

Zim, 16.05.22



## Stellungnahme der ZKBS

### I Zusammenfassung

1. Az.: 45110.2202
2. Projektleiter: Dr. Jakob Trimpert  
Dr. Karsten Tedin  
Dr. Michael Veit
3. Betreiber: Freie Universität Berlin
4. Thema der gentechnischen Arbeit gemäß den Unterlagen:  
Arbeiten mit dem Impfstoffkandidaten sCPD9, einem durch gentechnische Veränderung abgeschwächten SARS-CoV-2 Virus
5. Kurzfassung des Vorhabens gemäß den Unterlagen:  
In der vorliegenden gentechnischen Arbeit soll der lebend-attenuierte COVID-19-Impfstoffkandidat sCPD9 in Zellkultur vermehrt und weiter charakterisiert sowie seine Wirksamkeit im Tiermodell überprüft werden. Der Impfstoffkandidat wurde durch Kodonpaar-Deoptimierung, ausgehend von einem wildtypischen SARS-CoV-2-Isolat, Plasmid-basiert hergestellt. Dabei wurden innerhalb eines ca. 1000 Nukleotide großen Genomabschnitts, der für den C-terminalen Teil von nsp15 sowie für nsp16 kodiert, mehrere Punktmutationen eingeführt. Diese verändern nicht die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine.
6. Einschätzung der Sicherheitsstufe durch den Antragsteller: **Sicherheitsstufe 2**

## II Votum

### 1. Spenderorganismen:

Gemäß § 5 Abs. 1 und § 6 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 GenTSV

- a. *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*, Virus SARS-CoV-2 **Risikogruppe 3**

Es liegt die cDNA des Gesamtgenoms vor.

### 2. Empfängerorganismen:

Gemäß § 5 Abs. 1 und § 6 i. V. m. Anlage 1 Nr. 1 oder Nr. 2 GenTSV

- a. *Escherichia coli* K12-Derivate **Risikogruppe 1**  
zur Transformation durch  
die Shuttle-Vektoren pCC1BACYAC-CMV- $\Delta$ oriV oder pCC1BACYAC-T7- $\Delta$ oriV: Derivate von pCC1BACYAC, in denen der *broad host range origin of replication (oriV)* des Plasmids RK2 deletiert wurde; enthält Cen6-ARS4 und HIS3 zur Vermehrung und Selektion in *Saccharomyces cerevisiae*
- b. etablierte, ggf. rekombinante Säugerzelllinien, wie z. B. 293T, 293T/ACE2, Vero, Vero E6, Vero E6/TMPRSS2, Calu-3, Caco-2, BHK21 **Risikogruppe 1**
- zur Transfektion mit einem der genannten Shuttle-Vektoren
  - zur Transfektion mit *in vitro*-transkribierter genomischer RNA von SARS-CoV-2
  - oder zur Infektion mit attenuierten, replikationskompetenten SARS-CoV-2-Partikeln

### 3. Gentechnisch veränderte Organismen (GVO):

Gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anlage 1 Nr. 2 GenTSV

- a. *E. coli* K12-Derivate **Risikogruppe 2**  
transformiert durch pCC1BACYAC-CMV- $\Delta$ oriV oder pCC1BACYAC-T7- $\Delta$ oriV einschließlich der mutierten vollständigen genomischen cDNA von SARS-CoV-2
- b. unter II.2.b. genannte Säugerzelllinien **Risikogruppe 2**  
transfiziert mit pCC1BACYAC-CMV- $\Delta$ oriV oder pCC1BACYAC-T7- $\Delta$ oriV einschließlich der mutierten vollständigen genomischen cDNA von SARS-CoV-2 oder der von diesen *in vitro*-transkribierten viralen genomischen RNA

- c. attenuierte, replikationskompetente SARS-CoV-2-Partikel sCPD9 und sCPD9-ΔFCS  
abgegeben von GVO II.3.b. **Risikogruppe 2**
- d. unter II.2.b. genannte Säugerzelllinien  
infiziert mit GVO II.3.c. **Risikogruppe 2**

Begründung:

zu 3.a.:

Die cDNA des Genoms von SARS-CoV-2 (**Risikogruppe 3**) wird mithilfe eines Vektors auf *E. coli* K12-Derivate (**Risikogruppe 1**) übertragen. Die cDNA weist Punktmutationen und ggf. eine Deletion auf, die zu einer Attenuierung des Virus führen (siehe Begründung zu 3.b. und c.). Die cDNA des Virus steht unter der Kontrolle des T7- oder CMV-Promotors.

Die Verwendung der *E. coli* K12-Derivate zusammen mit den beschriebenen Vektoren stellt eine biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 7 Abs. 2 und § 8 GenTSV dar. Gemäß der „Allgemeinen Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus“ (Az. 6790-10-89, erweiterte Fassung November 2019) sind die GVO der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

zu 3.b. und c.:

Etablierte, ggf. rekombinante Säugerzelllinien der **Risikogruppe 1** werden mit der *in vitro*-transkribierten genomischen RNA oder mit Vektoren mit der vollständigen genomischen cDNA von SARS-CoV-2 (**Risikogruppe 3**) transfiziert. In den Zellen kommt es zur Expression viraler Proteine und zur Replikation des viralen Genoms. Daraufhin werden rekombinante, replikationskompetente Viruspartikel gebildet und abgegeben. Innerhalb des viralen Genoms wurde ein 1146 Nukleotide langer Abschnitt des ORF1ab (Nukleotide 20.359 – 21.504) durch Kodonpaar-Deoptimierung modifiziert. Dabei werden die Positionen synonyme Kodons so gegeneinander vertauscht, dass die im menschlichen Genom am seltensten auftretenden Kodonpaare entstehen, ohne dabei jedoch die relative Häufigkeit einzelner Kodons (*codon bias*) zu verändern. Die Aminosäuresequenz der vom betroffenen Abschnitt kodierten Proteine bleibt ebenfalls erhalten. Bei der hier vorliegenden Mutante sind dies der C-terminale Bereich der Endoribonuklease (nsp15) und die vollständige 2'-O-Methyltransferase (nsp16). Um einen Einfluss auf die Regulierung der Genexpression auszuschließen, werden die Kodons zudem so ausgetauscht, dass keine neuen Transkriptionsregulationssequenzen des SARS-CoV-2 (Sequenz ACGAAC) entstehen. Insgesamt werden somit mehrere hundert stille Punktmutationen in das virale Genom eingeführt. Zudem liegt ggf. innerhalb des für das Spike (S)-Protein kodierenden Nukleinsäureabschnitts eine Deletion von 30 Nukleotiden vor, die die Furinspaltstelle (NSPRRARSVA) des Proteins entfernt. Die übrigen Genomabschnitte entsprechen dem des ursprünglichen Isolats Wuhan-Hu-1 aus dem Jahr 2019. Die Mutanten werden im Folgenden als sCPD9 und sCPD9-ΔFCS bezeichnet. In den Zelllinien liegen keine Nukleinsäureabschnitte des unveränderten ORF1ab vor.

Die Methode der Kodonpaar-Deoptimierung wurde bereits für die Attenuierung verschiedener RNA-Viren eingesetzt und in Zellkultur sowie Tierversuchen erfolgreich erprobt. Die Ursache für die Attenuierung der Viren ist jedoch nicht abschließend geklärt. Es werden drei Gründe vermutet, die alternativ oder gemeinsam zur Attenuierung beitragen könnten. Zum einen könnte es innerhalb des Ribosoms zu einer sterischen Hinderung zwischen einzelnen tRNAs kommen, wodurch sich die Effizienz der Translation verringert. Zum anderen könnte es durch die Erhöhung der Häufigkeit von CpG-Dinukleotiden sowohl zu einer Reduktion der RNA-Stabilität als auch zu einer

erhöhten Erkennung durch intrazelluläre RNA-Sensoren, wie dem *zinc-finger antiviral protein* (ZAP), kommen<sup>1</sup>.

Zum Nachweis der Attenuierung der Mutante sCPD9 hat der Antragsteller die untenstehenden experimentellen Daten vorgelegt, die teilweise bereits publiziert sind<sup>2,3,4</sup>. Das Kontrollvirus ist jeweils das Isolat BetaCoV/Munich/BavPat1/2020. Dieses kodiert im Gegensatz zum Wuhan-Hu-1-Isolat für ein S-Protein mit der Aminosäuresubstitution D614G. Die Mutation erhöht die Infektiosität und Transmissibilität, nicht jedoch die Pathogenität des Virus<sup>5,6</sup>.

#### Replikationseigenschaften in Zellkultur:

Nach Infektion von Vero E6-Zellen verursachte sCPD9 im Gegensatz zum wildtypischen Virus (WT-Virus) keine Plaques. Zudem entstanden im *focus-forming assay* im Vergleich zum WT-Virus stark verkleinerte Foci. Bei Verwendung rekombinanter Vero E6-Zellen, die die humane Protease TMPRSS2 exprimieren, wurden auch mit der Mutante Plaques sichtbar, die jedoch weiterhin eine deutlich geringere Größe aufwiesen als die des WT-Virus auf Vero E6-Zellen. TMPRSS2 wurde als eine der Proteasen identifiziert, die das S-Protein von SARS-CoV-2 spalten und so die Fusion der Virus- mit der Zellmembran ermöglichen.

In einer Replikationskinetik in Vero E6-Zellen wies sCPD9 einen, je nach Zeitpunkt, 2 – 3 log<sub>10</sub>-Stufen niedrigeren Titer auf als das WT-Virus. Bei Replikation in der humanen Lungenzelllinie Calu-3 war der Titer der Mutante zu allen Zeitpunkten um eine log<sub>10</sub>-Stufe reduziert.

#### Pathogenität im Tiermodell:

Goldhamster, die intranasal mit einer Dosis von  $1 \times 10^5$  *focus forming units* (FFU) des sCPD9 infiziert wurden, zeigten keine klinischen Symptome. Zudem verloren die Tiere kein oder nur sehr wenig Gewicht (< 3 %) in den ersten drei Tagen nach der Infektion. Insgesamt stieg das mittlere Gewicht der Gruppe über einen Zeitraum von 21 Tagen nach der Infektion kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu zeigten alle Goldhamster, die intranasal mit  $1 \times 10^5$  FFU des WT-Virus infiziert wurden, klinische Symptome und verloren bis zum Tag 5 nach der Infektion teilweise mehr als 15 % Körpergewicht (Median ca. 15 %). Ein solch hoher Gewichtsverlust wurde auch bei Infektion mit der 10fach höheren Dosis des sCPD9 nicht verzeichnet (Median ca. 8 % bei Virus der Passage 4, ca. 11 % bei Virus der Passage 10).

Im Roborovski-Zwerghamster-Modell, in dem eine SARS-CoV-2-Infektion zu einer stärkeren Pathologie führt und das somit sensitiver als das Goldhamster-Modell ist, führte die intranasale Infektion mit  $1 \times 10^5$  FFU des sCPD9 ebenfalls zu keinen klinischen Symptomen und keinem Abfall der Körpertemperatur. Am ersten Tag nach der Infektion hatten die Tiere jedoch durchschnittlich ca. 3 % Gewicht verloren. Ab Tag 2 stieg das Durchschnittsgewicht wieder an. Im Gegensatz hierzu führte die intranasale Infektion mit dem WT-Virus bei der Dosis von  $1 \times 10^5$  *plaque forming units* (PFU)<sup>7</sup> in diesem Tiermodell zu einer Reduktion des Körpergewichts um durchschnittlich ca. 20 % nach drei Tagen bei einem gleichzeitigen Abfall der durchschnittlichen Körpertemperatur von 36 °C auf 30 °C. Darüber hinaus zeigten alle Tiere klinische Symptome wie Atemnot, Schniefen und zerzaustes Fell und wurden aus Tierschutzgründen an Tag 3 getötet. Auch nach der Infektion mit  $5 \times 10^3$  PFU des WT-Virus zeigten alle Tiere

<sup>1</sup> Groenke N *et al.* (2020). *Cell Rep.* 31(4):107586.

<sup>2</sup> Trimpert J *et al.* (2021). *Cell Rep.* 36(5):109493.

<sup>3</sup> Trimpert J *et al.* (2021). *Sci Adv.* 7(49):eabk0172.

<sup>4</sup> Trimpert J *et al.* (2020). *Cell Rep.* 8;33(10):108488.

<sup>5</sup> Jackson CB *et al.* (2021). *Biochem Biophys Res Commun.* 538:108-115.

<sup>6</sup> Volz E *et al.* (2021). *Cell.* 184(1):64-75.e11.

<sup>7</sup> Im Gegensatz zur Bestimmung von Virustitern in der Einheit FFU, die auf der Detektion lebender infizierter Zellen beruht, dienen bei der Bestimmung der PFU die bereits abgestorbenen infizierten Zellen als Messgröße. Aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden können sich prinzipiell Abweichungen zwischen den absoluten Titern in den zwei Einheiten ergeben, wobei für das Verhältnis der Einheiten generell gilt FFU/PFU  $\geq 1$ . Da es sich bei SARS-CoV-2 um ein nicht-persistierendes Virus handelt, das in infizierten Zellen innerhalb kurzer Zeit einen zytopathischen Effekt auslöst, ist hier FFU/PFU  $\approx 1$  anzunehmen. Diese Annahme wurde vom Antragsteller basierend auf experimentellen Daten bestätigt.

Atemnot und einen starken Gewichtsverlust (mindestens 15 %) sowie Abfall der Körpertemperatur und wurden an Tag 4 oder 5 aus Tierschutzgründen getötet.

Transgene Mäuse, die das humane Protein ACE2 exprimieren, welches als Eintrittsrezeptor für SARS-CoV-2 dient, zeigten bei intranasaler Infektion mit  $1 \times 10^{3,5}$  *tissue culture infectious dose* 50 (TCID<sub>50</sub>) des sCPD9 keine Symptome und keinen Gewichtsverlust. Demgegenüber verstarben 55 %, 80 % bzw. 100 % der Mäuse, nachdem sie intranasal mit  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> des WT-Virus infiziert worden waren.

#### Genetische Stabilität:

Zum Nachweis der genetischen Stabilität des sCPD9 wurde das Virus jeweils zehnmal auf Vero-, Vero E6- und Caco-2-Zellen passagiert. Dabei ergab sich keine Änderung hinsichtlich der Plaquegröße oder des maximal erreichten Titters auf Vero E6-Zellen. Dieser betrug bei sCPD9  $1 \times 10^5$  FFU/ml und beim WT-Virus  $1 \times 10^7$  FFU/ml. Bei der Sequenzierung der entstandenen Viruspopulationen mittels *next generation sequencing* zeigte sich, dass bei der Passagierung keine neuen Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen innerhalb des modifizierten Nukleinsäureabschnittes des ORF1ab entstanden waren. Es wurden jedoch kurze (15 – 30 nt) Deletionen innerhalb des Nukleinsäureabschnittes des S-Proteins registriert. Diese betrafen bei Passagierung auf den Zelllinien Vero und Vero E6 die Furinspaltstelle bzw. die unmittelbar davor liegenden Aminosäuren und stellen eine bekannte Adaptation von SARS-CoV-2 an TMPRSS2-defiziente Zelllinien dar<sup>8</sup>. Die Deletionen haben eine tendenziell attenuierende Wirkung im Tiermodell<sup>9</sup>. Bei Passagierung auf der humanen, TMPRSS2-positiven Zelllinie Caco-2 lag die Deletion innerhalb der N-terminalen Domäne des S-Proteins. Auswirkungen dieser Deletion sind nicht bekannt. Darüber hinaus wurden verteilt über das gesamte Genom verschiedene, überwiegend stumme, Punktmutationen detektiert.

Im Goldhamster-Modell zeigte die Viruspopulation aus der zehnten Passage des sCPD9 (mit Deletion der Aminosäuren NSPRRARSVA des S-Proteins) auf Vero E6-Zellen eine leicht erhöhte Pathogenität im Vergleich zu der aus der vierten Passage. Sie verursachte jedoch auch bei 10fach höherer Dosis weiterhin eine schwächere Symptomatik als das WT-Virus (siehe oben).

Zusammengenommen belegen die vorgelegten Daten die Attenuierung des sCPD9 im Vergleich zu einem wildtypischen SARS-CoV-2. Die Mutante ist in Tiermodellen jedoch nicht apathogen. Eine Pathogenität für den Menschen ist daher nicht auszuschließen. Aufgrund der Positionierung der eingebrachten Punktmutationen ist nicht davon auszugehen, dass die zur Prävention bzw. Behandlung von COVID-19 zugelassenen Impfstoffe (gerichtet gegen das S-Protein), monoklonalen Antikörperpräparate (gerichtet gegen das S-Protein) und antiviralen Wirkstoffe (gerichtet gegen die Hauptprotease (3CL<sup>pro</sup>, M<sup>pro</sup> oder nsp5) oder die RNA-Polymerase (RdRp oder nsp12)) eine abgeschwächte Wirksamkeit gegenüber sCPD9 aufweisen. Ebenso ist nicht davon auszugehen, dass die Mutationen die Eignung von PCR-Tests zum Nachweis des SARS-CoV-2 beeinflussen, da diese überwiegend auf Nukleinsäureabschnitte abzielen, die für das Hüll (E)-, Nukleo (N)- oder S-Protein oder die RdRp kodieren. Die attenuierten, replikationskompetenten SARS-CoV-2-Partikel sCPD9 sind daher der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Ebenso sind die von sCPD9 abgeleiteten Partikel sCPD9-ΔFCS, bei denen zusätzlich der Nukleinsäureabschnitt deletiert ist, der für die Aminosäuren der Furinspaltstelle des S-Proteins kodiert, der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Eine ähnliche Mutante (mit zusätzlichen, überwiegend stummen, Punktmutationen verteilt über das gesamte Genom) ist bei Passagierung auf Vero E6-Zellen entstanden. Das passagierte Virus zeigte im Vergleich zu einem wildtypischen SARS-CoV-2 weiterhin eine Attenuierung im Tiermodell. Das Gefährdungspotenzial der Viruspartikel bestimmt das Gefährdungspotenzial der transfizierten Zellen. Diese sind daher ebenso der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

<sup>8</sup> Sasaki M *et al.* (2021). PLoS Pathog. 17(1):e1009233.

<sup>9</sup> Lau SY *et al.* (2020). Emerg Microbes Infect. 9(1):837-842.

zu 3.d.:

Etablierte, ggf. rekombinante Säugerzelllinien der **Risikogruppe 1** werden mit attenuierten, replikationskompetenten SARS-CoV-2-Partikeln der **Risikogruppe 2** infiziert. Es ist davon auszugehen, dass replikationskompetente Viruspartikel der **Risikogruppe 2** gebildet und abgegeben werden. Es erfolgt ggf. eine Passagierung bis höchstens Passage 10. Unter Berücksichtigung der Daten zur Genomstabilität bei Passagierung (siehe Begründung zu 3.b. und c.) ist für diesen Zeitraum nicht von einer gleichzeitigen Reversion mehrerer Punktmutationen und dem damit einhergehenden Verlust der Attenuierung auszugehen. Das Gefährdungspotenzial der Viruspartikel bestimmt das Gefährdungspotenzial der infizierten Zellen. Die infizierten Zelllinien sind daher der **Risikogruppe 2** zuzuordnen.

#### 4. Einstufung der gentechnischen Arbeiten:

a. zu 3.a.:

Gemäß § 7 Abs. 2 und § 10 GenTSV

**Sicherheitsstufe 2**

Begründung:

Die Empfängerorganismen sind Organismen der **Risikogruppe 1**.

Die Vektoren und die aus den Spenderorganismen überführten Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die GVO nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 1 GenTSV das Gefährdungspotenzial von Organismen der **Risikogruppe 2** nicht überschreiten.

Die Verwendung der Empfängerorganismen gemeinsam mit dem jeweils angegebenen Vektor stellt eine biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 7 Abs. 2 und § 8 GenTSV dar.

b. zu 3.b. und d.:

Gemäß § 10 GenTSV

**Sicherheitsstufe 2**

Begründung:

Die Empfängerorganismen sind Organismen der **Risikogruppe 1**.

Die Vektoren und die aus den Spenderorganismen überführten Nukleinsäuren sind soweit charakterisiert, dass die GVO nach einer vorläufigen Sicherheitsbewertung nach § 5 Abs. 1 Satz 1 GenTSV das Gefährdungspotenzial von Organismen der **Risikogruppe 2** nicht überschreiten und keine GVO einer höheren Risikogruppe abgeben.

Die GVO geben GVO der **Risikogruppe 2** ab.

c. zu 3.c.:

Gemäß § 7 Abs. 3 GenTSV

**Sicherheitsstufe 2**

Begründung:

Die GVO sind attenuierte, replikationskompetente SARS-CoV-2-Partikel der **Risikogruppe 2**.

#### 5. Sicherheitsmaßnahmen:

Gemäß Anlage 2 A GenTSV

zu 4.a. – c.:

**Stufe 2**

Gemäß Anlage 4 GenTSV

für die Infektion von ggf. rekombinanten Mäusen und Hamstern mit GVO II.3.c.:

**Stufe 2**

Hinweise:

Die hier erfolgte Herabstufung replikationskompetenter SARS-CoV-2-Partikel in die Risikogruppe 2 gilt nur für Partikel mit den beschriebenen Mutationen (sCPD9- und sCPD9- $\Delta$ FCS-Partikel). Sollen, z. B. zur Anpassung an neu zirkulierende SARS-CoV-2-Varianten, weitere Mutationen in Genombereichen außerhalb der hier betrachteten Bereiche des ORF1ab und S-Gens eingeführt werden, sind der ZKBS vor einer Herabstufung dieser Mutanten erneut experimentelle Daten zu ihrer Attenuierung vorzulegen. Dies gilt auch für Mutanten, die durch Kodonpaar-Deoptimierung anderer Genombereiche hergestellt wurden oder die sich von sCPD9 ableiten (mit Ausnahme von sCPD9- $\Delta$ FCS).

Es wird auf die „Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *E. coli* K12-Derivaten mit einem Plasmid mit der (c)DNA des Genoms eines replikationskompetenten Virus“ (Az. 6790-10-89, erweiterte Fassung November 2019) hingewiesen.

**III Abstimmungsergebnis auf der 240. Sitzung der ZKBS am 5. April 2022:**

einstimmig angenommen

