

**Diplomarbeit**

**Die Entwicklung von SARS-CoV-2 Impfstoffen  
und zukünftige Einsatzgebiete von mRNA Impfstoffen**

eingereicht von

**Michael Neuhofer**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Lehrstuhl für Pharmakologie**

unter der Anleitung von

Ass.-Prof<sup>in</sup>. Priv.-Doz<sup>in</sup>. Mag.rer.nat. PhD. Julia Kargl

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Rudolf Schicho

Graz, 29.03.2022

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 29.03.2022

Michael Neuhofer eh.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich recht herzlich bei meiner Betreuerin Frau Ass.-Prof<sup>in</sup> Priv.-Doz<sup>in</sup> Mag.a Julia Kargl, PhD bedanken, die mir stets für Anmerkungen und Hinweise zur Verfügung stand.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Hannes und Gerlinde, die mich während des gesamten Studiums in allen Belangen unterstützt haben und mir dieses so erst ermöglicht haben. Im gleichen Rahmen möchte ich mich auch bei meinen Großeltern und restlichen Verwandten bedanken, welche den „armen Studenten“ immer wieder finanziell aber auch seelisch unterstützt haben.

Ein riesiges Dankeschön gebührt auch meiner Schwester Sarah, die diese Arbeit Korrektur gelesen hat und mir während meiner gesamten Ausbildung immer wieder unter die Arme gegriffen hat.

Nicht unerwähnt bleiben sollen auch meine Studienkolleg\*innen und Freund\*innen in Graz und in der Heimat, die das Studium neben dem gemeinsamen Lernen auch durch zahlreichen anderen Aktivitäten zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben.

Und zu guter Letzt gilt meinen Wohngemeinschaftskollegen Clemens und Lukas ein besonderer Dank für das jahrelange gute Zusammenleben, welches sicher seinesgleichen sucht.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	i
Danksagung .....	ii
Abkürzungen .....	vi
Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 SARS-CoV-2 Ausbruch und Pandemie.....	3
1.2 Allgemeines zu Coronaviren .....	4
1.2.1 Geschichte der Coronaviren.....	4
1.3 Aufbau von SARS-CoV-2.....	5
1.3.1 SARS-CoV-2 Genom.....	5
1.3.2 Spike-Protein.....	6
1.3.3 ACE2-Rezeptor .....	7
1.4 SARS-CoV-2 Varianten.....	7
1.4.1 B.1.1.7. (Alpha Variante) .....	7
1.4.2 B.1.351. (Beta-Variante).....	8
1.4.3 B.1.617.2. (Delta Variante).....	9
1.4.3 B.1.1.529 (Omikron Variante).....	9
2 Material und Methoden .....	10
3 Impfstoffentwicklung .....	10
3.1 Impfstoffentwicklung Fokus auf dem S- Protein .....	11
3.2 Geschichte der Impfung .....	13
3.3 Allgemeines zur Entwicklung von Impfstoffen .....	15
3.4 SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung unter Pandemiebedingungen.....	17
3.5 Impfstoffentwicklung bei MERS und SARS-Cov .....	18
3.5.1 Entwicklungseinschränkungen bei SARS-CoV und MERS Impfstoffen....	22

3.6 Die Anfänge der SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung.....	23
4 SARS-CoV-2 Impfstoffe.....	25
4.1 Herausforderungen der Impfstoffentwicklung.....	25
4.2 Grundprinzip von Vektorimpfstoffen.....	26
4.3 In Österreich zugelassene SARS-CoV-2 Vektorimpfstoffe.....	28
4.3.1 Vaxzevria (AstraZeneca).....	28
4.3.1.1 Präklinische Studien.....	29
4.3.1.2 Klinische Phase I/II Studien.....	30
4.3.1.3 Klinische Phase III Studien.....	32
4.3.2 Janssen (Johnson & Johnson).....	36
4.3.2.1 Präklinische Phasen.....	36
4.3.2.2 Phase I/II Studien.....	38
4.3.2.3 Phase III Studien.....	40
4.3.2.4 Thrombotische Ereignisse.....	41
5 mRNA Impfstoffe.....	42
5.1 Allgemeines zu DNA und RNA.....	42
5.2 Meilensteine am Weg zur mRNA Impfung.....	43
5.3 Vor- und Nachteile der mRNA als Trägerplattform.....	44
5.4 Herstellung von mRNA Impfstoffen.....	46
5.5 mRNA-Impfstoffe gegen SARS-CoV-2.....	47
5.5.1 Comirnaty (Biontech/Pfizer).....	48
5.5.1.1 Präklinische Phase.....	48
5.5.1.2 Klinische Phase I/II Studien.....	50
5.5.1.3 Klinische Phase III Studie.....	51
5.5.2 Spikevax (Moderna).....	52
5.5.2.1 Klinische Phase I Studien.....	52
5.5.2.2 Klinische Phase I/II Studien.....	53
5.5.2.3 Klinische Phase III Studie.....	54

6 Mögliche zukünftige Einsatzgebiete der mRNA.....	55
6.1 mRNA Transportsysteme.....	55
6.1.1 Elektroporation .....	55
6.1.2 Dendritische Zellen (DCs) .....	56
6.1.3 Protamin .....	56
6.1.4 Lipid-Komplex.....	57
6.2 mRNA-Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten.....	57
6.3 mRNA Impfstoffe als Tumorthherapie.....	58
6.4 Auf mRNA basierende passive Immuntherapie .....	59
6.5 Herausforderungen in der Entwicklung .....	60
7 Diskussion .....	61
Literaturverzeichnis .....	63

## Abkürzungen

<b>ACE2-Rezeptor</b>	Angiotensin Converting Enzyme 2-Rezeptor
<b>Ad26</b>	Adenovirus Typ 26
<b>ADE</b>	Antibody-Dependent Enhancement
<b>ARCA</b>	Anti Reverse Cap Analoga
<b>AU/ml</b>	Arbitrary Units/Milliliter
<b>Bat-SL-CoV</b>	Bat SARS-like Coronavirus
<b>CCDC</b>	Chinese Center for Disease Control and Prevention
<b>cDNA</b>	complementary Desoxyribonucleic Acid
<b>CP</b>	Cytoplasmatische Domäne
<b>Ct-Wert</b>	Crossing Threshold- Wert
<b>DC</b>	Dendritic Cells
<b>DPP-4</b>	Dipeptidylpeptidase-4
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>E-Protein</b>	Envelope-Protein
<b>EU</b>	Europäische Union
<b>EU/ml</b>	Elisa Units/ ml
<b>FB</b>	Fusionspeptid
<b>FSME</b>	Frühsommer-Meningoenzephalitis
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice
<b>hCoV</b>	humanes Coronavirus
<b>HeLa-Zellen</b>	Henrietta Lacks Zellen
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>HR</b>	Heptad Repeat

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL-2</b>	Interleukin-2
<b>LNP</b>	Lipidnanopartikel
<b>MERS</b>	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
<b>MHC-Molekül</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>M-Protein</b>	Membranprotein
<b>mRNA</b>	messenger Ribonucleic Acid
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>N-Protein</b>	Nucleoprotein
<b>NTD</b>	N-terminal Domain
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PD-1</b>	Programmed Cell Death-1
<b>pDNA</b>	plasmide Desoxyribonucleic Acid
<b>RBD</b>	Receptor Binding Domain
<b>RBM</b>	Receptor Binding Motif
<b>rN</b>	rekombinantes Nukleokapsid
<b>RT-qPCR</b>	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>S1-Untereinheit</b>	Spike-Protein 1 Untereinheit
<b>S2-Untereinheit</b>	Spike-Protein 2 Untereinheit
<b>SARS-CoV</b>	Severe Acute Respiratory Coronavirus
<b>SARS-CoV-2</b>	Severe Acute Respiratory Coronavirus Typ 2

<b>S-Protein</b>	Spike-Protein
<b>TATA-BOX</b>	Transkriptions-Initiationskomplex
<b>TMD</b>	Transmembrandomäne
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>tPA</b>	tissue Plasminogen Activator
<b>U/ml</b>	Units/ Milliliter
<b>UTR</b>	Untranslated Region
<b>VLP-Impfstoffe</b>	Virus-like Particles Impfstoffe
<b>VSV</b>	Vesikuläres Stomatitis Virus
<b>WHO</b>	World Health Organization

## **Zusammenfassung**

Die im Dezember 2019 ausgebrochene SARS-CoV-2 Pandemie stellt eine große Herausforderung für viele Gesundheitssysteme dar. Als eine Möglichkeit die Pandemie in den Griff zu bekommen rückte rasch die Impfstoffentwicklung in den Mittelpunkt der Forschung. In dieser Diplomarbeit wird die Entwicklung der SARS-CoV-2 Impfstoffe mittels einer Literaturrecherche dargestellt. Dazu wurden die Onlinedatenbanken PubMed und Google Scholar sowie Lehrbücher und aktuelle wissenschaftliche Artikel verwendet. Es wird anhand dieser gesammelten Literatur ein Überblick über SARS-CoV-2 gegeben und gezeigt wie eine beschleunigte Impfstoffentwicklung unter Pandemiebedingungen funktionieren kann. Des Weiteren wird die Entwicklung der bis Dezember 2021 in Österreich zugelassenen Impfstoffe von den präklinischen Studien bis hin zu groß angelegten Phase III Studien gezeigt. In einem weiteren Punkt wird besonders auf mRNA Impfstoffe eingegangen. Neben einer allgemeinen Beschreibung dieser Technologie werden auch mögliche zukünftige Einsatzgebiete von mRNA Impfstoffen beleuchtet.

## **Abstract**

The outbreak of the SARS-CoV-2 pandemic in December 2019 poses a major challenge for many healthcare systems. Vaccine development quickly became a focus of research to get the pandemic under control. In this diploma thesis, the development of SARS-CoV-2 vaccines is presented by means of a literature search. The online databases PubMed and Google Scholar as well as textbooks and current scientific articles were used for this purpose. Based on this collected literature, an overview of SARS-CoV-2 is given and it is shown how accelerated vaccine development can work under pandemic conditions. Furthermore, the development of the vaccines approved in Austria until December 2021 will be shown in a chronological way from preclinical studies to large scale phase III studies. In a further point, particular attention is paid to mRNA vaccines. In addition to a general description of this technology, possible future areas of application for mRNA vaccines are also highlighted.

# 1 Einleitung

## 1.1 SARS-CoV-2 Ausbruch und Pandemie

Erstmals wurden Ende Dezember 2019 in Wuhan, Provinz Hubei, China von mehreren örtlichen Gesundheitseinrichtungen Infektionscluster mit Pneumonien unbekannter Ursache gemeldet. Bei diesen zuerst lokal gemeldeten Fällen konnte ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem lokalen Großhandelsmarkt für Meeresfrüchte und Feuchttiere festgestellt werden. Das Chinese Center for Disease Control and Prevention (CCDC) entsandte daraufhin ein Team von Expert\*innen zur Untersuchung dieser unbekanntes Krankheit. Jenem Team gelang es, aus bronchoalveolär entnommenen Sekretproben, welche bei den dort stationär behandelten Patient\*innen entnommen wurden, die Genomsequenz des neuartigen Virus zu isolieren. Die Genomsequenz zeigte eine bis zu 85 prozentige Übereinstimmung mit dem bereits bekannten Genom des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), welches der Gattung der Betacoronaviren angehört.(1) Aufgrund der engen Beziehung zu SARS-CoV, wurde das neu aufgetretene Virus Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 (SARS-CoV-2) genannt. Die Namensgebung, die vom International Committee on Taxonomy of Viruses vorgenommen wurde, bezieht sich dabei auf die sehr enge Verwandtschaft zu SARS-CoV.(2)

Die Verbreitung des Virus schritt innerhalb Chinas und bald auch in anderen Ländern rund um die Welt rasch voran. Bereits am 30. Jänner 2020 erklärte die World Health Organization (WHO) den Ausbruch zu einem „public health emergency of international concern“. Bis zum 3. Februar 2020 wurden von offizieller Seite auf dem chinesischen Festland bereits mehr als 20.000 Infektionen mit dem neuartigen Virus bestätigt. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich das Virus bereits offiziell über vier Kontinente hinweg in mehr als 20 Ländern ausgebreitet.(3) Am 11. März 2020 erklärte die WHO den SARS-CoV-2 Ausbruch schließlich zur Pandemie.(4) Zum Zeitpunkt des 25. März 2020 hatten sich weltweit bereits mehr als 470.000 Personen nachgewiesener Weise infiziert und es gab bereits mehr als 21.000 mit dem Virus im Zusammenhang stehende Todesopfer zu vermelden.(5) Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand 5. Februar 2022) hatten sich weltweit 386 Millionen Menschen mit SARS-CoV-2 infiziert und das Virus forderte mehr als 5,7 Millionen Todesopfer.(6)

## 1.2 Allgemeines zu Coronaviren

Coronaviridae, zu welchen die umgangssprachlich als Coronaviren bezeichneten Viren gehören, sind eine Virenfamilie innerhalb der Ordnung Nidovirales. Innerhalb der Familie der Coronaviridae existieren vier Gattungen von Coronaviren. Dabei handelt es sich um die Gattungen der Alphacoronaviren, Betacoronaviren, Gammacoronaviren und Deltacoronaviren. In Evolutionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Alpha- und Betacoronaviren vor allem in Fledermausgattungen und Nagetieren vorkommen, wohingegen bei Gamma- und Deltacoronaviren vor allem unterschiedliche Vogelarten als Wirtstiere dienen.(7) Grundsätzlich wurden Coronaviren in mehreren Vogelarten, sowie mehreren Säugetieren unter anderem Hunde, Katzen, Kamele, Fledermäuse, Mäuse und maskierte Zibeten, nachgewiesen.(8)

### 1.2.1 Geschichte der Coronaviren

In den 1960er Jahren wurden erstmals humane Coronaviren (hCoVs) bei Patient\*innen in Zusammenhang mit Erkältungssymptomen beschrieben.(8) Seither wurden weitere hCoVs nachgewiesen. Vor Dezember 2019 waren sechs Coronaviren bekannt, die zu Infektionen bei Menschen führen können. Diese beinhalten zwei Viren der Gruppe 2 $\alpha$ CoVs (hCoV-229E und HKU-NL63) und vier  $\beta$ CoVs (hCoV-OC43 [Linie A], hCoV-HKU1 [Linie A], SARS-CoV [Linie B] and MERS-CoV [Linie C]). Die  $\beta$ CoV Linie A hCoV-OC43 und hCoV-HKU1 verursachen meist harmlose Infektionen der oberen Atemwege bei immunkompetenten Patient\*innen und können teilweise zu Infektionen der unteren Atemwege bei älteren Menschen und immunschwachen Personen führen.(9) Zu dieser Gruppe der humanpathogenen CoVs gehört auch das SARS-CoV Virus, das Ende 2002 in der Guodong Province in China ausbrach. Hier konnte ein Team von chinesischen Wissenschaftler\*innen aus dem Serum und aus nasopharyngealen Abstrichen das Virus isolieren. Der SARS-CoV Ausbruch führte im Jahr 2002-2003 zu 8.843 dokumentierten Fällen und forderte weltweit 813 Todesopfer, bevor die Pandemie unter Kontrolle gebracht werden konnte.(10) Des Weiteren trat im Jahr 2012 eine weitere potentiell lebensbedrohliche Pandemie auf, die von einem Coronavirus verursacht wurde. Hierbei handelte es sich um das Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS), welches erstmals bei einem verstorbenen 60-jährigen Saudi-Arabischen Patienten aus dessen Sputum nachgewiesen wurde. Der Patient hatte sich mit einer akuten Pneumonie und einem Nierenversagen unklarer Genese präsentiert.(11) Im von der WHO veröffentlichten MERS Situation Update vom

September 2019 wurden insgesamt weltweit 2.468 nachgewiesene Fälle gemeldet, wobei die Krankheit mit 851 nachgewiesenen Todesfällen eine sehr hohe Case Mortality Rate von circa 34 Prozent aufweist.(12)

### **1.3 Aufbau von SARS-CoV-2**

Coronaviren sind eine Familie von umhüllten, positivsträngigen RNA Viren mit einer Genomlänge von 26 bis 32 Kilobasen.(13) Im Rahmen dieser Arbeit wird speziell auf das im Dezember 2019 neu aufgetretene Virus SARS-CoV-2 eingegangen. Bald nachdem bekannt wurde, dass es in der Provinz Hubei mehrere Fälle von akuter Pneumonie unklarer Genese gab, gelang es einem chinesischen Forscher\*innen Team, aus dem Bronchialsekret und den angelegten Zellkulturen von neun Patient\*innen, die an der unklaren Lungenkrankheit litten, eine Genomsequenz des Virus mittels Next-Generation Sequenzierung nachzuweisen. Dabei gab es innerhalb der Patienten\*innenproben eine virale Genomübereinstimmung von 99 Prozent. Das zu diesem Zeitpunkt noch unbekannte Virus war am engsten zu zwei im Dezember 2018 in Fledermäusen isolierten Virenstämmen verwandt. Dabei handelte es sich um die Viren bat-SL-CoVZC45 und bat-SL-CoVZXC21. Zu anderen bekannten Coronaviren, die bereits zuvor zu Pandemien geführt hatten, wurden geringere Genomübereinstimmungen festgestellt. Im Falle von SARS-CoV lag diese bei rund 79 Prozent und im Falle von MERS lag sie bei knapp 50 Prozent. Phylogenetische Analysen zeigten, dass das zu diesem Zeitpunkt noch 2019-nCoV genannte Virus zur Subgruppe Sarbecovirus der Gattung Betacoronavirus gehört. Bei diesen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass das Virus so weit von SARS-CoV divergiert, um es als eigenständiges humanpathogenes Coronavirus einzustufen.(14)

#### **1.3.1 SARS-CoV-2 Genom**

Das Genom des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2, welches zum damaligen Zeitpunkt noch als 2019-nCoV bezeichnet und in dieser Arbeit in weiterer Folge unter der Abkürzung SARS-CoV-2 beschrieben wird, wurde von einem chinesischen Forscher\*innenteam im Jänner 2020 wie folgt beschrieben. Das einsträngige RNA Genom von SARS-CoV-2 besteht aus 29.891 Nucleotiden und kodiert für 9.860 Aminosäuren. Der Guanin + Cytosin Basenanteil beträgt 38 Prozent.(15) Diese Ergebnisse konnten von einer weiteren im Jänner 2020 durchgeführten Studie, in welcher sechs Proben von infizierten Mitarbeiter\*innen des Seafood Markets untersucht

wurden, bestätigt werden. Auch hier zeigte sich ein aus 29.891 Basenpaaren bestehendes Genom. Ein Datenabgleich von SARS-CoV-2 mit SARS-CoV zeigte auch hier eine Übereinstimmung der Genomsequenz von 79,6 Prozent.(16) Ähnlich zu anderen  $\beta$ CoVs enthält das Genom von SARS-CoV-2 zwei flankierende untranslatierte Regionen (UTR) und einen langen Open Reading Frame (ORF), der ein Polyprotein codiert. Das Genom von SARS-CoV-2 ist in der Reihenfolge wie folgt angeordnet: Der 5' - Replikase folgen die Strukturproteine, Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) und Nucleocapsid (N). Während in den meisten Genomsequenzen SARS-CoV-2 eine Übereinstimmung mit SARS-CoV von über 90 Prozent aufweist, bestehen die wesentlichen Unterschiede im Bereich des S-Proteins und in den Orf 8 und Orf 3b. Vor allem in Abschnitten der Spike1 (S1) -Untereinheit und in Orf 8 bestehen die größten Unterschiede. Diese Bereiche gelten auch als Hotspot in der Rekombinationsgabe von SARS-CoV-2.(15)

### **1.3.2 Spike-Protein**

Da das in der Folge beschriebene Spike-Protein in den Ansätzen diverser Impfstoffentwickler eine Hauptrolle einnimmt und dort die größten Unterschiede zwischen SARS-CoV-2 und SARS-CoV auszumachen sind, wird in diesem Abschnitt vertieft auf das S-Protein eingegangen. Das S-Protein besteht aus zwei Untereinheiten, der S1-Untereinheit und der Spike2 (S2) -Untereinheit. Die S1-Untereinheit beinhaltet ein Signalpeptid gefolgt von einer N- Terminalen Domain (NTD) und einer Receptor Binding Domain (RBD). Die S2-Untereinheit besteht dahingegen aus einem Fusionspeptid (FB), Heptadenmuster 1 und 2, Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne (CP). Die meisten Aminosäurenunterschiede befinden sich in der externen Subdomäne, welche für die direkte Wechselwirkung von Virus und Wirtszelle verantwortlich ist. Diese Region stellt auch den Ansatzpunkt für die meisten Impfstoffentwicklungen dar.(15) Diese Ergebnisse wurden auch in einer weiteren Studie eines anderen Forschungsteams deutlich. Auch hier zeigte sich eine Abweichung in der Gensequenzanalyse von SARS-CoV-2 und anderen SARS ähnlichen Viren. Diese Studie zeigte außerdem, dass das Genom des S-Proteins die größte Ähnlichkeit mit einem Virus namens RaTG13 hat. Hierbei konnte eine Genomübereinstimmung im S-Genom, von 93,1 Prozent, zwischen den beiden Viren gezeigt werden. Sowohl SARS-CoV-2 als auch RaTG13 sind wesentlich länger als andere SARS-CoVs und weisen deutliche Veränderungen im Bereich der RBD auf. Aufgrund des Vorkommens von RaTG13 in

Fledermäusen und da es die engste bekannte Verwandtschaft zu SARS-CoV-2 aufweist, geht die Forscher\*innengruppe davon aus, dass das Virus von Fledermäusen abstammen könnte.(16)

### **1.3.3 ACE2-Rezeptor**

In der bereits zitierten Forschungsarbeit, welche an Proben von sechs infizierten Arbeiter\*innen des Wuhan Seafood Market durchgeführt wurde, untersuchte man ebenfalls die Eintrittsmechanismen des Virus in die Wirtszellen. Da bekannt war, dass der Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) -Rezeptor einen Zellrezeptor für SARS-CoV darstellt, fokussierte sich das Team zuerst auf diesen Rezeptor. Hierfür wurden HeLa Zellen von Menschen und Zellen von mehreren Säugetieren verwendet, welche ACE2-Rezeptoren exprimierten oder nicht exprimierten. Dabei zeigte sich, dass SARS-CoV-2 alle Zellen infizieren konnte, die ACE2-Rezeptoren exprimierten. Im Gegensatz dazu konnten Zellen, welche keine ACE2-Rezeptoren exprimierten, nicht befallen werden. Das Forscher\*innen Team schlussfolgerte daraus, dass das Virus vermutlich ACE2-Rezeptoren verwendet, um in die Zellen einzudringen. Es wurden in dieser Studie auch weitere Rezeptoren, die als Eintrittspforte für andere Coronaviren dienen, wie zum Beispiel DPP4, untersucht. Allerdings gelang es dem SARS-CoV-2 bei keinem anderen Rezeptor in die Zellen einzudringen.(16)

## **1.4 SARS-CoV-2 Varianten**

Im folgenden Abschnitt werden die am meisten verbreiteten SARS-CoV-2 Mutationen bis Ende 2021 beschrieben, bei welchen angenommen wird, dass sie Einfluss auf die Effektivität der entwickelten Impfstoffe nehmen könnten. Mutationen des Virus, vor allem im Bereich des S-Protein, könnten die Effektivität und Wirksamkeit, der gegen SARS-CoV-2 entwickelten Impfstoffe, vermindern. Besonders anhaltend hohe Infektionsraten geben dem Virus die Chance, Mutationen zu erwerben. Deswegen ist es wichtig, in einer Pandemie die Infektionszahlen niedrig zu halten und möglichst rasch wirksame Impfstoffe zu entwickeln.(17)

### **1.4.1 B.1.1.7. (Alpha Variante)**

Die zuerst in Großbritannien beschriebene Variante bereitete im Dezember 2020 große Probleme in deren Gesundheitssystem, da sie zu sehr hohen Fallzahlen führte. Die Variante enthält 17 Mutationen im Vergleich zur Variante D614G, die sich bald nach Ausbruch der Pandemie als weltweit dominierende Variante durchgesetzt hatte.

Von diesen Mutationen befinden sich acht in der Gensequenz die für das S-Protein kodiert und stellen so eine potentielle Bedrohung für Impfstoffe dar, die auf dem S-Protein basieren. Die drei bedeutendsten Veränderungen sind eine zwei Aminosäuren Deletion an Position 69-70 der NTD, die Mutation im N501Y Gen welches für die RBD kodiert und an P618, welche für die Furinbindungsstelle wichtig ist.(17) Einige Regressionsanalysen mit Daten aus Großbritannien zeigten, dass das Virus einen Anstieg der Reproduktionszahl um 77 Prozent zur Folge haben könnte. Weitere in dieser Analyse ausgewertete Daten aus Dänemark mit 55 Prozent, der Schweiz mit 72 Prozent und der USA mit 59 Prozent, zeigten ebenfalls einen Anstieg der Reproduktionszahl.(18) Es zeigte sich also in den Daten, dass die Variante deutlich ansteckender sein dürfte. Zwei Hypothesen, weshalb das Virus ansteckender sein könnte, waren zum einen niedrigere Ct-Werte, also eine höhere Virenlast oder zum anderen eine verlängerte Ausscheidungsdauer des Virus.(18) Es wurde zuerst vermutet, dass die Variante zu mehr Krankenhausaufenthalten und schwereren Verläufen führen würde. In einem Bericht von Public Health England wurde berichtet, dass von 3.538 Erkrankten, 42 ins Krankenhaus eingeliefert werden mussten. Davon waren 16 Patient\*innen oder 0,9 Prozent von der Variante betroffen und 22 oder 1,5 Prozent mit dem Wildtyp infiziert. Somit bestätigte sich diese Vermutung nicht. Allerdings waren diese Daten nicht statistisch signifikant.(19)

#### **1.4.2 B.1.351. (Beta-Variante)**

Die Beta-Variante wurde erstmals in Südafrika beschrieben. Deutlich schnellere Anstiege der SARS-CoV-2 Fallzahlen in einigen Landesteilen hatten dort für Verwundung gesorgt. Das führte zu einer intensivierten Überwachung durch das dort ansässige Netzwerk für genomische Überwachung. Dieses untersuchte 2.589 vollständige SARS-CoV-2 Genomsequenzen, welche von März 2020 bis November 2020 entnommen worden waren. Dabei zeigte sich, dass eine neue Variante ab Mitte Oktober 2020 aufgetreten war, welche die bis dahin dominierenden Varianten bereits bis Anfang November 2020 übertroffen hatte. Im Vergleich zur D614G Variante, zeigten sich acht Veränderungen im S-Protein. Drei dieser Veränderungen betrafen die RBD, drei weitere die NTD und zwei weitere einen Loop.(20) Es zeigte sich, dass mononukleare Antikörper gegen die NTD und auch einige neutralisierende mononukleare Antikörper gegen die RBD deutlich schlechter wirksam waren, als bei vorherigen Varianten. Es wurde deswegen befürchtet, dass dies die Wirksamkeit von potentiellen Impfstoffen

deutlich reduzieren könnte.(21) Eine weitere an hospitalisierten Patient\*innen durchgeführte Studie in Südafrika zeigte allerdings, dass auch bei B.1.351 neutralisierende Antikörper in ähnlichem Maße wirksam waren, wie bei zuvor bereits zirkulierenden Varianten. Des Weiteren zeigte sich eine ausgeprägte Kreuzreaktivität, der bei B.1.351 Patient\*innen gebildeten Antikörper mit anderen Varianten, wie etwa der P1 Variante, welche in Brasilien erstmals beschrieben wurde und ebenfalls als potentielle Gefahr für die Impfstoffentwicklung eingestuft wurde.(22)

### **1.4.3 B.1.617.2. (Delta Variante)**

Die Delta Variante wurde erstmals im Oktober 2020 in einer Provinz in Indien gemeldet, von wo aus sie sich auf das ganze Land ausbreitete. Diese Variante ist von zwei kritischen Aminosäure Substitutionen geprägt, welche die RBD betreffen. Es entwickelten sich daraus drei Untereinheiten. Die sich weltweit verbreitende und mittlerweile in vielen Ländern, einschließlich Österreich dominierende Variante, ist nur von einer Mutation L452R in der RBD betroffen. Insgesamt enthält die Delta Variante 17 Mutationen in ihrer Genomsequenz. Die Mutation in L452R verleiht dem Virus eine stärkere Affinität für den ACE2-Rezeptor und eine verringerte Erkennungsfähigkeit für das Immunsystem.(23)

### **1.4.3 B.1.1.529 (Omikron Variante)**

Im November 2021 wurde erstmals aus Südafrika von einer neuen Variante berichtet, die dort zu einer rasanten Zunahme der Neuinfektionen geführt hatte. Bei dieser Variante waren im Vergleich zum ursprünglichen SARS-CoV-2 Virus 32 Mutationen im Genabschnitt, welcher für das Spike Protein kodiert aufgetreten. Durch diese Veränderungen wurde von vielen Wissenschaftler\*innen schnell angenommen, dass diese Variante infektiöser sein könnte und dem Immunsystem besser entkommen kann. Dies könnte wiederum auch zu einer Abnahme der Impfstoffwirksamkeit führen. Einige der aufgetretenen Mutationen betreffen die RBD. Dabei handelt es sich unter anderen auch um Mutationen, die bereits bei anderen Varianten aufgetreten waren. Dazu gehören etwa D614G, oder auch K417N welche bereits in der Beta Variante aufgetreten ist. Eine weitere Mutation E484A trat ebenfalls bereits bei Beta und Gamma auf und verlieh diesen Varianten die Fähigkeit für Reinfektionen. Des Weiteren kommt es bei der Omikron Variante aufgrund der Umwandlung einer hydrophilen in eine hydrophobe Aminosäure und einer Mutation in N501Y zu einer erhöhten Bindung an den ACE2-Rezeptor.(24)

## **2 Material und Methoden**

Diese Arbeit beruht auf einer Literaturrecherche zum Thema „Die Entwicklung von SARS-CoV-2 Impfstoffen und mögliche zukünftige Anwendungsgebiete von messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Impfstoffen“.

Zur Aufarbeitung dieser Themen, wurden aktuelle wissenschaftliche Artikel, Suchmaschinen und Lehrbücher verwendet. Die aktuelle Literatur wurde über die Onlinedatenbanken PubMed und Google Scholar bezogen. Dabei wurden Suchbegriffe wie „SARS-CoV-2“, „vaccine development“, „mRNA vaccination“ und „mRNA technologie“ verwendet. Des Weiteren erfolgte eine gezielte Suche nach den Studien bereits zugelassener SARS-CoV-2 Impfstoffe. Bei der Verwendung von Suchmaschinen wurde darauf geachtet, nur renommierte Quellen zu verwenden und Datensätze aus peer-reviewed Journalen und Datenbanken zu beziehen.

Die gesamte verwendete und gesammelte Literatur wurde im Literaturverwaltungsprogramm Zotero eingetragen und gespeichert. Die Zitierweise erfolgte im Vancouver-Stil.

## **3 Impfstoffentwicklung**

Nachdem sich das Virus im Februar 2020 zu einer weltweiten Pandemie entwickelt hatte, verordneten viele Staaten zur ersten Eindämmung der Virusverbreitung Lockdowns, wie auch in Österreich am 16. März 2020 einer verhängt wurde.<sup>(25)</sup> Da es weder Medikamente noch Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 gab, war dies für viele Staaten das einzige Mittel eine unkontrollierte Ausbreitung des Virus zu verhindern. Dies führte neben der Freiheitsbeschränkung vieler Menschen auch zu einem enormen wirtschaftlichen Schaden, weshalb schnell klar wurde, dass eine Impfung oder ein potentes Medikament der einzige Ausweg aus der größten Gesundheitskrise des 21. Jahrhunderts sein würde.<sup>(26)</sup> In dieser Arbeit wird im weiteren Verlauf nun auf die Impfstoffentwicklung bei SARS-CoV-2 und auf die verschiedenen Entwicklungsansätze im Hinblick auf die Impfstoffarten eingegangen. Des Weiteren wird ein Überblick über die in Österreich zugelassenen Impfstoffe geschaffen. In einem weiteren Punkt wird im Rahmen der Arbeit noch ein Ausblick auf die möglichen zukünftigen Einsatzgebiete von mRNA Impfstoffen geworfen.

### 3.1 Impfstoffentwicklung Fokus auf dem S- Protein

Die meisten Impfstoffentwickler\*innen, die an SARS-CoV-2 Impfstoffen forschen, verwenden das S-Protein als Virusantigen, um eine Immunantwort hervorzurufen. Dies geht darauf zurück, dass bereits bei SARS-CoV gezeigt werden konnte, dass das S-Protein vermutlich für die Bildung von Antikörpern den besten Ansatz darstellt. So konnte in einer Studie, bei welcher ein Parainfluenzavirus Typ 3 (BHPIV3) als Vektor für die einzelnen Strukturproteine von SARS-CoV verwendet wurde, gezeigt werden, dass nur Antikörper bei der BHPIV3/S-Protein Kombination nachgewiesen werden konnten. Während eine Kombination mit den anderen Strukturproteinen von SARS-CoV keine Verstärkung des Effekts zeigte und auch die Einzelkombinationen der Strukturproteine keine Antikörperbildung hervorrufen konnte.(27) Denselben Effekt konnten Forscher ebenfalls bereits 2004 bei der Entwicklung eines experimentellen Impfstoffes gegen SARS-CoV nachweisen. Hierbei konnte bei allen acht in der Studie eingebundenen Äthiopischen Grünmeerkatzen durch die Verabreichung von BHPIV3/SARS-S-Protein eine Immunreaktion hervorgerufen werden, wohingegen bei der Kontrollgruppe keine Immunreaktion stattfand.(28) Aufgrund dieser bereits von SARS-CoV bekannten guten Ansprechbarkeit des Immunsystems auf das S-Protein und dessen Funktion als Bindeglied von Virus und Mensch via ACE2-Rezeptor, rückte dieses schnell als Hauptansatzpunkt für die Impfstoffentwicklung ins Zentrum der Forschung.(28)

Weitere wichtige Untersuchungsergebnisse, das S-Protein betreffend, zeigten sich ebenfalls bereits bei SARS-CoV und MERS bei der Erforschung von S-Protein Untereinheiten. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei Nagetieren und in der *in vitro* Untersuchung bei der Verwendung eines vollständigen rekombinierten S-Proteins von SARS-CoV, neutralisierende Antikörper gebildet werden konnten. Allerdings wurde auch eine Bildung von infektionsverstärkenden Antikörpern sichtbar. Dadurch konnte das Virus in humane Monozyten und Lymphozyten eindringen und so zu einer immunvermittelten Verstärkung der Infektion führen.(29)

Einen interessanten Ansatz um dieses Phänomen zu verhindern stellt die Verwendung der S1-Untereinheit des S-Proteins dar. Diese Untereinheit ist wesentlich kürzer als das vollständige S-Protein und konnte in Studien eine ebenbürtige Anzahl an neutralisierenden Antikörpern erzeugen. Auch in einem Mäuseversuch zeigten sich die mit der S1-Untereinheit immunisierten Mäuse geschützt.(30) Die S2-Untereinheit konnte

dahingegen keine neutralisierenden Antikörper hervorrufen.(30) Sie könnte aber als möglicher Ansatz für einen Universalimpfstoff dienen, da die Aminosäurenstruktur in dieser Untereinheit sehr gut erhalten ist und somit für eine breite Impfstoffentwicklung dienen könnte.(31)

Einen weiteren interessanten Ansatzpunkt stellt die RBD, die ein Teil der S1-Untereinheit ist, dar. Die RBD ist eine einzelne Domäne innerhalb der S1-Untereinheit, welche alle strukturellen Informationen enthält um mit dem ACE2-Rezeptor zu interagieren. (32) Die RBD besteht aus einer Kernstruktur und dem Receptor Binding Motif (RBM), wobei das RBM an die äußere Oberfläche des ACE2-Rezeptors bindet.(33) Die RBD stellt also einen entscheidenden Faktor bei der Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle dar. Aufgrund dessen stellt sie einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für die Impfstoffentwicklung dar.

Weitere Strukturproteine von SARS-CoV konnten in Studien keine neutralisierenden Antikörper bilden. So zeigten mehrere Studien, dass bei der Abwesenheit des S-Proteins, weder beim E-Protein, M-Protein noch beim N-Protein, sowohl in Tierversuchen als auch bei *in vitro* Untersuchungen, neutralisierenden Antikörper gebildet werden konnten.(27) In einer Studie wurde das rekombinante Nukleokapsid (rN) des SARS-CoV Erregers kloniert und über *Escherichia coli* Bakterien exprimiert. Es wurde dann mittels 6 M Harnstoff extrahiert und mittels Ni<sup>2+</sup> + Affinitätschromatographie gereinigt. Danach wurden Mäuse mit dem rekombinierten Nukleotid immunisiert und jeweils zwei und vier Wochen nach der ersten Impfung geboostert. Dabei wurde einer Gruppe das rekombinierte Nukleotid in einer Trägersubstanz aus Montanide ISA-51 und einer anderen Gruppe eine Kombination aus rekombinantem Nukleotid und phosphatgebufferter Salzlösung als Trägersubstanz verabreicht. Bei den Mäusen wurden alle zwei Wochen Blutproben entnommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Mäuse, welche mittels rN-Protein und Montanide ISA-51 immunisiert wurden, IgG2a-Antikörper bildeten. Wohingegen die Mäuse, welche mittels rN-Protein und phosphatgebufferter Salzlösung immunisiert wurden, hauptsächlich IgG1-Antikörper bildeten. Die Autor\*innen gehen davon aus, dass das N-Protein, auch wenn es keine neutralisierenden Antikörper bilden kann, eventuell einen Einfluss auf die T- und B- Zell Immunantwort haben könnte.(34)

## 3.2 Geschichte der Impfung

In diesem Abschnitt soll ein grober Überblick über die zeitliche Evolution der Impfung gegeben werden. Beginnend bei den Pionieren der Impfung gegen Ende des 18. Jahrhunderts bis hin zu der in dieser Arbeit behandelten Entstehung der neuartigen Impfstoffe, die gegen SARS-CoV-2 entwickelt wurden.

Die Geschichte des Impfens startete im späten 18. Jahrhundert. 1776 impfte Edward Jenner erstmals Menschen mit Kuhpocken, welche er aus den Pusteln einer an Kuhpocken erkrankten Milchmagd entnommen hatte. Seine Annahme beruhte auf der Theorie, dass ein für Tiere virulenter Virus, bei Menschen zu abgeschwächten Infektionen von humanpathogenen Viren führen könnte. Dieses Prinzip der Attenuierung dient auch teils heute noch der Herstellung gewisser Impfstoffe. Bei seinen Beobachtungen zeigte sich auch, dass nur echte Kuhpocken eine Immunität gegen Pocken hervorriefen, während andere Rinderzoonosen dies nicht konnten.(35)

Schon lange vor Jenner entwickelte sich über die Jahrhunderte die Idee, Virusinfektionen abzuschwächen. So führte man vor allem im asiatischen Raum lange Zeit Variolationen durch. Dies basiert auf demselben Prinzip, wie etwa kleine Giftmengen zu applizieren um einen toxischen Effekt zu vermeiden. So wurden etwa aus den Pusteln von Pockenerkrankten Material entnommen und gesunden Personen subkutan injiziert. Der Nachteil bestand allerdings darin, dass sich die Viren teilweise wieder aktivieren und so die Erkrankung erneut hervorrufen konnten.(36)

Wie es Jenner bereits Ende des 18. Jahrhunderts gelang, konnten in weiterer Folge mehrere Lebendimpfstoffe entwickelt werden. So wurden etwa Rhesus- und Rinderrotavirusstämme verwendet, um einen humanen Rotavirusimpfstoff zu entwickeln. Auch Impfstoffe gegen Anthrax, Tollwut, Tuberkulose und im Laufe des 20. Jahrhunderts auch noch gegen Gelbfieber, konnten nach dem Prinzip der Attenuierung entwickelt werden.(36)

Eine Revolution in der Impfstoffentwicklung stellte die Entdeckung dar, dass Zellen *in vitro* kultiviert und als Substrat für das Virenwachstum verwendet werden können. Dies hat im Gegensatz zur Attenuierung in einem Wirtstier den Vorteil, weniger anfällig für Verunreinigungen zu sein. Die Passage durch mehrere Zellkulturen führt im Wesentlichen zu einer Anpassung des Wachstums an das Medium, wobei die dabei entstehen-

den am besten für das Wachstum geeigneten Mutanten, oft die Fähigkeit verloren haben einen Menschen zu infizieren beziehungsweise sich im menschlichen Körper zu reproduzieren. Einige Beispiele von Impfstoffen dieser Herstellungstechnik sind die Impfstoffe gegen Mumps, Masern, Röteln, Varicellen, den japanischen Enzephalitis Stamm SA 14-14-2 und den monovalenten Rotavirus Impfstoff.(36) So wurde etwa 1989 von einem mit dem Rotavirusstamm 89-12 infizierten Mädchen Virenmaterial gewonnen. Dieses wurde im Anschluss 26 Mal durch eine Zellkultur mit Nierenzellen von Äthiopischen Grünmeerkatzen angezüchtet und dann sieben Mal in einer weiteren Zelllinie angesetzt. Das Ergebnis zeigte, dass die Virulenz des Virus verloren gegangen war. Bei den geimpften Proband\*innen, die zuvor serumnegativ gewesen waren, hatten sich bei 19 von 20 Proband\*innen IgA-Antikörper gegen das Rotavirus gebildet.(37)

Eine weitere Entwicklung im Bereich der Impfung fand gegen Ende des 19. Jahrhunderts statt. Man stellte zu dieser Zeit fest, dass die Immunogenität von Bakterien erhalten bleiben konnte, wenn man sie vorsichtig durch thermische oder chemische Verfahren behandelte. Bei den mit diesen Methoden entwickelten Impfstoffen handelt es sich um inaktivierte Impfstoffe. Die ersten inaktivierten Impfstoffe wurden gegen Typhus, Pest und Cholera entwickelt. Weitere Impfstoffe dieser Klasse wurden Anfang des 20. Jahrhunderts gegen Pertussis und Diphtherie entwickelt. Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurde die chemische Inaktivierung schließlich auch auf virale Erreger ausgeweitet. So entstanden im Laufe des 20. Jahrhunderts inaktivierte Impfstoffe gegen Influenza, Polio, Hepatitis A, das japanische Enzephalitis Virus oder auch gegen FSME.(36)

Einen weiteren Meilenstein in der Impfgeschichte stellte die Entdeckung dar, dass Erreger von Polysaccharidkapseln umgeben sind. Spezifisch gegen diese Polysaccharide gerichtete Antikörper, können die Phagozytose der Erreger beschleunigen. So konnten Mitte des 20. Jahrhunderts erste Impfstoffe entwickelt werden, die Bestandteile oder sogar Kombinationen verschiedener Polysaccharide enthielten, wie etwa bei der Pneumokokkenimpfung. Weitere im Laufe des 20. Jahrhunderts entwickelte Impfstoffe sind jene gegen Meningokokken und Hämophilus Influenza B.(36)

Ab der Mitte des 20. Jahrhunderts wurden auch einige der zuvor oben beschriebenen inaktivierten Impfstoffe durch eine elegantere Methode ersetzt beziehungsweise verbessert. Hierbei wurde nun nicht mehr der vollständig inaktivierte Virus verwendet,

sondern nur gewisse Proteinbestandteile der Viren. Dies führte dazu, dass die Impfstoffe weniger Impfreaktionen nach sich zogen. Einige moderne Beispiele für diese Art der Herstellung sind die Influenzaimpfstoffe, der Tollwutimpfstoff oder auch azelluläre Pertussisimpfstoffe.(36)

Durch den Fortschritt in der Gentechnik kam es gegen Ende des 20. Jahrhunderts zu einem weiteren Sprung in der Impfstoffforschung. Es besteht nun die Möglichkeit durch Genomsequenzen, kodierende Abschnitte von Viren zu detektieren und diese dann in Zellkulturen anzusetzen. In diesen Zellkulturen die zum Beispiel aus Tier oder Insektenzellen bestehen können, werden die Antigene für den Impfstoff produziert. Dies ermöglicht eine viel schnellere Suche nach geeigneten Antigenen und bedeutet eine Beschleunigung des Herstellungsprozesses. Dies ebnete auch den Weg in Richtung Vektorimpfstoffe. Hierbei werden einem für Menschen ungefährlichen Virus, welches als Vektor dient, Genomsequenzen eines pathogenen Virus eingebaut. Auch der Weg zu den auf mRNA basierenden Impfstoffen wurde erst durch Entwicklungen in der Gentechnik möglich.(36)

### **3.3 Allgemeines zur Entwicklung von Impfstoffen**

Die Entwicklung bis hin zur Marktzulassung eines Impfstoffes dauert in der Regel zwischen 10 bis 15 Jahre. Die Impfstoffzulassung unterliegt strengsten Kriterien und muss mehrere Phasen durchlaufen.(38,39)

Die Explorationsphase dauert in der Regel zwei bis fünf Jahre. In dieser Phase wird Grundlagenforschung im Labor betrieben. Hierbei werden Konzepte erstellt und Ideen gesammelt, um ein Antigen gegen welches die zukünftige Impfung wirken soll, herzustellen. So wird in einem ersten Schritt der Erreger darauf analysiert, welche Bestandteile des Erregers eine Immunreaktion beim Menschen hervorrufen können.(29)(30)

Auf die Explorationsphase folgt die präklinische Phase, in welcher nun der potenzielle Impfstoff, in Laborversuchen an Tieren oder in Zellkulturen mit menschlichen Zellen, getestet wird. In dieser Phase wird vor allem auf die Immunogenität, die Verträglichkeit und mögliche Komplikationen des Impfstoffs geachtet. Dadurch erlangen die Forscher\*innen eine Vorstellung über die zellulären Reaktionen, welche beim Menschen zu erwarten sind. Des Weiteren können in dieser Phase auch eine sichere Anfangsdosis und die richtige Methode für die Verabreichung des Impfstoffes für die weiteren Phasen gefunden werden. Die Zulassungsbehörden werden in dieser Phase bereits

mit vollständigen Daten versorgt. Unter normalen Bedingungen dauert die präklinische Phase zwischen ein und zwei Jahre, wobei von 100 potentiellen Impfstoffen in der Regel sechs diese Phase überstehen.(38)(30)

Nach positiver Absolvierung der präklinischen Phase kann ein Impfstoff nun am Menschen getestet werden. Dieser Prozess besteht aus mindestens drei klinischen Phasen, wobei eine vierte Phase nach Marktzulassung meist ebenfalls durchgeführt wird.

In Phase 1 wird eine gewisse Anzahl an gesunden Proband\*innen, meistens zwischen 20 und 100 Personen, geimpft. Sollte ein Impfstoff für Kinder bestimmt sein wird der Impfstoff zuerst ebenfalls an Erwachsenen getestet und erst nachdem keine Sicherheitsbedenken bestehen, wird das Alter der Proband\*innen schrittweise reduziert. Phase 1 der klinischen Studien soll aufzeigen, ob der Impfstoff sicher ist und ob eine Immunantwort bei den Proband\*innen hervorgerufen werden kann. Bei dieser Phase handelt es sich meist um eine offene Studie. Dies bedeutet, dass sowohl der\*die Proband\*in als auch die Forscher\*innen wissen, mit welchem Mittel der\*die Proband\*in behandelt wird. Erst wenn keine Sicherheitsbedenken bestehen und eine gute Wirksamkeit des Impfstoffes nachgewiesen wurde, kann der Prozess in die nächste Phase weitergehen.(38)(30)

In Phase 2 der klinischen Untersuchung handelt es sich um randomisierte Studien, die eine Placebogruppe enthalten. An Phase 2 nehmen mehrere hundert freiwillige Proband\*innen teil. Darunter können sich auch schon Risikopatient\*innen befinden, die besonders von der potenziellen Impfung geschützt werden sollen. Es soll dabei, wie bereits in Phase 1, vor allem die Sicherheit und Wirksamkeit der Impfung überprüft werden. Des Weiteren wird auch geprüft, mit welcher Dosierung, Verabreichungsart und welchem Impfschema eine optimale Wirkung erzielt werden kann.(38)(30)

Vor der finalen Zulassung des Impfstoffes wird in Phase 3, an einer großen Gruppe von Personen getestet. In dieser Phase sind mehrere tausend Proband\*innen beteiligt. Das ist nötig, um Nebenwirkungen, die bei 1:1.000 Personen auftreten, feststellen zu können. Dafür sind bis zu 60.000 Studienteilnehmer\*innen nötig. Nebenwirkungen werden im Vergleich zur Kontrollgruppe genauestens dokumentiert und das Sicherheitsprofil wird dadurch weiter erhöht. Weiters wird in dieser Phase getestet, ob Antikörper gegen die Erreger gebildet werden. Alle Zielgruppen, für welche die Impfung hergestellt wird, können an dieser Phase teilnehmen.(38)(30)

Sind alle Phasen positiv absolviert, benötigt der potenzielle Impfstoff noch eine Zulassung. Diese Zulassung wird in der EU grundsätzlich von der Europäischen Arzneimittelagentur erteilt. Hierbei werden die vom Antragssteller eingereichten Daten auf korrekte Durchführung, sowohl der präklinischen und klinischen, als auch der Nachkontrollphase, geprüft. Außerdem werden alle Inhaltsstoffe der Impfung, sowie das Antigen selbst, von der Behörde überprüft. Ein Impfstoff wird auch nur zugelassen, wenn das Verhältnis von Nutzen und Risiko zu Gunsten des Nutzens überwiegt. (39)

Nach der Zulassung werden eventuelle Nebenwirkungen der Impfung ständig von der Zulassungsbehörde überwacht. Auch führen viele Hersteller\*innen nach der Zulassung eine optionale Phase 4 Studie, im Hinblick auf die Sicherheit und Wirksamkeit des bereits zugelassenen Impfstoffes, durch.(38)

### **3.4 SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung unter Pandemiebedingungen**

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, benötigt die Entwicklung von Impfstoffen im Schnitt zwischen 10 und 15 Jahre. Der rasante Ausbruch und die rasche Verbreitung von SARS-CoV-2, stellt die Wissenschaft allerdings vor die Herausforderung, schnellstmöglich einen Impfstoff gegen das Virus entwickeln zu müssen. Der Herstellungsprozess von Impfstoffen kann in Anbetracht einer pandemischen Situation drastisch beschleunigt werden. Hinzu kam, dass die SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklungen, durch große staatliche Förderungen massiv finanziell unterstützt wurden. So wurden alleine über den von der EU eingerichteten Fond „Horizon 2020“ 48,5 Millionen Euro an Forscher\*innen Teams ausbezahlt, die sich exklusiv mit diesem Thema beschäftigten.(40)

Eine weitere Option, die Impfstoffzulassung zu beschleunigen, stellt die Möglichkeit dar, Studienphasen parallel ablaufen lassen zu können, wenn es sicherheitstechnisch möglich ist. Durch die vorliegende Dringlichkeit und die zur Verfügung gestellten Geldmittel, bauten Pharmafirmen bereits während der Zulassungsphasen ihre Produktionskapazitäten aus, um ehestmöglich große Mengen an Impfstoff bereitstellen zu können. Ein weiteres Mittel zur Beschleunigung der Zulassung sind verkürzte Zulassungsverfahren. So können vielversprechende Impfstoffe schon im Laufe der Entwicklung via „rolling review“ beobachtet werden. Bei einem „rolling review“ werden die erhobenen Daten während der laufenden Studien bereits ständig von den Zulassungsbehörden begutachtet. Dies ermöglicht eine Beschleunigung der Datenbegutachtung, nachdem

um eine offizielle Zulassung angesucht wurde.(37)(38) Auf diese Weise kann es gelingen, den Prozess der Impfstoffentwicklung und Zulassung auf 12 bis 18 Monate zu verkürzen.(38)

Durch das Anwenden dieser Methode konnte der erste gegen SARS-CoV-2 entwickelte Impfstoff in der EU bereits etwas mehr als ein Jahr nach Ausbruch der Pandemie, am 22. Dezember 2020, zugelassen werden.(41) Zuvor war am 11. Dezember 2020 in den USA ein erster SARS-CoV-2 Impfstoff zur Anwendung freigegeben worden.(42) Bereits am 11. August 2020 hatte Russland als erstes Land weltweit einen Impfstoff offiziell zugelassen, der jedoch zu dieser Zeit die Phase 3 des Entwicklungsprozesses noch nicht abgeschlossen hatte. Diese Zulassung hatte unter anderem Kritik von der WHO zur Folge, da sie nicht dem Standardprozedere der Internationalen Impfstoffzulassung genügte.(43)

### **3.5 Impfstoffentwicklung bei MERS und SARS-Cov**

Zu Beginn der Pandemie gab es weder einen zugelassenen Impfstoff, noch ein zugelassenes Medikament gegen die dem SARS-CoV-2 Virus am nächsten verwandten humanpathogenen Stämme, MERS und SARS-CoV. Allerdings waren beide Virenstränge sehr gut bekannt und es hatte bereits frühere Ansätze zur Entwicklung von Impfstoffen gegen MERS und SARS-CoV gegeben. Diese Ansätze haben aus diversen Gründen nie zu einer vollständigen Zulassung für einen Impfstoff geführt. Bei MERS verzögerte sich etwa die präklinische Entwicklung aufgrund von fehlenden kostengünstigen Kleintiermodellen. In weiterer Folge wurden wegen der nur lokal begrenzten Ausbrüche und der geringen Menge an infizierten Personen, von Seiten der Pharmaindustrie keine großen Investitionen in die Entwicklung eines Impfstoffes gesteckt. Auch bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen SARS-CoV, dürfte der finanzielle Aspekt eine Hauptrolle gespielt haben, da viele Unternehmen keinen Sinn darin sahen, einen Impfstoff zu entwickeln, obwohl seit 2004 scheinbar keine pandemische Bedrohung mehr vorlag.(44)

Auch wenn keine offiziell zugelassenen Impfstoffe gegen MERS und SARS-CoV entwickelt wurden, konnten doch einige Ansatzpunkte der vorangegangenen Forschung hilfreich für die Entwicklung eines SARS-CoV-2 Impfstoffes sein. Mehrere Impfstoffentwicklungsstudien wurden nach dem Ausbruch der SARS-CoV Pandemie 2002 bis 2003 in Auftrag gegeben. Hierbei wurden durchaus unterschiedliche Ansätze verfolgt.

So stand bereits bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen SARS-CoV das S-Protein im Mittelpunkt vieler Forschungsansätze, da es wie bereits zuvor erwähnt, der Virus dazu nutzt, um in die menschliche Zelle einzudringen. Eine potente Impfung, welche Antikörper gegen das S-Protein bilden würde, könnte so auch verhindern, dass das Virus in menschliche Zellen eindringt. Mehrere Studien dazu befanden sich in klinischen oder präklinischen Phasen und zeigten durchaus vielversprechende Ergebnisse.(44) Ein Beispiel für einen Impfstoff gegen SARS-CoV, stellt ein auf Deoxyribonucleic Acid (DNA) basierender Impfstoff dar, welcher das SARS-CoV S-Protein kodiert. Der Impfstoff bestand aus einem einzelnen geschlossenen DNA-Plasmid-Makromolekül, welches in Bakterienzellkulturen hergestellt wurde. Das DNA-Plasmid wird gereinigt und enthält danach keine viralen oder bakteriellen Komponenten mehr, die nicht für die Produktion des gewünschten Antigens benötigt werden. Das gereinigte Plasmid wurde in einen Expressionsvektor eingebaut. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen Zytomegalievirus (CMV), der bereits in zuvor durchgeführten HIV und Ebola Impfstoffstudien eingesetzt wurde. Der Vektor kodiert für eine Deletionsmutante des SARS-CoV S-Proteins, welches als Antigen für das Auslösen einer Immunantwort dient. Der fertig aufbereitete Impfstoff wurde in einer klinischen Phase 1 Studie an zehn Proband\*innen getestet. Alle Proband\*innen berichteten nach einmaliger Injektion über Nebenwirkungen. Schmerzen an der Einstichstelle des intramuskulär verabreichten Impfstoffes wurden von allen Teilnehmer\*innen angegeben und 50 Prozent gaben systemische Nebenwirkungen wie Fieber, Gliederschmerzen, Kopfschmerzen oder Schüttelfrost an. Keine Proband\*in hatte dabei einen mittelschweren oder schweren Krankheitsverlauf. Der Beobachtungszeitraum nach der Immunisierung erstreckte sich über 32 Wochen, wobei bei 80 Prozent der Teilnehmer\*innen mindestens einmal während des Kontrollzeitraums, Antikörper gegen das S-Protein nachgewiesen wurden. Die Konzentration der Antikörper erreichte rund um Woche acht bis zwölf ihren Höhepunkt und sechs der zehn Teilnehmer\*innen hatten zum Ende des Beobachtungszeitraums noch nachweisbare Antikörperspiegel. Des Weiteren wurde auch die T-Zell Immunantwort untersucht. Es zeigte sich, dass bei 100 Prozent der Proband\*innen eine CD4+ T-Zell Immunantwort hervorgerufen wurde, wohingegen nur 20 Prozent eine CD8+ T-Zellantwort entwickelten.(45) Es gab noch mehrere Ansätze, das S-Protein als Antigen für eine Impfung gegen SARS-CoV zu verwenden. So wurde etwa im präklinischen Bereich versucht, das S-Protein mittels abgeschwächten rekombinierten Viren einzuschleusen. Dazu wurden in einer Studie acht Äthiopische Grünmeerkatzen

immunisiert. Man verwendete dazu einen rekombinierten Parainfluenzavirus, welcher die vollständige Genomsequenz des S-Proteins enthielt. Dieser rekombinierte BHPIV3/SARS-S Virus konnte bei allen Affen eine Produktion von SARS-CoV neutralisierenden Serumantikörpern auslösen. Im Anschluss wurden alle immunisierten Affen und eine Kontrollgruppe mit dem Virus infiziert. Die Affen in der Kontrollgruppe schieden das Virus fünf bis acht Tage lang aus, wohingegen bei den immunisierten Affen zu keinem Zeitpunkt eine Virusausscheidung detektiert wurde.(28) Es gab einige weitere Impfstoffansätze in präklinischen Phasen, die sich mit dem S-Protein beschäftigten. So konnte etwa ein Impfstoff bei Mäusen, der aus den S-Protein-Aminosäuren 318 bis 510 besteht, welche die RBD enthalten, sowohl Antikörper als auch eine zelluläre Immunantwort gegen SARS-CoV hervorrufen.(46) Außerhalb dieses Beispiels befanden sich auch weitere Impfstoffe, welche auf der Verabreichung eines Proteinfragments des S-Proteins beruhten, in präklinischen Phasen und konnten durchaus vielversprechende Ergebnisse in Tiermodellen erzielen.(44)

Es gab aber auch Ansätze einen Impfstoff gegen SARS-CoV herzustellen, der sich nicht auf das S-Protein fixiert. So befand sich etwa ein inaktivierter Impfstoff in einer klinischen Phase 1 Studie. In dieser Studie erhielten 36 Personen entweder eine Immunisierung mit zwei Dosen von inaktivierten SARS-CoV oder zwei Dosen mit der doppelten Menge. Eine dritte Gruppe erhielt ein Placebo. Nach 42 Tagen Beobachtungszeitraum waren in beiden immunisierten Gruppen über 90 Prozent der Proband\*innen serokonvertiert und wiesen Antikörper gegen SARS-CoV auf. Die Antikörperspiegel erreichten bereits nach zwei Wochen ihr Maximum und begannen ab der vierten Woche wieder abzufallen.(47) Eine weitere Methode, die sich in präklinischen Studien als durchaus vielversprechend erwies, war die Immunisierung mittels attenuierten SARS-CoV Impfstoffen, bei denen das E-Protein entfernt worden war. Um es an Mäuse anzupassen wurden in einer präklinischen Studie am Virus einige Aminosäuren substituiert, und das E-Protein entfernt. Die Entfernung des E-Proteins verminderte die Replikationsfähigkeit des Virus, verhinderte allerdings keine Freisetzung. Der so entstandene Virusstrang rMA15-ΔE löste bei der Verabreichung an Mäusen keine schweren Reaktionen hervor. Einer Kontrollgruppe wurde der vollständige Virus appliziert. Diese erlitten schwere Verläufe und verstarben. Des Weiteren zeigte sich, dass die Mäuse, welche mit rMA15-ΔE behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach einer Provokation mit einer letalen Virendosis, gut gegen das Virus geschützt

waren. Sie bildeten außerdem sowohl Antikörper als auch eine T-Zell Immunantwort gegen SARS-CoV aus.(48)

Nicht nur bei der bereits 2002-2003 ausgebrochenen SARS-CoV Pandemie, wurde an der Entwicklung von Impfstoffen geforscht. Auch bei der MERS Pandemie im Jahre 2012 wurde intensiv an der Entwicklung mehrerer Impfstoffe gearbeitet. Wie beim SARS-CoV, nutzten auch bei MERS die meisten Impfstoffentwickler\*innen das S-Protein als Antigen. Es wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um das S-Protein in den menschlichen Körper einzuschleusen.(44) So wurde etwa von einer Forscher\*innengruppe ein Adenovirus-Typ-5 als Vektor verwendet. Hierzu wurde sowohl das S-Protein des MERS Virus, als auch die S1-Untereinheit des S-Proteins, jeweils in einen Adenovirus-Typ-5 integriert. Diese je nach Zusammenstellung entweder Ad5.MERS-S oder Ad5.MERS-S1 genannten Vektorimpfstoffe, wurden Mäusen intramuskulär injiziert. Drei Wochen nach dieser ersten Immunisierung wurden die Mäuse mit einer zweiten Dosis, die dieses Mal intranasal verabreicht wurde, immunisiert. Sowohl die mit Ad5.MERS-S, als auch die mit Ad5.MERS-S1 immunisierten Mäuse entwickelten Antikörper, welche spezifisch gegen MERS-S gerichtet waren. Dies war in einer eingesetzten Kontrollgruppe nicht der Fall.(49) Es gab zu MERS auch noch einige weitere Studien in präklinischen Phasen, die sich mit Viren als Vektor, für die S1-Untereinheit oder das komplette S-Protein beschäftigten. So zeigten Studien welche Masernviren, Tollwutviren und Pockenviren als Vektor verwendeten, durchaus gute Erfolge.(44) Ähnlich wie bei SARS-CoV, wurden auch bei MERS, Studien mit auf DNA basierenden Impfstoffen durchgeführt. So befand sich ein Impfstoff namens GLS-5300 MERS in einer klinischen Phase 1 Studie. An dieser Studie nahmen 75 gesunde Erwachsene zwischen 18 und 50 Jahren teil. Der Impfstoff enthielt das vollständige S-Protein und wurde in unterschiedlichen Dosierungen an die Proband\*innen verabreicht. Dafür wurden jeweils 25 Teilnehmer\*innen einer Gruppe zugewiesen, die entweder 0,67 mg, 2mg oder 6mg von GLS-5300 MERS injiziert bekamen. Es konnte in keiner Gruppe eine schwere wirkstoffassoziierte Nebenwirkung festgestellt werden. Bei über 90 Prozent der Teilnehmer\*innen traten allerdings Schmerzen an der Einstichstelle auf und je nach Gruppe gaben zwischen 20 und 40 Prozent Kopfschmerzen als häufigste Nebenwirkung an. Diese Nebenwirkungen wurden größtenteils als mild angegeben und waren selbstlimitierend. Bei 15 Teilnehmer\*innen kam es außerdem zu einem Anstieg der Kreatininphosphatase. Eine Serokonversion trat bei 86 Prozent der Teilnehmer\*innen nach einer Teilimpfung auf und bei 94 Prozent nach zwei oder drei

Teilimpfungen. Des Weiteren wurden bei 50 Prozent der Teilnehmer\*innen neutralisierende Antikörper nachgewiesen und bei 71 Prozent wurde eine T-Zell Immunantwort nach mindestens zwei Teilimpfungen nachgewiesen.(50)

Auch bei MERS wurde an attenuierten Lebendimpfstoffen und an chemisch oder physikalisch inaktivierte Impfstoffen, in präklinischen Studien geforscht.(44)

### **3.5.1 Entwicklungseinschränkungen bei SARS-CoV und MERS Impfstoffen**

Die Entwicklung von SARS-CoV und MERS Impfstoffen wurde durch das Fehlen von geeigneten Tiermodellen gebremst. Tiermodelle entwickeln zwar immunologische Reaktionen auf diese Coronaviren, allerdings zeigen sie oft eine verminderte klinische Manifestation und eine begrenzte Virusreplikation. So entwickeln Tiere in diesen Modellen oft nicht die beim Menschen typischen Symptome wie Fieber, Husten, Rhinorrhoe und Dyspnoe, bis hin zur Pneumonie. Dieses Problem führt dazu, dass bei solchen Tiermodellen nur eine eingeschränkte Beurteilung der Impfstoffwirksamkeit möglich ist. Einige Studienautor\*innen versuchten dieses Problem zu lösen, indem sie transgene Tiermodelle verwendeten. Unter transgenen Tiermodellen versteht man Tiere, die gentechnisch so verändert werden, dass sie für eine medizinische Fragestellung als geeignetes Versuchsmodell dienen. In diesem Fall werden diese Tiere so verändert, dass sie vulnerabler für eine Infektion sind und so einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie beim Menschen simulieren. So wurde auch in den im vorhergegangenen Abschnitt beschriebenen Studien, mit solchen transgenen Tieren gearbeitet. Diese Methoden sind allerdings aufwendig und da die Ausbrüche von SARS-CoV und MERS sehr schnell unter Kontrolle gebracht wurden, stellten viele Unternehmen die Forschung in diesem Gebiet wieder ein. Heutzutage und somit auch beim Ausbruch der SARS-CoV-2 Pandemie, sind solche transgenen Mausmodelle bereits kommerziell erhältlich. Dies führte zu einer weiteren Beschleunigung in der Entwicklung potenzieller Impfstoffe im Vergleich zu früheren Pandemien.(43)

Ein weiterer Punkt, welcher die kommerzielle Entwicklung eines SARS-CoV oder MERS Impfstoffes bremste war, dass sich nur wenige Tiermodelle mit der Frage beschäftigten, welche Impfschemata einen langfristigen Schutz bewirken können. Des Weiteren schafften es bei SARS-CoV und MERS wenige Impfstoffe aus der präklinischen Phase herauszukommen, aufgrund finanzieller Interessen.(43)

Bezüglich des Langzeitschutzes gegen SARS-CoV und MERS zeigte sich bei natürlich genesenen Personen, dass die Höhe der neutralisierenden Antikörper mit der Schwere der Erkrankung korrelierte. Auch die T-Zell Immunantwort schien vor allem bei der Elimination des Virus eine tragende Rolle zu spielen. Bei der SARS-CoV und MERS Impfstoffentwicklung war aufgrund eines Mangels an Langzeitstudien nicht klar, ob eine Impfung eine Langzeitimmunität aufbauen kann. Einige Studien konnten aber zeigen, dass bei natürlich durchgemachten Infektionen sechs Jahre nach der Infektion noch eine T-Zell Immunität bestand. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt keine B-Zell Immunantwort mehr festgestellt werden. Es war jedoch möglich, bis zu 24 Monate nach der durchgemachten Infektion, Antikörper nachzuweisen.(43)

Bei SARS-CoV und MERS bestanden außerdem Bedenken bezüglich der Sicherheit der Impfstoffe. So zeigte sich Bedenken in Hinblick auf ein Antibody-Dependent Enhancement (ADE). Dabei handelt es sich um das Auftreten von nicht neutralisierenden Antikörpern gegen Proteine eines Virus, welche den Viruseintritt in die Wirtszellen oder auch die Infektiosität verstärken können. In Tiermodellen wurde dieses Phänomen bei der Verwendung des gesamten S-Proteins teilweise beobachtet. Als Lösung dieses Problems wurden kürzere Abschnitte des S-Proteins, wie etwa die S1-Untereinheit oder die RBD als Antigen verwendet. Hierbei konnten neutralisierende Antikörper gebildet werden, ohne dass sich das Phänomen der ADE gezeigt hätte.(44)

### **3.6 Die Anfänge der SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung**

Das rapide Ausbreiten der Pandemie führte zu einem Wettlauf zwischen verschiedenen Forscher\*innen Teams und Ländern, möglichst rasch einen potenten Impfstoff gegen SARS-CoV-2 zu entwickeln. In diesem Abschnitt beschäftigt sich diese Arbeit mit den unterschiedlichen Ansätzen zur Entwicklung eines Impfstoffes, welche in den ersten Monaten verfolgt wurden.

Zum Zeitpunkt des 20. April 2020 befanden sich bereits fünf potentielle Impfstoffe in klinischen Studien und weitere 71 Impfstoffe in präklinischen Studien. Hierbei wurden durchaus unterschiedliche Ansätze verfolgt, sowohl die Trägerplattform als auch die unterschiedlichen Virenbestandteile betreffend. Bei den fünf Impfstoffen, die sich in den klinischen Phasen befanden, handelte es sich um einen Impfstoff, welcher einen Adenovirus als Vektor verwendet, um einen weiteren Impfstoff, der in die Gruppe der DNA Impfstoffe gehört, zwei inaktivierte Impfstoffe und einen auf mRNA basierenden Impfstoff. Bei den in präklinischen Phasen befindlichen Impfstoffen handelte es sich

um sieben Impfstoffe auf DNA Basis, zwei inaktivierte Impfstoffe, zwei attenuierte Lebendimpfstoffe, 17 Vektorimpfstoffe, 26 Protein-Untereinheit Impfstoffe, zehn auf mRNA basierende Impfstoffe und vier Virus-Like Particles (VLP) Impfstoffe. Bei drei weiteren in präklinischen Studien befindlichen Impfstoffen, war der Träger der WHO zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.(51)

Die inaktivierten Impfstoffe in dieser Phase setzten größtenteils auf die Deaktivierung des kompletten Virusgenoms. Hierzu kann als Beispiel der inaktivierte Impfstoff der Firma Sinovac herangezogen werden. Zur Herstellung dieses Impfstoffes, der während der Entwicklung PiCoVacc genannt wurde, wurden von elf wegen SARS-CoV-2 hospitalisierten Patient\*innen, bronchoalveoläre Proben entnommen. Aus diesen Proben isolierte man SARS-CoV-2 Stämme und entschied sich schließlich, den dabei isolierten CN2-Stamm zur Herstellung des Impfstoffes zu verwenden. Der CN2-Stamm wurde zuerst gereinigt, um einen Stamm zu erhalten, der in Vero-Zellen effizient wachsen kann. Bei Vero Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, welche aus den Nierenzellen von Grünmeerkatzen gewonnen wird. Nachdem dies gelungen war, wurde der Stamm zehn Mal in einer Zellkultur in Vero-Zellen passagiert. Es zeigte sich hierbei, dass der Stamm eine sehr hohe genetische Stabilität aufweist. Um das Virus für Tierversuche zu präparieren, wurde es in einer 50 Liter Zellkultur mit Vero-Zellen vermehrt und anschließend mittels Verwendung von  $\beta$ -Propiolacton inaktiviert. Dann wurde das Virus noch tiefenfiltriert und chromatographisch aufgetrennt. Dieses Endprodukt wurde im Tierversuch an Mäuse verabreicht. Die erste Dosis wurde am Tag 0 verabreicht, die zweite Dosis am Tag 7. Es gab eine mittels Kochsalzlösung geführte Kontrollgruppe, die ebenfalls im gleichen Schema zwei Dosen erhielt. In beiden Gruppen traten keine relevanten Nebenwirkungen auf und die immunisierten Mäuse entwickelten rasch hohe Antikörpertiter gegen SARS-CoV-2S und RBD. Im Vergleich zum S-Protein, wurden Antikörper gegen das N-Protein in deutlich geringerem Ausmaß gebildet. Dieses Ergebnis widersprach den Antikörperspiegeln bei natürlich mit SARS-CoV-2 infizierten Patient\*innen, bei denen Antikörper gegen das N-Protein meist höhere Werte erzielen. Zu dieser Phase konnten natürlich noch keine Aussagen getroffen werden, ob auch beim Menschen Antikörperspiegel in dieser Höhe mit PicoVacc aufgebaut werden können. Es zeigte im Tiermodell aber gute Voraussetzungen für die zukünftige Entwicklung eines Impfstoffes gegen SARS-CoV-2.(52)

Die weiteren Impfstoffentwickler\*innen setzten bei der Entwicklung der gegen SARS-CoV-2 gerichteten Impfstoffe von Beginn an auf das S-Protein oder dessen Untereinheiten.(51)

## **4 SARS-CoV-2 Impfstoffe**

In diesem Abschnitt geht die Arbeit nun auf die in Österreich zugelassenen Impfstoffe ein. Dabei werden die Funktionsweise, das Sicherheitsprofil und die Wirksamkeit der Impfstoffe anhand der zur Zulassung eingereichten präklinischen und klinischen Studien beleuchtet. In Österreich sind mit Stand 14. Dezember 2021 vier Impfstoffe offiziell zugelassen. Dabei handelt es sich um zwei Vektorimpfstoffe, jenen von der Firma AstraZeneca mit Handelsnamen Vaxzevria und dem Präparat von der Firma Johnson&Johnson, welches im Handelsnamen Janssen genannt wird. Bei den beiden weiteren Impfstoffen, die bis zu diesem Zeitpunkt zugelassen sind, handelt es sich um mRNA Impfstoffe. Der Impfstoff Comirnaty, welcher von den Unternehmen BioNTech und Pfizer in einer Kooperation hergestellt wurde und einen weiteren Impfstoff namens Spikevax, welcher vom amerikanischen Biotechnologieunternehmen Moderna entwickelt wurde.(53)

### **4.1 Herausforderungen der Impfstoffentwicklung**

In Zeiten einer Pandemie ist es wie zuvor bereits beschrieben essenziell, schnellstmöglich einen potenten Impfstoff zu entwickeln. Die Entwicklung von Impfstoffen benötigt allerdings Zeit und es dürfen keine neuen Schritte in der Entwicklung gesetzt, oder gar eine Zulassung beantragt werden, wenn die Sicherheit nicht ausreichend belegt ist. Im Gegensatz zu den meisten Medikamenten, welche bei kranken Menschen angewandt werden, werden Impfstoffe an gesunde Menschen verabreicht und erfordern daher besonders hohe Sicherheitsansprüche. Dies erfordert im Falle einer Notfallzulassung eine besonders genaue Weiterbeobachtung bei der breiten Anwendung in der Bevölkerung. Da in der Vergangenheit etwa bei MERS und SARS-CoV Impfungen Phänomene wie die ADE aufgetreten sind, ist eine genaue Nachbeobachtungsphase unbedingt notwendig, um seltene Nebenwirkungen feststellen zu können.(53)

Ein weiterer Punkt, der die Entwicklung von Impfstoffen erschwert ist, dass jeder Virus unterschiedliche Charakteristika aufweist. So unterscheiden sich Viren in ihren Infektionswegen, infizierten Zelltypen und auch in der unterschiedlichen Ausprägung der

virusassoziierten Pathologien. Weitere einzubeziehende Faktoren sind Alter, Geschlecht und eine Schwangerschaft. Sie können alle unterschiedlichen Einfluss auf die Immunantwort nehmen. Auch die Variabilität, die sich bei SARS-CoV-2 in der Ausprägung der Krankheitsverläufe zeigt, muss bei der Entwicklung eines Impfstoffes bedacht werden. Diese unterschiedlichen Verläufe könnten ein Hinweis darauf sein, dass es möglicherweise nicht nur einen perfekten Ansatz zur Entwicklung eines Impfstoffes gibt. Vor allem im Hinblick darauf eine langanhaltende Immunität zu erreichen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen SARS-CoV-2 könnte darstellen, dass Impfstoffe gegen respiratorische Erkrankungen schwerer zu entwickeln sind. Das Problem scheint darin zu liegen, dass die Oberfläche des Respirationstrakts großteils von Schleimhautepithel bedeckt ist, welches zu einem großen Anteil von sekretierenden IgA-Antikörpern geschützt wird. Diese Antikörper sind bei den meisten Impfungen, die intramuskulär verabreicht werden, allerdings in geringerem Ausmaß vorhanden als IgG-Antikörper. Es ist nicht restlos geklärt, welche Rolle IgA-Antikörper speziell bei SARS-CoV-2 zum Schutz vor einer Infektion haben.(54)

Da SARS-CoV-2 am ACE2-Rezeptor bindet, unterscheidet es sich außerdem von anderen respiratorischen Viren. So sind ACE-2 Rezeptoren unter anderem auch in Herz, Lunge, Ileum, Ösophagus, Niere und der Blase vorhanden. Es wurde gezeigt, dass ACE2-Rezeptoren dort sogar in einer höheren Anzahl als in der Lunge vorkommen können. Dies führt dazu, dass der Virus weitere Organsysteme wie etwa das Verdauungssystem, Nervensystem, Urogenitalsystem oder auch das Herzkreislaufsystem angreifen kann.(55) Gegen diesen Aspekt von SARS-CoV-2 als Multisystemerkrankung, könnte also das Vorliegen von IgG-Antikörpern, welche bei intramuskulär verabreichten Impfstoffen normalerweise in höherer Konzentration vorliegen, einen großen Nutzen haben. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Immunantwort ist die T-Zellaktivität. Vor allem im Hinblick auf eine langanhaltende Immunantwort, könnte die Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, weshalb sie bei der Entwicklung nicht außer Acht gelassen werden sollte.(54) Es zeigt sich also, dass generell bei der Entwicklung von Impfstoffen und im speziellen Fall von SARS-CoV-2, unzählige Feinheiten zu beachten sind, um einen sicheren und wirksamen Impfstoff zu entwickeln.

## **4.2 Grundprinzip von Vektorimpfstoffen**

Bei Vektorimpfstoffen handelt es sich um einen relativ neuen Ansatz zur Entwicklung von Impfstoffen. Als Vektor dient dabei ein für den Menschen grundsätzlich harmloser

Virus. Dem Vektorvirus wird das genetische Material eines Erregers in die Gensequenz integriert. Der so entstandene Impfvirus soll dann in die Zellen der zu impfenden Person eintreten. Die im Vektor integrierte Sequenz wird dann transkribiert und führt zur Bildung eines Antigens. Dies kann man am Beispiel der der SARS-CoV-2 Impfstoffe sehen, bei denen ein Oberflächenprotein synthetisiert wird. Das Oberflächenprotein wird vom Immunsystem als Antigen erkannt und die geimpfte Person entwickelt eine Immunantwort gegen dieses Antigen. Der Vektorvirus dient also dazu, ein Antigen in die Zellen des Körpers zu bringen.(56)

Grundsätzlich sind zwei Arten von Viren für die gentherapeutische Behandlung oder die Entwicklung von Impfstoffen von Bedeutung. Einerseits Retroviren, die das transportierte Erbgut direkt in das Genom der Zielzelle integrieren. Andererseits beispielsweise Adenoviren oder Herpesviren, die ein eigenständiges Element außerhalb des Genoms, ein sogenanntes Episom, bilden. Das Episom wird bei der Zellteilung nicht repliziert und geht somit nach kurzer Zeit wieder verloren.(57) Es besteht entweder die Möglichkeit RNA Viren, wie etwa VSV und Masernviren oder DNA Viren, wie beispielsweise Pockenviren und Adenoviren als Vektorplattformen, zu verwenden. Auf Basis dieses Systems wurde bereits ein Impfstoff gegen Ebola namens VSV-Zebov, in welchem ein Glykoprotein des VSV Virus gegen ein Ebola Glykoprotein ausgetauscht wurde, zugelassen.(58)

Es besteht einerseits die Möglichkeit replizierende Vektoren zu verwenden. Die infizierten Zellen im Körper der geimpften Person vermehren sich und bilden dabei im Falle von SARS-CoV-2 das S-Protein. Sie werden dann von dendritischen Zellen phagozytiert und mittels Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Molekülen an das Immunsystem präsentiert. Im Gegensatz dazu stehen nicht replizierende Vektorplattformen, welche sich im menschlichen Körper nicht weiter vermehren können. Sie führen im Körper zur Bildung von Peptiden, gegen die das Immunsystem dann reagiert.(58)

Um einen Virus als Vektor nutzbar zu machen muss er zuerst so modifiziert werden, dass nach Einbringen in den Organismus keine Virusvektorpartikel unkontrolliert repliziert werden. Deswegen werden die Sequenzen, die dafür notwendig sind, aus dem Vektorvirus entfernt. Damit verbleiben nur noch jene Genomsequenzen, die zur Einbringung und Integration in die Zielzelle benötigt werden.(57)

Ein Problem, das sich bei Vektorimpfstoffen ergeben könnte sind vektorspezifische Immunantworten. Bei häufig vorkommenden Virenstämmen in der Bevölkerung oder bei der Verwendung des gleichen Vektorvirus bei einer Boosterimpfung, könnte dies dazu führen, dass das Immunsystem bereits eine Immunität gegen den verwendeten Vektorvirus aufgebaut hat. Das könnte in weiterer Folge zu einer herabgesetzten Wirkung des Impfstoffes führen.(58)

## **4.3 In Österreich zugelassene SARS-CoV-2 Vektorimpfstoffe**

### **4.3.1 Vaxzevria (AstraZeneca)**

Der erste in Österreich und in der EU zugelassene Vektorimpfstoff wurde am 29. Jänner 2021 von der Europäischen Kommission zugelassen. Zuvor war eine ausführliche Prüfung der vorhandenen Daten durch die EMA durchgeführt worden. Die EMA sprach daraufhin eine Empfehlung zum Einsatz des Impfstoffes aus.(59) Mit Stand 15. Dezember 2021 wurden in Österreich 1.578.895 Impfdosen von Vaxzevria verabreicht, das macht 13 Prozent, der zu diesem Zeitpunkt in Österreich gegen SARS-CoV-2 geimpften Dosen aus.(60)

Der Vektorimpfstoff Vaxzevria wurde von der Universität Oxford in Kooperation mit der Pharmafirma AstraZeneca entwickelt. Zu Beginn seiner Entwicklung wurde er noch als ChAdOx1 bezeichnet, später unter AstraZeneca und in weiterer Folge schlussendlich als Vaxzevria bekannt. Dieser ist ein replikationsdefizienter Vektorimpfstoff, wobei ein adenoviraler Affenvektor aus dem Y25 Stamm den Vektor bildet. Dieser wurde mit dem SARS-CoV-2 S-Protein kombiniert und kodiert somit das S-Protein in voller Länge. Die Seroprävalenz von Y25 Antikörpern betrug in der europäischen Bevölkerung, vor dem großflächigen Impfeinsatz, einen Anteil von null Prozent. Im Vergleich dazu, sind in der Bevölkerung von Gambia bei fünf Prozent der Bewohner\*innen Antikörper gegen Y25 vorhanden. Eine niedrige Seroprävalenz in der Bevölkerung ist wichtig, um keine Reaktion des Immunsystems gegen den Vektorvirus hervorzurufen. Das könnte sonst zu einer verminderten Wirksamkeit des Impfstoffes führen. Es wurde bereits bei MERS an Impfstoffen gearbeitet, die Y25 als Vektor verwendeten. Dabei konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass nicht menschliche Primaten durch einen solchen Impfstoff gegen eine MERS induzierte Erkrankung geschützt werden können.(61)

### 4.3.1.1 Präklinische Studien

Um die Wirksamkeit und Sicherheit des entwickelten Impfstoffes für SARS-CoV-2 zu zeigen, wurde eine präklinische Studie an Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden zwei Mausstämme entweder mit ChAdOx1 nCoV-19 oder mit ChAdOx1 GFP, einem Kontrollimpfstoff der für grün fluoreszierende Farbe kodiert, intramuskulär geimpft. Neun bis 14 Tage nach der Impfung wurden die Mäuse auf humorale und zelluläre Immunantworten untersucht. Es konnten dabei in der mit ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe IgG-Antikörper, die gegen das S-Protein gerichtet waren, nachgewiesen werden. In allen mit ChAdOx1 nCoV-19 immunisierten Mäusen wurden neutralisierende Antikörper gegen das Virus nachgewiesen, wohingegen das in der Kontrollgruppe nicht der Fall war. Nachdem der Wirkstoff im Mäuseversuch einen Erfolg gezeigt hatte, wurde ein weiterer Versuch an Rhesusaffen durchgeführt. Rhesusaffen zeigen bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 Symptome, welche die oberen und unteren Atemwege betreffen. Die Affen wurden in zwei Gruppen eingeteilt, wobei sechs Tiere eine einmalige Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19 und weitere sechs Tiere eine zweite Boosterimpfung erhielten. Jeweils 28 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Rhesusaffen mit dem Virus infiziert. In der Kontrollgruppe erhielten fünf Tieren eine Injektion mit ChAdOx1 GFP und einem weiteren Tier wurden zwei Dosen von ChAdOx1 GFP verabreicht. Auch in diesem Versuch konnten wie bei den Mäusen, bereits 14 Tage nach dem ersten Stich in der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe Antikörper gegen das S-Protein nachgewiesen werden. In der Gruppe, welche die Boosterimpfung erhalten hatte, konnten teils signifikant höhere Werte festgestellt werden. Auch bei den virusspezifischen Antikörpern zeigte sich wie bei den Mäusen, eine Immunantwort in beiden ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen. Des Weiteren konnte auch eine T-Zell spezifische Immunantwort gemessen werden. In der Folge wurden die Affen mit dem Virus infiziert, wobei in der Kontrollgruppe deutlich schwerere Krankheitsverläufe registriert wurden, als in den ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen. Innerhalb der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen, welche eine Boosterimpfung oder eine einmalige Immunisierung erhalten hatten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Schwere der Krankheitsverläufe. In der Kontrollgruppe wurde jeden Tag virale genomische RNA und subgenomische RNA aus bronchoalveolären Lavagen nachgewiesen, die auf eine aktive Virusreplikation hindeutet. Dahingegen wurde nur bei zwei geimpften Tieren virale RNA nachgewiesen und die festgestellte Virenlast war deutlich geringer. In Nasenabstrichen war virale RNA sowohl bei den ChAdOx1 nCoV-

19 Gruppen, als auch bei den Tieren in der Kontrollgruppe jederzeit nachweisbar. Sieben Tage nachdem die Affen mit dem Virus infiziert worden waren, wurden sie euthanasiert und Gewebeproben aus ihren Lungen entnommen. Hier zeigte sich bei keinem der mit ChAdOx1 nCoV-19 geimpften Tiere eine Veränderung der Lungenpathologie, während sich bei der Kontrollgruppe bei drei Tieren eine interstitielle Pneumonie entwickelt hatte.(61)

#### **4.3.1.2 Klinische Phase I/II Studien**

Nachdem in den präklinischen Studien ein gutes Sicherheitsprofil und eine vielversprechende Wirksamkeit gezeigt wurden, konnten die klinischen Phasen eingeleitet werden. Hierzu wurde eine Phase 1/2 Studie durchgeführt. Dabei überschneiden sich Teile der Phase 1 und Phase 2. Dieses Vorgehen stellt eine Möglichkeit dar, die Entwicklung von Impfstoffen während einer Pandemie zu beschleunigen. Allerdings darf ein solches Vorgehen niemals die Sicherheit der Proband\*innen gefährden, weshalb immer zuerst ein ausreichendes Sicherheitsprofil in der vorhergehenden Phase gezeigt werden muss. Diese Phase 1/2 Studie wurde an fünf klinischen Zentren in Großbritannien durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine einfachverblindete, randomisierte Studie, an der gesunde Proband\*innen zwischen 18 und 55 Jahren teilnahmen. Teilnehmer\*innen an dieser Studie durften weder eine SARS-CoV-2 Infektion durchgemacht, noch ab dem Stichtag 01. Februar 2020, SARS-CoV-2 spezifische Symptome aufgewiesen haben. Da es zu Beginn des Rekrutierungsverfahrens noch keine validen Antikörpertests gab und somit bei Rekrutierungsbeginn nicht alle Teilnehmer\*innen auf das Vorhandensein von Antikörpern getestet werden konnten, wiesen zu Studienbeginn einige Proband\*innen bereits hohe Antikörperspiegel auf. Die Proband\*innen wurden nach genauer Prüfung der Einschlusskriterien nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Während die eine Gruppe den ChAdOx1 nCoV-19 Impfstoff erhielt, wurde in einer Kontrollgruppe der bereits kommerziell eingesetzte Meningokokkenimpfstoff MenACWY verwendet. Es wurde ein Impfstoff wie MenACWY für die Kontrollgruppe verwendet, da ein Einsatz von NaCl als Placebo das Risiko geborgen hätte, aufgrund impfstoffassoziierter lokaler Nebenwirkungen, die Verblindung der Studienteilnehmer\*innen zu gefährden. Die Teilnehmer\*innen der Studie wurden in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, die die Phase 1 dieser Studie darstellt, wurde streng in Hinblick auf das Sicherheitsprofil des Impfstoffes überwacht. Wie in allen anderen in weiterer Folge beschriebenen Gruppen, wurde eine Dosis mit

5 mal  $10^{10}$  Viruspartikel von ChAdOx1 nCoV-19 verabreicht. Diese Teilnehmer\*innen wurden am 3., 7., 14., 28. und 56. Tag nach der Impfung genauestens auf eventuell auftretende Nebenwirkungen beobachtet. Gruppe 2 diente zur Bestimmung der humoralen und zellulären Immunantwort, während Gruppe 4 zur Serumanalyse der humoralen Immunität genutzt wurde. Gruppe 3 bestand aus zehn Teilnehmer\*innen, welche nicht randomisiert wurden und 28. Tage nach dem ersten Stich eine Boosterimpfung erhielten. Diese zehn Teilnehmer\*innen wurden analog zur Gruppe 1 auf auftretende Nebenwirkungen beobachtet. Die Impfungen in Gruppe 1 und 3 wurden erst mit größeren Personenanzahlen weitergeführt, wenn es keine Sicherheitsbedenken bei den bis dahin nachbeobachteten Proband\*innen gab. Insgesamt nahmen so an dieser Studienphase 1/2, 1.077 Proband\*innen teil, wobei 543 mit ChAdOx1 nCoV-19 geimpft wurden und 534 MenACWY erhielten. Die Teilnehmer\*innen waren im Schnitt 35 Jahre alt, wobei der Anteil zwischen Männer und Frauen mit 50,2 Prozent Frauen ausgeglichen war. Die Studie lief vom 23. April 2020 bis zum 20. Mai 2020. Kurz nach der Verabreichung des Impfstoffes wurden die Reaktionen auf die Impfung erhoben. Hier zeigten sich bei 67 Prozent der Teilnehmer\*innen in der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe Nebenwirkungen von leichter bis moderater Ausprägung, während in der Kontrollgruppe 38 Prozent von Beschwerden berichteten. Der Schweregrad der aufgetretenen Nebenwirkungen wird in vier Stufen eingeteilt. Bei Stufe 1 handelt es sich um leichte Nebenwirkungen, diese sind selbstlimitierend, körperlich kaum einschränkend, benötigen keine medizinische Intervention und halten nicht länger als 48 Stunden an. Moderate Nebenwirkungen bilden die Stufe 2. Diese sind gekennzeichnet durch eine leichte bis mäßige Einschränkung des Alltages und keinen bis minimalen medizinischen Interventionen. In Stufe 3 spricht man von schweren Nebenwirkungen, dabei kommt es zu deutlichen Einschränkungen des Allgemeinzustandes, der eine Unterstützung durch eine andere Person und eine medizinische Intervention nötig macht. Die vierte Stufe bilden lebensbedrohliche Ereignisse, die eine Untersuchung oder Behandlung im Krankenhaus nötig machen. Die häufigsten Nebenwirkungen bei dieser Impfung waren Müdigkeit mit 70 Prozent und Kopfschmerzen mit 68 Prozent, innerhalb der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe. Weitere berichtete Nebenwirkungen waren Muskelschmerzen, allgemeines Unwohlsein, Schüttelfrost und Fieber. In den ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen entwickelten immerhin 18 Prozent der Teilnehmer\*innen Fieber über 38 Grad Celsius. Im Vergleich dazu lag dieser Wert in der Kontrollgruppe bei

unter einem Prozent. Außerdem kam es bei 46 Prozent der Teilnehmer\*innen der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen zu einer vorübergehenden Neutropenie. Diese trat bei nur 3 Prozent der Kontrollgruppenteilnehmer\*innen auf. Die größte Intensität der Nebenwirkungen wurde von den Proband\*innen am ersten Tag nach der Impfung beschrieben. In Gruppe 3, in welcher das Booster Regime angewendet wurde, zeigte sich nach der zweiten Impfung im Vergleich zur ersten Dosis, ein deutlich vermindertes Nebenwirkungsprofil. Es wurden außerdem die S-Protein spezifischen Antikörperspiegel der Teilnehmer\*innen untersucht. In den ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen erreichten diese am 28. Tag ihren Höhepunkt. Die Spiegel lagen zu diesem Zeitpunkt bei einem Median von 157 EU/ml und bis zum 56. Tag erreichte er immer noch 119 EU/ml. Bei Proband\*innen, die an der Prime-Boost-Gruppe teilgenommen hatten, lagen die S-Protein spezifischen Antikörper nach der zweiten Immunisierung im Median bei 639 EU/ml.(61)

Auch wenn diese Studie ein gutes Sicherheitsprofil mit nur leichten oder moderaten Nebenwirkungen zeigte, weisen die Autor\*innen auch auf mehrere Limitationen hin. So zählen sie in etwa die niedrige Teilnehmer\*innenzahl in der Prime-Boost-Gruppe oder die nur einseitige gewählte Verblindung im Studiendesign, als Limitationen der Studie auf. Des Weiteren sind die Ergebnisse nicht zu verallgemeinern und auf die breite Bevölkerung anzuwenden, da vor allem junge gesunde Proband\*innen daran teilgenommen haben.(62)

#### **4.3.1.3 Klinische Phase III Studien**

Um seltene Nebenwirkungen festzustellen und weiterführende Einschätzungen bezüglich der Wirksamkeit treffen zu können, sind weitere klinische Studien nötig. Dabei sollen vor allem auch ältere Altersgruppen, die ganz besonders von der Impfung profitieren, in die Studien eingeschlossen werden.

Eine dieser Studien war eine Phase 2/3 Studie, in der wieder einige Elemente des normalen Studienablaufes nach Ausschluss von Sicherheitsbedenken parallel durchgeführt wurden. Für diese an 20 Zentren in Großbritannien durchgeführte Studie, wurden Proband\*innen nach Altersklassen rekrutiert. Gesucht wurden diese über lokale Zeitungsanzeigen. Zuerst wurden Proband\*innen in den Altersklassen 18 bis 55 Jahren (160 Teilnehmer\*innen), dann 56 bis 70 Jahren (160 Teilnehmer\*innen) und schließlich über 70-jährige (240 Teilnehmer\*innen) für die Studie rekrutiert. Pro-

band\*innen, welche schwere Vorerkrankungen aufwiesen, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es wurden zuerst 18 bis 55-jährige, wie in der zuvor beschriebenen Studienphase 1/2, randomisiert in eine niedrigdosierte ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe oder eine Kontrollgruppe, in der MenACWY geimpft wurde, eingeteilt. Nachdem ein erstes Sicherheitsprofil, das auch von externen Expert\*innen beurteilt wurde, als sicher eingestuft wurde, konnten weitere Proband\*innen im Alter zwischen 56 und 70 Jahren in die Studie aufgenommen werden. Nachdem sich auch in dieser Gruppe ein gutes Sicherheitsprofil zeigte, wurden in einem weiteren Schritt Personen, die älter als 70 Jahre waren, in die Studie eingeschlossen. Innerhalb der Altersgruppen, wurden die Teilnehmer\*innen entweder einem Prime oder Prime-Boost-Regime zugelost. Sie erhielten also entweder eine einmalige Impfung in der Primegruppe oder eine zweifache Immunisierung in der Prime-Boost-Gruppe. In einem weiteren Schritt wurden sie dann entweder der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe oder der Kontrollgruppe zugelost. Die so entstandenen Gruppen wurden dann noch in zwei Kohorten eingeteilt. Eine Kohorte erhielt eine niedrigere Dosierung von ChAdOx1 nCoV-19, die bei  $2.2 \times 10^{10}$  Viruspartikeln lag, also niedriger als in der Phase 1 Studie. Die andere Kohorte erhielt eine Standarddosis, welche aus  $3.5-6.5 \times 10^{10}$  Viruspartikeln bestand. Allen Gruppen wurden die verwendeten Substanzen in den musculus deltoideus verabreicht. Die Ergebnisse zeigten, dass die häufigsten lokalen Nebenwirkungen Schmerz und Druckempfindlichkeit an der Einstichstelle waren. Diese traten meist in den ersten 48 Stunden nach der Impfung auf und waren selbstlimitierend. In der Gruppe der 18 bis 55-jährigen berichteten 88 Prozent von lokalen Nebenwirkungen, während diese in der Altersgruppe der 55 bis 70-jährigen mit 73 Prozent und bei den über 70-jährigen mit 61 Prozent etwas niedriger lagen. Diese Werte beziehen sich auf die Proband\*innen der Standardgruppe. Die Niedrigdosisgruppe berichtete über etwas geringer ausgeprägte lokale Nebenwirkungen. In der Gruppe der 56 bis 70-jährigen löste ChAdOx1 nCoV-19 wie bereits in der Phase 1 Studie, deutlich mehr systemische Nebenwirkungen aus als MenACWY. Die häufigsten systematischen Nebenwirkungen waren Kopfschmerzen, Fieber und Myalgie. Bei der Standarddosis wurde bei 86 Prozent der 18 bis 55-jährigen, 77 Prozent der 56 bis 70-jährigen und 65 Prozent der über 70-jährigen mindestens ein Symptom gemeldet. Bei der Boosterimpfung war der Anteil der systemischen Nebenwirkungen geringer, wobei hier ein männlicher Proband eine schwere Nebenwirkung meldete. Bei der ersten Teilimpfung hatten sieben Proband\*innen, oder fünf Prozent, eine schwere Nebenwirkung angegeben. In der Niedrigdosisgruppe

wurde mit zunehmendem Alter eine ähnliche Abnahme der Reaktivität beobachtet. In einem Follow-up bis zum 26. Oktober 2020 wurden 13 schwerwiegende unerwünschte Ereignisse unter allen Proband\*innen registriert. Nach Einschätzung der Impffärzt\*innen war keines dieser Ereignisse auf die Impfung zurückzuführen. Es wurde eine Antikörperanalyse von IgG-Antikörpern, die sich gegen das S-Protein richten, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass am 28. Tag nach der Impfung, die Proband\*innen in der Standarddosisgruppe höhere Antikörperspiegel aufwiesen. In der Gruppe der 18 bis 55-jährigen wies die Niedrigdosisgruppe einen Median von 6.439 AU/mL auf, wohingegen in der Standardgruppe der Median bei 9.807 AU/mL lag. In den Altersgruppen zeigte sich mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Antikörperspiegel. 28 Tage nach der Boosterimpfung lagen die Antikörperspiegel deutlich höher. So stiegen sie etwa bei den 18 bis 55-jährigen in der Standardgruppe im Median auf 20.713 AU/mL. Diese Steigerung verhielt sich in den anderen Gruppen in einem ähnlichen Ausmaß.(63)

In dieser Phase wurde das Sicherheitsprofil der Impfung als gut angesehen und es konnten zufriedenstellende Antikörperspiegel aufgebaut werden. Um die Wirksamkeit und mögliche seltene Nebenwirkungen aufzuzeigen, benötigte es allerdings noch größere Studien.

Um die Wirksamkeit der Impfung nachzuweisen, wurde eine Studie mit insgesamt 11.636 Proband\*innen, die über 18 Jahre alt waren, in Großbritannien, Brasilien und Südafrika, durchgeführt. Die in weiterer Folge beschriebenen Daten kommen aus einer Zwischenanalyse, welche die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Daten aus vier Studien zusammenfasst. In diesen Studien wurden die Proband\*innen entweder in eine der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen oder Gruppen, die MenACWY oder NaCl erhielten, zugeteilt. Die ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen erhielten ein Prime-Boost-Regime mit einer Standarddosis von je 5 Mal  $10^{10}$  Viruspartikel. Eine Untereinheit innerhalb der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen erhielt als erste Dosis eine halbe Dosierung und eine Standarddosierung bei der Boosterimpfung. Das primäre Ziel dieser Zwischenanalyse war, die Wirksamkeit des Impfstoffes zu demonstrieren. Dabei sollten alle, frühestens 14 Tage nach der zweiten Impfung mittels PCR-Test positiv getesteten Proband\*innen der ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen, mit den in diesem Zeitraum positiv getesteten Teilnehmer\*innen in den Kontrollgruppen verglichen werden.

Analysiert wurden vier laufende Studien. Darunter die beiden bereits zuvor beschriebenen Studien aus Großbritannien. Wobei bei der Phase 2/3 Studie Proband\*innen inkludiert wurden, die eine niedriger dosierte erste Dosis und eine Standarddosis als zweite Impfung erhielten. Eine weitere eingeschlossene Studie war eine Phase 3 Studie aus Brasilien. Diese basierte auf einem einfach verblindeten, randomisierten Studienaufbau. Diese Studie verwendete in der Kontrollgruppe bei der ersten Impfung MenACWY und bei der Boosterimpfung eine Kochsalzlösung. Die vierte Studie war eine doppelt verblindete, randomisierte Phase 1 Studie an gesunden Erwachsenen, die in Südafrika durchgeführt wurde. In all diesen Studien, wurden die Teilnehmer\*innen regelmäßig auf eine vorliegende SARS-CoV-2 Infektion getestet. Um asymptomatische Infektionen zu detektieren, wurde in der britischen Studie ein wöchentlicher Selbsttest von den Proband\*innen durchgeführt, der von spezialisierten Laboren ausgewertet wurde. Dahingegen gab es in Brasilien keinen Testplan für asymptomatische Proband\*innen. Zwischen April und November 2020 konnten so 23.848 Proband\*innen rekrutiert werden. Davon erfüllten 11.636 Teilnehmer\*innen die Einschlusskriterien, um in der Zwischenanalyse berücksichtigt zu werden. Wobei 5.807 einer ChAdOx1 nCoV-19 Gruppe und 5.829 einer Kontrollgruppe angehörten. Von diesen Teilnehmer\*innen waren 87,8 Prozent zwischen 18 und 55 Jahre alt, die restlichen waren älter. Ein Problem in der Auswertung stellte dar, dass die Boosterimpfungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten verabreicht worden waren. In der in Großbritannien durchgeführten Studie wurden einige Proband\*innen erst 12 Wochen nach der Erstimpfung ein zweites Mal immunisiert, während in der brasilianischen Studie bereits nach sechs Wochen der Booster verabreicht wurde. Insgesamt wurden im Beobachtungszeitraum dieser Zwischenanalyse 131 Infektionen, welche mindestens zwei Wochen nach der zweiten Impfung aufgetreten sind, detektiert. Davon entfielen 30 Infektionen auf mit ChAdOx1 nCoV-19 immunisierte Personen. Das sind 0,5 Prozent der Teilnehmer\*innen in dieser Gruppe. Die restlichen 101 Infektionen betrafen die Kontrollgruppe. Also waren 1,7 Prozent in dieser Gruppe mit dem Virus infiziert. Bei Teilnehmer\*innen, die zuerst eine Standarddosis erhielten wurde eine Impfstoffwirksamkeit von 62,1 Prozent errechnet. Wohingegen in der Gruppe, welche eine niedrigere Dosierung als erste Dosis erhalten hatte, eine Wirksamkeit von bis zu 90 Prozent festgestellt wurde. In allen Studien konnte ein gutes Sicherheitsprofil der Impfung gezeigt werden. Insgesamt traten 168 schwerwiegende Ereignisse im Beobachtungszeitraum auf. 79 davon wurden aus den ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen und 89 aus den Kontrollgruppen gemeldet. Ein

Fall von transverser Myelitis, welche zwei Wochen nach der Immunisierung mit ChAdOx1 nCoV-19 auftrat, wurde in Zusammenhang mit der Impfung gebracht. Unabhängige Neurolog\*innen stuften dieses Ereignis allerdings als idiopathisch aufgetretenes Geschehen ein. Vier Teilnehmer\*innen verstarben an Ursachen, die nicht im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-Infektion stehen. Ein Todesfall trat in den ChAdOx1 nCoV-19 Gruppen auf, die drei weiteren waren Proband\*innen der Kontrollgruppen. Keiner dieser Todesfälle konnte in Zusammenhang mit der Impfung gebracht werden.(63)

In der Diskussion weisen die Autor\*innen darauf hin, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die gesteigerte Effektivität bei der Verwendung einer niedrigeren Dosierung bei der ersten Impfung zu erklären. Eine mögliche Theorie auf die verwiesen wird ist, dass möglicherweise eine Immunreaktion, die sich gegen den Vektorvirus richtet, nach Verwendung der Standarddosis als Erstimpfung, bei der zweiten Impfung auftreten könnte.(64)

### **4.3.2 Janssen (Johnson & Johnson)**

Der Vektorimpfstoff der Pharmafirma Johnson & Johnson, mit Handelsnamen „Janssen“ genannt, war der vierte in der EU zugelassene Impfstoff gegen SARS-CoV-2 und der zweite zugelassene Vektorimpfstoff. Nachdem die EMA eine Empfehlung zum Einsatz ausgesprochen hatte, erteilte die Europäische Kommission die bedingte Zulassung für den Impfstoff am 12. März 2021. Durch den Impfstoff erwartete man sich eine Beschleunigung des zu diesem Zeitpunkt noch schleppend vorangehenden Impffortschritts, da eine einfache Dosis ausreichte um als immunisiert zu gelten.(65) Des Weiteren konnte der Impfstoff laut Herstellerangaben bis zu zwei Jahre in einem Standardtiefkühler und bis zu drei Monate in einem Standardkühlschrank gelagert werden.(66) Aufgrund geringer Liefermengen in den Monaten nach der Zulassung, wurde der Impfstoff in Österreich am wenigsten geimpft. Mit Stand 16. Dezember 2021, wurde er 341.458 Mal eingesetzt. Das entspricht einem Anteil von 2,8 Prozent, der in Österreich insgesamt verwendeten Impfdosen.(60)

#### **4.3.2.1 Präklinische Phasen**

Die Entwickler\*innen von Janssen verwendeten einen Adenovirus (Ad) 26 als Trägerplattform, der so verändert wurde, dass er für das vollständige S-Protein kodiert. In präklinischen Studien wurden mehrere mögliche Kombinationen des Ad26 mit dem S-Protein getestet. Ein Problem stellte dar, dass wie auch andere Klasse-1-FB, das S-

Protein intrinsisch metastabil ist. Bereits beim Versuch andere Klasse-1-FB zu stabilisieren hatte sich gezeigt, dass vor allem die Stabilisierung der Hinge Loopregion, welche der zentralen Helix vorausgeht, ein erfolgreicher Ansatz zur Stabilisierung sein kann. Das konnte auch bei SARS-CoV gezeigt werden. Dafür wurden zwei konsekutiven Prolinsubstitutionen in der S2-Untereinheit, zwischen zentraler Helix und Heptad Repeat 1 vorgenommen und so eine Stabilisierung erreicht. Für die SARS-CoV-2 Impfstoffentwicklung wurden mehrere Kombinationen von Ad26 und S-Protein ausprobiert.(67) In einer präklinischen Studie mit 52 Rhesusaffen, wurden sieben verschiedene S-Protein Varianten mit Ad26 kombiniert. Drei dieser Kombinationen enthielten als Leadersequenz einen tissue Plasminogen Activator (tPA) mit dem S-Protein in voller Länge oder mit eingefügten Mutationen an stabilisierenden Stellen. Der tPA ist ein körpereigenes Enzym welches aus den Endothelzellen der Gefäßwand freigesetzt wird und als Aktivator der Fibrinolyse wirkt. Vier weitere Adenovektoren wurden kreiert, welche nur die Wildtyp Leadersequenz oder die Wildtyp Leadersequenz in Kombination mit Mutationen in für die Stabilität wichtigen Bereichen, enthielten. Nach der Herstellung dieser Vektoren wurden 52 Rhesusaffen damit geimpft. Bei allen geimpften Affen zeigten sich nach vier Wochen RBD spezifische Antikörper. Auch neutralisierende Antikörper wurden bei allen Tieren nach dieser Zeit nachgewiesen. Die höchsten Werte an neutralisierenden Antikörpern wurden bei der Kombination Ad26-S.PP detektiert. Diese enthält den Wildtyp als Leadersequenz und es wurden in das vollständige S-Protein, Mutationen in die Furin-Schnittstelle und zwei Prolin stabilisierende Mutationen eingebaut. Bei dieser Kombination konnten außerdem S-Protein spezifische IgG- und IgA-Antikörper, in entnommenen bronchoalveolären Lavagen, nachgewiesen werden. Nach sechs Wochen wurden die Tiere mit dem Virus infiziert. Es zeigte sich bei allen Tieren keine Reaktion oder nur ein schwacher Verlauf. Des Weiteren wurde mittels PCR, die Viruslast aus bronchoalveolären Lavagen, getestet. Dabei konnte bei keinem der mit Ad26-S.PP immunisierten Affen, virale RNA nachgewiesen werden. In den anderen Gruppen zeigte sich ein geringerer Schutz. Ähnlich verhielt es sich bei durchgeführten Nasenabstrichen. Hierbei wurde bei einem der mit Ad26-S.PP immunisierten Affen eine niedrige Virenlast detektiert.(68) Ähnliche Ergebnisse zeigte eine präklinische *in vitro* Studie, bei der eine ähnliche Kombination aus potentiellen Impfstoffen untersucht wurde. Auch hier zeigte sich, dass die neutralisierende Funktion und die Bindung an den ACE2-Rezeptor und die RBD, bei den in der Furin Schnittstelle

und mit zwei Prolin stabilisierenden Mutationen veränderten Varianten, am besten sind.(67)

Die Ergebnisse dieser präklinischen Studien hatten zur Folge, dass diese Kombination als aussichtsreichster Vektorimpfstoff gesehen wurde. In den klinischen Studien wird dieser nun als Ad26.COV2.S bezeichnet.

#### **4.3.2.2 Phase I/II Studien**

In einer multizentrischen, randomisierten, doppelt verblindeten, placebokontrollierten Phase 1/2 Studie, wurde der Impfstoff an Zentren in den USA und Belgien getestet. Die primären Endpunkte dieser Studie zielten auf die Sicherheit und Wirksamkeit der untersuchten Dosierungen ab. Die Studie startete am 21. Juli 2020 mit gesunden Erwachsenen zwischen 18 und 55 Jahren, sowie Teilnehmer\*innen über 65 Jahren. Den Teilnehmer\*innen wurde entweder eine intramuskuläre Injektion einer niedrigen Dosis mit  $5 \cdot 10^{10}$  oder einer hohen Dosis mit  $1 \cdot 10^{11}$  Viruspartikeln verabreicht. Es wurde dabei ein Prime-Boost-Regime angewendet, wobei die zweite Dosis 56 Tage nach dem ersten Stich verabreicht wurde. Die Proband\*innen wurden im Zufallsprinzip auf fünf Gruppen aufgeteilt. Diese stellten sich so zusammen, dass die Proband\*innen entweder zwei hohe Dosen, zwei niedrige Dosen, zweimal das Placebo, einmal eine hohe Dose und das Placebo oder eine niedrige Dose plus das Placebo, erhielten. Insgesamt bekamen 402 Personen in der Kohorte 1, welche die Gruppe der jungen Erwachsenen repräsentierte, eine erste Dosis verabreicht. Bis zum 7. November 2020 hatten alle Teilnehmer\*innen dieser Kohorte ihre zweite Dosis erhalten. In der Kohorte 3, die Personen über 65 Jahren beinhaltete, wurde 403 Personen eine erste Dosis verabreicht. Die Kohorte 1 war bereits früher rekrutiert und geimpft worden, um das Sicherheitsprofil für die Gruppe 3 zu erfüllen. Die Ergebnisse nach der ersten Impfung zeigten in Hinblick auf die Sicherheit, dass lokale Nebenwirkungen bei 64 Prozent der Proband\*innen, die die niedrige Dosis erhalten hatten, auftraten. Bei den Proband\*innen der Hochdosisgruppe kamen diese bei 78 Prozent vor, wohingegen sie in der Placebogruppe bei nur neun Prozent auftraten. In Kohorte 3 kamen deutlich weniger lokale Nebenwirkungen vor. In der Niedrigdosisgruppe berichteten 41 Prozent über lokale Nebenwirkungen, in der Hochdosisgruppe 42 Prozent und in der Placebogruppe 14 Prozent. Systemische Nebenwirkungen äußerten sich in beiden Kohorten zum Großteil als leichte bis moderate Beschwerden. Die häufigsten berichteten Nebenwirkungen waren Kopfschmerzen, Müdigkeit und Myalgie.

In Kohorte 1 berichteten in der Niedrigdosisgruppe 65 Prozent, in der Hochdosisgruppe 84 Prozent und in der Placebogruppe 26 Prozent über systemische Nebenwirkungen. Dahingegen berichteten in Kohorte 3 46 Prozent der Niedrigdosis, 55 Prozent der Hochdosis und 23 Prozent der Placeboempfänger\*innen über systemische Nebenwirkungen.

Schwerere systemische Reaktionen wurden in Kohorte 1 bei 9 Prozent der Niedrigdosisempfänger\*innen und 20 Prozent der Hochdosisempfänger\*innen registriert, wohingegen solche Reaktionen in der Placebogruppe nicht vorkamen. In der Kohorte 3 wurden schwerere systemische Reaktionen bei einem Prozent der Niedrigdosisgruppe und zwei Prozent der Hochdosisgruppe registriert. Dies lässt darauf schließen, dass der Impfstoff für ältere Proband\*innen besser verträglich ist. Ein ähnlicher Effekt konnte bei Fieber und hohem Fieber gezeigt werden, wovon die jungen Proband\*innen deutlich häufiger betroffen waren. In der Kohorte 1 lagen bereits Ergebnisse zur zweiten Impfung vor. Hier zeigte sich bei 80 Prozent der Proband\*innen, welche Ad26.COV2.S erhalten hatten, eine systemische Reaktion. Dieser Wert lag deutlich höher als in der Placebogruppe, in der 30 Prozent über Nebenwirkungen berichtet hatten.

Um die Immunreaktion der Proband\*innen beurteilen zu können wurde der Mittelwert von Bindungsantikörpern, gegen ein stabilisiertes SARS-CoV-2 S-Protein, gemessen. Am 29. Tag nach der ersten Impfung fand dabei bei allen Teilnehmer\*innen eine Serokonversion, von zuerst unter der Quantifizierungsnorm gelegenen Mittelwerten, hin zu über der Norm gelegenen Werten, statt. Wobei der niedrigste Mittelwert mit 478 EU/ml in der Gruppe lag, die eine niedrige Dosierung und ein Placebo erhalten hatte. Der höchste Wert lag dahingegen mit 788 EU/ml in der Gruppe, die bei beiden Impfungen eine hohe Dosierung erhalten hatte. Bis zum 57. Tag nach der Erstimpfung stiegen die Mittelwerte noch deutlich an und lagen je nach Gruppe zwischen 660 und 1.100 EU/ml. Zwei Wochen nach der zweiten Impfung erhöhten sich die Werte in der Hochdosisgruppe auf 2.292 EU/ml und auf 1.677 EU/ml in der Niedrigdosisgruppe. Dahingegen blieben die Werte, welche als Zweitimpfung ein Placebo erhielten in etwa gleich. In der Kohorte 3 zeigten sich ähnliche Verhältnisse innerhalb der Gruppen, allerdings wiesen die Bindungsantikörper niedrigere Werte auf. Des Weiteren konnten in beiden Kohorten neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden und auch hier kam es bei über 90 Prozent der Proband\*innen zu einer Serokonversion.(69)

In dieser Studie zeigte sich also eine Immunantwort, die bereits nach der ersten Impfdosis ansprechende Werte zeigte. Des Weiteren zeigte sich ein akzeptables Sicherheitsprofil, wobei eine deutliche Abnahme der Nebenwirkungen bei älteren Proband\*innen und bei Verwendung von niedrigeren Dosierungen festgestellt werden konnten. Die Autor\*innen der Studie weisen auf die gute Wirksamkeit nach bereits einer Impfdosis hin, das könnte vor allem in einer pandemischen Situation ein Vorteil sein.(69)

#### **4.3.2.3 Phase III Studien**

Diese Studien mussten in Hinblick auf Sicherheit und Wirksamkeit natürlich noch mit einer Phase 3 Studie untermauert werden. Das primäre Endziel dieser Studie bestand darin, die Effizienz des Impfstoffes gegen mittlere und schwere Verläufe bei SARS-CoV-2 Infektionen zu testen. Hierzu wurde eine international angelegte, doppelt verblindete, randomisierte, placebokontrollierte Studie, durchgeführt. Die Proband\*innen erhielten dabei eine einzelne Dosis mit  $5 \cdot 10^{10}$  Viruspartikel von Ad26.COV2.S, also der in der Phase 1/2 Studie beschriebenen niedrigen Dosierung. Die Teilnehmer\*innen der Studie wurden randomisiert der Placebogruppe oder der Ad26.COV2.S. Gruppe zugeteilt und auf Alter, Studienstandort und Begleiterkrankungen stratifiziert. Zu Studienbeginn wurden alle Teilnehmer\*innen auf eine vorliegende Seropositivität gegen das SARS-CoV-2-N-Protein getestet. Weiters wurden nasale Abstriche auf das Vorliegen einer aktiven SARS-CoV-2 Infektion abgenommen, welche mittels PCR Test ausgewertet wurden. Die Studie begann am 21. September 2020 wobei 44.325 Proband\*innen randomisiert wurden. Davon erhielten schlussendlich 43.783 entweder das Vakzin oder das Placebo. 39.321 dieser Teilnehmer\*innen waren zu Beginn der Studie SARS-CoV-2 seronegativ. Somit waren 9,6 Prozent der Studienteilnehmer\*innen zu Beginn seropositiv. Es wurde in der Studie ebenfalls eine Sicherheits subgroup eingesetzt, in der 3.356 Proband\*innen aus der Vakzingrouppe und 3.380 Proband\*innen aus der Placebogruppe eingeschlossen waren. Hier zeigte sich, wie schon in der Phase 1/2 Studie, eine deutliche Vermehrung von Fällen mit Nebenwirkungen in der Vakzinegruppe und eine Abnahme der Nebenwirkungen mit zunehmendem Alter. Die häufigsten Nebenwirkungen, über welche 48,6 Prozent der Teilnehmer\*innen berichteten, waren lokale Nebenwirkungen mit Schmerzen an der Impfstelle, gefolgt von systemischen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen mit 38,9 Prozent, Abgeschlagenheit

mit 38,2 Prozent oder Myalgie mit 33,2 Prozent. Von den 21.895 Proband\*innen, welche das Vakzin erhalten hatten, berichteten 83 über schwerwiegende unerwünschte Ereignisse in den ersten sieben Tagen nach der Impfung. In der Placebogruppe war dieser Anteil mit 96 von 21.888 sogar etwas höher. Ein ungewöhnliches Missverhältnis zeigte sich bei thromboembolischen Ereignissen. Hier erlitten elf Personen der Ad26.COV2.S Gruppe im Vergleich zu drei Personen in der Placebogruppe ein solches Ereignis. Weitere Auffälligkeiten waren vier Personen mit Krampfanfällen und sechs mit Tinnitus in der Ad26.COV2.S Gruppe, wohingegen nur eine Person der Placebogruppe einen Krampfanfall erlitt und niemand einen Tinnitus beklagte. Allerdings konnte die Impfung nicht mit ausreichender Sicherheit als Auslöser deklariert werden. Es wurde aber darauf hingewiesen, dass in der Nachbeobachtungsphase ein Augenmerk auf diese Ereignisse gelegt werden sollte. An Daten zur Effektivität zeigte sich im Beobachtungszeitraum, dass bei insgesamt 468 Personen eine Infektion nachgewiesen wurde. Davon betrafen 116 die Vakzingroupe und 348 die Placebogruppe. Dies bedeutet eine errechnete Effektivität von 66,9 Prozent. Betrachtet man die Fälle, die mindestens 28 Tage nach der Impfung auftraten, stellte sich ein Verhältnis von 66 Fällen in der Ad26.COV2.S Gruppe zu 193 Fällen in der Placebogruppe ein. Errechnet beträgt die Wirksamkeit so 66,1 Prozent. Gegen schwere Krankheitsverläufe betrug die Effektivität 14 Tage nach der Impfung 76,7 Prozent. 28 Tage nach der Impfung stieg der Schutz gegen schwere Krankheitsverläufe auf 84,4 Prozent an. Des Weiteren traten fünf mit SARS-CoV-2 assoziierte Todesfälle in der Placebogruppe auf. Dahingegen war in der Vakzingroupe kein einziger mit SARS-CoV-2 assoziierter Todesfall zu verzeichnen.(66)

#### **4.3.2.4 Thrombotische Ereignisse**

In der Beobachtungsphase traten bei Vaxzevria und Janssen seltene Fälle von thrombotisch-thrombozytopenischen Ereignissen auf. In einer im März 2021 durchgeführten Studie an elf Personen, welche ein solches Ereignis erlitten hatten, wurden die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht. Von den elf Teilnehmer\*innen, waren neun weiblich und hatten ein Durchschnittsalter von 36 Jahren. Neun dieser Patient\*innen hatten eine Sinusvenenthrombose, drei hatten eine Splanchnicusthrombose, drei eine Lungenembolie und vier hatten eine andere Thromboseform entwickelt. Sechs der Patient\*innen verstarben an diesen Komplikationen. Des Weiteren präsentierten sie eine

Thrombozytopenie und ihre Symptomatik hatte große Ähnlichkeit mit dem Verlauf einer Autoimmun-Heparin induzierten Thrombozytopenie. Dabei kommt es zu einer Aktivierung von Blutplättchenaktivierenden Antikörpern, die multimolekuläre Komplexe zwischen Plättchenfaktor 4(PF4) und anionischem Heparin erkennen. Allerdings kann dieses Phänomen auch vorkommen wenn kein Heparin vorhanden ist. Einige Beispiele dafür wären polyanionische Medikamente oder bakterielle oder virale Infektionen. Das Serum der untersuchten Patient\*innen zeigte eine erhöhte Reaktivität auf PF4-Heparin-Elisa. Des Weiteren zeigte sich eine starke Aktivierung der Thrombozyten in Gegenwart von PF4. Bei Anwesenheit von niedrigen Dosen von niedermolekularem Heparin zeigte sich eine Abnahme der Aktivität. Außerdem konnten Antikörper von zwei Patient\*innen in Anwesenheit von PF4 eine Blutplättchenaktivierung hervorrufen. Ob es sich dabei um Autoantikörper, die aufgrund eines von der Impfung hervorgerufenen Entzündungsreizes aktiviert wurden oder von der Impfung induzierte Antikörper handelt ist nicht vollständig geklärt.(70)

## **5 mRNA Impfstoffe**

### **5.1 Allgemeines zu DNA und RNA**

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Nukleinsäuren, die DNA und die RNA. Beide werden von Nukleotiden aufgebaut. Ein Nukleotid besteht aus einer Base, einem Zuckermolekül und Phosphorsäure. Insgesamt gibt es fünf Basen, die in der DNA und RNA vorkommen. Drei Pyrimidinbasen namens Cytosin, Thymin und Uracil. Thymin kommt in der DNA vor und wird in der RNA von Uracil, das nur in der RNA vorkommt, ersetzt. Des Weiteren gibt es noch die zwei Purinbasen Adenin und Guanin, die sowohl in der DNA als auch in der RNA vorkommen. Die RNA ist im Gegensatz zur DNA einzelsträngig und enthält Ribose als Zuckermolekül, wohingegen das in der DNA enthaltene Zuckermolekül die 2`Desoxyribose ist. Es gibt mehrere Formen der RNA, wobei die mRNA die am besten untersuchte ist. Die mRNA, wovon die folgenden Abschnitte handeln werden, fungiert als Informationsträger bei der Synthese von Proteinen. Dafür wird die genetische Information der DNA in mRNA umgeschrieben und ins Zytoplasma der Zelle transportiert. Dort werden aus den so gelieferten Informationen, an den Ribosomen die Proteine gebildet. Dieser Prozess läuft in zwei Schritten ab, der Transkription und der Translation. Bei der Transkription werden die Informationen der DNA vom 3' zum 5' Ende des codogenen Strangs der Doppelhelix abgelesen. Dies geschieht mittels der RNA-Polymerase, welche beginnend an einer Promotorsequenz

die Informationen auf dem jeweiligen Gen abliest und so einen RNA-Strang synthetisiert, der dann in 5'-3' Richtung vorliegt. Um den Transkriptionsprozess überhaupt starten zu können, benötigen RNA-Polymerasen allgemeine Transkriptionsfaktoren. Diese lagern sich an den Promotor an und bringen die RNA-Polymerase in die richtige Position. Zusammen mit der RNA-Polymerase bilden sie eine TATA-Box, an welcher der Transkriptionsprozess startet. Die RNA-Polymerase verfügt außerdem über eine Helikasefunktion um die DNA selbstständig entwinden zu können. 25 Nukleotide nach der TATA-Box beginnt die RNA-Polymerase mit der RNA-Synthese. Eine Topoisomerase verhindert dabei ein Verdrillen der Stränge. Am 5`Ende der mRNA wird 5`-Methylguanosin an die Ribose geknüpft. Diese Verbindung nennt sich Cap-Struktur und ist wichtig, da sie die mRNA vor dem Abbau durch Exonukleasen schützt und eine wichtige Rolle bei der Bindung an das Ribosom spielt. Am anderen Ende der mRNA wird eine Polyadenylierung vorgenommen. Hierbei werden an 3`Ende bis zu 200 Adenylreste als sogenannter Poly-A-Schwanz angehängt. Dieser ist besonders wichtig für die Stabilität der mRNA und erhöht somit die biologische Halbwertszeit. Im Anschluss muss die unreife mRNA noch dahingehend behandelt werden, dass die nicht codierenden Abschnitte, entfernt werden. Dieser Vorgang heißt Splicing. Die nun fertig vorliegende mRNA kann im Anschluss mittels Transportproteinen zu den Ribosomen transportiert werden.(71)

## **5.2 Meilensteine am Weg zur mRNA Impfung**

Erstmals beschrieben wurde die mRNA bereits 1961 von einem Forscher\*innenteam rund um Sydney Brenner. Es bestand zu dieser Zeit bereits eine Hypothese, die besagte, dass die ribosomale RNA nicht der unmittelbare Informationsträger vom Genom zu den Ribosomen ist. Diese Hypothese ging davon aus, dass die Ribosomen eine nicht spezialisierte Struktur sind, die ihre Informationen zur Proteinsynthese von einem instabilen Vermittler oder auch „messenger“ erhalten. Sie untermauerten diese Hypothese mit einem Versuch, bei dem sie Bakterien mit Phagen infizierten. Es kam dabei zu einer Umstellung der Proteinsynthese in den Bakterien, um sich auf die neuen Umstände einzustellen. In ihrem Experiment zeigte sich, dass sich keine neuen Ribosomen bildeten und sich eine neue RNA Form bildete. Des Weiteren zeigte sich, dass alle Prozesse der Proteinsynthese weiterhin in den bereits zuvor bestehenden Ribo-

somen abliefern. Daraus schlossen sie, dass nicht die Ribosomen selbst die Information für die Proteinsynthese enthalten, sondern eine extra dafür gebildete RNA für die Informationsvermittlung verantwortlich ist.(72)

Ein weiterer großer Schritt in der Entwicklung der mRNA, hin zu einem Therapeutikum, fand 1989 statt. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es nur wenige Versuche die mRNA in Zellen einzuführen. Die Instabilität, der rasche Abbau und die nicht vorhandene Möglichkeit große Mengen stabiler mRNA zu produzieren hatten dazu geführt, dass es kaum Fortschritte in diesem Bereich gab. Zu dieser Zeit entstand die Möglichkeit große Mengen mRNA, mittels bakterieller RNA Polymerase, *in vitro* herzustellen. Somit änderte sich dieser Umstand und immer mehr Forscher\*innen widmeten sich diesem Thema. Einem Forscher\*innenteam rund um Robert Malone gelang es RNA vermittelt durch Lipofectin, einem Liposom welches ein kationisches Lipid enthält, in Gewebekulturen einzuführen. Dieser RNA/Lipofectin Komplex erwies sich als effektiv und reproduzierbar. Es zeigte sich, dass er genutzt werden kann, um RNA in unterschiedliche Zellreihen einzubringen.(73) Bereits ein Jahr später gelang es, einer Maus *in vitro* transkribierte mRNA zu injizieren und dabei eine Genexpression auszulösen. Das stellte einen ersten positiv verlaufenen *in vivo* Versuch dar und bewies, dass auf mRNA aufgebaute Impfstoffe funktionieren können. Seither kam es zu zahlreichen technischen Fortschritten vor allem in der Stabilisierung und der Verbesserung der Effektivität, bei der *in vivo* Verabreichung der mRNA.(74)

### **5.3 Vor- und Nachteile der mRNA als Trägerplattform**

Das Ziel einer mRNA getragenen Impfung ist es exogene genetische Informationen in Zellen zu transportieren, wo von den körpereigenen Zellen ein Antigen synthetisiert wird, gegen welches eine Immunreaktion hervorgerufen wird.(75)

Die Verwendung von mRNA als Trägerplattform bringt mehrere Vorteile mit sich. Ein erster großer Vorteil ist ihr ausgezeichnetes Sicherheitsprofil. So ist es der mRNA nicht möglich in das Genom des Menschen einzudringen, wodurch es zu keinen unerwünschten Mutationen im selbigen führen kann.(76) Ein weiterer Punkt weshalb mRNA Impfstoffe ein hohes Sicherheitspotential haben ist, dass sie vollständig katabolisiert werden. Es verbleiben also keine Bestandteile des Vektors im Körper und die Expression des Proteins findet ebenfalls nur vorübergehend statt. Dies bringt mit sich, dass sie nicht die Möglichkeit haben, die körpereigene Genexpression dauerhaft zu beeinflussen. Des Weiteren wurden noch nie Autoimmunreaktionen gegen mRNA

Impfstoffe nachgewiesen, das stellt einen weiteren wichtigen Sicherheitsaspekt der mRNA Impfstoffe dar.(75) Ein weiterer Vorteil, den die mRNA etwa im Gegensatz zu DNA Impfstoffen mit sich bringt, ist ihre im Vergleich einfache Herstellung und Reinigung unter GMP Bedingungen. Der Grund dafür ist, dass bei der Herstellung von DNA bei der Reinigung des Plasmidring Reste bakterielle DNA zurückbleibt. Für die mRNA Herstellung stellt dies allerdings kein Hindernis dar, weil die verwendete mRNA-Polymerase an Promotorsequenzen ansetzt, die keine Bestandteile der bakteriellen DNA enthalten. Ein weiterer Vorteil ist, dass die RNA-Polymerase ein DNA-Plasmid mehrere hundert Mal transkribieren kann. Somit können aus geringen Mengen DNA-Plasmid, große Mengen mRNA erzeugt werden.(75) Abgesehen vom Sicherheitsaspekt, stellt mRNA aus einem weiteren Grund eine vielversprechende Plattform dar. So kann jedes Protein von mRNA kodiert und exprimiert werden. Potentiell können so Impfstoffe gegen alle möglichen Erreger, aber auch Tumorerkrankungen, entstehen. Aber auch Therapeutika zur Proteinersatztherapie könnten theoretisch auf diesem Weg entwickelt werden. Um unterschiedliche Proteine herzustellen ist es nur nötig die mRNA Sequenzen zu verändern. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der mRNA bleiben dabei unverändert. Das führt dazu, dass mRNA Impfstoffe potentiell extrem rasch angepasst werden können, ohne dabei neue Produktionsprozesse entwickeln zu müssen. Ein weiterer Vorteil, den mRNA-Trägerplattformen gegenüber DNA-Trägerplattformen aufweisen ist, dass sie die Kernhülle nicht passieren müssen um wirken zu können. Gegenüber Peptid und Protein basierten Impfstoffen, könnten mRNA Impfstoffe außerdem den Vorteil haben, dass sie keine Adjuvantien zur Verstärkung der Wirkung benötigen, da sie so konzipiert werden könnten, dass sie diese selbst produzieren.(77) Es gibt allerdings auch Nachteile, die die mRNA mit sich bringt. So stellt die kurze Halbwertszeit der mRNA und damit auch der Proteine für die sie kodiert, ein Problem dar. Ein weiteres Hindernis ist die Instabilität und der rasche Abbau der mRNA. Die mRNA enthält mehrere Regionen, welche sie anfällig gegen den Abbau durch Exonukleasen macht. Das kann zu einer Senkung der Translationseffizienz führen. Dabei scheinen vor allem 5`-3` UTRs eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine Möglichkeit um die Stabilität zu verbessern, könnte sein UTRs zu verwenden, welche sich in Untersuchungen stabiler als andere UTRs präsentiert haben. So sind etwa die Verwendung von 3`UTRs, die für viele Proteine wie etwa alpha-Globin, beta-Globin oder Albumin kodieren und eine lange Halbwertszeit aufweisen, mögliche Ansatzpunkte, um die mRNA zu stabilisieren.(78)

## 5.4 Herstellung von mRNA Impfstoffen

In einem ersten Schritt muss die mRNA synthetisiert werden. Dazu benötigt man eine complementary DNA (cDNA), welche mittels einer bakteriophagen RNA-Polymerase transkribiert wird. Bei der cDNA handelt es sich um eine Form der DNA, welche mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wird. Als cDNA dient dabei meist plasmide DNA (pDNA), die von der RNA-Polymerase abgelesen wird. Die so entstandene mRNA muss dann noch in einigen Schritten weiterbearbeitet werden. Die synthetische mRNA benötigt mindestens einen ORF, einen Cap und einen Poly-A-Schwanz, um in eukaryotischen Zellen funktionieren zu können. Die verwendete pDNA muss mindestens einen Promotor und eine ORF enthalten. Der Poly-A-Schwanz und der Cap können vorhanden sein, oder erst nach der Transkription enzymatisch angehängt werden. Nachdem die Transkription abgeschlossen ist, wird die pDNA Matrize und die restliche bakterielle DNA von Desoxyribonukleasen verdaut. In einem nächsten Schritt muss die so entstandene mRNA aufbereitet werden. Die mRNA liegt zu diesem Zeitpunkt in einem Gemisch vor, welches mehrere unerwünschte Bestandteile enthält. Darunter befinden sich Nukleotide, Oligodesoxynukleotide oder auch Proteine. Diese Bestandteile werden durch Fällungs- und Extraktionsschritte aus dem Gemisch entfernt. Des Weiteren sind auch unerwünschte mRNA Transkripte vorhanden, welche ebenfalls entfernt werden müssen. Dies geschieht durch einen chromatographischen Prozess, bei dem die mRNA Bestandteile nach ihrer Größe aufgetrennt werden. So können die Transkripte, welche kürzer und länger als die gewünschte mRNA sind, entfernt werden. Um eine für therapeutische Zwecke geeignete mRNA zu erhalten, muss diese nun noch in Hinblick auf ihre Stabilität optimiert werden. Hierbei stehen vor allem der Cap und der Poly-A-Schwanz, aber auch die dem ORF anliegenden UTRs im Fokus. Es gibt die Möglichkeit, den Cap während der Transkription mittels eines Cap Analogons einzubauen. Allerdings werden diese oft an der falschen Stelle eingebaut, das führt dazu, dass bis zu einem Drittel der entstandenen mRNA nicht translatiert. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen ist, die mRNA ohne Cap zu transkribieren und erst im Anschluss einen Cap anzufügen. Dies bringt den Nachteil mit sich, dass in der Produktion ein zusätzlicher enzymatischer Schritt notwendig wird. Das Problem der falsch eingebauten Caps an der Methylverbindung kann durch den Einsatz von ARCA verhindert werden. Diese ARCAs erlauben nur den Einbau eines Nukleotids an das nicht methylierte Guanosin und garantiert so einen richtigen Aufbau. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Stabilität ist der Poly-A-Schwanz. Der Poly-A-Schwanz

ist nach der Transkription meist schon vorhanden. Es hat sich gezeigt, dass mit zunehmender Länge des Poly-A-Schwanzes eine bessere Stabilität und eine verbesserte Proteinsynthese erreicht werden kann. Diese Verlängerung kann man etwa durch enzymatische Polyadenylierung erreichen. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der mRNA, der zur Stabilität und verbesserten Translation beiträgt, sind die UTRs. So zeigte sich, dass die Kombination von 5`-UTR des beta-Globin und 3`-UTRs des alpha-Globins einen positiven Effekt haben. Die beta-Globin UTRs verbessern die Translation, während die alpha-Globin UTRs für eine Erhöhung der Stabilität sorgen. In Zukunft können durch das Screening ganzer Transkriptome, vermutlich komplett neue stabilisierende UTRs bereitgestellt werden.

Ist die mRNA nun fertig hergestellt, muss sie ins Zytoplasma der Zielzellen gebracht werden, damit sie ihre Wirkung entfalten kann. Hier liegt der Vorteil gegenüber der DNA Impfstoffe darin, dass sie nur die Plasmamembran, aber nicht die Kernhülle durchdringen muss. Im Vergleich zu DNA enthält die mRNA Uridin anstelle von Desoxythymidin und ist an der 2`-Position der Ribose hydroxyliert. Des Weiteren können sich durch ihre Länge und ihr Vorliegen als Einzelstrang, Sekundär und Tertiärstrukturen bilden, die ansonsten nicht möglich wären und eine entscheidende Rolle beim Eintritt spielen. Die mRNA wird vermutlich zu einem großen Teil über Caveolea/Lipid Rafts aufgenommen, dies wird durch einen Scavenger Rezeptor vermittelt, der bevorzugt negativ geladene Makromoleküle erkennt und so die Internalisierung erleichtert. Ein letzter wichtiger Punkt bei der Entwicklung ist die Angreifbarkeit der mRNA gegen extrazelluläre Ribonukleasen. Diese würden die mRNA rasch abbauen und das könnte dazu führen, dass die mRNA abgebaut wird bevor sie das Zytosol erreicht. Um die mRNA vor einem zu raschen Abbau zu schützen, haben sich vor allem Lipide aber auch Polymere, mit denen sie einen Komplex bilden, als beste Ansätze erwiesen.(77)

## **5.5 mRNA-Impfstoffe gegen SARS-CoV-2**

Die ersten in der EU und somit auch in Österreich zugelassenen Impfstoffe waren mRNA-Impfstoffe. Dabei handelt es sich zum einen um den von Biontech und Pfizer und zum anderen um einen vom Biotechnologieunternehmen Moderna entwickelten Impfstoff. Der Impfstoff von Biontech und Pfizer wurde am 21. Dezember 2020 zugelassen, nachdem die EMA, die Daten die vorgelegt wurden, ausreichend geprüft hatte, um eine bedingte Zulassung zu erteilen. Der von Moderna entwickelte Impfstoff erhielt seine Zulassung am 6. Jänner 2021 und war somit der zweite bedingt zugelassene

Impfstoff gegen SARS-CoV-2 in Österreich.(79) Daraufhin lief in Österreich eine groß angelegte Impfkampagne an. Dabei wurden 9.193.170 Millionen Impfdosen von Biontech und Pfizer eingesetzt, das entspricht 75,4 Prozent der in Österreich insgesamt verwendeten Dosen. Anteilig wurde der Impfstoff von Moderna bei 8,8 Prozent verwendet. Dies entspricht 1.407.566 Dosen. (Stand 16. Dezember 2021).(60)

## **5.5.1 Comirnaty (Biontech/Pfizer)**

### **5.5.1.1 Präklinische Phase**

In der präklinischen Phase wurden zwei mögliche Impfstoffe getestet. Dabei handelt es sich um die Präparate BNT162b1 und BNT162b2. Diese zwei Impfstoffe enthalten modRNA. Das ist eine synthetisch oder chemisch modifizierte mRNA, in der einzelne Nukleoside durch natürlich modifizierte Nukleoside oder durch synthetische Nukleosid-Analoga ersetzt werden. Diese modRNA wurde in Lipidnanopartikel formuliert und mit N<sup>1</sup>-Methylpseudouridin modifiziert. Bei N<sup>1</sup>-Methylpseudouridin handelt es sich um ein methyliertes Derivat des Pseudouridins, welches im Vergleich zu Uridin eine verminderte Reaktion der angeborenen Immunantwort auslöst und so zu einer verstärkten Translation führt. Die fertige modRNA kodiert für Bestandteile des S-Proteins. BNT162b1 kodiert nur für die RBD, während BNT162b2 für das vollständige S-Protein kodiert. BNT162b2 wurde durch die Substitution zweier Aminosäurenreste durch Prolin, in seiner Präfusionskonformation fixiert. Um die Wirkung der beiden potentiellen Impfstoffe zu testen, wurden sie BALB/c-Mäusen im Rahmen einer präklinischen Studie intramuskulär verabreicht. Es zeigte sich, dass durch eine einzige Impfung mit einem der beiden Präparate, hohe Titer an RBD und S1 spezifischen IgG-Antikörpern gebildet werden konnten. Dabei stiegen die Antikörperspiegel bei den mit BNT162b2 geimpften Mäusen in den ersten Tagen stärker an, wohingegen bei den mit BNT162b1 immunisierten, die durchschnittlichen Werte am 28. Tag höher lagen. Eine Kontrollgruppe mit BALB/c-Mäusen, erhielt entweder ein Placebo oder eine in Lipid-Nanopartikel verpackte modRNA. Diese modRNA kodierte für ein für SARS-CoV-2 irrelevantes Antigen. Es konnten in der Kontrollgruppe keine RBD oder S1 spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass beide Impfstoffe eine T-Zell Immunantwort auslösen können. Es zeigten sich ein hoher Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die IFN- $\gamma$  und weitere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche IL-2 bildeten. Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Immunantwort war für beide Impfstoffe ähnlich, mit einer etwas stärker ausgeprägten IFN- $\gamma$  Produktion bei BNT162b2.(80)

Um weitere Hinweise über die Wirksamkeit der Impfstoffe zu bekommen, wurden sie im Tierversuch an Makaken, einer Primatengattung aus der Familie der Meerkatzenverwandten, getestet. Es wurden dazu Gruppen eingeteilt, denen jeweils sechs Makaken zugeteilt wurden. Es gab zwei Gruppen, welche entweder zwei Dosen mit 30 µg oder 100 µg von BNT162b1 injiziert bekamen. Zwei weitere Gruppen erhielten BNT162b2 im selben Schema und einer weiteren Gruppe wurde eine Kochsalzlösung injiziert. Bei BNT162b1 zeigten sich bereits nach 14 Tagen RBD spezifische IgG-Antikörperspiegel. Diese stiegen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums 35 Tage nach der Erstimpfung und sieben Tage nach der Zweitimpfung an. Im Durchschnitt lagen sie bei BNT162b1 bei der niedrigen Dosis am 35. Tag bei 20.962 U/ml<sup>-1</sup> und bei 48.575 U/ml<sup>-1</sup> bei der höheren Dosis. Bei den mit BNT162b2 immunisierten Makaken lag der Wert, der mit der niedrigeren Dosis erzielt wurde, bei 23.781 U ml<sup>-1</sup> und bei 26.170 U ml<sup>-1</sup> mit der hohen Dosierung. Des Weiteren wurde gezeigt, dass BNT162b2 eine T-Zell Immunantwort hervorruft. Es bildeten sich dabei vor allem CD4+ T-Zellen, welche IL-2, IFN-γ und TNF produzierten. In einem weiteren Schritt wurden die sechs Affen, die 100 µg von BNT162b1 oder BNT162b2 erhalten hatten, mit SARS-CoV-2 infiziert. Neun weitere Makaken, welche eine Kochsalzlösung verabreicht bekamen, wurden ebenfalls mit dem Virus infiziert. Eine weitere Gruppe von sechs Makaken, von denen drei eine 30µg Dosis erhalten hatten, wurde mit einem Zellkulturmedium infiziert. Es wurden nasale, oropharyngeale und rektale Abstriche entnommen und bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt. Diese Proben wurden mittels RT-qPCR auf SARS-CoV-2-RNA untersucht. In der Kontrollgruppe wurde nach drei Tagen bei sieben von neun Makaken virale RNA nachgewiesen. Nach sechs Tagen wurde immer noch bei vier Makaken virale RNA nachgewiesen und bei einem weiteren lag ein unklares Ergebnis vor. Im Vergleich dazu, konnte bei der mit BNT162b1 immunisierten Gruppe nur bei zwei von sechs Makaken virale RNA nachgewiesen werden. Nach sechs Tagen wurde bei keinem Affen mehr virale RNA nachgewiesen. In der BNT162b2 Gruppe konnte zu keinem Zeitpunkt virale RNA in der bronchoalveolären Flüssigkeit festgestellt werden. Bei den via Nasenabstrich gewonnenen Proben, wurde einen Tag nach der Infektion, bei vier von neun Makaken in der Kontrollgruppe, ein positives PCR-Ergebnis abgenommen. In der mit BNT162b2 immunisierten Gruppe, konnten am ersten Tag bei fünf von sechs Makaken virale RNA nachgewiesen werden, während in der BNT162b1 Gruppe kein Nachweis möglich war. An den weiteren Kontrolltagen drehte sich dieses Bild und es konnte keine virale RNA mehr in der BNT162b2 Gruppe nachgewiesen

werden. In den anderen beiden Gruppen wurde dahingegen teils noch virale RNA detektiert. Zum Zeitpunkt der Infektion lagen die Titer der neutralisierenden Antikörper von 208 bis 1.185 U/ml in der BNT162b1 und von 260 bis 1.004 U/ml in der BNT162b2 Gruppe. Diese Titerpiegel veränderten sich nach der durchgemachten Infektion kaum, wohingegen die Titerpiegel in der Kontrollgruppe nach der Infektion deutlich anstiegen. Dies könnte ein Hinweis auf die gute Wirksamkeit der Impfung sein, da die Infektion anscheinend in diesen Gruppen unterdrückt wurde.(80)

### **5.5.1.2 Klinische Phase I/II Studien**

Nachdem die präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt hatten, wurde mit den klinischen Studien begonnen. In Deutschland und den USA wurde an einer Studie mit 45 gesunden Erwachsenen zwischen 18 und 55 Jahren gearbeitet. Die Proband\*innen erhielten dabei im Abstand von 21 Tagen zwei Dosen des Vakzins. Diese Dosen enthielten entweder 10 µg, 30 µg, 100 µg oder ein Placebo. Es zeigte sich eine solide Immunantwort. Die gemessenen RBD spezifischen IgG-Antikörper nahmen sowohl mit der Höhe der verabreichten Dosis, als auch nach der zweiten Impfung zu. Im Vergleich zu Humansenen, die von rekonvaleszenten Patient\*innen mindestens 14 Tage nach der Infektion entnommen worden waren, zeigten sich bis zu fünf Mal höhere RBD spezifische Antikörperspiegel. Mit Blick auf das Sicherheitsprofil zeigten sich leichte bis moderate Reaktionen auf die Impfung.(81)

Da sowohl BNT162b1 als auch BNT162b2 vielversprechende Ergebnisse in den präklinischen Studien gezeigt hatten, wurden die beiden in einer klinischen Phase 1 Studie miteinander verglichen. Damit sollte der für die weiteren Studienphasen geeignete Impfstoff festgelegt werden. Hierzu wurden gesunde Erwachsene im Alter von 18 bis 55 Jahren oder von 65 bis 85 Jahren entweder mit BNT162b1 oder BNT162b2 immunisiert. Die Proband\*innen wurden in mehrere Gruppen aufgeteilt. Ihnen wurden 10 µg, 20 µg oder 30 µg von BNT162b1 oder BNT162b2 verabreicht. Des Weiteren gab es eine Placebogruppe und eine weitere Gruppe, die entweder 100 µg BNT162b1 oder ein Placebo erhielten. Alle Gruppen wurden in einem zwei Stufenschema immunisiert, wobei die zweite Dosis 21 Tage nach der ersten verabreicht wurde. So wurden insgesamt 195 Proband\*innen 13 Gruppen zugeteilt. Jede Gruppe bestand aus 15 Teilnehmer\*innen, wobei jeweils zwölf einen Impfstoff und drei ein Placebo verabreicht bekamen. In der Gruppe, die 100 µg BNT162b1 erhielt, wurde die zweite Dosis nicht mehr

verabreicht, da es im Vergleich zu den anderen Gruppen zu verstärkten Nebenwirkungen gekommen war. Die Impfungen wurden auch auf ihre Sicherheit und auftretende Nebenwirkungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die häufigste lokale Nebenwirkung Schmerzen an der Impfstelle waren. Diese traten innerhalb der ersten sieben Tage nach der Impfung auf und waren selbstlimitierend. Die Proband\*innen berichteten dabei nach der zweiten Dosis öfter über Schmerzen, als nach der ersten Impfung. Des Weiteren wurden in den Gruppen, die BNT162b1 erhielten, etwas häufiger über Schmerzen berichtet, als in den BNT162b2 Gruppen. In keiner Gruppe wurde über eine schwere lokale Nebenwirkung berichtet. Bei den systemischen Nebenwirkungen standen Fieber, Schüttelfrost und allgemeines Schwächegefühl im Vordergrund. Bei BNT162b1 waren die Symptome über alle Altersgruppen tendenziell ausgeprägter als in den BNT162b2 Gruppen und es nahmen in beiden Gruppen die Symptome mit der Höhe der verabreichten Dosis zu. Auch hier zeigte sich, dass die Symptome nach der zweiten Impfung ausgeprägter waren als nach der ersten Dosis. Kein\*e Teilnehmer\*in der Studie berichtete über schwere systemische Nebenwirkungen. Zur Bestimmung der Wirksamkeit wurden zwei Werte herangezogen. Es wurden die S1-IgG-Bindungsantikörper und neutralisierenden Antikörper bestimmt. Die gebildeten IgG-Antikörper waren bei beiden Wirkstoffen in ähnlichem Maße vorhanden. Wobei sie mit zunehmendem Alter der Proband\*innen etwas abnahmen und bei höheren Dosen etwas höher lagen. Bei der Bestimmung der 50 Prozent Neutralisationstiter, zeigten sich zwischen den Gruppen ähnliche Verhältnisse wie bei den Antikörpern.(82)

Aufgrund der bei BNT162b2 geringer ausgeprägten Nebenwirkungen und dem ähnlich guten Wirkungsprofil, wurde der Beschluss gefasst, diesen Wirkstoff in einer weiteren großangelegten Studie zu testen.

### **5.2.1.3 Klinische Phase III Studie**

Im Rahmen dieser Studie erhielten 43.488 gesunde Personen ab 16 Jahren zwei Injektionen mit 30 µg BNT162b2 oder ein Placebo. 21.720 Personen erhielten im Abstand von 21 Tagen 30 µg BNT162b2. Eine weitere Gruppe, die aus 21.728 Personen bestand, erhielt im gleichen Abstand zwei Injektionen mit einer Kochsalzlösung. Die Studie sollte die Sicherheit und Wirksamkeit der Impfung zeigen. In Bezug auf die Sicherheit zeigte sich, dass mehr lokale Reaktionen in der BNT162b2 Gruppe als in der Placebogruppe auftraten. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Schmerzen an der Einstichstelle. Diese waren bei über 55-jährigen weniger ausgeprägt, als bei jüngeren

Proband\*innen. Die Beschwerden traten sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Dosis in ähnlichem Ausmaß auf. So zeigten nach der ersten Dosis 83 Prozent der Proband\*innen, die jünger als 55 Jahre waren, lokale Reaktionen. Nach der zweiten Dosis lag dieser Anteil bei 78 Prozent. Die lokalen Symptome wurden alle als leicht bis moderat eingestuft. Kein\*e Proband\*in berichtete über schwerwiegende lokale Nebenwirkungen. Systemische Nebenwirkungen kamen ebenfalls bei den jüngeren Proband\*innen vermehrt vor. Auch hier zeigte sich, dass gehäuft nach der zweiten Dosis über Nebenwirkungen berichtet wurde. Die häufigsten systemischen Nebenwirkungen waren Abgeschlagenheit und Kopfschmerz mit bis zu 59 Prozent, wobei diese Symptome auch von 24 Prozent der Placeboprobant\*innen berichtet wurden. Des Weiteren wurde bei 16 Prozent der jüngeren und bei 11 Prozent der älteren Teilnehmer\*innen, Fieber über 38 Grad berichtet. Allgemein nahmen die Symptome mit zunehmendem Alter ab. In einem zweimonatigem Nachbeobachtungszeitraum konnten keine schwerwiegenden Ereignisse mit dem Vakzin in Verbindung gebracht werden. Zur Bestimmung der Wirksamkeit wurden die Vakzingrouppe und die Placebogruppe auf aufgetretene SARS-CoV-2 Infektionen miteinander verglichen. Diese Infektionen mussten mindestens sieben Tage nach der zweiten Impfung auftreten und es wurden nur Personen in diese Statistik aufgenommen, bei denen kein Hinweis auf eine bereits durchgemachte SARS-CoV-2-Infektion bestand. Dabei konnte bei acht Teilnehmer\*innen der BNT162b2 Gruppe eine Infektion mit SARS-CoV-2 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu trat im selben Zeitraum bei 162 Teilnehmer\*innen der Placebogruppe eine Infektion mit SARS-CoV-2 auf. Dies führt zu einer errechneten Wirksamkeit des Vakzins von 95 Prozent. Bei Anwendung eines 95 prozentigen Konfidenzintervalls liegt die angegebene Wirksamkeit zwischen 90,3 und 97,6 Prozent. Die errechnete Wirksamkeit im Zeitraum zwischen der ersten und zweiten Impfung lag bei 52 Prozent. In diesem Intervall waren bei den geimpften Proband\*innen 39 Fälle aufgetreten, während in der Placebogruppe 82 Personen positiv getestet wurden.(83)

## **5.5.2 Spikevax (Moderna)**

### **5.5.2.1 Klinische Phase I Studien**

Bereits 24 Stunden nachdem die isolierte Sequenz von SARS-CoV-2 bekannt wurde, gelang den Entwickler\*innen dieses Impfstoffes ein erster Durchbruch. Es ist bereits bei der Forschung an möglichen MERS Impfstoffen aufgefallen, dass eine Substitution

von zwei Prolinsequenzen an der zentralen Helix und dem HR1 eine Stabilisierung des S-Proteins in seiner Präfusionskonformation ermöglicht. Dieses Wissen machte man sich zu Nutze und erschuf so ein im Präfusionszustand stabilisiertes SARS-CoV-2 S-Protein, namens SARS-CoV-2 S-2P. Bereits fünf Tage später konnte mit der Produktion eines Impfstoffes namens mRNA-1273 begonnen werden. Dieser Impfstoff bestand aus mRNA, die in Lipidnanopartikel eingebettet war und für SARS-CoV-2 S-2P kodierte. In einer ersten Studie wurden Mäuse in einem dreiwöchigen Intervall immunisiert. Dabei wurden sie mit 0.01 µg, 0.1 µg oder 1 µg mRNA-1273 immunisiert. Mit allen verwendeten Dosierungen konnte eine S-Protein spezifische Immunantwort hervorgerufen werden. Die Höhe der gemessenen Antikörperspiegel stieg mit Zunahme der Dosierung an. Des Weiteren konnten neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, die ebenfalls mit zunehmender Dosierung anstiegen.(84)

In einer weiteren im Anschluss durchgeführten Studie wurde mRNA-1273 an Rhesusaffen, welche zur Gattung der Makaken gehören, getestet. Insgesamt wurden 24 Affen in Dreiergruppen eingeteilt. Innerhalb der Gruppen bekam ein Affe in einem vierwöchigen Intervall jeweils zwei Dosen mit 10 µg, 100 µg mRNA-1273 oder ein Placebo. Vier Wochen nach der zweiten Dosis wurden die Affen mit SARS-CoV-2 infiziert. Daraufhin wurden bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt und Nasenabstriche vorgenommen. Das so gewonnene Material wurde mittels PCR auf virale RNA untersucht. Zwei Tage nach der Infektion wurde in beiden mRNA-1273 Gruppen keine virale RNA in der bronchoalveolären Flüssigkeit nachgewiesen. Dahingegen wurde bei allen acht Affen der Placebogruppe virale RNA in der bronchoalveolären Flüssigkeit detektiert. Bei den nasalen Abstrichen zeigte sich zwei Tage nach Kontakt mit dem Virus ein etwas anderes Bild. Hier wurde bei fünf Affen in der 10 µg Gruppe und bei keinem in der 100 µg Gruppe virale RNA nachgewiesen, während sie in der Placebogruppe bei sechs Affen nachweisbar war. Es wurden auch die SARS-CoV-2 S-2P spezifischen IgG-Antikörper und die neutralisierenden Antikörper gemessen. Beide lagen in der 100 µg Gruppe vier Wochen nach der zweiten Impfung, deutlich höher als in der 10 µg Gruppe.(85)

### **5.2.2.2 Klinische Phase I/II Studien**

Bereits 66 Tage nach Ausbruch der Pandemie wurde in einer ersten klinischen Studie mRNA-1273 an gesunden Erwachsenen im Alter von 18 bis 55 Jahren getestet. Den

Proband\*innen wurden dabei zwei Dosen des Vakzins im Abstand von 28 Tagen verabreicht. Es wurden unterschiedliche Gruppen gebildet, in welchen 25 µg, 100 µg oder 250µg verwendet wurden. Es erhielten 45 Proband\*innen eine erste Dosis. Drei der Proband\*innen schieden aufgrund unterschiedlicher Gründe aus der Studie aus und konnten keine zweite Dosis erhalten. Eine Person aus der 25 µg Gruppe, hatte fünf Tage nach der ersten Impfung Urtikaria an beiden Beinen entwickelt und bei den beiden anderen wurden SARS-CoV-2 Infektionen vermutet, welche sich allerdings nicht bestätigten. Das Nebenwirkungsprofil der Impfung zeigte sich im Hinblick auf systemische Reaktionen nach der zweiten Impfung verstärkt. So berichteten hier in den 100 µg und 250 µg Gruppen alle Teilnehmer\*innen über systemische Beschwerden. Diese wurden allerdings alle als leicht bis moderat angegeben. Über hohes Fieber wurde bei keinem oder keiner der Proband\*innen nach der ersten Impfung berichtet. Allerdings hatte ein männlicher Proband, nach der zweiten Impfung mit 250 µg mRNA-1273, Fieber über 39,6 Grad Celsius und das entspricht einem schwerwiegenden Ereignis. Die meisten beschriebenen lokalen Reaktionen waren Schmerzen an der Einstichstelle und wurden als leicht bis moderat angegeben. Im Hinblick auf die Wirksamkeit, konnten nach der ersten Impfung ähnlich hohe IgG-Antikörperspiegel erreicht werden, wie unter einer Vergleichsgruppe seropositiver Genesener. Nach der zweiten Impfung lagen die Antikörperspiegel in allen Gruppen über den Werten, die die Genesenen erreichten. Die höchsten Werte wurden in der Gruppe erzielt, welche mit 100 µg mRNA-1273 geimpft wurde.(86)

Aufgrund der vorliegenden Daten, welche suggerierten, dass zwei Dosen mit 100 µg mRNA-1273 eine ausgezeichnete B- und T-Zell Immunantwort hervorrufen und ein gegenüber höheren Dosen besseres Nebenwirkungsprofil vorweisen, wurde eine weitere großangelegte Phase 3 Studie mit dieser Dosierung durchgeführt.(86)

### **5.2.2.3 Klinische Phase III Studie**

In dieser Studie wurden 30.420 Teilnehmer\*innen in einem 1:1 Verhältnis entweder einer Placebogruppe oder einer Gruppe, die das Vakzin erhielt, zugeteilt. In der Vakzingruppe wurden im Abstand von 28 Tagen zwei Dosen mit 100 µg mRNA-1273 verabreicht. In Bezug auf die Nebenwirkungen zeigte sich, dass bei lokalen Symptomen vor allem Schmerzen im Bereich der Impfstelle auftraten. Dies kam bei 84 Prozent der Proband\*innen nach der ersten und bei 88 Prozent nach der zweiten Impfung vor. Diese Ereignisse wurden größtenteils als leicht bis moderat beschrieben. Systemische

Nebenwirkungen traten vermehrt nach der zweiten Impfung auf, bei der 80 Prozent der Teilnehmer\*innen über Nebenwirkungen berichteten. Sowohl lokale als auch systemische Nebenwirkungen traten bei Teilnehmer\*innen, die jünger als 65 Jahre waren, vermehrt auf. In einer ersten Nachbeobachtungsphase konnten zwischen den beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Hinweise auf einen Unterschied in schweren behandlungsbedürftigen Ereignissen und Todesfällen nach der Impfung gefunden werden. Zur Untersuchung der Wirksamkeit wurden die beiden Gruppen auf das Auftreten einer SARS-CoV-2-Infektion verglichen. Bis zum 15. November 2020, an dem der primäre Endpunkt der Studie definiert war, wurde bei elf Personen in der Vakzingrouppe eine Infektion nachgewiesen. Im Vergleich dazu, wurden in der Placebogruppe 185 Fälle bestätigt. Dies führt zu einer errechneten Wirksamkeit der Impfung von 94,1 Prozent. Bei einem Konfidenzintervall von 95 Prozent, lag die angegebene Schutzwirkung des Impfstoffes zwischen 89,3 und 96,8 Prozent.(87)

## **6 Mögliche zukünftige Einsatzgebiete der mRNA**

Das größte Potential der mRNA als Trägerplattform wird im Bereich der Immuntherapie gesehen. Hierbei stehen vor allem die Entwicklung von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten und der Einsatz in der Tumorthherapie im Zentrum der Forschung.(74)

### **6.1 mRNA Transportsysteme**

Um potente Immunantworten hervorrufen zu können, ist es nötig die mRNA in das Zytoplasma der Zellen zu bringen. Allerdings ist das mRNA Molekül nicht klein genug um die Zellmembran durch freie Diffusion zu überwinden. Ein weiterer Faktor, der ein erschwertes Eindringen in die Zelle begünstigt ist, dass sowohl die mRNA als auch die Zellmembran negativ geladen sind. Um diese Probleme zu lösen sind Transportsysteme nötig, welche der mRNA in das Zytoplasma verhelfen.(74)

#### **6.1.1 Elektroporation**

Eine Möglichkeit die Effektivität der mRNA zu erhöhen sind physikalische Methoden. So kann in etwa mittels Elektroporation ein Spannungsimpuls erzeugt werden, der den Arzneimittelfluss bei transkutaner und intrazellulärer Genabgabe erhöht. Darüber hinaus kann die Elektroporation als Adjuvans dienen, weil dadurch proinflammatorische Zellen aktiviert werden und die Zytokinproduktion gesteigert wird. Eine weitere physikalische Möglichkeit um den Transport zu verbessern ist die Genkanone. Dabei wird mit goldenen Nanopartikel beschichtete exogene DNA, unter Einsatz von Helium, als

Beschleunigungskraft direkt in Hautepithelzellen geschleudert.(88) Allerdings kommen physikalische Verfahren bei Menschen und größeren Tieren kaum zum Einsatz. Physikalische Wege zur mRNA Abgabe können die Aktivität von Zellen verändern und einen abnormalen Zelltod einleiten, weswegen sie potentiell gefährlich und vermutlich ungeeignet zur Anwendung am Menschen sind.(74)

### **6.1.2 Dendritische Zellen (DCs)**

Eine weitere Möglichkeit mRNA effizienter in den Körper einzuschleusen besteht darin, mRNAs *in vitro* in DCs zu transferieren. Diese DCs werden dann in den Wirtskörper transferiert und können Antigene über den Haupthistokompatibilitätskomplex, an CD4+ und CD8+ T-Zellen präsentieren. Diese Methode kam bisher vor allem in präklinischen Experimenten und Tiermodellen zum Einsatz und wurde hauptsächlich im Forschungsfeld der Tumorbehandlungen angewandt. Bei der alleinigen Anwendung der DCs Endozytose, ist die Transfektionsrate allerdings äußerst gering. Deswegen können andere Verfahren wie die Elektroporation eingesetzt werden, um die Transfektionsrate zu verbessern. Da dieses Verfahren einen zeit- und kostenaufwendigen Produktionsprozess mit sich bringt, ist es für die Entwicklung von Impfstoffen, welche rasch und in großer Menge gebraucht werden, nicht optimal geeignet.(74)

### **6.1.3 Protamin**

Ein großer Vorteil der mRNA als Impfstoff, ist ihre Fähigkeit sowohl eine antigenspezifische Immunantwort auslösen zu können, als auch das angeborene Immunsystem zu aktivieren. Um dieses Potential voll auszuschöpfen, kann die mRNA einen Komplex zum Beispiel mit einer kationischen Verbindung, wie Protamin, bilden. Je nach Zusammenstellung dieses Komplexes, kann die Bindung an spezifische Rezeptoren, welche die angeborene Immunantwort aktivieren, beeinflusst werden. So zeigte sich in Studien bei einem 1:1 Verhältnis von mRNA zu Protamin eine erhöhte Zytokinsekretion. Dies führte allerdings auch zu einer beinahe vollständigen Unterdrückung des von der mRNA kodierten Proteins. In einer Studie, die an Mäusen durchgeführt wurde, zeigte sich bei der Verwendung eines mRNA-Protamin-Komplexes im Verhältnis von 1:2 eine starke Stimulation des angeborenen Immunsystems. Allerdings ging damit eine starke Hemmung der Proteinexpression einher. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein Zweikomponentenimpfstoff, welcher zu 50 Prozent aus freier mRNA und zu 50 Prozent aus einem mRNA-Protamin-Komplex im Verhältnis 1:2 besteht, getestet. Es zeigte

sich dabei, dass sich die beiden Komponenten nicht vermischten und über unterschiedliche endozytische Wege in die Zellen aufgenommen wurden. Außerdem konnte so sowohl die Proteinexpression gewährleistet werden, als auch das angeborene Immunsystem aktiviert werden.(89) Ein weiterer Vorteil eines mRNA-Protamin-Komplexes, ist der Schutz der mRNA gegen zirkulierende Ribonukleasen.(74)

#### **6.1.4 Lipid-Komplex**

Eine der am weitesten fortgeschrittenen Methoden zum Transport von mRNA sind die kationisch lipidbasierten Abgabesysteme, die auch bei den bereits zuvor beschriebenen SARS-CoV-2 mRNA Impfstoffen eingesetzt wurden. Kationische Liposome bilden dabei mit Nukleinsäuren einen elektrostatischen Komplex. Dieser kationische Lipid-mRNA-Komplex und weiter Präparate können einen 80 bis 200 nm großen Nanopartikel, der als LNP bezeichnet wird, bilden. Dieser LNP besteht aus kationischen Lipiden, Phospholipiden, Cholesterin und Polyethylenglykol. Die kationischen Lipide fördern durch Ionisierung eine Freisetzung der mRNA im Zytoplasma. Phospholipide unterstützen die Nanopartikel, um eine Lipiddoppelschicht zu bilden und Cholesterin dient dazu die Stabilität der LNP zu erhöhen. Die mRNA sitzt im Kern der LNP und wird so vor Abbau durch Ribonukleasen geschützt. Des Weiteren ermöglicht die Lipophilie des LNP eine Fusion mit der Wirtszellmembran und die mRNA wird durch Endozytose in die Zelle transportiert.(74)

#### **6.2 mRNA-Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten**

Mit traditionellen Impfstoffen, wie attenuierten Lebendimpfstoffen, Untereinheitsimpfstoffen oder inaktivierten Impfstoffen, konnte aktuell gegen einige Infektionskrankheiten wie HIV oder Tuberkulose keine suffiziente Schutzwirkung erreicht werden. Des Weiteren sind diese Impfstoffe kaum geeignet um rasch auf ausbrechende Pandemien zu reagieren, da ihre Entwicklung und Herstellung zu viel Zeit benötigt. Für diese Einsatzgebiete scheinen mRNA-Impfstoffe eine vielversprechende Option darzustellen. Es befinden sich auch bereits zahlreiche Impfstoffe in präklinischen oder klinischen Testphasen. Neben den bereits zugelassenen Impfstoffen mRNA1273 und BNT162b2, sind mRNA Impfstoffe gegen HIV, Rabies, Influenza, Zika-Virus und das Zytomegalievirus in klinischen Testphasen.(74)

### 6.3 mRNA Impfstoffe als Tumorthherapie

Die Immuntherapie ist ein rasant wachsendes Gebiet in der Tumorthherapie. Die Charakteristika, die die Immuntherapie bei Tumorpatient\*innen mit sich bringt, sind die hohe Spezifität, gute Effizienz und anhaltende Antitumorantworten durch Stimulierung des eigenen Immunsystems des\*der Patient\*in. Vakzine, die gegen Tumore gerichtet sind, könnten prophylaktisch oder als Therapeutikum angewendet werden. Sie müssen eine humorale oder zelluläre Immunantwort hervorrufen und sollten DCs und T-Zell Immunantworten aktivieren können. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch den Einsatz von Antigenen, welche spezifisch für die Tumorzellen der Patient\*innen sind, eine im höchsten Grade individuelle Behandlung ermöglicht werden könnte.(88)

Die Krebsimmunität wird hauptsächlich durch gegen mutierte Neoantigene gerichtete T-Zellen getrieben. Allerdings ist die spontane Immunerkennung von Mutationen bei Tumorpatient\*innen limitiert, weshalb eine Unterstützung des Immunsystems nötig ist. Dies könnte durch die Produktion von mittels mRNA kodierten Neoantigenen ermöglicht werden.(90) Die Entwicklung mutationsspezifischer Impfstoffe ist aktuell dahingehend limitiert, dass sie nur bei häufig vorkommende Neoantigene verwendet werden können. Um überhaupt eingesetzt werden zu können, müssen diese Mutationen bei der\*dem Patient\*in vorhanden sein. Somit sind diese Methoden nicht bei allen Patient\*innen anwendbar und wirken auch nur gegen ein einziges mutiertes Neoantigen. Mit der Entwicklung des NGS zeigte sich, dass menschliche Tumore aus mehreren tausend Mutationen bestehen können. Des Weiteren wird vermutet, dass bei jedem Tumor eine gewisse Anzahl an Mutationen potentiell von MHC-Klasse-I präsentiert werden kann. In einem Mausmodell wurde ein Impfstoff eingesetzt, der mittels mRNA für tumorspezifische Mutationen kodiert. Die Mutationen waren dafür durch NGS identifiziert worden. Dabei zeigte sich, dass bei mRNA Impfstoffen, die für MHC-Klasse-II-Neoepitope kodierten, das Wachstum von Melanomen und Darmkrebs kontrolliert werden konnte. Es sollte in Zukunft möglich sein, durch rechnerische Vorhersagen relevanter MHC-Klasse-II-Neoepitope, eine schnelle Herstellung von Poly-Neoepitop-mRNA-Impfstoffen zu ermöglichen. So könnte in Zukunft ein prophylaktischer und therapeutischer Einsatz von mRNA Impfstoffen in der Tumorthherapie möglich werden.(91)

Dieses Prinzip der Impfstoffentwicklung gegen Tumorerkrankungen wurde auch schon bei Menschen getestet. Bei 13 Patient\*innen mit Melanomen der Stufe drei bis vier,

wurden nicht synonyme Mutationen aus Blutproben und Biopsien identifiziert. Die entdeckten Mutationen wurden nach der Höhe der Wahrscheinlichkeit, eine hohe Affinität für MHC-I und MHC-II Klassen zu haben, geordnet. Aufgrund dieser Wahrscheinlichkeit, wurden für jede\*n Patient\*in spezifische mRNA-Impfstoffe entwickelt, die für diese Neoepitope kodierten. Die Impfstoffe wurden ultraschallgezielt in die Leistenlymphknoten injiziert. Es wurden dabei pro Patient\*in, mindestens acht und bis zu maximal 20 Impfdosen verabreicht. Die Anwendung löste bei keinem oder keiner der Patient\*innen eine schwere Nebenwirkung aus. Gegen 60 Prozent der eingesetzten Neoepitope wurden T-Zell Immunantworten detektiert und jede\*r Patient\*in entwickelte mindestens gegen drei Mutationen T-Zell Immunantworten. Acht Patient\*innen blieben im Beobachtungszeitraum, der bis zu zwei Jahren dauerte, rezidivfrei. Die anderen fünf Patient\*innen hatten kurz vor der Impfung, trotz Ausschöpfung der Standardtherapieverfahren, fortschreitende Verläufe. Ein männlicher Patient hatte ein vollständiges Ansprechen auf die Impfung und blieb bis zu Ende der Therapie rezidivfrei. Ein weiterer hatte eine vollständige Regression in Kombination mit einer PD-1 Blockade. Bei zwei Patient\*innen zeigte sich eine Stabilisierung des Tumors nach der Impfung. Ein männlicher Patient hatte trotz Impfung einen progressiven Verlauf und verstarb an der Erkrankung. Es zeigte sich allerdings, dass die Anwendung spezifischer Impfstoffe eine Möglichkeit für Tumortherapien sei könnte und weitere Forschung in diesem Bereich unbedingt betrieben werden sollte.(90)

Ein Problem, welches Immuntherapien in der Tumortherapie präsentieren, ist die Abhängigkeit der Therapie von den individuellen Immunreaktionen der Patient\*innen.(88)

## **6.4 Auf mRNA basierende passive Immuntherapie**

In vielen Bereichen haben mononukleale Antikörper mittlerweile Einzug in die Behandlung von Krankheiten gehalten und stellen einen in den letzten Jahren rasant wachsenden Markt dar. Bei Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten, Osteoporose, Hypercholesterinämie oder in der Tumortherapie werden sie bereits erfolgreich in der Therapie eingesetzt. Hohe Produktionskosten und die Notwendigkeit einer häufigen systemischen Anwendung, stellen zurzeit oft Hindernisse für einen breiten Einsatz dieser Therapie dar. Dieses Problem könnte in Zukunft durch mRNA-Technologien gelöst

werden. Man könnte Patient\*innen Nukleotidsequenzen verabreichen, die für mononukleale Antikörper kodieren und so die *in vivo* Produktion von mononuklealen Antikörpern ermöglichen. In präklinischen Studien konnten bereits mononukleale Antikörper gegen HIV, Tumorzellen oder auch Botulinumtoxin gebildet werden, ohne dabei toxische Nebenwirkungen zu produzieren.(92)

## **6.5 Herausforderungen in der Entwicklung**

In den letzten Jahren sind enorme Fortschritte in der Entwicklung von mRNA-Impfstoffen gemacht worden. Trotzdem bleibt noch viel Raum für Verbesserungen und Innovationen.

So ist zurzeit noch nicht ausreichend erforscht, wie sich unterschiedliche mRNA-Komplexe auf die Immunreaktionen auswirken und bei welchen Krankheiten sie am besten einzusetzen sind. Dies zeigt sich dadurch, dass die Immunreaktion sehr stark von unterschiedlichen Variablen beeinflusst werden kann. So können durch Veränderungen, wie der Modifizierung von Nukleosiden, Reinigung und Modifizierung der mRNA, intrazellulärer RNA-Replikation oder dem verwendeten Transportmedium, unterschiedliche Zytokin- und Chemokinmilieus entstehen. Diese beeinflussen in weiterer Folge die Größe und Qualität der T- und B-Zellreaktion. So scheint es wahrscheinlich, dass nicht unbedingt für jede Krankheit eine bestimmte Zusammenstellung der mRNA passend ist.(93)

Eine weitere Herausforderung könnte die teilweise auftretende Diskrepanz zwischen erfolgreichen Versuchen in Tiermodellen und anschließenden Misserfolgen in humanen Versuchen darstellen. So gezeigt etwa bei der Entwicklung von mRNA-Vakzinen gegen Rabies und Influenza. Hier wurden in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse erzielt. Bei der Anwendung der Impfstoffe am Menschen wurden allerdings nur sehr niedrige Spiegel an neutralisierenden Antikörpern gebildet. Das wirft die Frage auf, ob mRNA-Impfstoffe bei Menschen anders wirken als bei Tieren und ob bei Menschen andere biologische Ansprüche bestehen, um eine potente Immunantwort auszulösen.(93)

Es wird auch wichtig sein, die Immunogenität von mRNA-Impfstoffen genau zu verstehen. Ein gutes Beispiel dafür ist die Wirkung von Typ I-IFNs. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Typ I-IFN bei selbstamplifizierenden mRNA-Impfstoffen von

Nachteil ist. Wenn man die Typ I-IFN Rezeptoren blockiert führt dies zu einer Verbesserung der Expression von durch mRNA kodierten Proteinen und der entstehenden T- und B-Zell Immunantwort. In Hinblick auf die Tumorforschung zeigte sich dahingegen, dass eine IFN Signalisierung bei der Anwendung von unmodifizierten mRNA-LNP Impfstoffen, essentiell für eine optimale antitumorale Immunität ist.(93)

## **7 Diskussion**

SARS-CoV-2 ist eine der größten Herausforderung, welche die Gesellschaften und die Gesundheitssysteme vieler Länder in den letzten Jahrzehnten erlebt haben. Nachdem das Virus Ende Dezember 2019 erstmals in Wuhan nachgewiesen wurde, begann ein Wettlauf gegen die Zeit, um ein Medikament oder eine Impfung gegen Sars-CoV-2 zu entwickeln.(1)

Da die beiden humanpathogenen Viren MERS und SARS-CoV dem SARS-CoV-2 Virus in ihrer Struktur am ähnlichsten sind, fokussierten sich viele Entwicklungsteams auf das S-Protein als Ansatzpunkt für die Impfung. Bereits bei SARS-CoV und MERS hatte dieses Strukturprotein in präklinischen und klinischen Phase 1 Studien vielversprechende Ergebnisse geliefert.(26)(27)(28)(29)(30)(31)(32)

Um eine rasche Entwicklung und Herstellung von Impfstoffen zu ermöglichen, sind bisher verwendete Impfstoffe wie attenuierte Lebendimpfstoffe, Untereinheitenimpfstoffe oder inaktivierte Impfstoffe schlecht geeignet, da sie nicht schnell genug in großen Mengen produziert werden können und die Entwicklung zu lange dauert. Im Gegensatz dazu, eröffnen neue Methoden der Impfstoffentwicklung Möglichkeiten rasch auf pandemische Ereignisse zu reagieren. Bei der Entwicklung der SARS-CoV-2 Impfstoffe, rückten rasch Vektorimpfstoffe und mRNA-Impfstoffe in den Mittelpunkt der Forschung. Besonders die mRNA-Impfstoffe ermöglichen eine rasche Entwicklung, hohe Effektivität, ein hohes Sicherheitsprofil und niedrige Produktionskosten.(92)(74)

Bereits wenige Tage nach dem Ausbruch der Pandemie konnte mit Hilfe der mRNA-Technologie ein erster Impfstoff hergestellt werden. Etwa drei Monate nach Beginn der Pandemie befand sich bereits ein erster Impfstoff in einer ersten klinischen Phase. Dieser rasche Fortschritt in der Entwicklung wurde durch die neuen Technologien erst möglich.(83)(84)(85)

Durch den enormen Einsatz, der weltweit in die Forschung gesteckt wurde, konnten zum aktuellen Zeitpunkt bereits vier Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 zugelassen werden. In ihren präklinischen und klinischen Studien zeigten alle vier Impfstoffe eine signifikante Wirkung und ein gutes Sicherheitsprofil.(87)(83)(64)(67)

Vor allem die in dieser Arbeit gesondert behandelten mRNA-Impfstoffe, scheinen aufgrund der großen Variabilität, die diese Impfstoffe potentiell ermöglichen, ein großes Zukunftspotential in zahlreichen weiteren Bereichen zu haben. So sollte es möglich sein, jedes Protein mithilfe dieser Technologie *in vivo* zu produzieren, da dafür im Prinzip nur eine Anpassung der Nukleotidsequenz nötig ist. Allerdings stellte sich in präklinischen und klinischen Studien heraus, dass mehrere weitere Faktoren, wie die Konfiguration oder auch das verwendete Transportmedium, die Reaktionen des Körpers sehr stark beeinflussen können.(72-90)

Potentielle zukünftige Einsatzgebiete der mRNA-Impfstoffe können der prophylaktische Einsatz bei Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen sein. Aber auch als Therapeutikum, vor allem in der Tumorthherapie, können große Hoffnungen auf mRNA basierende Therapeutika gesetzt werden, wenn die vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen und ersten klinischen Studien umgesetzt werden können.(72-90)

Es wird interessant zu beobachten sein, wie sich die bereits entwickelten Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 in den Nachbeobachtungsphasen präsentieren, um weitere wichtige Informationen über diese Technologien zu erlangen. Zusätzlich wird es weitere Forschungsarbeiten in diesem Themengebiet brauchen, um die Mechanismen genau zu verstehen und so eine breite Anwendung in verschiedenen Themenbereichen der Medizin zu ermöglichen.(90)

## Literaturverzeichnis

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, u. a. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*. 20. Februar 2020;382(8):727.
2. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. WHO vergibt offiziellen Namen für neuartiges Coronavirus und... [Internet]. *Deutsches Ärzteblatt*. 2020 [zitiert 22. Oktober 2021].
3. Li X, Wang W, Zhao X, Zai J, Zhao Q, Li Y, u. a. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*. Mai 2020;92(5):501.
4. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic [Internet]. [zitiert 10. Mai 2021].
5. Mavragani A. Tracking COVID-19 in Europe: Infodemiology Approach. *JMIR Public Health and Surveillance* [Internet]. Juni 2020 [zitiert 10. Mai 2021];6(2).
6. COVID Live Update: 159,317,866 Cases and 3,311,590 Deaths from the Coronavirus - Worldometer [Internet]. [zitiert 10. Mai 2021].
7. Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Jin D-Y, Yuen K-Y. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*. Oktober 2013;21(10):544.
8. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, u. a. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*. Juni 2016;24(6):490.
9. Woo PCY, Lau SKP, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, u. a. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *Journal of Virology*. Januar 2005;79(2):884.
10. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, u. a. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet (London, England)*. 25. Oktober 2003;362(9393):1353.
11. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia [Internet]. <http://dx-1doi-1org-10013b5k80088.han.medun-igraz.at/10.1056/NEJMoa1211721>. Massachusetts Medical Society; 2012 [zitiert 13. Mai 2021].
12. EMROPub-MERS-SEP-2019-EN.pdf [Internet]. [zitiert 13. Mai 2021]. Verfügbar unter: <https://applications.emro.who.int/docs/EMROPub-MERS-SEP-2019-EN.pdf?ua=1&ua=1>
13. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*. :1.

14. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, u. a. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*. 22. Februar 2020;395(10224):565.
15. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, u. a. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):221.
16. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, u. a. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270.
17. Xiaoying Shen HT. SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited by ancestral spike vaccines. *Cell Host & Microbe*. 14. April 2021;29(4):529.
18. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, u. a. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England [Internet]. 2021 März [zitiert 14. Oktober 2021] S. 2020.12.24.20248822. Verfügbar unter: <https://www-1medrxiv-1org-10013b5q80225.han.medunigraz.at/content/10.1101/2020.12.24.20248822v3>
19. Public Health England (2020). Public Health England: Investigation of novel SARS-COV-2 variant Variant of Concern 202012.
20. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, u. a. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa [Internet]. 2020 Dez [zitiert 15. Oktober 2021] S. 2020.12.21.20248640. Verfügbar unter: <https://www-1medrxiv-1org-10013b5q80353.han.medunigraz.at/content/10.1101/2020.12.21.20248640v1>
21. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, u. a. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*. Mai 2021;593(7857):130–5.
22. Thandeka Moyo-Gwete MM. SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351) elicits cross-reactive neutralizing antibodies. *bioRxiv [Internet]*. [zitiert 15. Oktober 2021];
23. The impact of spike mutated variants of SARS-CoV2 [Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Lambda] on the efficacy of subunit recombinant vaccines [Internet]. [zitiert 14. Oktober 2021].
24. S K, P SSA, A S. Omicron (B.1.1.529) - variant of concern - molecular profile and epidemiology: a mini review. *European review for medical and pharmacological sciences [Internet]*. Dezember 2021 [zitiert 10. Februar 2022];25(24).
25. BGBLA\_2020\_II\_98.pdf [Internet]. [zitiert 21. Mai 2021].
26. Corona-Shutdown verursacht Milliarden-Schaden [Internet]. *springerprofessional.de*. 2020 [zitiert 21. Mai 2021].

27. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, u. a. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 29. Juni 2004;101(26):9804.
28. Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, Vogel LN, Elkins WR, Claire MS, u. a. Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet (London, England)*. 26. Juni 2004;363(9427):2122.
29. SARS CoV subunit vaccine: antibody- mediated neutralisation and enhancement [Internet]. HKMJ. 2015 [zitiert 25. Mai 2021].
30. Li J, Ulitzy L, Silberstein E, Taylor DR, Viscidi R. Immunogenicity and Protection Efficacy of Monomeric and Trimeric Recombinant SARS Coronavirus Spike Protein Subunit Vaccine Candidates. *Viral Immunology*. April 2013;26(2):126.
31. Wang N, Shang J, Jiang S, Du L. Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [zitiert 25. Mai 2021];11.
32. M L, A M, V M. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature microbiology* [Internet]. April 2020 [zitiert 1. Juni 2021];5(4).
33. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology* [Internet]. April 2020 [zitiert 1. Juni 2021];94(7).
34. Liu S-J, Leng C-H, Lien S, Chi H-Y, Huang C-Y, Lin C-L, u. a. Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. *Vaccine*. 12. April 2006;24(16):3100.
35. Baxby D. Edward Jenner's Inquiry after 200 years. *BMJ : British Medical Journal*. 6. Februar 1999;318(7180):390.
36. Plotkin S. History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 26. August 2014;111(34):12283.
37. Di B, Ve S, Jr S, Gm S, Ds S, D D, u. a. Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine* [Internet]. Februar 1998 [zitiert 15. September 2021];16(4).
38. Dutta AK. Vaccine Against Covid-19 Disease – Present Status of Development. *Indian Journal of Pediatrics*. :1.
39. Entwicklung und Zulassung von Impfstoffen [Internet]. AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit. [zitiert 18. September 2021].

40. Wissenschaft und Forschung - Bundeskanzleramt Österreich [Internet]. [zitiert 18. September 2021].
41. WEBER F. COVID-19: EU-Kommission erteilt BionTech/Pfizer-Impfstoff erste EU-weite Zulassung [Internet]. Deutschland - European Commission. 2020 [zitiert 18. September 2021].
42. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Biontech-Impfstoff in den USA zugelassen [Internet]. Deutsches Ärzteblatt. 2020 [zitiert 18. September 2021].
43. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Russland lässt Impfstoff gegen SARS-CoV-2 zu [Internet]. Deutsches Ärzteblatt. 2020 [zitiert 18. September 2021].
44. Padron-Regalado E. Vaccines for SARS-CoV-2: Lessons from Other Coronavirus Strains. *Infectious Diseases and Therapy*. Juni 2020;9(2):255.
45. Martin JE, Louder MK, Holman LA, Gordon IJ, Enama ME, Larkin BD, u. a. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine*. 25. November 2008;26(50):6338.
46. Zakhartchouk AN, Sharon C, Satkunarajah M, Auperin T, Viswanathan S, Mutwiri G, u. a. Immunogenicity of a receptor-binding domain of SARS coronavirus spike protein in mice: Implications for a subunit vaccine. *Vaccine*. 2. Januar 2007;25(1):136.
47. Jt L, Js Z, N S, Jg X, N W, Jt C, u. a. Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antiviral therapy* [Internet]. 2007 [zitiert 21. September 2021];12(7).
48. Fett C, DeDiego ML, Regla-Nava JA, Enjuanes L, Perlman S. Complete Protection against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Mediated Lethal Respiratory Disease in Aged Mice by Immunization with a Mouse-Adapted Virus Lacking E Protein. *Journal of Virology*. Juni 2013;87(12):6551.
49. Kim E, Okada K, Kenniston T, Raj VS, AlHajri MM, Farag EABA, u. a. Immunogenicity of an adenoviral-based Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine in BALB/c mice. *Vaccine*. 14. Oktober 2014;32(45):5975.
50. Modjarrad K, Roberts CC, Mills KT, Castellano AR, Paolino K, Muthumani K, u. a. Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial. *The Lancet Infectious Diseases*. September 2019;19(9):1013.
51. WHO. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines—20 March 2020. 2020. [Online]. <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf?ua=1>. Accessed 15 Mar 2020.
52. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M, u. a. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science (New York, N.y)* [Internet]. [zitiert 24. September 2021];

53. COVID-19 Impfstoffe [Internet]. BASG. [zitiert 29. September 2021].
54. Chung YH, Beiss V, Fiering SN, Steinmetz NF. COVID-19 Vaccine Frontrunners and Their Nanotechnology Design. ACS Nano [Internet]. [zitiert 6. Oktober 2021];
55. Zhang Y, Geng X, Tan Y, Li Q, Xu C, Xu J, u. a. New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. Biomedicine & Pharmacotherapy. Juli 2020;127:110195.
56. Vektor-Impfstoff | Deutsches Zentrum für Infektionsforschung [Internet]. [zitiert 6. Oktober 2021].
57. drze.de/im-blickpunkt/somatische-gentherapie/module/virale-vektoren [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2021].
58. GmbH A-MDA. SARS-CoV-2-Impfstoffe – Teil 2: Vektorviren als Plattform [Internet]. Pharmazeutische Zeitung online. [zitiert 7. Oktober 2021].
59. Der dritte sichere und wirksame Impfstoff gegen COVID-19 [Internet]. European Commission - European Commission. [zitiert 7. Oktober 2021].
60. COVID-19 Schutzimpfungen in Österreich, Tirol Atlas [Internet]. [zitiert 7. Oktober 2021].
61. Doremalen N van, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, u. a. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. Nature. Oktober 2020;586(7830):578.
62. Pm F, Kj E, Pk A, B A, S B, S B-R, u. a. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. Lancet (London, England) [Internet]. 15. August 2020 [zitiert 12. Oktober 2021];396(10249).
63. Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, u. a. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. Lancet (London, England). 19. Dezember 2020;396(10267):1979.
64. M V, Sac C, Sa M, Ly W, Pm F, Pk A, u. a. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. Lancet (London, England) [Internet]. 1. September 2021 [zitiert 8. Oktober 2021];397(10269).
65. WEBER F. Johnson & Johnson: Kommission lässt vierten COVID19-Impfstoff in der EU zu [Internet]. Deutschland - European Commission. 2021 [zitiert 13. Oktober 2021].
66. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, u. a. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. N Engl J Med. 21. April 2021;NEJMoa2101544.

67. Bos R, Rutten L, van der Lubbe JEM, Bakkers MJG, Hardenberg G, Wegmann F, u. a. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines*. 28. September 2020;5:91.
68. Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J, u. a. Single-Shot Ad26 Vaccine Protects Against SARS-CoV-2 in Rhesus Macaques. *Nature*. Oktober 2020;586(7830):583.
69. Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, Heerwegh D, Truyers C, de Groot AM, u. a. Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 13. Januar 2021;NEJMoa2034201.
70. A G, T, Te W, K W, Pa K, S E. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *The New England journal of medicine* [Internet]. 6. März 2021 [zitiert 10. Februar 2022];384(22).
71. Communications E. Taschenlehrbuch Humangenetik [Internet]. [zitiert 25. Oktober 2021]. Verfügbar unter: [https://eref-1thieme-1de-1yuhhxapq012c.han.medunigraz.at/ebooks/1879364#/ebook\\_1879364\\_SL73445214](https://eref-1thieme-1de-1yuhhxapq012c.han.medunigraz.at/ebooks/1879364#/ebook_1879364_SL73445214)
72. BRENNER, S.; JACOB, F.; MESELSON, M. (1961). An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. , 190(4776), 576–581. doi:10.1038/190576a0.
73. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. August 1989;86(16):6077–81.
74. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. September 2020 [zitiert 18. August 2021];21(18).
75. Pascolo S. Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med*. 2006;127:23–40.
76. Fan Y-N, Li M, Luo Y-L, Chen Q, Wang L, Zhang H-B, u. a. Cationic lipid-assisted nanoparticles for delivery of mRNA cancer vaccine. *Biomater Sci*. 1. November 2018;6(11):3009–18.
77. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen K-J. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biology*. 1. November 2012;9(11):1319.
78. Zarghampoor F, Azarpira N, Khatami SR, Behzad-Behbahani A, Foroughmand AM. Improved translation efficiency of therapeutic mRNA. *Gene*. 30. Juli 2019;707:231–8.
79. Erster Covid-19-Impfstoff in der EU zugelassen - Bundeskanzleramt Österreich [Internet]. [zitiert 29. Oktober 2021].
80. Ab V, I K, Y C, Ka S, A M, M V, u. a. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature* [Internet]. April 2021 [zitiert 8. November 2021];592(7853).

81. Mj M, Ke L, N K, J A, A G, S L, u. a. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* [Internet]. Oktober 2020 [zitiert 8. November 2021];586(7830).
82. Walsh EE, Frenck RW, Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, u. a. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. [zitiert 11. November 2021];
83. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, u. a. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. [zitiert 28. Mai 2021];
84. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, u. a. SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Design Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. *Nature*. Oktober 2020;586(7830):567–71.
85. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, u. a. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med*. 28. Juli 2020;NEJMoa2024671.
86. Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, u. a. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N Engl J Med*. 14. Juli 2020;NEJMoa2022483.
87. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, u. a. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 4. Februar 2021;384(5):403–16.
88. X S, L Z, Y H. Transcutaneous delivery of DNA/mRNA for cancer therapeutic vaccination. *The journal of gene medicine* [Internet]. Juli 2019 [zitiert 15. November 2021];21(7).
89. M F-M, Km D, C L, R P, S O-Z, J P, u. a. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* [Internet]. Januar 2011 [zitiert 16. November 2021];34(1).
90. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke B-P, Simon P, Löwer M, u. a. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 13. Juli 2017;547(7662):222–6.
91. Türeci Ö, Vormehr M, Diken M, Kreiter S, Huber C, Sahin U. Targeting the Heterogeneity of Cancer with Individualized Neoepitope Vaccines. *Clin Cancer Res*. 15. April 2016;22(8):1885–96.
92. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. April 2018;17(4):261–79.
93. N P, Mj H, D W. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Current opinion in immunology* [Internet]. August 2020 [zitiert 16. November 2021];

