

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des
chimären synthetischen Pferdepockenvirus TNX-801
als Spender- und Empfängerorganismus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Das Pferdepockenvirus (Horsepox virus, HSPV) aus der Familie *Poxviridae*, Gattung *Orthopoxvirus* ist ein umhülltes Virus. Das Genom aus doppelsträngiger DNA umfasst 212 Kilobasenpaare und 236 offene Leserahmen.

Die erste und bislang einzige molekularbiologische Untersuchung erfolgte an dem Isolat MNR-76, welches 1976 in der Mongolei von Pferden isoliert wurde, die an pustulärer Stomatitis mit Läsionen an Euter und Ohren erkrankt waren, mit schweren bis tödlichen Krankheitsverläufen in Fohlen und Stuten [1].

Phylogenetisch gehört HSPV zur Untergruppe der *Vaccinia-Virus (VACV)-like viruses* und hat mit VACV einen gemeinsamen Vorfahren. Das Genom von HSPV umfasst intakte Gene mit Homologie zu VACV-Genen, sowie intakte Gene und Genfragmente, die nicht im VACV-Genom, aber im Genom anderer Orthopoxviren vorkommen, wie z. B. das *Orthopoxvirus cowpox*-Homolog *Brighton Red CrmB TNFR II-like protein* [1].

Während HSPV-Infektionen vor dem 20. Jahrhundert bei Pferden häufig waren, gilt das Virus heute als selten bzw. ausgestorben [1]. Beschriebene klinische Formen der Pferdepocken sind infektiöse pustuläre Stomatitis (gutartige lokale Form mit Läsionen im Maul), equine papuläre Stomatitis (generalisiert und hoch infektiös) und exudative Dermatitis der Fesseln [1].

2018 wurde auf Basis der Sequenz des Isolats HSPV MNR-76 (GenBank DQ792504) ein synthetisches, chimäres Pferdepockenvirusgenom mit *VACV-hairpins* hergestellt, TNX-801. Die Herstellung erfolgte mittels acht überlappender DNA-Fragmente und zwei Fragmenten mit *hairpins* von VACV, da die *hairpins* von HSPV nicht sequenziert sind. Es wurden stille Mutationen eingefügt, um einerseits zwei Restriktionsstellen zu eliminieren, damit HSPV von anderen Orthopoxviren unterschieden werden kann. Andererseits wurden durch weitere stille Mutationen zwei neue Restriktionsstellen eingebracht. Zunächst wurde ein synthetisches Pferdepockenvirus mit einem Fusionsprodukt aus gelbfluoreszierendem Protein (YFP) und einer Guaninphosphoribosyltransferase (gpt) aus *Escherichia coli* [2] im Thymidinkinase-Lokus hergestellt (TNX-801 YFP-gpt::095). Dazu wurden *Shope fibroma virus*-infizierte BGMK-Zellen transfiziert und zur Bildung von Plaques auf die etablierte Nierenzelllinie BSC-40 aus dem

Affen *Cercopithecus aethiops* ausplattiert. Anschließend wurde mittels homologer Rekombination mit dem HSPV Thymidinkinasegen das YFP-gpt-Konstrukt deletiert und TNX-801 gebildet [3].

TNX-801 und TNX-801 YFP-gpt::095 bilden kleinere Plaques als VACV. Mit TNX-801 intranasal inokulierte Mäuse zeigen keine Krankheitssymptome und bilden VACV-kreuzreaktive Antikörper. Bei einer Folgeinfektion mit VACV entwickeln die Mäuse keine oder leichte Krankheitssymptome [3].

TNX-801 repliziert in humanen dermalen Zellen (Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten) und Zellen des Atemtraktes (Epithelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen) mit einem leicht niedrigeren bzw. vergleichbaren Titer wie VACV-Stämme (VACV-WR, IHD, Lis und NYC), während das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) keine Replikation aufweist. TNX-801 ist stärker attenuiert als frühere auf VACV basierende Impfstoffe (VACV-WR, IHD, Lis und NYC), weniger virulent als VACV in Mäusen mit geschwächtem Immunsystem und führt zu keiner klinischen Erkrankung, Veränderung der Körpertemperatur oder Gewicht in Mäusen [4].

Die Inokulation mit TNX-801 Lebendimpfstoff von nicht-humanen Primaten verläuft ohne klinische Erkrankungen, Gewichtsverlust sowie Virämie und *shedding*. Die Infektion löst eine robuste humorale Antwort mit neutralisierenden Antikörpern aus und schützt vor einer schweren Erkrankung durch Affenpocken [5].

Gentechnische Arbeiten mit rekombinanten Vacciniaviren sind der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet (Az. 6790-10-04, aktualisiert 2014). Das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) wurde durch vielfache Passagierung attenuiert und ist für den Menschen und verschiedenste Tiere avirulent. MVA wurde von der ZKBS der Risikogruppe 1 zugeordnet (Allgemeine Stellungnahme der ZKBS, Vaccinia MVA, Az. 6790-10-74, aktualisiert 2018). Entsprechend wurden gentechnische Arbeiten mit MVA, die heterologe Gene enthalten, die weder den Replikationsdefekt von MVA komplementieren noch das Wirtsspektrum verändern oder das Gefährdungspotential von MVA erhöhen, der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet.

In der TRBA 462 „Einstufung von Viren und TSE-Agenten in Risikogruppen“ ist HSPV als „Variante/Synonym/englische Bezeichnung“ der Spezies Vacciniavirus in die Risikogruppe 2 eingestuft und mit dem Hinweis „09“ gekennzeichnet¹ [6].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird das chimäre synthetische Pferdepockenvirus TNX-801 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Das chimäre synthetische Pferdepockenvirus TNX-801 basiert auf Nukleotidsequenzen eines für Pferde stark pathogenen Virusisolats und wurde ohne gezielte Mutationen zur Attenuierung hergestellt. Im Vergleich zu VACV-Stämmen zeigt TNX-801 bei Experimenten an Mäusen und

¹ 09: Besitzen ein breites Wirtsspektrum und können zum Teil auf viele Säugetierarten übertragen werden.

nicht-humanen Primaten, einschließlich immunsupprimierten Mäusen, eine geringe Virulenz, die Replikation in humanen Zelllinien ist ähnlich hoch.

Literatur

1. **Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL** (2006). Genome of horsepox virus. *J Virol* **80**(18):9244–58.
2. **Isaacs SN, Kotwal GJ, Moss B** (1990). Reverse guanine phosphoribosyltransferase selection of recombinant vaccinia viruses. *Virology* **178**(2):626–30.
3. **Noyce RS, Lederman S, Evans DH** (2018). Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One* **13**(1):e0188453.
4. **Trefry SV, Raney CN, Cregger AL, Gonzales CA, Layton BL, Enamorado RN, Martinez NA, Gohegan DS, Moulaei T, Ziolkowska NE, Goebel SJ, Lederman S, Bavari S, Nasar F**. Recombinant chimeric Horsepox Virus (TNX-801) is attenuated relative to Vaccinia Virus Strains in Human Primary Cell Lines and in Immunocompromised Mice. bioRxiv. doi:10.1101/2023.10.25.564033.
5. **Noyce RS, Westfall LW, Fogarty S, Gilbert K, Mpanju O, Stillwell H, Esparza J, Daugherty B, Koide F, Evans DH, Lederman S** (2023). Single Dose of Recombinant Chimeric Horsepox Virus (TNX-801) Vaccination Protects Macaques from Lethal Monkeypox Challenge. *Viruses* **15**(2).
6. **Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe** (2024). TRBA 462 Einstufung von Viren und TSE-Agenzien in Risikogruppen. <https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/TRBA-462>. Besucht am 02.08.2024.