



Der Weg des Biotechnologieunternehmens CureVac Das Potenzial der mRNA-Technologie

SIMONE GIESLER

Angelo Esslinger auf
www.pixabay.com

Das Botenmolekül mRNA gezielt in RNA-Impfstoffen für medizinische Zwecke einzusetzen, ist zurzeit zentrales Forschungsbereich vieler Firmen. CureVac hat als weltweit erstes Unternehmen eine neue Technologieplattform auf mRNA-Basis entwickelt, die in der Corona-Pandemie die Welt verändert. Dabei ist die Bekämpfung von Infektionskrankheiten aber nur eines von vielen Zielen, die mittlerweile eine ganze Reihe von Biotech-Firmen verfolgen. Doch was steckt hinter der mRNA-Technologie?

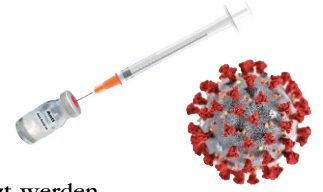
Ein Labor der Tübinger Universität im Jahr 1999: Ein Doktorand vermutet eine Verwechslung in seinem Experiment und wiederholt es. Er injiziert Mäusen ein Stück DNA, um herauszufinden, ob die Mäuse das kodierte Protein herstellen würden. Als Antigen könnte es, so sein Gedankenspiel, das Immunsystem aktivieren, um etwa Krebs zu bekämpfen. Dann der Moment: Ingmar Hoerr entdeckt beim erneuten Versuch, dass auch die Negativkontrolle, nackte und unverpackte RNA, eine Immunreaktion auslöst – noch dazu stärker als die DNA. Obwohl RNA schnell abgebaut wird, war sie offensichtlich stabil genug,

um in Zellen einzudringen und eine Reaktion hervorzurufen.

Das war ein Paradigmenwechsel, denn bis dato galt RNA als instabil und somit therapeutisch wertlos. Während DNA in Eukaryoten weitgehend geschützt im Zellkern liegt, befindet sich das Botenmolekül messenger RNA (mRNA) im Cytosol – und ist den dort anwesenden Enzymen ausgesetzt. Zudem wird mRNA von Natur aus relativ schnell abgebaut. Das ist wichtig, denn so lässt sich die Menge an Protein, die daraus gebildet wird, nach Bedarf posttranskriptionell steuern – ein natürlicher Regulationsmechanismus der Zelle. Die Entdeckung ließ Hoerr und seine CureVac-Mitgründer fortan an der Vision festhalten, dass modifizierte mRNA das Therapiemolekül der Zukunft sei. Im Jahr 2000 wurde der Grundstein für CureVac gelegt. Im gleichen Jahr wiesen die Gründer nach, dass Mäuse, denen man RNA als Bauplan für ein Modellantigen spritzte, sowohl Antikörper bildeten als auch T-Zellen anreicherten, die sich gegen dieses Protein richteten [1].

Starkes Fundament

Die Idee, RNA therapeutisch zu nutzen, hatte bereits die ungarische Biochemikerin Katalin Karikó in den 1990er Jahren. Heute gilt ihre Forschungsarbeit an der University of Pennsylvania als erster Wegbereiter für die neue Technologie. Damals jedoch musste sie bei ihrer Entwicklung eines Medikaments viele Rückschläge hinnehmen, wie zunächst auch Hoerr in Tübingen. Innovative Befunde mit dem Wissen um Zellen und Pathogene zu verknüpfen, ex-



perimentelle Strategien zu entwickeln und zu optimieren, die Überlegenheit gegenüber anderen Methoden nachzuweisen und Studien zu designen – all das gelingt nur mit einer gewissen Portion Unterstützung und Risikobereitschaft. Außerdem ist es eine große Hürde für die Entwicklung neuer Technologien, sich gegen etablierte Verfahren durchsetzen zu müssen. Erst durch die Investmentgesellschaft von Dietmar Hopp im Jahr 2006 konnte sich CureVac professionell aufstellen. Im weiteren Verlauf erfuhr das Unternehmen dann weitere Unterstützung [2].

Auch andere Unternehmen wie BioNTech und Moderna begannen, die mRNA-Technologie zu erforschen und zu entwickeln. Die Ziele aller Unternehmen sind dabei vielseitig: Entwicklung von prophylaktischen und therapeutischen Medikamenten gegen Krebs, Stoffwechselerkrankungen, seltene Krankheiten und Infektionen. Warum aber war vor der Corona-Pandemie noch kein mRNA-Medikament auf dem Markt? Die Gründe dafür liegen nicht nur in der langwierigen Grundlagenforschung und dem zögerlichen Interesse von Kapitalgebern. Vielmehr legten die Forschungsunternehmen, wie auch CureVac, zunächst großen Fokus auf Therapieoptionen gegen Krebs, einer bekanntlich komplexen Erkrankung, bei der viele Faktoren einfließen – schließlich sind jeder Krebs und jeder Patient anders. Verglichen damit ist die Entwicklung eines Impfstoffkonstrukts relativ einfach, vor allem mit dem mittlerweile riesigen Erfahrungsschatz über die mRNA-Technologie. So hat CureVac einen Impfstoffkandidaten gegen das Tollwutvirus entwickelt, mit bahnbrechenden Erkenntnissen: In den 2017 veröffentlichten Daten zur Phase-I-Studie konnte erstmals ein Anstieg funktioneller Antikörper gegen virale Antigene, in diesem Fall Glykoprotein RABV-G des Tollwutvirus, gezeigt werden [3]. Das dadurch erworbene Know-how zu Design und Formulierung durch Nanopartikel konnte in weitere Wirkstoffentwicklungen einfließen [4] – so auch für den Corona-Impfstoff (Abbildung 1).

CureVac ist etwas später in die klinische Studie und damit auch in die entscheidende Phase 3 eingestiegen: Im Gegensatz zu den Studien von Moderna und BioNTech, die auf Daten mit dem Wildtyp-Virus beruhen, fand sich bei den CureVac-Studien bereits eine Vielfalt mit über 15 Virusvarianten des Coronavirus vor. In einer finalen Analyse der Phase 2b/3-Studie [5] wurde nur eine reduzierte Wirksamkeit des Impfstoffs CVnCoV nachgewiesen, was die Wichtigkeit der Anpassung des Impfstoffs an Varianten unterstreicht. So könnte ein an aktuelle Varianten angepasstes CureVac-Vakzin auch interessant für Booster-Impfungen werden. Die Entwicklung der mRNA-Impfstoffe, die auf einer mittlerweile über 20-jährigen Expertise gründet, ist in Rekordzeit verlaufen und wird fortlaufend optimiert. Doch was macht die mRNA-Technologie so besonders?

Die Wirkweise von mRNA-Therapeutika

Applizierte mRNA soll menschliche Körperzellen anleiten, die darauf kodierten Proteine herzustellen. Wichtig dabei

ist, für welchen Zweck der Wirkstoff eingesetzt werden soll. Anders als bei Impfstoffen soll die Therapie seltener Erbkrankheiten keine Immunzellarmada und Antikörperproduktion auslösen. So unterscheiden sich die Transportsysteme und Applikationsarten für Impfstoffanwendungen von solchen, die für molekulare Therapien eingesetzt werden. Viele seltene genetische Erkrankungen beruhen auf defekten oder fehlenden intrazellulären oder membranständigen Proteinen und lassen sich bisher nicht mit rekombinant hergestellten Proteinen behandeln. CureVac arbeitet an Strategien, physiologische Mengen an Protein wiederherzustellen, um so beispielsweise hepatische genetische Erkrankungen heilen zu können.

Anders sieht es bei der Krebsimmuntherapie aus, die einige mRNA-Hersteller verfolgen: Hier wird eine Art „Fahndungsfoto“ über die Krebszelle eingeschleust, um den Immunzellen klarzumachen: „Das ist der Feind und dieser muss bekämpft werden“, obwohl es sich dabei um körpereigene Zellen handelt. Dazu muss zunächst das Erbgut der Krebszellen vollständig sequenziert werden, um bestimmte Strukturen auf der Oberfläche der Tumorzelle zu identifizieren und optimierte mRNA gegen diese Merkmale für die Impfung herzustellen. Zusätzlich zur



ABB. 1 GMP-konforme Impfstoffproduktion bei CureVac, Tübingen.

Foto: CureVac AG.

IN KÜRZE

- Mit der mRNA-Technologie lassen sich **prophylaktische und therapeutische Therapien** gegen Krebs, Stoffwechselerkrankungen, seltene Krankheiten und Infektionskrankheiten entwickeln.
- mRNA-basierte Wirkstoffe lassen sich vergleichsweise **einfach herstellen** und effizient anpassen.
- Impfstoffe auf mRNA-Basis benötigen keine Adjuvantien und werden **schnell und rückstandslos im Körper abgebaut**. Sie gelangen nicht in den Zellkern und können nicht ins Genom integriert werden.

Tumorvakzinierung gibt es ein weiteres Therapieprinzip, die Immunmodulation. Hierbei greifen spezifische RNA-Konstrukte die Krebszellen direkt an und verändern gezielt die Umgebung des Tumorgewebes, um das Immunsystem auf den Tumor auszurichten. CureVac testet hier beispielsweise einen Wirkstoff bei progressivem Melanom in einer fortgeschrittenen Phase-1-Studie [6]. Mit dem Wissen über typische Merkmale, die sich von Tumor zu Tumor und Patient zu Patient unterscheiden, könnte die mRNA-Plattform zukünftig maßgeschneiderte Therapien bieten, um zielgenauer als Strahlen- oder Chemotherapie und aufgrund der kurzen Halbwertszeit der RNA mit geringeren Nebenwirkungen diverse Tumore zu bekämpfen.

Bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten werden Informationen über den Erreger genutzt. Um Immunzellen eine echte Infektion vorzugaukeln, reicht es aus, ihnen die Struktur von Erregerbestandteilen zu präsentieren. Gewünscht ist eine möglichst komplette und gleichzeitig ausgewogene Immunantwort. Das angeborene Immunsystem nutzt zum Kampf gegen die Erreger sowohl die schnellen, jedoch unspezifischen Abwehrmechanismen von Monozyten, Makrophagen („Fresszellen“) und dendritischen Zellen als auch das verzögert, aber sehr spezifisch reagierende adaptive Immunsystem. Bei der Impfung sollen idealerweise beide Sys-

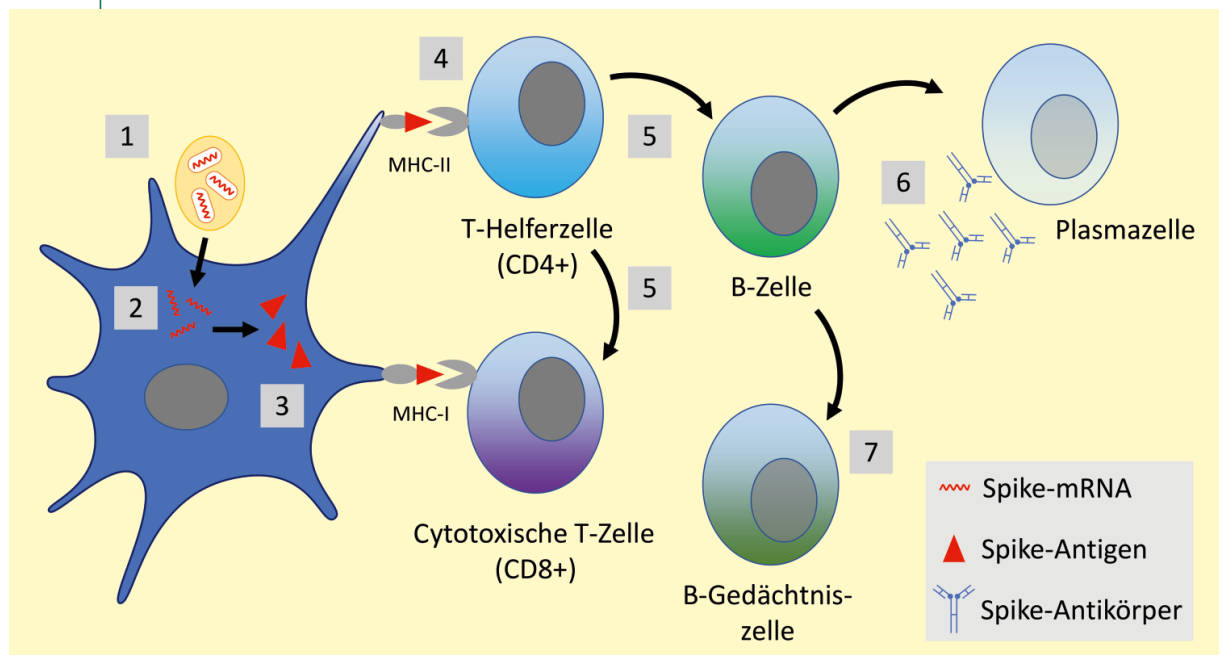
teme angeregt und sowohl Antikörper als auch T-Zellen gebildet werden.

Ausbalanciert und umfassend – das Wunschpaket am Beispiel COVID-19

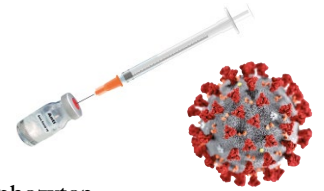
Bei Infektionskrankheiten wie COVID-19 wünscht man sich, das Immunsystem im Rahmen einer aktiven Immunisierung in Stellung zu bringen, um das Virus unschädlich zu machen. Im Fokus steht dabei die Bildung neutralisierender Antikörper, die an die Viruspartikel binden und sie daran hindern, eine Zelle effektiv zu infizieren. Vor allem bindende Antikörper, die sich gegen die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des Spike-Proteins richten, sollen dabei auf den Plan rücken.

Eine gute Immunantwort verknüpft Mechanismen sowohl auf humoraler Ebene, also basierend auf freien Antikörpern, als auch auf zellulärer Ebene. So aktivieren bestimmte T-Helfer-Zellen ($CD4^+$ -Lymphozyten) B-Zellen, damit diese spezifische Antikörper produzieren. Außerdem helfen sie Makrophagen, aufgenommene Virus- oder Zellfragmente unschädlich zu machen. Cytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ -Lymphozyten) töten infizierte Zellen, während regulatorische T-Zellen harmonisch ins Geschehen einwirken und entzündliche Immunantworten unterdrücken. Um keinen Cytokinsturm und somit übermäßige Entzündungen hervorzurufen und gleichzeitig eine effek-

ABB. 2 | WIRKUNGSWEISE VON mRNA-IMPSTOFFEN.



Nach der Aufnahme des Wirkstoffs (1) in die Antigen-präsentierende Zelle (APC) wird die mRNA freigesetzt (2) und an den Ribosomen das kodierte Antigen in seiner nativen Form exprimiert und zu antigenen Peptiden prozessiert (3). Die APCs präsentieren die Antigene im Lymphknoten über MHC-I-Oberflächenmoleküle an $CD8^+$ -T-Zellen bzw. nach Aufnahme und Prozessierung von bereits exprimierten, extrazellulären Antigenen über MHC-II-Oberflächenmoleküle an $CD4^+$ -T-Zellen (4). Dies führt zur Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen und unterstützt die Differenzierung von B-Zellen (5) zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (6) sowie B-Gedächtniszellen (7). Grafik: P. Eitner, adaptiert von S. Giesler.



tive Immunität zu fördern, ist eine Ausgewogenheit der Immunantwort wichtig. Ein entscheidender Aspekt in der Impfstoffentwicklung ist, dass jedes verwendete Antigen die Bildung einer ausgewogenen Menge an Helferzellen TH1 und TH2 sowie regulatorischen T-Zellen auslöst.

Im Falle von CVnCoV, dem COVID-19-Impfstoff von CureVac, sieht das so aus (Abbildung 2): Der Impfstoff enthält den Bauplan für das Spike-Protein, einem Oberflächenprotein von SARS-CoV-2. Nach Injektion in den menschlichen Muskel gelangt der Wirkstoff in Körperzellen, vor allem Muskel- und Immunzellen. Immunzellen sind hier die Antigen-präsentierenden Zellen, die nach der Impfung aus anderen Orten in die Injektionsumgebung wandern. In den Muskel- und Immunzellen werden die Untereinheiten des Spike-Proteins an den Proteinfabriken, den Ribosomen, gebildet und zusammengesetzt. Sowohl komplette Spike-Proteine als auch Fragmente davon werden dann an der Oberfläche von Immunzellen in der Injektionsumgebung präsentiert oder als freies Protein abgegeben. Die Präsentation der Proteinfofragmente erfolgt über die Bindung an den Haupthistokompatibilitätskomplex der MHC-Klasse-I, die jede Körperzelle auf der Oberfläche trägt. Wie Detektive scannen $CD8^+$ -T-Zellen die Zelloberflächen. Treffen sie auf eine Körperzelle, die ein fremdes Fragment auf dem MHC-I-Komplex präsentiert, zerstören sie die Zelle.

Dendritische Zellen, eine bestimmte Immunzellklasse, können extrazelluläre, frei zirkulierende Antigene aufnehmen, die beispielsweise beim Zerfall von Spike-Proteinbildenden Zellen freigesetzt werden, und über Proteine der MHC-Klasse-II den $CD4^+$ -T-Zellen präsentieren. Werden B-Zellen von diesen T-Helferzellen aktiviert, beginnen sie sich zu teilen – mit großem Effekt: Ein Teil wandelt sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen um, die restlichen B-Zellen werden zu Gedächtniszellen. Bei einer erneuten Infektion des Körpers mit SARS-CoV-2 können sich die B-Gedächtniszellen viel schneller zu Plasmazellen umwandeln und so Antikörper ausschütten, die gegen das Spike-Protein gerichtet sind. Die freigesetzten Antikörper heften sich an die Coronavirus-Spikes, markieren das Virus sozusagen als „freigegeben zur Zerstörung“ und hindern es daran, mit seinen Spikes an andere Zellen zu binden. Die enge Verzahnung der Immunabwehr auf Antikörper- und T-Zell-Basis wird hier deutlich. Beide Faktoren – Bildung der B-Gedächtniszellen sowie der $CD8^+$ -T-Zellen – stellen einen wichtigen Langzeitschutzfaktor vor einer Infektion dar.

CureVac zeigte in präklinischen Studien, dass CVnCoV eine umfassende Immunantwort auslöst und konnte dieses Ergebnis nachfolgend in den ersten klinischen Phasen bestätigen [7, 8]: Demnach ließen sich hohe Titer an Antikörpern nachweisen, die das Spike-Protein und insbesondere die spezifische Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des Spike-Proteins erkannten, ebenso wie hohe Titer an virusneutralisierenden Antikörpern sowie an T-Zellen, da-

runter sowohl $CD4^+$ - als auch $CD8^+$ -T-Lymphozyten. $CD8^+$ -T-Zellen werden zwar erst aktiv, nachdem ein Virus in den Körper eingedrungen ist, aber sie sind wichtig, um eine laufende Infektion zu bekämpfen und schwere Verläufe zu vermeiden [9]. Wenn T-Zellen in der Lage sind, die infizierten Zellen abzutöten, bevor sie sich in den oberen Atemwegen ausbreiten, könnte dies die Übertragung des Virus einschränken, indem es die Viruslast in einer infizierten Person reduziert. Die Bedeutung der T-Zell-Immunität beim Auftreten von Mutationen im viralen Erbgut haben weitere Forschergruppen in Blutanalysen untersucht [10]. Sie konnten zeigen, dass die $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zell-Antworten bei COVID-19-Genesenen und Probanden, die mit mRNA-Impfstoffen von Moderna oder BioNTech/Pfizer geimpft waren, durch die in den SARS-CoV-2-Varianten gefundenen Mutationen nicht wesentlich beeinflusst werden.

In präklinischen Studien zeigte sich, dass die geimpften Tiere nach einer Belastungsinfektion eine verringerte virale Belastung in den oberen Atemwegen, also dem Nasen- und Rachenraum, aufwiesen. In den unteren Atemwegen, der Lunge, war das Virus überhaupt nicht nachweisbar [7]. Auch das angeborene Immunsystem wurde aktiviert, was anhand der Toll-ähnlichen-Rezeptoren (Toll-like Receptor, TLR) nachgewiesen wurde. Die TLRs auf Monozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen erkennen und binden virale Bestandteile, aktivieren die Abwehrzellen und führen u. a. zur Ausschüttung von Interferon. TLRs stimulieren aber nicht nur unspezifische Abwehrmechanismen, sondern stellen auch die Weichen für spezifische Immunreaktionen und des immunologischen Gedächtnisses. So können dendritische Zellen, die TLRs synthetisieren, auch B- und T-Lymphozyten aktivieren.

Eine vollständige und ausgewogene Immunreaktion mit der Ausbildung eines Immungedächtnisses ist der Traum jeder Impfstoffentwicklung. Doch wie schafft man es, dass die fragile RNA überhaupt lange genug für die Produktion des Antigens im Organismus zur Verfügung steht, bevor sie restlos abgebaut wird?

Der Code als Schlüssel

Die Reise reiner RNA im Blut der Geimpften wäre durch Enzyme und Makrophagen, die freie RNA aufnehmen können, schnell beendet. Selbst durch Trägerviren eingeschleuste RNA kann nach dem Verschmelzen mit der Zellmembran als Eindringling erkannt und entsorgt werden. Die Entwickler von mRNA-basierten Therapeutika haben deshalb verschiedene Methoden zur Stabilisierung ihrer RNA-Konstrukte entwickelt. Grundlage für den COVID-19-Wirkstoff ist das Spike-Protein, das mit dem humanen Angiotensin-konvertierenden Enzym 2 (ACE2) interagiert und sich so Zutritt in die menschliche Zelle verschafft. Dabei passt das Spike-Protein wie ein Schlüssel zum Schlüssellock an seinen Rezeptor, das ACE2-Protein, bindet darüber an die Oberfläche von ACE2-tragenden

Zellen und kann anschließend von diesen aufgenommen werden. Diesen Eintrittsmechanismus konnte man bereits durch die verwandten Coronaviren SARS-CoV und MERS-CoV [11–13]. Außerdem konnte durch den Abgleich mit den Genomsequenzen bekannter Coronaviren bereits im Januar 2020 die komplette DNA-Sequenz des neuen Coronavirus entschlüsselt werden. Auf Genomebene unterscheidet es sich nur in wenigen Bereichen von seinen Verwandten. Ohne dieses Vorwissen hätte es möglicherweise Jahre gedauert, das angreifbare Target für SARS-CoV-2 zu finden.

Das Spike-Protein ist ein Komplex aus drei Monomeren. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen, S1 und S2, die getrennt voneinander wirken, um die virale Bindung bzw. Fusion an die Wirtszellmembran zu vermitteln. Im natürlichen Infektionsverlauf bringt sich das Spike-Protein in eine für den ACE-Zellrezeptor passende Form: Die Fusion mit der Membran durch S1 führt zu einer Konformationsänderung, zur Spaltung der S1- und S2-Domänen und schließlich zur Aufnahme des Virus in die Zelle und zu seiner Vermehrung [14–16]. Die 3D-Struktur des Spike-Proteins vor der Fusion und damit vor dem Eintritt in die Zelle wurde als Target ins Visier genommen. So sollten Angriffsziele für neutralisierende und Domänen-bindende Antikörper gefunden werden. CureVac wählte für seinen mRNA-Impfstoff die gesamte Länge des präfusionsstabilisierten Spike-Proteins mit intakter S1/S2-Spaltstelle und Transmembrandomäne aus. Zwei eingeführte Mutationen stabilisieren diese Proteinkonformation rein sterisch; auch hier nutzte man Vorwissen über MERS-CoV und SARS-CoV [17, 18]. Es wurden die Codons zweier Aminosäuren ausgetauscht, um an diesen Stellen jeweils die Aminosäure Prolin statt Lysin bzw. Valin einzubauen.

Der künstlich hergestellte DNA-Strang dient als Schablone, von der ausgehend die mRNA erstellt wird. Im Unterschied zu DNA ist RNA von Natur aus instabil: So fehlt dem Nucleotid Uracil, das in RNA anstelle von Thymin vorkommt, die schützende Methylgruppe, und der Zuckerbestandteil Ribose besitzt eine reaktivere freie Gruppe und ist somit schneller abbaubar als die Desoxyribose der DNA. Zur Stabilisierung der künstlichen mRNA kommen herstellereigene Feinheiten der Rezeptur ins Spiel, bei der jeder auf Erfahrungen aufbaut. BioNTech und Moderna setzen bei ihrer COVID-19-Plattform-Technologie auf chemisch modifizierte Nucleotide, die vor frühzeitiger Erkennung und Inaktivierung der fremden RNA durch Immunzellen schützen sollen, CureVac hingegen verwendet natürliche mRNA.

Eine wichtige Rolle spielt die Wahl des Codons für die Kodierung einer bestimmten Aminosäure. So macht man sich für das Design des Impfstoffs zunutze, dass viele Aminosäuren von mehr als einem Codon kodiert werden, wobei vor allem die dritte Base des Triplets oft variabel ist. Man kann deshalb bei der Konstruktion der mRNA das dritte Nucleotid im Codon an einigen Stellen austauschen,

ohne dass sich dadurch die kodierte Aminosäure verändert – eine Vorgehensweise, die als Codon-Optimierung bezeichnet wird. Dadurch lässt sich z. B. der Anteil an Guanin und Cytosin steigern, wodurch die Stabilität der mRNA und somit auch die Syntheserate des Proteins erhöht werden. Weiterhin gibt es Sequenzabschnitte in der mRNA, die nicht in Protein übersetzt werden, sondern regulatorische oder immunogene Funktionen ausüben [19]. Hieraus ergibt sich ein riesiger Baukasten zur Optimierung des Designs der mRNA.

Geschützt unterstützt: Das RNA-Konstrukt am Beispiel des COVID-19-Impfstoffs

An beiden Enden erhält die Impfstoff-mRNA für das Spike-Protein (Abbildung 3) zusätzliche Nucleotide, die u. a. vor Enzymen und Angriffen des Immunsystems schützen. Die CAP-Struktur am 5'-Ende jeder natürlichen mRNA markiert die RNA als „aus dem Zellkern stammend“ und verhindert dadurch Abwehrreaktionen der Körperzellen. Am anderen Ende der RNA befindet sich ein sogenannter 3'-Poly-A-Schwanz, der vor frühzeitigem Abbau schützt und ebenfalls in fast jeder zellulären mRNA vorhanden ist. Wie diese beiden Enden wird auch die sogenannte 5'-untranslatierte Region nicht in Protein übersetzt. Sie ist die Bindestelle für Proteine, welche die Stabilität der mRNA oder deren Translation beeinflussen, und reguliert den Start der Übersetzung in Protein. Dieser regulatorische Abschnitt wurde anhand von bereits gewonnenen Erfahrungswerten weiter optimiert, um nicht als fremd erkannt zu werden und um die Expression positiv zu beeinflussen. Am anderen Ende bestimmt die 3'-untranslatierte Region die Stabilität und die Translationseffizienz einer mRNA.

In der Mitte der mRNA befindet sich das Herzstück, der offene Leserahmen (*Open-Reading-Frame*), der das gewünschte Protein kodiert, und wie oben beschrieben, durch Codon-Optimierung verändert werden kann. Die beiden gezielten Aminosäureaustausche, bei denen ein Lysin und ein Valin jeweils gegen Prolin ersetzt wurden, verbessern die Impfwirkung erheblich. Denn durch sie wird die Struktur des Spike-Proteins nachgebildet, wie sie im natürlichen anfänglichen Infektionsverlauf vor Bindung an ACE2 vorliegt. Die RNA erhält außerdem eine stärkende Startsequenz (Kozak-Sequenz), damit sie in der Zelle bevorzugt abgelesen wird. Andere Impfstoffdesigns enthalten im *Open-Reading-Frame* einen Bereich, der für einen Replikase-Enzymkomplex kodiert. Die sogenannten selbst-amplifizierenden mRNAs bringen damit ein eigenes Enzym mit, das die Menge an produziertem Antigen erhöhen kann. Allerdings wird so die RNA insgesamt sehr groß. Für die COVID-Impfstoff-Formulierung hat sich derzeit das Konzept der nicht selbst-amplifizierenden mRNA bewährt. Um die Stabilität, Translationseffizienz und somit die Immunstimulation zu erhöhen, kann die mRNA modifiziert werden. Dabei werden die Uridinreste durch N1-Methylpseudouridin ersetzt. Während dieses Konzept BioNTech und Moderna für ihre COVID-Impfstoffe verfolgen, hat



CureVac beim Wirkstoff CVnCoV aufgrund vorangegangener Erkenntnisse bisher auf unmodifizierte mRNA gesetzt.

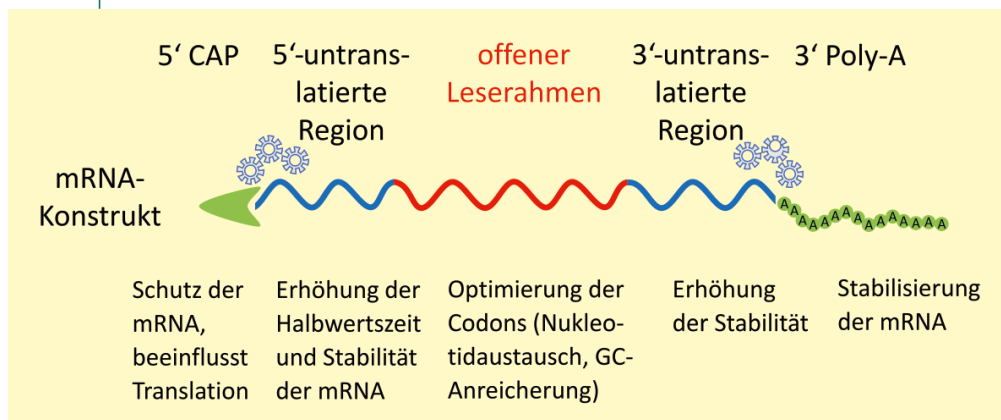
CureVac konnte in den Studien [7] zeigen, dass die CVnCoV-mRNA-Moleküle, so wie die zahllosen, natürlich vorkommenden RNA-Moleküle in unseren Zellen, in Protein übersetzt werden, das wiederum nachträglich gespalten und modifiziert wird. Die anschließende Präsentation des viralen Proteins auf der Oberfläche von Körperzellen ahmte eine Infektion nach. Die Feinheiten im Aufbau der mRNA und in ihrer Aufbereitung haben einen entscheidenden Einfluss darauf, wie gut die Übersetzung in Proteine funktioniert. Hier baut jeder Hersteller auf eigene Erfahrungen auf. Für CVnCoV hat CureVac anhand vielversprechender Ergebnisse aus den präklinischen sowie Phase 1/2-Studien eine Wirkstoffmenge von nur 12 µg pro Dosis eingesetzt, mit der eine optimal ausbalancierte Immunantwort erreicht werden sollte. Der Wirkstoff von BioNTech enthält pro Dosis 30 µg mRNA, der von Moderna 100 µg. Die Aufbereitung der RNA hat möglicherweise auch Einfluss auf die Lagerfähigkeit. Wie schon für ihren Tollwut-Impfstoffkandidaten CV7202 konnte CureVac auch für CVnCoV eine Stabilität über mehrere Monate bei +5 Grad Celsius zeigen. Die Lagerfähigkeit kann aber auch durch einen weiteren Parameter beeinflusst werden: die Verpackung.

Verpackung mit Wirkung

Es gibt verschiedene Methoden, mRNA in die Zellen zu bringen. Als am vielversprechendsten für die Formulierung von mRNA-basierten Impfstoffen haben sich derzeit Lipid-Nanopartikel (LNP) erwiesen. Einkapselt in derartige Vesikel gelangt die mRNA vor Enzymen oder pH-Wert-Änderungen geschützt durch die Zellmembran in die Zelle. Die verpackten RNA-Moleküle dürfen jedoch keinen Abwehrsturm des Immunsystems hervorrufen. Deshalb sind die Partikel auf einer Lipidbasis aufgebaut, die der Zellmembran ähnlich ist [20].

Nach der Impfung binden die positiv geladenen Nanopartikel an die negativ geladenen Zellmembranen, die sich daraufhin einstülpen und das Nanopartikel in die Zelle aufnehmen. Einerseits muss die RNA zu ihrem Schutz zunächst gut an den Nanopartikel binden, andererseits muss sie sich in der Zelle auch wieder gut vom Partikel lösen, um dort translatiert werden zu können. Dies ist eine Gratwanderung, bei der eine optimale Zusammensetzung der Nanopartikel gefunden werden muss. Auch diese Formu-

ABB. 3 | OPTIMIERUNG VON mRNA-IMPFSTOFFEN



Die mRNA wird durch In-vitro-Transkription erhalten; als Matrize dient einzelsträngige DNA des gewünschten Genabschnitts. Für den COVID-19-Wirkstoff (CVnCoV) verwendet CureVac natürliche, nicht chemisch modifizierte Nukleotide. Der offene Leserahmen (ORF) kodiert für das gewünschte Protein, im Fall von CVnCoV für das Spike-Glykoprotein von SARS-CoV-2. Die Sequenz des ORF wird durch GC-Anreicherung optimiert und durch Nukleotidaustausche stabilisiert. Flankierende Elemente sind für die Funktion reifer mRNA wesentlich: Die 5'-Kappenstruktur mit einer modifizierten Form des Guanosins (7-Methylguanodin) schützt die RNA vor dem Abbau durch Nukleasen sowie vor Abwehrreaktionen der Zelle und ist für den Translationsstart wichtig. Die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) erhöhen die Halbwertszeit und Stabilität der mRNA und somit die Proteinexpression. Der Poly-A-Schwanz schützt die eukaryotische mRNA vor enzymatischem Abbau. Grafik: P. Eitner, adaptiert von S. Giesler.

lierung ist eine Kernkompetenz der mRNA-Hersteller. LNPs enthalten in der Regel vier Komponenten: ein ionisierbares oder Aminolipid, Cholesterin, ein Phospholipid und ein lipidverankertes Polyethylenglykol.

Die Formulierung von CureVac, die von einem langjährigen Partner lizenziert wurde, hat sich bereits bei ihrem Tollwut-Vakzin bewährt: In ersten Phase-1-Studien konnte die Verträglichkeit nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde im Vergleich zur Injektion nackter RNA durch die schützende LNP-Formulierung mehr mRNA in die Zelle aufgenommen und dadurch die Immunreaktion durch Bildung von Antikörpern verbessert. Auf bereits optimierte Parameter wie Partikelgröße, Lipidkonzentration, mRNA-Gehalt und Verkapselung konnte für das Design des COVID-19-Impfstoffs bereits zurückgegriffen werden. Diese Kenntnisse waren sehr wichtig und beschleunigten die Entwicklung des Impfstoffs. Die Hersteller verwenden geringfügig unterschiedliche Formulierungen der LNP, was einen Einfluss auf Wirksamkeit und Stabilität des Impfstoffs haben kann. So kann die LNP-Formulierung zur guten Temperaturstabilität von CureVacs Impfstoff beitragen [20].

Chancen der mRNA-Technologie

Therapien auf mRNA-Basis haben viele Vorteile. So hinterlassen sie in der Zelle keine Rückstände, da RNA vollständig abgebaut wird. Auf verstärkende Zusätze, die Adjuvantien, kann bei mRNA-Impfstoffen gegen Infektionen verzichtet werden, da mRNAs eine gewisse „angeborene“ Stimulationsfunktion haben und bereits in niedrigen Do-



ABB. 4 RNA Printer® von CureVac. Foto: CureVac AG.

sen wirken. Auch lässt sich eine hohe Sicherheit erwarten, da Fremdanteile fehlen, wie sie bei abgetöteten oder lebend-attenuierten (abgeschwächten) Impfstoffen vorkommen. Totimpfstoffe aus abgetöteten Erregern lassen sich zwar einfach herstellen, doch kann hier das Immunsystem nicht immer ausreichend aktiviert werden – in einigen Fällen wird sogar der Viruseintritt in die Zelle unterstützt. Dieses Phänomen, *Antibody-dependent enhancement* (ADE), konnte in den Studien der mRNA-Wirkstoffe bisher nicht beobachtet werden.

Lebendimpfstoffe zeigen meist eine gute Wirksamkeit, erfordern aber aufwendige Kultivierungs- und Herstellungsverfahren. Im Vergleich dazu lassen sich genetische Impfstoffe einfach, schnell und kostengünstig herstellen. Gegenüber DNA-Impfstoffen haben Konstrukte auf RNA-Basis den Vorteil, dass RNA-Moleküle im Zellplasma verbleiben und nicht das – wenn auch geringe – Risiko bergen, ins Wirtsgenom eingebaut zu werden. Auch können Zellen RNA nicht in DNA umwandeln, da der menschliche Körper in der Regel keine Enzyme dafür besitzt. Retroviren wie HIV besitzen zwar solche Reversen Transkriptasen, doch können diese spezifisch nur die eigene Virus-RNA ablesen. Die mRNA wird im Cytosol in Spike-Proteine übersetzt, die dann posttranslational modifiziert werden. Im Cytosol kommt es nicht zum Spleißen – dieses Herausschneiden von nicht-kodierenden Abschnitten geschieht nur im Zellkern. Somit existiert bei mRNA-Wirkstoffen keine Gefahr unerwünschter Spleißvorgänge, die kürzere lösliche Proteinvarianten hervorbringen und möglicherweise Nebenwirkungen verursachen könnten.

Die lange Erfahrung mit der mRNA-Plattform bietet eine stabile Basis für weitere Ansätze zur Entwicklung von Therapeutika. Da die Eigenschaften des Impfstoffs unab-

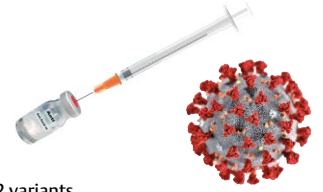
hängig von den kodierten Proteinen sind, kann die Entwicklung verschiedener Wirkstoffe erfolgen, ohne dass neue Produktions-, Reinigungs- und Validierungsmethoden sowie Produktionsanlagen eingerichtet werden müssen. Wie die jüngsten Ausbrüche von schweren Infektionen wie Ebola, Zika, SARS, MERS und nun auch SARS-CoV-2 zeigen, sind schnell entwickelbare, effektive und sichere Impfstoffe notwendig. Impfstoffe auf mRNA-Basis könnten sich deshalb unter Pandemiebedingungen als Mittel der Wahl herausstellen. Zudem lassen sich die Konstrukte schnell anpassen – ein wichtiger Aspekt, gerade im Hinblick auf Virusvarianten. So lassen sich Impfstoffe der nächsten Generation [21] produzieren und skalieren, beispielsweise um T-Zellen effektiv zu stimulieren. Aber auch die Krebs-

therapie wird von der Flexibilität profitieren, da die Sequenzen der mRNA-Impfstoffe schnell verändert und angepasst werden können, wenn sich ein Tumor verändert. Diese maßgeschneiderte und personalisierte Therapie ist eine Schlüsseldisziplin der Medizin.

Als eine weitere Innovation baut CureVac gemeinsam mit Tesla Automation sogenannte mRNA-Printer. Dabei handelt es sich um vollautomatisierte und mobile Produktionseinheiten, die weltweit aufgestellt werden und ein mRNA-Konstrukt innerhalb weniger Tage produzieren können (Abbildung 4). Die Ausgangsmaterialien sind hauptsächlich Enzyme, Nukleotide und Pufferkomponenten. Die künstlich synthetisierte DNA wird amplifiziert und dient als Matrize für die RNA-Produktion. Es folgen Reinigungs- und Filtrationsschritte, bevor die Produkte in Einwegbeutel abgefüllt und zu Anwendungseinheiten aliquotiert werden. Unterstützt wird CureVac dafür bereits seit Anfang 2019 durch die Koalition für Innovationen zur Vorsorge vor Epidemien (CEPI). Ursprünglich war geplant, den RNA-Drucker zur Produktion von Impfstoffen gegen Tollwut, Lassa-Fieber und Gelbfieber zu entwickeln [22]. Das Potenzial ist klar: Hier entstehen flexible Plattformen zur Herstellung personalisierter Medizin im Krankenhausumfeld bis hin zur schnellen Versorgung mit Impfstoffen vor Ort in Epidemie-Ausbruchsregionen.

Zusammenfassung

Die mRNA-Technologie lässt eine neue Produktklasse in der Medizin entstehen, mit der gegen Infektionserkrankungen prophylaktisch und gegen viele Krebsarten therapeutisch geimpft werden kann sowie seltene Krankheiten bekämpft werden können.



Summary

The potential of mRNA technology

mRNA technology is giving rise to a novel class of medical products that can be used to prophylactically vaccinate against infectious diseases and therapeutically vaccinate against many types of cancer, as well as to combat rare diseases.

Schlagworte:

mRNA, COVID, SARS, Immunonkologie, Impfstoffe, Infektionskrankheiten

Angaben zu Interessenskonflikten:

Die Autorin bestätigt hiermit, dass keinerlei Interessenskonflikte bestehen sowie dass CureVac weder aktiv an der Entstehung des vorliegenden Artikels beteiligt war, noch diesen finanziert hat.

Literatur

[1] I. Hoerr et al. (2000). In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *European Journal of Immunology* 30, 1–7.

[2] I. Hoerr (2017). A successful founder off the beaten path. *Nature Biotechnology* 35, 900–903.

[3] M. Alberer et al. (2017). Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *The Lancet* 390, 1511–1520.

[4] A Study to Assess the Safety, Reactogenicity and Immune Response of CureVac’s Candidate Rabies mRNA Vaccine in Healthy Adults. *Clinical Trials.gov*: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03713086>

[5] Pressemitteilung CureVac, 30. Juni 2021. <https://www.curevac.com/2021/06/30/curevac-daten-der-finalen-analyse-der-phase-2b-3-studie-fuer-cvncov-den-impfstoffkandidaten-der-ersten-generation-zeigen-schutzwirkung-in-altersgruppe-von-18-bis-60-jahren/>

[6] CureVac erweitert Phase 1-Studie seines RNA-Kandidaten CV8102 beim fortgeschrittenen Melanom. Pressemitteilung CureVac, Feb. 2021. <https://www.curevac.com/2021/02/04/curevac-erweitert-phase-1-studie-seines-rna-kandidaten-cv8102-beim-fortgeschrittenen-melanom/>

[7] mRNA based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus neutralizing antibodies and mediates protection in rodents. Feb 2021. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.0.10.23.351775v2>

[8] Phase 1 Assessment of the Safety and Immunogenicity of an mRNA- Lipid Nanoparticle Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2 in Human Volunteers. *medRxiv* Nov 2020. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.09.20228551v1>

[9] M. E. Schmidt, S. M. Varga (2018). The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Front Immunol* 9, 678.

[10] A. Tarke et al. (2021). Negligible impact of SARS-CoV-2 variants on CD4+ and CD8+ T cell reactivity in COVID-19 exposed donors and vaccinees, <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.27.433180v1.full.pdf>

[11] W. Li et al. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454.

[12] M. Hoffmann et al. (2020). Pohlmann. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell* 78, 779–784 e775.

[13] M. Letko et al. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 5, 562–569.

[14] D. Wrapp et al. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260–1263.

[15] Y. Huang et al. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 41, 1141–1149.

[16] J. Shang et al. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 11727–11734.

[17] J. Pallesen et al. (2017). Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, E7348–E7357.

[18] R. N. Kirchdoerfer et al. (2018). Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. *Sci Rep* 8, 15701.

[19] G. Maruggi et al. (2019). mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases. *Mol Ther* 27, P757–772.

[20] S. Rauch et al. (2018). Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front Immunol* 9, 1963. *Clinical-Trial-Protocol-of-Phase-2b_3_CVnCoV.pdf*

[21] CV2CoV, an enhanced mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate, supports higher protein expression and improved immunogenicity in rats. https://www.curevac.com/wp-content/uploads/2021/05/20210513_PR_CV2CoV_Rat_Data_DE_Final.pdf

[22] Impfstoffe aus dem Drucker. Bundesministerium für Bildung und Forschung, <https://www.bmbf.de/de/impfstoffe-aus-dem-drucker-8003.html>

Verfasst von:



Simone Giesler ist Diplom-Biologin und hat sich nach ihrer Forschungsarbeit in einem Biotechnologieunternehmen und Presse- und Öffentlichkeitsarbeit am Universitätsklinikum Heidelberg selbstständig gemacht. Sie arbeitet als Redakteurin und Autorin für Bildungsmedien und Fachpublikationen.

Korrespondenz:

Simone Giesler
Eichenweg 7
69207 Sandhausen
Email: info@redaktion-text-idee.de