ZKBS
Zentrale Kommission
für die Biologische Sicherheit

Az. 45310.0115 Aktualisierte Version vom Juli 2020

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von rekombinanten Masern-Impfstämmen

1. Einführung

Das **Masernvirus** (MeV) ist ein behülltes Negativstrang-RNA-Virus (Genom ~ 16 kb) der Gattung *Morbillivirus* innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* (Übersicht in [1] und [2]). Das Virus verbreitet sich über Aerosole und ist mit einem Kontagionsindex von ~ 95 % hoch ansteckend. Menschen sind der einzige bekannte natürliche Wirt. Die Viren replizieren lytisch im Zytoplasma und breiten sich ausgehend vom Respirationstrakt auf verschiedenste Organe aus. Die Infektion führt zu Fieber, Erkältungssymptomen sowie generalisiertem makulapapulösem Ausschlag und geht mit einer über Monate anhaltenden Beeinträchtigung der Gedächtnis-B- und -T-Zellen einher, wodurch Sekundärinfektionen begünstigt werden. Es kann zu ernsthaften Komplikationen und Todesfällen kommen. Eine seltene, aber tödliche Langzeitfolge ist die subakute sklerosierende Panenzephalitis. Nach ausgeheilter Infektion besteht eine lebenslange Immunität. Gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV ist MeV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Vom Masernvirus abgeleitete Impfstämme gehören zu den sichersten und effektivsten Impfstoffen weltweit (Übersicht in [3]). Sie sind attenuiert und rufen eine starke Immunantwort hervor. Darüber hinaus infizieren sie selektiv verschiedenste Tumorzellen. Dies und die Tatsache, dass Fremdgene von bis zu 6 kb problemlos inseriert und exprimiert werden können [4], macht diese Viren zu attraktiven Kandidaten für rekombinante Impfstoffe gegen verschiedene Virusinfektionen und für die onkolytische Virotherapie.

Die Attenuierung ist das Ergebnis der Adaptation an nicht-permissive Zellkulturen, insbesondere Vogelzelllinien (Übersicht in [3] und [5]). Ein Teil der Impfstämme stammt von MeV-Wildtyp-Isolaten ab, die voneinander unabhängig in Russland (Leningrad-4), Japan (CAM-70) und China (Shanghai-191) isoliert wurden. Andere Impfstämme leiten sich vom MeV-Stamm **Edmonston** ab [5]. Dieser wurde 1954 aus einem Kind mit Masern isoliert, auf humanen Nieren-Primärzellen propagiert und anschließend an verschiedene Zellkulturen adaptiert, wodurch die attenuierten Edmonston-*seed*-Stämme A und B entstanden [6; 7]. Durch weitere Passagen bei reduzierter Temperatur auf *chicken embryo fibroblasts* (CEF) entstanden daraus die folgenden attenuierten Stämme:

(1) Der MeV-Stamm **Edmonston B**, dessen Genomsequenz sich in 36 Nukleotiden von der des MeV-Isolats Edmonston unterscheidet. Er wurde 1963 unter dem Namen Rubeovax® in den USA als Impfstoff zugelassen [8].

(2) Die MeV-Stämme **Schwarz** und **Moraten**, deren Genomsequenzen identisch sind, obwohl sie durch divergente Passage, ausgehend vom Edmonston-*seed*-Stamm A bzw. B, entstanden [5]. Sie unterscheiden sich in 42 Nukleotiden vom MeV-Stamm Edmonston und in 16 Nukleotiden vom Stamm Edmonston B. Beide Stämme wurden in den 70er Jahren zugelassen und werden bis heute für die Impfung verwendet.

Wie auch der Wildtyp nutzen diese attenuierten Stämme für den Eintritt in die Wirtszelle den Rezeptor CD150, der sich hauptsächlich auf Immunzellen befindet, sowie Nectin 4. Sie haben aber zusätzlich die Fähigkeit erworben, auch den *complement regulator* CD46 zu nutzen. Nectin 4 und CD46 befinden sich vermehrt auf Tumorzellen, die somit bevorzugt infiziert und zerstört

BVL_FO_05_4100_402_V1.1

werden [9]. Durch weitere Passagen wurden außerdem folgende Impfstämme generiert: Der Stamm Edmonston-Zagreb [10], welcher der meistgenutzte Masern-Impfstamm im Rahmen des *Expanded Programm on Immunization* der WHO ist und dessen Genomsequenz sich in 33 Nukleotiden von der des MeV-Stamms Edmonston unterscheidet, sowie die Stämme AIK-C [11] und MVbv [12].

Die Genomsequenzen der stark attenuierten MeV-Impfstämme unterscheiden sich demnach an mindestens 33 Nukleotidpositionen von der des Wildtyp-MeV [5]. Dabei sind die Mutationen über das gesamte Genom verteilt. Die molekulare Ursache der Attenuierung ist bislang ungeklärt; es scheinen jedoch Mutationen in nahezu allen Genen kumulativ zum attenuierten Phänotyp beizutragen (Übersicht in [5]). Die Impfstämme werden seit Jahrzehnten weltweit als gut verträgliche Standardimpfung für immunkompetente Personen eingesetzt [2]. Entsprechend der ZKBS-Stellungnahme zu „Arbeiten mit animalen Viren der Risikogruppe 1“ aus dem Jahr 2011 (Az. 6790-05-02-0075) können amtlich zugelassene, vermehrungsfähige **MeV-Impfstämme** gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV in Verbindung mit den Kriterien des Anhangs I GenTSV als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft werden, sofern nicht mehr als die von der Zulassungsstelle zugelassenen Passagen erfolgen und keine anderen als die bei der Impfstoffherstellung verwendeten Zellkulturen oder Wirtssysteme zur Vermehrung eingesetzt werden.

Rekombinante Impfstämme des MeV werden mithilfe reverser Genetik generiert [13]. Hierfür werden heterologe Gene (z. B. kodierend für ein virales Struktur- oder Glykoprotein) als zusätzliche Leserahmen in das MeV-Genom eingebracht. Es wurde gezeigt, dass Masernviren über mehr als 12 Passagen stabil Fremdgene exprimieren [3]. Zahlreiche rekombinante MeV werden derzeit als onkolytische Masernviren gegen verschiedenste Tumore oder als Impfstämme gegen verschiedene virale Infektionen (z. B. *Human immunodeficiency virus 1* [14; 15] und *Chikungunya virus* [16; 17]) in (prä-)klinischen Studien getestet (Übersicht in [3]). Sie basieren meist auf den MeV-Stämmen Edmonston B und Schwarz. Insgesamt belegen die bisher verfügbaren Daten die gute Verträglichkeit und Sicherheit der rekombinanten Impfstämme.

2. Bewertung rekombinanter Masern-Impfstämme, die heterologe Antigene exprimieren

Zelltropismus

Es ist nicht von einer Erweiterung des Zelltropismus auszugehen, wenn ein fremdes Glykoprotein zusätzlich in die Hülle der MeV-Partikel eingebaut wird, da das Hämagglutinin der MeV-Impfstämme u. a. an den CD46-Rezeptor bindet und so eine Infektion vermittelt. Dieser wird mit Ausnahme von Erythrozyten auf allen humanen Zellen exprimiert.

Wirtsbereich

MeV besitzt einen sehr engen Wirtsbereich, welcher unter natürlichen Bedingungen auf den Menschen beschränkt ist. Experimentell kann auch eine Infektion von nicht-humanen Primaten über natürliche Übertragungswege erreicht werden. Prinzipiell ist es möglich, dass die zusätzliche Expression eines fremden Hüllproteins zu einer Erweiterung des Wirtsbereiches der rekombinanten MeV-Partikel führt. Der Wirtsbereich wird jedoch nicht nur durch die viralen Hüllproteine bestimmt, sondern es spielen darüber hinaus zelluläre Faktoren eine wichtige Rolle (z. B. bestimmte Wirtsfaktoren, die für die Replikation essenziell sind). Eine Erweiterung des Wirtsbereichs kann oftmals nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Genetische Stabilität

MeV gehört zu den Viren mit einem RNA-Genom, dessen Mutationsrate während der Replikation im Vergleich zu DNA-Genomen höher ist. Verglichen mit anderen RNA-Viren ist MeV jedoch genetisch sehr stabil [18], auch nach wiederholter Replikation eines MeV-Impfstammes im Menschen [19]. Bis heute sind keine Reversionen zur pathogenen Form

BVL_FO_05_4100_402_V1.1

beschrieben [3; 20], und es gibt keinen Beleg für Rekombinationsereignisse zwischen MeV-Wildtyp- und -Impfstämmen in Personen, die mit beiden Stämmen koinfiziert waren [9].

shedding
Bezüglich des *sheddings* von MeV-Impfstämmen liegen nur wenige Daten vor (Übersicht in [2] und [21]). Es ist nicht auszuschließen, dass die rekombinanten MeV-Partikel von Versuchstieren oder Menschen abgegeben werden. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bei den zugelassenen Impfstämmen bisher nicht beobachtet [3; 22].

Wirkung auf den bestehenden Impfschutz
Es ist davon auszugehen, dass ein bestehender MeV-Impfschutz auch gegen die rekombinanten Viruspartikel wirksam wäre. Da die eingebrachten Fremd-Antigene zusätzlich zu den paramyxoviralen Proteinen exprimiert werden, liegen neben den fremden Glykoproteinen immer noch die Glykoproteine (Hämagglutinin und das Fusionsprotein) der MeV auf der Virusoberfläche vor. Diese induzieren sowohl eine zelluläre als auch eine Antikörper-vermittelte Immunität gegen MeV. Es ist daher davon auszugehen, dass MeV-spezifische Antikörper auch rekombinante MeV-Partikel mit heterologen Glykoproteinen in der Virushülle genauso effektiv neutralisieren wie wildtypische MeV-Partikel.

3. Empfehlung

Werden bei gentechnischen Arbeiten mit zugelassenen Masernimpfstämmen der **Risikogruppe 1** die amtlich geprüften und zugelassenen Bedingungen der Impfstoffproduktion erfüllt, so können die Arbeiten der **Sicherheitsstufe 1** zugeordnet werden.

Wird von den Bedingungen der Impfstoffproduktion abgewichen, so werden die gentechnischen Arbeiten mindestens der **Sicherheitsstufe 2** zugeordnet. Zu den Abweichungen zählen die Verwendung anderer Zellkulturbedingungen, wie z. B. die Vermehrung der Viren in einem anderen Zellkultursystem oder eine veränderte Passagenanzahl oder Veränderungen am Genom durch z. B. Einbringen von Mutationen oder Insertionen. Dies kann auch das Einbringen eines Reportergens sein.

Die Einstufung der rekombinanten MeV in die **Risikogruppe 2** kann entsprechend §12 Abs. 4 GenTG grundsätzlich im Rahmen der Vergleichbarkeit erfolgen. Dies gilt jedoch nicht, sofern der eingebrachte Nukleinsäureabschnitt eines der folgenden Kriterien erfüllt:

- er besitzt ein eigenständiges Gefährdungspotenzial, kodiert also beispielsweise für ein Toxin oder Prion,
- er lässt eine Abschwächung der Attenuierung der rekombinanten MeV erwarten oder
- er besitzt immunmodulatorische Eigenschaften.

Ist eines oder mehrere dieser Kriterien erfüllt und liegen keine experimentellen Daten vor, die belegen, dass der eingebrachte Nukleinsäureabschnitt nicht zu einer Erhöhung des Gefährdungspotenzials führt, so muss eine Risikobewertung durch die ZKBS im Einzelfall erfolgen.

Werden Daten zu einer Attenuierung der rekombinanten MeV vorgelegt, die insbesondere auch die Stabilität betreffen, kann eine Herabstufung in **Risikogruppe 1** erfolgen.

BVL_FO_05_4100_402_V1.1

Hinweise

Es wird auf folgende Stellungnahmen der ZKBS hingewiesen:

- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten, bei denen Gene für immunmodulierende Proteine in das Genom replikationskompetenter Mikroorganismen integriert werden (Az. 6790-03-05; Aktualisierung vom April 2019),

- Hinweise der ZKBS zum Umgang mit animalen Viren der Risikogruppe 1 bei gentechnischen Arbeiten vom November 2011 (Az. 6790-05-02-0075)

Literatur

1. **Jiang Y et al.** (2016). Host–Pathogen Interactions in Measles Virus Replication and Anti-Viral Immunity. *Viruses* **8**: 308.
2. **Holzmann H et al.** (2016). Eradication of measles: remaining challenges. *Med Microbiol Immunol* **205**:201-8.
3. **Baldo A et al.** (2016). Biosafety considerations for attenuated measles virus vectors used in virotherapy and vaccination. *Hum Vaccin Immunother* **12**:1102-16.
4. **Billeter MA et al.** (2009). Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines: applications of recombinant measles viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **329**:129-62.
5. **Bankamp B et al.** (2011). Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis* **204**(Suppl 1):533-48.
6. **Enders JF & Peebles TC** (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**:277-86.
7. **Enders JF et al.** (1960). Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparations of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *N Engl J Med* **263**:153-9.
8. **Zuniga A et al.** (2007). Attenuated measles virus as a vaccine vector. *Vaccine* **25**:2974-83.
9. **Msaouel P et al.** (2013). Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther* **13**:483-502.
10. **Ikic D et al.** (1972). Attenuation and characterisation of Edmonston-Zagreb measles virus. *Ann Immunol Hung* **16**:175-81.
11. **Mori T et al.** (1993). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of genomic RNA of the AIC-K strain of attenuated measles virus. *Virus Genes* **7**:67-81.
12. **Zuniga A et al.** (2013). Sequence and immunogenicity of a clinically approved novel measles virus vaccine vector. *Hum Vaccin Immunother* **9**:607-13
13. **Radecke F et al.** (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14:5773-84.
14. **Lorin C et al.** (2012). Toxicology, biodistribution and shedding profile of a recombinant measles vaccine vector expressing HIV-1 antigens, in cynomolgus macaques. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**:1211-25.
15. **Stebbings R et al.** (2012). Immunogenicity of a recombinant measles-HIV-1 clade B candidate vaccine. *PLoS One* **7**:e50397.
16. **Brandler S et al. (**2013). A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine* **31**:3718-25.
17. **Ramsauer K et al.** (2015). Immunogenicity, safety and tolerability of a recombinant measles virus-based chikungunya vaccine: an observer and subject blinded, block randomised, active and placebo-controlled first in man trial. *Lancet Infect Dis* **15**:519-27.
18. **Zhang X et al.** (2013). Determination of spontaneous mutation frequencies in measles virus under nonselective conditions. *J Virol* **87**:2686-92.
19. **Bellini WJ & Rota PA** (1998). Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis* 4:29-35
20. **Griffin DE & Pan CH** (2009). Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* **330**:191-212

21. **Greenwood KP et al.** (2016). A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine* **34**:2531-36.

22. **WHO position on measles vaccines** (2009). *Vaccine* **27**:7219-21.