

Le iniezioni COVID-19 a base di RNA di BioNTech contengono grandi quantità di DNA residuo, incluso un SV40 Sequenza promotore/potenziatore

Ulrike Kämmerer¹, Verena Schulz², Klaus Steger^{3*}

Astratto

Sfondo: Le iniezioni COVID-19 basate sull'RNA BNT162b2 sono specificatamente progettate per trasfettare le cellule umane e produrre in modo efficiente proteine spike per una risposta immunitaria.

Metodi: Abbiamo analizzato quattro lotti tedeschi di BNT162b2 applicando la coltura cellulare HEK293, l'immunoistochimica, l'ELISA, la PCR e la spettrometria di massa.

Risultati: Abbiamo dimostrato la trasfezione riuscita di biologici mRNA modificati con nucleosidi (modRNA) in cellule HEK293 e abbiamo mostrato livelli robusti di proteine spike per diversi giorni di coltura cellulare. La secrezione nei surnatanti cellulari è avvenuta prevalentemente tramite vescicole extracellulari arricchite di marcatori esosomiali. Abbiamo ulteriormente analizzato il contenuto di RNA e DNA di queste fiale e identificato grandi quantità di DNA dopo digestione con RNasi A in tutti i lotti, con concentrazioni comprese tra 32,7 ng e 43,4 ng per dose clinica. Questo supera di gran lunga la concentrazione massima accettabile di 10 ng per dose clinica stabilita dalle autorità di regolamentazione internazionali. Le analisi geniche con coppie selezionate di primer PCR hanno dimostrato che il DNA residuo rappresenta non solo frammenti delle matrici di DNA che codificano per il gene spike, ma tutti i geni del plasmide, inclusi il promotore/enhancer SV40 e il gene della resistenza agli antibiotici.

Conclusione: I nostri risultati sollevano gravi preoccupazioni in merito alla sicurezza del vaccino BNT162b2 e richiedono l'immediata sospensione di tutti i prodotti biologici a base di RNA, a meno che tali preoccupazioni non possano essere dissipate.

* Corrispondenza: Klaus.Steger@chiru.med.uni-giessen.de

1. Ospedale universitario di Würzburg, Reparto di ostetricia e ginecologia, Würzburg, Germania.

2. Ricercatore indipendente, Passau, Germania.

3. Università Justus Liebig, Giessen, Germania.

Parole chiave

BNT162b2, trasfezione cellulare, Comirnaty, COVID-19, plasmide, vaccino a RNA, promotore/potenziatore SV40

Introduzione

Nel 2020, campagne promosse politicamente come "Operation Warp Speed" [1,2] e "Project Lightspeed" [3,4] hanno spinto lo sviluppo di una classe completamente nuova di farmaci che mirano finalmente a vaccinare sette miliardi di persone in tutto il mondo contro il COVID-19 [5]. Questi cosiddetti "vaccini a mRNA" - di seguito denominati iniezioni di RNA o RNA biologici - consistono in mRNA modificato con nucleosidi (modRNA) confezionato in nanoparticelle lipidiche (LNP) competenti per la trasfezione. Secondo l'idea di base, il modRNA, una volta nella cellula, la costringe a produrre proteine spike del SARS-CoV-2 e a presentarle sulla superficie cellulare, con conseguente stimolazione del sistema immunitario a generare anticorpi specifici contro l'antigene spike presentato [6,7]. La "velocità della scienza" [8] e la richiesta dei governi di tutto il mondo hanno posto i produttori di fronte alla sfida di produrre grandi quantità di modRNA in tempi molto brevi. Pertanto, il processo iniziale basato sulla PCR per la generazione di matrici di DNA (processo-1) per la produzione di modRNA, che ha ricevuto l'autorizzazione per l'uso nella sperimentazione clinica di fase 3, ha presto raggiunto i suoi limiti. Le aziende sono quindi passate a una produzione su larga scala di matrici di DNA tramite vettori shuttle clonati, che possono essere facilmente moltiplicati in sistemi di coltura cellulare batterica (processo-2) [9]. A partire dalla distribuzione del vaccino governativo, questo prodotto del processo-2 è stato utilizzato al posto del prodotto originale.

Già nel 2021, è stato segnalato che le proteine spike indotte dal modRNA potevano essere trovate in circolazione nel sangue dei vaccinati settimane dopo le iniezioni [10]. Nel 2022, il primo post- dettagliato

L'indagine mortem ha rivelato la presenza di proteine spike indotte dal vaccino in più punti nelle pareti dei vasi e in diversi tessuti settimane dopo l'ultima iniezione di BNT162b2 [11]. Recentemente, proteine spike indotte dal vaccino sono state identificate nelle placente di donne iniettate con biologici a RNA durante la gravidanza [12]. Dhuli e colleghi hanno riportato la presenza di una sequenza corrispondente a un frammento del modRNA nelle cellule del sangue di pazienti con COVID lungo con una storia di due dosi del vaccino BioNTech/Pfizer [13]. È importante notare che la produzione di proteine spike da parte delle cellule del corpo non è limitata all'area di iniezione e non si è conclusa entro pochi giorni come era stato proclamato dai produttori e dalle autorità responsabili. Finora sono stati suggeriti diversi meccanismi che potrebbero contribuire alla notevole espressione a lunga durata delle proteine spike negli individui vaccinati.

In primo luogo, i prodotti biologici contengono mRNA modificato con nucleosidi (modRNA) per estenderne la durata [14], per ridurne la distruzione disattivando il rilevamento del recettore toll-like [15] e per massimizzarne la traduzione. Ciò è stato ottenuto sostituendo le uridine naturali con N1-metil-pseudouridine sintetiche (mPsi) e aumentando il contenuto di guanina e citosina (noto come ottimizzazione del codone) [6,14,16].

In secondo luogo, il modRNA transfettato può essere trascritto inversamente nel DNA e integrato nel genoma della cellula tramite un meccanismo mediato da LINE1 (Long Interspersed Nuclear Element-1), come suggeriscono i dati degli esperimenti di transfettazione nelle linee cellulari umane HEK293T [17] e Huh7 [18].

In terzo luogo, le nanoparticelle lipidiche (LNP) che trasportano il modRNA alle cellule possono contenere anche DNA, derivato dal processo di produzione, in cui il DNA codificante per la proteina spike è stato utilizzato come stampo per la trascrizione in vitro del modRNA. Il DNA rimanente potrebbe non essere completamente separato dal modRNA e degradato dalla digestione con desossiribonucleasi-I (DNasi-I) e, successivamente, essere impacchettato nel

LNP insieme al modRNA. È noto che la DNasi-I può aderire alle superfici dei recipienti di reazione e può mostrare un'efficienza ridotta in presenza di ibridi di DNA e RNA [19]. Secondo un produttore, è "probabilmente impossibile rimuovere ogni singolo filamento di DNA in una preparazione di RNA" [20]. Dato che l'Agenzia europea per i medicinali e l'Istituto tedesco Paul Ehrlich hanno fissato come accettabile un DNA residuo di 10 ng per dose clinica iniettata (e in effetti il DNA fino a questo margine è stato mostrato nei documenti di registrazione [9]), è altamente probabile un confezionamento di questo DNA nelle nanoparticelle lipidiche.

Questa possibilità è emersa sulla scena nel febbraio 2023, quando McKernan e colleghi hanno annunciato la scoperta di grandi quantità sia di DNA codificante per la proteina spike che di DNA plasmidico residuo derivato dal sistema di vettori di espressione nei lotti di vaccini BioNTech/Pfizer e Moderna [21,22]. La maggior parte era rappresentata da DNA frammentato e linearizzato, ma anche da plasmidi intatti in grado di trasfettare con successo le cellule di *E. coli* [21,22]. Supponendo che questi plasmidi intatti fossero impacchettati nell'LNP insieme al modRNA, i vettori di espressione stabili potrebbero entrare nelle cellule e quindi fornire una ricca fonte di produzione di proteine spike a lunga durata nel caso in cui le cellule siano in grado di trascrivere la regione codificata della proteina spike. In modo incomprensibile, i plasmidi di BioNTech/Pfizer, ma non di Moderna, non contengono solo il sistema promotore batterico T7, ma anche una sequenza promotore/enhancer del virus Simian Virus 40 (SV40) dei mammiferi [23-25]. Ciò desta preoccupazione, poiché già nel 1999 Dean e colleghi avevano dimostrato che l'ingresso nucleare del DNA plasmidico, soprattutto nelle cellule non in divisione, richiede una sequenza di 72 bp del promotore/enhancer SV40 [23]. Da notare che né il promotore né l'origine della replicazione sono necessari per la localizzazione nucleare del DNA plasmidico [23]. Nel frattempo, i risultati del team di McKernan hanno

è stato confermato ed esteso [26]. Recentemente, König e Kirchner hanno pubblicato dati su grandi quantità di DNA residuo all'interno di diversi lotti BNT162b2 [27].

In questo contesto, abbiamo condotto una serie di esperimenti per rispondere alle seguenti domande urgenti. In primo luogo, la grande quantità di DNA residuo nei lotti BioNTech [27] e persino nei plasmidi identificati nei lotti Pfizer [21,22] può essere confermata solo nei lotti BioNTech (BNT162b2, Comirnaty) distribuiti in Germania con diversi metodi di rilevamento del DNA comparabili? In secondo luogo, i plasmidi residui o i frammenti di DNA, se presenti, possono essere trasfettati in modo efficiente nelle cellule umane insieme al modRNA codificante? In terzo luogo, questi biologici possono indurre l'espressione cellulare continua della proteina spike, creando così focolai a lungo termine per l'attacco immunitario? Per rispondere a queste domande, abbiamo applicato un modello di coltura cellulare in vitro utilizzando cellule HEK293, poiché queste cellule simulano le cellule umane in divisione e, pertanto, non solo rappresentano un bersaglio idoneo per la produzione di proteine, ma sono anche le più suscettibili a una potenziale interazione tra gli acidi nucleici estranei trasfettati e il genoma cellulare. Il fatto che abbiamo ottenuto risultati positivi su tutti i fronti solleva forti preoccupazioni sulla sicurezza del vaccino BNT162b2.

Materiali e metodi

Lotti di vaccini

Sono stati utilizzati i seguenti lotti di vaccino BNT162b2 originali e non aperti: FD7958 (monovalente Wuhan; data di scadenza ottobre 2021), FE6975 (monovalente Wuhan; data di scadenza ottobre 2021), EX8679 (monovalente Wuhan; data di scadenza agosto 2021), HD9869 (bivalente Wuhan/Omicron XBB1.5; data di scadenza ottobre 2024). Come controllo positivo per la reazione PCR e l'analisi di spettrometria di massa, il lotto GH9715 (bivalente Wuhan/Omicron BA.4 e

È stato utilizzato il plasmide BA.5 (data di scadenza giugno 2023), poiché la sua contaminazione con il plasmide contenente SV40 era già stata dimostrata [25]. Le fiale ci sono state fornite dalla farmacia nello stato refrigerato del produttore. Erano chiuse e sempre refrigerate durante il trasporto e lo stoccaggio.

Esperimenti su linee cellulari ed ELISA

Le cellule HEK293 sono state coltivate in un incubatore umidificato a 37 °C, 5% di CO₂. Le cellule utilizzate provenivano da stock originali (Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Germania) regolarmente testate negative per micoplasma e conservate in aliquote in azoto liquido. Le cellule sono state scongelate fresche prima degli esperimenti di trasfezione, coltivate in piastre da 10 cm con DMEM al 10% di siero fetale di vitello addizionato con penicillina/streptomicina all'1% fino a confluenza e trasferite dopo tripsinizzazione (tripsina/EDTA allo 0,05% (Gibco n. 11500636) per 3 minuti a 37 °C) in nuovi pozzetti, secondo la configurazione sperimentale descritta di seguito.

Per tutti gli esperimenti di trasfezione, le fiale con l'mRNA monovalente sono state prediluite 1:5 con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) sterile priva di RNasi alla concentrazione clinica, secondo il produttore. Le fiale bivalenti non sono state prediluite poiché la concentrazione clinica era già presente. Per l'ELISA, piastre da 12 pozzi con densità cellulare dell'80% e un volume di terreno di 1 ml ciascuna sono state trasfettate con 1/12 (25 µl) di una dose clinica di una fiala e cellule e terreno di coltura sono stati raccolti ai punti temporali giorno 1, giorno 3, giorno 5 e giorno 7. Le cellule non trasfettate al giorno 7 sono servite come controllo negativo. Per l'analisi delle proteine, le cellule sono state lavate due volte in soluzione salina tamponata con fosfato sterile (PBS) dopo il rispettivo tempo di incubazione (vedere sopra), lisate nel tampone di lisi (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 1% NP40, pH 7,6) e il livello della proteina spike è stato determinato nella proteina

supernatante e terreno di coltura utilizzando un test ELISA S-Plex SARS-CoV-2 Spike ad alta sensibilità disponibile in commercio (Mesoscale Discovery K150ADJS).

Immunoistochimica

L'immunoistochimica è stata eseguita utilizzando un protocollo standard. In breve, il 60% di cellule dense su piastre da 24 pozzi è stato transfettato con 12,5 µl di una dose clinica per pozzetto in 200 µl di terreno. Dopo 4 ore di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con PBS sterile e 500 µl di terreno di coltura fresco sono stati applicati ai pozzi. 24 ore dopo l'inizio della transfettazione, le cellule sono state raccolte, fissate in paraformaldeide tamponata al 4%, incluse in agarosio/acqua al 2% e disidratate utilizzando un protocollo di disidratazione standard per campioni biotecnici. Successivamente, i blocchi di agarosio sono stati inclusi in paraffina e tagliati. Le sezioni sono state posizionate su vetrini Superfrost, deparaffinate due volte con xilene e reidratate in una serie graduata di etanolo e in acqua distillata. Dopo la reidratazione e il recupero dell'antigene (ACD biotechne n. 322000, vaporizzatore da 15 minuti), i vetrini sono stati permeabilizzati (0,3% Triton-X-100/PBST), trattati con soppressore di perossido (Thermo Scientific n. 35000) e bloccati in PBS con 1% di siero di capra, 1% di BSA, 0,1% di Triton-X-100 e 0,05% di Tween-20. Quindi, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo polyclonale di coniglio contro la proteina spike del SARS-CoV-2 (subunità S1; ProSci n. 9083) per una notte a 4 °C, lavati in PBS e incubati con anticorpo poli-HRP anti-coniglio (Invitrogen n. 32260) per 30 minuti a temperatura ambiente. La rilevazione della proteina è stata eseguita utilizzando il kit HRP Green permanente (Zytomed), controllato con ematossilina e incluso nel kit RotiHistol II.

Quantificazione del DNA e dell'RNA

Una dose clinica di ogni fiala è stata diluita 1:10 con PBS sterile privo di RNasi integrato con l'1%

Triton-X-100. Per la quantificazione dell'RNA, 10 µl della dose clinica diluita sono stati applicati su una piastra nera a 96 pozetti in triplicato e trattati con Qubit RNA High Sensitivity Assay (Invitrogen #Q32852). Per la quantificazione del dsDNA, 10 µl della dose clinica diluita sono stati applicati su una piastra nera a 96 pozetti in triplicato e trattati con Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Invitrogen #Q33230), Quanti-iT Pico Green dsDNA Assay (Invitrogen #P7589) o AccuBlue High Sensitivity dsDNA Assay (Biotium # 31006-T). Il trattamento con RNase A (concentrazione finale 50 µg/ml, Monarch RNase A priva di DNase #T3018L) è stato eseguito a 37 °C per 30 minuti. I segnali di tutti i test sono stati quantificati con un lettore di piastre standard a eccitazione 483 nm ed emissione 530 nm. Non si è verificata alcuna sovrapposizione di segnale tra le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione per i rispettivi fluorofori utilizzati nei kit. Abbiamo misurato la quantità di DNA e RNA (Figura 1 AC) e calcolato il rapporto DNA/RNA relativo a 1 mg di RNA. Questi rapporti sono stati messi in relazione alla regolazione EMA di 0,33 mg di dsDNA per 1 mg di RNA. Da questo, abbiamo ottenuto il fattore di incremento nella Tabella 3 e nella Figura 1D.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Per isolare il DNA plasmidico dalle cellule, piastre da 6 cm con cellule all'80% di densità sono state trasfettate con metà di una dose clinica di ciascuna fiala (150 µl/pozzetto) aggiunta a 1 ml di terreno di coltura. Le cellule non trasfettate sono servite come controllo negativo. Dopo 6 ore, le cellule sono state raccolte, lavate due volte in PBS e il DNA plasmidico è stato purificato (Gene Jet Plasmid Mini Kit). Aliquote di 1-10 ng di DNA sono state caricate in ciascuna reazione di PCR.

Per determinare il contenuto di DNA nelle fiale, una dose clinica di ciascuna fiala è stata diluita 1:10 in tampone EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) integrato con l'1% di Triton-X-100. Per la reazione PCR,

I primer sono stati progettati utilizzando PrimerBlast e ordinati tramite Eurofins Genomics, disciolti in acqua priva di nucleasi e utilizzati alla concentrazione finale di 0,2 mM. Per la posizione delle coppie di primer in relazione al vettore di espressione, vedere la Figura 3A. 1 µl della soluzione diluita è stato utilizzato come stampo ed elaborato secondo il protocollo standard della Taq polimerasi (94 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 38 cicli) utilizzando la Taq DNA polimerasi con tampone Taq standard (New England Biolabs). # M0273S). L'acqua priva di nucleasi è servita come controllo negativo. Una fiala contenente il lotto GH9715 è stata utilizzata come controllo positivo, poiché il DNA plasmidico di questo lotto era già stato isolato e sequenziato [21,22] e confermato come riferimento alla sequenza plasmidica BNT162b2 (GenBank PP544445.1, GenBank PP544446.1, GenBank MQ287666.1 che rappresenta la sequenza 16 del brevetto WO2021214204) pubblicata da BioNTech. I primer applicati sono descritti nella Tabella 1. Infine, le reazioni di PCR sono state caricate su un gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio in tampone TAE standard (tempo di esecuzione ~ 1 ora; 100 V). Gene Ruler DNA-Ladder Mix (Thermo Scientific #SM0331) è stato utilizzato come marcatore del DNA.

Isolamento degli EV e concentrazione del secretoma

Le cellule sono state coltivate in piastre da 6 cm fino all'80% di densità e trasfettate con metà di una dose clinica (150 µl) del lotto bivalente GH9750 aggiunto a 1 ml di terreno di coltura. Le cellule non trasfettate sono servite da controllo negativo. Dopo 6 ore, le cellule sono state lavate e il terreno di coltura è stato sostituito con 5 ml di terreno di coltura fresco. Dopo ulteriori 18 ore, il terreno di coltura è stato raccolto e le cellule sono state lavate due volte in PBS, raccolte e ulteriormente elaborate per la spettrometria di massa.

L'isolamento dell'EV è stato eseguito come precedentemente riportato utilizzando il metodo di cattura del peptide VN-96 che precipita gli EV tramite il legame agli HSP sulla superficie dell'EV [28,29]. In breve, 20 µl del peptide VN-96

(Microvesicle Enrichment kit, New England Peptide, #W1073-2, USA) è stato aggiunto al terreno di coltura cellulare condizionato (2 ml) ottenuto da cellule HEK293 (non) transfectate e incubato su una ruota rotante per 1 ora a temperatura ambiente. Le EV sono state isolate dopo centrifugazione per 15 minuti a 16.000 xg a 4 °C. Il surnatante (secretoma solubile)

è stato raccolto in una nuova provetta e concentrato utilizzando un filtro MWCO da 3 kDa (Merck, Amsterdam, Paesi Bassi, cat. n. UFC500396). Il pellet EV è stato lavato una volta con 1 ml di PBS (4 °C) contenente PIC (completamente privo di Mini EDTA, n. 11836153001 Roche, Germania).

Sequence name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon (bp)
spike protein aa24-98	CCTACACCAACAGCTTACCC	GATGTTGGACTTCTCGGTGC	221
spike protein aa258-328	CGCTTACTATGTGGGCTACC	TGGTGATATTGGGGAACCGC	212
spike protein aa534-654	GAACCTCAACTTCAACGGCC	AGCTATTGTTCACGTGCTCG	362
Spike protein aa1183-1269	GGTGGCCAAGAACTGAAACG	CATGTGTAGTGCAGTTACCG	258
ORI	CTACATACCTCGCTAAC	GCGCCTTATCCGGTAACATATC	150
neomycin cassette	GACCACCAAGCGAACATCG	CCACCATGATATTGGCAAGC	195
SV40 promoter/enhancer	CCAGCTGTGGAATGTGTGTC	GCTGACTAATTGAGATGGATGC	93+165

Tabella 1. Caratterizzazione dei primer utilizzati per la PCR.

Preparazione del campione per la proteomica

La preparazione del campione per la proteomica è stata eseguita come precedentemente descritto [30,31]. A tal fine, un'aliquota della sospensione di pellet cellulare in PBS, corrispondente a ~25 mg di proteine, è stata lisata in 30 ml di tampone campione LDS (contenente il 10% di ditioltreitolo, Life Technologies, Carlsbad, CA, cat. n. NP0008), 20 ml di secretoma solubile sono stati lisati con 10 ml di tampone campione LDS 3x e il pellet EV è stato solubilizzato in 30 µl di tampone campione LDS 1x, il tutto a temperatura ambiente. Successivamente, i campioni sono stati riscaldati per 5 minuti a 99°C e sonicati (3x 20 sec) e frazionati mediante elettroforesi su gel preformato con gradiente Bis-Tris 4-12% utilizzando il sistema NuPAGE SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente. Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati fissati in una soluzione di etanolo al 50% / acido fosforico al 3% (Merck, Svizzera) e colorati per una notte con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Scientific, Regno Unito) a temperatura ambiente. Successivamente, i gel sono stati lavati con 25 ml di bicarbonato di ammonio 50 mM (Fluka, Seelze, Germania) e con 25 ml di bicarbonato di ammonio 50 mM con acetonitrile al 50% (Biosolve BV, Valkenswaard, Paesi Bassi). Le proteine sono state

ridotto e alchilato incubando l'intero gel in 25 ml di ditioltreitolo per 1 ora a 56 °C e 25 ml di iodoacetamide 55 mM (Sigma-Aldrich, USA) per 45 minuti a temperatura ambiente, rispettivamente. Le corsie del gel sono state tagliate in 3 bande e ciascuna banda è stata tagliata in ~1 mm³ cubetti. I cubetti di gel di ciascuna banda sono stati essiccati in un evaporatore centrifugo SpeedVac per 10 minuti a 50°C e incubati ~100-200 ml (sufficienti a coprire) con 6,25 ng/ml di tripsina modificata di grado sequenziale (Promega, Madison, USA) per una notte a temperatura ambiente. I peptidi di ciascuna banda di gel sono stati estratti con 100-150 ml di acido formico all'1% e due volte con 100-150 ml di acido formico al 5% / acetonitrile al 50%, liofilizzati e conservati a -20 °C fino all'analisi LC-MS/MS.

Proteomica basata sulla spettrometria di massa

La proteomica senza etichetta di lisati, EV e campioni di secretoma solubile è stata eseguita utilizzando un sistema cromatografico Evosep accoppiato a un sistema TimsTOF-HT MS/MS (Bruker, Germania). I peptidi (600 ng/ campione come determinato da Nanodrop) sono stati sciolti in FA allo 0,1% e caricati su Evotips (Evosep,

Danimarca) secondo il protocollo del produttore. I peptidi sono stati separati mediante cromatografia liquida a fase inversa a nanoflusso utilizzando gradienti standardizzati su un sistema di cromatografia liquida Evosep One (Evosep, Danimarca) con 0,1% di acidi grassi e 0,1% di acidi grassi / 99,9% di ACN come fasi mobili a temperatura ambiente. Il metodo SPD (30 campioni al giorno) è stato utilizzato in combinazione con una colonna a fase inversa da 15 cm x 150 µm impaccata con biglie C18 da 1,5 µm (Bruker Daltonics) collegata a un emettitore in silice fusa con diametro interno di 20 µm (Bruker Daltonics). I peptidi sono stati introdotti in un TimsTOF HT (Bruker Daltonics) utilizzando una sorgente ionica nanolettrospray (sorgente spray captiva, Bruker Daltonics) con tensione di spruzzo impostata a 1500 V. Il TimsTOF HT funzionava in modalità DDA-PASEF con un tempo di rampa impostato a 100 ms e dieci scansioni PASEF sono state acquisite per ciclo di acquisizione topN, con un tempo di ciclo di 1,16 s. Precursori con un intervallo di massa da 100 m/z a 1700 m/z, intervallo di mobilità ionica da 1,5 a 0,7 Vs cm⁻²e stati di carica da 0 (non assegnato) a 5+ sono stati analizzati. La soglia di intensità è stata impostata a 2.500 unità arbitrarie (au) e il valore target a 20.000 au. I precursori che hanno raggiunto questo valore target o la piena capacità di scheduling sono stati esclusi per 0,4 min. I precursori con carica singola sono stati filtrati in base alla loro posizione di mobilità ionica m/z. I precursori con una massa inferiore a 700 Da sono stati isolati con una larghezza di isolamento del quadrupolo di 2 Th, i precursori superiori a 700 Da con una larghezza di 3 Th. L'energia di collisione è stata ridotta linearmente da 59 eV a 1,6 Vs cm⁻²a 20 eV a 0,6 Vs cm⁻². Per tutti gli esperimenti, la dimensione della mobilità ionica è stata calibrata linearmente utilizzando tre ioni selezionati della miscela di sintonizzazione LC/MS Agilent ESI [m/z, 1/K0: (322 . 0481 , 0 . 7318 Vs cm⁻²) , (622 . 0289 , 0.9848 Vs cm⁻²), (922.0097, 1.1895 Vs cm⁻²)].

Gli spettri MS/MS sono stati ricercati utilizzando MaxQuant 2.3.1.0 rispetto al proteoma umano esaminato (Uniprot, marzo 2023, 42420 voci comprese le isoforme) e le sequenze di Moderna

Vettore di espressione mRNA1273, vettore di espressione bivalente Pfizer BNT162b2 e sequenza proteica spike Wuhan-Hu-1 dell'isolato di coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave, più i loro prodotti di traduzione con frame shift ribosomiale. La specificità enzimatica è stata impostata sulla tripsina e sono stati consentiti fino a due tagli mancati. La carbamidometilazione della cisteina (Cys, +57,021464 Da) è stata trattata come modifica fissa, mentre l'ossidazione della metionina (Met, +15,994915 Da) e l'acetilazione N-terminale (N-terminale, +42,010565 Da) sono state trattate come modifiche variabili. Le identificazioni di peptidi e proteine sono state filtrate a un FDR dell'1% utilizzando la strategia del database decoy. La lunghezza minima del peptide era di 7 aminoacidi. Le proteine che non potevano essere differenziate solo sulla base degli spettri MS/MS sono state raggruppate in gruppi proteici (impostazioni MaxQuant predefinite). Le ricerche sono state eseguite con l'opzione di quantificazione senza etichetta selezionata. Le proteine sono state quantificate mediante conteggio spettrale [32].

Risultati

La trasfezione riuscita delle cellule porta alla produzione della proteina Spike

Le nanoparticelle lipidiche contenenti modRNA rappresentano un potente strumento per la trasfezione di cellule di mammifero [33]. Per testare l'efficacia della trasfezione, abbiamo analizzato il pattern di espressione delle proteine spike dopo la trasfezione di cellule renali embrionali umane (HEK293) con quattro diversi lotti di vaccino BioNTech (Comirnaty), ovvero i lotti monovalenti FD7958, FE6975, EX8679 e il lotto bivalente HD9869. Tutti e quattro i lotti hanno trasfettato con successo le cellule HEK293, come dimostrato da un forte segnale immunoistochimico della proteina spike (Figura 1A). L'efficienza di trasfezione valutata dalle cellule spike positive è stata del 90,5%, 74,6%, 76,4%, 80,7% e 0% rispettivamente per i lotti FD7958, FE6975, EX8679, HD9869 e le cellule non trattate. Inoltre, le cellule trasfettate

Le cellule hanno mostrato chiari segni di un effetto citopatico rispetto alla linea cellulare non trasfettata (controllo), come evidenziato dalla formazione di grandi vacuoli e cellule distaccate (Figura 1B). Per quantificare la stabilità dell'espressione della proteina spike nel tempo, abbiamo misurato la quantità di proteina spike nei lisati cellulari dopo 1, 3, 5 e 7 giorni utilizzando un test ELISA disponibile in commercio. Tutti e quattro i lotti hanno seguito lo stesso pattern di espressione, con un'espressione già chiara della proteina spike dopo il giorno 1, una produzione in aumento fino al giorno 5 e una concentrazione di spike ancora più elevata il giorno 7 rispetto al giorno 1 (Figura 1C).

La proteina Spike viene rilasciata nel supernatante della cellula trasfettata

Per determinare se le proteine spike siano presenti solo sulle cellule o possano essere rilasciate o secrete dalle cellule trasfettate, abbiamo analizzato il supernatante della coltura acellulare per le proteine spike applicando ELISA. I valori misurati sono quantità cumulative dal giorno 0 al rispettivo punto temporale indicato. Abbiamo osservato un chiaro aumento della quantità di proteine spike nel terreno di coltura nel tempo nei tre lotti monovalenti. La concentrazione di proteine spike nel terreno di coltura delle cellule trasfettate con il lotto bivalente HD9869 era inferiore al limite di rilevabilità ELISA (Figura 1D).

La proteina Spike viene rilasciata principalmente tramite vescicole extracellulari

La parte luminale delle proteine di membrana può essere scissa sulla superficie della membrana da diverse secretasi cellulari e rilasciata nel mezzo, ma le proteine non scisse possono anche essere secrete dalle cellule tramite vescicole extracellulari (esosomi). Abbiamo utilizzato

spettrometria di massa per chiarire con quale meccanismo le proteine spike siano state secrete nel surnatante dopo la trasfezione artificiale della linea cellulare con il lotto GH9715 come sistema modello. A tal fine, sia le cellule trasfettate che il terreno di coltura sono stati raccolti dopo 24 ore dalla trasfezione. Come risultato dell'isolamento delle vescicole extracellulari (EV) dal terreno di coltura, abbiamo ottenuto tre frazioni: il lisato cellulare, le EV e il terreno di coltura privo di EV per la profilazione del proteoma. I risultati dell'abbondanza delle proteine spike nelle tre frazioni sono presentati nella Tabella 2. La proteina spike era più abbondante nel lisato (60 conteggi spettrali) e chiaramente presente nelle EV (14 conteggi spettrali), mentre solo bassi livelli (2 conteggi spettrali) sono stati riscontrati nel terreno di coltura privo di EV. È importante notare che le cellule di controllo transfettate erano negative per la proteina spike e, come previsto, i marcatori EV comuni (CD81, TSG101, Alix) erano arricchiti nella frazione EV rispetto al secretoma solubile e rilevati sia nelle cellule transfettate che in quelle non transfettate.

La concentrazione di RNA delle fiale testate corrisponde alla dichiarazione di BioNTech

Per confermare la qualità dei lotti utilizzati nelle reazioni di trasfezione, abbiamo testato il contenuto di RNA delle fiale mediante il test Qubit RNA High Sensitivity Assay. I risultati hanno confermato che le fiale contenevano la quantità di RNA dichiarata dal produttore, pari a 30 µg di RNA per dose clinica (Figura 2A). Eseguendo un'analisi in triplicato, il contenuto di RNA del lotto FD7958 è risultato pari a 26,74 + 0,31 (media + SEM) µg di RNA per dose clinica stimata, il lotto FE6975 conteneva 28,57 + 0,22 µg di RNA, il lotto EX8679 26,51 + 0,59 µg di RNA e il lotto HD9869 28,12 + 0,47 µg di RNA per dose clinica, dimostrando l'elevata affidabilità del metodo di manipolazione e quantificazione degli acidi nucleici utilizzato nel presente documento.

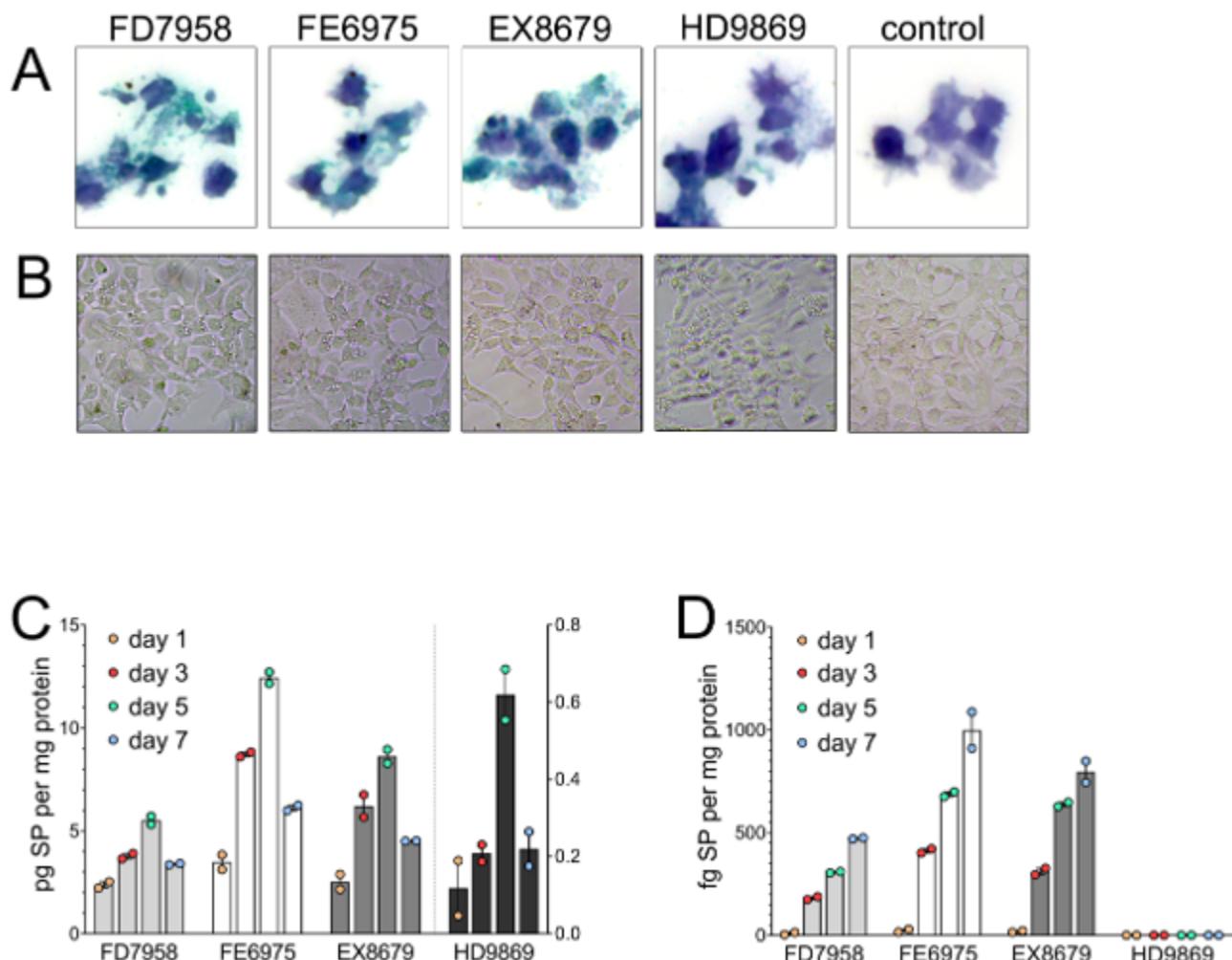


Figura 1. Espressione della proteina spike nelle cellule HEK293 dopo la trasfazione con i biologici BNT162b2. A: Colorazione delle proteine spike nelle cellule trasfettate con diversi lotti visualizzata in colore verde mediante immunoistochimica. Le cellule non trasfettate (controllo) mostrano nessuna colorazione. L'ematossilina funge da controcolorante per i nuclei. B: La microscopia in campo chiaro di cellule HEK293 trasfettate con lotti diversi mostra un accumulo di formazione di vescicole intracellulari. C: Quantificazione delle concentrazioni intracellulari di proteine spike (SP) nel tempo misurate mediante ELISA. n=2; media+SEM. D: Quantificazione dei livelli di proteine spike (SP) secrete nel tempo misurate mediante ELISA. Per il lotto HD9869, la concentrazione della proteina spike secca era inferiore al limite di rilevamento. n=2; media+SEM. Il risultato negativo del controllo non ha mostrato alcun contenuto di proteine spike nel lisato cellulare e nel surnatante cellulare. SEM, errore standard della media.

	Spike protein				Extracellular vesicle markers			
	CD81		TSG101		Alix			
	Control	BioNTech	Control	BioNTech	Control	BioNTech	Control	BioNTech
Cellular lysate	0	60	18	23	3	5	38	61
Extracellular vesicles	0	14	14	18	7	6	51	36
Soluble secretome	0	2	1	3	0	0	0	1

Tabella 2. Numero di conteggi spettrali (abbondanza proteica) in frazioni specifiche della linea cellulare HEK293 trasfettata con fiala bivalente BioNTech GH9715.

Grandi quantità di DNA sono state trovate nei lotti di vaccini a RNA testati

A causa di segnalazioni sul DNA residuo dei lotti BNT162b2 [27], tutti e quattro i lotti utilizzati nel presente documento sono stati analizzati con tre metodi diversi per il possibile DNA residuo che potrebbe derivare dal processo di produzione utilizzando plasmidi di DNA e sistemi di espressione di *E. coli*. Tre sistemi di quantificazione del DNA Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (P), Qubit 1x dsDNA High Sensitivity Assay (Q) e AccuBlue dsDNA High Sensitivity Assay (A) sono stati applicati direttamente al

solutions vaccinali originali. I risultati sono riassunti nella Figura 2B.

In un pre-test, abbiamo applicato l'1% di Triton-X-100 per aprire l'LNP e quantificare l'intera quantità di dsDNA (libero e impacchettato all'interno dell'LNP) presente nelle fiale. Come riassunto nella Tabella 3, il contenuto di dsDNA nei campioni originali non trattati era chiaramente inferiore (fattore 1,6-6,7 a seconda del lotto) rispetto alle aliquote trattate con Triton-X-100. Tutti gli esperimenti successivi sono stati eseguiti con trattamento con Triton-X-100.

	Without Triton X-100	With Triton X-100	Factor
	ng ± SEM dsDNA per clinical dose	ng ± SEM dsDNA per clinical dose	
FD7958	1514.00 ± 142.1	2446 ± 279.7	1.6
FE6975	962.90 ± 98.55	3683 ± 99.57	3.8
EX8679	410.00 ± 43.44	2745 ± 233.1	6.7
HD9869	577.80 ± 61.83	2712 ± 292.8	4.7

Tabella 3. Livelli di DNA nelle fiale indicate dei lotti BioNTech prima del trattamento con RNasi A, senza e con trattamento con Triton-X-100. Il fattore rappresenta l'aumento del DNA al rilascio di acidi nucleici dall'LNP rotto con Triton. SEM, standard errore della media.

Un'analisi diretta del contenuto delle fiale diluite 1:10 con soluzione salina tamponata priva di RNasi con Triton-X-100 all'1% ha rivelato elevate concentrazioni di DNA a doppio filamento (ds) tra 1326 e 4225 ng per dose clinica, con il metodo AccuBlue che ha mostrato le concentrazioni di DNA più basse in tre lotti e la stessa concentrazione del metodo Qubit nel lotto FE6975. Per tre dei quattro lotti testati (FE6976, EX8679 e HD9869), il test Pico Green ha mostrato la concentrazione di DNA più elevata, mentre per il lotto FD7958 il test Qubit ha mostrato una concentrazione di DNA leggermente superiore rispetto al test Pico Green. La variazione interna all'interno di un lotto e di un metodo di misurazione è stata minima, il che esclude qualsiasi errore di manipolazione e conferma la robustezza dei risultati. Questo confronto tra i tre diversi

i sistemi di analisi hanno mostrato variazioni in parte simili, in parte maggiori nella concentrazione del DNA nei rispettivi lotti, evidenziando un aspetto importante quando si confrontano i risultati tra diversi metodi di analisi.

Per escludere la possibilità che i kit utilizzati, contrariamente a quanto affermato per essere specifici per dsDNA, rilevino parzialmente l'RNA in presenza di elevate quantità di RNA, gli stessi campioni precedentemente misurati nella Figura 2B sono stati successivamente trattati con RNasi A (Tabella 4). Entro 3 minuti, le letture del DNA sono diminuite drasticamente e sono rimaste stabili per i restanti 30 minuti di incubazione, suggerendo che a) i coloranti intercalanti reagiscono effettivamente con l'RNA e b) il trattamento con RNasi ha eliminato sufficientemente tutto l'RNA interferente senza che fosse presente RNA rimanente.

presente nei campioni al termine del trattamento. Anche in questo caso, si è riscontrata solo una minima variazione nei triplicati analizzati indipendentemente. È interessante notare che la misurazione con AccuBlue dei campioni non trattati ha mostrato il livello di DNA più basso e con il trattamento con RNasi-A il contenuto più elevato, riflettendo la più bassa interazione con l'RNA dei tre sistemi di test utilizzati. Sembra che AccuBlue mostri la minore interferenza con l'RNA durante la misurazione delle concentrazioni di DNA, il che si adatta all'osservazione.

descritto da altri [34]. Da questi dati, si può presumere che i valori di DNA ottenuti dopo il trattamento con RNasi-A rappresentassero la reale concentrazione di DNA nelle fiale senza RNA interferente. Questo DNA residuo ora "puro" delle singole fiale era compreso tra 32,71 ng e 43,38 ng per dose clinica (Figura 2C). Ciò corrisponde a 1,23 µg - 1,62 µg dsDNA per mg di RNA e quindi supera il limite superiore di DNA dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA) di 4-5 volte (Tabella 2; Figura 2D).

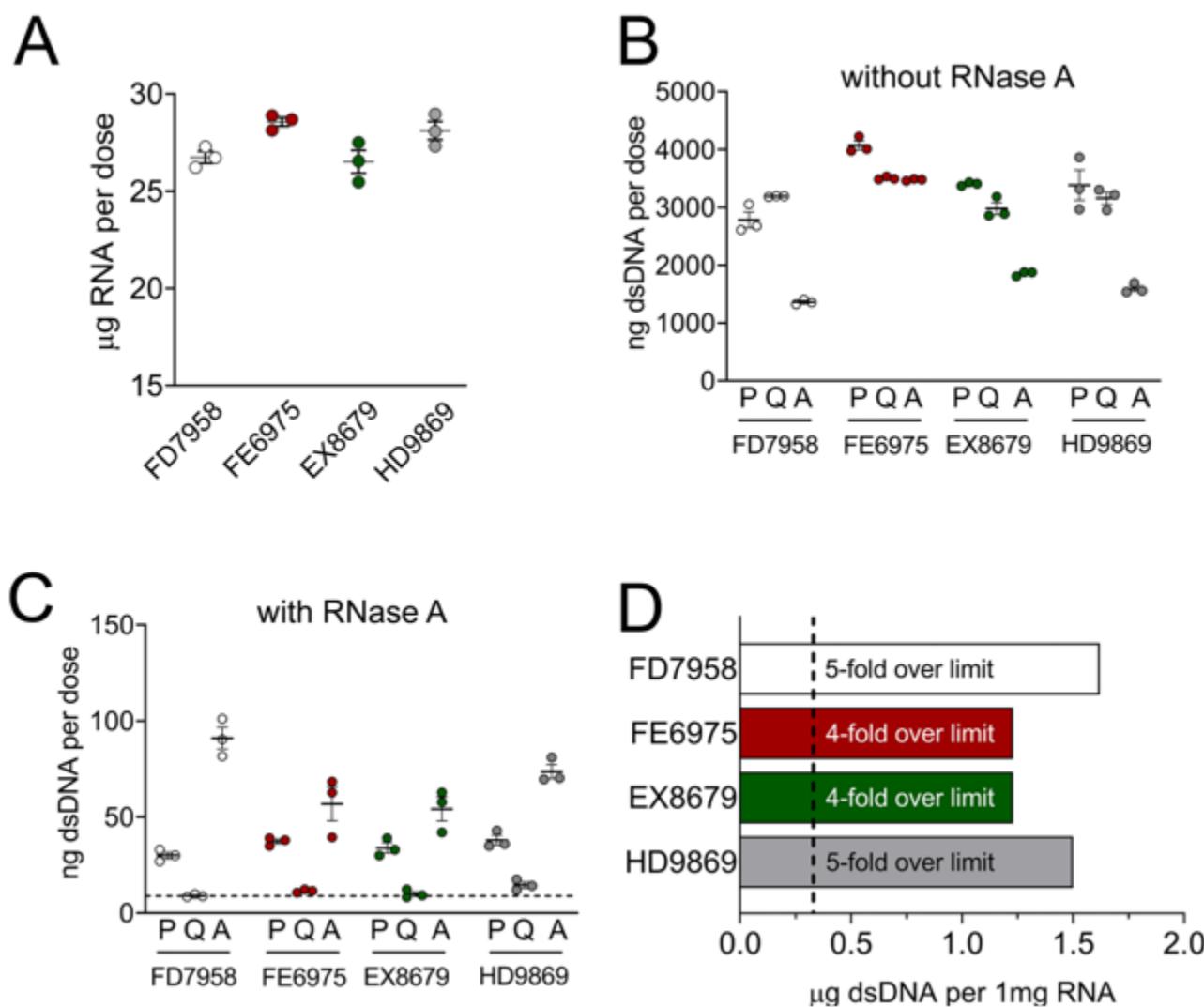


Figura 2. Contenuto di RNA e DNA di diversi prodotti biologici BNT162b2. A: I livelli di modRNA per dose clinica sono stati determinati in fiale mediante Qubit. n=3, media±SEM. BC: Livelli di DNA a doppio filamento (ds) per dose clinica in diverse fiale misurati mediante Picco Green (P), Qubit (Q) e AccuBlue (A) senza RNase A (Figura B) e con trattamento con RNasi A (C). La linea tratteggiata mostra il limite EMA dei livelli di dsDNA consentiti nei prodotti biologici. n=3, media±SEM. D: Rapporto tra il contenuto di dsDNA e RNA delle fiale e il limite superato secondo la normativa EMA di 0,33 mg di dsDNA per 1 mg di RNA (linea tratteggiata). SEM, standard errore della media.

	Without RNase-A		With RNase-A		Factor
	$\mu\text{g} \pm \text{SEM}$ RNA per clinical dose	$\text{ng} \pm \text{SEM}$ dsDNA per clinical dose	$\text{ng} \pm \text{SEM}$ dsDNA per clinical dose	$\mu\text{g dsDNA}$ per mg RNA	
FD7958	26.74 ± 0.31	2446 ± 279.7	43.38 ± 12.42	1.62	5
FE6975	28.57 ± 0.22	3683 ± 99.57	35.25 ± 7.06	1.23	4
EX8679	26.51 ± 0.59	2745 ± 233.1	32.71 ± 6.69	1.23	4
HD9869	28.12 ± 0.47	2712 ± 292.8	42.09 ± 8.69	1.50	5

Tabella 4. Livelli di CRNA e DNA (dopo il trattamento con Triton-X-100) nelle fiale indicate dei lotti BioNTech prima e dopo il trattamento con RNase A. Il fattore rappresenta il moltiplicatore per il superamento del valore limite in conformità con la normativa EMA di 0,33 ug di dsDNA per 1 mg di RNA. SEM, errore standard della media.

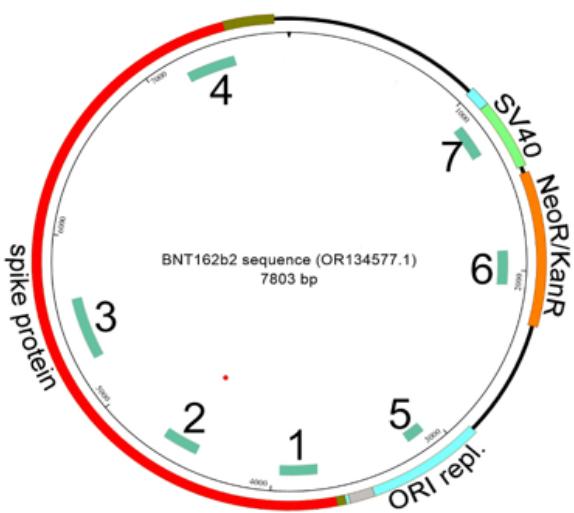
Il DNA residuo contiene elementi plasmidici correlati al processo e viene assorbito dalle cellule

Per determinare se il DNA trovato nelle fiale provenga dal DNA plasmidico utilizzato per il processo di produzione di mRNA, sono state generate coppie di primer contro sequenze di vari geni (promotore/enhancer SV40, cassetta di neomicina, replicone ORI e proteina spike) che rappresentano l'intera mappa del plasmide (Figura 3A). Una fiala contenente il lotto GH9715 è stata utilizzata come controllo positivo, poiché il DNA plasmidico di questo lotto era già stato isolato e sequenziato [21,22] e confermato come riferibile alla sequenza plasmidica BNT162b2 (GenBank PP544445.1, GenBank PP544446.1, GenBank MQ287666.1 che rappresenta la sequenza 16 del brevetto WO2021214204) pubblicato da BioNTech. McKernan è stato in grado di dimostrare che il DNA identificato era effettivamente il DNA plasmidico richiesto per il processo di produzione di mRNA. Il controllo positivo ha mostrato un frammento di DNA della dimensione corretta per tutte le coppie di primer (Figura 3B). Il controllo negativo (acqua) ha rivelato

nessun segnale. È interessante notare che tutte e quattro le fiale testate a una diluizione di 1:10 hanno mostrato segnali forti per tutti i frammenti di DNA dei diversi geni.

Per verificare se le cellule HEK293 nel nostro sistema fossero state trasfettate non solo con l'RNA del vaccino (con conseguente espressione del gene spike comprovata), ma anche con DNA plasmidico residuo, il DNA è stato isolato e purificato dalle cellule trasfettate accuratamente lavate e isolate. Come mostrato in Figura 3B, siamo stati in grado di rilevare tutti i prodotti di PCR delle dimensioni corrette, rappresentanti i geni plasmidici studiati, nelle cellule dopo la trasfezione con tutti e quattro i lotti. In linea con le due copie dell'elemento promotore/enhancer di SV40 di 72 bp interconnesse a cassetta nel plasmide (regioni 1041-1185 di GenBank PP544446; Figura 3C), la PCR del promotore/enhancer di SV40 ha prodotto due ampliconi delle dimensioni attese (Figura 3D). Questi segnali positivi erano possibili anche con solo l'1-10% della quantità di DNA normalmente utilizzata nella reazione di PCR (Figura 3B).

A



B

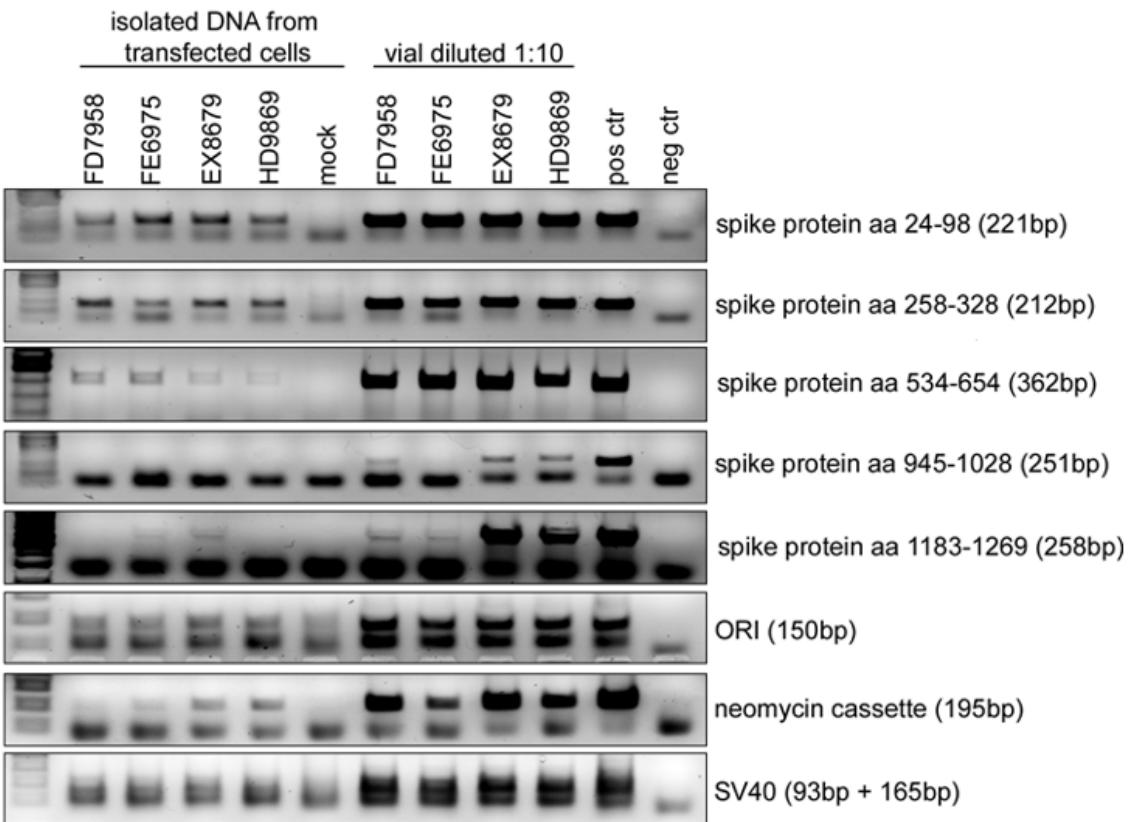
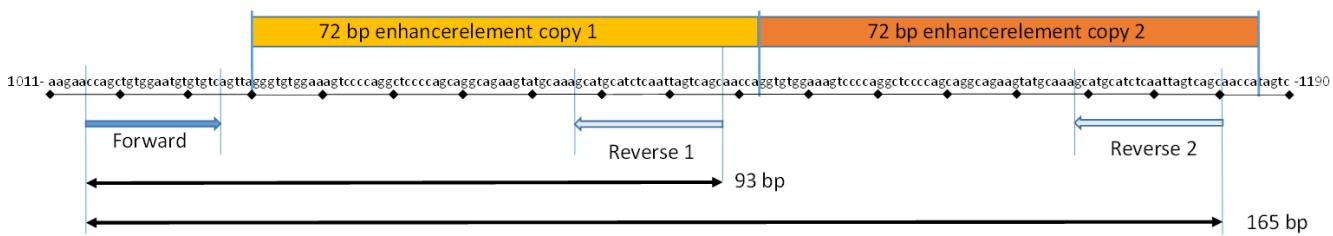


Figura 3A e 3B. La reazione a catena della polimerasi (PCR) rivela il DNA residuo del plasmide completo utilizzato nel processo di produzione del modRNA. A: Rappresentazione schematica del plasmide di DNA utilizzato da BioNTech come stampo per la produzione del modRNA.

Le sequenze specifiche (promotore/potenziatore SV40; cassetta resistente alla neomicina, replicone ORI, proteina spike) sono evidenziate a colori, così come le sequenze utilizzate per rilevare questi geni, che sono numerate da 1 a 7. B: I frammenti di DNA visualizzati dopo la PCR delle sequenze indicate (Figura A, 1-7) mostrano il rilevamento di tutti i geni dal plasmide di DNA nelle fiale (a destra, diluito 1:10 prima del caricamento nella PCR) e nelle preparazioni plasmidiche da cellule transfettate con questi biologici (a sinistra). Supporti fittizi per cellule non transfettate come controllo negativo per la parte sinistra e acqua come controllo negativo per la parte destra. Lotto GH9715 servito come controllo positivo.

C



D

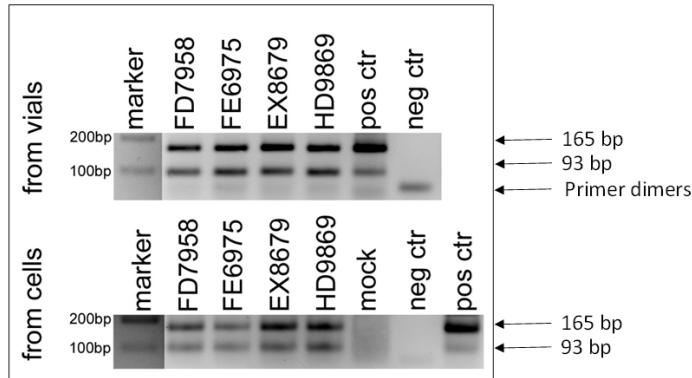


Figure 3C e 3D. La reazione a catena della polimerasi (PCR) rivela il DNA residuo dell'elemento SV40 di 72 bp nel modRNA. C: Mappa di la regione promotore/enhancer SV40 mostra le due copie dell'elemento 72bp che risultano nei due ampliconi visibili nella PCR dovuta a due siti di legame del primer inverso in combinazione con il singolo sito di legame del primer diretto. D: PCR aggiuntiva per il promotore/enhancer SV40 (stesse condizioni PCR della Figura 3B, ad eccezione di un tempo di esecuzione più lungo) al fine di separare e visualizzare meglio i due ampliconi a 165 bp e 93 bp.

Discussione

Abbiamo analizzato il contenuto di acido nucleico di quattro fiale di BNT162b2 (Comirnaty) distribuite in Germania e abbiamo scoperto che la concentrazione di RNA corrisponde alle specifiche del produttore di 30 µg per dose clinica, dimostrando l'accuratezza della nostra analisi. Inoltre, abbiamo identificato DNA residuo, incluso DNA plasmidico, in quantità simili a quelle riportate da McKernan et al. [21,22] per i lotti US-Pfizer. Le concentrazioni di DNA nelle fiale analizzate in questo studio variavano da 32,7 a 43,4 ng per dose clinica dopo l'eliminazione dell'RNA tramite digestione con RNasi. Questo supera di gran lunga il limite massimo di 10 ng per dose clinica, che l'OMS ha dichiarato tollerabile nei biologici iniettabili [35].

Per consentire l'analisi del contenuto totale di DNA presente nelle fiale, abbiamo eseguito il test Triton-

Trattamento con X-100 per aprire l'LNP. Il confronto tra le soluzioni di vaccino non trattate e le aliquote appaiate trattate con Triton-X-100 ha mostrato un aumento da 1,6 a 6,7 volte del contenuto di DNA, che probabilmente riflette un'elevata variabilità nell'impacchettamento dell'LNP dei residui di DNA durante il processo di produzione. I nostri risultati sono in accordo con i dati di Raoult [36], che ha recentemente riportato un chiaro aumento del contenuto di DNA dopo l'apertura dell'LNP in un lotto Comirnaty. La quantità di DNA residuo, rilasciata dall'LNP mediante trattamento con Triton-X-100, analizzata in questo studio è inferiore a quella riportata di recente [27]. Sospettiamo che ciò possa essere dovuto all'interazione incrociata dell'RNA con i coloranti intercalanti [37]. Infatti, quando i campioni sono stati trattati con RNAse, le concentrazioni di DNA sono state notevolmente ridotte, sebbene a livelli che rimanevano comunque molte volte al di sopra dei limiti ritenuti accettabili per il DNA nudo. In una recente preprint [38], il DNA correlato al prodotto

È stato riportato che le impurità in BNT162b2 coincidono con le specifiche di mRNA approvate. Tuttavia, gli autori hanno eseguito un ulteriore passaggio di precipitazione con etanolo prima dell'analisi Qubit, che è noto per precipitare in modo inefficiente brevi sequenze di DNA che rappresentano la maggior parte del DNA reminiscente dopo la sedigestione del DNA durante il processo di produzione. Questo approccio ha comportato un'elevata variabilità intra-lotto della quantità di RNA calcolata in due lotti Comirnaty. Mentre i nostri risultati (ottenuti senza precipitazione con etanolo) hanno mostrato solo una bassa dispersione tra i lotti e un contenuto di RNA quasi identico e prossimo al contenuto di 30 µg specificato per dose, il contenuto di RNA calcolato da Kaiser et al. [38] era molto più basso, con un massimo di 20 µg per dose. Ciò suggerisce che probabilmente hanno perso una quantità considerevole di acidi nucleici durante la preparazione del campione. Come nel caso della bassa concentrazione di RNA risultante, anche l'analisi del DNA ha prodotto concentrazioni decisamente troppo basse e non rappresenta il reale contenuto di DNA residuo se confrontato con la concentrazione iniziale di DNA nelle fiale (libere e confezionate in LNP) prima delle perdite nelle fasi di precipitazione, lavaggio e risoluzione.

È importante notare che i valori limite ufficiali per il DNA residuo nei prodotti biologici sono definiti per anticorpi, vaccini attenuati e soluzioni proteiche, ma non per le iniezioni di RNA e, cosa ancora più importante, per gli acidi nucleici confezionati in reagenti di trasfezione come le nanoparticelle lipidiche, che sono state utilizzate per la prima volta nelle iniezioni di COVID-19 [39]. In effetti, non esiste alcuna prova scientifica che consenta di definire un livello di sicurezza del DNA residuo in tali iniettabili.

Ancora più preoccupante è l'identificazione di sequenze geniche che rivelano residui dei lotti BNT162b2 con DNA plasmidico che è stato impiegato come sistema di espressione nel processo di produzione [9]. Originariamente, la presenza di plasmidi intatti è stata dimostrata da McKernan e colleghi [21,22]

In esperimenti di trasformazione, in cui la resistenza alla kanamicina codificata da plasmidi è stata conferita a E. coli ricevente. Tuttavia, la questione complementare se la trasfezione di cellule umane possa verificarsi anche in colture cellulari non è stata ancora affrontata. Dopo la trasfezione di colture cellulari senza ulteriori reagenti di trasfezione, sequenze derivate da plasmidi come il kanamicingene e il promotore/enhancer SV 40 potrebbero essere successivamente reisolate dalle cellule trasfettate, suggerendo che l'impacchettamento in nanoparticelle lipidiche e la trasfezione nelle cellule si siano verificati, poiché il DNA libero e non impacchettato non verrebbe assorbito dalle cellule. L'assorbimento cellulare non è quindi seguito da una rapida degradazione e disperdibilità del plasmide-DNA. Sebbene ulteriori indagini debbano chiarire se il DNA plasmidico residuo possa anche fungere da modello per la generazione di proteine funzionali nella cellula, i nostri risultati non lasciano dubbi sul fatto che il DNA plasmidico residuo e i frammenti da esso derivati, contenuti nei biologici dell'RNA, entreranno in miriadi di cellule nei riceventi umani. Non siamo stati in grado di dimostrare se alcune delle cellule trasfettate contenessero i plasmidi intatti, tuttavia, la presenza della regione promotore/enhancer SV40 identificata è altamente preoccupante indipendentemente dalla presenza del plasmide [23,40,41].

Le nostre analisi molecolari dei componenti plasmidici hanno confermato i dati riportati da McKernan e colleghi [21,22], ovvero la presenza di una sequenza di DNA del promotore/enhancer di SV40. Questa sequenza non era stata dichiarata nella mappa plasmidica presentata da BioNTech/Pfizer nella procedura di approvazione [42, pagina 24]. Questa scoperta è molto sorprendente e solleva una domanda legittima: perché BioNTech/Pfizer ha applicato questo elemento totalmente inutile ma altamente pericoloso nei propri plasmidi e lo ha utilizzato come stampo per la produzione di modRNA? A nostro avviso, BioNTech/Pfizer deve essere ritenuta responsabile per aver incorporato questo elemento altamente pericoloso nei propri plasmidi.

Per progettazione, i plasmidi utilizzati da BioNTech e Pfizer sono i cosiddetti vettori shuttle. Contengono siti di clonazione e segnali di poliadenilazione, nonché elementi necessari per la replicazione e la traduzione nei sistemi batterici, come il promotore del fago T7, e in aggiunta un elemento promotore/enhancer per consentire l'inizio della trascrizione nelle cellule eucariotiche, che di solito deriva da virus come CMV o SV40. Uno dei primi vettori shuttle, che è servito come una sorta di prototipo per l'attuale plasmide BioNTech/Pfizer, è stato stabilito già nel 1988 [43]. Un componente SV40 simile contenente vettori di espressione di mammiferi [Addgene: pcDNA3.1 SARS-CoV-2 S D614, tuttavia, senza i componenti batterici], è stato utilizzato già nel 2020 per l'analisi delle funzioni della proteina spike nelle linee cellulari umane [44].

Secondo il processo di generazione ufficiale dell'RNA che codifica per la proteina spike, non è necessario alcun promotore/enhancer eucariotico, poiché l'intero processo-2 viene eseguito *in vitro* nel batterico *Escherichia coli*sistema. Inoltre, tra i potenti elementi promotori/enhancer virali disponibili, come CMV, Bakulovirus e RSV, l'elemento SV40 è il più pericoloso per l'integrità delle cellule bersaglio poiché molto prima dello sviluppo di RNA biologici, è stato dimostrato che il frammento promotore/enhancer SV40 di 72 bp facilita il trasporto massimo del DNA plasmidico nel nucleo delle cellule trasfettate [23,41], una caratteristica non riscontrata negli elementi CMV e RSV. Esplicitamente, un aspetto dovrebbe far suonare il campanello d'allarme espresso da Dean et al. [23]: "L'inclusione di questa sequenza SV40 in vettori non virali può aumentare notevolmente la loro capacità di essere trasportati nel nucleo, soprattutto nelle cellule non in divisione". Questo trasporto di plasmidi contenenti l'elemento promotore/enhancer SV40 nel nucleo è stato riscontrato per un'ampia varietà di tipi cellulari testati [45], portando alla promozione dell'elemento promotore/enhancer SV 4 0 per approcci di terapia genica altamente efficaci. Il rilevamento di questo SV40

sequenze promotore/potenziatore solleva la questione di quale intenzione avessero i produttori quando hanno selezionato un sistema di espressione contenente questo elemento attivo delle cellule di mammifero invece di selezionare un sistema di espressione procariotico puro per il processo di produzione.

Infine, dimostriamo che le cellule trasfettate sono in grado di produrre e secernere proteine spike. Non abbiamo utilizzato altre sostanze che potenziano la trasfezione in nessuna delle trasfezioni. Questo ci ha permesso di analizzare il trasferimento genico diretto della sostanza pura dalle nanoparticelle lipidiche come "reagente di trasfezione" nelle cellule ospiti, simulando la situazione negli individui vaccinati. È noto che una somministrazione aggiuntiva di potenziatori di trasfezione, come l'apolipoproteina E3 (ApoE3), che si lega al colesterolo dell'involucro lipidico dell'LNP e quindi facilita l'assorbimento dell'LNP nelle cellule attraverso i recettori ApoE3, avrebbe portato a una maggiore efficienza di trasfezione. L'efficienza di trasfezione può anche essere aumentata cambiando la linea cellulare bersaglio o aumentando la somministrazione di LNP. I nostri valori misurati delle concentrazioni di spike intracellulari ed extracellulari si riferiscono quindi solo alle cellule HEK293 con i parametri specificati, descritti in dettaglio nella sezione metodi. Dopo la trasfezione, le nostre cellule hanno mostrato grandi vescicole intracellulari che rappresentano una chiara caratteristica di compromissione della salute cellulare dopo l'assorbimento del modRNA contenente LNP. L'involucro di quest'ultimo è costituito da quattro componenti lipidici. In particolare, il gruppo di lipidi cationici (ionizzabili) è ben noto per il suo effetto tossico e pro-infiammatorio sulle cellule sia *in vitro* che *in vivo* [46]. Attualmente non è noto quanti e quali tipi di cellule nel corpo siano interessati, ma è stato riportato che l'LNP si diffonde in tutto il corpo e il modRNA si trova in tutti gli organi esaminati [9]. Abbiamo scoperto che la produzione di proteine spike dura per molti giorni. Dopo una settimana, nelle cellule sono presenti ancora più proteine spike rispetto a dopo 24 ore, sebbene

Il livello più alto di modRNA è previsto dopo 24 ore, prima che venga degradato. La quantità di proteine spike prodotte variava tra i lotti, ma la progressione nel tempo era identica per tutti, con un picco il 5° giorno dopo la trasfezione. Abbiamo anche dimostrato che il livello di produzione è correlato alla quantità di modRNA iniettato, poiché il lotto HD9869 rivela un livello di proteine spike significativamente inferiore rispetto agli altri tre lotti. Ciò è dovuto al fatto che HD9869 è un vaccino bivalente costituito da due diversi modRNA per due diverse varianti di proteine spike, ovvero la variante di Wuhan e la variante di Omicron. Poiché il test ELISA applicato in questo studio rileva solo la variante di Wuhan, le proteine spike prodotte dalla variante di Omicron non sono rilevabili e otteniamo valori inferiori rispetto ai tre vaccini monovalenti con la sola variante di Wuhan.

Utilizzando la spettrometria di massa, siamo stati in grado di dimostrare che le proteine spike vengono rilasciate nel mezzo quasi esclusivamente tramite esosomi. In caso di una situazione in vivo, ciò significherebbe che le proteine spike vengono trasportate all'interno degli esosomi verso altri tessuti e organi attraverso il flusso sanguigno e, di conseguenza, assorbite dalle cellule bersaglio. Infatti, è già stato riportato che le proteine spike possono essere trovate negli esosomi di individui vaccinati [10]. Le funzioni degli esosomi sono molteplici. Servono principalmente come piattaforma di comunicazione tra cellule dello stesso tessuto e tra cellule di organi diversi. Gli esosomi vengono facilmente assorbiti dalle cellule bersaglio attraverso vari meccanismi e il contenuto entra quindi nella cellula bersaglio e induce una risposta strutturale e funzionale [47]. Nel caso di BNT162b2, si può presumere che le proteine spike possano essere trasferite e assorbite da un tessuto all'altro in questo modo, indipendentemente dalla presenza di LNP o modRNA. Non è stato ancora studiato se le cellule bersaglio siano danneggiate dall'assorbimento di esosomi contenenti proteine spike. Tuttavia, questa potente capacità di trasfezione fa scattare l'allarme alla luce dello sfondo del co-trasfettato

DNA residuo e in particolare gli elementi promotori/enhancer SV 4 0 del materiale primario, il plasmide. In esperimenti preliminari, un altro lotto di BNT162b2 è stato in grado di trasfettare cellule di cancro ovarico e qui, parti del materiale di acido nucleico trasfettato sono state effettivamente trovate, mediante sequenziamento dell'intero genoma, integrate nei cromosomi 9 e 12 delle cellule [48].

La sequenza del modRNA mostra che la sequenza leader per la traduzione della proteina spike nel lume del reticolo endoplasmatico e la sequenza per l'ancora di membrana non sono state rimosse dal modRNA. Di conseguenza, le proteine spike prodotte sono espresse prevalentemente sulla superficie cellulare. Secondo BioNTech, il modRNA viene tradotto nel citosol [49]. Ciò significherebbe che le proteine spike rimangono all'interno delle cellule e non sono presentate come proteine a lunghezza intera sulla superficie cellulare. Tuttavia, ciò contraddice la funzione di una sequenza leader e di una sequenza di ancoraggio all'interno dell'RNA in altre proteine di membrana. Anche la possibilità di rilascio delle proteine spike non è stata considerata da BioNTech [49].

Limiti dello studio e variabilità dei dati

Abbiamo utilizzato repliche tecniche e biologiche (ove appropriato) per riprodurre i nostri risultati e determinare la variabilità. Poiché la variabilità per ciascun esperimento era ridotta all'interno di un gruppo, possiamo escludere artefatti tecnici. Avevamo accesso solo a pochi lotti, ma li abbiamo considerati sufficienti per dimostrare il problema fondamentale del DNA residuo e della trasfezione cellulare da parte dei "vaccini a RNA". Al momento dell'esecuzione degli esperimenti (2023), la data di scadenza dei tre lotti di vaccino monovalente specificata dal produttore era già trascorsa. Poiché le fiale venivano conservate sempre chiuse a - 80 °C e che la data di scadenza è stata prorogata ufficialmente più volte dal tedesco Paul Ehrlich

Institute (PEI) [50: 10 settembre 2021 da 6 a 9 mesi; 51: 24 marzo / 4 aprile 2022 da 9 a 12 mesi; 52: 2 dicembre 2022 da 12 a 18 mesi], non prevediamo effetti negativi sui nostri risultati. Non possiamo escludere che i vaccini contengano e trasfettino anche RNA a doppio filamento (dsRNA) stabile e ibridi RNA:DNA in parallelo al modRNA a singolo filamento e al DNA vettoriale. Inoltre, non siamo in grado di mappare completamente la tossicità dell'LNP su diversi tipi di cellule. Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato una linea cellulare renale embrionale umana relativamente robusta, immortalizzata e quindi in grado di resistere a sostanze tossiche fino a un certo livello. Sono necessari ulteriori studi per testare, ad esempio, colture cellulari primarie come cellule neuronali primarie o cellule immunitarie, che reagirebbero in modo molto più sensibile all'LNP. Poiché è noto che gli LNP sono distribuiti in tutto il corpo e quindi probabilmente influenzano tutti i tipi di cellule, è necessario condurre ulteriori studi *in vitro* sulla tossicità, sul comportamento di espressione e sull'analisi del proteoma.

Conclusione

Abbiamo dimostrato che la trasfezione della linea cellulare umana HEK293 con quattro diversi lotti di BNT162b2 determina la produzione di proteine spike nell'arco di diversi giorni, che vengono rilasciate nel supernatante cellulare tramite esosomi. Abbiamo rilevato DNA plasmidico residuo in tutte le fiale a concentrazioni di gran lunga superiori al limite EMA consentito di 0,33 ng di dsDNA per 1 mg di RNA. Abbiamo identificato tutti i geni plasmidici e le due copie dell'elemento promotore/enhancer di 72 bp di SV40. È stato dimostrato che il DNA penetra e persiste nelle cellule.

Già prima dell'inizio della campagna vaccinale governativa, medici e scienziati avevano sottolineato che gli agenti genetici avrebbero scatenato gravi eventi avversi. Nel frattempo, lo spettro degli eventi avversi collaterali è...

diventano così sfaccettati che il termine "spikeopatia" è stato creato per indicare il nuovo complesso di malattie [53]. I pericoli eterni di tutti i biologici a RNA sono 4: in primo luogo, il modRNA che codifica qualsiasi proteina estranea innescherà reazioni autoimmuni dannose [54]. In secondo luogo, le nanoparticelle lipidiche sono esse stesse altamente tossiche [55]. In terzo luogo, il DNA plasmidico residuo e l'mRNA trascritto inversamente modificheranno geneticamente le cellule. In quarto luogo, la sostituzione dell'uridina nell'mRNA naturale con N1-metil-pseudouridina nel modRNA sintetico causa uno spostamento di frame ribosomiale +1 con conseguente produzione casuale di proteine completamente estranee [56].

I nostri risultati confermano e ampliano i rapporti pubblicati e sollevano gravi preoccupazioni circa la sicurezza del vaccino BNT162b2. Chiediamo l'immediata sospensione di tutti i prodotti biologici a base di RNA fino a quando queste preoccupazioni non saranno affrontate scientificamente e dissipate in modo convincente.

Ringraziamenti

Ringraziamo il Proteomics Core Facility dell'Amsterdam UMC nei Paesi Bassi per il supporto alla spettrometria di massa e Maarten Fornerod per aver analizzato i dati della spettrometria di massa per determinare l'abbondanza di plasmidi e peptidi ORF alternativi.

Contributi degli autori: Concettualizzazione, Regno Unito, VS e KS; metodologia, Regno Unito e VS; software, VS; convalida, Regno Unito e VS; analisi formale, Regno Unito, VS e KS; indagine, Regno Unito e VS; risorse, Regno Unito e VS; cura dei dati, Regno Unito e VS; scrittura - preparazione della bozza originale, Regno Unito, VS e KS; scrittura - revisione e modifica, Regno Unito, VS e KS; visualizzazione, Regno Unito e VS; supervisione, Regno Unito, VS e KS; amministrazione del progetto, VS e KS; Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Questa ricerca non ha ricevuto finanziamenti esterni.

Conflitti di interesse: Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Riferimenti

- 1.** Winch, GM, Cao, D., Maytorena-Sanchez, E., Pinto, J., Sergeeva, N., Zhang, S. Operation Warp Speed: Progetti in risposta alla pandemia di COVID-19. Project Leadership and Society. 2:100019. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plas.2021.100019>
- 2.** Operazione Warp Speed. 2021. Disponibile online: <https://www.gao.gov/products/gao-21-319> (consultato il 25.06.2024)
- 3.** Türeci, Ö., Sahin, U. Projekt Lightspeed (tedesco). 2021. ISBN10 3498002775.
- 4.** Progetto Velocità della luce. 2020. Disponibile online: https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/EN/newsroom-en/dossiers/ppt-erste-studie-sars-cov-2-impfstoff-en.pdf?__blob=publicationFile&v=2 (accesso il 25.06.2024)
- 5.** Francia 24. 2020. Disponibile online: <https://www.pfizer.com/science/innovation/mrna-technology> (consultato il 25.06.2024)
- 6.** Pagina web BioNTech. <https://www.biontech.com/int/en/home/pipeline-andproducts/platforms/our-mrna-platforms.html>
- 7.** Pagina web Pfizer. <https://www.pfizer.com/science/innovation/mrna-technology>
- 8.** Il vaccino della vita. Disponibile online: https://www.pfizer.com/news/articles/shot_of_a_lifetime_how_pfizer_and_biontech_developed_and_launched_a_covid_19_vaccine_in_record_time (consultato il 24.06.2024)
- 9.** Rapporto di valutazione dell'EMA. 2021. Disponibile online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessmentreport_en.pdf (consultato il 25.06.2024)
- 10.** Bansal, S., Perincheri, S., Fleming, T., Poulsom, C., Tiffany, B., Bremner, RM, Mohanakumar, T. Cutting Edge: Gli esosomi circolanti con la proteina spike del COVID sono indotti dal vaccino BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) prima dello sviluppo di anticorpi: un nuovo meccanismo per l'attivazione immunitaria da parte dei vaccini a mRNA. *Journal of Immunology*. 207:2405-2410. 2021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>
- 11.** Mörz, M. Rapporto di un caso: encefalite necrotizzante multifocale e miocardite dopo vaccinazione con mRNA BNT162b2 contro COVID-19. *Vaccini*. 10:1651. 2022. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101651>
- 12.** Hanna, N., Lin, X., Thomas, K., Vintzileos, A., Chavez, M., Palaia, T., Ragolia, L., Verma, S., Khullar, P., Hanna, I. Sottostima dell'infezione da SARS-CoV-2 nei campioni placentari. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 225:572-575.e1. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.07.010>
- 13.** Dhuli, K., Medori, MC, Micheletti, C., Donato, K., Fioretti, F., Calzoni, A., Praderio, A., De Angelis, MG, Arabia, G., Cristoni, S., Nodari, S., Bertelli, M. Presenza della proteina spike virale e della proteina spike vaccinale nel siero sanguigno di pazienti con sindrome da COVID-19 prolungato. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 27 (Suppl. 6):13-19. 2023.

Italiano: https://doi.org/10.26355/eurrev_202312_34685
- 14.** Sahin, U., Karikó, K., Türeci, Ö. Terapie basate sull'mRNA: sviluppo di una nuova classe di farmaci. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13:759-780. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>
- 15.** Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D. Soppressione del riconoscimento dell'RNA da parte dei recettori Toll-like: l'impatto della modifica dei nucleosidi e l'origine evolutiva dell'RNA. *Immunità*. 23:165-175. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2005.06.008>

- 16.**Granados-Riveron, JT, Aquino-Jarquin, G. Progettazione degli attuali vaccini mRNA-LNP modificati con nucleosidi contro SARS-CoV-2. Biomedicina e farmacoterapia. 142. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111953>
- 17.**Zhang, L., Richards, A., Barrasa, MI, Jaenisch, R. L'RNA del SARS-CoV-2 retrotrascritto può integrarsi nel genoma delle cellule umane coltivate e può essere espresso nei tessuti derivati dai pazienti. Proceedings of the National Academy of Sciences. 118:e2105968118. 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105968118>
- 18.**Alden, M., Olofsson Falla, F., Yang, D., Barghouth, M., Luan, C., Rasmussen, M., De Marinis, Y. Trascrizione inversa intracellulare del vaccino mRNA BNT162b2 di Pfizer BioNTech contro il COVID-19 in vitro su una linea cellulare epatica umana. Current Issues in Molecular Biology. 44:1115-1126. 2022. <https://doi.org/10.3390/cimb44030073>
- 19.**Sutton, DH, Conn, GL, Brown, T., Lane, AN La dipendenza dell'attività della DNasi I dalla conformazione degli oligodesossinucleotidi. Biochemical Journal. 321:481-486. 1997. <https://doi.org/10.1042/bj3210481>
- 20.**Pagina web Thermofisher. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support-nucleasi-enzimi/articoli-general/dnasi-idemystified.html>
- 21.**McKernan, K. I vaccini bivalenti Pfizer e Moderna contengono il 20-35% di vettore di espressione e sono competenti nella trasformazione in E. coli. 2023. <https://anandamide.substack.com/p/pfizer-and-moderna-bivalent-vaccines>
- 22.**McKernan, K., Helbert, Y., Kane, LT, McLaughlin, S. Il sequenziamento dei vaccini bivalenti Moderna e Pfizer mRNA rivela quantità di dsDNA del vettore di espressione da nanogrammi a microgrammi per dose. OSF Preprints. 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110443>
- 23.**Dean, DA, Dean, BS, Muller, S., Smith, LC Requisiti di sequenza per l'importazione nucleare di plasmidi. Experimental Cell Research. 253:713-722. 1999. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4716>
- 24.**Il sequenziamento dei vaccini monovalenti a mRNA della Pfizer rivela anche la doppia copia del promotore SV40 da 72 bp. 2023. <https://anandamide.substack.com/p/sequencing-the-pfizer-monovalent>
- 25.**25. qPCR mirata al vaccino di linee cellulari tumorali trattate con BNT162b2. 2024. <https://anandamide.substack.com/p/vaccine-targeted-qpcr-della-cellula-cancerosa>
- 26.**Speicher, DJ, Rose, J., Gutschi, LM, Wiseman, DM, McKernan, K. Frammenti di DNA rilevati nei vaccini monovalenti e bivalenti Pfizer/BioNTech e Moderna modRNA COVID-19 provenienti dall'Ontario, Canada: relazione esplorativa dose-risposta con eventi avversi gravi. OSF Preprints. 2023 <https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97>
- 27.**König, B., Kirchner, JO Considerazioni metodologiche sulla quantificazione delle impurità del DNA nel vaccino mRNA contro il COVID-19. Metodi e protocolli. 7:41. 2024. <https://doi.org/10.3390/mps7030041>
- 28.**Ghosh, AA, Davey, M., Chute, IC, Griffiths, SG, Lewis, S., Chacko, S., Barnett, D., Crapoulet, N., Fournier, S., Joy, A., Caissie, MC, Ferguson, AD, Daigle, M., Meli, MV, Lewis, SM, Ouellette, RJ Isolamento rapido di vescicole extracellulari da colture cellulari e fluidi biologici utilizzando un peptide sintetico con affinità specifica per le proteine da shock termico. PLoS One. e110443. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110443>
- 29.**Knol, JC, de Reus, I, Schelfhorst, T., Beekhof, R., De Wit, M., Piersma, SR, Pham, TV, Smit, EF, Verheul, HMW, Jiménez, CR Mediata da peptidi

L'isolamento "miniprep" delle vescicole extracellulari è adatto per la proteomica ad alto rendimento. European Proteomics Association Open Proteomics. 11:11-15. 2016 <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2016.02.001>

30.Piersma, SR, Warmoes, MO, De Wit, M., De Reus, I., Knol, JC, Jiménez, CR Procedura di elaborazione del gel intero per proteomica basata su GeLC-MS/MS. Scienza del proteoma. 11:17. 2013. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-17>

31.Garcia de Durango, CR, Monteiro, MN, Bijnsdorp, IV, Pham, TV, De Wit, M., Piersma, SR, Knol, JC, Pérez-Gordo, M., Fijneman, RJA, Vidal-Vanaclocha, F., Jimenez, CR
Secrezione di proteine solubili e vescicolari regolata da lipopolisaccaridi da un pannello di linee cellulari di cancro del colon-retto. Applicazioni cliniche della proteomica. 15:1900119. 2021.
<https://doi.org/10.1002/prca.201900119>

32.Liu, H., Sadygov, RG, Yates, JR Un modello per il campionamento casuale e la stima dell'abbondanza relativa di proteine nella proteomica shotgun. Chimica analitica. 76:4193-4201. 2004.
<https://doi.org/10.1021/ac0498563>

33.Kim, TK, Eberwine, JH Trasfezione di cellule di mammifero: presente e futuro. Chimica analitica e bioanalitica. 397:3173-3178. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>

34.Bruijns, BB, Tiggelaar, RM, Gardeniers, JGE Coloranti fluorescenti alla cianina per la quantificazione di basse quantità di dsDNA. Biochimica analitica. 511:74-79. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.022>

35.Rapporto della riunione dell'OMS. Gruppo di studio sui substrati cellulari per la produzione di prodotti biologici. 1-30 2007. Disponibile online:
https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrati/cellule.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf
(consultato il 25.06.2024)

36.Raoult, D. Conferma della presenza di DNA vaccinale nel vaccino Pfizer anti-COVID-19. Preprint 2024. <https://hal.science/hal-04778576v1>

37.Jones, LJ, Yue, ST, Cheung, CY, Singer, VL Quantificazione dell'RNA mediante saggio in soluzione basato sulla fluorescenza: caratterizzazione del reagente RiboGreen. Biochimica analitica. 265:368-374. 1998. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>

38.Kaiser, SM, Kaiser, SR, Reis, J., Marschalek, R. Quantificazione delle concentrazioni oggettive di impurità del DNA nei vaccini a mRNA. Preprint 2024. <https://ssrn.com/abstract=5009375>
<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5009375>

39.Yang, H. Definizione di limiti accettabili per il DNA residuo. Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 67:155-163. 2013.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2013.00910>

40.Graessmann, M., Menne, J., Liebler, M., Graeber, I., Graessmann, A. Attività di supporto per l'espressione genica, una nuova funzione dell'enhancer SV40. Ricerca sugli acidi nucleici. 17:6603-6612. 1989. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6603>

41.Young, JL, Benoit, JN, Dean, DA Effetto di una sequenza di DNA mirata al nucleo sul trasferimento genico e sull'espressione dei plasmidi nel sistema vascolare intatto. Terapia genica 10:1465-1470. 2003.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302021>

42.Relatore: Rolling Review. 2020. Disponibile online:
<https://factreview.gr/wp-content/uploads/2023/07/Rolling-Review-Report-Quality-COVID-19-mRNA-Vaccine-BioNTech.pdf> (consultato il 24.06.2024)

43.Mongkolsuk, S. Nuovi vettori di espressione eucariotici che consentono la replicazione a singolo filamento in Escherichia coli e l'analisi traslazionale in vitro dei geni clonati. Gene. 70:313-319. 1988.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90203-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90203-x)

44.Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, KE,

Tomkins-Tinch, C., Nyalile, TP, Wang, Y., Baum, A., Diehl, WE, Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, SB, Schaffner, SF, Lemieux, JE, Munro, JB, Rafique, A., Barve, A., Sabeti, PC, Kyratsous, CA, Dudkina, NV, Shen, K., Luban, J. Analisi strutturale e funzionale della variante proteica spike D614G del SARS-CoV-2. *Cell.* 183:739-751.E8. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>

45.Vacik, J., Dean, BS, Zimmer, WE, Dean, DA Importazione nucleare specifica delle cellule del DNA plasmidico. *Terapia genica.* 6:1006-1014. 1999.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300924>

46.Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., Igyártó, BZ Il componente nanoparticellare lipidico della piattaforma mRNA-LNP utilizzato negli studi preclinici sui vaccini è altamente infiammatorio. *iScience.* 24:103479. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>

47.Jadli, AS, Ballasy, N., Edalat, P., Patel, VB Dentro (vista) di un piccolo comunicatore: biogenesi, secrezione e assorbimento degli esosomi. *Biochimica molecolare e cellulare.* 467:77-94. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z>

48.McKernan, K. Replicazione del DNA plasmidico nelle linee cellulari vaccinate con BNT162b2. 2024. <https://anandamide.substack.com/p/plasmid-dna-repl ication-in-bnt162b2>

49.MHRA. Rapporto di valutazione pubblica, autorizzazione per la fornitura temporanea, vaccino mRNA COVID-19 BNT162b2 (RNA BNT162b2) concentrato per soluzione iniettabile. 2021. Disponibile online: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/63529601e90e07768265c115/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UKPAR__PFIZER_BIONTECH_Nat al spostamento del frame ribosomiale +1. Nature. 625:189-194. 2024 https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3

50.Istituto Paul-Ehrlich.

<https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2021/211004-comirnaty-vaccine-shelf-life-extended.html>
51.Istituto Paul-Ehrlich. <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2022/220421-comirnaty-shelf-life-extended-to-12-months.html>

52.Istituto Paul-Ehrlich. <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2022/221230-comirnaty-shelf-life-extended.html>

53.Parry, PI, Lefringhausen, A., Turni, C., Neil, CJ, Cosford, R., Hudson, NJ, Gillespie, J. 'Spikeopathy': la proteina Spike del COVID-19 è patogena, sia dal virus che dall'mRNA del vaccino. *Biomedicines.* 11:2287. 2023.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>

54.Polykretis, P., Donzelli, A., Lindsay, JC, Wiseman, D., Kyriakopoulos, AM, Mörz, M., Bellavite, P., Fukushima, M., Seneff, S., McCullough, PA Reazioni infiammatorie autoimmuni innescate dai vaccini genetici COVID-19 nei tessuti terminalmente differenziati. *Autoimmunità.* 56:1. 2023. *Italiano:* <https://doi.org/10.1080/08916934.2023.2259123>

55.Segalla, G. Criticità chimico-fisica e potenziale tossicologico dei nanomateriali lipidici contenuti in un vaccino a mRNA contro il COVID-19. *International Journal of Vaccine Theory Practice and Research.* 3:787-817. 2023.
<https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.68>

56.Mulroney, TE, Pöyry, T., Yam-Puc, JC, Rust, M., Harvey, RF, Kalmar, L., Horner, E., Booth, L., Ferreira, AP, Stoneley, M., Sawarkar, R., Mentzer, AJ, Lilley, KS, Smales, CM, von der Haar, T., Turtle, L., Dunachie, S., Kleinerman, P., Thaventhiran, JED, Willis, AE La metilpseudouridilazione N1 mRNA causa lo spostamento del frame ribosomiale +1. *Nature.* 625:189-194. 2024 <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>