

Vom belächelten Aussenseiter zum weltweiten Hoffnungsträger

# Ausweg aus der COVID-19-Pandemie dank mRNA-Impfstoff

PD Dr. med. Steve Pascolo

Dermatologische Klinik, Universitätsspital Zürich

Das Editorial zu diesem Artikel finden Sie auf S. 112 in dieser Ausgabe.

Im Rennen um einen Impfstoff gegen SARS-CoV-2 hat sich das synthetische Messenger-RNA-(mRNA-)Format als das schnellste herausgestellt. Ausserdem erwies es sich als sicher und hocheffizient, selbst bei der sehr niedrigen Dosis von wenigen Mikrogramm pro Injektion.

## Einführung

Ribonukleinsäure (RNA) besitzt alle vier Charakteristika lebender Organismen (Geninformationen in definierten Strukturen enthalten, vervielfältigen und regulieren) und alle wurden zur Herstellung von Medikamenten genutzt:

1. RNA kann genetische Information enthalten und es damit dem Organismus ermöglichen, ein bestimmtes Protein herzustellen (Abb. 1); dieser Ansatz wird seit fast 30 Jahren für die Entwicklung von Impfungen optimiert [1] und hat mit dem Impfstoff gegen COVID-19 erstmals im Dezember 2020 eine Zulassung erreicht.
2. Die Bildung von dreidimensionalen Strukturen wie in Ribosomen oder anderen Ribonukleoprotein-Komplexen wird zur Erzeugung von Aptameren verwendet. Dies führte zur Entwicklung von Pegaptanib (Macugen®), einer 2'-Fluoro-Oligonukleotid-Struktur, die «vascular endothelial growth factor» (VEGF) bindet und blockiert, zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration.
3. RNA kann Enzymaktivität haben wie bei Ribozymen (diese Technologie wurde noch nicht in ein zugelassenes Medikament umgesetzt).
4. Kontrolle der Genexpression wie bei der microRNA (miRNA), die in ein Medikament («small interfering RNA» [siRNA]) umgewandelt wurde, das den Botenstoff Transthyretin abbaut und zur Behandlung der hereditären Transthyretin-Amyloidose eingesetzt wird.

Interessanterweise benötigt der Newcomer in dieser Liste der synthetischen RNA-Therapeutika, der Impfstoff gegen SARS-CoV-2 [2], bemerkenswert niedrige Dosen: zweimal 30 µg synthetische in vitro transkribierte Messenger-RNA (ivt mRNA), die in den Muskel

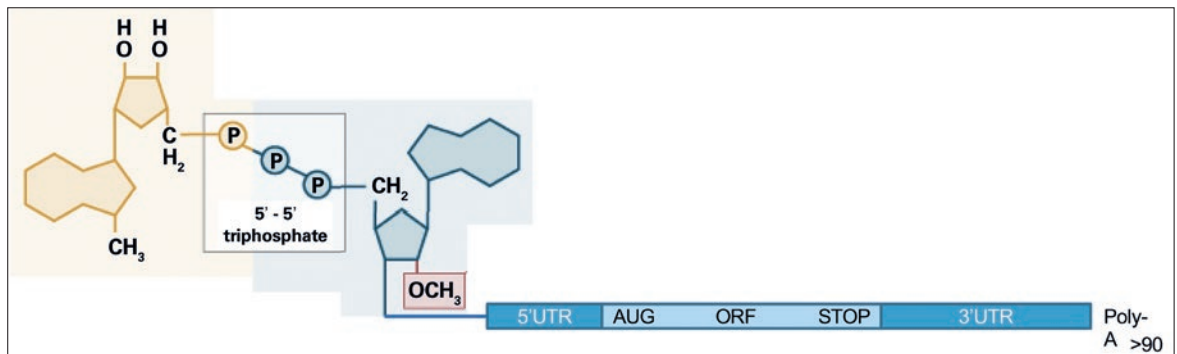
injiziert wird, während Macugen® in einer Dosis von 3000 µg alle sechs Wochen intravitreal und Patisiran (Onpattro®) in einer Dosis von bis zu 30 000 µg alle drei Wochen intravenös verabreicht werden. Diese sehr niedrige erforderliche Dosis des mRNA-Impfstoffs sowie seine Sicherheits- und Wirksamkeitsmerkmale machen ihn zu einem potenten Impfstoff, um die COVID-19-Pandemie zu bekämpfen. Unter dem Namen Comirnaty® (Tozinameran) wurde er am 19. Dezember 2020 in der Schweiz zugelassen.

## Geschichte der synthetischen nicht replizierenden mRNA-Impfstoffe

Die lange etablierten Impfstoffe gegen Gelbfieber, Masern, Mumps und Röteln sind eigentlich frühe Versionen von mRNA-Impfstoffen: Die zur Impfung verwendeten abgeschwächten Viren, die subkutan und ohne Adjuvans injiziert werden, geben ihr RNA-Genom in die Zellen des Wirts ab; diese infizierten Zellen produzieren die viralen Proteine, sie spüren die Gefahr und lösen eine Entzündung aus, die die Entwicklung einer Immunantwort ermöglicht. Genau die gleichen Mechanismen erklären die Funktionsweise der ivt-mRNA-Impfstoffe. Anstelle einer viralen Membran, die viele Komponenten (Lipide und Proteine) enthält, besteht die Hülle des ivt mRNA-Impfstoffs jedoch aus einem Liposom, das aus wenigen (meist vier) definierten Lipiden zusammengesetzt ist. Ausserdem enthält der ivt-mRNA-Impfstoff statt komplexer mRNAs, die für viele virale Proteine kodieren, eine einzige mRNA, die für ein (im Falle von nicht replizierenden mRNA-Impfstoffen) ausgewähltes Protein kodiert: ein Strukturprotein eines Infektionserregers, ein Allergen oder ein Tumorantigen zum Beispiel. Es gibt zwei Varianten von ivt-mRNA-Impfstoffen: nicht replizierende, die



Steve Pascolo



**Abbildung 1:** Struktur der in vitro transkribierten mRNA (ivt mRNA). Die mRNA beginnt mit einer Cap-Struktur, dann folgt eine untranslatierte Region (5'UTR) bis zum Startcodon. Zwischen Start- und Stoppcodon befindet sich die kodierende Sequenz. Danach kommen die 3'UTR und ein Poly-A-Schwanz.

nur das Antigen kodieren, und replizierende, die ein Antigen kodieren sowie eine RNA-Replikase, die die rekombinante mRNA vervielfältigt. Dieser Artikel konzentriert sich auf nicht replizierende ivt-mRNA-Impfstoffe, da dieses Format jetzt als Impfstoff gegen COVID-19 zugelassen wurde [2].

Die Möglichkeit, nicht replizierende ivt mRNA zur Herstellung von Impfstoffen zu verwenden, wurde erstmals 1993 von Martinon et al. beschrieben [3]: ivt mRNA, die für das Nukleoprotein (NP) des Influenzavirus kodiert und in Cholesterin/Phosphatidylcholin/Phosphatidylserin-Liposomen eingekapselt ist, führte zu NP-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in Mäusen, die den Impfstoff (12 µg in einem Prime-Boost-Schema) subkutan oder intravenös erhielten. Im Jahr 2000 publizierten Hoerr et al. [4], dass eine einmalige intradermale Injektion von 30 µg mRNA entweder nackt (in Kochsalzlösung) oder geschützt durch das kationische Peptid Protamin sowie die intravenöse Injektion von mRNA in einem Liposom eine Immunantwort gegen das kodierte Protein induzieren. Auf der Grundlage dieser Daten und einiger weiterer, die ich im Labor gewonnen hatte, gründeten wir im Jahr 2000 eine eigene Firma: CureVac. Bereits 2003 verabreichten wir Krebspatienten ivt-mRNA-Impfstoffe intradermal und mir selber (um die Funktionalität von ivt mRNA im Menschen zu testen) [5]. Die ersten Studien an Melanom- und Nierenzellkarzinompatienten deuteten darauf hin, dass die ivt-mRNA-Impfstoffformulierungen sicher sind, Immunantworten induzieren und klinische Reaktionen erzielen konnten [6–8]. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse konnte eine Phase-IIb-Studie, die die Wirksamkeit einer intradermalen ivt-mRNA-Vakzine als Monotherapie gegen Prostatakrebs untersuchte, keinen Nutzen zeigen für das progressionsfreie Überleben und die Mortalität insgesamt. Der Misserfolg ist jedoch nicht grundsätzlich auf den Impfstoff zurückzuführen (es wurde eine Immunantwort

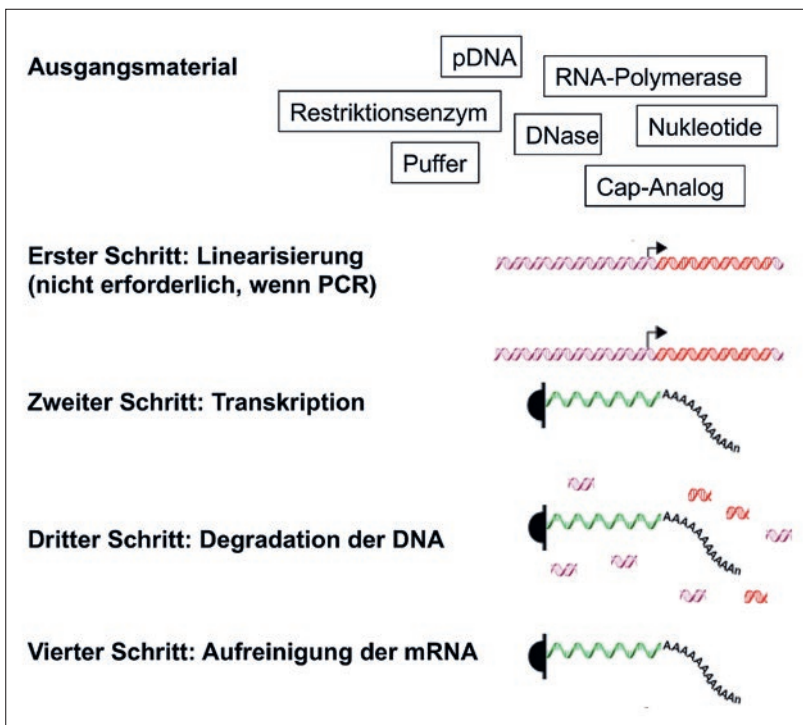
gegen die von den ivt mRNAs kodierten Proteine festgestellt), sondern auf die ungenügende Immunantwort selbst: Sie konnte das Tumorstadium nicht ausreichend kontrollieren, um klinisch genügend wirksam zu sein. Mehrere Studien mit ivt mRNA als Anti-Krebs-Vakzine sind im Gange, und das Design der ivt mRNA (z.B. Kodierung für Mutationen), die Formulierung (z.B. in Liposomen, die intravenös verabreicht werden) sowie die Anwendung (z.B. in Kombination mit anderen Krebstherapien) werden sicherlich zur Validierung von Anti-Krebs-ivt-mRNA-Vakzinen führen. In der Zwischenzeit wurden ivt-mRNA-Impfstoffe in frühen klinischen Studien am Menschen als prophylaktische Impfstoffe gegen Viren (Influenza und Tollwut) untersucht [9]. Weitere klinische Studien der Phase I/II der ivt-mRNA-Vakzine gegen verschiedene Viren (Cytomegalovirus, Zika-Virus, Metapneumovirus, Parainfluenzavirus Typ 3) laufen. Am wichtigsten ist, dass der Anti-SARS-CoV-2-Impfstoff in Form von ivt mRNA kürzlich in mehreren Ländern und von zwei unabhängigen Unternehmen zugelassen wurde.

## Vorteile synthetischer mRNA-Vakzinen

Obwohl im Labor die Herstellung und Verwendung von ivt mRNA für Therapien umständlich und teuer sind, hat dieses Format für die klinische Anwendung viele Vorteile gegenüber anderen Formaten [10].

### Schnelle und einfache Produktion unter pharmazeutischen Bedingungen

Die Schritte, die zur Herstellung von mRNA führen (Abb. 2), sind einfach, schnell und vor allem robust, das heißt, sie sind nicht von der mRNA-Sequenz abhängig. Wenn also der pharmazeutische Prozess zur mRNA-Produktion einmal etabliert ist, kann er für jede beliebige Sequenz, die ein beliebiges Protein kodiert, verwendet werden. Das ist nicht der Fall bei Impfstoffen,



**Abbildung 2:** Herstellung von in vitro transkribierter mRNA (ivt mRNA). Es wird wenig Ausgangsmaterial benötigt. Dann sind die vier Schritte alle robust (arbeiten unabhängig von der Sequenz der benötigten ivt mRNA) und benötigen jeweils nur wenige Stunden (jeder Schritt ist 2 Stunden im Labor). pDNA: Plasmid-DNA; PCR: «polymerase chain reaction»; DNA: Desoxyribonukleinsäure; RNA: Ribonukleinsäure; mRNA: Messenger-RNA.

die auf Peptiden, Proteinen, Nanopartikeln oder Viren basieren. Die Vielseitigkeit der mRNA-Produktion wird genutzt, um individualisierte Anti-Krebs-Impfstoffe herzustellen: Tumorbiopsien von individuellen Patienten werden sequenziert, krebsspezifische Mutationen identifiziert und ivt mRNA produziert, um kurze Proteine zu kodieren, die diese Mutationen enthalten. Jeder Patient erhält seinen eigenen Impfstoff. Der Prozess von der Biopsie bis zum mRNA-Impfstoff dauert weniger als drei Monate.

### Hochgradig stabil in vitro

Entgegen der allgemeinen Annahme ist RNA in vitro sehr stabil. Sie wird in Gegenwart von RNasen oder bei erhöhtem pH-Wert abgebaut. Ist die RNA jedoch frei von RNasen (was bei der pharmazeutischen ivt mRNA natürlich der Fall ist) und bei neutralem/leicht saurem pH-Wert, dann ist sie sehr stabil. Sie ist das einzige biologische Molekül, das ausgefällt, in Wasser resuspendiert, auf bis zu 90 Grad erhitzt, eingefroren und gefriergetrocknet werden kann, ohne dass es Schaden nimmt. Kein anderes biologisches Produkt ist so robust (insbesondere was die hohen Temperaturen angeht). Ausserdem kann lyophilisierte RNA bei Raumtemperatur sehr lange gelagert werden. In Wasser resuspendiert ist sie sofort wieder biologisch aktiv (unabhängig von

ihrer Sequenz, das heisst unabhängig vom kodierten Protein). Auf dieser Basis hat CureVac im Jahr 2014 einen mit zwei Millionen Euro dotierten Sonderpreis der EU erhalten. Der Preis galt innovativen Lösungen für den Transport und die Lagerung von Impfstoffen, bei denen die Kühlkette nicht gewährleistet werden kann.

### Sicheres und definiertes therapeutisches Fenster

Im Gegensatz zu DNA-basierten Impfstoffen (Plasmid-DNA oder DNA-Viren) ist die ivt mRNA von Natur aus in vivo ein transientes Molekül. Sie wird durch reichlich vorhandene RNasen ausserhalb und innerhalb von Zellen vollständig abgebaut. Sie kann auch das DNA-Genom des Wirts nicht beeinflussen. Aus diesen Gründen ist ivt mRNA für Therapien besonders sicher. Ein weiterer Vorteil der sehr transienten Natur von ivt mRNA in vivo ist, dass je nach mRNA-Sequenz und Transportvehikel nach maximal ein paar Tagen davon ausgegangen werden kann, dass keine ivt mRNA mehr aktiv ist. Das therapeutische Fenster ist also sehr definiert. Re-Injektionen können durchgeführt werden und kumulieren nicht mit früheren Injektionen. Es können daher keine überraschenden Nebenwirkungen wegen einer Kumulation der ivt mRNA auftreten und Personen/Patienten können wiederholt Injektionen erhalten, wenn dies für die Wirksamkeit der Behandlung erforderlich ist.

### Monoantigene

Impfstoffe in Form von rekombinanten Viren exprimieren viele verschiedene Proteine, darunter auch das interessierende (z.B. SARS-CoV-2-Spike-Protein). Somit lösen Boost-Impfstoffe eventuell a) die Immunität gegen nicht zielgerichtete Antigene aus und werden b) durch Antikörper gegen das Vehikel, das durch die erste Injektion ausgelöst wurde, neutralisiert. Ein ähnliches Problem tritt bei komplexen rekombinanten Impfstoffen (virusähnliche Partikel) oder sogar bei Proteinimpfstoffen auf, die von Natur aus Verunreinigungen enthalten (z.B. Abbauprodukte, fehlgefaltete Proteine, Verunreinigungen aus der Produktion), die Immunantworten auslösen und verstärken können, die nicht die gewünschten sind.

### Design und Optimierung von nicht replizierenden ivt mRNAs

Obwohl es sich um eine einfache Formulierung handelt, kann der ivt-mRNA-Impfstoff auf viele Arten optimiert werden. Diese Optimierung hat vor über 20 Jahren begonnen und sowohl bei der mRNA selbst als auch bei der Verabreichungsmethode können einige sehr wichtige Erfolge verzeichnet werden.

### Optimierung der mRNA

Wie in Abbildung 1 dargestellt, können fünf funktionelle Teile im mRNA-Molekül definiert werden, die jeweils unabhängig voneinander optimiert werden können, um die mRNA a) im Zytosol zu stabilisieren und b) sie besser zu übersetzen, von 5' nach 3':

1. **Die Cap-Struktur:** Sie wird für den Start der Translation der mRNA verwendet und besteht in vivo aus einem Guanosin, das an Position 7 methyliert und mit einer Triphosphatbindung an das erste Nukleotid der RNA gebunden ist. Viele Jahre lang wurde ein Cap-Analogon namens ARCA für die In-vitro-Transkription verwendet. Es warf jedoch Probleme bei der Produktion und Funktionalität der mRNA auf. Eine Revolution kam 2017 mit dem CleanCap®-System von Trilink®. Dabei handelt es sich um ein Trinukleotid, das aus dem 7-Methyl-Guanosin besteht, das über eine Triphosphatbindung mit einem 2'-methylierten Adenosin und anschliessend mit einem Guanosin verbunden ist. CleanCap® ermöglicht ein effizienteres Capping der mRNA, überragende Funktionalitäten der mRNA und eine fünf- bis zehnfach höhere Effizienz der Transkriptionsreaktion. Alle drei mRNA-Impfstoffe, die von den grösseren mRNA-Firmen (siehe unten) entwickelt wurden, verwenden CleanCap®, da diese Strategie unvergleichlich ist.
2. **Die 5' untranslatierte Region (UTR).** Sie befindet sich zwischen dem Cap und dem Startcodon. Sie kann zwischen drei bis Hunderte Nukleotide enthalten. Das Ribosom scannt diese UTR und beginnt die Translation am ersten AUG-Codon in einer korrekten Umgebung (Kozak genannt). Die Sequenz dieses 5'UTR kann die Translation regulieren. Normalerweise wird in ivt mRNA die 5'UTR von sehr stabilen mRNAs verwendet, wie zum Beispiel der globinkodierenden mRNA. Wir beschrieben eine optimierte 5'UTR in Form eines Aptamers, das in der Lage ist, den eIF4F-Komplex anzuziehen [11]. Andere optimierte Sequenzen wurden durch Vorhersagen oder iterative Methoden definiert. Firmen verwenden meist ihre eigene proprietäre 5'UTR-Sequenz.
3. Im Anschluss an die 5'UTR folgt die **kodierende Sequenz**. Dieser Teil ist entscheidend für die Rate der mRNA-Translation und für die Stabilität der mRNA im Zytosol. Obwohl Wildtyp-Sequenzen von Säugetiergenen in der Regel von Natur aus an unsere Codon Usage angepasst sind, können Sequenzen aus niederen Organismen (z.B. Bakterien) für eine effiziente Translation in einem Säugetierzytosol problematisch sein. Daher kann für gewisse Gene eine Codon-Optimierung erforderlich sein. Wenn die Gene von Säugetierviren stammen (wie SARS-

CoV-2) und die Zeit fehlt, viele verschiedene codonoptimierte Sequenzen zu testen, kann die Verwendung der Wildtyp-Sequenz empfohlen werden.

4. Nach der kodierenden Sequenz, die auf dem Stoppcodon endet, befindet sich die **3'UTR**. Sie ist eine sehr kritische Sequenz, die sowohl von zytosolischen Proteinen als auch von siRNA erkannt wird und die mRNA-Stabilität sehr stark beeinflusst. Auch hier verwendeten die frühen Arbeiten ivt mRNA mit 3'UTRs aus den sehr stabilen Globin-Genen. In jüngerer Zeit wurden Tandem-Wiederholungen solcher Sequenzen oder neue, eventuell kombinierte Sequenzen definiert [12]. Wie bei der 5'UTR haben die Firmen in der Regel ihre eigene stabilisierende 3'UTR in ihren ivt mRNAs und sie alle sorgen für eine wirksame intrazelluläre Stabilisierung des synthetischen Moleküls.
5. Die mRNA endet an einem **Poly-A-Schwanz**, der idealerweise über 90 Adenin-Nukleotide aufweist.

Die gesamte mRNA kann aus den vier kanonischen Nukleotiden (Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin) oder aus modifizierten Nukleotiden wie Pseudouridin anstelle von Uridin bestehen. Dies ist im Zusammenhang mit ivt-mRNA-Impfstoffen kein kritisches Merkmal, und die Firmen verwenden die Modifikationen in ihren Impfstoff-mRNAs oder nicht (siehe unten).

### Optimierung der Verabreichung

Kationische Verbindungen können die anionische RNA binden und stabilisieren. Gleichzeitig neutralisieren sie das Molekül und erzeugen Partikel, die die Aufnahme in Zellen und die Passage durch Zellmembranen erleichtern. Sowohl kationische Liposomen als auch kationische Polymere werden seit Beginn der Optimierung von ivt-mRNA-Impfstoffen eingesetzt (Liposomen und Protamine in der Studie von Hoerr [4]). Optimierte Formulierungen müssen zwei gegensätzliche Eigenschaften aufweisen: eine sehr stabile und widerstandsfähige Struktur, die die RNA ausserhalb der Zellen schützt, und eine sehr wirksame Dissoziation der RNA von ihrem Träger innerhalb der Zytosole. Ist die Wechselwirkung zwischen RNA und Träger zu stark, kann die RNA nicht in das Zytosol freigesetzt werden. Ist sie zu schwach, können die Partikel sowohl in vitro als auch nach Injektion instabil sein und die RNA freisetzen, bevor sie in das Zytosol gelangt. Darüber hinaus muss das Vehikel aus sicheren Verbindungen bestehen, die auf natürlichem Wege katabolisiert werden. Kationische Liposomen (insbesondere solche, die ionisierbare kationische Lipide enthalten) haben sich bisher als die besten erwiesen. Ihre Entwicklung wurde seit Anfang des Jahrhunderts für die Verabreichung von siRNA-Wirkstoffen beschleunigt. Diese

siRNA muss sehr effizient das Zytoplasma der Zellen erreichen, um wirksam zu sein. Unternehmen wie Acuitas Therapeutics haben enorme Fortschritte bei liposomalen Formulierungen gemacht, die auf die Verabreichung von RNA abzielen, und ermöglichten die Entwicklung von Onpattro®, dem ersten Medikament auf der Basis von siRNA. Da dieses einen genetischen Defekt behandelt, muss es häufig verabreicht werden, und da es die Genexpression in einem grossen Organ kontrollieren muss, ist eine Gabe in hoher Dosis nötig. Daher musste die Formulierung wirksam und nicht toxisch sein. Sie besteht aus einer Verabreichung von bis zu 30 mg RNA alle drei Wochen durch intravenöse Injektion. Basierend auf dieser Expertise konnten sichere und wirksame Formulierungen von ivt mRNA entwickelt werden. Das Liposom, mit dem das erste zugelassene ivt-mRNA-Medikament, der Impfstoff von BioNTech/Pfizer, verabreicht wird, basiert auf den Technologien von Acuitas Therapeutics. CureVac verwendet auch die Formulierungen von Acuitas Therapeutics für seinen ivt-mRNA-Impfstoff gegen COVID-19 in klinischen Studien.

### Anti-SARS-CoV-2 nicht replizierende mRNA-Impfstoffe

Seit Beginn der COVID-19-Pandemie und allein aufgrund der am 11. Januar 2020 in *Nature* veröffentlichten Sequenz des SARS-CoV-2 haben die drei grössten mRNA-Firmen – BioNTech (Mainz, Deutschland), CureVac (Tübingen, Deutschland) und Moderna (Boston, USA) – begonnen, ihre Expertise und Infrastruktur zu nutzen, um einen Impfstoff gegen COVID-19 zu generieren. Glücklicherweise ähnelt das SARS-CoV-2 dem SARS-CoV (2003) und so konnte schnell herausgefunden werden, dass es dasselbe Spike-Protein benutzt, um in Zellen einzudringen, indem es «angiotensin converting enzyme 2» (ACE2) erkennt, ein membrangebundenes Enzym, das auf der Oberfläche vieler Zellen exprimiert wird. Spike ist ein grosses (1273 Aminosäuren) Transmembranprotein, dessen Funktionen durch viele Glykosylierungen und fluktuierende Strukturen bestimmt werden. Es assembliert als Trimer. Aus früheren Arbeiten über Coronaviren war bekannt, dass Spike auf Viruspartikeln in seiner «Präfusions»-Konformation vorliegt. Es ist diese Form, die von Antikörpern erkannt werden muss, die das Virus neutralisieren sollen. Um diese Konformation zu stabilisieren im Rahmen der Herstellung der mRNA-Impfung gegen Spike, ersetzen zwei aufeinanderfolgende Proline im C-terminalen Teil von Spike die natürlichen Aminosäuren (Sequenz KV an Proteinposition 986 und 987) [13].

Alle drei Firmen nutzten dieses bereits vorhandene Wissen, um ihre kodierende Sequenz zu entwerfen: Sie enthält die beiden Proline, was die Präfusionsstruktur von SARS-CoV-2-Spike begünstigt, das von der ivt mRNA an der Oberfläche der transfizierten Zellen exprimiert wird. Es gibt jedoch feine Unterschiede zwischen den drei Impfstoffen:

#### Moderna

Mit der Injektion des ersten Probanden am 16. März 2020 hat Moderna als erster Medikamentenentwickler mit der klinischen Prüfung eines Anti-COVID-19-Impfstoffs begonnen. Ein einzelner Impfstoff, der aus pseudouridinmodifizierter mRNA besteht, die für den Präfusionskonformations-Spike in voller Länge in einer liposomalen Hülle kodiert, wurde in Rekordgeschwindigkeit hergestellt. Das Unternehmen hat im November 2020 die Ergebnisse der Phase-I-Dosis-Eskalationsstudie veröffentlicht [14]. Mit den drei getesteten Dosen (drei Kohorten von 15 Teilnehmern) von 25, 100 und 250 µg, die in Liposomen formuliert und intramuskulär in einem Prime-Boost-Schema verabreicht wurden (mit 4 Wochen Abstand zwischen den Injektionen), konnten hohe neutralisierende Antikörpertiter erzeugt werden (ähnlich oder höher als die Titer, die in den Seren von Patienten gefunden wurden, die sich von COVID-19 erholt hatten). Es traten bei der Hälfte der Teilnehmer meist milde Nebenwirkungen des Impfstoffs auf, wie Müdigkeit, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Myalgien und Schmerzen an der Injektionsstelle. Diese Nebenwirkungen waren bei der Boost-Injektion und bei der höchsten Dosis von 250 µg stärker ausgeprägt. Die klinischen Laborwerte zeigten keine schwerwiegenden Probleme. Das Unternehmen wählte die mittlere Dosis von 100 µg für weitere Studien aus und schloss am 22. Oktober 2020 die Rekrutierung von 30 000 Teilnehmern für seine Phase-III-Studie ab. Eine vorläufige Analyse des Unternehmens zeigt eine 95%ige Wirksamkeit des Impfstoffs beim Schutz vor COVID-19: 196 COVID-19-Fälle (185 unter Placebo), 30 schwere (30 unter Placebo) [15]. In der Zwischenzeit haben Studien an geimpften und mit Viren exponierten nicht menschlichen Primaten gezeigt, dass der Impfstoff die Virusreplikation in den oberen und unteren Atemwegen verhindern kann [16]. Aufgrund der vom Unternehmen vorgelegten Daten hat die US-amerikanische «Food and Drug Administration» (FDA) den Impfstoff für den Notfalleinsatz zugelassen. Dies ist die zweite Zulassung (nach dem BioNTech-Impfstoff, siehe unten) eines mRNA-Medikaments, wobei es sich wiederum um einen Impfstoff gegen SARS-CoV-2 handelt. In der Folge haben mehrere Länder (darunter die EU und die Schweiz) den Impfstoff zugelassen.

### BioNTech

Das Unternehmen, das über eine breite Palette von ivt-mRNA-Technologien verfügt, hat im Januar 2020 vier verschiedene mRNA-Impfstoffe entwickelt: Zwei mRNAs, die für den Präfusionskonformations-Spike in voller Länge kodieren, eine mit Pseudouridinen und die andere mit unmodifizierten Uridinen (da es keine Beweise dafür gibt, dass für diese Art von Impfstoff die eine oder andere Version vorteilhaft ist), eine mRNA, die nur für die «receptor binding»-Domäne des Spike-Proteins kodiert (da Antikörper, die nur gegen diese Domäne gerichtet sind, möglicherweise wirksamer sind und eine erleichterte Infektion verhindern) und eine selbstamplifizierende mRNA (da dieses Format viel niedrigere Dosen benötigt als nicht replizierende mRNA). Nachdem am 23. April 2020 mit der ersten Injektion begonnen wurde, hat BioNTech beschlossen, in der Phase-III-Studie die pseudoU mRNA, die für den Präfusionskonformations-Spike in voller Länge kodiert (BNT162b2), zu verwenden. Es handelt sich um ein Prime-Boost-Schema mit 21 Tagen zwischen den Injektionen. Die Phase-I-Daten für diesen Impfstoff, der in Dosen von 10, 30 und 100 µg getestet wurde, zeigten eine Serokonversion bei allen Probanden und hohe neutralisierende Antikörpertiter (ähnlich oder höher als in den Seren von Patienten, die sich von COVID-19 erholt hatten) auch bei Teilnehmern, die älter als 65 Jahre waren, sowie ein gutes Sicherheitsprofil [17]. Nachdem Pfizer und BioNTech am 17. März 2020 ihre Zusammenarbeit bekannt gegeben hatten, evaluierten sie gemeinsam den Impfstoff, was die Rekrutierung von Teilnehmern erheblich beschleunigte. Die Phase-III-Studie wurde bereits am 18. November 2020 abgeschlossen [2]. Sie umfasste über 40 000 Teilnehmer (mit oder ohne vorherige Infektion mit SARS-CoV-2) und zeigte einen 95%igen Schutz gegen COVID-19: neun Fälle von COVID-19 mindestens sieben Tage nach der zweiten Dosis wurden bei den Impfstoffempfängern und 169 bei den Placeboempfängern beobachtet. Damit verbundene unerwünschte Ereignisse wurden bei 21% in der Impfstoff- und 5% in der Placebogruppe dokumentiert. Bei den Impfstoffempfängern wurden vier schwerwiegende unerwünschte Ereignisse berichtet (Schulterverletzung im Zusammenhang mit der Verabreichung des Impfstoffs, rechtsseitige axilläre Lymphadenopathie, paroxysmale ventrikuläre Arrhythmie und Parästhesie im rechten Bein). Schwere Müdigkeit wurde bei etwa 4% der BNT162b2-Empfänger beobachtet. Temperatur (38,9–40 °C) bei 0,8% (Impfstoff) und 0,1% (Placebo) nach der zweiten Dosis. Basierend auf diesen günstigen Sicherheits- und Wirksamkeitsdaten haben Grossbritannien (am 2. Dezember 2020 als erstes mRNA-basiertes Medikament und erster zugelasse-

ner Impfstoff gegen COVID-19) und die USA (am 11. Dezember 2020) den Impfstoff für die Notfallanwendung zugelassen. Am 19. Dezember 2020 erteilt die Schweiz eine bedingte Marktzulassung für den Anti-SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoff von BioNTech/Pfizer, der unter dem Namen Comirnaty® vertrieben wird. Es ist die erste Zulassung weltweit, die nicht für den Notfalleinsatz gilt.

### CureVac

Das Unternehmen hat seine Phase-I-Studie im Juni 2020 begonnen und verwendet ein Liposom (Cholesterin, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin [DSPC]), PEG-yliertes Lipid und ein kationisches Lipid) zur intramuskulären Verabreichung von unmodifizierter mRNA, die für den Spike in voller Länge in Präfusionskonformation kodiert. Die Dosisescalation ging von 2 bis zu 12 µg. Es handelt sich um ein Prime-Boost-Schema mit 28 Tagen zwischen den Injektionen. Die Studienpopulation bestand aus 248 Erwachsenen im Alter von 18 bis 60 Jahren. Das Unternehmen teilte mit (obwohl der entsprechende Artikel noch nicht in einer Fachzeitschrift veröffentlicht wurde, <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.09.20228551v1.full-text>), dass der Impfstoff gut vertragen wurde (obwohl die Häufigkeit und der Schweregrad der unerwünschten Ereignisse mit der Höhe der Dosis zunahmen) und bei allen Probanden in der Dosis von 12 µg neutralisierende Antikörper induzierte. Der Impfstoff könnte auch bereits vorhandene Immunantworten bei Personen verstärken, die zuvor mit SARS-CoV-2 infiziert waren. Ende September 2020 startete die Phase-II-Studie von CureVac, die ältere Erwachsene einschliesst. Am 14. Dezember 2020 kündigte das Unternehmen den Start der zulassungsrelevanten klinischen Studie an.

### Produktion und Lagerung

Alle drei Hauptakteure verfügten bereits über Produktionsanlagen zur Herstellung von ivt mRNA für die Injektion. Die Massenproduktion eines prophylaktischen Impfstoffs in kurzer Zeit stellt jedoch eine Herausforderung dar. Wenn letztlich 1 Milliarde Dosen dringend benötigt werden (um zweimal 500 Millionen Menschen zu impfen, was ca. 10% der Bevölkerung abdeckt: z.B. Risikopersonen und medizinisches Fachpersonal), sind es 100 kg mRNA für Moderna, 30 kg mRNA für BioNTech und 12 kg mRNA für CureVac. Die Volumina der In-vitro-Transkriptionen liegen dann bei mindestens 20 000, 6000 respektive 2400 Litern (unter der Annahme einer Konzentration von mindestens 5 mg/ml mRNA am Ende der Transkriptionsreaktion). Ein Hauptproblem wäre hier nicht die Transkriptionsreaktion oder die Aufreinigung, sondern die Verfüg-

barkeit der Rohprodukte: hauptsächlich CleanCap®, Triphosphatnukleotide und Enzyme. Diese Komponenten werden von den mRNA-Firmen nicht selbst hergestellt. Sie werden von spezialisierten Anbietern biologischer Reagenzien wie zum Beispiel Trilink® und New England BioLabs® zugekauft. Diese Anbieter mussten ihre Produktionskapazitäten aufrüsten, um den mRNA-Produzenten die benötigten Materialien liefern zu können. All diese Anbieter- und Herstellerketten werden aufgerüstet und die Milliarden Dosen werden im Jahr 2021 verfügbar sein. Für das Jahr 2020 hat BioNtech/Pfizer 50 Mio. Dosen und Moderna 20 Mio. Dies ermöglicht den Beginn der Impfkampagnen in Ländern, in denen der Impfstoff zugelassen ist. Wie bereits erwähnt, ist ivt mRNA als reines Molekül (frei von RNasen) bei Raumtemperatur sehr stabil. Die liposomale Formulierung kann jedoch bei Raumtemperatur instabil sein und sich durch Auftauen/Gefrieren verändern (Form, Grösse, Prozentsatz der eingekapselten mRNA, usw.). Daher ist die Verteilung des Impfstoffs bei adäquater Lagertemperatur eine Grundvoraussetzung. Bislang wird der Impfstoff von BioNtech/Pfizer bei -70 °C gelagert und kann bei dieser Temperatur monatelang aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen wird er fünf Tage bei 2–8 °C gelagert. Der Impfstoff von Moderna wird bei -20 °C gelagert, ist bei dieser Temperatur monatelang stabil und soll nach dem Auftauen 30 Tage lang bei 2–8 °C stabil sein. CureVac hat angekündigt, dass der Impfstoff mindestens drei Monate lang stabil bleibt, wenn er bei einer Standard-Kühlschranktemperatur von +5 °C gelagert wird, und bis zu 24 Stunden als gebrauchsfertiger Impfstoff, wenn er bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. Es ist zu erwarten, dass alle drei Unternehmen weitere Stabilitätsdaten zur Verfügung stellen werden, die kontinuierlich einen einfacheren Transport und Vertrieb der Impfstoffe ermöglichen werden.

## Ausblick

Die Initiierung einer industriellen Entwicklung des ivt-mRNA-Impfstoffs im Jahr 2000 wurde von der wissenschaftlichen und medizinischen Gemeinschaft als utopisch oder irrelevant angesehen. Unsere Pionier-

arbeit wurde von Grant-Evaluierungsgremien und Redakteuren oder Gutachtern von High-Impact-Journalen abgelehnt. Der allererste Bericht über eine ivt-mRNA-Injektion (die ich an mir selbst durchführte) wurde 2007 in der Zeitschrift *Gene Therapy* publiziert, Impact-Faktor 4. Die ersten klinischen Studien zu ivt-mRNA-Impfstoffen erschienen 2008 und 2009 im *Journal of Immunotherapy*, ebenfalls Impact-Faktor 4. Jetzt, durch die COVID-19-Pandemie, haben sich ivt-mRNA-Impfstoffe als das schnellste, sicherste und sehr wirksame Impfstoffformat erwiesen. Enorme Verbesserungen der Methode (ivt mRNA und Träger) haben es ermöglicht, eine sehr kleine Dosis ivt mRNA (30 µg pro Injektion für den ersten zugelassenen Impfstoff, weniger als das, was wir vor 20 Jahren in Mäuse injiziert haben!) in einen sehr potenten Impfstoff zu verwandeln. Es ist das erste Mal in der Geschichte, dass ein Impfstoff in weniger als einem Jahr nach der Beschreibung eines neuen Virus (Sequenz von SARS-CoV-2 im Januar 2020 veröffentlicht) validiert wird. Die ivt-mRNA-Impfstoffe werden diese Pandemie beenden und die Welt vor neuen Pandemien schützen können. Darüber hinaus können ivt-mRNA-basierte Therapien für praktisch jedes medizinische Problem entwickelt werden. So mauserte sich diese Technologie innerhalb von 20 Jahren vom belächelten Aussenseiter zum weltweiten Hoffnungsträger und wird nun hoffentlich in voller Fahrt all ihre vielen Versprechen einlösen können.

## Verdankung

Das Labor von PD Dr. med. Steve Pascolo wird derzeit von der Universitätsklinik für Dermatologie, vom Universitären Forschungsschwerpunkt (URPP, Universität Zürich) «Translationale Krebsforschung», von der Monique Dormonville de la Cour Stiftung und von einem SNF-Stipendium (Nummer 198321) aus der Ausschreibung des NRP 78 COVID-19 unterstützt.

## Disclosure statement

The author declares he was co-founder of CureVac and its Chief Scientific Officer from 2000 till 2006. He left the company (position and participation) in 2006 and has no activities with CureVac. He works with BioNTech on mRNA vaccines against cancer (not on vaccines against COVID-19). They had a EU grant together: <http://merit-consortium.eu>. The author declares to not benefit financially from any anti-COVID-19 vaccine and to have no shares from BioNTech, CureVac or Moderna.

## Literatur

Die vollständige Literaturliste finden Sie in der Online-Version des Artikels unter <https://doi.org/10.4414/smfm.2021.08742>.

Korrespondenz:  
PD Dr. med. Steve Pascolo  
Dermatologische Klinik  
Universitätsspital Zürich  
Gloriastrasse 31  
CH-8091 Zürich  
[Steve.Pascolo\[at\]usz.ch](mailto:Steve.Pascolo[at]usz.ch)