

1. Titel und verantwortliche Personen

Projekttitel: Sicherheit von Impfstoffen gegen Flaviviren

Förderkennzeichen: ZMVI1-2516FSB416

Management:

Prof. Dr. Veronika von Messling (Paul-Ehrlich-Institut, PEI)

Prof. Dr. Gülsah Gabriel (Leibniz-Institut für Virologie, LIV)

Dr. Christian K. Pfaller (PEI)

Dr. Richard JP Brown (PEI)

Personal:

Dr. Cindy Hörner, geb. Nürnberger (PEI)

Eduardo Montoya-Diaz (PEI)

Lena Bonn (PEI)

Dr. Maike Herrmann (PEI)

Robin Kleinert (PEI)

Yvonne Krebs (PEI)

Kontaktdaten:

Paul-Ehrlich-Institut

Abteilung Veterinärmedizin

Paul-Ehrlich-Straße 51-59

63225 Langen

Tel.: +49 6103 77 0

Email: pei@pei.de

Laufzeit: 01.12.2016 - 31.12.2023

Fördersumme: 2.551.305 €

2. Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1. Titel und verantwortliche Personen.....	1
2. Inhaltsverzeichnis	2
3. Zusammenfassung.....	3
4. Einleitung.....	4
5. Methodik der Erhebung und Auswertung.....	8
6. Umsetzung, Arbeit und Zeitplan	9
7. Ergebnisse.....	13
8. Gender Mainstreaming-Aspekt	34
9. Diskussion.....	35
10. Verbreitung und Öffentlichkeitsarbeit der Projektergebnisse	40
11. Nutzung der Projektergebnisse	41
12. Publikationsliste.....	45

3. Zusammenfassung

Flaviviren stellen eine große Belastung für die globale Gesundheit dar, obwohl es für viele dieser Erreger mittlerweile wirksame Impfstoffe gibt. Am 1. Februar 2016 erklärte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Zika-Virus (ZIKV)-Epidemie in Südamerika zu einer internationalen gesundheitlichen Notlage, da bei Neugeborenen nach Infektionen schwangerer Frauen häufig Mikrozephalie auftritt. Auch die Berichte über neurologische Komplikationen nahmen zu. Gleichzeitig erhöhen die Gelbfieber-Ausbrüche in Angola und Brasilien das Risiko einer Einschleppung von Gelbfieber-Viren (YFV) nach Asien, wodurch 2 Milliarden Menschen einer Infektionsgefahr ausgesetzt wären: Gelbfieber ist für mehr als 50 % der jährlichen Todesfälle im Zusammenhang mit hämorrhagischem Fieber verantwortlich. Obwohl die Mückenarten, die humanpathogene Flaviviren wie ZIKV, YFV, das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV) und das West-Nil-Virus (WNV) übertragen, nicht in Europa endemisch sind, nimmt das Spektrum der Mückenarten, die humanpathogene Flaviviren übertragen, aufgrund des vom Menschen verursachten Klimawandels zu, und aufgrund des hohen weltweiten Reiseaufkommens in endemische Regionen werden Fälle importiert.

Um auf aktuelle und zukünftige Ausbrüche und Epidemien durch Flaviviren schnell reagieren zu können, ist ein besseres Verständnis der Sicherheitsprofile von Flavivirus-Impfstoffkonzepten erforderlich. Ein erster Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung experimenteller Impfstoffe für den Einsatz bei schwangeren Frauen, für die derzeit keine Flavivirus-Impfstoffe zugelassen sind. Gleichzeitig bieten neue Erkenntnisse zu strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten innerhalb der Flavivirus-Familie innovative Ansatzpunkte für gemeinsame Modelle zur Risikobewertung entsprechender Impfstoffe hinsichtlich ihres infektionsverstärkenden Potenzials und der potenziellen Auslösung neurologischer Syndrome. Neben der Reaktion auf die Empfehlungen der WHO zur ZIKV-Epidemie 2016–2017 beantwortet das Projekt auch grundlegende Fragen zur Sicherheit experimenteller Impfstoffplattformen gegen diese wichtige Erregerfamilie.

4. Einleitung

Die Familie der Flaviviridae ist eine vielfältige Gruppe kleiner umhüllter Viren, die über 100 Arten umfasst. Die viralen Genome der Flaviviridae sind nicht segmentierte, positivsträngige RNAs mit einer Länge von ca. 9 bis ca. 13 kb. Phylogenetische Analysen von 125 Familienmitgliedern ergeben vier gut belegte Gattungen: Pestivirus, Hepacivirus, Pegivirus und Flavivirus (Abbildung 1). Mitglieder der Flaviviridae, die eine erhebliche Krankheitslast beim Menschen verursachen, sind im Baum in Abbildung 1 hervorgehoben. Die Genomorganisation und die zytoplasmatische Replikation auf Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) sind zwischen den verschiedenen Flaviviridae-Mitgliedern konserviert. Wirtsspektrum, Gewebetropismus, Pathogenität und Übertragungswege können sich jedoch stark unterscheiden. Mitglieder der Gattung Flavivirus, die aus Arboviren mit breitem Wirtsspektrum besteht, können aus tierischen Reservoirs über Insektenvektoren auf den Menschen übertragen werden. Diese Gattung enthält eine Reihe wichtiger menschlicher Krankheitserreger, die akute Infektionen verursachen können, darunter Dengue-Virus (DENV), YFV, WNV, JEV und ZIKV. Die Übertragung erfolgt über Mückenvektoren und eine Infektion des Menschen kann eine Reihe klinischer Folgen haben, die von asymptomatischer bis hin zu tödlicher Enzephalitis (WNV, JEV und ZIKV) oder tödlichem hämorrhagischem Fieber (YFV und DENV) reichen.

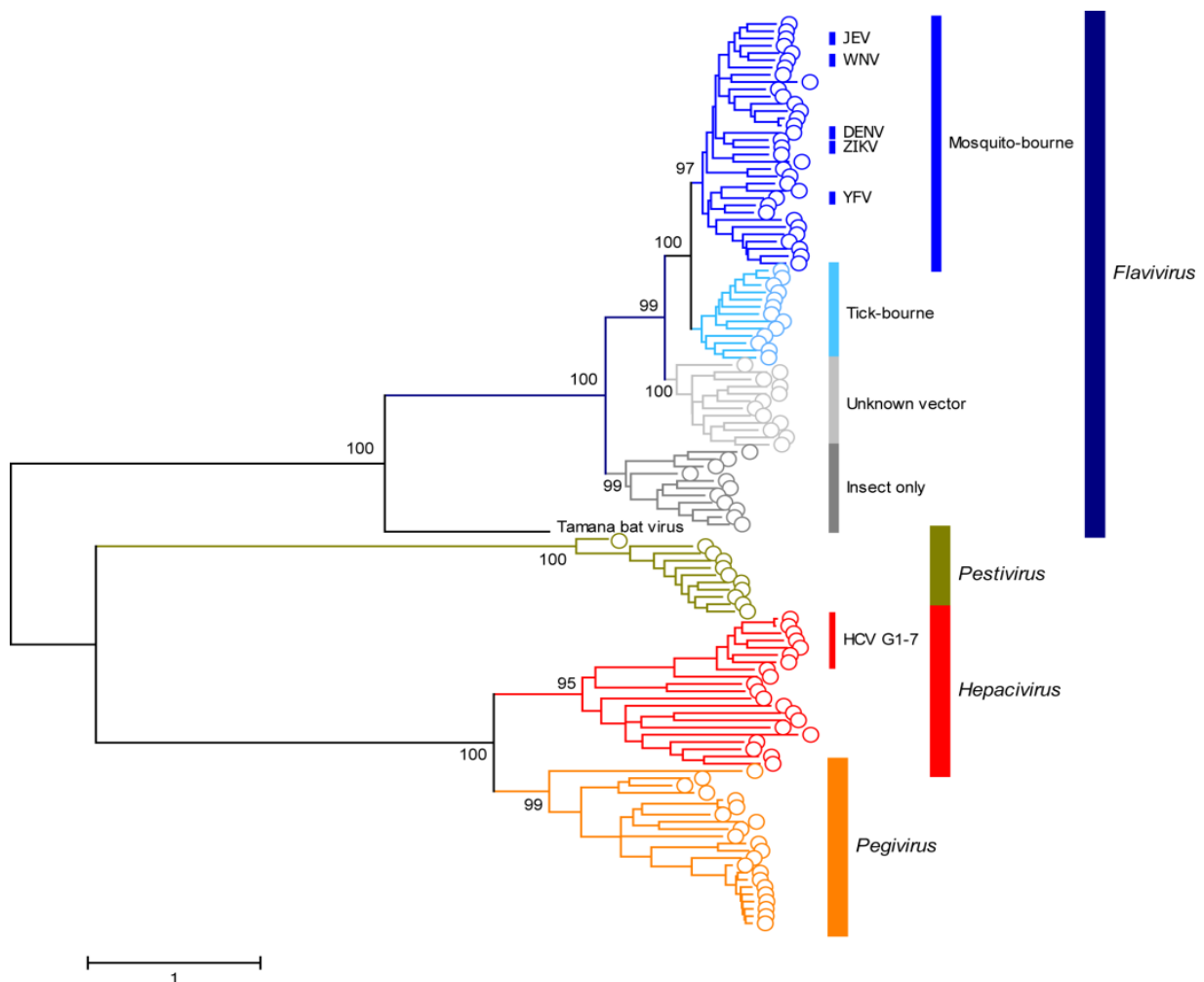


Abbildung 1. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der *Flaviviridae*. (abgewandelt nach Kleinert et al. 2019).

Von Mücken übertragene Flaviviren sind weltweit eine der Hauptursachen für Krankenhausaufenthalte und Todesfälle, insbesondere in den ressourcenarmen Entwicklungsländern. Da die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt sind, ist die Entwicklung einer Reihe sicherer und schützender Flavivirus-Impfstoffe zur Eindämmung der Ausbreitung und der damit verbundenen Krankheiten eine wissenschaftliche Priorität. Flavivirus-Infektionen verursachen zunächst unspezifische grippeähnliche Symptome, die durch Fieber, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen und gelegentlich Hautausschlag gekennzeichnet sind. In vielen Fällen klingen diese Symptome innerhalb einer Woche ab und es wird keine spezifische Diagnose gestellt. Bei einer erheblichen Minderheit der Infektionen können jedoch schwere oder tödliche Folgen auftreten. Bei ZIKV gibt es Berichte über transplazentare Infektionen, die zu Fehlgeburten oder fötalen Missbildungen und neurologischen Schäden führen können. Vor dem Ausbruch in 2016-2017 war dieser Aspekt der Flavivirus-Pathogenese nur unzureichend verstanden. Um die Handlungsoptionen gegen die ZIKV-Epidemie bestmöglich einschätzen zu können und auf zukünftige Ausbrüche bekannter und neuer Flaviviren vorbereitet zu sein, ist ein detailliertes Verständnis der verschiedenen Sicherheitsaspekte von Flavivirus-Modellimpfstoffen in verschiedenen Zielgruppen, insbesondere schwangeren Frauen, und der Ausbruchsszenarien erforderlich.

Das ZIKV ist nach dem Ort benannt, an dem es 1947 erstmals isoliert wurde, dem Zika-Wald in Uganda. Aufgrund des historisch meist milden oder asymptomatischen Infektionsverlaufs erregte es zunächst wenig Aufmerksamkeit. Das Virus wurde jedoch 2007 bei einem größeren Ausbruch der Erkrankung auf der Insel Yap in Mikronesien nachgewiesen und 2014 nach einem Zwischenstopp in Französisch-Polynesien im Jahr 2013 nach Südamerika eingeschleppt. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Pathologie der ZIKV-Infektionen ziemlich dramatisch verändert, einschließlich der teratogenen Wirkungen, die weltweite Forschungsaktivitäten und die Erklärung der Ausbreitung von ZIKV zu einem globalen Gesundheitsnotfall von internationaler Tragweite am 1. Februar 2016 auslösten. Tatsächlich hat ZIKV aufgrund einer Epidemie in Amerika (2015-2017) weltweite Besorgnis ausgelöst, da es bei Babys ZIKV-infizierter Mütter angeborene neurologische Anomalien verursacht. Solche fötalen Phänotypen werden als angeborenes ZIKV-Syndrom bezeichnet. Zwischen Januar 2016 und Juni 2017 wurden in Brasilien insgesamt 26.000 Verdachtsfälle einer ZIKV-Erkrankung bei schwangeren Frauen gemeldet, von denen 11.500 im Labor bestätigt wurden. Darüber hinaus wurden 3.000 von 14.500 Verdachtsfällen von Mikrozephalie und angeborenem ZIKV-Syndrom, die zwischen August 2015 und Juli 2017 gemeldet wurden, durch klinische, radiologische oder Labor-Nachweismethoden bestätigt. Somit standen mehr als ein Drittel der 582 Todesfälle des Fötus nach der Geburt oder während der Schwangerschaft sowie der Fälle von Mikrozephalie oder anderen fötalen Fehlbildungen des zentralen Nervensystems, die 2016 in Brasilien gemeldet wurden, im Zusammenhang mit einer ZIKV-Infektion der Mütter während der Schwangerschaft. Darüber hinaus kam es vermehrt zu schweren neurologischen Komplikationen, darunter in etwa 1 % der Fälle das Guillain-Barré-Syndrom. Daher wird die Entwicklung wirksamer Gegenmaßnahmen als unerlässlich erachtet, insbesondere für Frauen im gebärfähigen Alter, und ZIKV wurde folglich als vorrangiger Erreger in die Liste der WHO aufgenommen. Während antivirale Mittel als

schnelle Notfallmaßnahmen bei einer diagnostizierten Infektion dienen können, wird die Entwicklung eines prophylaktischen Impfstoffs, der auch eine fötale ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft verhindert, als dringend erachtet. Zu diesem Zweck hat die WHO ein Zielproduktprofil des ZIKV-Impfstoffs mit wünschenswerten Eigenschaften eines ZIKV-Notfallimpfstoffs zusammengestellt. Dementsprechend hat die Entwicklung eines prophylaktischen ZIKV-Impfstoffs höchste Priorität für die Impfung von Frauen im gebärfähigen Alter im Rahmen eines Notfallimpfprogramms, um angeborene Folgeerkrankungen einer ZIKV-Infektion zu verhindern. Dieser Ansatz schließt potenziell auch schwangere Frauen ein. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ZIKV effizient sexuell übertragen wird und im Vaginalepithel und in Körperflüssigkeiten wie Sperma bestehen bleiben kann.

YFV stellt weiterhin eine sehr reale Bedrohung für die öffentliche Gesundheit dar, was durch die jüngsten Ausbrüche in Angola 2015–2016 und Brasilien 2016–2017 und die damit verbundene Einfuhr in nicht endemische Regionen deutlich wurde. Dazu gehört auch China, wo ein erhöhtes Risiko einer Einschleppung von YFV katastrophale Folgen für die öffentliche Gesundheit in Asien haben könnte. YFV wird durch die in tropischen Regionen Afrikas und Südamerikas endemischen Mückenarten *Aedes* und *Haemagogus* übertragen. Das Virus verursacht Gelbfieber, eine potenziell tödliche Erkrankung, die durch akutes Fieber, Schüttelfrost, starke Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, allgemeine Muskelschmerzen, Übelkeit und Erbrechen gekennzeichnet ist. In 20 – 30 % der Fälle schreitet die Krankheit in eine toxischere Phase fort, die zu Gelbsucht, Blutungen, Organversagen und einer hohen Sterblichkeitsrate führt. Obwohl ein hochwirksamer Impfstoff verfügbar ist, bleibt Gelbfieber ein erhebliches Risiko für die öffentliche Gesundheit, insbesondere in Gebieten mit geringer Impfquote und mangelhafter Mückenbekämpfung. Ausbrüche können verheerende Auswirkungen auf Bevölkerung und Gesundheitssysteme haben und erfordern daher kontinuierliche Überwachung, Impfkampagnen und Vektorkontrollmaßnahmen, um die Ausbreitung des Virus zu verhindern und einzudämmen.

JEV wird hauptsächlich durch Mücken übertragen, insbesondere durch die Gattung *Culex*. Es ist eine der Hauptursachen für virale Enzephalitis in Asien mit erheblichen Morbiditäts- und Mortalitätsraten. JEV infiziert jährlich etwa 50.000 Menschen. Die Infektion verläuft in etwa 30 % der Fälle tödlich und kann langfristige neurologische Schäden verursachen. Schweine und Stelzvögel dienen als Verstärkerwirte, während Menschen Zufallswirte sind, d. h. sie tragen nicht zum Übertragungszyklus des Virus bei. Eine JEV-Infektion kann zu schweren neurologischen Erkrankungen führen, deren Symptome von leichtem Fieber und Kopfschmerzen bis hin zu akuter Enzephalitis reichen, die durch Krampfanfälle, Lähmungen und Koma gekennzeichnet ist. Die Impfung bleibt die wirksamste vorbeugende Maßnahme und wird durch Vektorkontrollstrategien zur Reduzierung der Mückenpopulation und der Exposition des Menschen ergänzt. Obwohl JEV vermeidbar ist, stellt es in endemischen Regionen aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Impfstoffen und der eingeschränkten öffentlichen Gesundheitsinfrastruktur weiterhin eine Herausforderung für die öffentliche Gesundheit dar.

WNV wird ebenfalls hauptsächlich von Mücken der Gattung *Culex* übertragen. Es bleibt in der Natur durch einen Vogel-Mücken-Vogel-Übertragungszyklus erhalten, wobei Menschen und andere Säugetiere als Nebenwirte fungieren. Während die meisten

Infektionen beim Menschen asymptomatisch verlaufen, führen etwa 20 % der Fälle zum West-Nil-Fieber, das durch Fieber, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Gelenkschmerzen, Erbrechen, Durchfall oder Hautausschlag gekennzeichnet ist. Weniger als 1 % der infizierten Personen entwickeln schwere neurologische Erkrankungen wie Enzephalitis oder Meningitis, die zu langfristigen neurologischen Auswirkungen oder zum Tod führen können. Es gibt keine spezifische antivirale Behandlung oder Impfung gegen WNV beim Menschen, sodass Präventionsstrategien wie Mückenbekämpfung, Verwendung von Insektenschutzmitteln und Schutzkleidung entscheidend zur Verringerung der Übertragung sind. Das Virus ist weit verbreitet, darunter in Teilen Afrikas, Europas, des Nahen Ostens, Nordamerikas und Westasiens, und stellt eine anhaltende Herausforderung für die öffentliche Gesundheit dar.

Es gibt mehrere Impfstofftechnologieplattformen, um Immunogene zu verabreichen und Schutzreaktionen gegen Infektionen mit einer Reihe viraler Krankheitserreger hervorzurufen. Zu den etablierten Impfstoffplattformen gehören abgeschwächte Lebendviren, inaktivierte Viren, modifizierte virale Vektoren, die Immunogene kodieren, und rekombinante Proteinuntereinheitenansätze. In jüngerer Zeit wurden modifizierte mRNA-Impfstoffe entwickelt, die virale Strukturproteine kodieren, wobei zur Verabreichung des Immunogens Lipidnanopartikel (LNPs) eingekapselt werden. Diese Technologie wurde erfolgreich in den SARS-CoV-2-Impfstoffen von Moderna (mRNA-1273) und BioNTech/Pfizer (BNT162b2) implementiert. In seltenen Fällen können vor Infektion schon bestehende Immunantworten gegen einige Erreger schädlich sein. Speziell bei Flaviviren kann eine Antikörper-vermittelte Verstärkung (ADE) der Infektion die Pathogenese verstärken. Antikörper, die gegen eine frühere DENV-Infektion gebildet wurden, schützen normalerweise vor einer nachfolgenden Infektion mit demselben Subtyp. Allerdings sind humorale Reaktionen, die gegen DENV ausgelöst werden, hochgradig kreuzreaktiv und können die Infektionsverstärkung heterologer Subtypen über eine durch den Fcγ-Rezeptor (FcγR) vermittelte Infektion myeloider Zellen fördern, was zu schwereren Krankheitsverläufen bei Sekundärinfektionen mit einem anderen Subtyp beiträgt. Ob kreuzreaktive Antikörper, die ADE fördern, die durch experimentelle Impfstoffkandidaten gegen mit DENV verwandte Flaviviren induziert werden können und deren Sicherheit gefährden, bleibt unklar. Dies stellt eine wichtige Forschungsfrage dar.

5. Methodik der Erhebung und Auswertung

Projektstruktur

Ziel 1: Entwicklung von Testsystemen zur Bewertung des teratogenen Potenzials einer Flavivirus-Infektion und von Modellimpfstoffen.

Teilziele:

- 1A. Optimierung von Mausmodellen zur Prüfung des teratogenen Potenzials experimenteller Flavivirus-Impfstoffe
- 1B. Entwicklung und Produktion experimenteller Flavivirus-Impfstoffkandidaten
- 1C. Potentielle Entwicklung von Backup-Tiermodellen

Ziel 2: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des infektionsverstärkenden Potenzials von Flavivirus-Modellimpfstoffen.

Teilziele:

- 2A. Vergleichende Analyse der infektionsverstärkenden Wirkung von Antikörperreaktionen gegen etablierte und experimentelle Flavivirus-Impfstoffe
- 2B. Charakterisierung der Auswirkungen experimenteller Impfstoffe auf den Krankheitsverlauf, die Häufigkeit transplazentarer Infektionen und Immunreaktionen
- 2C. Untersuchung der infektionsverstärkenden Wirkung von Antikörperreaktionen bei Probanden aus Dengue- und Gelbfieber-Impfstoffstudien

Ziel 3: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des Risikos der Induktion des Guillain-Barré-Syndroms und anderer neurologischer Schäden durch eine Flavivirus-Infektion und Modellimpfstoffe.

Teilziele:

- 3A. Identifizierung gemeinsamer Epitope in Flavivirus-Proteinen und menschlichen Myelinscheiden-Proteinen
- 3B. Entwicklung von Tiermodellen zur Beurteilung des durch das ZIKV induzierten Guillain-Barré-Syndroms und neurologischer Schäden
- 3C. Kreuzreaktivität von Seren aus Teilprojekt 1 und 2 mit Gangliosiden und Oligodendrozyten

6. Umsetzung, Arbeit und Zeitplan

Folgende Meilensteine wurden für das Projekt erreicht bzw. überarbeitet.

Ziel 1: Entwicklung von Testsystemen zur Bewertung des teratogenen Potenzials einer Flavivirus-Infektion und von Modellimpfstoffen.

Status: Nach 7 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Eine Reihe von Mausmodellen, experimentellen Impfstoffen und zugehörigen experimentellen Systemen zur Ex-vivo-Bewertung von durch Impfstoffe und Infektionen induzierten Immunreaktionen wurden erfolgreich entwickelt. Diese Systeme wurden verwendet, um das teratogene Potenzial experimenteller Impfstoffe gegen ZIKV zu bewerten.

Teilziel 1A: Optimierung von Mausmodellen zur Prüfung des teratogenen Potenzials experimenteller Flavivirus-Impfstoffe.

Status: Abschluss nach 4 Jahren.

Ziele erreicht. Ein allogenes Mausmodell wurde entwickelt und erfolgreich eingesetzt, um das teratogene Potenzial experimenteller Impfstoffe gegen ZIKV zu bewerten.

Teilziel 1B: Entwicklung und Produktion experimenteller Flavivirus-Impfstoffkandidaten.

Status: Abschluss nach 7 Jahren.

Ziele erreicht. Es wurden mehrere Impfstoffplattformen entwickelt und produziert und die Antigenexpression in vitro bestätigt. Dazu gehören: (1) Vektor-basierte Impfstoffe gegen das Masernvirus (MV) (enthalten ZIKV-E-Protein); (2) inaktivierte Lebendviren (formalinfixiertes ZIKV); (3) abgeschwächte Lebendimpfstoffe (YFV-17D); (4) virusähnliche Partikel (VLPs)-Impfstoffkonstrukte der 1. Generation, die SP-, prM- und E-Proteine von JEV, WNV, YFV und ZIKV kodieren; (5) VLPs der 2. Generation mit modifizierten Fusionspeptiden (W101A), die in Zellen mit hoher Furin-Expression produziert wurden (Impfstoffkonstrukte kodieren SP-, prM- und E-Proteine von JEV, WNV, YFV und ZIKV) und Lipid-Nanopartikel (LNP)-mRNA-basierte Impfstoffe (Impfstoffkonstrukte kodieren SP-, prM- und E-Proteine von WNV und ZIKV). Für beide viralen Antigene wurden native und W101A-mutierte Variantenimpfstoffe produziert. LNP-mRNA wurde mit dem Ignite NanoAssemblr-System produziert.

Teilziel 1C: Potentielle Entwicklung von Back-up-Tiermodellen

Status: Abschluss nach 4 Jahren.

Ein Hasentiermodell (Kaninchen) wurde auf die Produktion von Immunsereen gegen etablierte Impfstoffe, experimentelle Impfstoffe und Infektionen mit Lebendviren untersucht. Kreuzreaktivität zwischen Immunsereen aus Kanincheninfektionen und experimentellen Impfstoffen wurde ebenfalls untersucht. Nichtmenschliche Primaten (Makaken) wurden als Tiermodell etabliert, um die Kreuzreaktivität von Immunreaktionen auf ZIKV und Wirtsepitope zu untersuchen.

Ziel 2: Entwicklung von Testsystemen zur Prüfung des infektionsverstärkenden Potenzials von Flavivirus-Modellimpfstoffen.

Status: Nach 6 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Mäuse und Kaninchen wurden mit experimentellen Impfstoffplattformen immunisiert. Das infektionsverstärkende Potenzial von ZIKV-basierten Impfstoffkandidaten wurde in vivo evaluiert, einschließlich der Evaluierung teratogener Effekte und der Effekte auf transplazentare Infektionen. Die Kreuzreaktivität und infektionsverstärkende Effekte von Antikörpern, die gegen heterologe experimentelle Flavivirus-Impfstoffe, etablierte Flavivirus-Impfstoffe und Lebendvirusinfektionen gebildet wurden, konnten erfolgreich anhand immunkompetenter Tiermodelle und Ex-vivo-Systeme evaluiert werden.

Teilziel 2A: Vergleichende Analyse der infektionsverstärkenden Wirkung von Antikörperreaktionen gegen etablierte und experimentelle Flavivirus-Impfstoffe.

Status: nach 6 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Experimentelle Impfstoffkandidaten gegen ZIKV wurden erfolgreich auf ihre infektionsverstärkende Wirkung in einem allogenen Masträchtigkeitsmodell untersucht. Experimentelle Impfstoffkandidaten gegen heterologe Flaviviren (ZIKV, WNV, YFV und JEV) im Vergleich zu Lebendvirusinfektionen wurden erfolgreich auf ihre Fähigkeit untersucht, neutralisierende und kreuzreaktive Antikörperreaktionen in immunkompetenten Tiermodellen (Maus und Kaninchen) hervorzurufen. Die infektionsverstärkende Wirkung von Immunsereen aus experimentellen Impfungen und Infektionen mit heterologen Flaviviren wurde anhand immunkompetenter Tiermodelle und Ex-vivo-Systeme untersucht.

Teilziel 2B: Charakterisierung der Auswirkungen experimenteller Impfstoffe auf den Krankheitsverlauf, die Häufigkeit transplazentarer Infektionen und Immunreaktionen

Status: nach 4 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Experimentelle Impfstoffkandidaten gegen ZIKV wurden erfolgreich in einem allogenen Masträchtigkeitsmodell evaluiert, um die Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf, die Häufigkeit transplazentarer Infektionen und Immunreaktionen zu bestimmen.

Teilziel 2C: Untersuchung der infektionsverstärkenden Wirkung von Antikörperreaktionen bei Probanden aus Flavivirus-Impfstoffstudien.

Status: nach 6 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Eine wegweisende Studie aus dem Jahr 2017 untersuchte die infektionsverstärkenden Effekte früherer Flavivirus-Infektionen auf nachfolgende Infektionen mit heterologen Flaviviren <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aal4365>. Darüber hinaus hatten wir keinen Zugriff auf menschliche Serumproben aus YFV- oder DENV-Impfkampagnen, die in Deutschland oder Europa nicht vorkommen, da diese Viren in Europa nicht endemisch sind. Daher wurden die infektionsverstärkenden Effekte etablierter und experimenteller Flavivirus-Impfstoffkandidaten in Immunsereen aus Tierimpfungen untersucht.

Ziel 3: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des Risikos der Auslösung des Guillain-Barré-Syndroms und anderer neurologischer Schäden durch eine Flavivirus-Infektion und Modellimpfstoffe.

Status: Nach 3 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Ein immunkompetentes Mausmodell wurde erfolgreich entwickelt und zur Bewertung der neurologischen Schäden verwendet, die durch eine ZIKV-Infektion verursacht werden, einschließlich transplazentarer neurologischer Schäden bei Föten,

die durch ZIKV-Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft verursacht werden. Die Kreuzreaktivität von Antikörpern, die durch ZIKV-Infektionen verursacht werden, mit Epitopen von Wirtsproteinen wurde bei Mäusen und Primaten erfolgreich nachgewiesen

Teilziel 3A: Identifizierung gemeinsamer Epitope in Flavivirus-Proteinen und menschlichen Myelinscheiden-Proteinen

Status: Nach 1,5 Jahren abgeschlossen.

Ziele erreicht. Während sich die ersten Untersuchungen auf T-Zell-Epitope konzentrierten, konnte bei ZIKV-Infektionen keine Beteiligung der T-Zell-Zielsetzung auf Wirts-Epitope auf menschlichen Myelinscheiden-Proteinen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Homologie zwischen dem ZIKV-E-Protein und menschlichem C1q nachgewiesen. Nach einer ZIKV-Infektion konnte eine Kreuzreaktivität von Antikörpern von Mäusen und nichtmenschlichen Primaten gegen ZIKV-E und Wirts-C1q nachgewiesen werden.

Teilziel 3B: Entwicklung von Tiermodellen zur Beurteilung des durch das ZIKV induzierten Guillain-Barré-Syndroms und neurologischer Schäden

Status: Nach 2,5 Jahren abgeschlossen.

Ein immunkompetentes Mausmodell wurde erfolgreich entwickelt und zur Bewertung neurologischer Schäden verwendet, die in Trächtigkeitsexperimenten mit ZIKV verursacht wurden. Diese Experimente ergaben, dass männliche Nachkommen von ZIKV-infizierten Müttern häufiger an langfristigen neurologischen Komplikationen leiden, die bis ins Erwachsenenalter andauern, als ihre weiblichen Wurfgeschwister.

Teilziel 3C: Kreuzreaktivität von Seren aus Teilprojekt 1 und 2 mit Gangliosiden und Oligodendrozyten

Status: Nach 1,5 Jahren abgeschlossen.

Nach einer ZIKV-Infektion konnte eine Kreuzreaktivität von Antikörpern von Mäusen und nichtmenschlichen Primaten gegen ZIKV-E und Wirts-C1q nachgewiesen werden.

Aufgetretene Probleme

- Der Projektfortschritt und eine passende Finanzplanung wurde durch mehrfachen Personalwechsel und wiederholte Änderungen im Projektmanagement beeinträchtigt. Die Bindung von geschultem Personal erwies sich mit Zeitverträgen als schwierig und wirkte sich nachteilig auf das Projekt aus.
- Aufgrund der COVID-19-Pandemie kam es ab März 2020 zu erheblichen Beeinträchtigungen des Projekts. Am PEI waren von März bis Mai 2020 aufgrund des COVID-Lockdowns Arbeiten an Forschungsprojekten, die nicht direkt mit COVID-19 in Zusammenhang standen, nicht möglich. Im Juni 2020 wurde die Arbeit am Projekt wiederaufgenommen, obwohl die COVID-19 Beschränkungen die Arbeit bis in das Jahr 2022 weiterhin stark beeinträchtigten. Dazu gehörten (1) die Schließung eines der Forschungslabore für zwei Jahre, um den Kontakt zwischen Forschungspersonal und Amtsaufgabenpersonal zu minimieren und so das Risiko von Coronavirus-Ausbrüchen innerhalb der Abteilung zu verringern, und (2) Beschränkungen der Anzahl der Mitarbeiter, die gleichzeitig in Laboren und Büros arbeiten können.
- Die Genehmigung der Arbeiten mit Flaviviren der biologischen Schutzstufe (BSL) 3 durch die zuständige Behörde wurde erst im März 2021 erteilt. Die entsprechenden Arbeitsabläufe konnten erst mit dem Dienstantritt von Dr. Brown Anfang 2019 endgültig fixiert werden. Auch dieser Prozess wurde durch die COVID-19-Pandemie ab

März 2020 verzögert. Erst nach der Genehmigung konnten alle Viren extern beschafft werden (Europäischen Virusarchiv, EVAg <https://www.european-virus-archive.com/>), was aufgrund der Pandemie wiederum zu Verzögerungen beim Versand führte. Erst nach Erhalt der Viren konnten die neuen Vermehrungsprotokolle am PEI etabliert werden.

- Eine 8-monatige Verzögerung bei der Erneuerung unseres zuvor genehmigten Tierversuchsantrags hat den Fortschritt im Jahr 2023 erheblich beeinflusst. Überraschende Änderungswünsche der zuständigen Behörde haben verhindert, die Experimente wie ursprünglich geplant durchzuführen. Beispielsweise wurden die ursprünglich geplanten intramuskulären Immunisierungen nicht genehmigt. Das hatte zur Folge, dass die für die Verabreichung des mRNA-Impfstoffs der Viren verwendete Formulierung der Lipid-Partikel (LNPs) abgeändert werden musste. Bei der Herstellung experimenteller Flavi-LNPs-mRNA-Impfstoffe traten technische Probleme auf, die jedoch letztendlich gelöst werden konnten.
- Der Ausfall eines BSL3-Gefrierschranks Mitte 2023 führte zum Verlust aller unserer Flavivirus-Bestände, beeinträchtigte die Durchführung des Projektes erheblich.

Revisionen

- Unserem Antrag auf Verlängerung der Projektlaufzeit und -förderung bis Ende 2024 hat das BMG nicht stattgegeben. Um dem früheren Projektabschlussstermin (31.12.2023) Rechnung zu tragen, wurde im Februar 2023 ein überarbeiteter Projekt- und Förderplan genehmigt und umgesetzt. Um die Wirkung der Projektergebnisse zu maximieren, wurden sämtliche weiteren Arbeiten an den Projekten 1 und 3 gestoppt. Die Bemühungen konzentrierten sich in der Restlaufzeit auf Projekt 2 „Entwicklung von Testsystemen zur Beurteilung des infektionsfördernden Potenzials experimenteller Flavivirus-Impfstoffe“.
- Proben von menschlichen Probanden aus YFV- oder Dengvaxia-Impfkampagnen standen entgegen der ursprünglichen Planungen nicht für die Studie zur Verfügung. Impfkampagnen gegen diese tropischen Viren fanden in Deutschland nicht statt. In Asien, Afrika und Südamerika, wo Impfungen gegen diese Viren durchgeführt werden, konnten bis Mitte 2020 keine Kooperationspartner mit Zugang zu Patientenprobenmaterial gefunden werden. Weiterhin wurden Impfkampagnen gegen andere Erreger als SARS-CoV-2 durch die COVID-19-Pandemie stark beeinflusst. Daher musste auf die Untersuchung von Proben tierischer Probanden nach Impfungen ausgewichen werden.
- Der ursprüngliche Projektvorschlag war vor allem auf Mausmodelle ausgerichtet (eine Spezies, die von Natur aus nicht anfällig für eine Infektion mit Flaviviren ist). Der Einfluss der angeborenen Immunität auf die Sicherheit des Impfstoffs stand nicht im Fokus des Projektes. Da die angeborene Immunität aber für die Induktion wirksamer adaptiver Immunreaktionen sehr wichtig ist und um mit relevanterem menschlichem Probenmaterial zu arbeiten, wurde entschieden, das Projekt entsprechend auszurichten. Dazu wurden angeborene Immunreaktionen in primären menschlichen Zellen nach Inokulation mit Stamaril (abgeschwächter Lebendimpfstoff gegen YFV, Stamm 17D-204) mit den Reaktionen verglichen, die durch pathogene YFV-Stämme hervorgerufen wurden. Diese Experimente werfen Licht auf die angeborenen Immunsignaturen des Wirts, die den schützenden Wirtsreaktionen auf einen etablierten Flavivirus-Impfstoff mit einem hervorragenden Sicherheitsprofil zugrunde liegen.

7. Ergebnisse

Ziel 1: Entwicklung von Testsystemen zur Bewertung des teratogenen Potenzials einer Flavivirus-Infektion und von Modellimpfstoffen.

ZIKV ist ein von Mücken übertragenes Flavivirus, welches eine Reihe neurologischer Komplikationen verursacht, darunter angeborene Geburtsfehler wie Mikrozephalie, die bei dem Ausbruch 2015-2017 in Südamerika auftrat. Diese Pathologie ist spezifisch für ZIKV und wurde bei anderen Flaviviren nicht berichtet. Trotz des dringenden Bedarfs wurde bisher kein Impfstoff gegen ZIKV zugelassen. Masernviren (MV), die aus rekombinanten Impfstoffstämmen stammen, stellen eine vielversprechende Vektorplattform dar, um durch die Expression von Antigenen aus zusätzlichen Transkriptionseinheiten Immunität gegen fremde Krankheitserreger zu induzieren, während sie gleichzeitig ein gut etabliertes Sicherheitsprofil aufweisen.

Um das teratogene Potenzial experimenteller ZIKV-Impfstoffe zu bewerten und zu untersuchen, ob diese Impfstoffe vor ZIKV-Infektionen, virusbedingten Pathologien und transplazentarer Virusinfektion ungeborener Föten schützen, haben wir zwei experimentelle Impfstoffverabreichungsplattformen verglichen. Ein rekombinanter Schwarz-Stamm-MV wurde entwickelt, der ZIKV-prM und lösliche E-Proteine (MV-ZIKV-sE) kodiert und exprimiert (Abbildung 2A und B). Die Einfügung der ZIKV-Strukturproteine hatte keinen Einfluss auf die Replikationskinetik des MV-ZIKV-sE, die mit einem Kontroll-MV-kodierenden GFP-Konstrukt (MV-GFP) vergleichbar war.

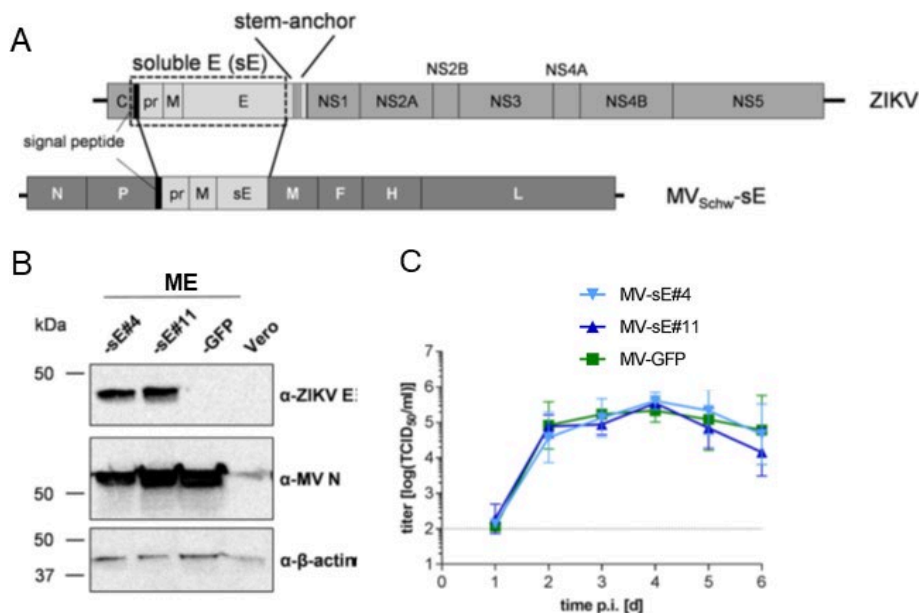


Abbildung 2. Charakterisierung von rekombinantem MV, das eine lösliche Form des ZIKV-E-Proteins exprimiert. (A) Eine verkürzte Version des ZIKV-E-Proteingens, dem die Stammankerregion fehlt, was zu sE führt, wurde zusammen mit dem prM-Gen eingefügt, dem das C-terminale Signalpeptid der Kapsidschicht vorangestellt ist. (B) Western-Blot-Analyse, bei der zwei Klone von MV-ZIKV-sE, die lösliches E kodieren (MV-sE#4 und MV-sE#11), direkt mit dem Kontrollvirus MV-GFP verglichen werden. Die Blots wurden auf die angegebenen Proteine bei den erwarteten Molekulargewichten (kDa) untersucht. (C) Wachstumskinetik der angegebenen rekombinanten MV-Stämme auf Zellen bei einer MOI von 0,03. Dargestellt sind Titer des in den Zellüberstand sezernierten Virus (D). (Abb. entnommen aus Nürnberger et al. 2019)

Als nächstes untersuchten wir, ob rekombinantes MV, das das lösliche ZIKV-prM-sE-Protein kodiert, ZIKV-E-spezifische humorale Immunreaktionen (Antikörper und T-Zellen) induziert. Für diese Experimente verwendeten wir genetisch modifizierte transgene IFNAR^{-/-}-CD46Ge-Mäuse. Das Ausschalten des Interferon-Alpha-Rezeptors (IFNAR) in diesen Mäusen ermöglicht eine robuste Infektion mit ZIKV, während die Expression des menschlichen Zelleintrittsrezeptors für Masernimpfstoffe, CD46, eine effiziente Infektion durch MV-ZIKV-sE ermöglicht und so möglicherweise die Immunreaktion verstärkt. IFNAR^{-/-}-CD46Ge-Mäuse wurden mit 5×10^4 TCID₅₀ von entweder MV-ZIKV-sE oder MV-GFP gemäß einem optimierten Prime-Boost-Schema immunisiert (Abbildung 3A). ZIKV-spezifische IgG- und ZIKV-neutralisierende Antikörper (nAb) wurden dann aus den letzten Blutproben bestimmt (Abbildung 3B und C).

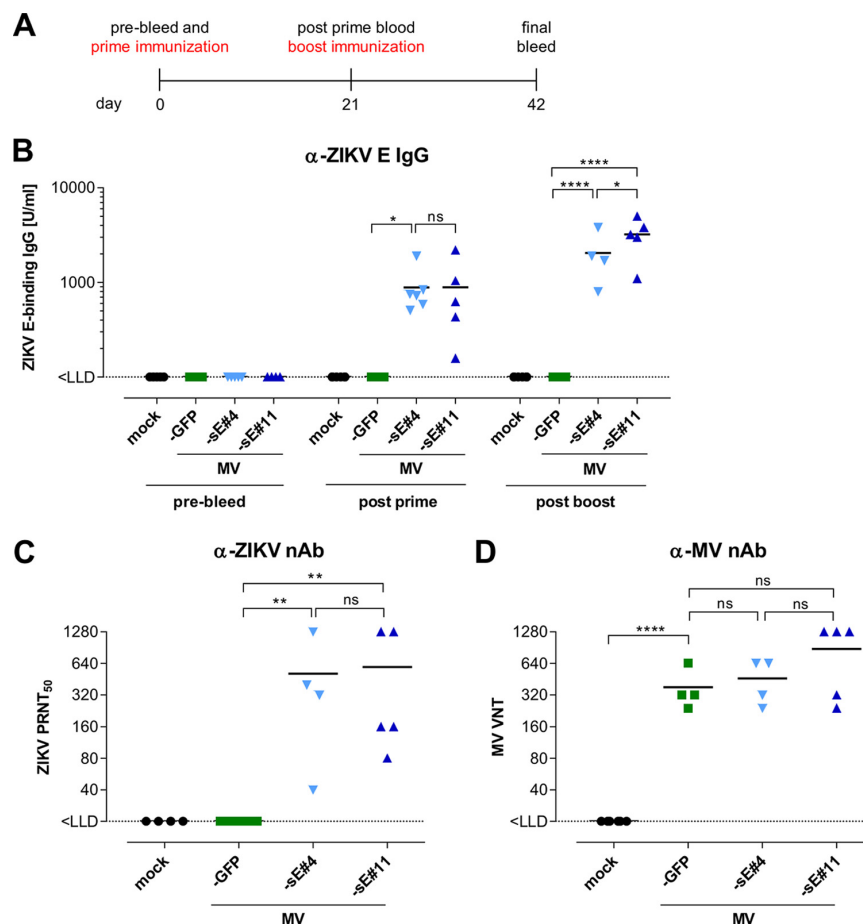


Abbildung 3. Durch humorale Immunität induzierte experimentelle MV-ZIKV-sE-Impfstoffe. (A) Cartoon-Darstellung des Impfplans für die erste Auffrischungsimpfung. IFNAR^{-/-}-CD46Ge-Mäuse (n = 4 - 6) wurden an den Tagen 0 und 21 mit den ZIKV-Impfstoffklonen MV-sE#4 oder MV-sE#11, dem MV-GFP-Impfstoffkontrollvirus oder einem Medium (Mock) immunisiert. Vor der Immunisierung und 21 Tage nach der Auffrischungsimpfung wurde Blut zur Analyse der humoralen Immunität abgenommen. (B) ZIKV-E-spezifische Gesamt-IgG-Antikörpertiter wurden durch ELISA (unteres Detektionslimit, LLD = 100 U/ml) bestimmt. (C) Funktionelle ZIKV-neutralisierende Antikörper (nAb) wurden in den Seren nach der Auffrischungsimpfung (Tag 42) durch einen Plaque-Reduktions-Neutralisationstest von ZIKV-Plaques (PRNT₅₀) auf Vero-Zellen (LLD = 20 PRNT₅₀/ml) bestimmt. (D) Titer neutralisierender Antikörper (VNT) gegen MV in Seren von Mäusen nach Auffrischungsimpfung. (Abb. entnommen aus Nürnberger et al. 2019)

Diese Experimente zeigen, dass die Immunisierung mit experimentellen MV-ZIKV-sE - Impfstoffen die Induktion von ZIKV-spezifischen IgGs bewirkt, deren Titer durch eine

Strategien nach, die für erfolgreiche Virusimpfstoffe wie Poliovirus, Grippe und Hepatitis A verwendet wurden.

Um die Schutzwirkung der verschiedenen Impfstoffplattformen gegen eine systemische ZIKV-Infektion zu beurteilen, wurden Mäuse nach dem Schema in Abbildung 5A immunisiert. Geimpfte, mit ZIKV infizierte Mäuse wurden dann wie im Labor der Kooperationspartnerin, Prof. Gabriel etabliert, in einem allogenen Trächtigkeitsmodell mit BALB/c-Mäusen gepaart, um die Schutzwirkung der Impfung auf die Übertragung zwischen Mutter und Fötus und die Entwicklung des Fötus zu beurteilen (Abbildung 6).

Die Immunisierung mit experimentellen Impfstoffen konnte ZIKV-E-bindende Antikörper induzieren, wobei MV-ZIKV-sE höhere Titer von ZIKV-spezifischem IgG hervorrief als ZPIV (Abbildung 5B). Die Kontrollimpfung mit MV-GFP und die bivalente MV-ZIKV-sE-Impfung induzierten erwartungsgemäß ebenfalls hohe Titer von MV-Antikörpern. Um die Schutzwirkung der Impfung nach der Paarung zu beurteilen, wurden trächtige Muttertiere mit lebendem ZIKV infiziert und das Körpergewicht überwacht und die Virämie verfolgt. Mit MV-ZIKV-sE geimpfte Mäuse nahmen im gleichen Maße an Gewicht zu wie nicht infizierte Tiere, während mit Kontroll-, MV-GFP- und ZPIV-geimpfte Tiere eine deutlich geringere Gewichtszunahme zeigten (Abbildung 5C). Im Einklang mit einer Schutzwirkung von MV-ZIKV-sE war die ZIKV-Virämie an den Tagen 5, 7 und 8 deutlich reduziert, während mit Kontroll-, MV-GFP- und ZPIV-geimpfte Tiere vergleichbare Mengen an zirkulierenden Viren aufwiesen (Abbildung 5D). Einen Tag nach der Infektion wurden die Tiere getötet und die ZIKV-Viruslasten in Milz, Gehirn, Leber und Gebärmutter ausgewertet (Abbildung 5E-H). In allen Organen wurden die ZIKV-Viruslasten bei mit MV-ZIKV-sE geimpften Mäusen unterdrückt, während mit MV-GFP und ZPIV geimpfte Tiere vergleichbare Mengen an geweberesidentem Virus aufwiesen (Abbildung 5E-F). Diese Daten unterstreichen die schützende Wirkung der MV-ZIKV-sE-Impfung auf trächtige Mäuse, einschließlich der Unterdrückung der zirkulierenden Virämie in den Seren und der geweberesidenten Viruslasten in Organen wie Gehirn und Gebärmutter.

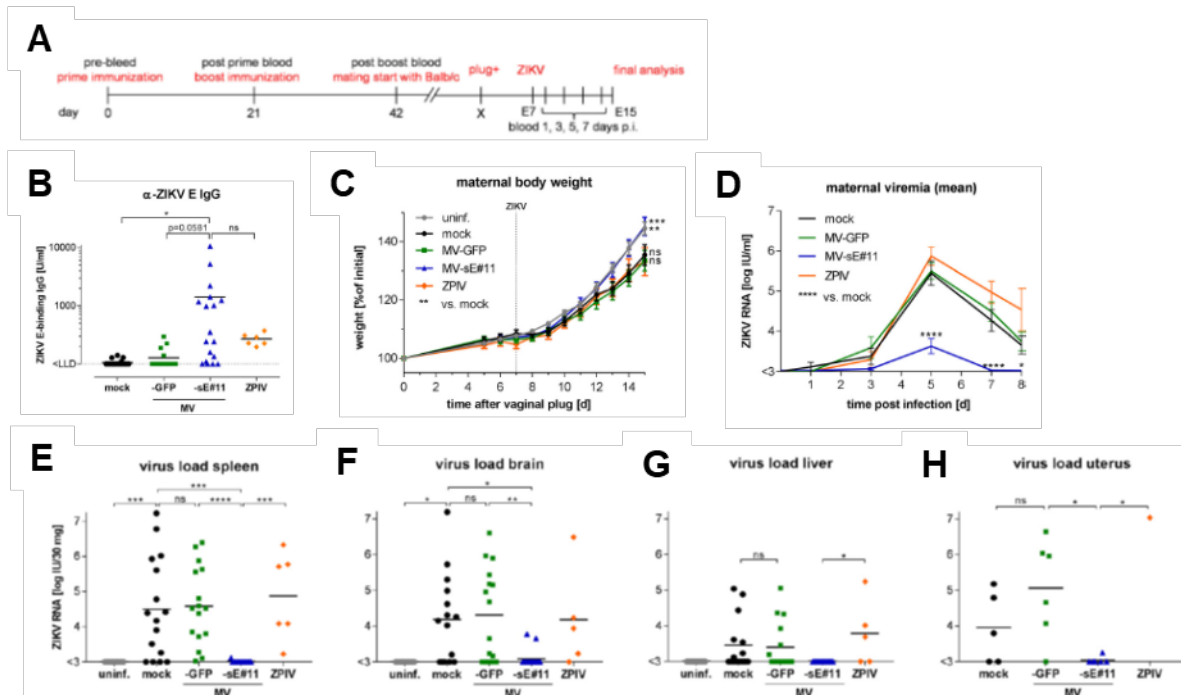


Abbildung 5. Virämie und ZIKV-Organlast sind bei mit MV-sE#11 geimpften Mäusen nach ZIKV-Infektion reduziert. (A) Cartoon-Darstellung des Impf-, Paarungs- und ZIKV- Infektionsplans. In drei unabhängigen Experimenten wurden 16-17 weibliche IFNAR^{-/-}CD46Ge-Mäuse vor der Paarung und Infektion mit ZIKV entweder mit MV-sE#11, MV-GFP oder ZPIV gemäß einem Prime-Boost-Schema immunisiert. (B) ZIKV-spezifisches IgG, nach Auffrischungsimpfung bestimmt durch ELISA. (C) Gewichtskurven trächtiger Mäuse, die mindestens 21 Tage nach der Impfung gepaart und mit lebendem ZIKV infiziert wurden. (D) Plasmavirämie infizierter Tiere an den Tagen 0, 3, 5, 7 und 8 nach der ZIKV-Infektion, bestimmt durch ZIKV RT-qPCR (Serum-RNA-Kopien). (E-H) ZIKV-Viruslasten (RNA-Kopien) in Milz, Gehirn, Leber und Gebärmutter, bestimmt durch RT-qPCR. (Abb. entnommen aus Nürnberger et al. 2019.)

Als nächstes wurde der schützende oder potentielle teratogene Effekt der Impfung auf die mütterliche Plazenta und die Übertragung von ZIKV auf Föten untersucht (Abbildung 6). Föten von nicht infizierten oder MV-sE#11 geimpfte Muttertiere wiesen eine ähnlich gesunde Größe und Erscheinung auf, während Kontrolltiere sowie mit MV-GFP und ZPIV geimpfte Tiere insgesamt kleiner und blasser aussahen (Abbildung 6A). Tatsächlich verdeutlichte die Quantifizierung des Fötusgewichts, der Fötusgröße und des Plazentagewichts die teratogenen Effekte einer ZIKV-Infektion und belegte den Schutz auch der Föten durch die Immunisierung mit MV-sE#11. Föten und Plazenten von nicht infizierten oder mit MV-sE#11 geimpften Muttertieren wiesen ähnliche Gewichte/Größen auf, wobei bei infizierten Kontrolltieren sowie mit MV-GFP und ZPIV geimpften Tieren geringere Gewichte und Größen der Föten beobachtet wurden (Abbildung 6B-D). Um zu bestätigen, dass die beobachteten Anomalien der Föten in den Kontroll-, MV-GFP- und ZPIV-Gruppen auf eine mütterliche Übertragung von ZIKV zurückzuführen sind, wurde die Viruslast in der Plazenta (Abbildung 6E) mittels ZIKV RT-qPCR bestimmt. Diese Analyse bestätigte eine hohe Viruslast in den Plazenten der Kontrollgruppe sowie der mit MV-GFP und ZPIV geimpften Gruppen. Im Gegensatz war bei den mit MV-sE#11 geimpften Tieren eine signifikante Reduktion der Viruslast zu beobachten. Im Einklang mit diesem Befund gab es bei den mit MV-sE#11 geimpften Tieren keine Föten, bei denen sich eine Infektion mit dem Virus nachweisen ließ (Abbildung 6E). Ebenso war die Überlebensraten der Föten mit denen nicht infizierter Tiere vergleichbar (Abbildung 6F).

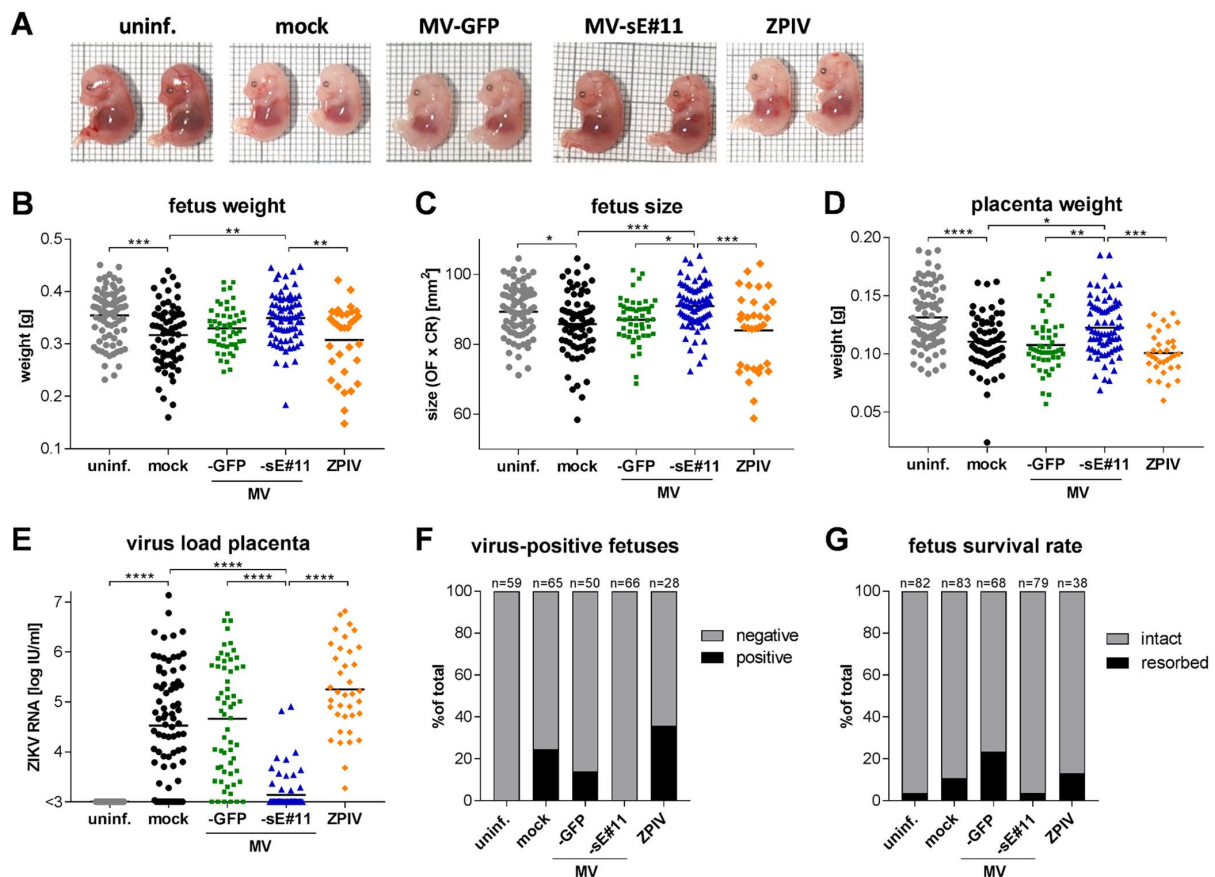


Abbildung 6. Föten von mit MV/ZIKV geimpften trächtigen Mäusen sind während der ZIKV-Exposition vor teratogenen Effekten geschützt. Föten von infizierten trächtigen Muttertieren, die in Abbildung 5 gezeigt sind, wurden entnommen und auf phänotypische Veränderungen untersucht. (A) Repräsentative Bilder von jeweils zwei Föten aus verschiedenen Gruppen zum Zeitpunkt der Entnahme. (B-D) Fötusgewicht (B) und -größe (C) sowie Plazentagewicht (D) aus den angegebenen Gruppen. (E und F) ZIKV-RNA-Kopienzahlen in einem 30 mm³ großen Stück Plazenta (E) und Signale für ZIKV-RNA über der Nachweisgrenze (100 Kopien) in Fötusköpfen (F), bestimmt durch RT-qPCR. (G) Fötale Überlebensraten in den angegebenen Gruppen. Resorptionsraten bei Muttertieren nach ZIKV-Exposition weisen auf den Tod des Fötus hin. (Abb. entnommen aus Nürnberger et al. 2019.)

Diese Ergebnisse zeigten, dass der rekombinante Impfstoff auf MV-Basis starke Immunreaktionen bei Mäusen auslöste und vor einer Infektion mit dem ZIKV schützte. Der Impfstoff rief spezifische Antikörper gegen das Hüllprotein des ZIKV hervor und induzierte zelluläre Immunreaktionen. Die Impfung mit MV-ZIKV-sE verringerte die ZIKV-Last in verschiedenen Organen und der Plazenta und verhinderte eine transplazentare Infektion des Fötus. Bei mit MV-ZIKV-sE geimpften Muttertieren wurden keine fötalen Wachstumsverzögerungen, Anämie oder Todesfälle aufgrund einer ZIKV-Infektion beobachtet. Im Gegensatz dazu hatte der inaktivierte ZIKV-Impfstoff wenig bis gar keine Wirkung beim Schutz vor einer ZIKV-Infektion und der entsprechenden teratogenen Wirkungen. Der Inaktivat-Impfstoff induzierte lediglich Antikörperreaktionen, die jedoch nicht ausreichten, um Schutz zu bieten. Insgesamt zeigte die Studie das Potenzial des rekombinanten Impfstoffs auf MV-Basis als vielversprechender Kandidat zur Vorbeugung einer ZIKV-Infektion während der Schwangerschaft und zur Verhinderung teratogener Wirkungen auf die fötale Entwicklung. Die Fähigkeit des Impfstoffs, starke Immunreaktionen hervorzurufen und in einem Tiermodell vor einer Infektion mit dem ZIKV zu schützen, weist auf sein Potenzial für eine weitere Entwicklung hin.

Ziel 2: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des infektionsverstärkenden Potenzials von Flavivirus-Modellimpfstoffen

Um festzustellen, ob experimentelle Flavivirus-Impfstoffkonstrukte das Potenzial haben, kreuzreaktive und infektionsverstärkende Reaktionen hervorzurufen, konzentrierten wir uns auf vier pathogene Flaviviren (JEV, WNV, YFV und ZIKV), die beim Menschen schwere Krankheiten verursachen und deren geografische Verbreitung sich überschneidet. Um kreuzreaktive Reaktionen hervorzurufen, müssen die Strukturproteine dieser verschiedenen Viren ein gewisses Maß an struktureller oder antigener Konservierung aufweisen. Um dies herauszufinden, untersuchten wir zunächst die genetische Verwandtschaft dieser Viren, indem wir eine phylogenetische Analyse der Gensequenzen durchführten, die das E-Protein verschiedener von Mücken übertragener Flaviviren kodieren, und die Positionen unseres Virenpanels im resultierenden Evolutionsbaum hervorhoben (Abbildung 7A). Die Zusammensetzung und Freisetzung von Flaviviren aus Zellen erfordert die Expression von zwei viralen membrangebundenen Proteinen, E und prM. Wir bestätigten das Vorhandensein essentieller funktioneller Domänen und Spaltstellen für Wirtspoteasen in den translatierten Aminosäuren mithilfe bioinformatischer Vorhersagewerkzeuge vor der Gensynthese (Abbildung 7B). Die translatierten Aminosäuresequenzen wurden dann verglichen, um die antigene Verwandtschaft der kodierten Proteine zu bestimmen (Abbildung 7C). Diese Analysen zeigen, dass das E-Protein (42-77 % Identität) einen ähnlichen Konservierungsgrad wie das M-Protein (38-80 %) aufweist. WNV und JEV zeigten den höchsten Konservierungsgrad des E-Proteins (77 %), während YFV und ZIKV den niedrigsten (42 %) zeigten. Plasmidkonstrukte, die die Strukturproteine prM und E von JEV, WNV, YFV und ZIKV kodieren, wurden erzeugt (Abbildung 7D) und in HEK293T-Zellen transfiziert, um Flavi-VLPs zu produzieren. Western Blotting gereinigter Flavi-VLP-Präparate für das hochkonservierte Fusionspeptid ergab für alle Präparate korrekt verarbeitetes E-Protein bei 55 kd (Abbildung 7E).

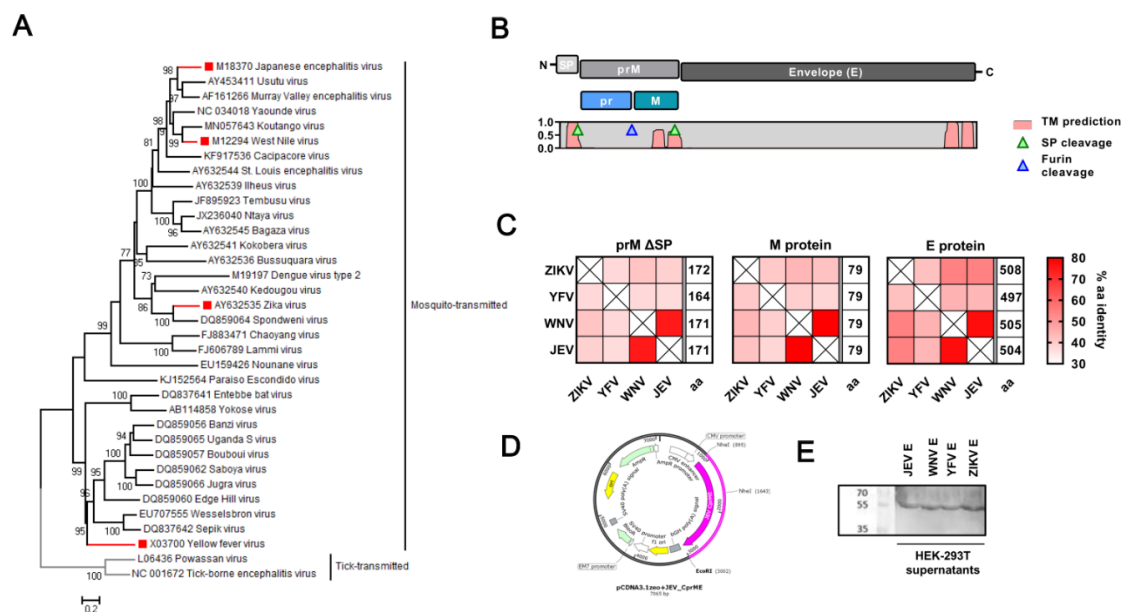


Abbildung 7. Genetische und antigene Vielfalt pathogener Flaviviren. (A) Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse der von Moskitos übertragenen Flaviviren. Ausgewählte pathogene Stämme, die Menschen infizieren und in dieser Studie untersucht wurden, sind rot hervorgehoben. (B) Schematische Darstellung der Strukturproteine des Flavivirus. SP: Signalpeptid. prM: Prämembran. M: Membran. Die vorhergesagten Positionen der Transmembrandomänen (TM) und der Schnittstelle zur Wirtspotease sind

unten angegeben. (C) Heatmaps, die die prozentuale Aminosäureidentität der drei codierten Strukturproteine zwischen ausgewählten Stämmen (JEV: SA 14-14-2, WNV: NY99, YFV: 17D, ZIKV: H/PF/2013) darstellen, die für die Flavi-VLP-Produktion verwendet wurden. Die Zahlen in den Kästchen geben die Aminosäurelänge der jeweiligen Proteine an. (D) Beispiel einer Plasmidkarte des Konstrukts, das für die Flavi-VLP-Produktion verwendet wurde. (E) Gereinigte Flavi-VLPs, die nach Plasmidtransfektion aus HEK-293T-Zellen gewonnen wurden. Die Western-Blot-Analyse zeigte bei allen Transfektionen korrekt verarbeitetes E-Protein bei 55 Kd.

Um zu untersuchen, ob Flavi-VLPs immunogen sind und kreuzreaktive Antikörper erzeugen, wurden Kaninchen subkutan mit 300 µg gereinigten WN-VLPs, gemischt mit Sigma Adjuvant System (Verhältnis 1:1 pro Immunisierung), gemäß dem in Abbildung 8A beschriebenen homologen Prime-Boost-Schema immunisiert. Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität von Antikörpern, die durch WN-VLP-Immunisierungen induziert werden, erfolgte ein Vergleich der induzierten Antikörper mit denen, die durch eine natürliche Flavivirus-Infektion (ZIKV: H/PF/2013) erzeugt wurden. Seren von WN-VLP-immunisierten und ZIKV-infizierten Tieren wurden in einem ZIKV PRNT₅₀-Test, der auf Vero E6 durchgeführt wurde, verglichen (Abbildung 8B und C). Diese bestätigten Daten, dass Antikörper, die gegen eine natürliche ZIKV-Infektion erzeugt wurden, hochwirksam bei der Neutralisierung einer homologen ZIKV-Infektion von Vero E6-Zellen in einem PRNT-Test sind. Sie bestätigen auch, dass eine Impfung mit verwandten Immunogenen (WN-VLPs) kreuzreaktive, schwach neutralisierende Antikörperreaktionen auf ein heterologes Flavivirus (ZIKV) erzeugen kann.

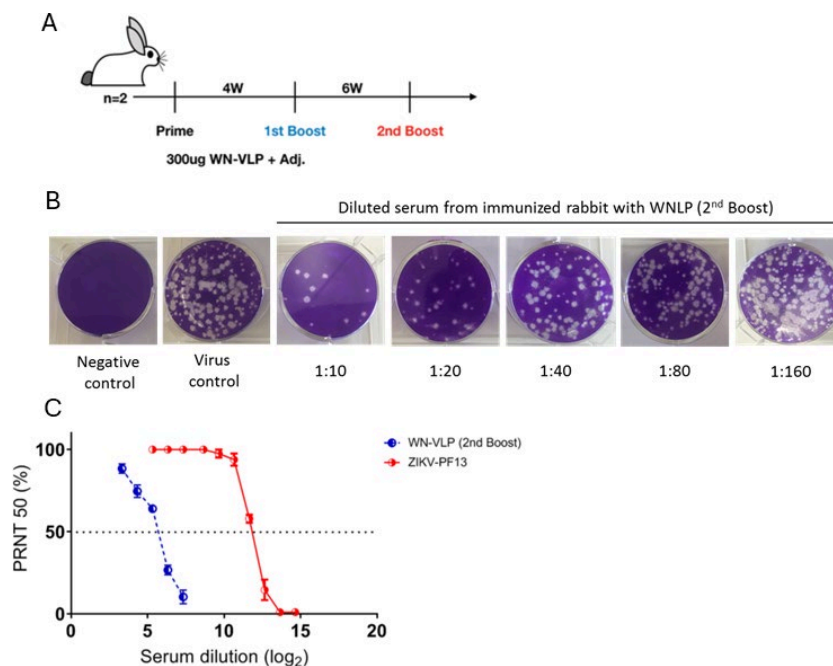


Abbildung 8. WN-VLP-Immunisierungen erzeugen schwach neutralisierende Antikörper gegen ZIKV. (A) Schematische Darstellung des Prime-Boost-Impf- und Blutentnahmeschemas. Kaninchen wurden sowohl mit WN-VLPs immunisiert als auch mit lebendem ZIKV (Stamm PF13) infiziert. (B) Beispielvertiefungen für PRNT-Test zur Bewertung der Neutralisierungskapazität von Kaninchenseren. (C) PRNT₅₀-Test bestimmt die Serumneutralisierung gegen eine ZIKV-Infektion von VeroE6. Blau. WN-VLP-Immunsere. Rot. ZIKV-Immunsere.

Gruppen von BALB/c-Mäusen wurden dann subkutan mit 10 µg gereinigten Flavi-VLPs, gemischt mit Sigma Adjuvant System (Verhältnis 1:1 pro Immunisierung), gemäß dem in Abbildung 9A beschriebenen homologen Prime-Boost-Schema immunisiert. Um das gesamte gegen homologe Flavi-VLPs hervorgerufene IgG zu quantifizieren, wurden

serielle Verdünnungen von Immunsereen mit fixiert transfizierten VeroE6-Zellen inkubiert, die geeignete Flavi-VLP-Expressionsvektoren exprimierten, und die Titer bindender Antikörper wurden mithilfe eines Immunpräzipitationstests mit limitierender Verdünnung berechnet. (Abbildung 9B, obere Tafeln).

Da viele wirksame Impfstoffe inaktivierte Viren verwenden, um schützende Immunreaktionen hervorzurufen (z. B. Hepatitis A, Grippe, Polio) wurden Mäuse zu Vergleichszwecken auch mit einem adjuvantierten, formalinaktivierten ZIKV (ZPIV) immunisiert, bei Anwendung desselben Prime-Boost-Schemas. ZPIV löste ein ähnliches humorales Reaktionsprofil aus wie die Flavi-VLPs, wobei die Anzahl der bindenden Antikörper durch die Verstärkung zunahm (Abbildung 9B, unteres linkes Feld). Obwohl immunkompetente Mäuse wenig anfällig für eine Infektion mit Flaviviren sind, führten wir auch Infektionen von Mäusen mit ZIKV nach demselben Prime-Boost-Schema durch. Eine Infektion mit lebendem ZIKV führte zu einer schnellen Induktion von ZIKV-spezifischen bindenden IgGs, obwohl im Gegensatz zu Flavi-VLPs und ZPIV kein Verstärkungseffekt beobachtet wurde (Abbildung 9B, unteres rechtes Feld). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass adjuvantierte Flavi-VLPs bei Mäusen hochgradig immunogen sind und spezifische bindende Antikörper gegen homologe strukturelle Flavivirus-Proteine induzieren.

Um die Kreuzreaktivität von bindenden Antikörpern zu bewerten, die gegen strukturelle Flavi-VLPs induziert wurden, untersuchten wir, ob Serum von Mäusen, die mit spezifischen Flavi-VLPs immunisiert wurden, Kreuzreaktivität mit einem heterologen Flavivirus-Antigen zeigte. Um die bindenden IgGs zu quantifizieren, die gegen heterologe Flavi-VLPs gebildet wurden, wurden serielle Verdünnungen von Immunsereen mit Zellen inkubiert, die Flavi-VLP-Expressionsvektoren exprimierten, und die Titer der bindenden Antikörper wurden mithilfe einer IPMA mit limitierender Verdünnung berechnet (Abbildung 9C). Diese Daten zeigen, dass Seren von Mäusen, die mit Flavi-VLPs immunisiert wurden, heterologe Flavivirus-Antigene erkennen konnten. Darüber hinaus waren die verstärkenden Effekte des Prime-Boost-Regimes gegen heterologe Antigene weithin sichtbar. Seren von Mäusen, die mit Flavi-VLPs und ZPIV-ZIKV immunisiert oder mit lebendem ZIKV infiziert wurden, konnten auch lebendes ZIKV-Antigen in infizierten, fixierten VeroE6-Zellen erkennen.

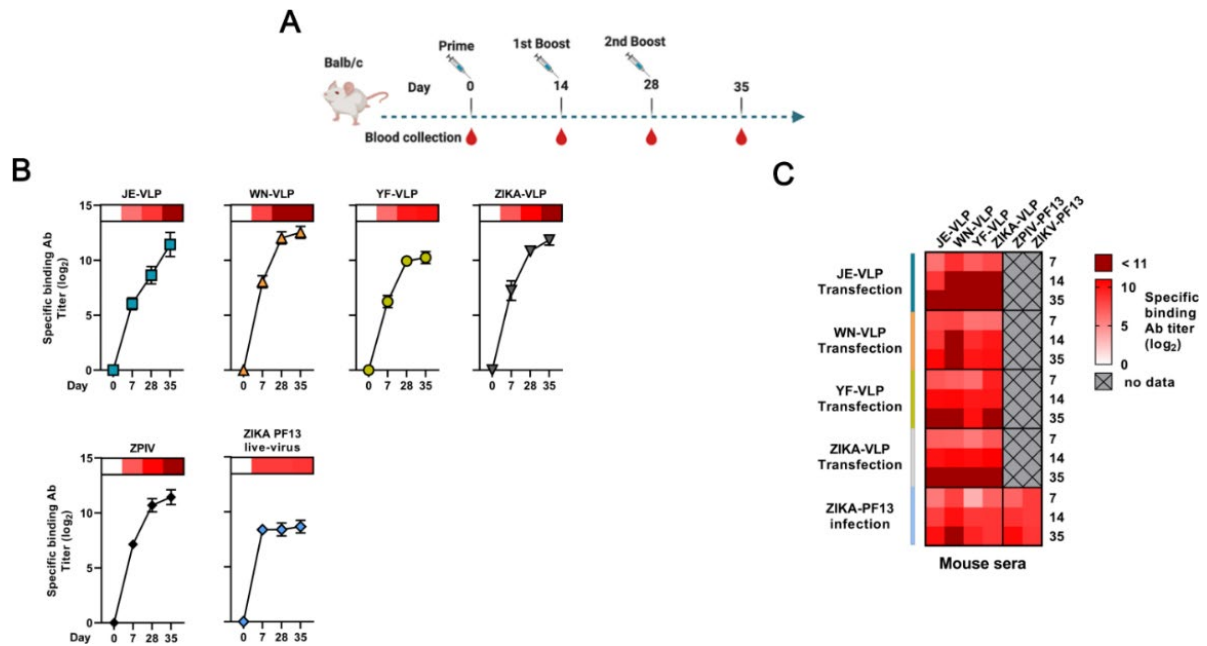


Abbildung 9. Flavi-VLPs induzieren immunogenspezifische und kreuzreaktive Antikörper in Mäusen. (A) Schematische Darstellung des Prime-Boost-Impf- und Blutentnahmeschemas für BALB/c-Mäuse. Die Mäuse wurden sowohl mit Flavi-VLPs als auch mit formalininaktiviertem ZIKV (ZPIV) immunisiert. (B) Endpunkttiter autologer bindender IgG-Antikörper in Immunsere von Mäusen, die gegen die jeweiligen Flavi-VLPs, ZPIV und eine Lebendvirusinfektion mit ZIKV gebildet wurden, bestimmt mittels IPMA in VeroE6-Zellen nach Plasmidtransfektion. (C) Heatmap zeigt die Kreuzreaktivität der durch Immunisierung und Infektion gebildeten Antikörper. Endpunkttiter kreuzreaktiver bindender Gesamt-IgG-Antikörper aus Immunsere von Mäusen, die gegen heterologe Flavi-VLP-Antigene, ZPIV und eine Lebendvirusinfektion mit ZIKV gebildet wurden, gemessen mittels IPMA in VeroE6-Zellen nach Plasmidtransfektion.

Um zu beurteilen, ob durch Flavi-VLP induzierte Antikörper eine Neutralisierung oder ADE fördern, wurde ein auf Durchflusszytometrie basierender Test entwickelt. K562-Zellen wurden als eine menschliche Suspensionszelllinie identifiziert, die von Natur aus anfällig für eine Infektion mit Flaviviren über klassische virale Eintrittswege ist, aber auch den FC-gamma-Rezeptor (FcγR II: CD36) exprimiert. Die Infektion von K562-Zellen wurde in Gegenwart von Immunsere von BALB/c-Mäusen durchgeführt, die mit heterologen Flavi-VLP-Immunogenen geimpft wurden. Das Neutralisierungs- oder ADE-Potenzial der Immunsere wurde dann sowohl für ZIKV als auch für YFV bewertet (Abbildung 10).

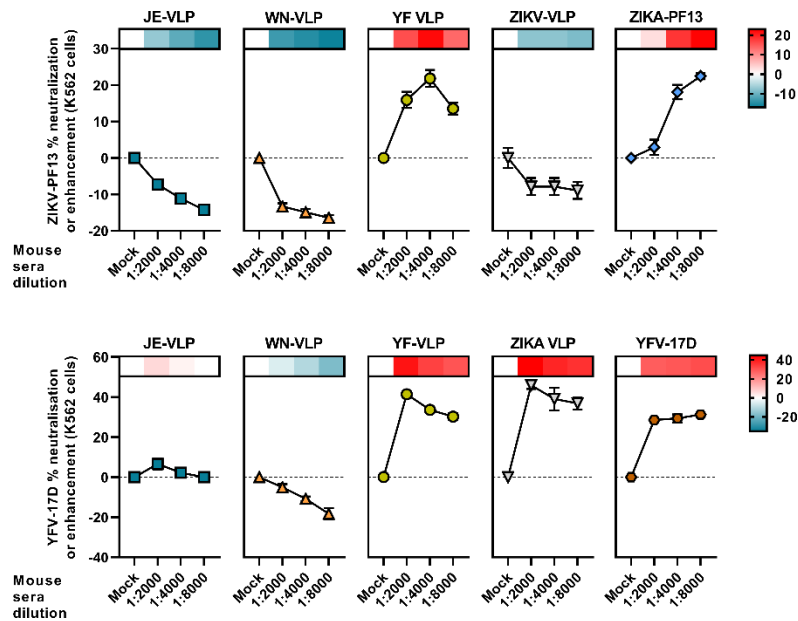


Abbildung 10. Flavi-VLPs induzieren Antikörper, die die Infektion verstärken und neutralisieren: Die durch Flavi-VLP induzierte Immunität von Mäusen verstärkt oder neutralisiert die ZIKV- oder YFV-Infektion von K562-Zellen. Serumpool (n=5 Mäuse) von geimpften Mäusen, die entweder mit ZIKV-PF13 (oberes Feld) oder YFV-17D (unteres Feld) inkubiert wurden. Der Maßstab stellt die Virusneutralisierung (blau) oder die ADE-Verstärkung (rot) dar.

Immunisierung und Infektion induzierten die Produktion von Antikörpern, die sowohl die Neutralisierung als auch die ADE von ZIKV und YFV in K562-Zellen vermitteln. Paradoxe Weise erhöhte in einigen Fällen eine Verringerung der Konzentration von Immunsereinen die Neutralisierung oder ADE, was bedeutet, dass beide Antikörpertypen in ausgewählten Immunsereinen vorhanden sind, wobei Unterschiede in Titer und Wirksamkeit zwischen den Antikörpertypen erkennbar sind. Diese Daten unterstreichen das Potenzial zur Induktion kreuzreaktiver ADE bei der Entwicklung von Flavivirus-Impfstoffen.

Ungespaltenes prM auf der Oberfläche unreifer Flavivirus-Virionen wurde als möglicher Mediator kreuzreaktiver Flavivirus-Antikörper beschrieben. Eine effiziente Spaltung von prM durch Furin ist für die Präsentation des reifen homodimeren E-Proteins auf der Virionenoberfläche erforderlich, und die Anwesenheit von ungespaltenem prM beeinflusst wahrscheinlich die Immunogenitätsprofile von Flavivirus-VLPs (Strukturen reifer und unreifer Viren in Abbildung 11A). Die Furin-Spaltstelle ist zwischen verschiedenen Flaviviren stark konserviert (Abbildung 11B). Die Furin-Expressionsniveaus unterscheiden sich jedoch zwischen Zelllinien, was zur Produktion gemischter Populationen reifer und unreifer Partikel führt. Daher wurde eine modifizierte HEK-293T-Zelllinie für eine stabile humane Furin-Expression entwickelt, um die prM-Verarbeitung und die Produktion von VLPs mit reifen strukturellen Proteinkonformationen zu maximieren.

Ein weiterer potenzieller Mediator von ADE-induzierenden Antikörpern ist das Fusionspeptid (FP), eine 16 Aminosäuren lange Region im E-Protein, die bei den unterschiedlichen, von Mücken übertragenen Flaviviren hochkonserviert ist (Abbildung 11C und D). Es wurde bereits gezeigt, dass W101A-Mutationen die Membranfusionsaktivität der E-Proteine aufheben und Immunreaktionen auf das FP reduzieren. Vor diesem Hintergrund haben wir neue Flavi-VLP-Konstrukte mit W101A-

Mutationen im FP von E entwickelt. Folglich werden WT- und W101A-Flavi-VLPs in HEK-293T- und HEK-293T-huFurin-Zellen produziert. Diese Änderungen am Flavi-VLP-Produktionsprotokoll sollten die prM-Verarbeitung und die Inaktivierung der Fusionschleife maximieren und möglicherweise das Gleichgewicht der durch Impfung erzeugten Antikörper in Richtung Virusneutralisierung und weg von Kreuzreaktivität und ADE verschieben.

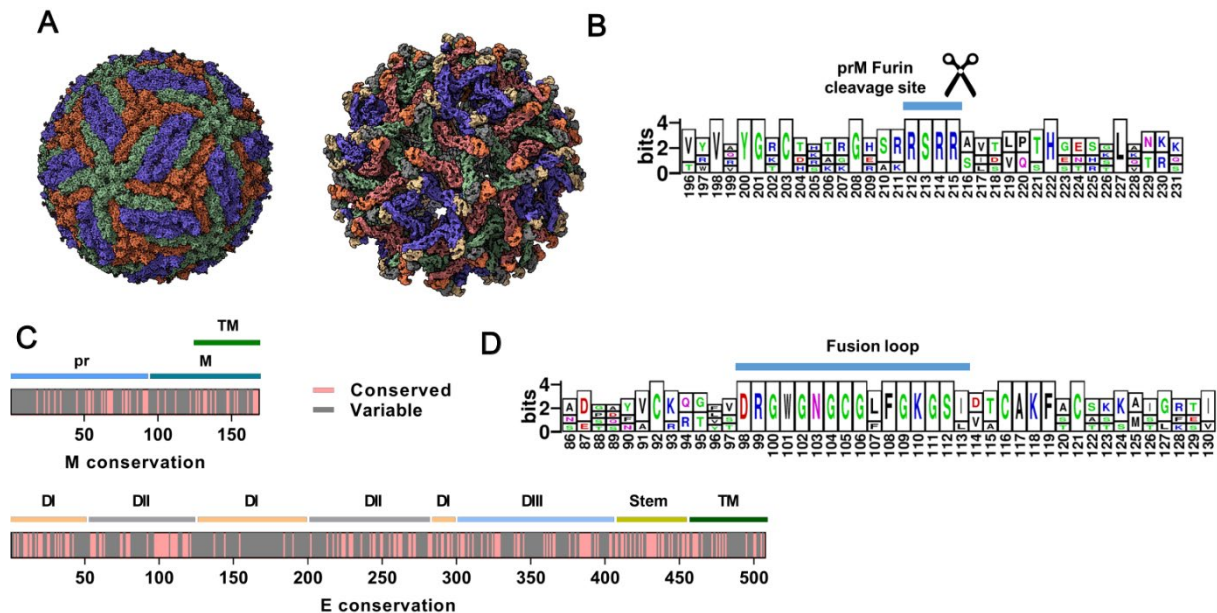


Abbildung 11. Potentielle virale Mediatoren von Kreuzreaktionen. (A) Vergleich der Strukturen reifer (links) und unreifer (rechts) ZIKV-Virionen (PDB-Zugangsnummern 6C08 bzw. 1NA4). Der Übergang von unreifen zu reifen Virionen wird durch die Furin-abhängige Spaltung von prM/M vermittelt. (B) Das Logo der Aminosäuresequenz zeigt die Konservierung der Furin-prM/M-Spaltstelle in unserem Panel divergierender Flavi-VLP-Konstrukte. (C) Das Diagramm zeigt konservierte (rot) und variable (grau) Aminosäurereste in den Membran- (oben) und Hüllproteinen (unten). Funktionelle Proteindomänen sind unter jedem Diagramm hervorgehoben. (D) Das Logo der Aminosäuresequenz zeigt die Konservierung des 16-Aminosäure-Fusionspeptidmotivs in DII von E.

Mit der Idee, diese modifizierte Immunogene zu evaluieren, wurde der überarbeitete Arbeitsplan für 2023 (genehmigt im Februar 2023) wie folgt umgesetzt:

Flavi-VLPs der ersten (WT) und zweiten (W101A) Generation wurden in großem Maßstab für WNV- und ZIKV-Konstrukte produziert und gereinigt (siehe Tabelle 1: Viren, für die es keine zugelassenen Impfstoffe für Menschen gibt, wurden bevorzugt behandelt). Die Sekretion der Flavi-VLPs in den Überstand wurde durch Western Blotting der viralen Strukturproteine mit kommerziellen monoklonalen Antikörpern bestätigt. Die Langzeitstabilität der Antigene bei -20 °C wurde ebenfalls durch Western Blotting bestätigt. Die erfolgreiche Produktion von Flavi-VLPs der 1. und 2. Generation für Mausimmunisierungen wurde erreicht.

Tabelle 1 1. und 2. Generation Flavi-VLPs

Plasmid	Produzentenzellen
WNV sp - prM -E_WT	HEK-293T
ZIKV sp - prM -E_WT	HEK-293T
WNV sp-prM-E_W101A	HEK-293T [huFurin]

Plasmid	Produzentenzellen
ZIKV sp-prM-E_W101A	HEK-293T [huFurin]

Wir haben experimentelle RNA-Impfstoffe in unseren überarbeiteten Projektplan für 2023 aufgenommen. Diese Impfstoffkonstrukte liefern mRNA-Immungene, die in Lipidnanopartikel (LNP) eingekapselt sind, um die Freisetzung zu maximieren (Abbildung 12A). Basierend auf dem Erfolg der mRNA-LNP-Impfung gegen SARS-CoV-2 haben wir diese hochmoderne Impfstofftechnologie in unsere Projektplanprotokolle integriert, um die Sicherheit von Flavivirus-Impfstoffen (Flavi-LNPs) zu bewerten. Begründung für diese Aufnahme war (1) die nachgewiesene Wirksamkeit von mRNA-LNP-Impfstoffen bei der Auslösung schützender Immunreaktionen, (2) das hervorragende Sicherheitsprofil mRNA-LNP-basierter Impfstoffe, darunter keine gemeldeten Fälle von impfstoffinduzierter ADE, und (3) die seit kurzem verfügbare Instrumentierung zur Produktion von mRNA-LNPs im Forschungslabormaßstab (Ignite NanoAssemblr).

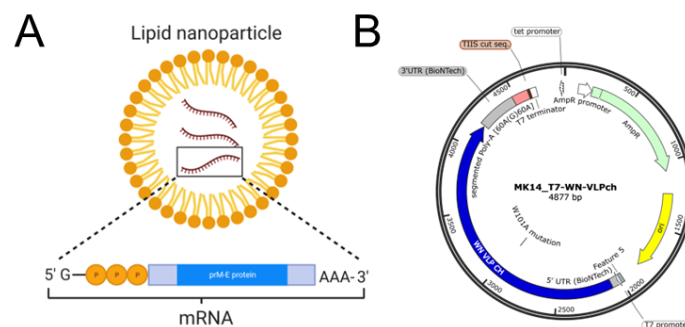


Abbildung 12. mRNA-Impfstoffe gegen Flaviviren. (A) Flavi-LNP-Zusammensetzung. (B) MK14-Plasmidkarte mit kodierten Strukturgenen des Flavivirus (WNV) (blau), flankierenden UTRs (grau) und PolyA + Schwanz (rosa) hervorgehoben

Umfangreiche Tests von Impfstoff-Vektorplattformen haben den Vektor MK14 als ideal für die Produktion von 5'-gekapselter Flavi-mRNA vor der Einkapselung in LNPs identifiziert. Sequenzen, die WNV- und ZIKV-Strukturproteine (sp-prM-E WT und W101A) kodieren, wurden erfolgreich in den Vektor MK14 geklont und durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung 12B). Linearisierte Plasmidvorlagen wurden für die Reverse Transkription kodierter Flavi-mRNAs vor der Einkapselung in LNPs verwendet. Die LNP-Formulierung und die Flavi-mRNA-Einkapselung wurden mithilfe der Ignite NanoAssemblr-Plattform optimiert. Die Länge des PolyA+-Schwanzes stromabwärts des 3'UTR (>100 Nukleoside) wurde als entscheidend für den Erfolg der mRNA-Expression in Zellen/Gewebe nach der LNP-Abgabe identifiziert. Daher wurden alle Flavi-LNP-Konstrukte so konstruiert, dass sie PolyA+-Schwanzsequenzen mit 150-200 Nukleosiden enthalten. Der Entwurf und die Konstruktion von Flavi-mRNA-Impfstoffplasmiden sowie Protokolle für die mRNA-Produktion und -Einkapselung in LNPs zur Immunabgabe wurden erfolgreich durchgeführt.

Charakterisierung von Flavi-VLP und Flavi-LNP:

Die Sekretion von Flavi-VLP aus Produzentenzellen wurde durch Western Blot Analysen bestätigt, wobei die Erkennung des E-Antigens in transfizierten HEK-293T-Zellüberständen mit kommerziellen monoklonalen Antikörpern durchgeführt wurde. Die

Nanosight-Charakterisierung von Flavi-VLPs schlug aufgrund ihrer geringen Größe (<100 nm) fehl.

Die Charakterisierung von Flavi-VLPs mittels Elektronenmikroskopie (EM) war teilweise erfolgreich, die Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass zur Verbesserung der Spezifität ein Antikörperfärbeschritt erforderlich ist. Die LNP-Abgabe von eingekapselten Flavi-mRNAs an eine Zelllinie wurde durch E-Antigenexpression bestätigt, die durch Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung des handelsüblichen Anti-E-Antikörpers 4G2 bestimmt wurde (Abbildung 13). Diese Daten bestätigten, dass Flavi-mRNAs durch LNP-Abgabe erfolgreich an Zellen abgegeben werden und die abgegebenen mRNAs erfolgreich in Proteine übersetzt werden, die zytoplasmatisch lokalisiert sind.

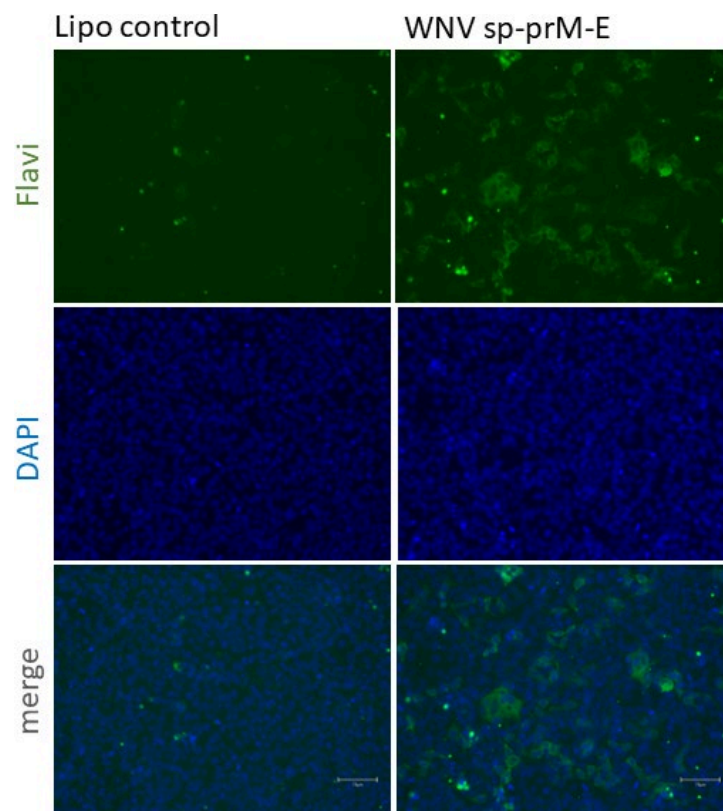


Abbildung 13. Die Verabreichung des Flavi-LNP-mRNA-Impfstoffs führt zur Expression des Flavivirus-E-Antigens in HEK-293T-Zellen. Beispielbilder zeigen, dass leere LNPs (linke Tafeln) oder LNPs, die WNV sp-prM-E-kodierende RNAs einkapseln, an HEK-293T-Zellen verabreicht wurden. Obere Tafeln. Färbung des Flavivirus-E-Antigens (grün). Mittlere Tafeln. Kernfärbung mit DAPI (blau). Untere Tafeln. Zusammengeführte E- und DAPI-Bilder

Immunisierungen von Mäusen:

Die Immunisierung der Mäuse mit Flavi-VLPs und Flavi-LNPs wurden gemäß zuvor etablierten Priming-Boost-Schemata geplant. Parallele Immunisierungen mit Stamaril (Stamm YFV-17D) waren als positive Kontrollen und PBS-geimpfte Tiere als negative Kontrollen geplant. Ein überarbeiteter Tierversuchsantrag, der LNP-mRNA- und Stamaril-Impfungen umfasste, wurde Anfang 2023 bei der zuständigen Behörde eingereicht. Aufgrund umfangreicher Änderungen an unserem bereits genehmigten Tierversuchsantrag durften wir diese Versuche nicht beginnen, bevor die Genehmigung erteilt wurde. Dieser Prozess dauerte über acht Monate, wobei mehrere Änderungsrounds durchlaufen wurden.

Aufgrund von Einschränkungen seitens der zuständigen Behörde bzgl. der intramuskulären Immunisierung von Mäusen (die zuvor genehmigt worden war) mussten unsere anfänglich geplanten LNP-Formulierungen für die Flavi-mRNA-Abgabe (geladenes Lipid zur Verkapselung) überarbeitet werden. Für die intraperitoneale Immunisierung (die einzige uns noch verbleibende Immunisierungsmethode) mussten neutrale Lipide zur Verkapselung verwendet werden, wodurch unsere ursprünglichen Flavi-LNPs unbrauchbar wurden. Aufgrund dieser unvorhergesehenen Probleme konnten wir die Immunisierungen nicht bis Ende 2023 abschließen und die Immunsereen für Neutralisations-/ADE-Tests auswerten. Die Experimente und die Datenauswertung werden nach dem Ende des Projektfinanzierungszeitraums in 2024 fortgesetzt und von alternativen Quellen und externen Partnern finanziert.

Die Verfahren für die terminale Blutentnahme und Milzisolierung von Mäusen wurden optimiert. Plasma wird aus dem Vollblut isoliert (300-600 µl/Tier durch Herzpunktion) und Milzzellensuspensionen wurden zur Lagerung bei -80° C für die nachfolgenden ELISpot- und FACS-Tests vorbereitet. Die Bewertung der Antikörperbindung und Kreuzreaktivität von Mausimmunsereen wurde mithilfe eines Enzymimmunoassays (ELISA) durchgeführt. Die ELISA-Protokolle wurden mithilfe von PFA-inaktivierten Viren, die an eine Platte gebunden sind, optimiert, um die Antigenbindung und Kreuzreaktivität zu bewerten. Der ELISA ersetzt den vorherigen Immunpräzipitationsmonolayer-Test (IPMA), der benutzerspezifischen Verzerrungen unterlag. Die Bewertung des Flavivirus-Neutralisierungspotenzials von durch Impfstoffe induzierten Antikörpern in Mausimmunsereen wird mithilfe des PRNT durchgeführt, dem Goldstandardtest für durch Impfstoffe induzierte Antikörperneutralisierung. Zu diesem Zweck wurden VeroE6-Lebendvirusinfektionen mit Flaviviren in Gegenwart von seriellen Verdünnungen von Mausimmunsereen durchgeführt. Mithilfe archivierter Seren von mit Stamaril geimpften Kaninchen wurde die YFV-Infektion von VeroE6-Zellen dosisabhängig blockiert (Abbildung 14). Wir haben erfolgreich den PRNT-Test etabliert, um das virusneutralisierende Potenzial von durch Impfstoffe induzierten Antikörpern zu quantifizieren.

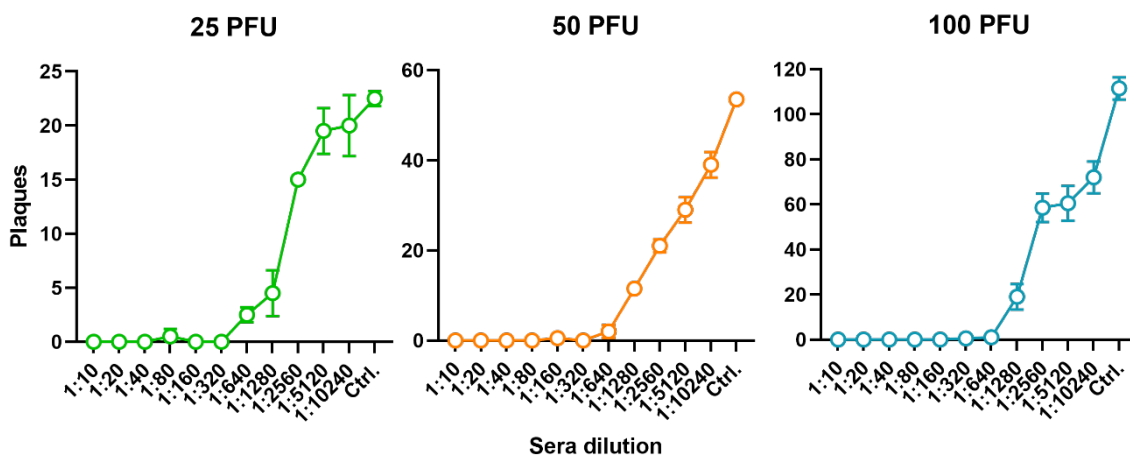


Abbildung 14. YFV-Neutralisierung. Hemmung der Infektion von VeroE6-Zellen durch archivierte Immunsereen von mit Stamaril geimpften Kaninchen. Die Infektionen wurden mit YFV in drei verschiedenen Dosen (25, 50 und 100 PFU) in Gegenwart von Kaninchen-Immunsereen in den angegebenen Verdünnungen durchgeführt.

Um das ADE-Potenzial von durch Impfstoffe induzierten Antikörpern zu bewerten, wurden FcγRII exprimierende K562-Zellen mit lebenden Flaviviren in Gegenwart von

seriellen Verdünnungen von Mausseren infiziert. Durchflusszytometrieprotokolle zur Bestätigung der Virusaufnahme und -replikation in FcγRII-positiven Zellen wurden verfeinert, indem der Nachweis des viralen E-Antigens (Protein) mit dem Nachweis doppelsträngiger RNAs (virales replikatives Zwischenprodukt) verglichen wurde. Das virale E-Antigen erwies sich als überlegen. Somit wurde der ADE-Test erfolgreich optimiert. ELISpot- und Durchflusszytometrie-Tests wurden verwendet, um die T-Zell-Reaktivität in geimpften Milzzellen von Mäusen zu untersuchen. Diese Tests und Protokolle wurden in einem verwandten BMG-Projekt (Charis6a) unter Verwendung menschlicher PMBCs von gegen SARS-CoV-2 geimpften Personen entwickelt und an gegen Flaviviren geimpfte Milzzellen von Mäusen angepasst. Die Bedingungen für ELISpot-Tests an Milzzellen von Mäusen wurden mithilfe immunstimulierender Kontrollen optimiert (Abbildung 15) und es wurden Peptidpools entwickelt, die ZIKV/WNV SP-prM-E umfassen, um die Quantifizierung von Flavivirus-reaktiven T-Zellen nach Impfung und Milzzellenstimulation zu ermöglichen. Somit wurde der ELISpot-Test zur Bewertung von durch Impfstoffe induzierten T-Zellen in der Milz von Mäusen erfolgreich entwickelt.

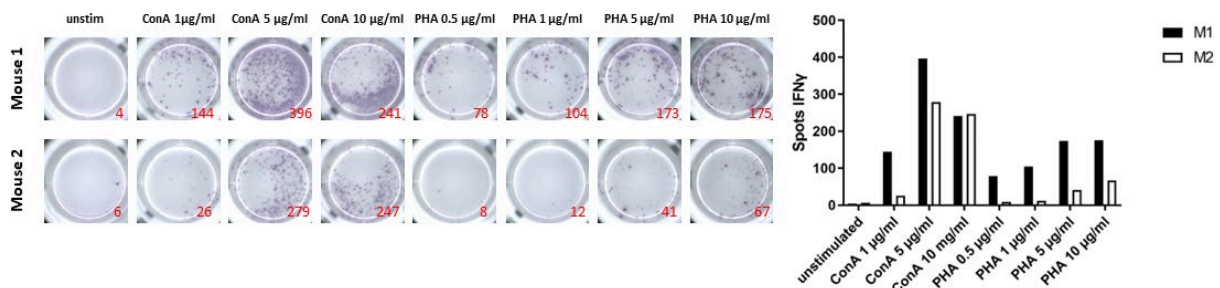


Abbildung 15. Beispiel ELISpot-Test an Milzzellen von Mäusen mit Immunstimulation. Milzzellen von zwei Mäusen wurden mit steigenden Konzentrationen von ConA und PHA behandelt und IFN-gamma exprimierende T-Zellen wurden pro Vertiefung quantifiziert.

Ziel 3: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des Risikos der Induktion des Guillain-Barré-Syndroms und anderer neurologischer Schäden durch eine Flavivirus-Infektion und Modellimpfstoffe

Das ZIKV verursacht normalerweise eine asymptomatische Infektion oder eine leichte fiebrige Erkrankung. Als die Zahl der Patienten 2016-2017 zunahm, wurden jedoch verschiedene neurologische Merkmale wie Mikrozephalie bei Neugeborenen und seltene Fälle (~1 %) des Guillain-Barré-Syndroms beobachtet. Das kongenitale Zika-Syndrom (CZS) verursacht bei ~1 % der betroffenen Neugeborenen eine fötale Mikrozephalie. Ob die Mehrheit der klinisch stummen Neugeborenen aufgrund neurologischer Schäden langfristige gesundheitliche Beeinträchtigungen erleidet, ist bei der Geburt nicht offensichtlich. Um dies herauszufinden, untersuchten wir zunächst, ob sich der ZIKV-Stamm 2016 in menschlichen Plazentazellen (JEG-3) und neuralen Vorläuferzellen (NPCs) produktiv replizieren konnte (Abbildung 16).

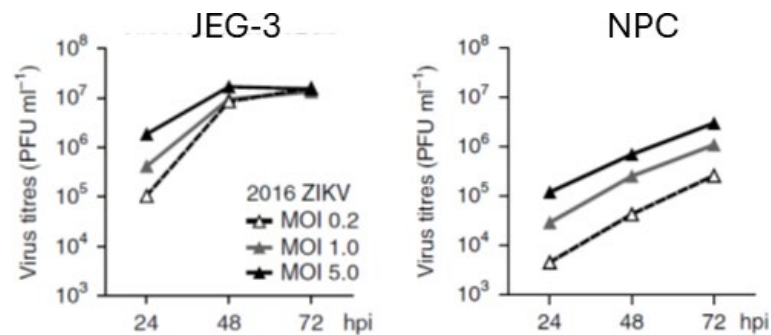


Abbildung 16. ZIKV 2016 infiziert produktiv menschliche Plazenta- und Nervenzellen. Linkes Feld. Zeitlicher Verlauf der ZIKV-Produktion in JEG-3 menschlichen Plazentazellen, die mit zunehmenden MOIs infiziert wurden. Rechtes Feld. Zeitlicher Verlauf der ZIKV-Produktion in neuronalen Vorläuferzellen (NPC), die mit zunehmenden MOIs infiziert wurden. (Abb. angepasst nach Stanelle-Bertram et al. 2018).

Diese Daten bestätigen, dass der ZIKV-Stamm 2016 sowohl die Plazenta als auch NPCs infizieren kann und daher wahrscheinlich die Plazentaschranke passieren und sich entwickelnde fötale Gehirne infizieren kann. Tatsächlich sind NPCs für die Bildung neuer Neuronen im Gehirn verantwortlich, und eine ZIKV-Infektion führt zur Entwicklung von Mikrozephalie bei den Nachkommen. Als nächstes infizierten wir immunkompetente trächtige Mäuse mit einer hohen Dosis (HD) ZIKV, was bei den Nachkommen schwere Phänotypen verursachte, darunter fötalen Tod und reduzierte fötale Länge und Gewicht. Im Gegensatz dazu führte eine niedrig dosierte (LD) mütterliche ZIKV-Infektion zu niedrigeren fötalen Geburtsgewichten, aber zu keinen anderen offensichtlichen Phänotypen (Abbildung 17).

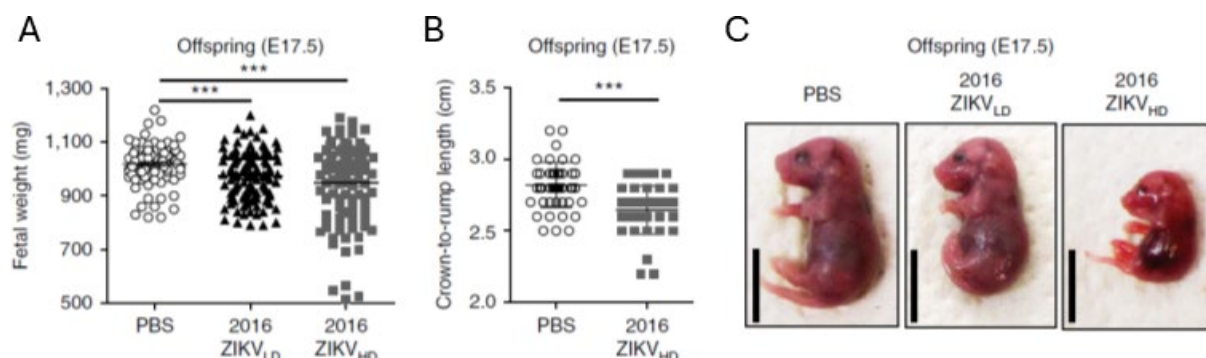


Abbildung 17. Eine Infektion trächtiger Mäuse mit ZIKV 2016 führt zu einer Wachstumsverzögerung des Fötus. (A) Fötales Gewicht trächtiger Mäuse, die mit PBS, ZIKV LD und ZIKV HD infiziert sind. (B) Fötale Länge trächtiger Mäuse, die mit PBS, ZIKV LD und ZIKV HD infiziert sind. (C) Beispiel eines Fötus trächtiger Mäuse, die mit PBS, ZIKV LD und ZIKV HD infiziert sind. (Abb. angepasst nach Stanelle-Bertram et al. 2018).

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der ZIKV-Infektion auf die Gehirnentwicklung zu verstehen, untersuchten wir die hormonellen und immunologischen Reaktionen der infizierten trächtigen Mäuse und ihrer Nachkommen. Die ZIKV-Infektion war mit dem Nachweis viraler RNAs im Gehirn infizierter Mütter sowie erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (MCP-1, IL6) und Testosteron (TST) verbunden (Abbildung 18A). Das männliche Sexualhormon TST spielt bekanntermaßen eine entscheidende Rolle bei der Gehirnentwicklung und kann zu den Gehirnanomalien beitragen, die bei den Nachkommen ZIKV-infizierter Mütter beobachtet werden. Daher

wurden die TST-Werte auch bei Föten ZIKV-infizierter Mütter untersucht (Abbildung 18B).

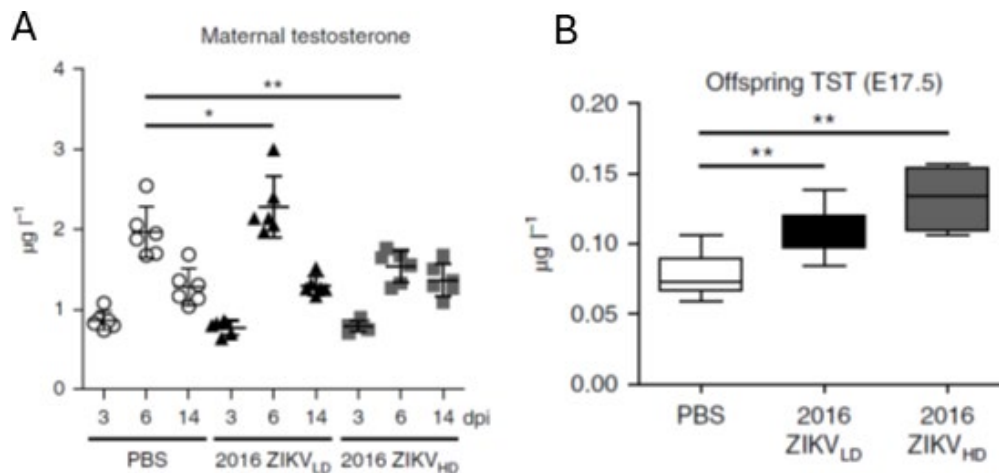


Abbildung 18. Eine Infektion mit ZIKV 2016 führt zu erhöhten TST-Werten bei den Nachkommen. (A) Mütterliche TST-Werte bei mit PBS, ZIKV LD und ZIKV HD infizierten trächtigen Mäusen. (B) Fötale TST-Werte von mit PBS, ZIKV LD und ZIKV HD infizierten Müttern. (Abb. angepasst nach Stanelle-Bertram et al. 2018).

Männliche Nachkommen von LD-ZIKV-infizierten Müttern wiesen im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren deutlich erhöhte TST-Werte auf und hatten eine geringere Überlebenschance bei der Infektion im Mutterleib als ihre weiblichen Geschwister. Männliche Nachkommen von HD-ZIKV-infizierten Müttern wiesen noch höhere TST-Werte auf. Im Gegensatz dazu führte eine niedrig dosierte (LD) ZIKV-Infektion der Mutter zu einem geringeren fötalen Geburtsgewicht, aber zu keinen anderen offensichtlichen Phänotypen (Abbildung 17A und C). Um die Auswirkungen der ZIKV-Infektion auf das sich entwickelnde Gehirn und die kognitiven Funktionen von Mäusen zu untersuchen, untersuchten wir die Gehirne der Nachkommen auf Anomalien. Die Analyse der Mäusegehirne von ZIKV-LD-infizierten Müttern ergab eine gestörte Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen. Darüber hinaus wiesen männliche Nachkommen auch eine erhöhte Anzahl unreifer Neuronen in den apikalen (Abbildung 19) und basalen Dendriten des Hippocampus auf, während weibliche Nachkommen nur in den basalen Dendriten unreife Neuronen hatten.

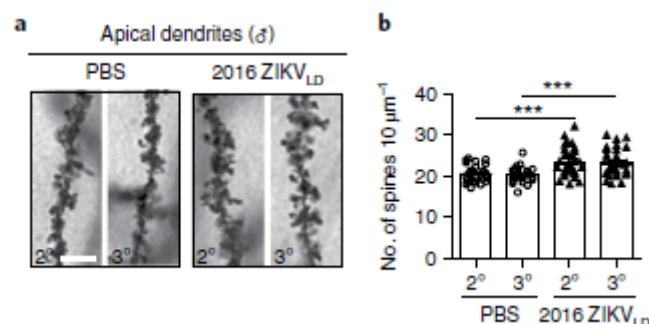


Abbildung 19. Apikale Dendriten erwachsener männlicher Nachkommen. (a) Dorndichte und Verteilung der Dorntypen in apikalen Dendriten von CA1-Pyramidenneuronen in sekundären und tertiären Zweigen männlicher Nachkommen von Kontroll- und ZIKV-infizierten Muttertieren. (b) Quantifizierung der Dorndichte apikaler Dendriten von CA1-Pyramidenneuronen männlicher Nachkommen (PBS: sekundär

(2°) n= 30 und tertiär (3°) n= 28; 2016 ZIKV LD: n= 30 Segmente aus 7 Zellen aus 4 Gehirnen) (Abb. angepasst nach Stanelle-Bertram et al. 2018).

Diese Daten unterstreichen geschlechtsspezifische Unterschiede in der mit einer ZIKV-Infektion verbundenen Verzögerung der Gehirnentwicklung, wobei bei männlichen Nachkommen eine stärkere neuronale Entwicklung beobachtet wurde als bei weiblichen Nachkommen. Diese beeinträchtigte Entwicklung ist auf die erhöhten TST-Werte zurückzuführen, die bei einer ZIKV-Infektion auftreten und für die Männer anfälliger sind. Basierend auf den beobachteten Unterschieden in der Gehirnentwicklung zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen wollten wir als nächstes feststellen, ob männliche Nachkommen mit hohen, aber nicht sehr hohen (Storm-) TST-Werten eher an Lern- und Gedächtnisstörungen leiden als weibliche. Männliche Mäuse mit hohen TST-Werten schnitten in Verhaltenstests, die kognitive Lern- und Gedächtnisstörungen bewerteten, im Vergleich zu weiblichen oder PBS/Storm-TST-Tieren schlecht ab (Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass eine ZIKV-Virusinfektion während der Schwangerschaft langfristige Auswirkungen auf die kognitive Funktion der Nachkommen haben kann, die bei der Geburt nicht offensichtlich sind und bei männlichen Nachkommen schwerwiegender sind.

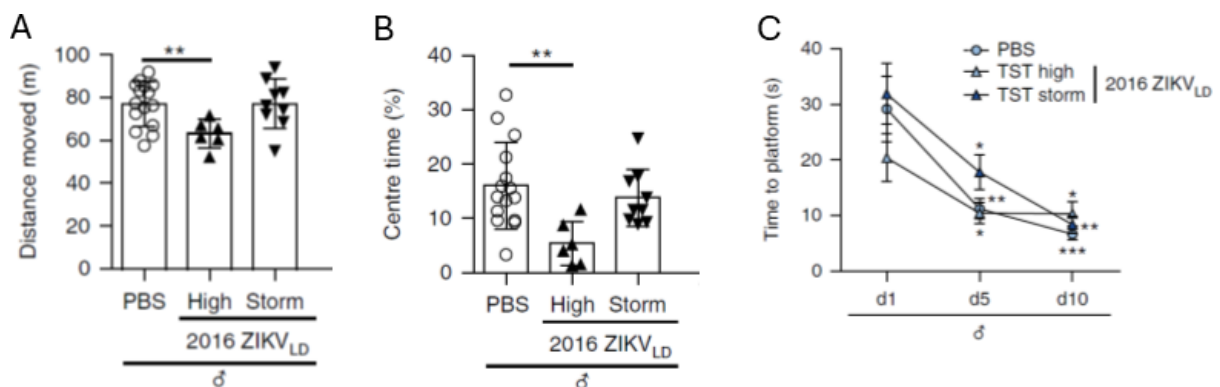


Abbildung 20. Bewertung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses erwachsener männlicher Nachkommen. Zurückgelegte Distanz (A) und Mittelpunktszeit in den ersten 5 Minuten (B) im Freilandtest für männliche Mäuse von mit PBS behandelten Müttern oder von mit ZIKV LD infizierten Müttern. Mäuse von mit ZIKV LD infizierten Müttern werden weiter in die Gruppen „High TST“ und „Storm TST“ unterteilt. (C) Zeit bis zur Plattform (Fluchtlatenz) für männliche Nachkommen aus denselben Gruppen wie (A) und (B). Die durchschnittliche Schwimmggeschwindigkeit pro Versuch lag zwischen 18 und 27 cm/s und unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. (Abb. angepasst nach Stanelle-Bertram et al. 2018).

Diese Daten zeigen die Auswirkungen einer ZIKV-Virusinfektion während der Schwangerschaft, einschließlich TST-bedingter Schäden an der neuronalen Entwicklung des fötalen Gehirns, die die kognitiven Funktionen bei Erwachsenen beeinträchtigen. Unsere Studie liefert wertvolle Einblicke in die potenziellen Risiken einer ZIKV-Virusinfektion während der Schwangerschaft und legt nahe, dass in Ländern mit hoher ZIKV-Prävalenz eine erhöhte geschlechtsspezifische Wachsamkeit erforderlich ist, da eine beeinträchtigte neurologische Entwicklung durch ein gesundes Erscheinungsbild bei der Geburt kaschiert werden kann. Sie unterstreichen die Bedeutung des Verständnisses der Mechanismen, die diesen Auswirkungen zugrunde liegen, um wirksame Strategien zur Vorbeugung und Behandlung entwickeln zu können.

Um zu untersuchen, ob Autoimmunität gegen Wirtsfaktoren möglicherweise zur Pathogenese von ZIKV beitragen könnte, wurde das E-Protein von ZIKV mithilfe der Informationsspektrummethode (ISM) analysiert. ISM identifiziert gemeinsame Informationen, die durch die Primärstrukturen der viralen Proteine kodiert sind und die von Proteinen geteilt werden, die aus dem jeweiligen Wirt stammen. ISM zeigte, dass die Kreuzspektren des ZIKV-E-Proteins und der Wirtskomplementkomponente 1q (C1q) durch einen einzigen dominanten Peak bei der Frequenz $F = 0,338$ gekennzeichnet sind, was darauf hinweist, dass die beiden Proteine ähnliche biologische Eigenschaften haben (Abbildung 21). Diese Eigenschaft war auch für murines C1q konserviert. Für das E-Protein des verwandten Flavivirus WNV wurde jedoch kein solches Signal identifiziert. Neben seiner Rolle als Anfangskomponente der klassischen Komplementkaskade ist bekannt, dass C1q nicht nur an der angeborenen Immunität, sondern auch an Homöostase, Angiogenese, Apoptose, Autoimmunität und synaptischer Organisation beteiligt ist.

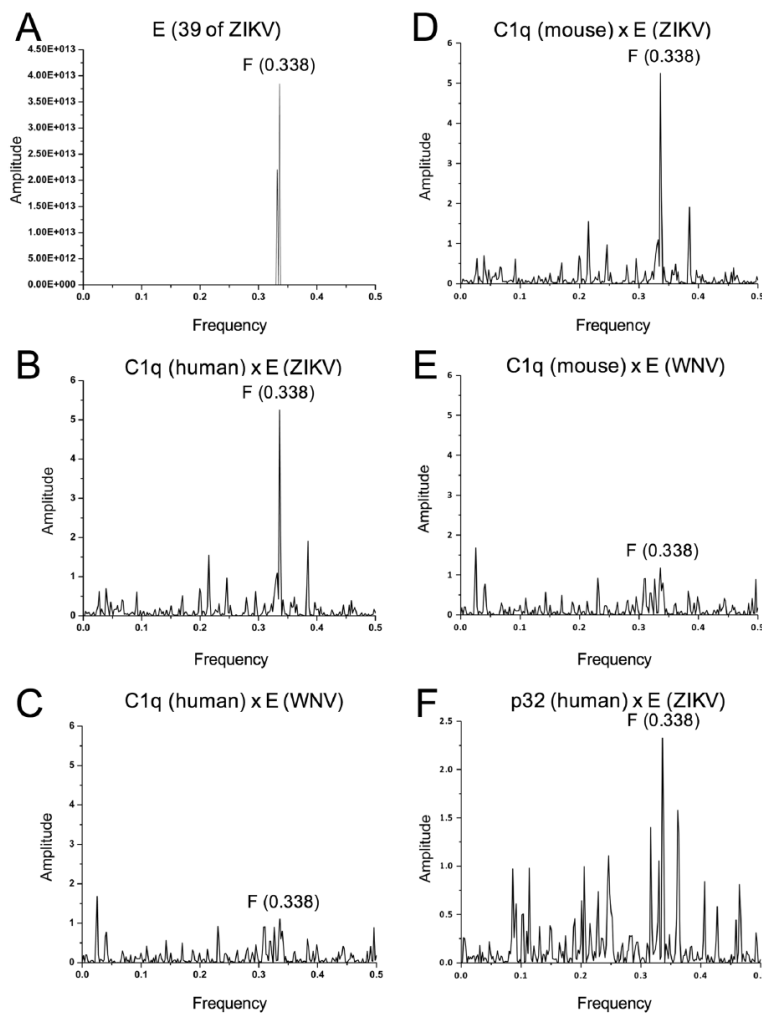


Abbildung 21. ISM-Analyse des ZIKV-E-Proteins und des C1q-Proteins. (A) Das Konsens-ISM von 39 ZIKV-E-Proteinen. (B) Das Kreuzspektrum des E-Proteins von ZIKV (Stamm H/PF/2013) und des menschlichen C1q-Proteins. (C) Das Kreuzspektrum des WNV-E-Proteins und des menschlichen C1q-Proteins. (D) Das Kreuzspektrum des E-Proteins von ZIKV und des murinen C1q-Proteins. (E) Das Kreuzspektrum des WNV-E-Proteins und des murinen C1q-Proteins. (F) Das Kreuzspektrum des E-Proteins von ZIKV und des menschlichen p32-Proteins (Q07021). Die Abszisse stellt die ISM-Frequenzen dar, die Ordinaten sind normalisierte Amplituden, die den jeweiligen Frequenzkomponenten entsprechen. (Abb. angepasst nach Koma et al. 2018).

Aufgrund der beobachteten Ähnlichkeiten zwischen C1q- und ZIKV-E-Proteinen vermuteten wir, dass eine Infektion mit ZIKV Autoantikörper gegen C1q hervorrufen könnte. Als nächstes untersuchten wir, ob eine ZIKV-Infektion in Tiermodellen, darunter verschiedenen Mausstämmen (A129, CD-1, BALB/c) sowie nichtmenschlichen Primaten (Makaken), Antikörper hervorrief, die spezifisch gegen C1q sind. Die Tiere wurden mit ZIKV oder WNV infiziert, und Anti-C1q-Antikörper wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion per ELISA gemessen (Abbildung 22).

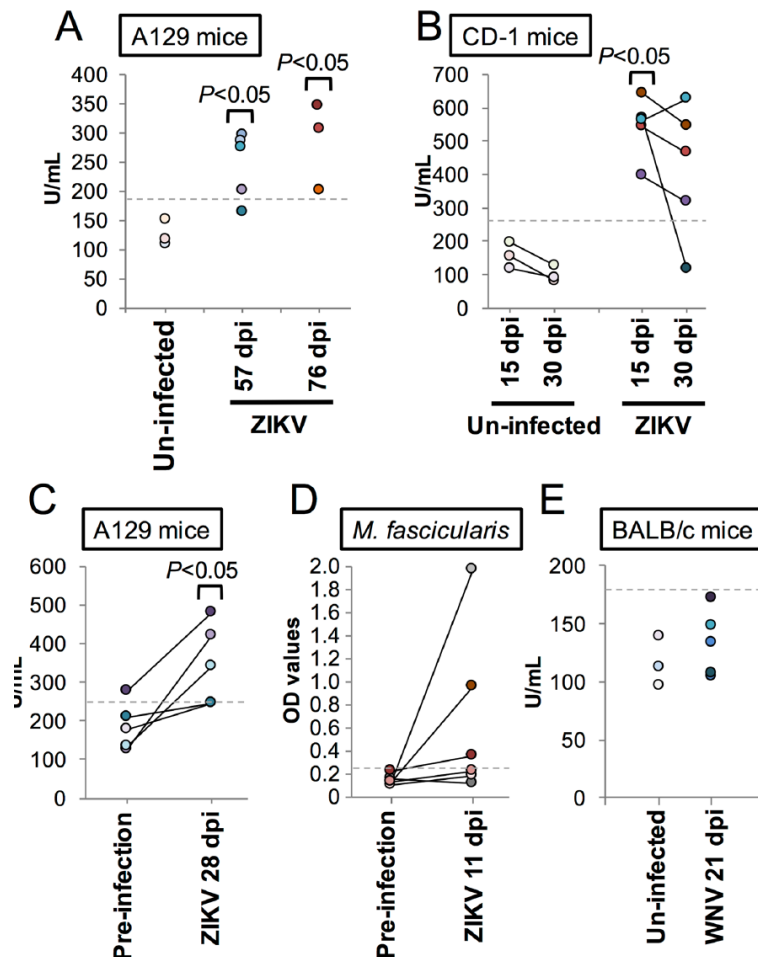


Abbildung 22. Anti-C1q-Antikörper werden in mit ZIKV infizierten Tieren gebildet. (A) A129-Mäuse wurden mit ZIKV (Stamm FSS13025) infiziert und an den angegebenen Tagen getötet. (B) Serumproben wurden von mit ZIKV (Stamm FSS13025) infizierten CD-1-Mäusen gesammelt und auf Anti-C1q-Antikörper untersucht. (C) Serumproben wurden an 0 dpi (vor der Infektion) und 28 dpi von mit ZIKV (Stamm FSS13025) infizierten A129-Mäusen gesammelt. (D) Serumproben wurden an 0 dpi (vor der Infektion) und 11 dpi von mit ZIKV (Stamm H/PF/2013) infizierten Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) gesammelt. Die Daten stellen ELISA-Roh-OD-Werte dar, da im ELISA-Kit keine Kalibrierungsproben enthalten waren. (E) Serumproben wurden von BALB/c-Mäusen, die mit WNV (Stamm TX AR12-9793) infiziert waren, am 21. Tag nach der Infektion entnommen und auf Anti-C1q-Antikörper untersucht. Die Linien zwischen den Punkten zeigen an, dass die Proben von denselben Tieren stammen. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzwerte für jeden Test an. Jeder Grenzwert wurde durch den Mittelwert plus 3 SDs der Negativkontrollen (nicht infiziert) oder vor der Infektion bestimmt. (Abb. angepasst nach Koma et al. 2018).

C1q-spezifische Antikörper wurden in Seren von Mäusen und Affen nachgewiesen, die mit ZIKV infiziert waren (Abbildung 22A-D). Im Gegensatz dazu entwickelten Mäuse, die mit dem verwandten Flavivirus WNV infiziert waren, keine Antikörper gegen C1q

(Abbildung 22E). Da C1q bekanntermaßen nicht nur an der Immunität, sondern auch an der synaptischen Organisation und verschiedenen Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, können durch ZIKV induzierte Anti-C1q-Antikörper auch zu den neurologischen Komplikationen beitragen. Obwohl Autoantigene, die mit dem Guillain-Barré-Syndrom in Zusammenhang stehen, noch nicht eindeutig identifiziert wurden, können Autoantikörper an Myelinantigene binden und Komplement aktivieren. Darauf folgt die Bildung eines Membranangriffskomplexes auf der äußeren Oberfläche der Schwann-Zellen und die Einleitung der vesikulären Degeneration. Solche Autoantikörper können daher zu den beobachteten neurologischen Komplikationen beitragen, die mit einer ZIKV-Infektion in Zusammenhang stehen. Diese Erkenntnisse könnten auch bei der Entwicklung sicherer und wirksamer Impfstoffe gegen ZIKV hilfreich sein.

8. Gender Mainstreaming-Aspekt

Ziel 1: Entwicklung eines Testsystems zur Bewertung des teratogenen Potenzials einer Flavivirus-Infektion und von Modellimpfstoffen.

Bei einer ZIKV-Infektion ist auch nachgewiesen, dass Modellimpfstoffe, die wirksame Immunreaktionen auslösen können, die transplazentare Verbreitung des Flavivirus und damit verbundene Schädigungen des Fötus verhindern. Daher sollten bei zukünftigen Krankheitsausbrüchen, bei denen Impfstoffe gegen ZIKV eingesetzt werden könnten, Frauen in den ersten Impfwellen bevorzugt behandelt werden, um die Häufigkeit von durch ZIKV verursachter Mikrozephalie aufgrund einer Übertragung über die Plazenta während der Schwangerschaft zu verringern.

Ziel 2: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des infektionsverstärkenden Potenzials von Flavivirus-Modellimpfstoffen.

Weder in unseren Studien noch an anderer Stelle wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der durch Impfstoffe hervorgerufenen Immunität oder dem Potenzial für durch Impfstoffe hervorgerufene ADE beobachtet. Die Ergebnisse gelten daher für beide Geschlechter gleichermaßen.

Ziel 3: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des Risikos der Induktion des Guillain-Barré-Syndroms und anderer neurologischer Schäden durch eine Flavivirus-Infektion sowie von Modellimpfstoffen.

Modellimpfstoffe weisen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Wirksamkeit oder Schutz auf. Bei ZIKV-Infektionen hatten männliche Nachkommen jedoch eine geringere Überlebenschance als weibliche Wurfgeschwister. Auch neurologische Schäden waren bei männlichen Nachkommen ausgeprägter. Diese Daten zeigen die Auswirkungen einer ZIKV-Virusinfektion während der Schwangerschaft, einschließlich TST-vermittelter Schäden an der neuronalen Entwicklung des fötalen Gehirns, die die kognitiven Funktionen bei Erwachsenen, insbesondere bei Männern, beeinträchtigen. Diese Daten geben wertvolle Einblicke in die potenziellen Risiken einer ZIKV-Virusinfektion während der Schwangerschaft und legen nahe, dass in Ländern mit hoher ZIKV-Prävalenz eine erhöhte geschlechtsspezifische Wachsamkeit erforderlich ist, da eine beeinträchtigte neurologische Entwicklung durch ein gesundes Erscheinungsbild bei der Geburt kaschiert werden kann.

9. Diskussion

Gesamtbeurteilung und Interpretation.

Ziel 1: Entwicklung von Testsystemen zur Bewertung des teratogenen Potenzials einer Flavivirus-Infektion und von Modellimpfstoffen.

Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse.

- Rekombinante Impfstoffe auf Basis des Masernvirus (MV), die das Zika-Virus (ZIKV) prM und lösliche E-Proteine (MV-ZIKV-sE) oder formalinfixierte Äquivalente exprimieren, wurden auf ihre Wirksamkeit bei der Vorbeugung einer ZIKV-Infektion und ihre Fähigkeit zur Vorbeugung damit verbundener teratogener Komplikationen während der Schwangerschaft untersucht.
- Die Immunisierung mit MV-ZIKV-sE in IFNAR^{-/-}-CD46^{Ge}-Mäusen induzierte ZIKV-E-bindende und neutralisierende Antikörper. Es wurden auch zelluläre Immunreaktionen beobachtet, die durch Gamma-Interferon-Enzym-gekoppelte Immunspot- (ELISpot) und T-Zell-Proliferations-Tests angezeigt wurden.
- In einem Maus-Trächtigkeitsmodell wurden geimpfte Weibchen nach allogener Paarung mit ZIKV infiziert. Die MV-ZIKV-sE-Impfung führte zu einem signifikanten Schutz, wobei bei den meisten Tieren keine Virämie nachweisbar war, im Gegensatz zu Kontrollgruppen, die eine hohe Virämie und eine verringerte Gewichtszunahme zeigten.
- Die MV-ZIKV-sE-Impfung reduzierte die ZIKV-Belastung in verschiedenen Organen, einschließlich der Plazenta, und verhinderte so eine Infektion des Fötus. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigten die geimpften Muttertiere keine Anzeichen von Wachstumsverzögerung, Anämie oder Tod des Fötus. Somit hatte die MV-ZIKV-sE-Impfung keine teratogenen oder infektionsverstärkenden Wirkungen.
- Der MV-ZIKV-sE-Impfstoff zeigte eine weitaus höhere Wirksamkeit als ein prototypischer, mit Alaun-Adjuvans versehener, inaktivierter ZIKV-Partikelimpfstoff, der im gleichen Modell kaum oder gar keine Schutzwirkung hatte.
- Diese Studien unterstreichen das hervorragende Sicherheitsprofil bivalenter MV-basierter Impfstoffe und bekräftigen ihr Potenzial für einen weitverbreiteten Einsatz, insbesondere in endemischen Gebieten, um angeborene ZIKV-Infektionen zu verhindern.
- Der aus MV gewonnene ZIKV-Impfstoffkandidat zeigte in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse und rechtfertigt eine weitere Entwicklung und Evaluierung im klinischen Umfeld. Seine Wirksamkeit bei der Vorbeugung einer ZIKV-Infektion und der damit verbundenen teratogenen Wirkungen unterstreicht sein Potenzial als Notfallimpfstoff.

Ziel 2: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des infektionsverstärkenden Potenzials von Flavivirus-Modellimpfstoffen.

Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse.

- Flavi-VLPs sind bei immunkompetenten Mäusen hoch immunogen und induzieren die Produktion hoher Titer bindender Antikörper.
- Die Prime-Boost-Strategie erhöhte bei Mäusen die Titer immunogenspezifischer Antikörper.

- Mithilfe eines IPMA-Tests bestätigen wir, dass Flavi-VLPs und Flavivirus-Infektionen Antikörper induzieren, die sowohl immunogenspezifisch als auch kreuzreaktiv gegen die Strukturproteine verwandter heterologer Flaviviren sind.
- Mithilfe eines FACS-basierten Infektionstests in K562-Zellen bestätigen wir die durch Immunisierung und Infektion hervorgerufene Produktion von Antikörpern, die sowohl Neutralisierung als auch ADE vermitteln.
- Paradoxerweise führte in manchen Fällen eine Verringerung der Immunserenkonzentrationen zu einer verstärkten Neutralisierung oder ADE. Dies bedeutet, dass in ausgewählten Immunseren beide Antikörpertypen vorhanden sind und zwischen den Typen Unterschiede im Titer und in der Wirksamkeit erkennbar sind.
- Diese Daten unterstreichen das Potenzial zur Induktion kreuzreaktiver ADE bei der Entwicklung von Flavivirus-Impfstoffen zusätzlich zur gewünschten Produktion infektionsneutralisierender Antikörper.
- Es wurden Systeme zur Produktion von Flavi-LNPs entwickelt, einschließlich Vektorauswahl und Optimierung der Expressionskassette, mRNA-Produktion und 5'-Capping, Optimierung der Formulierung von Lipid-Nanopartikeln, Zusammenbau von LNP-mRNA-Impfstoffen und Bestätigung der Antigenabgabe an Zellen.
- Laufende Untersuchungen versuchen festzustellen, ob ungespaltenes prM auf der Oberfläche von Flavi-VLPs oder hochkonservierte Regionen (Fusionspeptid) zu ADE beitragen und ob Antikörperprofile durch Modifizierung von Immunogenen von einem Typ zum anderen verschoben werden können. Ein Vergleich der Immunogenitätsprofile und des ADE-Potenzials für Flavi-VLPs und Flavi-LNPs ist im Gange.

Ziel 3: Entwicklung eines Testsystems zur Prüfung des Risikos der Auslösung des Guillain-Barré-Syndroms und anderer neurologischer Schäden durch eine Flavivirus-Infektion und Modellimpfstoffe.

Beurteilung und Interpretation der Ergebnisse.

- Es wurden keine Hinweise auf neurologische Schäden durch die Immunisierung mit einem experimentellen MV-ZIKV-sE Impfstoff beobachtet.
- Bei einer neurotrophen mütterlichen ZIKV-Infektion mit dem Stamm von 2016 sind die Sexualhormonspiegel verändert.
- Die Übertragung des ZIKV 2016 von der Mutter auf den Fötus ist mit einer Plazentainsuffizienz verbunden, und männliche Nachkommen haben im Vergleich zu ihren weiblichen Wurfgeschwistern eine geringere Überlebenschance bei einer ZIKV 2016-Infektion der Mutter.
- Die mütterliche TST-Behandlung führt bei Mäusen zum Trächtigkeitsabbruch, hat aber keinen Einfluss auf das Geschlecht der Nachkommen. In menschlichen Patientenproben sind die TST-Werte bei ZIKV-RNA-positiven schwangeren Frauen und ihren Neugeborenen erhöht
- Männliche Nachkommen weisen im Vergleich zu ihren weiblichen Wurfgeschwistern schwerwiegendere neuropathologische Veränderungen im Hippocampus auf.
- Männliche Nachkommen mit hohen TST-Werten zeigen als Erwachsene Verhaltensänderungen und Lerndefizite im Hippocampus. Eine ZIKV-Infektion erhöht daher die TST-Werte, was bei männlichen Nachkommen zu schwereren neurologischen Schäden führt, die bei der Geburt nicht offensichtlich sind.

- Durch umfassendes Screening der strukturellen Homologie zwischen ZIKV-E und dem kodierten menschlichen Proteom wurde eine strukturelle Homologie mit menschlichem C1q festgestellt.
- Diese Eigenschaft blieb in Primaten- und Maus-Proteomen erhalten und ist bei den E-Proteinen des verwandten Flavivirus WNV nicht erkennbar. Sie ist daher ZIKV-spezifisch.
- Im Einklang mit dieser Beobachtung löst eine Infektion von Mäusen und nichtmenschlichen Primaten Antikörper aus, die sich gegen das ZIKV-E-Protein und auch gegen C1q des Wirts richten. Somit löst eine ZIKV-Infektion in einzigartiger Weise Autoantikörper gegen Epitope des Wirtes aus.
- Es ist bekannt, dass C1q nicht nur an der Immunität, sondern auch an der synaptischen Organisation beteiligt ist. Autoantikörper können daher an Myelinantigene binden und Komplement aktivieren, woraufhin sich auf der äußeren Oberfläche der Schwann-Zellen ein Membranangriffskomplex bildet und die vesikuläre Degeneration einsetzt.

Im Allgemeinen wurden die ursprünglichen Ziele und Teilziele des Projekts erfolgreich erreicht. Da es zwischen den im ursprünglichen Projektplan definierten messbaren Zielen und Teilzielen eine große Überschneidung gibt, wird nachfolgend ein Überblick gegeben.

- Im Einklang mit den ursprünglichen Projektzielen gelang die Herstellung etablierter und experimenteller Flavivirus-Impfstoffe unter Einsatz mehrerer Technologieplattformen (Ziele 1, 2 und 3). Die folgenden etablierten oder experimentellen Impfstoffverabreichungs-Plattformen wurden erfolgreich entwickelt.
 - Masernvirus (MV) vektorbasiert (enthält lösliches ZIKV-E-Protein)
 - Inaktiviertes Lebendvirus (formalinfixiertes ZIKV)
 - Lebendimpfstoffe (YFV-17D)
 - Virusähnliche Partikel (VLPs) der 1. Generation (Impfstoffkonstrukte kodieren SP-, prM- und E-Proteine von JEV, WNV, YFV und ZIKV)
 - Virusähnliche Partikel (VLPs) der 2. Generation mit modifizierten Fusionspeptiden (W101A), produziert in Furin-exprimierenden Zellen (Impfstoffkonstrukte kodieren SP-, prM- und E-Proteine von JEV, WNV, YFV und ZIKV)
 - Auf Lipidnanopartikeln (LNP) basierende mRNA-Impfstoffe (Impfstoffkonstrukte kodieren SP-, prM- und E-Proteine von WNV und ZIKV: WT und W101A)
- Es wurden Tiermodelle zur Prüfung des teratogenen Potenzials experimenteller Flavivirus-Impfstoffe, der durch Flaviviren verursachten neurologischen Schäden und der Produktion von Immunsereen zur Beurteilung der Antikörperbindung und Immunogenität angewendet (Ziele 1, 2 und 3). Folgende Tiermodelle wurden erfolgreich entwickelt.
 - Es wurde die Zucht transgener Immun-Knockout-Mäuse (IFNAR^{-/-}-CD46^{Ge}) am PEI etabliert und verwendet, um die Wirksamkeit experimenteller ZIKV-Kandidaten bei der Induktion schützender humoraler und zellulärer Reaktionen zu bewerten.
 - Es wurde ein allogenes murines Trächtigkeitsmodell vom Projektpartner G. Gabriel an das PEI transferiert, bei dem IFNAR^{-/-}-CD46^{Ge} mit einem immunkompetenten Mäusestamm gekreuzt wurde. Dieses Modell wurde

verwendet, um das teratogene Potenzial des experimentellen ZIKV-Impfstoffs und seine Fähigkeit, Föten in einem Trächtigkeits-Challenge-Modell zu schützen, zu bewerten.

- Immunkompetente Mausstämme wurden verwendet, um die durch eine ZIKV-Infektion verursachten neurologischen Schäden bei Föten zu untersuchen und um Immunsereen gegen Flaviviren sowie experimentelle Impfstoffe zur Untersuchung von ADE herzustellen.
 - Darüber hinaus wurden zusätzliche nicht-murine Tiermodelle (Kaninchen und Makaken) entwickelt, um die Kreuzreaktivität von durch Infektionen oder experimentelle Impfstoffe induzierten Antikörpern zu bewerten, Immunsereen herzustellen und Autoantikörper zu untersuchen, die sich durch eine ZIKV-Infektion gegen Wirtsepitope richten.
- Die folgenden experimentellen Systeme zur Beurteilung der Immunreaktion auf Infektionen und experimentelle Impfungen wurden etabliert (Ziele 1, 2 und 3)
 - Western Blot- und Immunfluoreszenzprotokolle zur Bestätigung der Expression von Impfstoff-Immunogenproteinen wurden unter Verwendung polyklonaler Seren und monoklonaler Antikörper erfolgreich entwickelt.
 - Humanpathogene Flaviviren wurden extern beschafft und Vermehrungsprotokolle in Gewebekulturen unter BSL2/BSL3-Bedingungen entwickelt. Protokolle zur Produktion von ZIKV, YFV, JEV und WNV wurden erfolgreich für Immunisierungs-/Infektionsexperimente an Mäusen und zur *Ex-vivo* -Charakterisierung von Immunreaktionen entwickelt.
 - Immunperoxidase-Monolayer-Assays (IPMA) und Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur Quantifizierung von durch Infektion und Impfung induzierte flavivirusspezifische IgGs wurden erfolgreich etabliert.
 - Plaque-Reduktions-Neutralisationstests (PRNT) und Tests mit einer 50 %igen Gewebekultur-Infektionsdosis (TCID₅₀) sowie Tests zur Bestimmung des Neutralisationspotenzials von Antikörpern, die durch Infektion oder Impfung produziert wurden, wurden erfolgreich etabliert.
 - FACS-basierte Tests zur Bestimmung der Flavivirus-Infektionsraten unter Verwendung monoklonaler Anti-E-Antikörper aus polyklonalen Immunsereen wurden entwickelt. Dieser Test wurde für einen FACS-basierten Test zur Quantifizierung von ADE unter Verwendung von FcGR II exprimierenden K562-Zellen umfunktioniert. Somit wurde erfolgreich ein Testsystem zur Bewertung der Fähigkeit von Seren von geimpften/infizierten Tieren entwickelt, die Infektionsraten mit lebenden Viren zu erhöhen.

Änderungen

Proben von menschlichen Probanden aus YFV- oder Dengvaxia-Impfkampagnen standen wie ursprünglich angegeben nicht für die Studie zur Verfügung. Impfkampagnen gegen diese tropischen Viren finden in Deutschland nicht statt. In Asien, Afrika und Südamerika, wo Impfungen gegen diese Viren durchgeführt werden, konnten bis Mitte 2020 keine Kooperationspartner mit Zugang zu Patientenprobenmaterial gefunden werden. Tatsächlich stimmen sich solche Kampagnen oft schon lange im Voraus mit akademischen, behördlichen und industriellen Kooperationspartnern ab. Darüber hinaus wurden Impfkampagnen gegen Nicht-SARS-CoV-2 durch die COVID-19-Pandemie stark beeinflusst. Daher musste auf die Untersuchung von Proben tierischer Probanden nach Impfungen ausgewichen werden.

Eine 8-monatige Verzögerung bei der Erneuerung unseres zuvor genehmigten Tierversuchsantrags hat den Fortschritt im Jahr 2023 erheblich beeinflusst. Überraschende Änderungswünsche der zuständigen Behörde haben verhindert, die Experimente wie ursprünglich geplant durchzuführen. Beispielsweise wurden die ursprünglich geplanten intramuskulären Immunisierungen nicht genehmigt. Das hatte zur Folge, dass die für die Verabreichung des mRNA-Impfstoffs der Viren verwendete Formulierung der Lipid-Partikel (LNPs) abgeändert werden musste.

Nach dem Ausfall des -80°C-Gefrierschrank im BSL3-Flaviviruslabor, in dem die Saat- und Arbeitsbestände aller BSL3/2-Flaviviren gelagert wurden, ergaben umfangreiche Tests der Saat- und Arbeitsbestände einen vollständigen Verlust infektiöser Virustiter für JEV-, WNV- und YFV-Bestände. Eine Aufstockung des Lagerbestands durch Import aus dem EVAg war in der verbleibenden Zeit nicht möglich (der Prozess dauert normalerweise 6 Monate). Daher wird die Bewertung des Neutralisierungs- und ADE-Potenzials von Mausimmunseren gegen Flavi-VLPs und Flavi-LNPs der zweiten Generation mit lebenden Flaviviren nach dem Ende des Förderzeitraums an alternativen Partnerstandorten und mit zusätzlicher Finanzierung fortgesetzt. Die Experimente laufen und ein Manuskript ist in Vorbereitung.

10. Verbreitung und Öffentlichkeitsarbeit der Projektergebnisse

Konferenzbeiträge:

1. Montoya-Diaz E, von Messling V. Engineering Flavivirus-like particles platforms to assess the pre-existing Flavivirus immunity. PEI Retreat 2019, Ronneburg, Germany, 30.01.-01.02.2019. (Poster)
2. Nürnberger C, Bodmer BS, Fiedler AH, Gabriel G, Mühlebach MD. Immunity induced by a measles virus-based ZIKV vaccine results in fast ZIKV virus clearance and protects against fetal death. 29th Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, 20.-23.03.2019 (Präsentation).
3. Nürnberger C, Bodmer BS, Fiedler AH, Gabriel G, Mühlebach MD. Immunity induced by a measles virus-based ZIKV vaccine results in fast ZIKV virus clearance and protects against congenital sequelae of infection. 38th Annual Meeting of the American Society for Virology, University of Minnesota, Minneapolis (MN), USA, 20.-24.07.2019. (Präsentation)
4. Montoya-Diaz E, von Messling V. Engineering Flavivirus-like particles platforms to assess the pre-existing Flavivirus immunity. Joint Meeting of the German Society for Immunology and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (48th Annual Meeting of the German Society for Immunology), Munich, Germany, 10.-13.09.2019. (Poster)
5. Mühlebach MD. Pros and cons of platform-based vaccines. 18th Workshop of the Study Group "Immunobiology of Viral Infections" of the Society for Virology (GfV), Bad Mergentheim, Germany, 27.09.2019. (Lecture)
6. Montoya-Diaz E, von Messling V. Engineering Flavivirus-like particles platforms to assess the pre-existing Flavivirus immunity. 18th Workshop of the Study Group "Immunobiology of Viral Infections" of the Society for Virology (GfV), Bad Mergentheim, Germany, 27.09.2019. (Präsentation)
7. Montoya-Diaz E, von Messling V. Engineering Flavivirus-like particles platforms to assess the pre-existing Flavivirus immunity. DRUID Retreat, Rauischholzhausen, Germany, 25.-26.11.2019. (Poster)
8. Montoya-Diaz E, Kleinert RKV, Krebs Y, von Messling V, Pfaller CK, Brown RJP. Identifying determinants of antibody dependent enhancement of flavivirus infection using a virus-like-particle platform. 31st Annual Meeting of the Society for Virology (GfV). Munich, Germany. 30.03.-2.04.2022 (ePoster).
9. Montoya-Diaz E, Kleinert RKV, Krebs Y, von Messling V, Pfaller CK, Brown RJP. Virus-like particle immunizations elicit cross-reactive antibody responses which recognize divergent pathogenic flaviviruses and promote both neutralization and infection enhancement. 28th International symposium – HCV-Flavi 2022. Ghent, Belgium. June 2022. (Poster und pitch talk).
10. Kleinert RKV, Herrmann M, Miskey C, Brown RJP. Protection without pathology: altered cell tropism and modulation of innate immune activation contribute to yellow fever vaccine attenuation. 29th International symposium – HCV-Flavi 2023. Atlanta, USA. September 2023. (Poster).

11. Nutzung der Projektergebnisse

Die Erforschung experimenteller Impfstoffe anhand von Tiermodellen ist ein Eckpfeiler der modernen Medizin. Sie liefert wichtige Daten zu Sicherheit, Wirksamkeit und Wirkmechanismen, die die Impfstoffentwicklung vorantreiben und die öffentliche Gesundheit schützen. Zwar gibt es ethische Bedenken und die Notwendigkeit einer sorgfältigen behördlichen Überwachung, doch die Vorteile für die Gesundheitsversorgung sind beträchtlich und führen zur Prävention und Kontrolle von Infektionskrankheiten, zu verbesserten Ergebnissen für die menschliche Gesundheit und einer besseren Vorbereitung auf zukünftige gesundheitliche Herausforderungen. Seit dem großen Ausbruch in Brasilien im Jahr 2015 gab es weitere Ausbrüche und sporadische Fälle von ZIKV-Infektionen, doch hat keiner davon das gleiche Ausmaß in Bezug auf weit verbreitete Fälle und eine signifikante Anzahl von Mikrozephalie-Fällen oder Guillain-Barré-Syndrom erreicht.

Dazu gehören:

Ausbrüche nach 2015:

- Amerika und Südostasien (2016–2017): Nach dem ersten Ausbruch im Jahr 2015 verbreitete sich das ZIKV in andere Teile Amerikas, einschließlich der Vereinigten Staaten, sowie in Teile Südostasiens. Während dieser Zeit wurden Fälle von Mikrozephalie und anderen angeborenen Anomalien im Zusammenhang mit ZIKV-Infektionen bei schwangeren Frauen gemeldet.
- Angola (2017): In Angola wurde ein Ausbruch mit mehreren Fällen einer ZIKV-Infektion gemeldet. Der Zusammenhang mit Mikrozephalie wurde jedoch nicht so deutlich dokumentiert wie in Amerika.

Fallberichte und kleine Cluster:

- Laufende Überwachung: Weltweit werden weiterhin sporadische Fälle von ZIKV-Infektionen gemeldet, insbesondere in Regionen, in denen die *Aedes*-Mücke weit verbreitet ist. Einige dieser Fälle betrafen schwangere Frauen und führten zu Mikrozephalie und anderen angeborenen Anomalien bei Neugeborenen.
- Reisebedingte Fälle: Aus ZIKV-betroffenen Gebieten zurückkehrende Reisende haben das Virus gelegentlich in nicht-endemische Regionen eingeschleppt, was zu Einzelfällen und verstärkter Überwachung, insbesondere bei schwangeren Frauen, geführt hat.

Mikrozephalie und andere Geburtsfehler:

- Kontinuierliche Überwachung: Gesundheitsorganisationen wie die Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) überwachen und melden weiterhin Fälle von Mikrozephalie und anderen Geburtsfehlern, die mit Infektionen mit dem ZIKV in Zusammenhang stehen.
- Forschung und Datenerhebung: Studien und Datenerhebungen haben das Verständnis der langfristigen Auswirkungen des ZIKV auf die fötale Entwicklung weiter verbessert. Diese laufende Forschung hilft bei der Identifizierung neuer Fälle und dem Verständnis des gesamten Spektrums des angeborenen ZIKV-Syndroms.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kontinuierliche Überwachung, Beobachtung und Forschung unerlässlich sind, um das Verhalten des ZIKV zu verstehen und künftige Ausbrüche zu verhindern, insbesondere solche, die schwangere Frauen betreffen und zu angeborenen Anomalien führen. Unsere Daten zeigen, dass in Mausmodellen neurologische Schäden bei männlichen Nachkommen bei der Geburt getarnt sein können und bis ins Erwachsenenalter bestehen bleiben.

Die erzielten Ergebnisse haben keine direkten Auswirkungen auf die Gesundheitsversorgung, da die im Projekt untersuchten Flaviviren in Deutschland nicht endemisch sind und im Allgemeinen nur importierte Fälle gemeldet werden. Die globale Erwärmung erweitert jedoch die Verbreitungsgebiete der Mückenvektoren, und endemische und importierte Fälle werden in Zukunft wahrscheinlich zunehmen. Daher ist Forschung, die die Impfstoffentwicklung verbessert und informiert, für zukünftige Präventionsprogramme von entscheidender Bedeutung, da die prophylaktische Impfung nachweislich die wirksamste Methode zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten ist. Die im Projekt entwickelten Werkzeuge, Tiermodelle und Testsysteme bringen die folgenden Bereiche der medizinischen Gesundheitsforschung und der damit verbundenen Entwicklung direkt voran.

Verbesserte Impfstoffentwicklung:

- Sicherheits- und Wirksamkeitstests: Anhand von Tiermodellen konnten wir die Sicherheit und Wirksamkeit neuer Impfstoffplattformen testen. Dieser Schritt ist entscheidend, um sicherzustellen, dass Impfstoffe keinen Schaden anrichten, wirksam Immunität hervorrufen und bei Bedarf für neue Krankheitserreger wiederverwendet werden können.
- Immunreaktionen verstehen: Die Projektdaten geben Aufschluss darüber, wie das Immunsystem auf experimentelle und etablierte Impfstoffe reagiert, und geben Aufschluss darüber, wie Impfstoffe verbessert oder angepasst werden können, um eine bessere Wirkung zu erzielen.

Beschleunigte Forschung und Entwicklung:

- Rapid Prototyping: Schnelles Prototyping und Testen von Impfstoffkandidaten, wodurch der Entwicklungsprozess beschleunigt wird. Dies ist insbesondere bei Ausbrüchen neu auftretender Infektionskrankheiten wichtig, bei denen der Zeitfaktor von entscheidender Bedeutung ist.
- Identifizierung potenzieller Nebenwirkungen: Die frühzeitige Identifizierung von Nebenwirkungen in Tiermodellen hilft bei der Minderung von Risiken und der Verbesserung der Impfstoffformulierungen, bevor mit den Versuchen am Menschen begonnen wird.

Verbesserte Ergebnisse für die menschliche Gesundheit:

- Effektive Krankheitsprävention: Erfolgreiche Forschung an Tiermodellen kann zur Entwicklung von Impfstoffen führen, die Krankheiten beim Menschen wirksam vorbeugen und so die Morbiditäts- und Mortalitätsraten senken.

Entwicklung neuer Impfstofftechnologien:

- Innovative Plattformen: Die Entwicklung neuartiger Impfstoffplattformen, die schnell an neuartige Krankheitserreger angepasst werden können, kann in präklinischen Tiermodellen bewertet werden.

Vorbereitung der öffentlichen Gesundheit:

- Pandemievorsorge: Tiermodelle sind für die Entwicklung von Impfstoffen gegen potenzielle Pandemieerreger von entscheidender Bedeutung und ermöglichen eine schnelle Reaktion und Vorbereitung auf neu auftretende Bedrohungen.

Ethische und regulatorische Überlegungen:

- Zulassung durch die zuständige Behörde: Für die Zulassung von Impfstoffen an Menschen sind häufig Daten aus Tiermodellen erforderlich. Dieser Schritt stellt sicher, dass nur sichere und potenziell wirksame Impfstoffe an Menschen getestet werden.
- Ethische Rahmenbedingungen: Der Einsatz von Tiermodellen erfordert strenge ethische Richtlinien, um eine humane Behandlung zu gewährleisten und um das Leiden zu minimieren, was zur Verfeinerung der Forschungsmethoden und besseren Tierschutzstandards führt.

Krankheitsmechanismen verstehen:

- Dynamik des Immunsystems: Die Untersuchung der Reaktion des Immunsystems von Tieren auf Krankheitserreger und Impfstoffe bietet Einblicke in die menschliche Immunologie und hilft bei der Identifizierung von Biomarkern für die Wirksamkeit von Impfstoffen.

Translationale Forschung:

- Brücke zwischen präklinischer und klinischer Forschung: Tiermodelle dienen als Brücke zwischen Laborforschung und klinischen Studien am Menschen und erleichtern die Umsetzung wissenschaftlicher Erkenntnisse in praktische medizinische Lösungen.
- Modellierung menschlicher Krankheiten: Bestimmte Tiermodelle sind dem Menschen genetisch oder physiologisch ähnlich, was sie für die Modellierung menschlicher Krankheiten und das Testen von Impfstoffkandidaten in einer kontrollierten Umgebung von unschätzbarem Wert macht.

Nach Projektende verbleiben die bivalente MV-Impfstoff-Vektorplattform sowie die zugehörigen Tiermodelle und Testsysteme bei Dr. Mühlebach am PEI. Diese können schnell für neuartige Krankheitserreger umgerüstet und genutzt werden, wie es während der SARS-CoV-2-Pandemie der Fall war, als das System angepasst wurde, um Fragen im Zusammenhang mit der Sicherheit des SARS-CoV-2-Impfstoffs zu beantworten:

Ebenig A, Muraleedharan S, Kazmierski J, Todt D, Auste A, Anzaghe M, Gömer A, Postmus D, Gogesch P, Niles M, Plesker R, Miskey C, Gellhorn-Serra M, Breithaupt A, Hörner C, Kruijff C, Ehmann R, Ivics Z, Waibler Z, Pfaender S, Wyler E, Landthaler M, Kupke A, Nouailles G, Goffinet C, Brown RJP, Mühlebach MD (2022)

Vaccine-associated enhanced respiratory pathology in COVID-19 hamsters after T_H2-biased immunization. *Cell Reports* 40(7): 111214

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111214>

Das immunkompetente Mausträchtighkeitsmodell als zugehöriges experimentelles System zur Beurteilung von ZIKV-Infektionsschäden an Nachkommen wird von Prof. Gabriel am LIV verwaltet. Dieses Modell kann möglicherweise umfunktioniert werden, um Fragen

hinsichtlich neurologischer Schäden im Zusammenhang mit alternativen neurotrophen Flavivirus-Infektionen bei einer Mausträchtigkeit zu beantworten.

Dr. Brown hat das PEI verlassen, untersucht aber weiterhin die Sicherheit und Wirksamkeit der Flavi-VLP- und Flavi-LNP-Impfstoffplattformen und ihre Fähigkeit, schützende oder infektionsverstärkende Reaktionen hervorzurufen, unter Verwendung der im Projekt entwickelten Testsysteme. Die Bewertung des Neutralisierungs- und ADE-Potenzials von Mausimmunerzellen gegen Flavi-VLPs und Flavi-LNPs der zweiten Generation mit lebenden Flaviviren wird nach dem Ende des Förderzeitraums an alternativen Partnerstandorten und mit zusätzlicher Finanzierung fortgesetzt. Die Experimente laufen und ein Manuskript ist in Vorbereitung

12. Publikationsliste

Publikationen

1. Stanelle -Bertram S, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Thiele S, Asante IA, Dreier C, Kouassi NM, Preuß A, Pilnitz -Stolze G, Müller U, Thanisch S, Richter M, Scharrenberg R, Kraus V, Dörk R, Schau L, Herder V, Gerhauser I, Pfankuche VM, Käufer C, Waltl I, Moraes T, Sellau J, Hoenow S, Schmidt- Chanasit J, Jansen S, Schattling B, Ittrich H, Bartsch U, Renné T, Bartenschlager R, Arck P, Cadar D, Friese MA, Vapalahti O, Lotter H, Benites S, Rolling L, Gabriel M, Baumgärtner W, Morellini F, Hölter SM, Amarie O, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Löscher W, Calderon de Anda F, Gabriel G. (2018). Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood. *Nat Microbiol.* 3: 1161-1174.
2. Koma T, Veljkovic V, Anderson DE, Wang LF, Rossi SL, Shan C, Shi PY, Beasley DW, Bukreyeva N, Smith JN, Hallam S, Huang C, von Messling V, Paessler S. (2018) ZIKV virus infection elicits auto -antibodies to C1q. *Sci Rep.* 8(1):1882. doi: 10.1038/s41598-018-20185-8.
3. Nürnberger C, Bodmer BS, Fiedler AH, Gabriel G, Mühlebach MD. (2019) A Measles Virus-Based Vaccine Candidate Mediates Protection against ZIKV Virus in an Allogeneic Mouse Pregnancy Model. *J Virol.* 93: e01485-18. doi: 10.1128/JVI.01485-18.
4. Kleinert RDV, Montoya-Diaz E, Khera T, Welsch K, Tegtmeyer B, Hoehl S, Ciesek S, Brown RJP. (2019) Yellow Fever: Integrating Current Knowledge with Technological Innovations to Identify Strategies for Controlling a Re-Emerging Virus. *Viruses.* 11: E960. doi: 10.3390/v11100960.
5. Saivish MV, da Costa VG, Rodrigues RL, Féres VCR, Montoya-Diaz E, Moreli ML. (2020) Detection of Rocio virus SPH 34675 during dengue epidemics, Brazil, 2011-2013. *Emerg Infect Dis.* 26: 797-799. doi: 10.3201/2604.190487.
6. Meister TL, Frericks N, Kleinert RDV, Rodriguez E, Steinmann J, Todt D, Brown RJP, Steinmann E. (2024): Inactivation of yellow fever virus by WHO recommended hand rub formulations and surface disinfectants. *PLoS Negl Trop Dis* 18(6): e0012264. doi: 10.1371/journal.pntd.0012264.
7. Montoya-Diaz E, Kleinert RKV, Krebs Y, Sawatsky B, Steinmann E, Pietschmann T, Pfaender S, Todt D, Brown RJP. Comparison of neutralizing and infection enhancing antibodies induced by VLP and LNP vaccine platforms against pathogenic flaviviruses. Manuskript eingereicht und in Prüfung.

Thesen

8. Bachelorarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen. 2018. Herr Jermaine Justin Rivero. "West Nile Virus-like particle design, expression and purification."
9. Bachelorarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main. 2020. Herr Jan Paulini. "Megakaryocyte cell lineage susceptibility to yellow fever virus infection."
10. Bachelorarbeit. Goethe-Universität, Frankfurt am Main. 2022. Herr Estéban Schlimme. "Screening of a mouse-cDNA library for restriction factors that support human liver cell survival during a YFV/ ZIKV infection."
11. Doktorarbeit. Philipps-Universität Marburg. Herr Robin Kleinert. 2024. "Protection without pathology: altered cell tropism and modulation of innate immune activation contribute to Yellow fever vaccine attenuation."