

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des rekombinanten Vacciniavirus MVA

Das modifizierte Vacciniavirus Ankara, MVA, entstand im Verlauf von 570 Passagen des Wildtyp-Vacciniavirus Ankara (CVA, **Risikogruppe 2**) auf primären Hühnerembryo-Fibroblasten (CEF). Dabei traten im Genom von MVA zahlreiche Mutationen auf und es entstanden sechs große Deletionen im Umfang von insgesamt 31 kbp (CVA-Genom: 208 kbp).

Die Funktionen der deletierten Gene sind noch nicht vollständig geklärt. Die Deletion der entsprechenden sechs genomischen Regionen im Genom von CVA führte nicht dazu, dass der Wirtsbereich eingeschränkt oder CVA deutlich attenuiert wurde. Die Attenuierung von MVA beruht demnach nicht ausschließlich auf der Deletion der sechs Genombereiche. Der Wirtsbereich von MVA ist gegenüber dem von CVA deutlich eingeschränkt: Bislang konnte eine produktive Replikation von MVA nur in CEF und weiteren embryonalen Zelllinien von Hühnern, Enten oder Wachteln, in der Hamsterzelllinie BHK-21 und in Flughundzellen gezeigt werden. Nach Infektion humaner Zellen werden sowohl frühe als auch späte Vacciniavirus-Gene exprimiert. Es liegt jedoch ein Block bei der Morphogenese der Viruspartikel vor, so dass keine Virusnachkommenschaft gebildet wird. Darüber hinaus weist MVA einen hoch attenuierten Phänotyp auf. In einer Reihe von Tierexperimenten, u. a. auch an immunsupprimierten Tieren, stellte sich MVA als avirulent heraus. Bei der klinischen Anwendung von MVA als Impfstoff an über 150.000 Personen konnten ebenfalls keine signifikanten Nebenwirkungen festgestellt werden. MVA wurde daher der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Durch *marker rescue*-Experimente mit Wildtyp-DNA-Fragmenten konnte der Wirtsbereich von MVA nur teilweise erweitert werden. Hierfür verantwortliche Mutationen sind hauptsächlich am linken Genom-Ende lokalisiert. Gleichzeitig zeigen diese Arbeiten, dass multiple virale Funktionen wiederhergestellt werden müssen, um eine dem Wildtyp-Vacciniavirus vergleichbare Vermehrungsfähigkeit von MVA zu erreichen. Sowohl die viralen Funktionen, deren Verlust zur Attenuierung beiträgt, als auch die zellulären Funktionen, die die Virusreplikation in den wenigen permissiven Zellen ermöglichen, sind nur teilweise bekannt. Aus diesem Grund ist bei der Herstellung eines rekombinanten MVA (rMVA) zu prüfen, ob sich die Expression des inserierten Gens auf die Attenuierung auswirkt. Als Anhaltspunkt hierfür dient die Untersuchung der Replikationsfähigkeit in humanen Zellkulturen. Ist das rMVA nach der Insertion eines Transgens weiterhin replikationsdefekt, ist nicht davon auszugehen, dass sich das Gefährdungspotential des rekombinanten MVA über die **Risikogruppe 1** hinaus erhöht hat. Bei bestimmten Nukleinsäureabschnitten ist jedoch grundsätzlich nicht zu erwarten, dass sie die Replikationsfähigkeit von MVA beeinflussen bzw. das Gefährdungspotential von MVA erhöhen.

Daher empfiehlt die ZKBS, die Risikobewertung rekombinanter MVA wie folgt vorzunehmen:

1. rMVA mit Nukleinsäureabschnitten, die das Gefährdungspotential von MVA nicht erhöhen, sind der **Risikogruppe 1** zuzuordnen.
Hierzu gehören insbesondere
 - Reportergene,
 - Gene von RNA-Polymerasen

- Gene viraler Proteine ohne eigenes Gefährdungspotential (Ausnahme: Proteine von Orthopoxviren)
- sowie die unter 2. aufgeführten Nukleinsäureabschnitte, bei denen gezeigt wurde, dass ihre Insertion in das Genom von MVA nicht dazu führt, dass die Replikationsfähigkeit der rMVA wiederhergestellt wird

2. rMVA mit

- einem Nukleinsäureabschnitt eines Orthopoxvirus wie Vacciniavirus, Ektromelie-Virus, Kuhpockenvirus, Elefantenpockenvirus, Katzenpockenvirus oder anderer Kuhpocken-ähnlicher Viren, oder
- einem Nukleinsäureabschnitt, der kein eigenes Gefährdungspotential besitzt, bei dem aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Replikationsfähigkeit von MVA in humanen Zellen wiederhergestellt wird,

sind der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Attenuierung von MVA durch die Übertragung solcher Nukleinsäureabschnitte vermindert wird. Wenn gezeigt ist, dass nach Infektion humaner Zellen keine Virusproduktion stattfindet, können sie in die **Risikogruppe 1** herabgestuft werden.

Zum Test der Replikation rekombinanter MVA eignen sich die Zelllinien HeLa oder HaCat. Informationen über erfolgte Tests werden an die Geschäftsstelle der ZKBS weitergeleitet und den Landesbehörden zur Verfügung gestellt, so dass diese auch auf Testergebnisse aus anderen Bundesländern zurückgreifen können.

3. rMVA mit

- einem Nukleinsäureabschnitt eines Orthopoxvirus (außer Variola-Virus¹), wie Affenpocken-Virus oder Kamelpockenvirus, oder
- einem Nukleinsäureabschnitt, der für ein Toxin oder Prion kodiert, oder einem anderen Nukleinsäureabschnitt, bei dem davon auszugehen ist, dass er ein eigenes Gefährdungspotential besitzt,

sind im Einzelfall einer Risikobewertung durch die ZKBS zu unterziehen.

Hinweis

Es besteht die Möglichkeit einer Impfprophylaxe mithilfe eines replikationsdefizienten MVA-Stammes.

Auf folgende Stellungnahmen der ZKBS wird hingewiesen:

- Stellungnahme der ZKBS zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren (aktualisierte Fassung vom April 2014, Az. 6790-10-04)
- Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten, bei denen Zytokingene und Apoptoseregulierende Gene in replikationskompetente Mikroorganismen integriert werden (Juli 2002, Az. 6790-03-05)

¹ Auf Empfehlung der *World Health Organization* ist in Laboreinrichtungen, in denen mit Orthopockenviren gearbeitet wird, der Umgang mit Variola-DNA verboten (*WHO Recommendations concerning the distribution, handling and synthesis of variola virus DNA*, überarbeitet 2016).

Literatur

- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F. G.** (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244(2), 365-396.
- Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A.** (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.*, 72, 1031-1038.
- Sutter, G., Ramsey-Ewing, A., Rosales, R., and Moss, B.** (1994). Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J. Virol.*, 68: 4109-4116.
- Meisinger-Henschel, C., Späth, M., Lukassen, S., Wolferstätter, M., Kachelriess, H., Baur, K., ... and Hausmann, J.** (2010). Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice. *J. Virol.*, 84(19), 9907-9919.
- Dimier, J., Ferrier-Rembert, A., Pradeau-Aubreton, K., Hebben, M., Spehner, D., Favier, A. L., ... and Drillien, R.** (2011). Deletion of major non essential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. *J. Virol.*, 85, 5016-5026.
- Carroll, M. W., and Moss, B.** (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 238, 198-211.
- Jordan, I., Horn, D., Oehmke, S., Leendertz, F. H., and Sandig, V.** (2009). Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.*, 145(1), 54-62.
- Jordan, I., Northoff, S., Thiele, M., Hartmann, S., Horn, D., Höwing, K., ... & Hinrichsen, L.** (2011). A chemically defined production process for highly attenuated poxviruses. *Biologicals*, 39(1), 50-58.
- Lohr, V., Rath, A., Genzel, Y., Jordan, I., Sandig, V., & Reichl, U.** (2009). New avian suspension cell lines provide production of influenza virus and MVA in serum-free media: studies on growth, metabolism and virus propagation. *Vaccine*, 27(36), 4975-4982.
- Drexler, I., Heller, K. B., Wahren, B., Erfle, V., and Sutter, G.** (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.*, 79, 347-352.
- Wyatt, L. S., Miles W., Carroll, M. W., Czerny, C.-P., Merchlinsky, M., Sisler, J. R., and Moss, B.** (1998). Marker Rescue of the Host Range Restriction Defects of Modified Vaccinia Virus Ankara. *Virology*, 251, 334-342.