

Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung rekombinanter Rabies- und Vesikuläre-Stomatitis-Viren

1. Einführung

Die Familie der *Rhabdoviridae* (Ordnung *Mononegavirales*) umfasst Viren mit breitem Wirtsspektrum, die z. T. ernsthafte Erkrankungen bei Menschen und Tieren hervorrufen können. Die Prototypen der Rhabdoviren sind das *Indiana vesiculovirus* (VSV; früher: Vesicular stomatitis indiana virus, Vesicular stomatitis virus) aus der Gattung *Vesiculovirus* und das *Rabies lyssavirus* (RABV) aus der Gattung *Lyssavirus* [1].

Rhabdoviren besitzen ein unsegmentiertes, einzelsträngiges und negativ orientiertes RNA-Genom mit einer Gesamtlänge von ca. 12 kb, das folgendermaßen aufgebaut ist: 3' – *leader* – Nukleoprotein (N) – Phosphoprotein (P) – Matrixprotein (M) – Glykoprotein (G) – große Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L) – *trailer* – 5'. Die Replikation der Rhabdoviren findet vollständig im Zytoplasma der Wirtszelle statt [1].

VSV infiziert Pferde, Rinder, Schweine und eine Vielzahl weiterer Säugetiere, darunter auch den Menschen [1; 2]. Die Symptome bei Tieren umfassen Ulzerationen an den Schleimhäuten des Mauls, am Euter und am Koronarband der Hufe und ähneln bei Rindern stark der Maul- und Klauenseuche. VSV-Ausbrüche in Viehzuchten führen zu einer verringerten Produktion und signifikanten wirtschaftlichen Einbußen. Die Erkrankung klingt meistens innerhalb von zwei Wochen ab. Eine medikamentöse Therapie existiert nicht. Die Eindämmung basiert auf Hygiene- und Quarantänemaßnahmen. Humane VSV-Infektionen verlaufen zumeist asymptomatisch, gelegentlich kommt es zu leichten, Grippe-ähnlichen Symptomen und selten zu Mundbläschen und geschwollenen Lymphknoten.

Bei Ausbrüchen verbreitet sich VSV schnell durch den direkten Kontakt der Tiere untereinander, beispielsweise über Speichel und Haut- bzw. Schleimhautverletzungen. Aber auch Insekten spielen eine signifikante Rolle bei der Übertragung, die derzeit noch genauer untersucht wird [3].

Da das Glykoprotein von VSV sowohl einen breiten Wirtsbereich als auch einen breiten Zelltropismus vermittelt, nimmt VSV eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie ein, beispielsweise in Impfvektoren, für die Übertragung genetischen Materials in Zellen oder als Antitumor-Agens.

Gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV ist VSV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

RABV ist weltweit verbreitet und zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. So können neben Hunden und Füchsen auch Marderhunde, Stinktiere und Fledermäuse infiziert werden. Die Übertragung von RABV erfolgt in der Regel über Bissverletzungen, da im Speichel infizierter Tiere hohe Viruskonzentrationen vorliegen [4]. Aber auch kleinste Verletzungen der Haut oder Schleimhäute können ein Eindringen des Virus per Kontaktinfektion ermöglichen. Darüber hinaus sind Einzelfälle dokumentiert, bei denen eine Luftübertragung des Virus als Infektionsroute angenommen wird, da die Patienten vor der Erkrankung hohen Konzentrationen an aerosolisiertem Virus ausgesetzt waren [5]. RABV repliziert in den

Speicheldrüsen und im zentralen Nervensystem (ZNS) infizierter Menschen und Tiere und löst bei ihnen Tollwut aus. Diese geht mit einer akuten Enzephalitis einher, die selbst bei intensivmedizinischer Betreuung fast ausnahmslos tödlich endet [6].

Weitere Vertreter des Genus *Lyssavirus* sind das *Lagos bat lyssavirus* (LBV), *Mokola lyssavirus* (MOKV), *Duvenhage lyssavirus* (DUVV), *European bat 1 lyssavirus* (EBLV-1), *European bat 2 lyssavirus* (EBLV-2) und das *Australian bat lyssavirus* (ABLV). Mit Ausnahme von MOKV zirkulieren all diese Viren in Fledermäusen und lösen bei Mensch und Tier ebenfalls eine Tollwut-ähnliche neurologische Erkrankung aus.

Zur aktiven Immunisierung von Mensch und Tier stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung. Diese verleihen jedoch keinen Schutz gegen eine Infektion mit LBV oder MOKV [7, 8]. Mit den für die Anwendung am Menschen zugelassenen Impfstoffen kann auch eine Postexpositionsprophylaxe durchgeführt werden, die eine hohe Schutzwirkung aufweist, wenn sie unverzüglich nach der Exposition verabreicht wird [9]. Eine Therapie mit wissenschaftlich nachgewiesener Wirksamkeit steht nicht zur Verfügung.

Gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV sind RABV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2 und ABLV als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 3**** zugeordnet. LBV und MOKV sind der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

2. Einstufung replikationsdefizienter VSV und Lyssaviren

Replikationsdefiziente Lyssaviren werden beispielsweise zur Erforschung neuronaler Netzwerke oder zur Entwicklung von Impfstoffvektoren eingesetzt. Replikationsdefiziente VSV sind ebenfalls für die Forschung, als Impfstoffvektoren oder Vektoren der Tumorthherapie von Bedeutung [2].

Im Genom dieser Viren ist ein essenzielles Gen (wie z. B. das Gen für das Glykoprotein G) deletiert; dafür wird in der Regel ein Transgen inseriert, wie z. B. ein Reporter-gen oder ein Gen für ein heterologes, immunogenes Protein. Die Herstellung der Viruspartikel erfolgt auf komplementierenden Zelllinien. Die entstehenden Partikel sind infektiös, aber replikationsdefizient. Das Genom der defekten Viruspartikel wird im Zytoplasma der transduzierten Wirtszelle amplifiziert, und das Transgen wird exprimiert. Es erfolgt keine Integration in das Genom der Wirtszelle, und es werden keine neuen Viruspartikel gebildet. Sofern das übertragene Transgen kein eigenes Gefährdungspotenzial besitzt oder den Replikationsdefekt komplementiert, ist trotz der Amplifikationsfähigkeit des Genoms kein Gefährdungspotenzial im Falle einer akzidentellen Infektion zu erwarten. Daher hat die ZKBS rekombinante, replikationsdefiziente Lyssaviren (Az. 6790-01-1562 vom März 2007 und Az. 6790-01-1631 vom Juli 2009) und auch replikationsdefiziente, ggf. rekombinante VSV (Az. 45110.1894 vom Dezember 2015 und Az. 45110.1911 vom Juli 2016) der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Besitzt das übertragene Transgen ein eigenes Gefährdungspotenzial oder kann es möglicherweise den Replikationsdefekt komplementieren, so ist für Lyssaviren immer, und für VSV sofern keine Vergleichbarkeit mit vorherigen Arbeiten besteht, eine Einzelfallbewertung der gentechnischen Arbeiten durch die ZKBS erforderlich.

3. Einstufung des RABV-Stammes SAD B19 und davon abgeleiteter rekombinanter Rabiesviren

SAD B19 ist ein attenuierter RABV-Stamm, der durch *in vivo*- und *in vitro*-Passagierung eines 1935 in Nordamerika aus einem Hund gewonnenen Isolats hergestellt wurde [10, 11]. Er ist in Deutschland unter dem Namen FuchSORAL® zur Immunisierung von wildlebenden Füchsen zugelassen. Es wird davon ausgegangen, dass die Attenuierung vor allem auf Mutationen im Gen für das Glykoprotein G beruht [12]. SAD B19 besitzt unter experimentellen Bedingungen eine Restpathogenität für Nagetiere [13]. Im Rahmen der Postvakzinierungsüberwachung wurden zudem vereinzelt SAD B19-assoziierte Tollwutfälle bei Füchsen beschrieben (3 Fälle

nach Verteilung von ca. 97 Mio Impfködern) [11]. Obwohl sich der Impfstamm auch für Primaten als ungefährlich erwies [15, 16], kann ein Restrisiko für den Menschen nicht ausgeschlossen werden. Gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV ist der RABV-Stamm SAD B19 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Die Weltgesundheitsorganisation und die Ständige Impfkommision des Robert Koch-Instituts empfehlen die Durchführung einer Postexpositionsprophylaxe für den Fall eines akzidentellen Kontakts mit dem Impfvirus ab Expositionsgrad II (Kontakt der Impfflüssigkeit eines beschädigten Impfstoffköders mit nicht intakter Haut).

Das rekombinante Rabiesvirus **ORA DPC** leitet sich vom RABV-Stamm SAD L16 ab, welcher ein cDNA-Klon von SAD B19 ist [17]. Zur Herstellung von ORA DPC wurden im Genom von SAD L16 drei gentechnische Veränderungen vorgenommen. Im Gen für das Glykoprotein G wurde eine Mutation eingeführt, die zu dem Aminosäureaustausch Arg333→Asp333 führt. Bereits dieser Aminosäureaustausch resultiert in einer weiteren Attenuierung von SAD L16 [18]. Im Gen für das Phosphoprotein P wurden zudem die Kodons für die Aminosäuren 143 - 149 deletiert. Dieser Teil des P-Proteins umfasst ein Motiv zur Interaktion mit dem zellulären Protein *dynein light chain* LC8, welches möglicherweise am retrograden Transport von RABV zum ZNS beteiligt ist [19]. Zusätzlich wurde das Gen für das Glykoprotein G vom RABV-Wildtypstamm CVS inseriert. Auch dieses Gen wurde so modifiziert, dass das resultierende Glykoprotein den Aminosäureaustausch Arg333→Asp333 aufweist. ORA DPC ist genetisch stabil und apathogen für immunsupprimierte Mäuse und Hunde. Das Restrisiko für den Menschen im Falle eines akzidentellen Kontakts mit dem Virus kann jedoch nicht abgeschätzt werden. Die ZKBS hat das rekombinante Rabiesvirus ORA DPC somit der **Risikogruppe 2** zugeordnet (Az. 45110.1774 vom März 2013).

Das **rekombinante Rabiesvirus SPBN GASGAS** leitet sich vom RABV-Stamm SPBN ab, welcher wiederum ein Derivat des Impfstammes SAD B19 ist. SPBN unterscheidet sich von SAD B19 durch die Deletion des Pseudogens ψ und die Einführung von vier Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Bei der Konstruktion von SPBN GASGAS wurde das Gen für das Glykoprotein G gegen das entsprechende Gen des SAD B19-Derivats SN10-333 ausgetauscht. Das G-Protein von SN10-333 enthält den Aminosäureaustausch Arg333→Glu333, auf dem die Attenuierung dieses Stammes beruht. In das Gen wurde darüber hinaus eine zweite Mutation eingeführt, die zu dem Aminosäureaustausch Asn194→Ser194 führt und die Mutation an Position 333 stabilisiert [20]. Das so veränderte Glykoprotein wurde dupliziert. Durch die Duplikation des Gens ist die Wahrscheinlichkeit einer *reversion to pathogenicity* reduziert, da die attenuierte Variante des Glykoproteins phänotypisch dominant ist [21]. Auch konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Rabiesvirus genetisch stabil ist. SPBN GASGAS ist unter natürlichen Bedingungen der (Impfstoff-)aufnahme apathogen für immunkompetente Ziel- und Nichtzieltiere einschließlich nicht-humaner Primaten. Da, nach oraler Verabreichung an betäubte Mäuse diese jedoch vereinzelt an Tollwut erkrankten, entschied die ZKBS im Jahr 2016, SPBN GASGAS vorerst in der Risikogruppe 2 zu belassen (Az. 45242.0129 vom Oktober 2016). Ende 2017 wurden mit einem Antrag auf eine Impfstoff-Zulassung für wildlebende Füchse umfangreiche, weitere Daten zur Sicherheit von SPBN GASGAS bei der *European Medicines Agency* (EMA) eingereicht. Auf Empfehlung der EMA erfolgte diese durch Beschluss der Europäischen Kommission und SPBN GASGAS wurde in Europa unter dem Namen Rabitec zugelassen. Unter der Voraussetzung, dass die im Antrag beschriebenen Herstellungsbedingungen eingehalten werden (Anzahl der Passagierungen, verwendete Zellkulturen für die Virusvermehrung), wird der *Rabies virus*-Impfstamm SPBN GASGAS gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. den Kriterien des Anhangs I GenTSV als gentechnisch veränderter Organismus in die **Risikogruppe 1** herabgestuft.

4. Literatur

1. **Asmi et al.** (2018). Rhabdoviruses, antiviral defense, and SUMO pathway. *Viruses* **10**(686); doi:10.3390/v10120686.

2. **Bishnoie et al.** (2018). Oncotargeting by Vesicular stomatitis virus (VSV): advances in cancer therapy. *Viruses* **10**(90); doi:10.3390/v10020090.
3. **Roza-Lopez et al.** (2018). Vesicular stomatitis virus transmission: a comparison of incriminated vectors. *Insects* **9**(190); doi:10.3390/insects9040190.
4. **Trimarchi CV, Briggs DJ** (1999). The diagnosis of rabies, *RABIES: Guidelines for Medical Professionals*, Veterinary Learning Systems: pp. 55-66.
5. **Johnson N, Phillipotts R, Fooks AR** (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *J Med Microbiol* **55**:785-790.
6. **Rupprecht C, Kuzmin I, Meslin F** (2017). Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* **6**(F1000 Faculty Rev):184.
7. **Fekadu M, Shaddock JH, Sanderlin DW, Smith JS** (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies and rabies-related viruses. *Vaccine* **6**(6):533-539.
8. **Kgaladi J, Wright N, Coertse J, Markotter W, Marston D, Fooks AR, Freuling CM, Müller TF, Sabeta CT, Nel LH** (2013). Diversity and epidemiology of Mokola virus. *PLoS Negl Trop Dis* **7**(10): e2511.
9. **Robert Koch-Institut** (2018). RKI-Ratgeber Tollwut. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tollwut.html
10. **Blancou J, Meslin F-X** (1996). Modified live-virus rabies vaccines for oral immunization of carnivores. In: Laboratory techniques in rabies, 4th Edition (Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds.), World Health Organization, Geneva, Switzerland.
11. **Müller TF, Schröder R, Wysocki P, Mettenleiter TC, Freuling CM** (2015). Spatio-temporal use of oral rabies vaccines in fox rabies elimination programmes in Europe. *PLoS Negl Trop Dis* **9**(8):e0003953.
12. **Conzelmann K, Cox JH, Schneider LG, Thiel H** (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* **175**:485-499.
13. **Vos A, Neubert A, Aylan O, Schuster P, Pommerening E, Müller T, Chivatsi DC** (1999). An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species. *Epidemiol Infect* **123**:165-175.
14. **Müller T, Bätza HJ, Beckert A, Bunzenthal C, Cox JH, Freuling CM, Fooks AR, Frost J, Geue L, Hoeflechner A, Marston D, Neubert A, Neubert L, Revilla-Fernández S, Vanek E, Vos A, Wodak E, Zimmer K, Mettenleiter TC** (2009). Analysis of Vaccine virus associated rabies cases in wildlife after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch Virol* **154**(7):1081-1091.
15. **World Health Organization** (1993). Report of the fourth WHO Consultation on oral immunization of dogs against rabies. WHO/Rab.Res/93.42. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
16. **World Health Organization** (2012). WHO Expert Consultation on Rabies, 2nd report. WHO Technical Report Series. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
17. **Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK** (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* **13**(18): 4195-4203.
18. **Tuffereau C, Leblois H, Benejean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A** (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* **172**(1):206-212.
19. **Mebatsion T** (2001). Extensive attenuation of rabies virus by simultaneously modifying the dynein light chain binding site in the P protein and replacing Arg333 in the G protein. *J Virol* **75**(23):11496-11502.
20. **Faber M, Faber ML, Papaneri A, Bette M, Weihe E, Dietzschold B, Schnell MJ** (2005). A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J Virol*. **79**:14141-14148.

21. **Faber M, Faber ML, Li J, Preuss MA, Schnell MJ, Dietzschold B** (2007). Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J Virol* **81**:7041-7047.