

**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung
des *Chikungunya virus*, Stamm 181/clone 25
als Spender- oder Empfängerorganismus
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Das *Chikungunya virus* (CHIKV) gehört zur Familie *Togaviridae* (Gattung *Alphavirus*). Wie alle Alphaviren ist es umhüllt und besitzt ein lineares, einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität. CHIKV gehört zur Gruppe der Arboviren und wird von Mücken der Gattung *Aedes* übertragen. Zu seinen natürlichen Wirten zählen der Mensch, Affen, Nagetiere und Vögel. Charakteristische Krankheitssymptome einer CHIKV-Infektion beim Menschen sind abrupt einsetzendes Fieber, Ausschlag und Gelenkschmerzen, wobei letztere über Monate anhalten können. In seltenen Fällen kann eine CHIKV-Infektion vor allem bei Neugeborenen und Personen mit Vorerkrankungen zum Tod führen (Letalitätsrate 0,1 %). 5 – 15 % der Infektionen verlaufen asymptomatisch [1; 2]. CHIKV ist in der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 3**** zugeordnet.

Der Stamm 181/clone 25 (181/25) wurde 1985 vom US-Militär als Impfstoffkandidat entwickelt. Hierzu wurde zunächst das Feldisolat AF15561 (Thailand, 1962) zehnmal in primären Nierenzellen der Grünen Meerkatze passagiert. Anschließend erfolgten 18 weitere Plaque-Passagierungen in humanen embryonalen Lungenzellen (MRC-5). Einer der resultierenden Viruskclone zeichnete sich durch die Bildung stark verkleinerter Plaques und einen vollständigen Verlust der Letalität in 1 – 3 Tage alten Mäusen bei intrakranieller Infektion aus. Ebenso zeigten Rhesusaffen bei einer intramuskulären Gabe von $10^{3,5} - 10^{5,5}$ *plaque forming units* (pfu) des Impfstoffkandidaten keine oder nur eine leichte, transiente Virämie, welche um den Faktor 100 geringer war als die von Viren, die nach einer Passage des Ausgangsisolats gewonnen worden waren. Hinsichtlich der Stabilität der erfolgten Attenuierung wurde auch nach weiteren vier Passagen in MRC-5-Zellen keine Veränderung der Plaque-Morphologie in Zellkultur und der Letalität in Mäusen festgestellt. Ebenso war die aus den Rhesusaffen isolierte Viruspopulation hinsichtlich ihrer Plaque-Morphologie und -Homogenität nicht von der von Viren zu unterscheiden, die zur Infektion der Rhesusaffen genutzt worden waren [3].

Die Ergebnisse von zwei Phase-I/II-Studien zur Wirksamkeit einer Immunisierung mit 181/25 (Name des Prüfprodukts TSI-GSD-218) wurden bisher veröffentlicht. Bei diesen wurde insgesamt 114, überwiegend Alphavirus-naiven Freiwilligen eine Impfdosis von $10^{4,4}$ oder 10^5 pfu subkutan verabreicht. In Folge der Impfung entwickelten sechs Probanden (5 %) die für eine CHIKV-Infektion typischen Gelenkschmerzen, welche allerdings nur höchstens einen Tag anhielten und als moderat beschrieben wurden. Bei weiteren lokalen oder systemischen Reaktionen, wie Fieber, Ausschlag, Kopf- und Muskelschmerzen, wurde kein signifikanter Unterschied zu den Placebogruppen festgestellt [4; 5].

In einer Studie zur Untersuchung der Grundlage der Attenuierung wurden basierend auf einem Sequenzvergleich von 181/25 mit seinem Ausgangsisolat AF15561 zehn Punktmutationen identifiziert, welche alle innerhalb kodierender Bereiche liegen. Fünf dieser Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch, wobei jeweils eine Mutation im Nichtstrukturprotein nsP1 (T301I) und in den Strukturproteinen E1 (A404V) und 6k (C42F) auftritt. Die anderen zwei Mutationen betreffen das Strukturprotein E2 (T12I und G82R). Nach dem gezielten Einbringen dieser fünf Mutationen, einzeln und in Kombination, beeinflussten lediglich die Mutationen in E2 die Virämie und die Überlebensrate von subkutan oder intradermal infizierten Mäusen. Bei diesen lag der durchschnittliche Virustiter im Blut, wie auch bei 181/25, 100- bis 1000-fach unterhalb des Titers von AF15561. Das Einbringen von jeweils einer der beiden

Mutationen führte zu einer Reduktion und das gleichzeitige Einbringen beider Mutationen zum vollständigen Verlust der Letalität in Mäusen. Die Attenuierung von 181/25 kann daher vollständig auf die Mutationen E2/T12I und E2/G82R zurückgeführt werden. Der Erwerb von zusätzlichen positiven Ladungen der Glykoproteine wird bei der Kultivierung von Alphaviren in Zellkultur häufig beobachtet und korreliert oftmals mit einer Attenuierung, da er möglicherweise die Virusausbreitung dadurch behindert, dass die Viren vermehrt an negativ geladene extrazelluläre Komponenten binden. E2/G82R ist außerdem ursächlich für die verringerte Plaquegröße von 181/25 [6].

Zur Untersuchung der genetischen Stabilität der beiden Mutationen in E2 wurde virale RNA von 181/25 drei Tage nach der Infektion aus dem Blut infizierter Mäuse isoliert. Die entsprechende cDNA wies bei allen acht Tieren, die mit der Doppelmutterante infiziert waren, die erwarteten Mutationen auf. Im Fall der Einzelmutanten wurde hingegen in zwei von acht (E2/T12I) bzw. in neun von neun (E2/G82R) Tieren eine Mischpopulation bestehend aus der erwarteten Mutante und Revertanten nachgewiesen [6]. Ähnlich hierzu zeigte sich in einer anderen Studie nach einer fünfmaligen intrakraniellen Passage von 181/25 in Mäusen die Reversion zu E2/R82G oder es traten Mutationen auf, welche zum Verlust von positiven Ladungen in E2 führten. Diese Mutationen gingen mit einer Vergrößerung der Plaques sowie mit einer wiedererlangten 100%igen Letalität in Mäusen einher [7]. Die E2/R82G-Reversion wurde auch in einem der Probanden der Phase-I/II-Studien nachgewiesen [8].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird der *Chikungunya virus*-Stamm 181/clone 25 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 3**** zugeordnet.

Begründung

Aufgrund des geringen Umfangs der für die Attenuierung verantwortlichen Mutationen und deren Tendenz zur Reversion ist davon auszugehen, dass der Stamm 181/clone 25 ein ähnlich hohes Gefährdungspotenzial wie andere *Chikungunya virus*-Stämme besitzt und somit ebenfalls der Risikogruppe 3** zugeordnet werden muss.

Literatur

1. **Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M** (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolos. *Lancet Infect Dis.* **7**(5):319-27.
2. **Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT** (2012). Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines.* **11**(9):1087-101.
3. **Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE Jr, Lupton HW** (1986). Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine.* **4**(3):157-62.
4. **McClain DJ, Pittman PR, Ramsburg HH, Nelson GO, Rossi CA, Mangiafico JA, Schmaljohn AL, Malinoski FJ** (1998). Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. *J Infect Dis.* **177**(3):634-41.
5. **Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA** (2000). Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.* **62**(6):681-5.
6. **Gorchakov R, Wang E, Leal G, Forrester NL, Plante K, Rossi SL, Partidos CD, Adams AP, Seymour RL, Weger J, Borland EM, Sherman MB, Powers AM, Osorio JE, Weaver SC** (2012). Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. *J Virol.* **86**(11):6084-96.

7. **Plante KS, Rossi SL, Bergren NA, Seymour RL, Weaver SC** (2015). Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**(9):e0004007.
8. **Hoke CH Jr, Pace-Templeton J, Pittman P, Malinoski FJ, Gibbs P, Ulderich T, Mathers M, Fogtman B, Glass P, Vaughn DW** (2012). US Military contributions to the global response to pandemic chikungunya. *Vaccine.* **30**(47):6713-20.