge*-Infektion mit dem Wildtypvirus. In klinischen Studien wurde CHIKV Δ5nsP3 bereits an 3614 erwachsene Personen verabreicht. Das Virus wurde als sicher eingestuft und war gut verträglich.

BVL_FO_05_4100_402_V1.8

Literatur

1. **Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M** (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* **7**(5): 319-27.
2. **Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT** (2012). Chikungunya virus ans prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines* **11**(9): 1087-1101.
3. **Valneva Austria GmbH** (2020). VLA1553 Chikungunya Vaccine. Modul 1.6.2 Introduction. Environmental Risk Assessment, technical and scientific information on the GMO.

4. **Galbraith SE, Sheahan BJ, Atkins GJ** (2006). Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *J Gen Virol* **87**: 937-47.
5. **Gardner CL, Hritz J, Sun C, Vanlandingham DL, Song TY, Ghedin E *et al.*** (2014). Deliberate attenuation of chikungunya virus by adaptation to heparan sulfate-dependent infectivity: a model for rational arboviral vaccine design. *PLoS Nelg Trop Dis* **8**(2): e2719.
6. **Silva LA, Khomandiak S, Ashbrook AW, Weller R, Heise MT, Morrison TE, Dermody TS** (2014). A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. *J Virol* **88**(5): 2385-97.
7. **Hallengärd D, Kakoulidou M, Lulla A, Kümmerer BM, Johansson DX, Mutso M *et al.*** (2014). Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. *J Virol* **88**(5). 2858-66.
8. **Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse, L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N *et al.*** (2017). Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight* **2**(6). e83527.
9. **Wressnigg N, Hochreiter R, Zoihsl O, Fritzer A, Bézay N, Klingler A *et al.*** (2020). Single-shot live-attenuated chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **20**(10): 1193-1203.
10. **Valneva Austria GmbH** (2022). Investigator·s Brochure VLA1553. 8. Effects in Humans – Adult Population.
11. **Brazilian Technical Commission on Biosafety (CTNBio)** (2021). Technical Opinion No. 1495/2021/SEI-CTNBio.
12. **Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz Österreich** (2022). Bestätigung Bundesministerium.