

BioNTech RNA-basierte COVID-19-Injektionen enthalten große Mengen an Rest-DNA, einschließlich einer SV40-Promotor/Enhancer-Sequenz

Ulrike Kämmerer. Verena Schulz. Klaus Steger *

[Peer Reviewed](#), [Klinische Forschung](#)

12/03/2024

[v5.2019-2024](#)

Abstrakt

Hintergrund: BNT162b2 RNA-basierte COVID-19-Injektionen sind dazu bestimmt, menschliche Zellen zu transfizieren, um effizient Spike-Proteine für eine Immunantwort zu produzieren.

Methoden: Wir analysierten vier deutsche BNT162b2-Chargen mittels HEK293-Zellkultur, Immunhistochemie, ELISA, PCR und Massenspektrometrie.

Ergebnisse: Wir demonstrieren die erfolgreiche Transfektion von nukleosidmodifizierter mRNA (modRNA) in HEK293-Zellen und zeigen robuste Konzentrationen von Spike-Proteinen über mehrere Tage der Zellkultur. Die Sekretion in den Zellüberstand erfolgte überwiegend über extrazelluläre Vesikel, die mit Exosomenmarkern angereichert sind. Wir haben den RNA- und DNA-Gehalt dieser Fläschchen weiter analysiert und nach dem RNase-A-Verdau in allen Chargen große DNA-Mengen mit Konzentrationen zwischen 32,7 ng und 43,4 ng pro klinischer Dosis festgestellt. Dies übersteigt bei weitem die von den internationalen Aufsichtsbehörden festgelegte zulässige Höchstkonzentration von 10 ng pro klinischer Dosis. Genanalysen mit ausgewählten PCR-Primerpaaren zeigten, dass die Rest-DNA nicht nur Fragmente der DNA-Matrizen darstellt, die für das Spike-Gen kodieren, sondern von allen Genen des Plasmids einschließlich des SV40-Promotors/Enhancers und des Antibiotikaresistenz-Gens.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse geben Anlass zu ernststen Bedenken hinsichtlich der Sicherheit des BNT162b2-Impfstoffs und fordern einen sofortigen Stopp aller RNA-Biologika, bis diese Bedenken ausgeräumt werden können.

Schlüsselwörter

[BNT162b2](#), [Zelltransfektion](#), [Komirnatie](#), [COVID-19](#), [Plasmid](#), [RNA-Impfstoff](#), [SV40-Promotor/Enhancer](#)

Einführung

Im Jahr 2020 haben politisch geförderte Kampagnen wie "Operation Warp Speed" [1,2] und "Project Lightspeed" [3,4] die Entwicklung einer völlig neuen Klasse von Medikamenten vorangetrieben, mit denen letztlich sieben Milliarden Menschen weltweit gegen COVID-19 geimpft werden sollen [5]. Diese sogenannten "mRNA-Impfstoffe" - im Folgenden als RNA-Injektionen oder RNA-Biologicals bezeichnet - bestehen aus nukleosidmodifizierter mRNA (modRNA), die in transfektionskompetente Lipid-Nanopartikel (LNP) verpackt ist. Der Grundgedanke ist, dass die modRNA, sobald sie in die Zelle gelangt ist, diese dazu zwingt, SARS-CoV-2-Spike-Proteine zu produzieren und auf der Zelloberfläche zu präsentieren, was wiederum das Immunsystem dazu anregt, spezifische Antikörper gegen das präsentierte Spike-Antigen zu bilden [6,7]. Die "Geschwindigkeit der Wissenschaft" [8] und die Nachfrage der Regierungen weltweit stellten die Hersteller vor die Herausforderung, große Mengen an modRNA innerhalb kürzester Zeit zu produzieren. So stieß das anfängliche PCR-basierte Verfahren zur Herstellung der DNA-Matrizen (Prozess-1) für die modRNA-Produktion, das die Zulassung für die klinische Phase-3-Studie erhielt, sehr bald an seine Grenzen, und die Unternehmen gingen zu einer großtechnischen Produktion von DNA-Matrizen über geklonte Shuttle-Vektoren über, die sich in bakteriellen Zellkultursystemen leicht vermehren lassen (Prozess-2) [9]. Ab der Einführung des staatlichen Impfstoffs wurde dieses Prozess-2-Produkt anstelle des ursprünglichen Produkts verwendet.

Bereits 2021 wurde berichtet, dass die modRNA-induzierten Spike-Proteine Wochen nach der Injektion im Blut der Geimpften zirkulierten [10]. Im Jahr 2022 zeigte die erste detaillierte Post-

mortem-Untersuchung das Vorhandensein von impfstoffinduzierten Spike-Proteinen an mehreren Stellen in Gefäßwänden und verschiedenen Geweben Wochen nach der letzten BNT162b2-Injektion [11]. Kürzlich wurden auch in der Plazenta von Frauen, denen während der Schwangerschaft RNA-Biologika injiziert wurden, impfstoffinduzierte Spike-Proteine nachgewiesen [12]. Dhuli und Kollegen berichteten über das Vorhandensein einer Sequenz, die einem Fragment der modRNA entspricht, in Blutzellen von Langzeit-COVID-Patienten mit einer Vorgeschichte von zwei Dosen des BioNTech/Pfizer-Impfstoffs [13]. Wichtig ist, dass die Produktion von Spike-Proteinen durch die Körperzellen nicht auf den Injektionsbereich beschränkt ist und nicht, wie von den Herstellern und den zuständigen Behörden behauptet, innerhalb weniger Tage aufhört. Bisher wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, die zu der bemerkenswert lang anhaltenden Expression von Spike-Proteinen bei geimpften Personen beitragen könnten.

Erstens enthalten Biologicals nukleosidmodifizierte mRNA (modRNA), um ihre Lebensdauer zu verlängern [14], ihre Zerstörung durch Ausschalten der Erkennung durch Toll-like-Rezeptoren zu verringern [15] und ihre Übersetzung zu maximieren. Dies wurde erreicht, indem natürliche Uridine durch synthetische N1-Methyl-Pseudouridine (mPsi) ersetzt und der Gehalt an Guanin und Cytosin erhöht wurde (bekannt als Codon-Optimierung) [6,14,16].

Zweitens kann transfizierte modRNA über einen durch LINE1 (Long Interspersed Nuclear Element-1) vermittelten Mechanismus revers in DNA transkribiert und in das Zellgenom integriert werden, wie Daten aus Transfektionsexperimenten in den menschlichen Zelllinien HEK293T [17] und Huh7 [18] nahelegen.

Drittens können Lipid-Nanopartikel (LNP), die modRNA an die Zellen abgeben, auch DNA enthalten, die aus dem Produktionsprozess stammt, bei dem Spike-codierende DNA als Vorlage für die In-vitro-Transkription von modRNA verwendet wurde. Die verbleibende DNA wird möglicherweise nicht vollständig von der modRNA getrennt und durch Verdauung mit Desoxyribonuclease-I (DNase-I) abgebaut und anschließend zusammen mit der modRNA in die LNP verpackt. Es ist bekannt, dass DNase-I an den Oberflächen von Reaktionsgefäßen haften kann und in Gegenwart von Hybriden aus DNA und RNA eine verminderte Effizienz aufweist [19]. Einem Hersteller zufolge ist es "wahrscheinlich unmöglich, jeden einzelnen DNA-Strang in einer RNA-Präparation zu entfernen" [20]. In Anbetracht der Tatsache, dass die Europäische Arzneimittelagentur und das deutsche Paul-Ehrlich-Institut eine Rest-DNA von 10 ng pro injizierter klinischer Dosis als akzeptabel festgelegt haben (und in der Tat wurde DNA bis zu dieser Grenze in den Zulassungsunterlagen ausgewiesen [9]), ist eine Verpackung dieser DNA in die Lipid-Nanopartikel sehr wahrscheinlich.

Diese Möglichkeit tauchte im Februar 2023 auf, als McKernan und Kollegen die Entdeckung großer Mengen sowohl von Spike-codierender DNA als auch von Restplasmid-DNA aus dem Expressionsvektorsystem in Impfstoffchargen von BioNTech/Pfizer und Moderna bekannt gaben [21,22]. Dabei handelte es sich größtenteils um fragmentierte, linearisierte DNA, aber auch um intakte Plasmide, die erfolgreich E. coli-Zellen transfizieren konnten [21,22]. Unter der Annahme, dass diese intakten Plasmide zusammen mit der modRNA in der LNP verpackt wurden, könnten stabile Expressionsvektoren in die Zellen gelangen und somit eine reichhaltige Quelle für eine lang anhaltende Spike-Produktion darstellen, falls die Zellen in der Lage sind, die kodierte Spike-Region zu transkribieren. Unverständlicherweise enthalten die Plasmide von BioNTech/Pfizer, nicht aber von Moderna, nicht nur das bakterielle T7-Promotorsystem, sondern auch die Promotor/Enhancer-Sequenz des Simian Virus 40 (SV40) von Säugetieren [23-25]. Dies ist besorgniserregend, denn bereits 1999 wiesen Dean und Kollegen nach, dass der Eintritt von Plasmid-DNA in den Zellkern, insbesondere in sich nicht teilenden Zellen, eine 72 bp-Sequenz des SV40-Promotors/Enhancers erfordert [23]. Bemerkenswert ist, dass weder der Promotor noch der Replikationsursprung für die Kernlokalisierung von Plasmid-DNA erforderlich sind [23]. Inzwischen wurden die Ergebnisse des McKernan-Teams bestätigt und erweitert [26]. Kürzlich veröffentlichten König und Kirchner Daten über große Mengen an Rest-DNA in mehreren BNT162b2-Partien [27].

Vor diesem Hintergrund haben wir eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die folgenden dringenden Fragen zu beantworten. Erstens: Kann die große Menge an Rest-DNA in BioNTech-Chargen [27] und sogar Plasmide, die in Pfizer-Chargen [21,22] identifiziert wurden, nur in BioNTech-Chargen (BNT162b2, Comirnaty), die in Deutschland vertrieben werden, durch verschiedene vergleichbare DNA-Nachweisverfahren bestätigt werden? Zweitens: Können restliche Plasmide oder DNA-Fragmente, falls vorhanden, zusammen mit der kodierenden modRNA effizient in menschliche Zellen transfiziert werden? Drittens: Können diese Biologicals eine anhaltende zelluläre Expression des Spike-Proteins induzieren und so langfristige Herde für den Immunangriff schaffen? Zur Beantwortung dieser Fragen verwendeten wir ein In-vitro-Zellkulturmodell mit HEK293-Zellen, da diese Zellen sich teilende menschliche Zellen simulieren und daher nicht nur ein geeignetes Ziel für die Proteinproduktion darstellen, sondern auch am empfänglichsten für eine potenzielle Interaktion zwischen den transfizierten fremden Nukleinsäuren und dem Genom der Zelle sind. Die Tatsache, dass wir in allen Punkten positive Ergebnisse erzielt haben, lässt die größten Bedenken hinsichtlich der Sicherheit des BNT162b2-Impfstoffs aufkommen.

Materialien und Methoden

Impfstoff-Lose

Es wurden die folgenden originalen und ungeöffneten BNT162b2-Impfstoffchargen verwendet: FD7958 (monovalent Wuhan; Verfallsdatum Oktober 2021), FE6975 (monovalent Wuhan; Verfallsdatum Oktober 2021), EX8679 (monovalent Wuhan; Verfallsdatum August 2021), HD9869 (bivalent Wuhan/Omicron XBB1.5; Verfallsdatum Oktober 2024). Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion und die massenspektrometrische Analyse wurde die Charge GH9715 (bivalent Wuhan/Omicron BA.4 und BA.5; Verfallsdatum Juni 2023) verwendet, da ihre Kontamination mit dem SV40-haltigen Plasmid bereits nachgewiesen wurde [25]. Die Fläschchen wurden uns von der Apotheke im gekühlten Zustand des Herstellers zur Verfügung gestellt. Sie waren ungeöffnet und während des Transports und der Lagerung stets gekühlt.

Zelllinienexperimente und ELISA

HEK293-Zellen wurden in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ gezüchtet. Die verwendeten Zellen stammten aus Originalbeständen (Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Deutschland), die regelmäßig negativ auf Mykoplasmen getestet und in Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Die Zellen wurden vor den Transfektionsexperimenten frisch aufgetaut, in 10-cm-Well-Schalen mit DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum, ergänzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin, bis zur Konfluenz kultiviert und nach Trypsinisierung (0,05 % Trypsin/EDTA (Gibco #11500636; 3 min 37 °C) in neue Wells transferiert, entsprechend dem unten beschriebenen Versuchsaufbau.

Für alle Transfektionsexperimente wurden die Fläschchen mit der monovalenten mRNA nach Angaben des Herstellers 1:5 mit steriler RNase-freier phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf die klinische Konzentration vorverdünnt. Die bivalenten Fläschchen wurden nicht vorverdünnt, da die klinische Konzentration bereits vorhanden war. Für den ELISA wurden 12-Well-Platten mit 80 % Zelldichte und einem Mediumvolumen von jeweils 1 ml mit 1/12 (25 µl) einer klinischen Dosis eines Fläschchens transfiziert und die Zellen und das Medium zu den Zeitpunkten Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7 geerntet. Nicht transfizierte Zellen an Tag 7 dienten als Negativkontrolle. Für die Proteinanalyse wurden die Zellen nach der jeweiligen Inkubationszeit (siehe oben) zweimal in steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, in Lysepuffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X-100, 1 % NP40, pH 7,6) lysiert und der Spike-Protein-Gehalt im Proteinüberstand und im Medium mit einem handelsüblichen hochempfindlichen S-Plex SARS-CoV-2 Spike ELISA-Assay (Mesoscale Discovery K150ADJS) bestimmt.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Kurz gesagt, wurden 60 % dichte Zellen auf 24-Well-Platten mit 12,5 ml einer klinischen Dosis pro Well in 200 ml Medium transfiziert. Nach 4 Stunden Inkubation wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS

gewaschen und 500 ml frisches Nährmedium in die Vertiefungen gegeben. 24 Stunden nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen geerntet, in 4 % gepuffertem Paraformaldehyd fixiert, in 2 % Agarose/Wasser eingebettet und nach einem Standard-Dehydratisierungsprotokoll für Biopsieproben dehydratisiert. Anschließend wurden die Agaroseblöcke in Paraffin eingebettet und geschnitten. Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger gelegt, zweimal mit Xylol entparaffiniert und in einer abgestuften Reihe von Ethanol und destilliertem Wasser rehydriert. Nach Rehydrierung und Antigen-Retrieval (ACD biotechnie #322000, 15 Min. Steamer) wurden die Objektträger permeabilisiert (0,3% Triton-X-100/PBST), mit Peroxid-Suppressor (Thermo Scientific #35000) behandelt und in PBS mit 1% Ziegen Serum, 1% BSA, 0,1% Triton-X-100 und 0,05% Tween-20 blockiert. Dann wurden die Objektträger mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen das SARS-CoV-2-Spike-Protein (S1-Untereinheit) (ProSci #9083) über Nacht bei 4 °C inkubiert, in PBS gewaschen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Anti-Kaninchen-Poly-HRP-Antikörper (Invitrogen #32260) inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem permanenten HRP Green Kit (Zytomed), Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Einbettung in RotiHistol II Kit.

Quantifizierung von DNA und RNA

Eine klinische Dosis jedes Fläschchens wurde 1:10 mit sterilem RNase-freiem PBS, ergänzt mit 1% Triton-X-100, verdünnt. Zur Quantifizierung der RNA wurden 10 µl der verdünnten klinischen Dosis in dreifacher Ausführung auf eine schwarze 96-Well-Platte aufgetragen und mit dem Qubit RNA High Sensitivity Assay (Invitrogen #Q32852) behandelt. Zur Quantifizierung der dsDNA wurden 10 µl der verdünnten klinischen Dosis in dreifacher Ausführung auf eine schwarze 96-Well-Platte aufgetragen und mit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Invitrogen #Q33230), Quanti-iT Pico Green dsDNA Assay (Invitrogen #P7589) oder AccuBlue High Sensitivity dsDNA Assay (Biotium #31006-T) behandelt. Die Behandlung mit RNase A (Endkonzentration 50 µg/ml, DNase-freie Monarch RNase A #T3018L) wurde bei 37 °C für 30 Minuten durchgeführt. Die Signale aller Assays wurden mit einem Standard-Plattenlesegerät bei 483 nm Anregung und 530 nm Emission quantifiziert. Es gab keine Signalüberschneidungen zwischen den Anregungs- und Emissionswellenlängen für die in den Kits verwendeten Fluorophore. Wir haben die DNA- und RNA-Menge gemessen (Abbildung 1 A-C) und das DNA/RNA-Verhältnis bezogen auf 1 mg RNA berechnet. Diese Verhältnisse wurden ins Verhältnis zur EMA-Vorschrift von 0,33 mg dsDNA pro 1 mg RNA gesetzt. Daraus ergab sich der Erhöhungsfaktor in Tabelle 3 und Abbildung 1D.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Plasmid-DNA aus den Zellen zu isolieren, wurden 6-cm-Schalen mit Zellen in 80%iger Dichte mit der Hälfte einer klinischen Dosis jedes Fläschchens (150 ml/Well) transfiziert, die zu 1 ml Medium hinzugefügt wurde. Nicht transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 6 Stunden wurden die Zellen geerntet, zweimal in PBS gewaschen und die Plasmid-DNA wurde gereinigt (Gene Jet Plasmid Mini Kit). Aliquots von 1-10 ng DNA wurden in jede PCR-Reaktion gegeben.

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts in den Fläschchen wurde eine klinische Dosis jedes Fläschchens im Verhältnis 1:10 in EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5), ergänzt mit 1 % Triton-X-100, verdünnt. Für die PCR-Reaktion wurden Primer mit PrimerBlast entworfen und über Eurofins Genomics bestellt, in nukleasefreiem Wasser aufgelöst und in einer Endkonzentration von 0,2 mM verwendet. Die Lage der Primerpaare in Bezug auf den Expressionsvektor ist in Abbildung 3A dargestellt. 1 µl der verdünnten Lösung wurde als Matrize verwendet und nach dem Standard-Taq-Polymerase-Protokoll (94 °C 30 Sek., 60 °C 30 Sek., 72 °C, 30 Sek., 38 Zyklen) unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase mit Standard-Taq-Puffer (New England Biolabs #M0273S) verarbeitet. Nuklease-freies Wasser diente als Negativkontrolle. Ein Fläschchen mit der Charge GH9715 wurde als Positivkontrolle verwendet, da die Plasmid-DNA aus dieser Charge bereits isoliert und sequenziert wurde [21,22] und bestätigt wurde, dass sie sich auf die von BioNTech veröffentlichte Plasmidsequenz BNT162b2 (GenBank PP544445.1, GenBank PP544446.1, GenBank MQ287666.1, die die Sequenz 16 aus dem Patent WO2021214204 darstellt) bezieht. Das isolierte und zuvor sequenzierte Plasmid aus dem Los GH9715 diente als Positivkontrolle. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 beschrieben. Schließlich wurden die

PCR-Reaktionen auf ein 2%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid in Standard-TAE-Puffer geladen (Laufzeit ~ 1h; 100V). Gene Ruler DNA-Ladder Mix (Thermo Scientific #SM0331) wurde als DNA-Marker verwendet.

Sequence name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Amplicon (bp)
spike protein aa24-98	CCTACACCAACAGCTTTACC	GATGTTGGACTTCTCGGTGC	221
spike protein aa258-328	CGCTTACTATGTGGGCTACC	TGGTGATATTGGGGAACCGC	212
spike protein aa534-654	GAACTTCAACTTCAACGGCC	AGCTATTGTTACGTGCTCG	362
spike protein aa1183-1269	GGTGGCCAAGAATCTGAACG	CATGTGTAGTGCAGTTTCACG	258
ORI	CTACATACCTCGCTAATC	GCGCCTTATCCGGTAACTATC	150
neomycin cassette	GACCACCAAGCGAAACATCG	CCACCATGATATTCGGCAAGC	195
SV40 promoter/enhancer	CCAGCTGTGGAATGTGTGTC	GCTGACTAATTGAGATGCATGC	93+165

Tabelle 1.

Charakterisierung der für die PCR verwendeten Primer.

EV-Isolierung und Sekretom-Konzentration

Die Zellen wurden in 6-cm-Schalen bis zu einer Dichte von 80 % gezüchtet und mit der Hälfte einer klinischen Dosis (150 µl) der bivalenten Charge GH9750 transfiziert, die zu 1 ml Medium hinzugefügt wurde. Nicht transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 6 Stunden wurden die Zellen gewaschen, und das Medium wurde durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 18 Stunden wurde das Medium entnommen, die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, geerntet und für die Massenspektrometrie weiterverarbeitet.

Die Isolierung von EVs erfolgte wie bereits berichtet mit der Vn-96-Peptid-Capture-Methode, die EVs durch Bindung an HSPs auf der EV-Oberfläche ausfällt [28,29]. Kurz gesagt: 20 µl des VN-96-Peptids (Microvesicle Enrichment Kit, New England Peptide, #W1073-2, USA) wurden dem zellkonditionierten Medium (2 ml) aus (un)transfizierten HEK293-Zellen zugesetzt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Rotationsrad inkubiert. Die EVs wurden nach 15-minütiger Zentrifugation bei 16.000 xg bei 4 °C isoliert. Der Überstand (lösliches Sekretom) wurde in einem neuen Röhrchen gesammelt und mit einem 3 kDa MWCO-Filter (Merck, Amsterdam, Niederlande, Kat.-Nr. UFC500396) konzentriert. Das EV-Pellet wurde einmal mit 1 ml PBS (4 °C) gewaschen, das PIC (Complete Mini EDTA-free, #11836153001 Roche, Deutschland) enthält.

Probenvorbereitung für die Proteomik

Die Probenvorbereitung für die Proteomik wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [30,31]. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Zellpelletsuspension in PBS, das ~25 mg Protein entspricht, in 30 ml LDS-Probenpuffer (mit 10 % Dithiothreitol, Life Technologies, Carlsbad, CA, Kat.-Nr. NP0008) lysiert, 20 ml lösliches Sekretom wurden mit 10 ml 3x LDS-Probenpuffer lysiert, und das EV-Pellet wurde in 30 µl 1x LDS-Probenpuffer gelöst, alles bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten lang auf 99° C erhitzt, beschallt (3x 20 Sekunden) und mittels Gelelektrophorese in vorgefertigten Bis-Tris 4-12% Gradientengelen unter Verwendung des NuPAGE SDS-PAGE Systems (Invitrogen, Carlsbad, CA) bei Raumtemperatur fraktioniert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 50%igem Ethanol / 3%iger Phosphorsäurelösung (Merck, Schweiz) fixiert und über Nacht mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Thermo Scientific, UK) bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit 25 ml 50 mM Ammoniumbicarbonat (Fluka, Seelze, Deutschland) und mit 25 ml 50 mM Ammoniumbicarbonat mit 50% Acetonitril (Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande) gewaschen. Die Proteine wurden durch Inkubation des gesamten Gels in 25 ml Dithiothreitol für 1 Stunde bei 56 °C und 25 ml 55 mM Iodacetamid (Sigma-Aldrich, USA) für 45 Minuten bei Raumtemperatur reduziert und alkyliert. Die Gelspuren wurden in 3 Banden geschnitten und

jede Bande wurde in ~1 mm große Würfel geschnitten³. Die Gelwürfel jeder Bande wurden in einem SpeedVac-Zentrifugalverdampfer 10 Minuten lang bei 50° C getrocknet und über Nacht bei Raumtemperatur mit 6,25 ng/ml modifiziertem Trypsin in Sequenzierqualität (Promega, Madison, USA) inkubiert. Die Peptide aus jeder Gelbande wurden mit 100-150 ml 1%iger Ameisensäure und zweimal mit 100-150 ml 5%iger Ameisensäure / 50%igem Acetonitril extrahiert, lyophilisiert und bis zur LC-MS/MS-Analyse bei -20 °C gelagert.

Massenspektrometrie-gestützte Proteomik

Die markierungsfreie Proteomik von Lysaten, EV und löslichen Sekretom-Proben wurde mit einem Evosep-Chromatographiesystem durchgeführt, das mit einem TimsTOF-HT MS/MS-System (Bruker, Deutschland) gekoppelt war. Peptide (600 ng / Probe, bestimmt mit Nanodrop) wurden in 0,1 % FA gelöst und auf Evotips (Evosep, Dänemark) gemäß dem Herstellerprotokoll geladen. Die Peptide wurden mittels Nanoflow-Reversed-Phase-Flüssigchromatographie unter Verwendung standardisierter Gradienten auf einem Evosep One Flüssigchromatographiesystem (Evosep, Dänemark) mit 0,1 % FA und 0,1 % FA / 99,9 % ACN als mobile Phasen bei Raumtemperatur getrennt. Die 30-Proben-pro-Tag-Methode (SPD) wurde in Kombination mit einer 15 cm x 150 µm Umkehrphasensäule verwendet, die mit 1,5 µm C18-Perlen (Bruker Daltonics) gepackt und mit einem 20 µm ID-Emitter aus Quarzglas (Bruker Daltonics) verbunden war. Die Peptide wurden in ein TimsTOF HT (Bruker Daltonics) unter Verwendung einer Nano-Elektrospray-Ionenquelle (Captive-Spray-Quelle, Bruker Daltonics) mit einer Sprühspannung von 1500 V eingebracht. Das TimsTOF HT lief im DDA-PASEF-Modus mit einer auf 100 ms eingestellten Rampenzeit und zehn PASEF-Scans pro topN-Erfassungszyklus, was zu einer Zykluszeit von 1,16 s führte. Analysiert wurden Vorläufer mit einem Massenbereich von 100 m/z bis 1700 m/z, einem Ionenmobilitätsbereich von 1,5 bis 0,7 Vs cm⁻² und Ladungszuständen von 0 (nicht zugeordnet) bis 5+. Der Schwellenwert für die Intensität wurde auf 2.500 willkürliche Einheiten (a.u.) und der Zielwert auf 20.000 a.u. festgelegt. Vorläufer, die diesen Zielwert oder die volle Planungskapazität erreichten, wurden für 0,4 min ausgeschlossen. Einfach geladene Vorläufer wurden anhand ihrer m/z-Ionen-Mobilität herausgefiltert. Vorläufer mit einer Masse unter 700 Da wurden mit einer Quadrupol-Isolationsbreite von 2 Th isoliert, Vorläufer über 700 Da mit einer Breite von 3 Th. Die Kollisionsenergie wurde linear von 59 eV bei 1,6 Vs cm⁻² auf 20 eV bei 0,6 Vs cm⁻² verringert. Bei allen Experimenten wurde die Ionenbeweglichkeit linear mit drei ausgewählten Ionen des Agilent ESI LC/MS Tuning Mix kalibriert [m/z, 1/KO: (322.0481, 0.7318 Vs cm⁻²), (622.0289, 0.9848 Vs cm⁻²), (922.0097, 1.1895 Vs cm⁻²)]. MS/MS-Spektren wurden mit MaxQuant 2.3.1.0 gegen das überprüfte menschliche Proteom (Uniprot, März 2023, 42420 Einträge einschließlich Isoformen) und die Sequenzen des Moderna mRNA1273-Expressionsvektors, des bivalenten Pfizer-Expressionsvektors BNT162b2 und der Spike-Protein-Sequenz des Isolats Wuhan-Hu-1 des schweren akuten respiratorischen Syndroms gesucht, sowie deren ribosomal rahmenverschobene Übersetzungsprodukte. Die Enzymspezifität war auf Trypsin eingestellt, und es waren bis zu zwei fehlgeschlagene Spaltungen erlaubt. Die Cystein-Carbamidomethylierung (Cys, +57,021464 Da) wurde als feste Modifikation behandelt, die Methioninoxidation (Met, +15,994915 Da) und die N-terminale Acetylierung (N-terminal, +42,010565 Da) als variable Modifikationen. Peptid- und Proteinidentifizierungen wurden mit einer FDR von 1 % unter Verwendung der Decoy-Datenbankstrategie gefiltert. Die minimale Peptidlänge betrug 7 Aminosäuren. Proteine, die nicht allein anhand der MS/MS-Spektren unterschieden werden konnten, wurden in Proteingruppen gruppiert (Standardinstellungen von MaxQuant). Die Suche wurde mit der Option der markierungsfreien Quantifizierung durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte durch Spektralzählung [32].

Ergebnisse

Erfolgreiche Transfektion von Zellen führt zur Produktion von Spike-Protein

Die modRNA-haltigen Lipid-Nanopartikel sind ein leistungsfähiges Werkzeug für die Transfektion von Säugetierzellen [33]. Um die Wirksamkeit der Transfektion zu testen, analysierten wir das Expressionsmuster von Spike-Proteinen nach Transfektion von humanen embryonalen

Nierenzellen (HEK293) mit vier verschiedenen BioNTech (Comirnaty) Impfstoffchargen, nämlich den monovalenten Chargen FD7958, FE6975, EX8679 und der bivalenten Charge HD9869. Alle vier Chargen transfizierten die HEK293-Zellen erfolgreich, was durch ein starkes immunhistochemisches Spike-Protein-Signal belegt wurde (Abbildung 1A). Die Transfektionseffizienz, gemessen an den Spike-positiven Zellen, betrug 90,5 %, 74,6 %, 76,4 %, 80,7 % bzw. 0 % für die Chargen FD7958, FE6975, EX8679, HD9869 und die unbehandelten Zellen. Darüber hinaus zeigten transfizierte Zellen im Vergleich zur nicht transfizierten (Kontroll-)Zelllinie deutliche Anzeichen eines zytopathischen Effekts, was durch die Bildung großer Vakuolen und abgelöster Zellen belegt wird (Abbildung 1B). Um die Stabilität der Spike-Protein-Expression im Laufe der Zeit zu quantifizieren, haben wir die Menge des Spike-Proteins in Zelllysaten nach 1, 3, 5 und 7 Tagen mit einem handelsüblichen ELISA gemessen. Alle vier Chargen folgten dem gleichen Expressionsmuster mit einer bereits deutlichen Expression von Spike-Protein nach Tag 1, einer zunehmenden Produktion bis Tag 5 und einer immer noch höheren Spike-Konzentration an Tag 7 als an Tag 1 (Abbildung 1C).

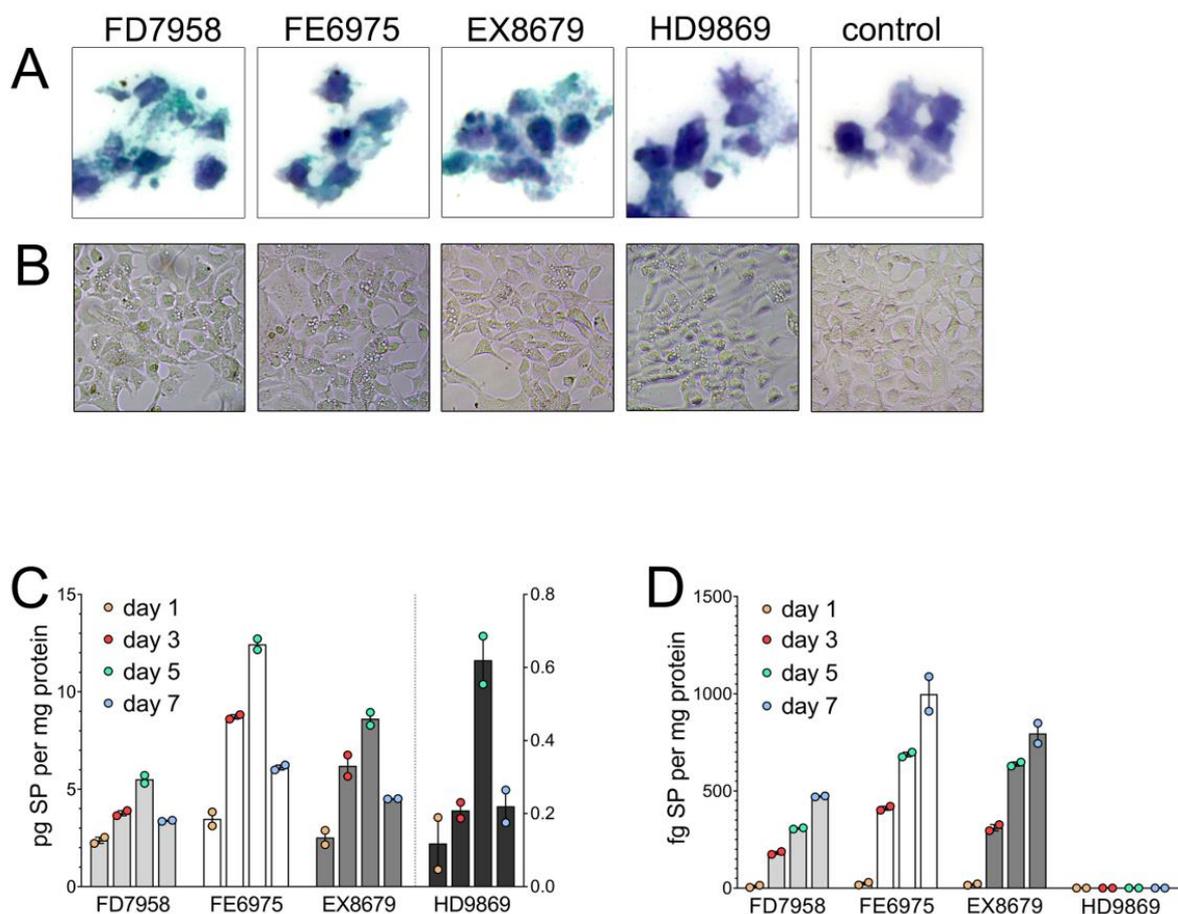


Abbildung 1.

Spike-Protein-Expression in HEK293-Zellen nach Transfektion mit BNT162b2-Biologics. A: Färbung von Spike-Proteinen in Zellen, die mit verschiedenen Chargen transfiziert wurden, dargestellt in grüner Farbe durch Immunhistochemie. Nicht-transfizierte Zellen (Kontrolle) zeigen keine Färbung. Hämatoxylin dient als Gegenfärbung der Zellkerne. B: Hellfeldmikroskopie von transfizierten HEK293-Zellen mit verschiedenen Chargen zeigt eine Anhäufung von intrazellulären Vesikelbildung. C: Quantifizierung der intrazellulären Spike-Protein (SP)-Konzentrationen über die Zeit, gemessen mittels ELISA. n=2; Mittelwert+SEM. D: Quantifizierung der sekretierten Spike-Protein (SP)-Konzentrationen im Laufe der Zeit, gemessen mit ELISA. Bei der Charge HD9869 lag die Konzentration des sekretierten Spike-Proteins unter der Nachweisgrenze. n=2; Mittelwert+SEM. Die Negativkontrolle zeigte keinen Spike-Protein-Gehalt im Zelllysat und Zellüberstand. SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

Spike-Protein wird in den Supernatant der transfizierten Zelle freigesetzt

Um festzustellen, ob die Spike-Proteine nur auf den Zellen vorhanden sind oder ob sie sich von den transfizierten Zellen ablösen oder von ihnen abgesondert werden können, haben wir den zellfreien Kulturüberstand mittels ELISA auf Spike-Proteine untersucht. Die gemessenen Werte sind kumulative Mengen von Tag 0 bis zum jeweils angegebenen Zeitpunkt. Wir beobachteten bei den drei monovalenten Chargen einen deutlichen Anstieg der Menge an Spike-Protein im Medium im Laufe der Zeit. Die Spike-Protein-Konzentration in den Medien von Zellen, die mit der bivalenten Charge HD9869 transfiziert wurden, lag unter der ELISA-Nachweisgrenze (Abbildung 1D).

Spike-Protein wird vor allem über extrazelluläre Vesikel freigesetzt

Der luminal Teil von Membranproteinen kann an der Membranoberfläche durch verschiedene zelluläre Sekretasen gespalten und in das Medium abgegeben werden, aber auch ungespaltene Proteine können über extrazelluläre Vesikel (Exosomen) aus den Zellen sezerniert werden. Mit Hilfe der Massenspektrometrie haben wir geklärt, über welchen Mechanismus Spike-Proteine nach künstlicher Transfektion der Zelllinie mit der Charge GH9715 als Modellsystem in den Überstand sezerniert wurden. Zu diesem Zweck wurden sowohl die transfizierten Zellen als auch das Medium nach 24h Transfektion geerntet. Durch die Isolierung der extrazellulären Vesikel (EV) aus dem Medium erhielten wir drei Fraktionen - das Zelllysate, die EVs und das EV-freie Medium für die Proteomprofilierung. Die Ergebnisse der Spike-Protein-Häufigkeit in den drei Fraktionen sind in Tabelle 2 dargestellt. Das Spike-Protein war am häufigsten im Lysat (60 Spektralwerte) und deutlich in den EVs (14 Spektralwerte) vorhanden, während im EV-freien Medium nur geringe Mengen (2 Spektralwerte) gefunden wurden. Wichtig ist, dass transfizierte Kontrollzellen negativ für das Spike-Protein waren und, wie erwartet, häufige EV-Marker (CD81, TSG101, alix) in der EV-Fraktion gegenüber dem löslichen Sekretom angereichert und sowohl in transfizierten als auch in nicht transfizierten Zellen nachgewiesen wurden.

	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

Tabelle 2.

Anzahl der Spektralzählungen (Proteinhäufigkeit) in spezifischen Fraktionen der HEK293-Zelllinie, die mit dem bivalenten BioNTech-Fläschchen GH9715 transfiziert wurde.

Die RNA-Konzentration der getesteten Fläschchen entspricht der Deklaration von BioNTech

Um die Qualität der in den Transfektionsreaktionen verwendeten Chargen zu bestätigen, testeten wir den RNA-Gehalt der Fläschchen mit dem Qubit RNA High Sensitivity Assay. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Fläschchen die vom Hersteller angegebene RNA-Menge von 30 µg RNA pro klinischer Dosis enthielten (Abbildung 2A). Bei einer dreifachen Analyse betrug der RNA-Gehalt der Charge FD7958 26,74 + 0,31 (Mittelwert + SEM) µg RNA pro geschätzter klinischer Dosis, die Charge FE6975 enthielt 28,57 + 0,22 µg RNA, die Charge EX8679 26,51 + 0,59 µg RNA und die Charge HD9869 28,12 + 0,47 µg RNA pro klinischer Dosis, was die hohe Zuverlässigkeit der hier verwendeten Handhabungs- und Nukleinsäurequantifizierungsmethode belegt.

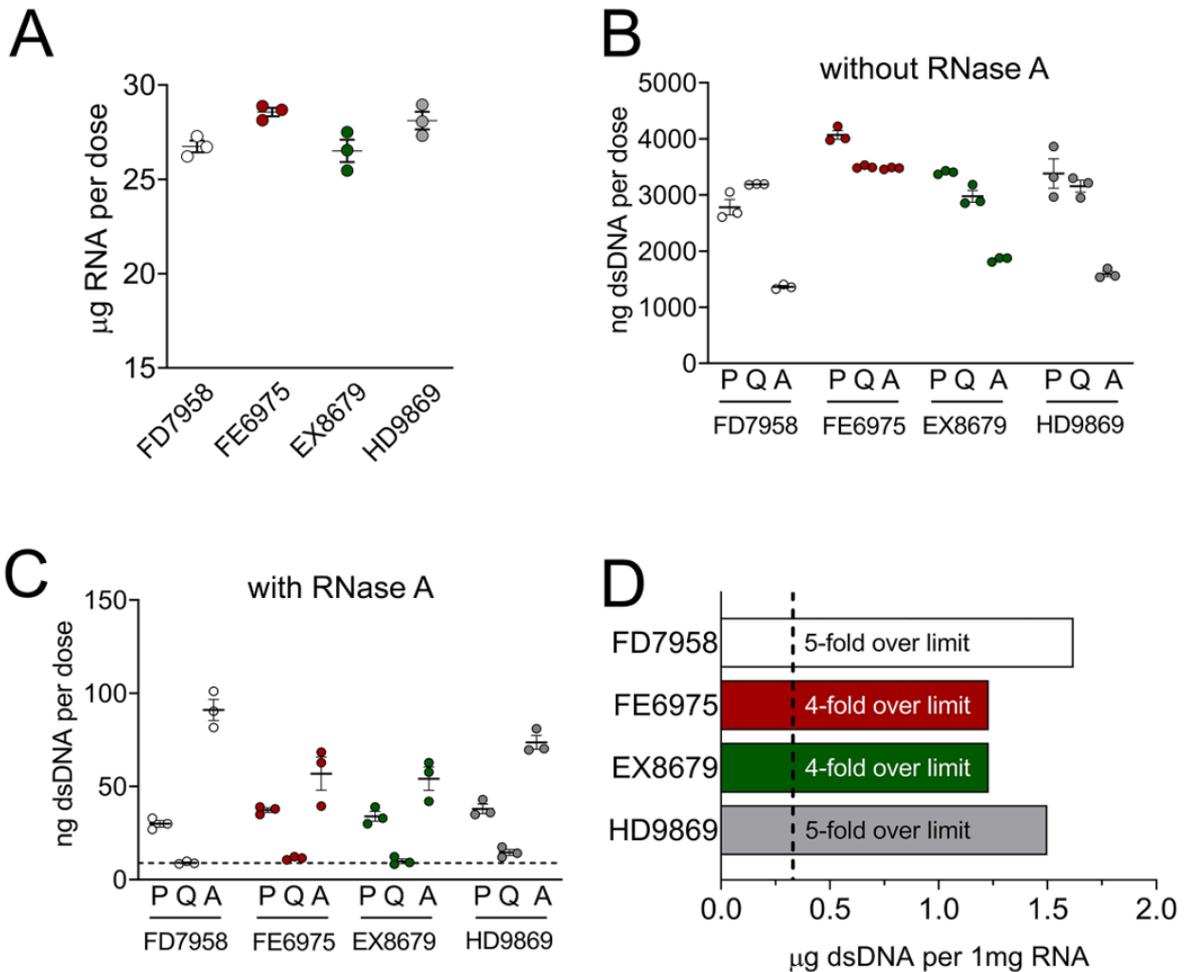


Abbildung 2.

RNA- und DNA-Gehalt der verschiedenen BNT162b2-Biologicals. A: Die modRNA-Konzentrationen pro klinischer Dosis wurden in Fläschchen mit Qubit bestimmt. n=3, Mittelwert±SEM. B-C: Gehalt an doppelsträngiger (ds) DNA pro klinischer Dosis in verschiedenen Fläschchen, gemessen mit Picco Green (P), Qubit (Q) und AccuBlue (A) ohne RNase A (Abbildung B) und mit RNase A (C) Behandlung. Die gestrichelte Linie zeigt die EMA-Grenze der zulässigen dsDNA-Konzentrationen in biologischen Proben. n=3, Mittelwert±SEM. D: Verhältnis zwischen dem dsDNA- und RNA-Gehalt der Fläschchen und dem Grenzwert, der gemäß der EMA-Verordnung von 0,33 mg dsDNA pro 1 mg RNA überschritten wurde (gestrichelte Linie). SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

In den getesteten RNA-Impfstoffchargen wurden große Mengen an DNA gefunden

Aufgrund von Berichten über Rest-DNA der BNT162b2-Lose [27] wurden alle vier hier verwendeten Lose mit drei verschiedenen Methoden auf mögliche Rest-DNA untersucht, die aus dem Herstellungsprozess unter Verwendung von DNA-Plasmiden und E. coli-Expressionssystemen stammen könnte. Die drei DNA-Quantifizierungssysteme Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (P), Qubit 1x dsDNA High Sensitivity Assay (Q) und AccuBlue dsDNA High Sensitivity Assay (A) wurden direkt auf die ursprünglichen Impfstofflösungen angewendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2B zusammengefasst.

In einem Vortest haben wir 1% Triton-X-100 angewendet, um die LNP zu öffnen und die gesamte Menge an dsDNA (frei und in den LNP verpackt) in den Fläschchen zu quantifizieren. Wie in Tabelle 3 zusammengefasst, war der dsDNA-Gehalt in den ursprünglichen, unbehandelten Proben im Vergleich zu den mit Triton-X-100 behandelten Aliquots deutlich niedriger (Faktor 1,6-6,7 je nach Charge). Alle folgenden Experimente wurden mit Triton-X-100-Behandlung durchgeführt.

	Without Triton X-100	With Triton X-100	Factor
	ng ± SEM dsDNA	ng ± SEM dsDNA	
	per clinical dose	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

Tabelle 3.

DNA-Gehalte in den angegebenen Fläschchen von BioNTech-Chargen vor der RNase A-Behandlung, ohne und mit Triton-X-100-Behandlung. Der Faktor steht für den Anstieg der DNA bei der Freisetzung von Nukleinsäuren aus dem durch Triton gebrochenen LNP. SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

Eine direkte Analyse des Inhalts der Fläschchen, die im Verhältnis 1:10 mit RNase-freier gepufferter Kochsalzlösung mit 1 % Triton-X-100 verdünnt wurden, ergab hohe Konzentrationen an doppelsträngiger (ds) DNA zwischen 1326 und 4225 ng pro klinischer Dosis, wobei die AccuBlue-Methode in drei Chargen die niedrigsten DNA-Konzentrationen und in der Charge FE6975 die gleiche Konzentration wie die Qubit-Methode aufwies. Bei drei der vier getesteten Chargen (FE6976, EX8679 und HD9869) wies der Pico Green Assay die höchste DNA-Konzentration auf, während bei der Charge FD7958 der Qubit Assay eine etwas höhere DNA-Konzentration als der Pico Green Assay ergab. Die interne Variation innerhalb einer Charge und Messmethode war minimal, was Handhabungsfehler ausschließt und die Robustheit der Ergebnisse bestätigt. Dieser Vergleich der drei verschiedenen Analysesysteme zeigte teils ähnliche, teils größere Schwankungen der DNA-Konzentration in den jeweiligen Chargen, was auf einen wichtigen Aspekt beim Vergleich von Ergebnissen zwischen verschiedenen Analysemethoden hinweist.

Um auszuschließen, dass die verwendeten Kits entgegen ihrer Behauptung, sie seien dsDNA-spezifisch, RNA in Gegenwart hoher RNA-Mengen teilweise erkennen, wurden dieselben Proben, die zuvor in Abbildung 2B gemessen wurden, anschließend mit RNase A behandelt (Tabelle 4). Innerhalb von 3 Minuten fielen die DNA-Werte drastisch ab und blieben für die verbleibenden 30 Minuten der Inkubation stabil, was darauf hindeutet, dass a) die interkalierenden Farbstoffe tatsächlich mit RNA reagieren und b) die RNase-Behandlung die gesamte interferierende RNA ausreichend entfernt hat, so dass am Ende der Behandlung keine RNA mehr in den Proben vorhanden war. Auch hier gab es nur minimale Schwankungen innerhalb der unabhängig voneinander analysierten Triplikate. Interessant ist, dass die Messung mit AccuBlue bei den unbehandelten Proben den niedrigsten DNA-Gehalt und bei der Behandlung mit RNase-A den höchsten Gehalt ergab, was die geringste Wechselwirkung mit RNA der drei verwendeten Testsysteme widerspiegelt. Es scheint, dass AccuBlue bei der Messung von DNA-Konzentrationen den geringsten Cross Talk mit RNA zeigt, was zu der von anderen beschriebenen Beobachtung passt [34]. Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass die nach der RNase-A-Behandlung erhaltenen DNA-Werte die tatsächliche DNA-Konzentration in den Fläschchen ohne störende RNA darstellen. Diese nun "reine" Rest-DNA der einzelnen Fläschchen lag zwischen 32,71 ng und 43,38 ng pro klinischer Dosis (Abbildung 2C). Dies entspricht 1,23 µg - 1,62 µg dsDNA pro mg RNA und übersteigt damit den oberen DNA-Grenzwert der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) um das 4-5fache (Tabelle 2; Abbildung 2D).

	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

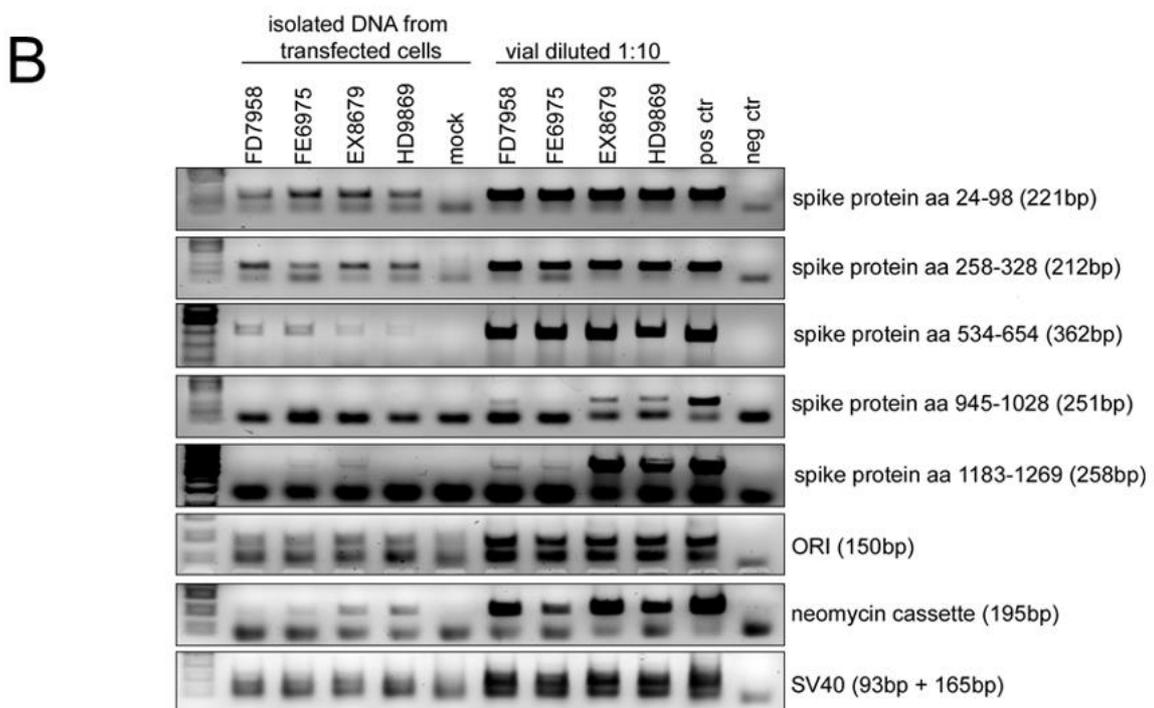
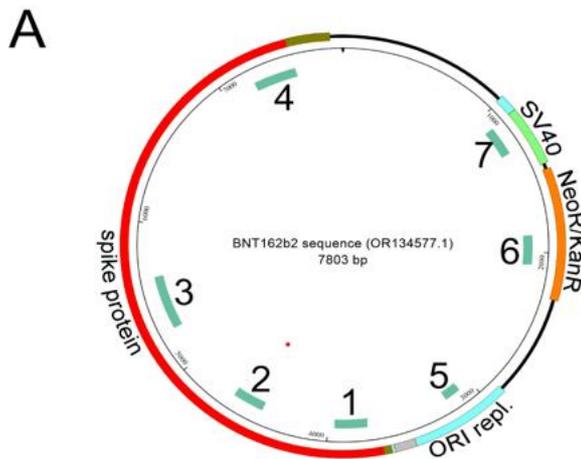
Tabelle 4.

CRNA- und DNA-Gehalte (nach Triton-X-100-Behandlung) in den angegebenen Fläschchen der BioNTech-Lose vor und nach der RNase A-Behandlung. Der Faktor stellt den Multiplikator für die Überschreitung des Grenzwerts gemäß der EMA-Verordnung von 0,33 μg dsDNA pro 1mg RNA dar. SEM, Standardfehler des Mittelwerts.

Restliche DNA enthält prozessbezogene Plasmidelemente und wird von den Zellen aufgenommen

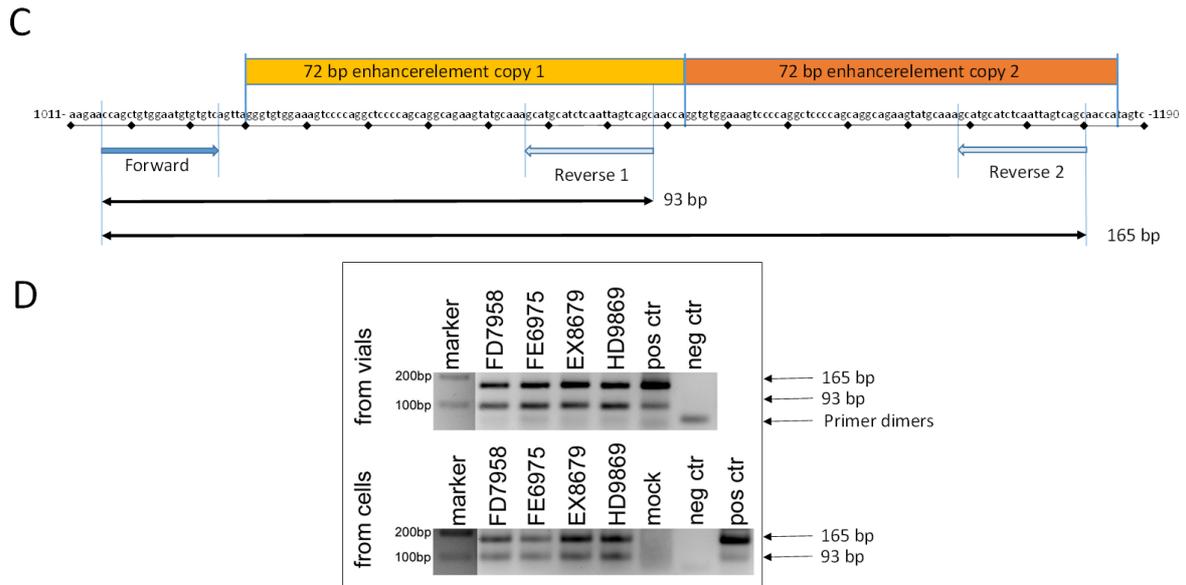
Um festzustellen, ob die in den Fläschchen gefundene DNA von der für den mRNA-Produktionsprozess verwendeten Plasmid-DNA stammt, wurden Primerpaare gegen Sequenzen verschiedener Gene (SV40-Promotor/Enhancer, Neomycin-Kassette, ORI-Replikon und Spike-Protein) generiert, die die gesamte Karte des Plasmids repräsentieren (Abbildung 3A). Ein Fläschchen mit der Charge GH9715 wurde als Positivkontrolle verwendet, da die Plasmid-DNA aus dieser Charge bereits isoliert und sequenziert wurde [21,22] und bestätigt wurde, dass sie sich auf die von BioNTech veröffentlichte Plasmidsequenz BNT162b2 (GenBank PP544445.1, GenBank PP544446.1, GenBank MQ287666.1, die die Sequenz 16 aus dem Patent WO2021214204 darstellt) bezieht. McKernan konnte nachweisen, dass es sich bei der identifizierten DNA tatsächlich um die für den mRNA-Produktionsprozess erforderliche Plasmid-DNA handelt. Die Positivkontrolle zeigte für alle Primerpaare ein DNA-Fragment in der richtigen Größe (Abbildung 3B). Die Negativkontrolle (Wasser) zeigte überhaupt kein Signal. Interessanterweise zeigten alle vier Fläschchen, die mit einer Verdünnung von 1:10 getestet wurden, starke Signale für alle DNA-Fragmente der verschiedenen Gene.

Um zu untersuchen, ob HEK293-Zellen in unserem System nicht nur mit der Impfstoff-RNA transfiziert wurden (was zu der nachgewiesenen Spike-Expression führte), sondern zusätzlich mit restlicher Plasmid-DNA, wurde DNA aus sorgfältig gewaschenen und isolierten transfizierten Zellen isoliert und gereinigt. Wie in Abbildung 3B dargestellt, konnten wir alle PCR-Produkte der richtigen Größe, die die untersuchten Plasmid-Gene repräsentieren, in den Zellen nach Transfektion mit allen vier Chargen nachweisen. In Übereinstimmung mit den zwei Kopien des 72 bp SV40-Promotor/Enhancer-Elements, die im Plasmid kassettenartig miteinander verbunden sind (Region Basen 1041 - 1185 von GenBank PP544446; Abbildung 3C), ergab die SV40-Promotor/Enhancer-PCR zwei Amplikons in der erwarteten Größe (Abbildung 3D). Diese positiven Signale waren sogar mit nur 1-10 % der normalerweise in der PCR-Reaktion verwendeten DNA-Menge möglich (Abbildung 3B).



Abbildungen 3A und 3B.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zeigt DNA-Reste des kompletten Plasmids, das für die modRNA-Produktion verwendet wurde. A: Schematische Darstellung des von BioNTech als Vorlage für die modRNA-Produktion verwendeten DNA-Plasmids. Spezifische Sequenzen (SV40-Promotor/Enhancer; Neomycin-resistente Kasette, ORI-Replikon, Spike-Protein) sind farblich hervorgehoben, ebenso wie die zum Nachweis dieser Gene verwendeten Sequenzen, die von 1 bis 7 nummeriert sind. B: Visualisierte DNA-Fragmente nach PCR der angegebenen Sequenzen (Abbildung A, 1-7) zeigen den Nachweis aller Gene aus dem DNA-Plasmid in den Fläschchen (rechts, 1:10 verdünnt vor dem Laden zur PCR) und in Plasmidpräparationen aus Zellen, die mit diesen biologischen Stoffen transfiziert wurden (links). Mock steht für nicht-transfizierte Zellen als Negativkontrolle für den linken Teil und Wasser als Negativkontrolle für den rechten Teil. Die Partie GH9715 diente als Positivkontrolle.



Abbildungen 3C und 3D.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zeigt DNA-Reste des vollständigen Plasmids, das bei der modRNA-Produktion verwendet wurde. C: Die Karte der SV40-Promotor/Enhancer-Region zeigt die beiden Kopien des 72bp-Elements, die zu den beiden Amplikons führen, die in der PCR aufgrund der beiden Bindungsstellen des Reverse-Primers in Kombination mit der einzigen Bindungsstelle des Forward-Primers sichtbar sind. D: Zusätzliche PCR für den SV40-Promotor/Enhancer (gleiche PCR-Bedingungen wie in Abbildung 3B mit Ausnahme einer längeren Laufzeit), um die beiden Amplikons bei 165 bp und 93 bp besser zu trennen und sichtbar zu machen.

Diskussion

Wir analysierten den Nukleinsäuregehalt von vier in Deutschland vertriebenen BNT162b2 (Comirnaty)-Fläschchen und stellten fest, dass die RNA-Konzentration mit der Herstellerangabe von 30 µg pro klinischer Dosis übereinstimmt, was die Genauigkeit unserer Analyse belegt. Darüber hinaus konnten wir DNA-Reste einschließlich Plasmid-DNA in ähnlichen Mengen nachweisen, wie sie von McKernan et al. [21,22] für US-Pfizer-Chargen berichtet wurden. Die DNA-Konzentrationen in den in dieser Studie analysierten Fläschchen reichten von 32,7 bis 43,4 ng pro klinischer Dosis nach Eliminierung der RNA durch RNase-Verdau. Dies übersteigt bei weitem die maximale Obergrenze von 10 ng pro klinischer Dosis, die die WHO bei injizierbaren biologischen Arzneimitteln für tolerierbar erklärt hat [35]. Um die Analyse des gesamten DNA-Gehalts in den Fläschchen zu ermöglichen, führten wir eine Triton-X-100-Behandlung durch, um die LNP zu öffnen. Der Vergleich der unbehandelten Impfstofflösungen mit den mit Triton-X-100 behandelten gepaarten Aliquots ergab einen 1,6- bis 6,7-fachen Anstieg des DNA-Gehalts, was wahrscheinlich eine hohe Variabilität in der LNP-Packung der DNA-Reste während des Herstellungsprozesses widerspiegelt. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Daten von Raoult [36] überein, der kürzlich über einen deutlichen Anstieg des DNA-Gehalts nach dem Öffnen der LNP in einer Comirnaty-Charge berichtete. Die in dieser Studie analysierte Menge an Rest-DNA, die durch die Behandlung mit Triton-X-100 aus den LNP freigesetzt wurde, ist geringer als die kürzlich berichtete Menge [27]. Wir vermuten, dass dies auf die Kreuzinteraktion von RNA mit interkalierenden Farbstoffen zurückzuführen ist [37]. Bei der Behandlung der Proben mit RNase wurden die DNA-Konzentrationen in der Tat deutlich reduziert, wenn auch auf Werte, die immer noch um ein Vielfaches über den Grenzwerten liegen, die für nackte DNA als akzeptabel gelten. In einem kürzlich erschienenen Preprint [38] wurde berichtet, dass produktbezogene DNA-Verunreinigungen in BNT162b2 mit den genehmigten mRNA-Spezifikationen übereinstimmen. Die Autoren führten jedoch vor der Qubit-Analyse einen zusätzlichen Ethanol-Fällungsschritt durch, von dem bekannt ist, dass er kurze

DNA-Sequenzen, die die Mehrheit der reminiszenten DNA nach dem DNase-Verdau während des Herstellungsprozesses darstellen, ineffizient ausfällt. Dieser Ansatz führte zu einer hohen Variabilität der berechneten RNA-Menge innerhalb einer Charge in zwei Comirnaty-Chargen. Während unsere Ergebnisse (ohne Ethanol-fällung) eine nur geringe Streuung zwischen den Chargen und einen RNA-Gehalt zeigten, der nahezu identisch und nahe an den angegebenen 30 µg pro Dosis lag, war der von Kaiser et al. [38] berechnete RNA-Gehalt mit maximal 20 µg pro Dosis deutlich niedriger. Dies deutet darauf hin, dass sie wahrscheinlich eine beträchtliche Menge an Nukleinsäuren während der Probenvorbereitung verloren haben. Wie die niedrige resultierende RNA-Konzentration ergab auch ihre DNA-Analyse viel zu niedrige Konzentrationen und repräsentiert nicht den tatsächlichen Rest-DNA-Gehalt im Vergleich zur ursprünglichen DNA-Konzentration in den Fläschchen (frei und in LNP verpackt) vor den Verlusten der Fällungs-, Wasch- und Auflösungs-schritte.

Es sei darauf hingewiesen, dass offizielle Grenzwerte für Rest-DNA in biologischen Präparaten für Antikörper, abgeschwächte Impfstoffe und Proteinlösungen festgelegt sind, nicht aber für RNA-Injektionen und - was noch wichtiger ist - für Nukleinsäuren, die in Transfektionsreagenzien wie Lipid-Nanopartikeln verpackt sind, die zum ersten Mal bei den COVID-19-Injektionen verwendet wurden [39]. Tatsächlich gibt es keine wissenschaftlichen Erkenntnisse, die es erlauben würden, ein Sicherheitsniveau für Rest-DNA in solchen Injektionspräparaten zu definieren.

Noch besorgniserregender ist die Identifizierung von Gensequenzen, die Reste der BNT162b2-Lose mit Plasmid-DNA offenbaren, die als Expressionssystem im Herstellungsprozess verwendet wurde [9]. Ursprünglich wurde das Vorhandensein intakter Plasmide von McKernan und Kollegen [21,22] in Transformationsexperimenten nachgewiesen, wobei plasmidkodierte Kanamycin-Resistenz auf Empfänger-E. coli übertragen wurde. Die ergänzende Frage, ob es auch zu einer Transfektion menschlicher Zellen kommen kann, ist jedoch noch nicht untersucht worden. Nach der Transfektion von Zellkulturen ohne zusätzliche Transfektionsreagenzien konnten von Plasmiden abgeleitete Sequenzen wie das Kanamycin-Gen und der SV40-Promotor/Enhancer aus den transfizierten Zellen wieder isoliert werden, was darauf hindeutet, dass eine Verpackung in Lipid-Nanopartikel und eine Transfektion in die Zellen stattgefunden hat, da freie, unverpackte DNA nicht von den Zellen aufgenommen wird. Während weitere Untersuchungen klären müssen, ob die restliche Plasmid-DNA auch als Vorlage für die Herstellung funktioneller Proteine in der Zelle dienen kann, lassen unsere Ergebnisse keinen Zweifel daran, dass restliche Plasmid-DNA und davon abgeleitete Fragmente, die in den RNA-Biologicals enthalten sind, in Myriaden von Zellen der menschlichen Empfänger gelangen. Wir konnten nicht nachweisen, ob einige der transfizierten Zellen die intakten Plasmide enthielten, jedoch ist das Vorhandensein der identifizierten SV40-Promotor/Enhancer-Region unabhängig vom Vorhandensein des Plasmids höchst bedenklich [23,40,41].

Unsere molekularen Analysen der Plasmidkomponenten bestätigten die von McKernan und Kollegen [21,22] berichteten Daten, nämlich das Vorhandensein einer DNA-Sequenz des SV40-Promotors/Enhancers. Diese Sequenz war in der Plasmidkarte, die BioNTech/Pfizer im Rahmen des Zulassungsverfahrens vorgelegt hat, nicht angegeben [42, Seite 24]. Dieser Befund ist sehr überraschend und wirft die berechnete Frage auf: Warum haben BioNTech/Pfizer dieses völlig unnötige, aber hochgefährliche Element in ihre Plasmide eingebracht und als Vorlage für die Produktion von modRNA verwendet? Unserer Meinung nach müssen BioNTech/Pfizer für die Aufnahme dieses hochgefährlichen Elements in ihre Plasmide zur Rechenschaft gezogen werden.

Bei den von BioNTech und Pfizer verwendeten Plasmiden handelt es sich um so genannte Shuttle-Vektoren. Sie enthalten Klonierungsstellen und Polyadenylierungssignale sowie Elemente, die für die Replikation und Translation in bakteriellen Systemen notwendig sind, wie den T7-Phagenpromotor, und zusätzlich ein Promotor/Enhancer-Element, um die Transkriptionsinitiierung in eukaryontischen Zellen zu ermöglichen, das in der Regel von Viren wie CMV oder SV40 stammt. Einer der ersten Shuttle-Vektoren, der als eine Art Prototyp für das heutige BioNTech/Pfizer-Plasmid diente, wurde bereits 1988 entwickelt [43]. Ein ähnlicher SV40-

Komponenten enthaltender Säugetier-Expressionsvektor [Addgene: pcDNA3.1 SARS-CoV-2 S D614, jedoch ohne die bakteriellen Komponenten] wurde bereits 2020 für die Analyse von Spike-Proteinfunktionen in menschlichen Zelllinien verwendet [44].

Nach dem offiziellen Verfahren zur Erzeugung der RNA, die für das Spike-Protein kodiert, ist kein eukaryotischer Promotor/Enhancer erforderlich, da der gesamte Prozess-2 in vitro im bakteriellen E. coli-System durchgeführt wird. Darüber hinaus ist unter den verfügbaren starken viralen Promotor/Enhancer-Elementen wie CMV, Bakulovirus und RSV das SV40-Element das gefährlichste für die Integrität der Zielzellen, da lange vor der Entwicklung von RNA-Biologika gezeigt wurde, dass das 72 bp SV40-Promotor/Enhancer-Fragment den maximalen Transport von Plasmid-DNA in den Zellkern transfizierter Zellen erleichtert [23,41], eine Eigenschaft, die bei CMV- und RSV-Elementen nicht zu finden ist. Ausdrücklich sollte ein Aspekt die Alarmglocken läuten lassen, der von Dean et al. zum Ausdruck gebracht wird [23]: "Die Aufnahme dieser SV40-Sequenz in nicht-virale Vektoren kann deren Fähigkeit, in den Zellkern transportiert zu werden, insbesondere in sich nicht teilenden Zellen, stark erhöhen." Dieser Transport von Plasmiden, die das SV40-Promotor/Enhancer-Element enthalten, in den Zellkern wurde bei einer Vielzahl von getesteten Zelltypen festgestellt [45], was zur Förderung des SV40-Promotor/Enhancer-Elements für hochwirksame Gentherapieansätze führte. Der Nachweis der SV40-Promotor/Enhancer-Sequenzen wirft die Frage auf, welche Absicht die Hersteller hatten, als sie ein Expressionssystem mit diesem in Säugetierzellen aktiven Element auswählten, anstatt ein rein prokaryotisches Expressionssystem für den Herstellungsprozess zu wählen. Schließlich zeigen wir, dass transfizierte Zellen in der Lage sind, Spike-Proteine zu produzieren und abzusondern. Wir haben bei keiner der Transfektionen andere transfektionsverstärkende Substanzen verwendet. So konnten wir den direkten Gentransfer der reinen Substanz aus den Lipid-Nanopartikeln als "Transfektionsreagenz" in die Wirtszellen analysieren, die die Situation bei den geimpften Personen simulieren. Es ist bekannt, dass eine zusätzliche Gabe von Transfektionsverstärkern wie Apolipoprotein E3 (ApoE3), das an das Cholesterin der Lipidhülle der LNP bindet und so die Aufnahme der LNP in die Zellen über ApoE3-Rezeptoren erleichtert, zu einer höheren Transfektionseffizienz geführt hätte. Die Transfektionseffizienz kann auch durch einen Wechsel der Zielzelllinie oder eine erhöhte LNP-Gabe gesteigert werden. Unsere Messwerte der intrazellulären und extrazellulären Spike-Konzentrationen beziehen sich daher nur auf die HEK293-Zellen unter den angegebenen Parametern, die im Methodenteil ausführlich beschrieben sind. Nach der Transfektion wiesen unsere Zellen große intrazelluläre Vesikel auf, die ein deutliches Merkmal für die Beeinträchtigung der Zellgesundheit nach Aufnahme der modRNA-haltigen LNP darstellen. Die Hülle der letzteren besteht aus vier Lipidkomponenten. Insbesondere die Gruppe der kationischen (ionisierbaren) Lipide ist für ihre toxische und entzündungsfördernde Wirkung auf Zellen sowohl in-vitro als auch in-vivo bekannt [46]. Es ist derzeit nicht bekannt, wie viele und welche Zelltypen im Körper betroffen sind, aber es wurde berichtet, dass sich die LNP im ganzen Körper ausbreiten und die modRNA in allen untersuchten Organen zu finden ist [9]. Wir stellten fest, dass die Produktion von Spike-Proteinen viele Tage lang anhält. Nach einer Woche sind sogar mehr Spike-Proteine in den Zellen vorhanden als nach 24 Stunden, obwohl der höchste modRNA-Spiegel nach 24 Stunden zu erwarten ist, bevor er abgebaut wird. Die Menge der produzierten Spike-Proteine variierte von Charge zu Charge, aber der zeitliche Verlauf war bei allen identisch, mit einem Höhepunkt an Tag 5 nach der Transfektion. Wir konnten auch zeigen, dass die Produktionsmenge mit der Menge der injizierten modRNA zusammenhängt, da die Charge HD9869 eine deutlich geringere Spike-Protein-Menge aufweist als die anderen drei Chargen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass HD9869 ein bivalenter Impfstoff ist, der aus zwei verschiedenen modRNAs für zwei verschiedene Spike-Protein-Varianten besteht, nämlich die Wuhan-Variante und die Omicron-Variante. Da der in dieser Studie verwendete ELISA nur die Wuhan-Variante nachweist, sind die von der Omicron-Variante produzierten Spike-Proteine nicht nachweisbar, und wir erhalten niedrigere Werte als bei den drei monovalenten Impfstoffen mit nur der Wuhan-Variante.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten wir zeigen, dass die Spike-Proteine fast ausschließlich über Exosomen in das Medium abgegeben werden. Im Falle einer In-vivo-

Situation würde dies bedeuten, dass die Spike-Proteine in den Exosomen über den Blutstrom zu anderen Geweben und Organen transportiert und von den Zielzellen aufgenommen werden. In der Tat wurde bereits berichtet, dass Spike-Proteine in Exosomen von geimpften Personen gefunden werden können [10]. Die Funktionen von Exosomen sind vielfältig. Sie dienen hauptsächlich als Kommunikationsplattform zwischen Zellen desselben Gewebes und zwischen Zellen verschiedener Organe. Die Exosomen werden durch verschiedene Mechanismen leicht von den Zielzellen aufgenommen, so dass der Inhalt in die Zielzelle gelangt und eine strukturelle und funktionelle Reaktion auslöst [47]. Im Fall von BNT162b2 kann davon ausgegangen werden, dass Spike-Proteine auf diese Weise unabhängig von der Anwesenheit von LNP oder modRNA von einem Gewebe zum anderen übertragen und aufgenommen werden können. Ob die Zielzellen durch die Aufnahme von Spike-Protein-haltigen Exosomen geschädigt werden, ist noch nicht untersucht worden. Diese starke Transfektionsfähigkeit lässt jedoch vor dem Hintergrund der co-transfizierten Rest-DNA und insbesondere der SV40-Promotor/Enhancer-Elemente des Ausgangsmaterials, des Plasmids, die Alarmglocken schrillen. In Vorversuchen konnte eine andere Charge von BNT162b2 Eierstockkrebszellen transfizieren, und hier wurden Teile des transfizierten Nukleinsäurematerials durch Ganzgenomsequenzierung tatsächlich in die Chromosomen 9 und 12 der Zellen integriert [48]. Die Sequenz der modRNA zeigt, dass die Leader-Sequenz für die Translation des Spike-Proteins in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und die Sequenz für den Membrananker nicht aus der modRNA entfernt wurden. Infolgedessen werden die produzierten Spike-Proteine überwiegend an der Zelloberfläche exprimiert. Nach Angaben von BioNTech wird die modRNA im Zytosol übersetzt [49]. Dies würde bedeuten, dass die Spike-Proteine im Zellinneren verbleiben und nicht als Proteine in voller Länge an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dies widerspricht jedoch der Funktion einer Leader- und einer Ankersequenz innerhalb der RNA in anderen Membranproteinen. Auch die Möglichkeit des Sheddings der Spike-Proteine wurde von BioNTech [49] nicht berücksichtigt.

Beschränkung der Studie und Variabilität der Daten

Wir haben technische und biologische Replikate (wo angebracht) verwendet, um unsere Ergebnisse zu reproduzieren und die Variabilität zu bestimmen. Da die Variabilität für jedes Experiment innerhalb einer Gruppe gering war, können wir technische Artefakte ausschließen. Wir hatten nur Zugang zu einigen wenigen Chargen, aber wir hielten sie für ausreichend, um das grundlegende Problem der Rest-DNA und der Zelltransfektion durch "RNA-Impfstoffe" zu demonstrieren. Als die Experimente durchgeführt wurden (2023), war das Verfallsdatum der drei vom Hersteller angegebenen Chargen des monovalenten Impfstoffs bereits überschritten. Da die Fläschchen konsequent ungeöffnet bei -80 °C gelagert wurden und das Verfallsdatum vom deutschen Paul-Ehrlich-Institut (PEI) mehrfach offiziell verlängert wurde [50: 10. September 2021 von 6 auf 9 Monate; 51: 24. März / 4. April 2022 von 9 auf 12 Monate; 52: 2. Dezember 2022 von 12 auf 18 Monate], erwarten wir keine negativen Auswirkungen auf unsere Ergebnisse. Wir können nicht ausschließen, dass die Impfstoffe parallel zur einzelsträngigen modRNA und der vektorbasierten DNA auch stabile doppelsträngige RNA (dsRNA) und RNA:DNA-Hybride enthalten und transfizieren. Wir sind auch nicht in der Lage, die Toxizität von LNP auf verschiedene Zelltypen vollständig zu erfassen. Wir haben für unsere Experimente eine relativ robuste humane embryonale Nierenzelllinie verwendet, die immortalisiert ist und daher toxischen Substanzen bis zu einem gewissen Grad widerstehen kann. Weitere Studien sind notwendig, um z. B. primäre Zellkulturen wie primäre neuronale Zellen oder Immunzellen zu testen, die viel empfindlicher auf LNP reagieren würden. Da bekannt ist, dass LNP im ganzen Körper verteilt sind und daher wahrscheinlich alle Zelltypen betreffen, müssen weitere In-vitro-Studien zur Toxizität, zum Expressionsverhalten und zur Proteomanalyse durchgeführt werden.

Schlussfolgerung

Wir konnten zeigen, dass die Transfektion der menschlichen Zelllinie HEK293 mit vier verschiedenen BNT162b2-Chargen über mehrere Tage zur Produktion von Spike-Proteinen führt, die über Exosomen in den Zellüberstand abgegeben werden. Wir wiesen in allen Fläschchen

Restplasmid-DNA in Konzentrationen nach, die weit über dem zulässigen EMA-Grenzwert von 0,33 ng dsDNA pro 1 mg RNA lagen. Wir identifizierten alle Plasmid-Gene sowie die beiden Kopien des SV40-Promoter/Enhancer-Elements. Es wurde nachgewiesen, dass die DNA in die Zellen eindringt und dort verbleibt.

Schon vor dem Start der staatlichen Impfkampagne wiesen Ärzte und Wissenschaftler darauf hin, dass die genbasierten Wirkstoffe schwere Nebenwirkungen auslösen würden. Inzwischen ist das Spektrum der Nebenwirkungen so vielfältig, dass der Begriff "Spikeopathie" für den neuen Krankheitskomplex geschaffen wurde [53]. Die ewigen Gefahren aller RNA-Biologika sind vierfacher Natur: Erstens löst modRNA, die für ein fremdes Protein kodiert, schädliche Autoimmunreaktionen aus [54]. Zweitens sind die Lipid-Nanopartikel selbst hoch toxisch [55]. Drittens werden verbleibende Plasmid-DNA und revers transkribierte mRNA die Zellen genetisch verändern. Viertens führt der Ersatz von Uridin in natürlicher mRNA durch N1-Methyl-Pseudouridin in synthetischer modRNA zu +1 ribosomalem Frameshifting, was zu einer zufälligen Produktion völlig fremder Proteine führt [56].

Unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern veröffentlichte Berichte und geben Anlass zu großen Bedenken hinsichtlich der Sicherheit des BNT162b2-Impfstoffs. Wir fordern einen sofortigen Stopp aller biologischen Impfstoffe auf RNA-Basis, bis diese Bedenken wissenschaftlich geklärt und überzeugend ausgeräumt sind.

Danksagung

Wir danken der Proteomics Core Facility des UMC Amsterdam in den Niederlanden für die Unterstützung bei der Massenspektrometrie und Maarten Fornerod für die Analyse der Massenspektrometriedaten zur Bestimmung der Häufigkeit von Plasmid- und alternativen ORF-Peptiden.

Beiträge der Autoren

Konzeptualisierung, U.K., V.S. und K.S.; Methodik, U.K. und V.S.; Software, V.S.; Validierung, U.K. und V.S.; formale Analyse, U.K., V.S. und K.S.; Untersuchung, U.K. und V.S.; Ressourcen, U.K. und V.S.; Datenkuratierung, U.K. und V.S.; Schreiben - Erstellung des Originalentwurfs, U.K., V.S. und K.S.; Schreiben - Überprüfung und Bearbeitung, U.K., V.S. und K.S.; Visualisierung, U.K. und V.S.; Aufsicht, U.K., V.S. und K.S.; Projektverwaltung, V.S. und K.S.; Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und ihr zugestimmt.

Finanzierung

Für diese Forschung wurden keine externen Mittel bereitgestellt.

Interessenkonflikte

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Referenzen

1

Winch, G.M., Cao, D., Maytorena-Sanchez, E., Pinto, J., Sergeeva, N., Zhang, S. Operation Warp Speed: Projekte als Reaktion auf die COVID-19-Pandemie. Projektleitung und Gesellschaft. 2:100019. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plas.2021.100019>

2

Operation Warp-Geschwindigkeit. 2021. Online verfügbar: <https://www.gao.gov/products/gao-21-319> (Zugriff am 25.06.2024)

3

Türeci, Ö., Sahin, U. Projekt Lightspeed (Deutsch). 2021. ISBN10 3498002775.

4

Projekt Lightspeed. 2020. Online verfügbar: https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/EN/newsroom-en/dossiers/ppt-erste-studie-sars-cov-2-impfstoff-en.pdf?__blob=publicationFile&v=2 (Zugriff am 25.06.2024)

5

France24. 2020. Online verfügbar: <https://www.pfizer.com/science/innovation/mrna-technology> (Zugriff am 25.06.2024)

6

Webseite BioNTech. <https://www.biontech.com/int/en/home/pipeline-and-products/platforms/our-mrna-platforms.html>

7

Webseite Pfizer. <https://www.pfizer.com/science/innovation/mrna-technology>

8

Die Chance des Lebens. Online verfügbar:

https://www.pfizer.com/news/articles/shot_of_a_lifetime_how_pfizer_and_biontech_developed_and_manufactured_a_covid_19_vaccine_in_record_time (Zugriff am 24.06.2024)

9

EMA-Bewertungsbericht. 2021. Online verfügbar:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (Zugriff am 25.06.2024)

10

Bansal, S., Perincheri, S., Fleming, T., Poulson, C., Tiffany, B., Bremner, R.M., Mohanakumar, T. Cutting Edge: Circulating exosomes with COVID spike protein are induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) vaccination prior to development of antibodies: Ein neuer Mechanismus für die Immunaktivierung durch mRNA-Impfstoffe. Zeitschrift für Immunologie. 207:2405-2410. 2021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>

11

Mörz, M. Ein Fallbericht: Multifokale nekrotisierende Enzephalitis und Myokarditis nach BNT162b2 mRNA-Impfung gegen COVID-19. Vaccines. 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. Underestimation of SARS-CoV-2 infection in placental samples. 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, M.C., Micheletti, C., Donato, K., Fioretti, F., Calzoni, A., Praderio, A., De Angelis, M.G., Arabia, G., Cristoni, S., Nodari, S., Bertelli, M. Presence of viral spike protein and vaccinal spike protein in the blood serum of patients with long-COVID syndrome. Europäische Zeitschrift für medizinische und pharmakologische Wissenschaften. 27 (Suppl. 6):13-19. 2023. https://doi.org/10.26355/eurrev_202312_34685

14

Sahin, U., Karikó, K., Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. Nature Reviews Drug Discovery. 13:759-780. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>

15

Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. Immunität. 23:165-175. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>

16

Granados-Riveron, J.T., Aquino-Jarquín, G. Entwicklung der aktuellen nukleosid-modifizierten mRNA-LNP-Impfstoffe gegen SARS-CoV-2. Biomedizin und Pharmakotherapie. 142. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111953>

17

Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M.I., Jaenisch, R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. 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. Intra-cellular reverse transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA vaccine BNT162b2 in vitro in human liver cell line. *Aktuelle Fragen der Molekularbiologie*. 44:1115-1126. 2022.

<https://doi.org/10.3390/cimb44030073>

19

Sutton, D.H., Conn, G.L., Brown, T., Lane, A.N. The dependence of DNase I activity on the conformation of oligodeoxynucleotides. *Biochemical Journal*. 321:481-486. 1997.

<https://doi.org/10.1042/bj3210481>

20

Webpage Thermofisher. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/general-articles/dnase-i-demystified.html>

21

McKernan, K. Die bivalenten Impfstoffe von Pfizer und Moderna enthalten 20-35 % Expressionsvektor und sind in *E. coli* transformationsfähig. 2023.

<https://anandamide.substack.com/p/pfizer-and-moderna-bivalent-vaccines>

22

McKernan, K., Helbert, Y., Kane, L.T., McLaughlin, S. Die Sequenzierung von bivalenten Moderna- und Pfizer-mRNA-Impfstoffen zeigt Nanogramm- bis Mikrogramm-Mengen an Expressionsvektor-dsDNA pro Dosis. *OSF Preprints*. 2023.

<https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m>

23

Dean, D.A., Dean, B.S., Muller, S., Smith, L.C. Sequenzanforderungen für den Kernimport von Plasmiden. *Experimentelle Zellforschung*. 253:713-22. 1999.

<https://doi.org/10.1006/excr.1999.4716>

24

Die Sequenzierung der monovalenten mRNA-Impfstoffe von Pfizer zeigt auch einen 72-bp-SV40-Promotor mit zwei Kopien. 2023. <https://anandamide.substack.com/p/sequencing-the-pfizer-monovalent>

25

25. Impfstoffbezogene qPCR von Krebszelllinien, die mit BNT162b2 behandelt wurden. 2024.

<https://anandamide.substack.com/p/vaccine-targeted-qpcr-of-cancer-cell>

26

Speicher, D.J., Rose, J., Gutschi, L.M., Wiseman, D.M., McKernan, K. DNA fragments detected in monovalent and bivalent Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada: Explorative Dosis-Wirkungs-Beziehung mit schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen. *OSF Preprints*. 2023 <https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97>

27

König, B., Kirchner, J.O. Methodological considerations regarding the quantification of DNA impurities in the COVID-19 mRNA vaccine Comirnaty. *Methoden und Protokolle*. 7:41. 2024.

<https://doi.org/10.3390/mps7030041>

28

Ghosh, A.A., Davey, M., Chute, I.C., Griffiths, S.G., Lewis, S., Chacko, S., Barnett, D., Crapoulet, N., Fournier, S., Joy, A., Caissie, M.C., Ferguson, A.D., Daigle, M., Meli, M.V., Lewis, S.M., Ouellette, R.J. Schnelle Isolierung extrazellulärer Vesikel aus Zellkulturen und biologischen Flüssigkeiten unter Verwendung eines synthetischen Peptids mit spezifischer Affinität für Hitzeschockproteine. *PLoS One*. e110443. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110443>

29

Knol, J.C., de Reus, I, Schelfhorst, T., Beekhof, R., De Wit, M., Piersma, S.R., Pham, T.V., Smit, E.F., Verheul, H.M.W., Jiménez, C.R. Peptide-mediated 'miniprep' isolation of extracellular vesicles is suitable for high-throughput proteomics. *Europäische Proteomik-Vereinigung Open Proteomics*. 11:11-15. 2016 <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2016.02.001>

30

Piersma, S.R., Warmoes, M.O., De Wit, M., De Reus, I., Knol, J.C., Jiménez, C.R. Whole gel processing procedure for GeLC- MS/MS based proteomics. *Proteome Science*. 11:17. 2013. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-17>

31

Garcia de Durango, C.R., Monteiro, M.N., Bijnsdorp, I.V., Pham, T.V., De Wit, M., Piersma, S.R., Knol, J.C., Pérez-Gordo, M., Fijneman, R.J.A., Vidal-Vanaclocha, F., Jimenez, C.R. Lipopolysaccharid-regulierte Sekretion von löslichen und vesikulären Proteinen aus einer Gruppe von Darmkrebs-Zelllinien. *Proteomics Clinical Applications*. 15:1900119. 2021. <https://doi.org/10.1002/prca.201900119>

32

Liu, H., Sadygov, R.G., Yates, J.R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytische Chemie*. 76:4193-4201. 2004. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>

33

Kim, T.K., Eberwine, J.H. Säugetierzelltransfektion: die Gegenwart und die Zukunft. *Analytische und bioanalytische Chemie*. 397:3173-3178. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>

34

Bruijns, B.B., Tiggelaar, R.M., Gardeniers, J.G.E. Fluoreszierende Cyaninfarbstoffe für die Quantifizierung geringer Mengen von dsDNA. *Analytische Biochemie*. 511:74-79. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.022>

35

Bericht der WHO-Tagung. Studiengruppe über Zellsubstrate für die Herstellung von Biologika. 1-30. 2007. Online verfügbar: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrates/cells.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf (Zugriff am 25.06.2024)

36

Raoult, D. Bestätigung des Vorhandenseins von Impfstoff-DNA in dem Anti-COVID-19-Impfstoff von Pfizer. Preprint 2024. <https://hal.science/hal-04778576v1>

37

Jones, L.J., Yue, S.T., Cheung, C.Y., Singer, V.L. RNA-Quantifizierung durch fluoreszenzbasierten Lösungsassay: Charakterisierung des RiboGreen-Reagenzes. *Analytische Biochemie*. 265:368-374. 1998. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914>

38

Kaiser, S.M., Kaiser, S.R., Reis, J., Marschalek, R. Quantifizierung von objektiven Konzentrationen von DNA-Verunreinigungen in mRNA-Impfstoffen. Preprint 2024. <https://ssrn.com/abstract=5009375> <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5009375>

39

Yang, H. Festlegung akzeptabler Grenzwerte für DNA-Reste. *Zeitschrift für pharmazeutische Wissenschaft und Technologie*. 67:155-163. 2013. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2013.00910>

40

Graessmann, M., Menne, J., Liebler, M., Graeber, I., Graessmann, A. Helper activity for gene expression, a novel function of the SV40 enhancer. *Nucleic Acids Research*. 17:6603-6612. 1989. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6603>

41

Young, J.L., Benoit, J.N., Dean, D.A. Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gentherapie* 10:1465-1470. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302021>

42

Berichterstatter Laufende Überprüfung. 2020. Online verfügbar: <https://factreview.gr/wp-content/uploads/2023/07/Rolling-Review-Report-Quality-COVID-19-mRNA-Vaccine-BioNTech.pdf> (Zugriff am 24.06.2024)

43

Mongkolsuk, S. Novel eukaryotic expression vectors which permit single-stranded replication in Escherichia coli and in vitro translational analysis of cloned genes. *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, K.E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T.P., Wang, Y., Baum, A., Diehl, W.E., Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, S.B., Schaffner, S.F., Lemieux, J.E., Munro, J.B., Rafique, A., Barve, A., Sabeti, P.C., Kyratsous, C.A., Dudkina, N.V., Shen, K., Luban, J. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant. *Cell*. 183:739-751.E8. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>

45

Vacik, J., Dean, B.S., Zimmer, W.E., Dean, D.A. Zellspezifischer Kernimport von Plasmid-DNA. *Gene Therapy*. 6:1006-1014. 1999.

<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300924>

46

Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., Igyártó, B.Z. Die Lipid-Nanopartikel-Komponente der mRNA-LNP-Plattform, die in präklinischen Impfstoffstudien verwendet wird, ist hochentzündlich. *iScience*. 24:103479. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>

47

Jadli, A.S., Ballasy, N., Edalat, P., Patel, V.B. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molekulare und zelluläre Biochemie*. 467:77-94. 2020.

<https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z>

48

McKernan, K. Plasmid-DNA-Replikation in geimpften BNT162b2-Zelllinien. 2024.

<https://anandamide.substack.com/p/plasmid-dna-replication-in-bnt162b2>

49

MHRA. Öffentlicher Bewertungsbericht, Genehmigung zur vorübergehenden Abgabe, COVID-19 mRNA-Impfstoff BNT162b2 (BNT162b2 RNA) Konzentrat zur Injektionslösung. 2021. Online verfügbar:

https://assets.publishing.service.gov.uk/media/63529601e90e07768265c115/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2__UKPAR__PFIZER_BIONTECH_ext_of_indication_11.6.2021.pdf
)

50

Paul-Ehrlich-Institut. <https://www.pei.de/EN/newsroom/hp-news/2021/211004-comirnaty-vaccine-shelf-life-extended.html>

51

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

52

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

53

Parry, P.I., Lefringhausen, A., Turni, C., Neil, C.J., Cosford, R., Hudson, N.J., Gillespie, J. 'Spikeopathy': COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines*. 11:2287. 2023.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>

54

Polykretis, P., Donzelli, A., Lindsay, J.C., Wiseman, D., Kyriakopoulos, A.M., Mörz, M., Bellavite, P., Fukushima, M., Seneff, S., McCullough, P.A. Autoimmune Entzündungsreaktionen, ausgelöst durch die genetischen COVID-19-Impfstoffe in terminal differenzierten Geweben. *Autoimmunität*. 56:1. 2023.

<https://doi.org/10.1080/08916934.2023.2259123>

55

Segalla, G. Chemisch-physikalische Kritikalität und toxikologisches Potenzial von Lipid-Nanomaterialien, die in einem COVID-19 mRNA-Impfstoff enthalten sind. *International Journal*

of Vaccine Theory Practice and Research. 3:787-817. 2023.

<https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.68>

56

Mulrone, T.E., Pöyry, T., Yam-Puc, J.C., Rust, M., Harvey, R.F., Kalmar, L., Horner, E., Booth, L., Ferreira, A.P., Stoneley, M., Sawarkar, R., Mentzer, A.J., Lilley, K.S., Smales, C.M., von der Haar, T., Turtle, L., Dunachie, S., Klenerman, P., Thaventhiran, J.E.D., Willis, A.E. N1-Methylpseudouridylierung von mRNA verursacht +1 ribosomales Frameshifting. *Nature*. 625:189-194. 2024

<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>