



BESCHLUSSANTRAG

Kinder dürfen nicht als vermeintliches durch Impfung pharmazeutisch generiertes Schutzschild für die Gesellschaft missbraucht werden!

In der Pressekonferenz der Verantwortlichen des Südtiroler Sanitätsbetriebes und des Landesrates für die Gesundheit Hubert Messner zum Auftakt der Corona- und Grippeimpfkampagne 2025, hat laut Berichterstattung der Tagesschau RAI Südtirol die **Verantwortliche Direktorin des Amtes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit des Südtiroler Sanitätsbetriebes, Frau Dr. Silvia Spertini**, die Position vertreten, dass für Kleinkinder die Impfung (vorher wird im Bericht generell von Grippe- und Corona-Impfung gesprochen) wichtig sei, „weil sie zur Verbreitung der Infektion beitragen“.

Wörtlich im Bericht **„die Direktorin des Dienstes für Hygiene und Öffentliche Gesundheit Silvia Spertini rät Menschen ab sechzig zur Impfung, sowie Personen mit einem geschwächten Immunsystem. Auch für Kleinkinder sei die Impfung wichtig, weil sie zur Verbreitung der Infektion beitragen.“**

Laut dem am 15.10.2025 in der Tageszeitung Dolomiten veröffentlichten Artikel **„Mit einem Termin zum doppelten Schutz“** haben Verantwortliche des Südtiroler Sanitätsbetriebes sowie der Landesrat für Gesundheit Hubert

Messner in Bezug auf die Grippe- und die sog. Corona-Schutzimpfung auf der Pressekonferenz erklärt, „**Auch Kinder sollten geimpft werden, da sie als sogenannte Multiplikatoren der Viren gelten und eine relevante Rolle bei der Verbreitung von Infektionen spielen**“.

Die Verantwortlichen des Südtiroler Sanitätsbetriebes und der Südtiroler Landesrat für die Gesundheit Hubert Messner betrachten also die Kinder als „Virenmultiplikatoren und -verbreiter“, die es zu impfen gilt, um andere zu schützen!

Das entbehrt jeglicher medizinischen Ethik! Eine Impfung ist, wenn überhaupt, nur dann für Kinder zu empfehlen, wenn die Kinder selbst die Impfung benötigen sollten, aber nicht deshalb, weil die Kinder an der Verbreitung von Viren beteiligt sind!

Laut der Berichterstattung im Öffentlichen Rundfunksender RAI Südtirol und in der größten Südtiroler Tageszeitung, **ruft der Südtiroler Sanitätsbetrieb die Eltern dazu auf, Kinder zu impfen, und damit in deren natürliches Immunsystem einzugreifen, um andere zu schützen.**

Sprich, man missbraucht die Kinder (bis hin zu den Kleinkindern) als (darüber hinaus nur vermeintliches) pharmazeutisch generiertes Schutzschild für die Gesellschaft.

Das ist eine klare Verletzung der auch international verankerten Kinderrechte!

Siehe Art. 3 UN Konvention über die Rechte des Kindes

Artikel 3 (Wohl des Kindes)

Bei allen Maßnahmen, die Kinder betreffen, gleichviel ob sie von öffentlichen oder privaten Einrichtungen der sozialen Fürsorge, Gerichten,

Verwaltungsbehörden oder Gesetzgebungsorganen getroffen werden, ist **das Wohl des Kindes ein Gesichtspunkt, der vorrangig zu berücksichtigen** ist.

Es ist international bekannt, dass

- 1) **die Gripeschutzimpfung nicht wirkt, weil eine in den Arm gespritzte Substanz keine Immunantwort in den Schleimhäuten des respiratorischen Trakts hervorruft**, wie selbst Anthony Fauci in einem 2022 veröffentlichten wissenschaftlichen Artikel für die sog. Corona-Schutzimpfung und für die Grippeimpfung bestätigt (Anlage 1.1.)

<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1931-3128%2822%2900572-8>

Hier die Übersetzung in die deutsche Sprache (Anlage 1.2.):

<https://drive.google.com/file/d/1tc44moEQH6BfqBKM6L81gKHclKdCLz6Z/view?usp=drivesdk>

- 2) **das Risiko zu erkranken, für die Grippe-Geimpften wesentlich höher ist, als für die Nichtgeimpften, wie eine ganz neue Studie an über 53.000 Sanitäts-Mitarbeitern der Cleveland-Clinic (Ohio-USA) bezogen auf die Impfsaison 2024-25 deutlich zeigt** (Anlage 2.1.):

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2025.01.30.25321421v3>

Hier die Übersetzung in die deutsche Sprache (Anlage 2.2.):

https://drive.google.com/file/d/1gKO_ooe8dummq3C-jhwn0VQhbMnvmvBR/view?usp=drivesdk

- 3) **die sog. Covid-19-„Impfstoffe“ niemals für die Verhinderung der Virenübertragung, sondern allein für einen etwaigen Schutz vor der Krankheit Covid-19 der mit diesen experimentellen Substanzen behandelten Personen zugelassen wurden. Also von Fremdschutz keine Rede sein kann! Umgekehrt aber diese sog. Impfstoffe**

enorme Risiken für Leben und Gesundheit mit sich bringen, wie mittlerweile hinlänglich bekannt sein sollte.

Mit Schreiben vom 18.10.2023 wurde dies auf explizite Anfrage von EU-Parlamentariern durch die Direktorin der EMA, Emer Cooke ausdrücklich wie folgt bestätigt:

Übersetzung in die deutsche Sprache:

1. Die zugelassenen Indikationen

Sie geben an, dass die Impfstoffe gemäß den zugelassenen Indikationen nur Personen verabreicht werden sollten, die sich persönlich schützen möchten, und dass sie nicht zum Zweck der Verringerung der Übertragungs- oder Infektionsraten (Übertragungskontrolle) zugelassen sind. Sie geben außerdem an, dass die zugelassene Indikation nicht mit den von Pharmaunternehmen, Politikern und Gesundheitsexperten beworbenen Verwendungszwecken übereinstimmt.

Sie weisen zu Recht darauf hin, dass COVID-19-Impfstoffe nicht zur Verhinderung der Übertragung von einer Person auf eine andere zugelassen sind. Die Indikationen dienen ausschließlich dem Schutz der geimpften Personen.

In den Produktinformationen zu COVID-19-IMPfstOFFEN wird eindeutig angegeben, dass die Impfstoffe zur aktiven Immunisierung zur Vorbeugung von COVID-19 bestimmt sind. Darüber hinaus wird in den Bewertungsberichten der EMA zur Zulassung der Impfstoffe auf den Mangel an Daten zur Übertragbarkeit hingewiesen.

*Die EMA wird weiterhin Transparenz hinsichtlich der **zugelassenen Verwendungszwecke von COVID-19-Impfstoffen** walten lassen und Bereiche identifizieren, in denen wir Missverständnisse ausräumen müssen.*



Marcel de Graaff MEP
European Parliament
ASP 06E240
60, rue Wiertz / Wiertzstraat 60
B-1047 Brussels
Belgium

Email: marcel.degraaff@europarl.europa.eu

18 October 2023
EMA/451828/2023
European Medicines Agency

Dear Honourable Members of Parliament Marcel de Graaff, Gilbert Collard, Francesca Donato, Joachim Kuhs, Mislav Kolakušić, Virginie Joron, Ivan Vilibor Sinčić and Bernhard Zimniok

Thank you for your letter of 4 October 2023 in which you call for the suspension of the marketing authorisations of the mRNA COVID-19 vaccines Comirnaty and Spikevax.

The European Medicines Agency is committed to protecting public health by conducting thorough scientific assessments of medicinal products for the EU. We are equally dedicated to ensuring that the public and their representatives in the European Parliament are informed of the reasons why their medicines are authorised and of the measures we take to monitor them once they are available.

We should also emphasise that EMA focuses mainly on one aspect of EU health policy, namely the authorisation and monitoring of medicines and vaccines. When our scientific committees issue recommendations, other bodies, such as the European Commission, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and national health and vaccination authorities can consider them as they develop immunisation policies to protect the public.

Please find below direct responses to the questions you raise in your letter.

1. The authorised indications

You state that based on the authorised indications, the vaccines 'should only be administered to individuals who seek personal protection, and they are not authorised for the purpose of reducing transmission or infection rates (transmission control)'. You also state that the authorised indication does not align with uses promoted by 'pharmaceutical companies, politicians, and health professionals'.

You are indeed correct to point out that COVID-19 vaccines have not been authorised for preventing transmission from one person to another. The indications are for protecting the vaccinated individuals only.

The product information for COVID-19 vaccines clearly states that the vaccines are for active immunisation to prevent COVID-19. In addition, EMA's assessment reports on the authorisation of the vaccines note the lack of data on transmissibility.

Da die Covid-19-„Impfstoffe“ nicht zur Verhinderung der Virenübertragung zugelassen wurden und auch die Grippeimpfstoffe diesbezüglich nicht wirken, entspricht die Aufforderung (Klein-)Kinder mit diesen Substanzen zu behandeln, um einen Fremdschutz zu erzeugen, einer illegalen sofort abzustellenden off-label-Anwendung dieser Substanzen!

Das Landesgericht von Asti hat mit Urteil vom 26. September 2025 einer Frau, die seit der Behandlung mit dem sog. Covid-19-„Impfstoff“ Comirnaty von BioNTech/Pfizer an einer transversalen Myelitis erkrankt ist (sie kann nicht mehr gehen), eine monatliche Entschädigung von Euro 3.000.- zugesprochen. Für den Schadenersatz muss sich die Frau an den Produzenten wenden, der eine totale Haftungsbefreiung von der Republik Italien und der EU erhalten hatte!

Hier das Urteil (Anlage 3.1.):

<https://drive.google.com/file/d/1vtzg9NutlrKkdLVAu5AHt0721c2sbHm2/view?usp=drivesdk>

sowie die Übersetzung in die deutsche Sprache (Anlage 3.2.):

https://drive.google.com/file/d/1HcxPLZv9xe71JdQI-1VXW_GS6P3nZg5c/view?usp=drivesdk

In Südtirol setzt man die (Klein-)Kinder willentlich einem solchen unverantwortbaren Risiko aus, für Nichts! Nachdem nicht einmal ein Fremdschutz vorliegt, wie die EMA selbst bestätigt!

- 4) Nun im Tagestakt veröffentlichte Studien zeigen, dass die sog. Covid-19-„Impfstoffe“ auf mod.RNA Basis (Comirnaty von Pfizer/BioNTech, Spikevax von Moderna) enorme Rückstände an DNA-Plasmiden aufweisen und Comirnaty von Pfizer/BioNTech darüber hinaus einen,

den von FDA und WHO gesetzten Grenzwert weit übersteigenden Wert des SV40-Promoter-Enhancer aufweist.

Aus dem am **6. September 2025 in PubMed** (die online Datenbank des *National Institut of Health* der US-Regierung) veröffentlichten **weltweit mit größter Sorge zur Kenntnis genommenen** wissenschaftlichen Artikel dreier Top-US-Wissenschaftler geht hervor, dass

die beiden sog. Covid-19-„Impfstoffe“ auf modRNA-Basis - Comirnaty von Pfizer/BioNTech (aktuell in Südtirol zur Anwendung gebracht) und Spikevax von Moderna - Milliarden bis Hunderte von Milliarden DNA-Moleküle pro Dosis enthalten.

Beide Substanzen überschreiten die von der FDA und der WHO festgelegten Richtlinien für Rest-DNA von 10 ng/Dosis um das 36- bis 627-fache.

Darüber hinaus überschreitet die aktuell in Südtirol auch auf die Kinder angewandte Substanz Corminaty von Pfizer/BioNTech den gesetzlichen Grenzwert für den SV40-Promotor-Enhancer, der bekanntlich hoch krebserregend wirkt.

SV40-Promotor-Enhancer wird in Laboren Versuchstieren zur Erzeugung von Krebszellen gespritzt, um Krebsmedikamente zu testen, da er mit einer Reihe von bösartigen Tumoren im Menschen in Verbindung gebracht wird.

Siehe die Studie in der Originalfassung in englischer Sprache hier (Anlage 4.1):

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40913499/>

und die Übersetzung in die deutsche Sprache hier (Anlage 4.2.):

<https://drive.google.com/file/d/1O9RezZIX4tbeaVom2wD9UQ0WM1oYpUQ6/view>

Die sog. modRNA Covid-19-„Impfstoffe“ sind also nachweislich hoch genotoxisch, krebserregend und mutagen, sprich: das menschliche Genom verändernd, denn nichts anderes bedeutet die enorme Menge an DNA-Rückständen und die Überschreitung des zulässigen Grenzwertes des bekanntlich hoch krebserregenden SV40-Promotor-Enhancers.

Comirnaty von Pfizer/BioNTech, sowie die anderen sog. Covid-19-„Impfstoffe“ sind, wie direkt aus der Zulassungsdokumentation hervorgeht, u.a. **niemals auf ihre Genotoxizität, Karzinogenität und Mutagenität geprüft worden, weil man annahm**, dass diese experimentellen Substanzen diesbezüglich **keine Risiken bergen würden!**

Es wurden und es werden also den Kindern – basierend auf einer reinen Annahme ihrer Unbedenklichkeit – hoch genotoxische, karzinogene und leider auch mutagene experimentelle Substanzen gespritzt.

Siehe Seite S. 29 der aktuellen Fachinformation in Anlage I des Zulassungsbeschlusses der Europäischen Kommission zu Comirnaty von Pfizer/BioNTech (Anlage 5.1.):

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_de.pdf

Genotoxizität/Karzinogenität

Es wurden weder Genotoxizitäts- noch Karzinogenitätsstudien durchgeführt. Es wird nicht erwartet, dass die Bestandteile des Impfstoffs (Lipide und mRNA) ein genotoxisches Potential haben.

Reproduktionstoxizität

Mit einer vor wenigen Tagen veröffentlichten groß angelegten bevölkerungsbasierten retrospektiven Studie in Seoul, Südkorea, wurden die kumulativen Inzidenzen und nachfolgenden Risiken für Krebserkrankungen insgesamt ein Jahr nach der COVID-19-„Impfung“ dargelegt.

Daten von 8.407.849 Personen zwischen 2021 und 2023 wurden aus der Datenbank der koreanischen Krankenversicherung bezogen. Die Teilnehmer wurden anhand ihres COVID-19-Impfstatus in zwei Gruppen eingeteilt.

Die Risiken für Schilddrüsenkrebs, Magenkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs, Brustkrebs und Prostatakrebs nahmen ein Jahr nach der Impfung signifikant zu.

Hier die Studie in der englischen Originalfassung (Anlage 6.1.):

<https://biomarkerres.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s40364-025-00831-w.pdf>

und hier die Übersetzung in die deutsche Sprache (Anlage 6.2.):

<https://drive.google.com/file/d/1kl-JSq1YofCuzK48JupAPxrsNoaF0WMn/view?usp=drivesdk>

Nun ist **erstmals** in einer jüngst veröffentlichten Studie der Nachweis der **Impfstoff-RNA-Sequenz von Comirnaty (Pfizer/BioNTech) in den Tumorzellen einer 31-jährigen erbracht** worden, **die nach wiederholter Injektion von Comirnaty (Pfizer/BioNTech) einen bis dato höchst seltenen Blasen-Turbokrebs entwickelt hat.**

Hier die Studie in der englischen Originalfassung (Anlage 7.1.):

<https://zenodo.org/records/17122912>

und hier in der deutschen Übersetzung (Anlage 7.2.):

<https://drive.google.com/file/d/13rVFhbXguWp1MiEJaOGOPTgm86FDNmlw/view?usp=drivesdk>

Das bedeutet, dass die „Impf“-RNA, die in den Nanolipiden die menschliche Zellen im gesamten Körper erreicht, sich in die menschliche DNA integriert.

Die Veröffentlichung weiterer Studienergebnisse zur nunmehr nachgewiesenen Karzinogenität und Mutagenität sind für die kommenden Wochen von US-Forschern angekündigt.

Der Leiter des Zentrums für Globale Gesundheit am Istituto Superiore di Sanità (Oberste wissenschaftliche Gesundheitsbehörde Italiens), Dott. Maurizio Federico, warnt bereits seit 2024 in vom italienischen Gesundheitsministerium finanzierten wissenschaftlichen Artikeln vor den durch die aktuellen Covid-19-„Impfstoffe“ hervorgerufenen Nebenwirkungen und vor der Unwirksamkeit der sog. Covid-19-„Impfstoffe“ für die Verhinderung von Übertragung und Krankheit.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39591184/> (Anlage 8.1.)

Hier die Übersetzung in die deutsche Sprache (Anlage 8.2):

<https://drive.google.com/file/d/19RvgebC5L6DW0CXhG-xywITYWHYsstu8/view?usp=drivesdk>

und in einer Zuschaltung direkt aus dem Istituto Superiore di Sanità in eine Pressekonferenz, die am 4. Dezember 2024 im Südtiroler Landtag stattgefunden hat, hat er auf die *de facto* Unwirksamkeit und die hohe Risikobehaftetheit der in den Oberarm gespritzten und auf modRNA basierten Covid-19-„Impfstoffe“ anhand von Studien hingewiesen.

Außerdem hat er betont, dass es bekannt ist, dass auch die Grippeimpfung nicht wirkt - wie selbst Anthony Fauci in einer mit anderen 2022 veröffentlichten Studie zugegeben hat - weil ein über den Atmungstrakt aufgenommenes Virus nicht durch eine in den Armmuskel injizierte Substanz blockiert werden kann!

Siehe dazu die Aufzeichnung seiner hochinteressanten Ausführungen in der Pressekonferenz im Südtiroler Landtag:

<https://odysee.com/@renateholzeisen:e/DottMaurizioFederico-ResponsabileCentroNazionaleSaluteGlobale%2C-ISS->

[Intervento in Conferenza Stampa Avv. Dr. Renate Holzeisen presso il Consiglio Provinciale di Bolzano 4 dicembre 2024: 7](#)

Siehe hier die vom Leiter des Nationalen Instituts für Globale Gesundheit am Istituto Superiore di Sanità in der Pressekonferenz im Südtiroler Landtag gezeigten Folien (Anlage 9):

<https://drive.google.com/file/d/1MwYBm7xIDJfSUXcQJ64GuFgcmJlgJXGD/view>

Die Befürchtungen des Leiters des Nationalen Instituts für Globale Gesundheit am Istituto Superiore di Sanità werden auch von der Bundesregierung der USA geteilt, die bereits im Mai für Schwangere und Kinder und dann nachfolgend generell die Empfehlung der sog. Covid-19-„Impfungen“ widerrufen hat.

Auch aus dem derzeit gültigen, bei der EMA hinterlegten Risk-Management-Plan des Produzenten geht eindeutig hervor, dass die Sicherheitsdaten auf die Langzeitfolgen fehlen, was eine Anwendung dieser Substanzen insbesondere auf Kinder zu einem absoluten medizinischen *no go* macht!

Table 73. List of Important Risks and Missing Information

Important identified risks	Myocarditis and Pericarditis
Important potential risks	None
Missing information	Use in pregnancy and while breast feeding
	Use in immunocompromised patients
	Use in frail patients with co-morbidities (e.g., chronic obstructive pulmonary disease [COPD], diabetes, chronic neurological disease, cardiovascular disorders)
	Use in patients with autoimmune or inflammatory disorders
	Long term safety data

Siehe Seite 187 des aktuellen RMP für Comirnaty von Pfizer/BioNTech (Anlage 10.1.):

https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp/comirnaty-epar-risk-management-plan_en.pdf

Aus der aktuellen Fachinformation der EMA/Europäischen Kommission (und von AIFA übernommen) zu **Comirnaty von Pfizer/BioNTech** geht ausdrücklich hervor, dass die auf mod.RNA-Basis beruhende Substanz **zu einer Herzmuskelentzündung auch mit Todesfolge führen kann.**

Landesrat Messner und den Verantwortlichen des Südtiroler Sanitätsbetriebes dürfte bekannt sein, dass die durch die Entzündung entstehenden Narben des Herzmuskels niemals richtig ausheilen, und daher viele Kardiologen auf die damit einhergehende Verkürzung der Lebenszeit hinweisen.

Myokarditis und Perikarditis

Nach der Impfung mit Comirnaty besteht ein erhöhtes Risiko für Myokarditis und Perikarditis. Diese Erkrankungen können sich innerhalb weniger Tage nach der Impfung entwickeln und traten hauptsächlich innerhalb von 14 Tagen auf. Sie wurden häufiger nach der zweiten Impfung und häufiger bei jüngeren Männern beobachtet (siehe Abschnitt 4.8). Die verfügbaren Daten zeigen, dass sich die meisten Fälle erholen. In einigen Fällen war eine intensivmedizinische Versorgung erforderlich, und es wurden Fälle mit Todesfolge beobachtet.

Angehörige der Heilberufe sollten auf Anzeichen und Symptome einer Myokarditis oder Perikarditis achten. Die Geimpften (einschließlich Eltern und Betreuer) sollten angewiesen werden, sofort einen Arzt aufzusuchen, wenn sich bei ihnen Symptome zeigen, die auf eine Myokarditis oder Perikarditis hinweisen, wie (akute und anhaltende) Schmerzen in der Brust, Kurzatmigkeit oder Herzklopfen nach der Impfung.

Angehörige der Gesundheitsberufe sollten Leitlinien und/oder Spezialisten für die Diagnose und Behandlung dieser Erkrankung konsultieren.

Siehe Seite 5 der aktuellen Version der Anlage I zum Durchführungsbeschluss der Europäischen Kommission betreffend die Marktzulassung von Comirnaty von Pfizer/BioNTech (Anlage 11.1.):

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_de.pdf

Substanzen,

- **die nachweislich nicht gegen eine virale Infektion schützen,**
- **die keine effektive Immunantwort in den Lungen erzeugen,**
- **die enorme Rückstände an DNA-Plasmiden und einen den Grenzwert weit überschreitenden SV-40-Promoter-Inhalt haben,**

- die generell bereits bekannte schwerste Nebenwirkungen (Herzmuskelentzündung, auch mit Todesfolge) und viele noch kaum untersuchte Nebenwirkungen aufweisen, wobei man die Langzeitwirkungen noch nicht kennt (wie auch die Hersteller in ihren RMP erklären)

in (Klein-)Kinder zu spritzen, bedeutet jüngstes Leben, in dem ein besonders rasanter und heikler Vorgang der Zellteilung erfolgt, einem enormen nicht verantwortbaren genotoxischen, karzinogenen und mutagenen Risiko auszusetzen.

Das ist schlichtweg kriminell!

Abschließend sei noch daran erinnert, dass

alle Impfstoffe für ihre zulassungs- und rechtskonforme Anwendung das Vorhandensein einer ärztlichen Verschreibung voraussetzen!

Siehe bspw. Anlage II Punkt B) des Zulassungsbeschlusses der EU-Kommission für den sog. Covid-19-„Impfstoff“ Comirnaty von Pfizer/BioNTech (Anlage 12.1.)

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_de.pdf

B. BEDINGUNGEN ODER EINSCHRÄNKUNGEN FÜR DIE ABGABE UND DEN GEBRAUCH

Arzneimittel, das der Verschreibungspflicht unterliegt.

Die ärztliche Verschreibungspflicht für eine in den Muskel zu injizierende Substanz ist von Art. 71 EU-Richtlinie 2001/83/CE und Art. 88 D.Lgs. 219/2006 vorgesehen.

In Italien ist nur der Arzt zur Verschreibung eines Arzneimittels berechtigt.

Impfungen in Apotheken ohne ärztliche Verschreibung sind per se illegal!

Der nationale Impfplan, die Impfpflichtung der nationalen und lokalen Gesundheitsbehörden ersetzen die ärztliche Verschreibung (die entsprechend Art. 4 und 13 des ärztlichen Deontologie-Kodexes zu erfolgen hat) nicht, denn sie beziehen sich weder auf die spezifisch zur Anwendung kommenden Impfstoffprodukte, noch auf das spezifische zu impfende Kind oder den Impfling generell, sondern auf eine anonyme Bevölkerung.

Der Arzt hat bei seiner Tätigkeit keinerlei Interessen, Aufoktroierungen oder Konditionierungen zu unterliegen.

Art. 4

Libertà e indipendenza della professione. Autonomia e responsabilità del medico

L'esercizio professionale del medico è fondato sui principi di libertà, indipendenza, autonomia e responsabilità.

Il medico ispira la propria attività professionale ai principi e alle regole della deontologia professionale senza sottostare a interessi, imposizioni o condizionamenti di qualsiasi natura.

Für die Verschreibung eines Arzneimittels (im konkreten Fall eines sog. Impfstoffes) muss der Arzt über das Wirksamkeits- und Risikoprofil des Arzneimittels Bescheid wissen und den Patienten aufklären und nicht als Marketingagent für die Pharmaindustrie wirken.

Art. 13

Prescrizione a fini di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione

La prescrizione a fini di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione è una diretta, specifica, esclusiva e non delegabile competenza del medico, impegna la sua autonomia e responsabilità e deve far seguito a una diagnosi circostanziata o a un fondato sospetto diagnostico.

La prescrizione deve fondarsi sulle evidenze scientifiche disponibili, sull'uso ottimale delle risorse e sul rispetto dei principi di efficacia clinica, di sicurezza e di appropriatezza.

Il medico tiene conto delle linee guida diagnostico-terapeutiche accreditate da fonti autorevoli e indipendenti quali raccomandazioni e ne valuta l'applicabilità al caso specifico.

L'adozione di protocolli diagnostico-terapeutici o di percorsi clinico-assistenziali impegna la diretta responsabilità del medico nella verifica della tollerabilità e dell'efficacia sui soggetti coinvolti.

Il medico è tenuto a un'adeguata conoscenza della natura e degli effetti dei farmaci prescritti, delle loro indicazioni, controindicazioni, interazioni e reazioni individuali prevedibili e delle modalità di impiego appropriato, efficace e sicuro dei mezzi diagnostico-terapeutici.

Il medico segnala tempestivamente all'Autorità competente le reazioni avverse o sospette da farmaci e gli eventi sfavorevoli o sospetti derivanti dall'utilizzo di presidi biomedicali.

Il medico può prescrivere farmaci non ancora registrati o non autorizzati al commercio oppure per indicazioni o a dosaggi non previsti dalla scheda tecnica, se la loro tollerabilità ed efficacia è scientificamente fondata e i rischi sono proporzionati ai benefici attesi; in tali casi motiva l'attività, acquisisce il consenso informato scritto del paziente e valuta nel tempo gli effetti.

Il medico può prescrivere, sotto la sua diretta responsabilità e per singoli casi, farmaci che abbiano superato esclusivamente le fasi di sperimentazione relative alla sicurezza e alla tollerabilità, nel rigoroso rispetto dell'ordinamento.

Il medico non acconsente alla richiesta di una prescrizione da parte dell'assistito al solo scopo di compiacerlo.

Il medico non adotta né diffonde pratiche diagnostiche o terapeutiche delle quali non è resa disponibile idonea documentazione scientifica e clinica valutabile dalla comunità professionale e dall'Autorità competente.

Il medico non deve adottare né diffondere terapie segrete.

Auch aktuell wird systematisch in größter Verletzung der vom Arzneimittelgesetzgeber aus guten Gründen vorgesehenen Notwendigkeit einer ärztlichen Verschreibung geimpft!

Die Empfehlung (Klein-)kinder zu „impfen“ (laut Berichterstattung richtet sich die Empfehlung sowohl auf die sog. Coronaschutzimpfung als auch auf die Grippeimpfung) weil sie zur Verbreitung der Infektion beitragen, sprich sog. Virenmultiplikatoren seien, stellt eine klare Verletzung der international verankerten Kinderrechte, des Medizinrechts sowie der Medizinethik dar, die einer ärztlichen Entscheidung stets zugrunde liegen muss, erst recht wenn es um Kinder geht.

Bereits in der sog. Pandemie wurden die Kinder in den *lockdown* geschickt, am freien Atmen und der Erfassung der visuellen Empathie durch unnütze und schädliche Masken gehindert, und anschließend mit experimentellen auf Gentechnik beruhende Substanzen „geimpft“ um sog. vulnerable Personengruppen zu schützen.

Es ist untragbar, dass der Südtiroler Sanitätsbetrieb und die Südtiroler „Gesundheitspolitik“ diese, die fundamentalsten Prinzipien der medizinischen Ethik und die Kinderrechte verletzende Handlungsweise, die auch wissenschaftlich jeglicher Grundlage entbehrt, fortsetzt.

Und daher dieser Beschlussantrag:

Aus diesen Gründen verpflichtet der Südtiroler Landtag die Landesregierung dazu, umgehend dafür Sorge zu tragen, dass der Südtiroler Sanitätsbetrieb und die für die Südtiroler Gesundheitspolitik Verantwortlichen es umgehend unterlassen, die Kinder als vermeintliches, durch Impfung auch mit experimentellen Substanzen pharmazeutisch generiertes Schutzschild für die Gesellschaft zu missbrauchen, d.h. es umgehend unterlassen zur Impfung der Kinder gegen Covid-19 und Grippe aufzurufen weil diese als angeblich zu hemmende Virenmultiplikatoren und -verbreiter wirken.



RA/Awv. DDr. Renate Holzeisen
Abgeordnete zum Südtiroler Landtag – Membro del Consiglio della Provincia
Autonoma di Bolzano
Fraktion VITA – Gruppo Consiliare VITA



MOZIONE

Bambini non possono essere abusati per la società come uno scudo farmaceutico generato da vaccinazione

Nella conferenza stampa dei responsabili dell'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige e dell'Assessore alla Salute Hubert Messner e dedicata all'inizio della campagna vaccinale 2025 contro il coronavirus e l'influenza, secondo quanto riportato dal telegiornale della RAI Südtirol, la **direttrice responsabile dell'Ufficio igiene e sanità pubblica dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige, dott.ssa Silvia Spertini**, ha sostenuto che la **vaccinazione sia importante per i bambini piccoli** (nel servizio si parla in generale di vaccinazione antinfluenzale e anti-Covid) **“perché contribuiscono alla diffusione dell'infezione”**.

Testualmente il servizio riportava: ***“La direttrice del Servizio di Igiene e Salute Pubblica Silvia Spertini consiglia la vaccinazione alle persone di età superiore ai sessant'anni e a quelle con un sistema immunitario indebolito. La vaccinazione è importante anche per i bambini piccoli, perché contribuiscono alla diffusione dell'infezione.”***

Secondo l'articolo pubblicato in data 15.10.2025 nel quotidiano Dolomiten “*Con un appuntamento per una doppia protezione*”, i responsabili dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige e l'assessore alla salute Hubert Messner hanno

dichiarato in conferenza stampa in riferimento al vaccino antinfluenzale e al cosiddetto vaccino Covid, che **“anche i bambini dovrebbero essere vaccinati, poiché sono considerati dei moltiplicatori del virus e svolgono un ruolo rilevante nella diffusione delle infezioni”**.

I responsabili dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige e l'assessore provinciale alla Salute Hubert Messner considerano, dunque, i bambini come “moltiplicatori e diffusori di virus” che devono essere vaccinati per proteggere gli altri!

Questo è contrario a qualsiasi etica medica! La vaccinazione è raccomandabile per i bambini, semmai, solo se essi stessi ne avessero bisogno, ma non perché sono coinvolti nella diffusione dei virus!

Secondo quanto riportato dall'emittente pubblica Rai Südtirol e dal più grande quotidiano altoatesino, l'Azienda sanitaria dell'Alto Adige invita i genitori a vaccinare i bambini, interferendo così con il loro sistema immunitario naturale, al fine di proteggere gli altri.

In altre parole, si abusano dei bambini (inclusi i più piccoli) come (peraltro solo presunto) scudo di protezione per la società generato con farmaci.

Si tratta di una chiara violazione dei diritti dei bambini, sanciti anche a livello internazionale!

Vedi art. 3 Convenzione Nazioni Unite sui Diritti dell'infanzia e dell'adolescenza

In tutte le decisioni relative ai fanciulli, di competenza delle istituzioni pubbliche o private di assistenza sociale, dei tribunali, delle autorità

amministrative o degli organi legislativi, **l'interesse superiore del fanciullo deve essere una considerazione preminente.**

A livello internazionale è noto che

1) il vaccino antinfluenzale non è efficace perché una sostanza iniettata nel braccio non provoca una risposta immunitaria nelle mucose del tratto respiratorio, come conferma lo stesso Anthony Fauci in un articolo scientifico pubblicato nel 2022 sul cosiddetto vaccino contro il coronavirus e sul vaccino antinfluenzale (allegato 1.1.):

<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1931-3128%2822%2900572-8>

Ecco la traduzione in lingua italiana (allegato 1.3.):

<https://drive.google.com/file/d/14tXzu9gv2W4N8M6McwrGPX1gLb9cFoEQ/view?usp=drivesdk>

2) il rischio di ammalarsi è notevolmente più elevato per chi è vaccinato contro l'influenza rispetto a chi non lo è, come dimostra chiaramente un recente studio condotto su oltre n. 53.000 operatori sanitari della Cleveland Clinic (Ohio, USA) relativo alla stagione vaccinale 2024-25 (allegato 2.1.):

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2025.01.30.25321421v3>

Ecco la traduzione in lingua italiana (allegato 2.3.)

https://drive.google.com/file/d/1l44x7vSYO3EEgUfAzS_ZWBh9JKisE7Bx/view?usp=drivesdk

3) i cosiddetti “vaccini” contro il Covid-19 non sono mai stati approvati per prevenire la trasmissione del virus, ma solo per proteggere

(eventualmente) le persone trattate con queste sostanze sperimentali dalla malattia Covid-19. Quindi non si può parlare di protezione degli altri! Al contrario, questi cosiddetti vaccini comportano enormi rischi per la vita e la salute, come dovrebbe essere ormai ben noto. Con lettera del 18.10.2023, su esplicita richiesta dei parlamentari europei, la direttrice dell'EMA, Emer Cooke, lo ha espressamente confermato come segue:

Traduzione in lingua italiana:

1. Le indicazioni approvate

Voi affermate che, secondo le indicazioni approvate, i vaccini dovrebbero essere somministrati solo a persone che desiderano proteggersi personalmente e che non sono approvati allo scopo di ridurre i tassi di trasmissione o di infezione (controllo della trasmissione). Affermate inoltre che l'indicazione approvata non corrisponde agli usi promossi dalle aziende farmaceutiche, dai politici e dagli esperti sanitari.

Sottolineate giustamente che i vaccini contro il COVID-19 non sono approvati per prevenire la trasmissione da una persona all'altra. Le indicazioni servono esclusivamente a proteggere le persone vaccinate.

*Le informazioni sul prodotto relative ai VACCINI CONTRO IL COVID-19 indicano chiaramente che i vaccini sono destinati all'immunizzazione attiva per la prevenzione del COVID-19. Inoltre, **le relazioni di valutazione dell'EMA relative all'autorizzazione dei vaccini sottolineano la mancanza di dati sulla trasmissibilità.***

*L'EMA continuerà a garantire la trasparenza in merito agli **usi autorizzati dei vaccini contro il COVID-19** e identificherà le aree in cui è necessario chiarire eventuali malintesi.”*



Marcel de Graaff MEP
European Parliament
ASP 06E240
60, rue Wiertz / Wiertzstraat 60
B-1047 Brussels
Belgium

Email: marcel.degraaff@europarl.europa.eu

18 October 2023
EMA/451828/2023
European Medicines Agency

Dear Honourable Members of Parliament Marcel de Graaff, Gilbert Collard, Francesca Donato, Joachim Kuhs, Mislav Kolakušić, Virginie Joron, Ivan Vilibor Sinčić and Bernhard Zimniok

Thank you for your letter of 4 October 2023 in which you call for the suspension of the marketing authorisations of the mRNA COVID-19 vaccines Comirnaty and Spikevax.

The European Medicines Agency is committed to protecting public health by conducting thorough scientific assessments of medicinal products for the EU. We are equally dedicated to ensuring that the public and their representatives in the European Parliament are informed of the reasons why their medicines are authorised and of the measures we take to monitor them once they are available.

We should also emphasise that EMA focuses mainly on one aspect of EU health policy, namely the authorisation and monitoring of medicines and vaccines. When our scientific committees issue recommendations, other bodies, such as the European Commission, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and national health and vaccination authorities can consider them as they develop immunisation policies to protect the public.

Please find below direct responses to the questions you raise in your letter.

1. The authorised indications

You state that based on the authorised indications, the vaccines 'should only be administered to individuals who seek personal protection, and they are not authorised for the purpose of reducing transmission or infection rates (transmission control)'. You also state that the authorised indication does not align with uses promoted by 'pharmaceutical companies, politicians, and health professionals'.

You are indeed correct to point out that COVID-19 vaccines have not been authorised for preventing transmission from one person to another. The indications are for protecting the vaccinated individuals only.

The product information for COVID-19 vaccines clearly states that the vaccines are for active immunisation to prevent COVID-19. In addition, EMA's assessment reports on the authorisation of the vaccines note the lack of data on transmissibility.

Considerato che i cosiddetti “vaccini” contro il Covid-19 non sono stati autorizzati per la prevenzione della trasmissione virale e anche i vaccini contro l’influenza non funzionano al riguardo, l’invito di trattare i bambini con queste sostanze ai fini della tutela degli altri costituisce un trattamento illegale off-label di queste sostanze.

Con sentenza del 26 settembre 2025, il Tribunale di Asti ha attribuito un risarcimento mensile di Euro 3.000 a una donna che, dopo essere stata trattata con il cosiddetto “vaccino” Covid-19 Comirnaty di BioNTech/Pfizer, ha contratto una mielite trasversa (non può più camminare). Per il risarcimento dei danni, la donna deve rivolgersi al produttore, che ha ottenuto l'esonero totale dalla responsabilità da parte della Repubblica Italiana e dell'UE!

Ecco la sentenza (allegato 3.1):

<https://drive.google.com/file/d/1vtzg9NutlrKkdLVAu5AHt0721c2sbHm2/view?usp=drivesdk>

In Alto Adige i bambini vengono esposti intenzionalmente in modo irresponsabile ad un tale rischio, peraltro per niente! Non essendoci nemmeno un’efficacia di proteggere gli altri, come confermato dalla stessa EMA!

4) Studi pubblicati ormai quotidianamente dimostrano che i cosiddetti “vaccini” Covid-19 su base RNA modificata (Comirnaty di Pfizer/BioNTech, Spikevax di Moderna) contengono enormi residui di plasmidi di DNA e che Comirnaty di Pfizer/BioNTech supera di gran lunga il limite fissato dalla FDA e dall'OMS per il promotore-potenziatore SV40.

Da un articolo scientifico pubblicato il **6 settembre 2025 su PubMed** (la banca dati online del *National Institute of Health* del governo degli Stati Uniti) e **accolto con grande preoccupazione in tutto il mondo**, scritto da tre eminenti scienziati statunitensi, emerge che **i due cosiddetti “vaccini” Covid-19 a base di mRNA - Comirnaty di Pfizer/BioNTech (attualmente in uso in Alto Adige/Sudtirolo) e Spikevax di Moderna - contengono da miliardi a centinaia di miliardi di molecole di DNA per dose.**

Entrambe le sostanze superano da 36 a 627 volte il limite fissato nelle linee guida stabilite dalla FDA e dall'OMS per il DNA residuo in 10 ng/dose.

Inoltre, la sostanza Comirnaty di Pfizer/BioNTech, attualmente utilizzata anche sui bambini in Alto Adige/Sudtirolo, supera di molto il limite legale per il promotore-potenziatore SV40, noto per essere altamente cancerogeno.

Il promotore-potenziatore SV40 viene iniettato negli animali da laboratorio per produrre cellule tumorali al fine di testare farmaci antitumorali, poiché è associato a una serie di tumori maligni nell'uomo.

Vedi lo studio nella versione originale in inglese qui (allegato 4.1.):

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40913499/>

e la traduzione in italiano qui (allegato 4.3.):

<https://drive.google.com/file/d/1A7hbNx8wnYkbWPQ8MMzIQGDSLhHtvVDm/view?usp=drivesdk>

I cosiddetti “vaccini” Covid-19 a RNA modificata sono quindi altamente genotossici, cancerogeni e mutageni (alterano il genoma umano), poiché l'enorme quantità di residui di DNA e il superamento del limite consentito

di quantità di promotore-potenziatore SV40, notoriamente altamente cancerogeno, non significano altro.

Comirnaty di Pfizer/BioNTech, così come gli altri cosiddetti “vaccini” Covid-19, per quanto risulta direttamente dalla documentazione di autorizzazione, **non sono mai stati testati, tra l'altro, in punto genotossicità, cancerogenicità e mutagenicità, perché si presumeva che queste sostanze sperimentali non comportassero rischi in tal senso!**

Ai bambini sono state e continuano ad essere somministrate sostanze sperimentali altamente genotossiche, cancerogene e purtroppo anche mutagene, basandosi sulla semplicissima presunzione della loro innocuità!

Vedi la pagina 30 delle attuali informazioni tecniche nell'allegato I della decisione di autorizzazione della Commissione Europea su Comirnaty di Pfizer/BioNTech (allegato 5.2):

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_it.pdf

Genotossicità/Potenziale cancerogeno

Non sono stati condotti studi di genotossicità o sul potenziale cancerogeno. Si ritiene che i componenti del vaccino (lipidi e mRNA) non presentino alcun potenziale genotossico.

Con uno studio retrospettivo su larga scala basato sulla popolazione del Corea del Sud pubblicato poche settimane fa a Seul, sono state presentate le incidenze cumulative e i rischi conseguenti per i tumori in generale un anno dopo la “vaccinazione” contro il COVID-19.

I dati relativi al periodo tra il 2021 e il 2023 riferiti a n. 8.407.849 persone, sono stati ricavati dal database dell'assicurazione sanitaria coreana. I partecipanti sono stati divisi in due gruppi in base al loro stato di vaccinazione contro il COVID-19.

I rischi di cancro alla tiroide, allo stomaco, all'intestino, ai polmoni, al seno e alla prostata sono aumentati in modo significativo un anno dopo la vaccinazione.

Ecco lo studio nella versione originale in inglese:

<https://biomarkerres.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s40364-025-00831-w.pdf> (allegato 6.1.)

e qui la traduzione in italiano (allegato 6.3.):

<https://drive.google.com/file/d/19n4g0ak580IUJJcuin-SYnQnTU4zJ4lF/view>

Ora, per la **prima volta**, in uno studio pubblicato di recente è stata fornita la prova della **sequenza RNA modificata “vaccinale” di Comirnaty di Pfizer/BioNTech nelle cellule tumorali di una donna di 31 anni, che dopo ripetute iniezioni di Comirnaty di Pfizer/BioNTech ha sviluppato un tumore alla vescica finora molto raro.**

Ecco lo studio nella versione originale inglese (allegato 7.1.):

<https://zenodo.org/records/17122912>

e qui nella traduzione italiana (allegato 7.3.):

<https://drive.google.com/file/d/102pELFF4Gch-VF65Q2RZzbnQILkIaYBX/view?usp=drivesdk>

Ciò significa che l'RNA “vaccinale” che raggiunge le cellule di tutto il corpo umano nei nanolipidi si integra nel DNA umano.

La pubblicazione di ulteriori risultati dello studio sulla cancerogenicità e mutagenicità ormai dimostrate è stata annunciata dai ricercatori statunitensi per le prossime settimane.

Il direttore del Centro per la Salute Globale dell'Istituto Superiore di Sanità, il dott. Maurizio Federico, già dal 2024 mette in guardia, in articoli scientifici finanziati dal Ministero della Salute italiano, dagli effetti collaterali causati dagli attuali “vaccini” Covid-19 e dalla loro inefficacia (allegato 8.1.)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39591184/>

Ecco la traduzione in lingua italiana (allegato 8.3.):

<https://drive.google.com/file/d/1jQJKw-FJxwSJgQcXROMzwwBqm1UxZ1Nu/view?usp=drivesdk>

e in un collegamento diretto dall'Istituto Superiore di Sanità a una conferenza stampa tenutasi il 4 dicembre 2024 nel Consiglio provinciale dell'Alto Adige, ha esposto, sulla base di studi scientifici internazionali, l'effettiva inefficacia e l'alto rischio dei “vaccini” Covid-19 a base di mRNA modificata iniettati nella parte superiore del braccio.

Ha inoltre sottolineato che è noto che anche il vaccino antinfluenzale non è efficace - come ha ammesso lo stesso Antony Fauci in uno studio pubblicato insieme ad altri nel 2022 - perché un virus assorbito attraverso le vie respiratorie non può essere bloccato da una sostanza iniettata nel muscolo del braccio!

Vedi a questo proposito la registrazione del suo interessantissimo intervento alla conferenza stampa nel Consiglio provinciale dell'Alto Adige:

<https://odysee.com/@renateholzeisen:e/DottMaurizioFederico-ResponsabileCentroNazionaleSaluteGlobale%2C-ISS-InterventoInConferenzaStampaAvvDDrRenateHolzeisenpressoilConsiglioProvinciadiBolzano4dicembre2024:7>

Vedi qui le diapositive mostrate dal direttore dell'Istituto Nazionale di Salute Globale dell'Istituto Superiore di Sanità durante la conferenza stampa al Consiglio provinciale dell'Alto Adige (allegato 9):

<https://drive.google.com/file/d/1MwYBm7xIDJfSUXcQJ64GuFgcmJlgJXGD/view>

I timori del direttore dell'Istituto Nazionale di Sanità Globale presso l'Istituto Superiore di Sanità sono condivisi anche dal governo federale degli Stati Uniti, che già a maggio ha revocato la raccomandazione delle cosiddette “vaccinazioni” Covid-19 per le donne in gravidanza e i bambini e successivamente in generale.

Anche dall'attuale piano di gestione dei rischi del produttore, depositato presso l'EMA, emerge chiaramente che mancano i dati sulla sicurezza relativi agli effetti a lungo termine, il che rende assolutamente inaccettabile l'uso di queste sostanze, in particolare sui bambini!

Table 73. List of Important Risks and Missing Information

Important identified risks	Myocarditis and Pericarditis
Important potential risks	None
Missing information	Use in pregnancy and while breast feeding
	Use in immunocompromised patients
	Use in frail patients with co-morbidities (e.g., chronic obstructive pulmonary disease [COPD], diabetes, chronic neurological disease, cardiovascular disorders)
	Use in patients with autoimmune or inflammatory disorders
	Long term safety data

Vedi pagina 187 dell'attuale RMP per Comirnaty di Pfizer/BioNTech (allegato 10):

https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp/comirnaty-epar-risk-management-plan_en.pdf

Dalle attuali informazioni dell'EMA/Commissione Europea (e riprese dall'AIFA) su **Comirnaty di Pfizer/BioNTech** emerge chiaramente che la sostanza a base di mRNA modificato **può causare un'inflammatione del muscolo cardiaco anche con esito fatale.**

L'Assessore provinciale Messner e i responsabili dell'Azienda sanitaria dell'Alto Adige dovrebbero sapere che le cicatrici del muscolo cardiaco causate dall'inflammatione non guariscono mai completamente e che molti cardiologi sottolineano la conseguente riduzione dell'aspettativa di vita.

Miocardite e pericardite

Dopo la vaccinazione con Comirnaty è presente un aumento del rischio di sviluppare miocardite e pericardite. Queste condizioni possono svilupparsi entro pochi giorni dalla vaccinazione e si sono verificate principalmente entro 14 giorni. Sono state osservate più spesso dopo la seconda dose di vaccino e nei maschi più giovani (vedere paragrafo 4.8). I dati disponibili indicano che la maggior parte dei casi si risolve. Alcuni casi hanno richiesto il supporto in terapia intensiva e sono stati osservati casi fatali.

Gli operatori sanitari devono prestare attenzione ai segni e ai sintomi di miocardite e pericardite. Le persone vaccinate (inclusi genitori o coloro che prestano assistenza) devono essere istruite a rivolgersi immediatamente al medico qualora dopo la vaccinazione sviluppino sintomi indicativi di miocardite o pericardite, quali dolore toracico (acuto e persistente), respiro affannoso o palpitazioni.

Gli operatori sanitari devono consultare le linee guida e/o specialisti per diagnosticare e trattare tale affezione.

Vedi pagina 5 dell'attuale versione dell'allegato I alla decisione di esecuzione della Commissione europea relativa all'autorizzazione all'immissione in commercio di Comirnaty di Pfizer/BioNTech (allegato 11.2):

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_it.pdf

Iniettare sostanze nei bambini

- **che hanno dimostrato di non proteggere dall'infezione virale,**
- **che non generano una risposta immunitaria efficace nei polmoni,**
- **che contengono enormi residui di plasmidi di DNA e un contenuto di promotore SV-40 che supera di gran lunga il limite consentito,**
- **che comportano gravissimi effetti collaterali già ufficialmente accertati (infiammazione del muscolo cardiaco, anche con esito fatale, mielite trasversa ecc.) e molti effetti collaterali ancora poco studiati, e di cui in generale non si conoscono gli effetti a lungo termine (come dichiarato anche dai produttori nel loro RMP)**

significa esporre in modo irresponsabile giovanissime vite, in cui avviene un processo di divisione cellulare particolarmente rapido e delicato, a un enorme rischio genotossico, cancerogeno e mutageno.

Questo è semplicemente criminale!

Infine, va ricordato che

tutti i vaccini richiedono una prescrizione medica per essere utilizzati in modo conforme alla legge e alle autorizzazioni!

Si veda ad esempio l'allegato II, punto B) della decisione di autorizzazione della Commissione europea per il cosiddetto “vaccino” Covid-19 Comirnaty di Pfizer/BioNTech (allegato 12.2)

https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2025/20250725167118/anx_167118_it.pdf

B. CONDIZIONI O LIMITAZIONI DI FORNITURA E UTILIZZO

Medicinale soggetto a prescrizione medica.

- **Rilascio ufficiale dei lotti**

L'obbligo di prescrizione medica per una sostanza iniettabile è previsto dall'art. 71 della direttiva UE 2001/83/CE e dall'art. 88 del D.Lgs. 219/2006.

In Italia solo il medico è autorizzato a prescrivere un farmaco.

Le vaccinazioni nelle farmacie senza prescrizione medica sono illegali a priori!

Il piano vaccinale nazionale e le raccomandazioni delle autorità sanitarie nazionali e locali in materia di vaccinazioni non sostituiscono la

prescrizione medica (che deve essere effettuata ai sensi degli articoli 4 e 13 del codice deontologico medico), poiché non si riferiscono né ai prodotti vaccinali specifici da somministrare, né al bambino specifico da vaccinare o al soggetto da vaccinare in generale, ma a una popolazione anonima.

Il medico non deve essere soggetto ad alcun interesse, imposizione o condizionamento nell'esercizio della sua attività.

Art. 4

Libertà e indipendenza della professione. Autonomia e responsabilità del medico

L'esercizio professionale del medico è fondato sui principi di libertà, indipendenza, autonomia e responsabilità.

Il medico ispira la propria attività professionale ai principi e alle regole della deontologia professionale senza sottostare a interessi, imposizioni o condizionamenti di qualsiasi natura.

Per prescrivere un medicinale (nel caso specifico un cosiddetto vaccino), il medico deve conoscere il profilo di efficacia e di sicurezza/rischio del medicinale e informare il paziente, senza agire come agente di marketing per l'industria farmaceutica.

Art. 13

Prescrizione a fini di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione

La prescrizione a fini di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione è una diretta, specifica, esclusiva e non delegabile competenza del medico, impegna la sua autonomia e responsabilità e deve far seguito a una diagnosi circostanziata o a un fondato sospetto diagnostico.

La prescrizione deve fondarsi sulle evidenze scientifiche disponibili, sull'uso ottimale delle risorse e sul rispetto dei principi di efficacia clinica, di sicurezza e di appropriatezza.

Il medico tiene conto delle linee guida diagnostico-terapeutiche accreditate da fonti autorevoli e indipendenti quali raccomandazioni e ne valuta l'applicabilità al caso specifico.

L'adozione di protocolli diagnostico-terapeutici o di percorsi clinico-assistenziali impegna la diretta responsabilità del medico nella verifica della tollerabilità e dell'efficacia sui soggetti coinvolti.

Il medico è tenuto a un'adeguata conoscenza della natura e degli effetti dei farmaci prescritti, delle loro indicazioni, controindicazioni, interazioni e reazioni individuali prevedibili e delle modalità di impiego appropriato, efficace e sicuro dei mezzi diagnostico-terapeutici.

Il medico segnala tempestivamente all'Autorità competente le reazioni avverse o sospette da farmaci e gli eventi sfavorevoli o sospetti derivanti dall'utilizzo di presidi biomedicali.

Il medico può prescrivere farmaci non ancora registrati o non autorizzati al commercio oppure per indicazioni o a dosaggi non previsti dalla scheda tecnica, se la loro tollerabilità ed efficacia è scientificamente fondata e i rischi sono proporzionati ai benefici attesi; in tali casi motiva l'attività, acquisisce il consenso informato scritto del paziente e valuta nel tempo gli effetti.

Il medico può prescrivere, sotto la sua diretta responsabilità e per singoli casi, farmaci che abbiano superato esclusivamente le fasi di sperimentazione relative alla sicurezza e alla tollerabilità, nel rigoroso rispetto dell'ordinamento.

Il medico non acconsente alla richiesta di una prescrizione da parte dell'assistito al solo scopo di compiacerlo.

Il medico non adotta né diffonde pratiche diagnostiche o terapeutiche delle quali non è resa disponibile idonea documentazione scientifica e clinica valutabile dalla comunità professionale e dall'Autorità competente.

Il medico non deve adottare né diffondere terapie segrete.

Anche attualmente si vaccina sistematicamente in grave violazione della necessità di una prescrizione medica, prevista invece dal legislatore farmaceutico per buoni motivi!

Quindi, la raccomandazione di “vaccinare” i bambini (secondo quanto riportato dai media, la raccomandazione si riferisce sia al cosiddetto vaccino contro il coronavirus, sia al vaccino antinfluenzale) perché contribuirebbero alla diffusione dell'infezione, ovvero perché sarebbero dei cosiddetti moltiplicatori di virus, costituisce una chiara violazione dei Diritti Fondamentali dei bambini tutelati a livello internazionale, del Diritto Farmaceutico e dell'Etica Medica, che deve sempre essere alla base di una decisione medica, a maggior ragione quando riguarda bambini.

Già durante la cosiddetta pandemia, i bambini sono stati mandati in *lockdown*, li è stato impedito di respirare liberamente e di percepire l'empatia visiva a causa di mascherine inutili e dannose, e successivamente sono stati

“vaccinati” con sostanze sperimentali basate sull'ingegneria genetica altamente pericolose per “proteggere” i cosiddetti gruppi di persone vulnerabili.

È semplicemente inconcepibile che l'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige e la “politica sanitaria” altoatesina/sudtirolese continuino a violare i principi fondamentali dell’etica medica e i diritti dei bambini con questo modo di agire, peraltro privo di qualsiasi fondamento scientifico.

Tanto premesso la seguente mozione:

Per questi motivi, il Consiglio della Provincia Autonoma di Bolzano obbliga la Giunta provinciale a provvedere immediatamente affinché l'Azienda sanitaria dell'Alto Adige e i responsabili della politica sanitaria altoatesina smettano immediatamente di abusare dei bambini come presunto scudo protettivo per la società, generato farmacologicamente anche con sostanze sperimentali attraverso la vaccinazione, ovvero affinché si astengano immediatamente dall’invito dei bambini alla vaccinazione contro il Covid-19 e l'influenza perché questi costituirebbero dei moltiplicatori e diffusori di virus da inibire.



RA/Avv. DDr. Renate Holzeisen

Abgeordnete zum Südtiroler Landtag – Membro del Consiglio della Provincia Autonoma di Bolzano

Fraktion VITA – Gruppo Consiliare VITA

Perspective

Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenzaviruses, and other respiratory viruses

David M. Morens,¹ Jeffery K. Taubenberger,^{2,*} and Anthony S. Fauci¹

¹Office of the Director, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

²Viral Pathogenesis and Evolution Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

*Correspondence: taubenbergerj@niaid.nih.gov

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.016>

SUMMARY

Viruses that replicate in the human respiratory mucosa without infecting systemically, including influenza A, SARS-CoV-2, endemic coronaviruses, RSV, and many other “common cold” viruses, cause significant mortality and morbidity and are important public health concerns. Because these viruses generally do not elicit complete and durable protective immunity by themselves, they have not to date been effectively controlled by licensed or experimental vaccines. In this review, we examine challenges that have impeded development of effective mucosal respiratory vaccines, emphasizing that all of these viruses replicate extremely rapidly in the surface epithelium and are quickly transmitted to other hosts, within a narrow window of time before adaptive immune responses are fully marshaled. We discuss possible approaches to developing next-generation vaccines against these viruses, in consideration of several variables such as vaccine antigen configuration, dose and adjuvantation, route and timing of vaccination, vaccine boosting, adjunctive therapies, and options for public health vaccination policies.

INTRODUCTION

Effective vaccines and vaccine prevention strategies against endemic and emerging respiratory viruses are of critical importance, as these pathogens kill as many as 5 million people worldwide every year. For example, over the past decade, influenza killed 12,000–52,000 people in the United States each year¹ and ranks among the leading causes of years of productive life lost (YPLL). Endemic respiratory viruses such as respiratory syncytial virus (RSV) and the parainfluenzaviruses take many additional lives, and previously unrecognized respiratory viruses such as SARS-CoV-2, the cause of COVID-19, have emerged unexpectedly. SARS-CoV-2 thus far has killed more than one million people in the United States. The increasing frequency of emergences of such pandemic respiratory viruses may be a key feature of a new pandemic era,² forcing us to consider anew the state of respiratory virus vaccinology (Figure 1).^{2,3}

Until the emergence of COVID-19, influenza had for many decades been the deadliest vaccine-preventable viral respiratory disease, one for which only less than suboptimal vaccines are available. Surprisingly, little has changed with influenza vaccines since 1957 when they were first administered in US national vaccination programs. Over the years, influenza vaccines have never been able to elicit durable protective immunity against seasonal influenza virus strains, even against non-drifted strains.^{4–7} Although current influenza vaccines reduce the risk of severe disease, hospitalization, and death to some degree, their effectiveness against clinically apparent infection is decidedly suboptimal, ranging from 14% to 60% over the past 15 influenza

seasons.¹ Furthermore, the duration of vaccine-elicited immunity is measured only in months. Current vaccines require annual re-vaccination with updated formulations that are frequently not precisely matched to circulating virus strains.⁸ Although annual influenza vaccinations are strongly recommended for most of the general public and especially for persons in high-risk groups, including the elderly, those with chronic diseases, and pregnant women, vaccine acceptance by the general public is not ideal.⁹

As of 2022, after more than 60 years of experience with influenza vaccines, very little improvement in vaccine prevention of infection has been noted. As pointed out decades ago, and still true today, the rates of effectiveness of our best approved influenza vaccines would be inadequate for licensure for most other vaccine-preventable diseases.⁷ Even decades-long efforts to develop better, so-called “universal” influenza vaccines—vaccines that would create more broadly protective immunity, preferably lasting over longer time periods^{8,10}—have not yet resulted in next-generation, broadly protective vaccines, although a large number of experimental vaccines are in preclinical or early clinical development.¹¹

During the COVID-19 pandemic, the rapid development and deployment of SARS-CoV-2 vaccines has saved innumerable lives and helped to achieve early partial pandemic control.¹² However, as variant SARS-CoV-2 strains have emerged, deficiencies in these vaccines reminiscent of influenza vaccines have become apparent. The vaccines for these two very different viruses have common characteristics: they elicit incomplete and short-lived protection against evolving virus variants that escape population immunity.^{12–15} Considering that vaccine



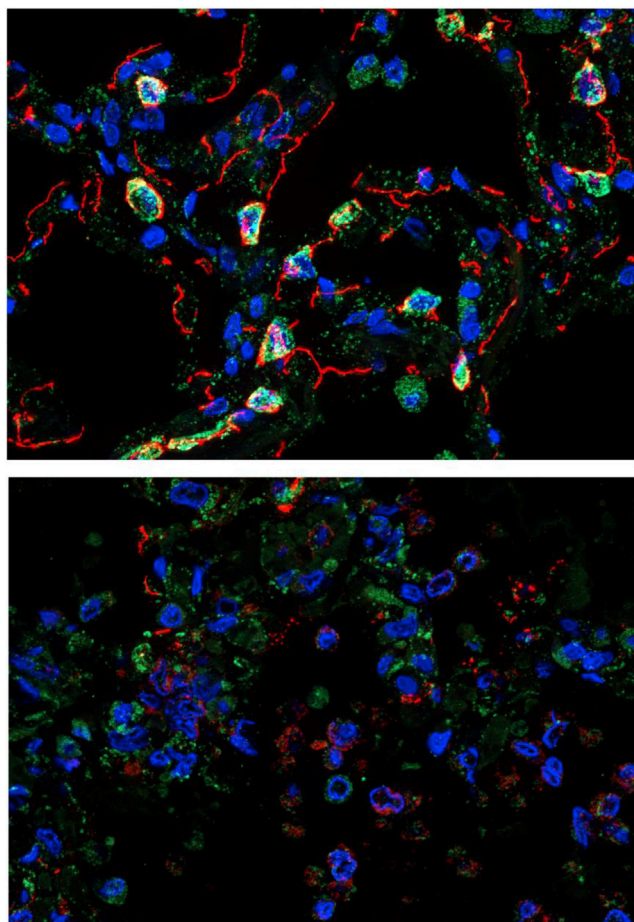


Figure 1. Alveolar damage in fatal COVID-19 lung autopsy samples
Multicolor immunofluorescence showing prosurfactant protein C (green) and E-cadherin (red) expression in normal lung tissue (top) and in a COVID-19 lung autopsy case (bottom). Nuclei are stained blue. Normal lung tissue alveolar septa show prominent prosurfactant protein C and E-cadherin expression in lung alveolar type 2 cells and epithelial junctions, respectively, compared to fatal COVID-19 lung tissue, which shows marked loss of alveolar septal prosurfactant protein C and E-cadherin staining and intra-alveolar accumulation of positive-stained epithelial debris.

The images demonstrate the extensive damage to the lung observed in a fatal COVID-19 case. New generations of vaccines against respiratory viruses like SARS-CoV-2 and influenza viruses are critically important for preventing pulmonary pathology, serious illness, and death.

Images of normal lung and a COVID-19 autopsy case are derived from D'Agnillo F, et al. *Sci Transl Med*. 2021;13(620):eabj7790. Images courtesy of Dr. Felice D'Agnillo of the US Food and Drug Administration.

development and licensure is a long and complex process requiring years of preclinical and clinical safety and efficacy data, the limitations of influenza and SARS-CoV-2 vaccines remind us that candidate vaccines for most other respiratory viruses have to date been insufficiently protective for consideration of licensure, including candidate vaccines against RSV, a major killer of infants and the elderly,^{16–21} parainfluenzaviruses, endemic coronaviruses,²² and many other “common cold” viruses that cause significant morbidity and economic loss.

More than 50 years ago, the development of successful vaccines against some of the most important respiratory viruses, including measles, mumps, and rubella, led to the hope that

vaccines could soon be developed for all other respiratory viruses. However, natural infections with these three vaccine-controlled respiratory viruses, as well as smallpox and varicella zoster virus (VZV), are not representative of infections caused by most respiratory viruses. They differ in at least three critically important ways that are related to their successful control with vaccines (Table 1):

- (1) after first replicating mucosally, these systemic respiratory viruses all cause significant viremia that seeds an enormous number of infectious virions throughout the body, putting them in contact with multiple immune compartments and immune competent cell types,
- (2) they have relatively long incubation periods that reflect initial mucosal replication and the subsequent systemic spread of infectious virions, which allows time for the induction of the full force of adaptive immunity, and
- (3) they elicit long-term or lifetime protective immunity (Table 1).

In stark contrast, the non-systemic respiratory viruses such as influenza viruses, SARS-CoV-2, and RSV tend to have significantly shorter incubation periods (Table 1) and rapid courses of viral replication. They replicate predominantly in local mucosal tissue, without causing viremia, and do not significantly encounter the systemic immune system or the full force of adaptive immune responses, which take at least 5–7 days to mature, usually well after the peak of viral replication and onward transmission to others. SARS-CoV-2 “RNAemia” (circulation of viral RNA in the bloodstream, as is seen with most mucosal respiratory virus infections, as distinct from viremia, in which infectious viruses can be cultured from the blood), has been reported, and RT-PCR levels of viral RNA have been linked to severe disease,^{23,24} similar to studies of influenza RNAemia.^{25,26} As a result, the non-systemically replicating respiratory viruses, apparently including SARS-CoV-2,^{13–15} tend to repeatedly re-infect people over their lifetimes without ever eliciting complete and durable protection.²⁷

Another important factor to consider is that although RNA viruses share a similar inherent RNA-dependent RNA polymerase error rate,²⁸ different viruses (and different open reading frames within their genomes) differ in their tolerance for mutation. Mutational constraints can be related to frequent overlapping open reading frames²⁸ or functional constraints on the acquisition of nonsynonymous mutations as is the case, for example, with measles virus.²⁹ In contrast, the external influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase proteins are comparatively plastic, and positively selected nonsynonymous mutations result in immunologically significant antigenic drift,^{30,31} by the acquisition of nonsynonymous mutations in antigenic epitopes, as well as by altering the N-linked glycosylation patterns.³² Rapid antigenic drift affects the control of annual influenza epidemics⁸ and complicates the effort to produce broadly protective, “universal” influenza vaccines. The SARS-CoV-2 spike protein has shown a similar plasticity, with the emergence of multiple variants with altered antigenicity³³ that has complicated its control through current vaccination strategies.³⁴

Although rapid evolution of antigenically variable mucosal viruses like influenza A viruses³⁵ and SARS-CoV-2 complicate next-generation vaccine design, other mucosal-only respiratory

Table 1. Epidemiologic and immunologic parameters of selected human respiratory viruses and vaccines used to control them

Virus	Incubation period ^a	Marked viremia	Infection elicits long-term protective immunity	Re-infections are rare	Vaccines elicit long-term protective immunity	Vaccine type
Measles (to prodrome)	≈ 10 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Mumps	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Rubella	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Smallpox ^b	≈ 12 days	yes	yes	yes	yes	replicating
VZV ^c	≈ 14 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Endemic coronaviruses	≈ 5 days	no	no	no	no	none
Influenza virus	≈ 2 days	no	no	no	no	replicating, other
Parainfluenzaviruses	≈ 4 days	no	no	no	no	none
RSV	≈ 5 days	no	no	no	no	none
SARS-CoV-2	≈ 4 days	no ^d	no	no	no	non-replicating

^aViral incubation periods, especially shorter incubation periods, typically have very broad ranges; these estimates are taken from cross-sections of the literature.

^bSmallpox was eradicated from natural circulation in 1978.

^cVaricella-zoster virus (VZV) recrudescence (referred to as zoster, zona, or “shingles”) results from release of latent viruses from ganglia; second exogenous respiratory infections in normal persons are rare.

^dAlthough SARS-CoV-2 antigens have been detected in multiple tissues, the virus does not appear to be associated with significant “free” viremia, as evidenced by difficulty in culturing infectious virions from blood or tissues, and by weak elicitation of broad and durable protective systemic immunity.

viruses, such as RSV, have shown much less antigenic plasticity^{36–38}; however, it still causes repeated infections over a lifetime without the development of long-term protective immunity.^{39,40} Thus, although genetic and antigenic variability of viruses like influenza and SARS-CoV-2 make vaccine design more challenging, these factors by themselves cannot fully explain the lack of elicitation of long-term protective immunity against other respiratory mucosal viruses like the more phenotypically stable RSV.

Taking all of these factors into account, it is not surprising that none of the predominantly mucosal respiratory viruses have ever been effectively controlled by vaccines. This observation raises a question of fundamental importance: if natural mucosal respiratory virus infections do not elicit complete and long-term protective immunity against reinfection, how can we expect vaccines, especially systemically administered non-replicating vaccines, to do so? This is a major challenge for future vaccine development, and overcoming it is critical as we work to develop “next-generation” vaccines.

Key challenges (summarized in Table 2) are discussed below, along with ways to confront them in the pursuit of new and improved vaccines for respiratory viruses.

NATURAL INFECTIONS WITH MUCOSAL RESPIRATORY VIRUSES MAY NOT BE FULLY CONTROLLED BY HUMAN IMMUNE RESPONSES BECAUSE THE HUMAN IMMUNE SYSTEM HAS EVOLVED TO TOLERATE THEM DURING VERY SHORT INTERVALS OF MUCOSAL VIRAL REPLICATION

The signs and symptoms of many different mucosal respiratory virus infections are remarkably similar: a short duration of illness and a typically uncomplicated course featuring rhinorrhea, sneezing, sore throat, variable cough, malaise, and in many cases low or absent fever.⁴¹ These commonalities strongly sug-

gest similar pathogenic mechanisms for these viruses involving host inflammatory and innate immune responses.

The inability of mucosal respiratory viruses to elicit durable protective immunity reflects, among many other factors, evolutionary adaptation of virus to host, and host to virus. In this evolutionary relationship, viruses have two important advantages: (1) the human respiratory immune system has evolved to express complex tolerance regulation (see below) that may inhibit effective viral immune elimination during the first 5–7 post-inoculation days, when innate immune responses predominate; and (2) very short incubation periods (Table 1) allow substantial and unchallenged viral replication and onward viral spread before adaptive immune responses can be adequately mounted to eliminate them.^{42,43}

Moreover, the several compartments of the respiratory immune system function in significantly different ways than do immune system compartments in other organ systems. In particular, the respiratory immune system resides in separate tissue-specific areas of the semi-organized, mucosal-associated lymphoid tissues (MALTs) of the tear/conjunctival associated lymphoid tissue (TALT), nasopharyngeal associated lymphoid tissue (NALT), bronchial associated lymphoid tissue (BALT),⁴⁴ and in separate pulmonary compartments. Each of these compartments independently senses viral infection and antigen presentation, interacts with the other compartments and with the systemic immune system, initiates local effector responses, and maintains a variably tolerized immune state.

The terms “disease tolerance” and “immune tolerance” refer to the still-incompletely characterized but distinct category of mammalian immune defense mechanisms that allow hosts to “accept” infection and other antigenic stimuli to optimize survival (reviewed in Medzhitov et al.⁴² and Iwasaki et al.⁴³). Because humans inhale and ingest enormous quantities of exogenous proteins with every breath and mouthful, the respiratory and gastrointestinal immune compartments have evolved to

Table 2. Key challenges in developing next-generation vaccines against mucosal respiratory viruses including SARS-CoV-2, influenza A viruses, and emerging pandemic and other viruses of importance

- (1) Natural infections with mucosal respiratory viruses may not be fully controlled by human immune responses because the human immune system has evolved to tolerate them during very short intervals of mucosal viral replication
- (2) Since mucosal and systemic immunity only partially protects against infection with mucosal respiratory viruses, we must take advantage of alternative host immune mechanisms
- (3) Immune correlates of protection against mucosal respiratory viruses are incompletely understood, vary between viral strains and subtypes, with viral drift, and they exhibit inter-individual variation
- (4) Vaccine-related questions of route of administration, antigen configuration, adjuvantation, and association with adjunctive therapy are of great importance for current research
- (5) Vaccinated hosts and host risk groups are many and heterogeneous
- (6) Public health considerations relating to next-generation respiratory vaccines must contribute to shaping vaccine design, including vaccine schedule, role of boosting, frequency of vaccination and duration/completeness of protection, side effects, and public acceptance

deal with continual and massive antigenic assaults from the outside world. (Immune responses to viral infection of the gastrointestinal mucosa have recently been reviewed,⁴⁵ and are not discussed here.) Inhaled and ingested proteins must be identified and either tolerated or attacked and eliminated. This requires a highly evolved and complicated immune “decision-making” strategy that simultaneously accepts harmless foreign proteins while down-regulating immune responses to infectious agents and allergens that otherwise might cause bystander tissue damage.^{46–50}

From the teleological point of view of the pathogen, mucosally replicating/non-systemic respiratory viruses have adapted over millennia to tolerized host immune environments to optimally infect, replicate, and spread quickly, before adaptive immune responses can be fully marshaled to control them. Among other tactics, they do so by inhibiting host interferon (IFN) responses (as do other systemically replicating RNA viruses), expressing decoy antigens, and inducing aberrant immune responses that promote viral survival without causing significant host tissue damage.¹⁶ The host respiratory microbiome contributes to this balance as well, on one hand by limiting infection (for example, by regulating IFN production) or on the other hand by promoting infection (for example, inducing antiviral states of immune tolerance).^{46,51–53} The gut microbiome has also been associated with individual variation in vaccine response, and this association also needs further in-depth investigation.^{54,55}

A better understanding of the afferent arm of these systems^{46,49,51,52,56–63} is needed, including the roles of upper airway epithelial cells (which play a key role in sensing foreign materials including viral pathogens), transepithelial antigen-sensing and -presenting cells such as M cells and intraepithelial dendritic cells, immune regulation, tolerance homeostasis, IgA control, and the expression and effects of class-switched IgA.⁶⁴ The latter is locally stimulated by incoming mucosal anti-

gens and, in addition to its viral neutralization and other effector functions, is more cross-protective than other immunoglobulins in its secretory form,^{65,66} initiates antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and is an immune regulator.^{67–70} The importance of mucosal secretory IgA (sIgA) in pathogen-specific responses against respiratory viral infections has long been appreciated for influenza viruses,^{65,71} RSV,^{72,73} and more recently SARS-CoV-2.^{74,75}

The immunologic “Faustian bargain” between tolerance versus infection control, which permits transient, moderated infection by respiratory agents of low or intermediate pathogenicity to restrain the destructive forces of an immune elimination response,^{16,59} may be problematic for vaccine control of respiratory viruses, not only in the local and systemic sensing of vaccine antigens but also in eliciting optimal immune responses. Not surprisingly, immune tolerance is most pronounced in the upper respiratory tract, where respiratory viruses are inoculated, compared with the lower respiratory tract,^{49,57,76} where some respiratory viruses may spread if not contained (see below). This presents an additional challenge to developing vaccines that should ideally both dampen initiation of viral infection and control infection post inoculation.

The human tolerance/immune response paradigm is not unique. A more extreme version is found among some bat species: during long hibernations, bats conserve survival energy by tolerating enormous burdens of infection over long periods.⁷⁷ This phenomenon is of more than passing interest because it may explain, in part, why bats are such important incubators of numerous viruses (coronaviruses, filoviruses, henipaviruses, rabies viruses, etc.) with cross-over potential to humans. Ironically, immune tolerance mechanisms in bats and other host species may be important determinants of the emergence of human epidemics and pandemics, just as they facilitate human-to-human spread of human-adapted viruses.

SINCE MUCOSAL AND SYSTEMIC IMMUNITY ONLY PARTIALLY PROTECTS AGAINST INFECTION WITH MUCOSAL RESPIRATORY VIRUSES, WE MUST TAKE ADVANTAGE OF ALTERNATIVE HOST IMMUNE MECHANISMS

For example, the recently appreciated phenomenon of “trained innate immunity”^{46–50} may offer promise that future vaccines might someday be able to boost innate immune responses either to specific pathogens or non-specifically. However, a key unanswered question remains how to control these responses to avoid harmful inflammatory consequences.⁷⁸

Many studies in humans and experimental animals, some before sIgA had been recognized,^{22,58,79–81} indicate that secretory mucosal immunity is generally more effective than systemic immunity in controlling mucosal respiratory viruses^{18,79,82} and that tissue-resident memory T cells can be effective in rapidly responding to mucosal infection.⁸³ The main humoral effectors at mucosal sites are sIgA expressed upon mucosal surfaces by local IgA-secreting plasma cells/plasmablasts and T cell memory and effector cells in the MALT.^{18,58,61,70,81,84–86} Nasal sIgA is the best correlate of protection in RSV challenge studies,¹⁸ even in the absence of systemic IgA-producing B cells. Similar results are seen with other viruses, including SARS-CoV-2.^{87–90}

Although non-systemically replicating mucosal viruses elicit systemic effectors, including systemic IgA-producing plasma cells and in some cases high levels of serum IgA and IgG, neither circulating antibodies, plasmablasts, nor systemic B or T or T effector cells function optimally at mucosal sites. This is due in part to the dilution of transuded antibody and the fact that many such effector cells lack trafficking signals to these sites.⁸⁵

It is therefore important to consider natural situations in which acquired antibody-mediated immunity *does* control non-systemic mucosal respiratory viruses. As long ago as 1918, it was shown that passively administered influenza immune plasmas could limit human influenza infection.⁹¹ In the 1940s, inhaled aerosolized influenza antibodies were also shown to have an effect against clinical influenza.⁹² Influenza infection generates durable systemic immune memory responses, as indicated by the detection of specific memory B cell clones 90 years after infection with the 1918 influenza virus⁹³; however, low levels of circulating immunoglobulin and the time lag between infection and development of an anamnestic response may not offer neutralizing protection against a rapidly replicating influenza virus. Similar observations have been made with other mucosal respiratory viruses. For example, maternal IgG antibodies, especially antibodies against RSV F protein, protect against infant RSV^{16–19} and a parenterally administered humanized monoclonal antibody prevents RSV infection in at-risk infants.²⁰

Nevertheless, the effectiveness of circulating Ig in these situations depends on transudation to mucosal surfaces of very high titers of antibody with specificity for key viral epitopes. It is not fully understood how such transudation is controlled, how antiviral IgA is regulated to function in both passive immunity and immune regulation,^{67,94} or how to elicit and sustain such high antibody levels with vaccination.

Apart from preventing initial infection, it is also important to consider the role of host immunity in limiting viral spread once infection has been established. Respiratory viruses usually first infect the mucosa of the upper respiratory tract, where IgA is most effective in antiviral control;⁹⁵ however, some may spread contiguously to the lower respiratory tract, even to the pulmonary alveoli. This is of considerable significance for a subset of pneumogenic respiratory viruses such as influenza, RSV, and possibly SARS-CoV-2. These viruses are normally limited to the upper respiratory tract but can escape immune control and spread into the lungs to cause primary viral pneumonia with or without secondary bacterial pneumonia, often the principal causes of death from these infections.⁹⁶ Moreover, evidence suggests that viral-bacterial coinfection may facilitate viral, and viral/bacterial airborne transmission⁹⁷ and may even increase case-fatality, a phenomenon noted as long ago as 1917.⁹⁸

The lung is functionally and immunologically different from the upper respiratory tract, containing both resident alveolar macrophages within the alveoli and resident immune and memory cells in peribronchiolar niches.⁸⁵ The latter niches are composed of immune cells that are absent at birth but develop in response to post-natal antigenic exposures,⁸⁶ which differ greatly among individuals and may expand in response to antigenic stimulation. Because the pulmonary immune system is semi-autonomous, it may be difficult for either systemically administered or upper respiratory-administered vaccines designed to prevent infection to additionally prevent pulmonary infection if upper respiratory

infection spreads to the lungs. For instance, because IgA appears to be a better effector in the upper respiratory tract, whereas IgG is better in the lung,⁸² it may be difficult to develop single vaccines that protect against all respiratory tissues. The implications for vaccinology are clear: preventing viral upper respiratory infection and limiting post-infection viral spread to contiguous respiratory compartments are both critical but may not be easily achieved with single vaccines.

To understand how vaccines might protect against lower respiratory infections, we will need to learn how the “cross-talk” between upper respiratory, lower respiratory, and systemic immune systems is coordinated and controlled, at the level of cell receptors, antigen sensing, antigen presentation, and numerous effector functions.^{49,50,61,82} We also need to further investigate the development and maintenance of viral-specific lung resident memory B and T cells, how to increase their persistence in the lung, and how quickly they can be mobilized to infected mucosal sites.^{99,100}

IMMUNE CORRELATES OF PROTECTION AGAINST MUCOSAL RESPIRATORY VIRUSES ARE INCOMPLETELY UNDERSTOOD, VARY BETWEEN VIRAL STRAINS AND SUBTYPES, WITH VIRAL DRIFT, AND THEY EXHIBIT INTER-INDIVIDUAL VARIATION

In developing next-generation vaccines, we will need to identify strong immunologic correlates of protection against each mucosal respiratory virus and agree about their relevance to public health vaccination goals.^{80,101,102} Additional immune correlate studies in humans are clearly needed and should be a research priority. Following influenza infection in humans, studies have long identified serum and mucosal immunoglobulin correlates^{103–105} and T cell immune correlates.^{104,106,107} In contrast, a human influenza challenge study after vaccination with inactivated vaccines or live-attenuated influenza vaccine (LAIV), followed by LAIV challenge, was unable to find any immunologic correlates of protection.¹⁰⁸

The immune system is complex with many effectors. Serum antibody titers to various viral epitopes may only indirectly correlate with protection because of association with other more critical (but not usually measured) immune effectors, such as mucosal immunoglobulins⁶⁵ or, for example, steric interactions of hemagglutinin stem antibodies resulting in neuraminidase inhibition.¹⁰⁹ In recent human challenge studies, serum neuraminidase antibody titers were more strongly correlated with different measures of protection compared with hemagglutinin head or stem antibody titers.^{110,111} Neuraminidase remains and underappreciated vaccine target for next-generation influenza vaccine design.¹¹² In short, correlations between serum antibody titers and susceptibility to influenza infection may be statistically valid in large studies, but imperfect in the context of individual variation, rapid viral evolution, and waning titers.

For each mucosal virus, we must also arrive at consensus on desired levels of protection; for example, goals for protection might be:

- preventing infection entirely, as vaccines for systemic respiratory viruses may do (Table 1);

- limiting viral replication or preventing transmission as with influenza anti-neuraminidase immunity;
- preventing disease; or
- only preventing severe disease (e.g., requiring hospitalization), as appears to be the case with some influenza virus and SARS-CoV-2 vaccines.

Such consensus is needed if we are to develop the best vaccines and optimized vaccination strategies and policies for using them. With influenza, for example, vaccines historically have been designed to prevent upper respiratory infection, not secondary pulmonary infection associated with spread from the upper respiratory tract. This has proved problematic because current influenza vaccines are suboptimal at both preventing infection and eliciting pulmonary immunity.¹¹³ Although influenza and SARS-CoV-2 vaccines reduce disease severity when vaccines fail to prevent infection, significant numbers of fatalities still occur, resulting in tens of thousands of annual influenza deaths in the United States.^{114–116} With the imperfections of these vaccines, it seems a public health imperative to aggressively pursue better vaccines and vaccination strategies.

VACCINE-RELATED QUESTIONS OF ROUTE OF ADMINISTRATION, ANTIGEN CONFIGURATION, ADJUVANTATION, AND ASSOCIATION WITH ADJUNCTIVE THERAPY ARE OF GREAT IMPORTANCE FOR CURRENT RESEARCH

Human mucosal surfaces amount to 30–40 square feet,⁸² almost entirely underlaid with active lymphoid tissues. The predominant antibody at most of these sites is sIgA, representing an extraordinary 65%–70% of all human immunoglobulins.⁸¹ It is increasingly accepted that route of vaccine administration (e.g., intramuscular, intranasal, conjunctival, or aerosol routes) is a key determinant of mucosal respiratory response.

In general, and when feasible, mucosal immunization seems the optimal approach for respiratory viruses^{52,58,61,70,81,86,117}; however, in contemplating next-generation vaccines we also may need optimized formulations, higher vaccine doses, greater frequency of vaccine administration, and overcoming immune tolerance challenges.

It is important for each virus to answer key questions such as:

- (1) Can non-replicating vaccines, which may be considerably less effective at eliciting IgA,⁸² be as efficacious as replicating vaccines, such as live-attenuated virus vaccines and live vaccine vectors expressing key viral proteins?
- (2) Can single- or pauci-antigen vaccines provide protection equivalent to more antigenically complex vaccines?
- (3) Can higher antigen doses or repeat vaccinations elicit better immunity?
- (4) What are the differential effects of soluble versus particulate antigens?⁸²
- (5) What are ideal relationships between vaccine antigen load and systemic or mucosal adjuvantation?¹¹⁸
- (6) What are the optimal strategies for routes and timing of vaccination: mucosal/systemic “prime-boost”? Newer strategies such as “prime-pull” and “prime-deploy” (vaccination strategies to elicit systemic T cell responses followed by recruitment of activated T cells via attractant

or recruitment of resident memory T cells, respectively, to lung)^{119–122} and others?

It is noteworthy that all of the vaccines that are successful against the systemic respiratory viruses (Table 1)—those which generally elicit broader and longer lasting protective humoral and cell-mediated immunity—are systemically replicating live virus vaccines that fully encounter the host mucosal and systemic immune system. The imperfect protective properties of LAIV nasal spray represents an exception that might result from over-attenuation, pre-existing LAIV immunity, compositional balance, antigenic drift, or other yet unappreciated factors.^{123,124} In recent decades, live virus vaccines have been less commonly developed for reasons of time constraints and lack of effort due to expense, potential safety, and difficulties in quickly adapting to antigenic drift; however, we believe this potentially powerful approach must be energetically pursued.

With respect to vaccine antigen (immunogen) configuration, it is important to ask whether vaccines that elicit immunity to specific conserved epitopes can create complex protective immunity equivalent to that seen with more complex antigen presentations, such as multi-antigen cocktails, and whether vaccines that decouple antigen components, such as influenza HA/NA and HA/stem¹²⁵ can reliably increase antigenicity. It is also of note that for some non-respiratory viruses, such as dermally inoculated (mosquito) systemically infecting flaviviruses—which include yellow fever virus, dengue virus, Zika virus, and Japanese encephalitis virus—complex cross-reactive immunity based on shared epitopes on related viruses and viral strains, when encountered sequentially, can elicit broad protection against somewhat distantly related viruses, associated with anamnestic antibody responses.¹²⁶ Similarly, an experimental multi-subtype intranasal influenza vaccine elicits experimental protective immunity to influenza A virus subtypes absent in the vaccine itself.¹²⁷ What are the viral and immunologic bases of these powerful, cross-protective phenomena, and can they be replicated with mucosal respiratory vaccines? How can we identify determinants of multi-antigen relatedness and complexity sufficient to make vaccines of greater breadth against different-but-related viral types?

A closely related question is whether vaccines that generate immune responses only against single critical epitopes conserved across virus strains and subtypes, or a limited number of such epitopes, can perform as well as vaccines that elicit broad humoral and cell-mediated responses against multiple epitopes. Although such conserved epitopes seem ideal candidates, vaccines based on this approach have not been particularly successful. The HIV conserved gp120 Muster-Kattinger epitope, the influenza M2 protein, and conserved influenza virus stem epitopes, all have been considered promising candidates for vaccines but have not yet been shown to elicit strong protective immunity in clinical studies, although many candidates are at preclinical or only early clinical stages of development.^{128–133} These findings emphasize that host immune responses are complex and inter-related and that making broadly protective vaccines will be challenging.

Vaccine routes, doses, and re-vaccination schedules must be carefully considered, including routes of vaccination that maximize development of mucosal immune memory B and T cells as well as sIgA; the possible differential advantages of upper

respiratory, lower respiratory tract, and systemic vaccination^{44,76,134–141}; or optimized combinations of these. Attempting to control mucosal respiratory viruses with systemically administered non-replicating vaccines has thus far been largely unsuccessful, indicating that new approaches are needed. For example, during times of significant viral circulation within human populations, can better protection be achieved with repeat dosing, or by sequential mucosal and systemic vaccination? Is frequent re-boosting a viable vaccine option, e.g., via self-administered home nasal vaccines? Also to be considered are possible ancillary roles for prophylactic antivirals, including “programmable antivirals” targeting conserved structures,¹⁴² antibodies, including therapeutic IgA¹⁴³ and innate immunity stimulators as adjuncts to imperfect vaccines. It remains to be seen if vaccination and prophylaxis can be effectively combined at the population level.

These provocative questions should all be considered as we work to optimize vaccination strategies. One intriguing approach to pursue, as noted above, would be making vaccines that stimulate innate immunity⁵⁰ which might be ideally suited to “hit and run” infections by mucosal respiratory viruses, which characteristically infect, spread locally, and are transmitted to others before adaptive immune responses capable of controlling them can be mounted. Finally, there are currently limited options for mucosal vaccine adjuvantation.^{82,144} If data support that mucosal vaccine adjuvantation is needed and proves possible, we will need to assess potential pitfalls, including possible toxicity and side effects of repeated high-dose mucosal immunization/adjuvantation, and how best to study it in humans.

VACCINATED HOSTS AND HOST RISK GROUPS ARE MANY AND HETEROGENEOUS

A key challenge for next-generation vaccines is determining if one-size-fits-all vaccines or vaccines targeted to key risk groups will be useful. It is inevitable that various human risk groups may require different vaccines or vaccine formulations. For example, we know that RSV infections are best prevented by humoral immunity in children but by cell-mediated immunity in the elderly.¹³⁶ Moreover, children may require different vaccine doses than do young adults, who in turn may need different doses than do the elderly with narrowed B cell and especially T cell repertoires to viral antigens.¹³⁶

Indeed, it seems likely that respiratory vaccines that fail to elicit robust cell-mediated immunity may be suboptimal for the elderly—but also that vaccines that elicit stronger cell-mediated responses could also increase the risk of immunopathogenic effects. If they do, can optimal trade-offs be found? The elderly are the most important litmus test risk group for vaccine prevention of influenza, SARS-CoV-2, RSV, and other respiratory viruses because they are most likely to suffer severe and fatal outcomes, and least likely to respond to vaccination, factors that make successful vaccination of older people a benchmark for other groups. It will also be important to learn more about genetic differences between individuals related to mucosal viral antigen sensing, predisposition to disease severity, and vaccine protection; for example, variations in IFITM3¹⁴⁵ and other IFN pathway-associated genes, as much evidence suggests that severe viral

respiratory disease often reflects host genetic susceptibility factors.^{16,51,146,147}

PUBLIC HEALTH CONSIDERATIONS RELATING TO NEXT-GENERATION RESPIRATORY VACCINES MUST CONTRIBUTE TO SHAPING VACCINE DESIGN, INCLUDING VACCINE SCHEDULE, ROLE OF BOOSTING, FREQUENCY OF VACCINATION AND DURATION/COMPLETENESS OF PROTECTION, SIDE EFFECTS, AND PUBLIC ACCEPTANCE

Once improved vaccines are developed, vaccine recipes and schedules will need to be optimized to best elicit durable protective mucosal immunity, especially with multivalent or boosted vaccines, for which antigen immunodominance and balance between humoral and cell-mediated immune responses may be complex.

With regard to public health usefulness and acceptance, it will be important to consider roles for high dose or frequently boosted vaccine antigens, mixed-sequential vaccines (e.g., prime-boost with different vaccines), and whether these approaches will be accepted by providers, regulators, and the public. The observation that repeated infant exposures to RSV reduces severe disease upon subsequent infection,¹⁴⁸ coupled with experimental data, suggest that respiratory vaccine timing and frequency can be important.¹⁹ Indeed, a recent controversial theory posits that the key determinant of immune/vaccine protection is not immune memory and recall but repeated antigenic exposures.¹⁴⁹ This proposal seems to be contradicted by many observable phenomena but is at the same time consistent with the observation that maintenance of memory T cells in the lungs is associated with repeated antigenic exposures.⁸² Because of its implications for vaccinology, this question can and should be studied experimentally. It also prompts reconsideration of many accepted approaches, such as one-time annual influenza vaccination at the beginning of influenza seasons.

We also need to ask whether there are other vaccine approaches that should be considered, such as sequential seasonal vaccinations and supplemental mucosal vaccines to stimulate specific upper respiratory immunity, or non-specific innate immunity. Such approaches might include prime-boost approaches, for example, mixing elicitation of systemic and mucosal immunity, perhaps with prime systemic vaccination followed by a boost with intranasal vaccination or vice versa.^{35,82,150} Beyond intranasal vaccination, we will need to more fully explore responses to vaccination in other respiratory immune compartments, such as eye-drop conjunctival vaccination¹¹⁷ and particularly aerosol vaccination for certain respiratory viruses, as suggested by human and animal experimental studies for influenza and other respiratory viral diseases.^{44,135}

CONCLUDING REMARKS

Durably protective vaccines against non-systemic mucosal respiratory viruses with high mortality rates have thus far eluded vaccine development efforts.

Challenges to developing next-generation respiratory vaccines are many and complex (Table 2). We must better understand why multiple sequential mucosal infections with the same circulating

respiratory viruses, spread out over decades of life, fail to elicit natural protective immunity, especially with viruses that lack significant antigenic drift (e.g., RSV and parainfluenzaviruses),^{17–19,22} if we are to rationally develop vaccines that prevent them. We must think outside the box to make next-generation vaccines that elicit immune protection against viruses that survive in human populations *because* of their ability to remain significantly outside of the full protective reach of human innate and adaptive immunity.

Past unsuccessful attempts to elicit solid protection against mucosal respiratory viruses and to control the deadly outbreaks and pandemics they cause have been a scientific and public health failure that must be urgently addressed. We are excited and invigorated that many investigators and collaborative groups are rethinking, from the ground up, all of our past assumptions and approaches to preventing important respiratory viral diseases and working to find bold new paths forward.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Intramural Research Program of the NIH and NIAID.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. CDC (2022). Past seasons' vaccine effectiveness estimates. <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/past-seasons-estimates.html>.
2. Morens, D.M., and Fauci, A.S. (2020). Emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19. *Cell* 182, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>.
3. Graham, B.S., and Sullivan, N.J. (2018). Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic. *Nat. Immunol.* 19, 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0007-9>.
4. Belongia, E.A., Simpson, M.D., King, J.P., Sundaram, M.E., Kelley, N.S., Osterholm, M.T., and McLean, H.Q. (2016). Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect. Dis.* 16, 942–951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8).
5. Memoli, M.J., Han, A., Walters, K.A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Angela Rosas, L., Cervantes-Medina, A., Park, J.K., Morens, D.M., et al. (2020). Influenza A reinfection in sequential human challenge: implications for protective immunity and "universal" vaccine development. *Clin. Infect. Dis.* 70, 748–753. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz281>.
6. Tricco, A.C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M.H., Tashkandi, M., Bauch, C.T., and Loeb, M. (2013). Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 11, 153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>.
7. Langmuir, A.D., Henderson, D.A., and Serfling, R.E. (1964). The epidemiological basis for the control of influenza. *Am. J. Public Health Nations Health* 54, 563–571. <https://doi.org/10.2105/ajph.54.4.563>.
8. Morens, D.M., and Taubenberger, J.K. (2019). Making universal influenza vaccines: lessons from the 1918 pandemic. *J. Infect. Dis.* 219, S5–S13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy728>.
9. Schmid, P., Rauber, D., Betsch, C., Lidolt, G., and Denker, M.L. (2017). Barriers of influenza vaccination intention and behavior - A systematic review of influenza vaccine hesitancy, 2005–2016. *PLoS One* 12, e0170550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170550>.
10. Erbeling, E.J., Post, D.J., Stemmy, E.J., Roberts, P.C., Augustine, A.D., Ferguson, S., Paules, C.I., Graham, B.S., and Fauci, A.S. (2018). A universal influenza vaccine: the strategic plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *J. Infect. Dis.* 218, 347–354. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy103>.
11. CIRDRAP (2022). The influenza vaccines roadmap: universal influenza vaccine technology landscape. <https://ivr.cidrap.umn.edu/universal-influenza-vaccine-technology-landscape>.
12. Golob, J.L., Lugogo, N., Luring, A.S., and Lok, A.S. (2021). SARS-CoV-2 vaccines: a triumph of science and collaboration. *JCI Insight* 6, e149187. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.149187>.
13. Liu, M., and Li, Y. (2022). Advances in COVID-19 vaccines and new coronavirus variants. *Front. Med.* 9, 888631. Lausanne. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.888631>.
14. Sette, A., and Crotty, S. (2022). Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol. Rev.* 310, 27–46. <https://doi.org/10.1111/immr.13089>.
15. Shrestha, L.B., Foster, C., Rawlinson, W., Tedla, N., and Bull, R.A. (2022). Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: implications for immune escape and transmission. *Rev. Med. Virol.* 32, e2381. <https://doi.org/10.1002/rmv.2381>.
16. Bergeron, H.C., and Tripp, R.A. (2021). Immunopathology of RSV: an updated review. *Viruses* 13, 2478. <https://doi.org/10.3390/v13122478>.
17. Bueno, S.M., González, P.A., Pacheco, R., Leiva, E.D., Cautivo, K.M., Tobar, H.E., Mora, J.E., Prado, C.E., Zúñiga, J.P., Jiménez, J., et al. (2008). Host immunity during RSV pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1320–1329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.012>.
18. Habibi, M.S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., DeVincenzo, J.P., de Haan, C.A., Wrammert, J., Openshaw, P.J., Chiu, C., et al. (2015). Impaired antibody-mediated protection and defective IgA B-cell memory in experimental infection of adults with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1040–1049. <https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2256OC>.
19. Lambert, L., Sagfors, A.M., Openshaw, P.J., and Culley, F.J. (2014). Immunity to RSV in early-life. *Front. Immunol.* 5, 466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00466>.
20. Shadman, K.A., and Wald, E.R. (2011). A review of palivizumab and emerging therapies for respiratory syncytial virus. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1455–1467. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.608062>.
21. Shi, T., McAllister, D.A., O'Brien, K.L., Simoes, E.A.F., Madhi, S.A., Gessner, B.D., Polack, F.P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., et al. (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 390, 946–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8).
22. Callow, K.A., Parry, H.F., Sergeant, M., and Tyrrell, D.A. (1990). The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol. Infect.* 105, 435–446. <https://doi.org/10.1017/s0950268800048019>.
23. Cardenoso Domingo, L., Roy Vallejo, E., Zurita Cruz, N.D., Chicot Llano, M., Ávalos Pérez-Urria, E., Barrios, A., Hernando Santos, J., Ortiz, J., Rodríguez García, S.C., Martín Ramírez, A., et al. (2022). Relevant SARS-CoV-2 viremia is associated with COVID-19 severity: prospective cohort study and validation cohort. *J. Med. Virol.* 94, 5260–5270. <https://doi.org/10.1002/jmv.27989>.
24. Jacobs, J.L., and Mellors, J.W. (2021). Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA in blood of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): what does it mean? *Clin. Infect. Dis.* 73, e2898–e2900. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1316>.
25. Campbell, A.P., Jacob, S.T., Kuypers, J., Wald, A., Englund, J.A., Corey, L., and Boeckh, M. (2010). Respiratory failure caused by 2009 novel influenza A/H1N1 in a hematopoietic stem-cell transplant recipient: detection of extrapulmonary H1N1 RNA and use of intravenous peramivir. *Ann. Intern. Med.* 152, 619–620. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-9-201005040-00022>.
26. Lee, N., Chan, P.K., Wong, C.K., Wong, K.T., Choi, K.W., Joynt, G.M., Lam, P., Chan, M.C., Wong, B.C., Lui, G.C., et al. (2011). Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic

- 2009 influenza A(H1N1) virus pneumonia. *Antivir. Ther.* 16, 237–247. <https://doi.org/10.3851/IMP1722>.
27. Yewdell, J.W. (2021). Individuals cannot rely on COVID-19 herd immunity: durable immunity to viral disease is limited to viruses with obligate viremic spread. *PLoS Pathog.* 17, e1009509. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009509>.
28. Holmes, E.C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* 11, 543–546. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.10.006>.
29. Fulton, B.O., Sachs, D., Beaty, S.M., Won, S.T., Lee, B., Palese, P., and Heaton, N.S. (2015). Mutational analysis of measles virus suggests constraints on antigenic variation of the glycoproteins. *Cell Rep.* 11, 1331–1338. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.054>.
30. Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al. (2008). Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26, D31–D34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.078>.
31. Taubenberger, J.K., and Kash, J.C. (2010). Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 7, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>.
32. Altman, M.O., Angel, M., Košik, I., Trovão, N.S., Zost, S.J., Gibbs, J.S., Casalino, L., Amaro, R.E., Hensley, S.E., Nelson, M.I., and Yewdell, J.W. (2019). Human influenza A virus hemagglutinin glycan evolution follows a temporal pattern to a glycan limit. *mBio* 10, e. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-19>.
33. van der Straten, K., Guerra, D., van Gils, M.J., Bontjer, I., Caniels, T.G., van Willigen, H.D.G., Wynberg, E., Poniman, M., Burger, J.A., Bouhuijs, J.H., et al. (2022). Antigenic cartography using sera from sequence-confirmed SARS-CoV-2 variants of concern infections reveals antigenic divergence of Omicron. *Immunity* 55, 1725–1731.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.07.018>.
34. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2022). Universal coronavirus vaccines – an urgent need. *N. Engl. J. Med.* 386, 297–299. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2118468>.
35. Tang, J., Zeng, C., Cox, T.M., Li, C., Son, Y.M., Cheon, I.S., Wu, Y., Behl, S., Taylor, J.J., Chakarabarty, R., et al. (2022). Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. *Sci. Immunol.* 7, eadd4853. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4853>.
36. Do, L.A.H., Wilm, A., van Doorn, H.R., Lam, H.M., Sim, S., Sukumaran, R., Tran, A.T., Nguyen, B.H., Tran, T.T.L., Tran, Q.H., et al. (2015). Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution. *J. Gen. Virol.* 96, 3470–3483. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000298>.
37. Rios Guzman, E., and Hultquist, J.F. (2022). Clinical and biological consequences of respiratory syncytial virus genetic diversity. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 9, 20499361221128091. <https://doi.org/10.1177/20499361221128091>.
38. Tan, L., Lemey, P., Houspie, L., Viveen, M.C., Jansen, N.J., van Loon, A.M., Wiertz, E., van Bleek, G.M., Martin, D.P., and Coenjaerts, F.E. (2012). Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PLoS One* 7, e51439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051439>.
39. Bont, L., Versteegh, J., Swelsen, W.T., Heijnen, C.J., Kavelaars, A., Brus, F., Draaisma, J.M., Pekelharing-Berghuis, M., van Diemen-Steenvoorde, R.A., and Kimpfen, J.L. (2002). Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity. *Pediatr. Res.* 52, 363–367. <https://doi.org/10.1203/00006450-200209000-00009>.
40. Yang, K., and Varga, S.M. (2014). Mucosal vaccines against respiratory syncytial virus. *Curr. Opin. Virol.* 6, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.009>.
41. Newton, A.H., Cardani, A., and Braciale, T.J. (2016). The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 38, 471–482. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>.
42. Medzhitov, R., Schneider, D.S., and Soares, M.P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335, 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>.
43. Iwasaki, A., Foxman, E.F., and Molony, R.D. (2017). Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>.
44. Low, N., Bavdekar, A., Jeyaseelan, L., Hirve, S., Ramanathan, K., Andrews, N.J., Shaikh, N., Jodi, R.S., Rajagopal, A., Brown, K.E., et al. (2015). A randomized, controlled trial of an aerosolized vaccine against measles. *N. Engl. J. Med.* 372, 1519–1529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407417>.
45. James, K.R., Elmentaite, R., Teichmann, S.A., and Hold, G.L. (2022). Redefining intestinal immunity with single-cell transcriptomics. *Mucosal Immunol.* 15, 531–541. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00470-y>.
46. Bekkering, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L.A.B., Riksen, N.P., and Netea, M.G. (2021). Trained immunity: reprogramming innate immunity in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>.
47. Netea, M.G., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Domínguez-Andrés, J., Curtis, N., van Crevel, R., van de Veerdonk, F.L., and Bonten, M. (2020). Trained immunity: a tool for reducing susceptibility to and the severity of SARS-CoV-2 infection. *Cell* 181, 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>.
48. Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
49. Randall, T.D., and Mebius, R.E. (2014). The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. *Mucosal Immunol.* 7, 455–466. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.11>.
50. Xing, Z., Afkhami, S., Bavananthasivam, J., Fritz, D.K., D’Agostino, M.R., Vaseghi-Shanjani, M., Yao, Y., and Jeyanathan, M. (2020). Innate immune memory of tissue-resident macrophages and trained innate immunity: re-vamping vaccine concept and strategies. *J. Leukoc. Biol.* 108, 825–834. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0220-446R>.
51. Denney, L., and Ho, L.P. (2018). The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomed J.* 41, 218–233. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.004>.
52. Zimmermann, P., and Curtis, N. (2019). Factors that influence the immune response to vaccination. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00084–e00018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
53. Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5354–5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>.
54. Hagan, T., Cortese, M., Roupheal, N., Boudreau, C., Linde, C., Maddur, M.S., Das, J., Wang, H., Guthmiller, J., Zheng, N.Y., et al. (2019). Antibiotics-driven gut microbiome perturbation alters immunity to vaccines in humans. *Cell* 178, 1313–1328.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.010>.
55. Oh, J.Z., Ravindran, R., Chassaing, B., Carvalho, F.A., Maddur, M.S., Bower, M., Hakimpour, P., Gill, K.P., Nakaya, H.I., Yarovinsky, F., et al. (2014). TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity* 41, 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.009>.
56. Bradley, K.C., Finsterbusch, K., Schnepf, D., Crotta, S., Llorian, M., Davidson, S., Fuchs, S.Y., Staeheli, P., and Wack, A. (2019). Microbiota-driven tonic interferon signals in lung stromal cells protect from influenza virus infection. *Cell Rep.* 28, 245–256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.105>.
57. Crane, M.J., Lee, K.M., FitzGerald, E.S., and Jamieson, A.M. (2018). Surviving deadly lung infections: innate host tolerance mechanisms in the pulmonary system. *Front. Immunol.* 9, 1421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01421>.
58. Gould, V.M.W., Francis, J.N., Anderson, K.J., Georges, B., Cope, A.V., and Tregoning, J.S. (2017). Nasal IgA provides protection against human

- influenza challenge in volunteers with low serum influenza antibody titre. *Front. Microbiol.* 8, 900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00900>.
59. Hansen, I.S., Baeten, D.L.P., and den Dunnen, J. (2019). The inflammatory function of human IgA. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2976-8>.
 60. Holtzman, M.J., Byers, D.E., Alexander-Brett, J., and Wang, X. (2014). The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nri3739>.
 61. Lamichhane, A., Azegamia, T., and Kiyono, H. (2014). The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 32, 6711–6723. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.089>.
 62. Whitsett, J.A., and Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat. Immunol.* 16, 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.
 63. Zimmermann, P., and Curtis, N. (2018). The influence of the intestinal microbiome on vaccine responses. *Vaccine* 36, 4433–4439. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.066>.
 64. Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claër, L., Quentric, P., Fadlallah, J., Devilliers, H., Ghillani, P., et al. (2021). IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd2223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>.
 65. Taylor, H.P., and Dimmock, N.J. (1985). Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.* 161, 198–209. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.198>.
 66. Corthésy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 4, 185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>.
 67. Ben Mkaddem, S., Rossato, E., Heming, N., and Monteiro, R.C. (2013). Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun. Rev.* 12, 666–669. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.011>.
 68. Callow, K.A. (1985). Effect of specific humoral immunity and some non-specific factors on resistance of volunteers to respiratory coronavirus infection. *J. Hyg.* 95, 173–189. <https://doi.org/10.1017/s0022172400062410>.
 69. Favre, L., Spertini, F., and Corthésy, B. (2005). Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J. Immunol.* 175, 2793–2800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2793>.
 70. Rose, M.A. (2014). Mucosal immunization in perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 2115–2117. <https://doi.org/10.4161/hv.29609>.
 71. Suzuki, T., Aina, A., and Hasegawa, H. (2017). Functional and structural characteristics of secretory IgA antibodies elicited by mucosal vaccines against influenza virus. *Vaccine* 35, 5297–5302. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.093>.
 72. Wiseman, D.J., Thwaites, R.S., Drysdale, S.B., Janet, S., Donaldson, G.C., Wedzicha, J.A., and Openshaw, P.J.; RESCEU Investigators (2020). Immunological and inflammatory biomarkers of susceptibility and severity in adult respiratory syncytial virus infections. *J. Infect. Dis.* 222, S584–S591. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa063>.
 73. Russell, C.D., Unger, S.A., Walton, M., and Schwarze, J. (2017). The human immune response to respiratory syncytial virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 481–502. <https://doi.org/10.1128/CMR.00090-16>.
 74. Takamatsu, Y., Omata, K., Shimizu, Y., Kinoshita-Iwamoto, N., Terada, M., Suzuki, T., Morioka, S., Uemura, Y., Ohmagari, N., Maeda, K., and Mitsuya, H. (2022). SARS-CoV-2-neutralizing humoral IgA response occurs earlier but is modest and diminishes faster than IgG response. *Microbiol. Spectr.* e0271622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02716-22>.
 75. Ameratunga, R., Leung, E., Woon, S.T., Lea, E., Allan, C., Chan, L., Steele, R., Lehnert, K., and Longhurst, H. (2022). Selective IgA deficiency may be an under-recognized risk factor for severe COVID-19. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.10.002>.
 76. Li, M., Wang, Y., Sun, Y., Cui, H., Zhu, S.J., and Qiu, H.J. (2020). Mucosal vaccines: strategies and challenges. *Immunol. Lett.* 217, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.013>.
 77. Irving, A.T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D.E., and Wang, L.F. (2021). Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature* 589, 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>.
 78. Arneth, B. (2021). Trained innate immunity. *Immunol. Res.* 69, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09170-y>.
 79. Smith, C.B., Purcell, R.H., Bellanti, J.A., and Chanock, R.M. (1966). Protective effect of antibody to parainfluenza type 1 virus. *N. Engl. J. Med.* 275, 1145–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJM196611242752101>.
 80. Plotkin, S.A. (2020). Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection. *Vaccine* 38, 2250–2257. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.046>.
 81. Russell, M.W., Moldoveanu, Z., Ogra, P.L., and Mestecky, J. (2020). Mucosal immunity in COVID-19: A neglected but critical aspect of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* 11, 611337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611337>.
 82. Lavelle, E.C., and Ward, R.W. (2022). Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. *Nat. Rev. Immunol.* 22, 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>.
 83. Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity* 41, 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>.
 84. Allie, S.R., and Randall, T.D. (2017). Pulmonary immunity to viruses. *Clin. Sci. (Lond.)* 131, 1737–1762. <https://doi.org/10.1042/CS20160259>.
 85. Seong, Y., Lazarus, N.H., Sutherland, L., Habtezion, A., Abramson, T., He, X.S., Greenberg, H.B., and Butcher, E.C. (2017). Trafficking receptor signatures define blood plasmablasts responding to tissue-specific immune challenge. *JCI Insight* 2, e90233. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90233>.
 86. Turner, D.L., Bickham, K.L., Thome, J.J., Kim, C.Y., D'Ovidio, F., Wherry, E.J., and Farber, D.L. (2014). Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol.* 7, 501–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.67>.
 87. Sheikh-Mohamed, S., Sanders, E.C., Gommerman, J.L., and Tal, M.C. (2022). Guardians of the oral and nasopharyngeal galaxy: IgA and protection against SARS-CoV-2 infection. *Immunol. Rev.* 309, 75–85. <https://doi.org/10.1111/immr.13118>.
 88. Primorac, D., Vrdoljak, K., Brlek, P., Pavelić, E., Molnar, V., Matišić, V., Erceg Ivković, I., and Parčina, M. (2022). Adaptive immune responses and immunity to SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* 13, 848582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848582>.
 89. Mouro, V., and Fischer, A. (2022). Dealing with a mucosal viral pandemic: lessons from COVID-19 vaccines. *Mucosal Immunol.* 15, 584–594. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00517-8>.
 90. Hennings, V., Thörn, K., Albinsson, S., Lingblom, C., Andersson, K., Andersson, C., Järbur, K., Pullerits, R., Idorn, M., Paludan, S.R., et al. (2022). The presence of serum anti-SARS-CoV-2 IgA appears to protect primary health care workers from COVID-19. *Eur. J. Immunol.* 52, 800–809. <https://doi.org/10.1002/eji.202149655>.
 91. Luke, T.C., Kilbane, E.M., Jackson, J.L., and Hoffman, S.L. (2006). Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Ann. Intern. Med.* 145, 599–609. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139>.
 92. Smorodintzev, A.A., Gulamov, A.G., and Tschalkina, O.M. (1940). Über die spezifische Prophylaxe der epidemischen Grippe durch Inhalation antigrippösen Serums. *Z. Klin. Med.* 138, 687–806.
 93. Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* 455, 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature07231>.

94. Englund, J.A. (1994). Passive protection against respiratory syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, 449–453. <https://doi.org/10.1097/00006454-199405000-00037>.
95. Renegar, K.B., Small, P.A., Jr., Boykins, L.G., and Wright, P.F. (2004). Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J. Immunol.* 173, 1978–1986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1978>.
96. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 198, 962–970. <https://doi.org/10.1086/591708>.
97. Rowe, H.M., Livingston, B., Margolis, E., Davis, A., Meliopoulos, V.A., Echlin, H., Schultz-Cherry, S., and Rosch, J.W. (2020). Respiratory bacteria stabilize and promote airborne transmission of influenza A virus. *mSystems* 5, e00762–e00720. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00762-20>.
98. Morens, D.M., and Taubenberger, J.K. (2015). A forgotten epidemic that changed medicine: measles in the US Army, 1917–18. *Lancet Infect. Dis.* 15, 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00109-7).
99. Szabo, P.A., Miron, M., and Farber, D.L. (2019). Location, location, location: tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci. Immunol.* 4, eaas9673. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>.
100. Gray, J.I., and Farber, D.L. (2022). Tissue-resident immune cells in humans. *Annu. Rev. Immunol.* 40, 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-112809>.
101. Krammer, F. (2021). Correlates of protection from SARS-CoV-2 infection. *Lancet* 397, 1421–1423. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00782-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00782-0).
102. Hall, V., Foulkes, S., Insalata, F., Saei, A., Kirwan, P., Atti, A., Wellington, E., Khawam, J., Munro, K., Cole, M., et al. (2021). Effectiveness and durability of protection against future SARS-CoV-2 infection conferred by COVID-19 vaccination and previous infection; findings from the UK SIREN prospective cohort study of healthcare workers March 2020 to September 2021. Preprint at medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.21267006>.
103. Brown, T.A., Murphy, B.R., Radl, J., Haaijman, J.J., and Mestecky, J. (1985). Subclass distribution and molecular form of immunoglobulin A hemagglutinin antibodies in sera and nasal secretions after experimental secondary infection with influenza A virus in humans. *J. Clin. Microbiol.* 22, 259–264. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.2.259-264.1985>.
104. Dolin, R., Richman, D.D., Murphy, B.R., and Fauci, A.S. (1977). Cell-mediated immune responses in humans after induced infection with influenza A virus. *J. Infect. Dis.* 135, 714–719. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.5.714>.
105. Ng, S., Nachbagauer, R., Balmaseda, A., Stadlbauer, D., Ojeda, S., Patel, M., Rajabathor, A., Lopez, R., Guglia, A.F., Sanchez, N., et al. (2019). Novel correlates of protection against pandemic H1N1 influenza A virus infection. *Nat. Med.* 25, 962–967. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0463-x>.
106. Hayward, A.C., Wang, L., Goonetilleke, N., Fragaszy, E.B., Bermingham, A., Copas, A., Dukes, O., Millett, E.R., Nazareth, I., Nguyen-Van-Tam, J.S., et al. (2015). Natural T cell-mediated protection against seasonal and pandemic influenza. Results of the flu watch cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1422–1431. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-1988OC>.
107. Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., Bean, T., Barclay, W., Deeks, J.J., and Lalvani, A. (2013). Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nat. Med.* 19, 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>.
108. Wright, P.F., Hoen, A.G., Ilyushina, N.A., Brown, E.P., Ackerman, M.E., Wieland-Alter, W., Connor, R.I., Jegaskanda, S., Rosenberg-Hasson, Y., Haynes, B.C., et al. (2016). Correlates of immunity to influenza as determined by challenge of children with live, attenuated influenza vaccine. *Open Forum Infect. Dis.* 3, ofw108. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw108>.
109. Kosik, I., Angeletti, D., Gibbs, J.S., Angel, M., Takeda, K., Kosikova, M., Nair, V., Hickman, H.D., Xie, H., Brooke, C.B., and Yewdell, J.W. (2019). Neuraminidase inhibition contributes to influenza A virus neutralization by anti-hemagglutinin stem antibodies. *J. Exp. Med.* 216, 304–316. <https://doi.org/10.1084/jem.20181624>.
110. Memoli, M.J., Shaw, P.A., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Fargis, S., Risos, K., Powers, J.H., et al. (2016). Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio* 7, e00417–e00416. <https://doi.org/10.1128/mBio.00417-16>.
111. Park, J.K., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Rosas, L.A., Cervantes-Medina, A., Taubenberger, J.K., and Memoli, M.J. (2018). Evaluation of preexisting anti-hemagglutinin stalk antibody as a correlate of protection in a healthy volunteer challenge with influenza A/H1N1pdm virus. *mBio* 9, e02284–e02217. <https://doi.org/10.1128/mBio.02284-17>.
112. Eichelberger, M.C., Morens, D.M., and Taubenberger, J.K. (2018). Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. *Curr. Opin. Immunol.* 53, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025>.
113. Cox, R.J., Brokstad, K.A., and Ogra, P. (2004). Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 59, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01382.x>.
114. Alcendor, D.J., Matthews-Juarez, P., Smoot, D., Hildreth, J.E.K., Lamar, K., Tabatabai, M., Wilus, D., and Juarez, P.D. (2022). Breakthrough COVID-19 infections in the US: implications for prolonging the pandemic. *Vaccines* 10, 755. Basel. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050755>.
115. Demicheli, V., Jefferson, T., Di Pietrantonj, C., Ferroni, E., Thorning, S., Thomas, R.E., and Rivetti, A. (2018). Vaccines for preventing influenza in the elderly. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD004876. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004876.pub4>.
116. Vardeny, O., Kim, K., Udell, J.A., Joseph, J., Desai, A.S., Farkouh, M.E., Hegde, S.M., Hernandez, A.F., McGeer, A., Talbot, H.K., et al. (2021). Effect of high-dose trivalent vs standard-dose quadrivalent influenza vaccine on mortality or cardiopulmonary hospitalization in patients with high-risk cardiovascular disease: A randomized clinical trial. *JAMA* 325, 39–49. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.23649>.
117. Lee, J.S., Yoon, S., Han, S.J., Kim, E.D., Kim, J., Shin, H.S., and Seo, K.Y. (2022). Eyedrop vaccination: an immunization route with promises for effective responses to pandemics. *Expert Rev. Vaccines* 21, 91–101. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2008246>.
118. Calzas, C., and Chevalier, C. (2019). Innovative mucosal vaccine formulations against influenza A virus infections. *Front. Immunol.* 10, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01605>.
119. Hodgins, B., Pillet, S., Landry, N., and Ward, B.J. (2019). Prime-pull vaccination with a plant-derived virus-like particle influenza vaccine elicits a broad immune response and protects aged mice from death and frailty after challenge. *Immun. Ageing* 16, 27. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0167-6>.
120. Chung, H., Kim, E.A., and Chang, J. (2021). A “prime and deploy” strategy for universal influenza vaccine targeting nucleoprotein induces lung-resident memory CD8 T cells. *Immune Netw.* 21, e28. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e28>.
121. Gary, E.N., Tursi, N.J., Warner, B., Parzych, E.M., Ali, A.R., FRASE, D., Moffat, E., Embury-Hyatt, C., Smith, T.R.F., Broderick, K.E., et al. (2022). Mucosal chemokine adjuvant enhances synDNA vaccine-mediated responses to SARS-CoV-2 and provides heterologous protection in vivo. *Cell. Reprod. Med.* 3, 100693. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100693>.
122. Bernstein, D.I., Cardin, R.D., Bravo, F.J., Awasthi, S., Lu, P., Pullum, D.A., Dixon, D.A., Iwasaki, A., and Friedman, H.M. (2019). Successful application of prime and pull strategy for a therapeutic HSV vaccine. *npj Vaccines* 4, 33. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0129-1>.
123. Poehling, K.A., Caspard, H., Peters, T.R., Belongia, E.A., Congeni, B., Gaglani, M., Griffin, M.R., Irving, S.A., Kavathekar, P.K., McLean, H.Q., et al. (2018). 2015–2016 vaccine effectiveness of live attenuated and inactivated influenza vaccines in children in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 66, 665–672. <https://doi.org/10.1093/cid/cix869>.

124. Isakova-Sivak, I., Matyushenko, V., Kotomina, T., Kiseleva, I., Krutikova, E., Donina, S., Rekstin, A., Larionova, N., Mezhenkaya, D., Sivak, K., et al. (2019). Sequential immunization with universal live attenuated influenza vaccine candidates protects ferrets against a high-dose heterologous virus challenge. *Vaccines* 7, 61. Basel. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030061>.
125. Angeletti, D., Kosik, I., Santos, J.J.S., Yewdell, W.T., Boudreau, C.M., Mallajosyula, V.V.A., Mankowski, M.C., Chambers, M., Prabhakaran, M., Hickman, H.D., et al. (2019). Outflanking immunodominance to target subdominant broadly neutralizing epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 13474–13479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816300116>.
126. Price, W.H., and Thind, I.S. (1972). The mechanism of cross-protection afforded by dengue virus against West Nile virus in hamsters. *J. Hyg.* 70, 611–617. <https://doi.org/10.1017/s0022172400022476>.
127. Park, J., Fong Legaspi, S.L., Schwartzman, L.M., Gygli, S.M., Sheng, Z.M., Freeman, A.D., Matthews, L.M., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Batchenkova, N.A., et al. (2022). An inactivated multivalent influenza A virus vaccine is broadly protective in mice and ferrets. *Sci. Transl. Med.* 14, eabo2167. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo2167>.
128. Folschweiller, N., Vanden Abeele, C., Chu, L., Van Damme, P., García-Sastre, A., Krammer, F., Nachbagauer, R., Palese, P., Solórzano, A., Bi, D., et al. (2022). Reactogenicity, safety, and immunogenicity of chimeric haemagglutinin influenza split-virion vaccines, adjuvanted with AS01 or AS03 or non-adjuvanted: a phase 1–2 randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 22, 1062–1075. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00024-X).
129. Darricarrère, N., Qiu, Y., Kanekiyo, M., Creanga, A., Gillespie, R.A., Moin, S.M., Saleh, J., Sancho, J., Chou, T.H., Zhou, Y., et al. (2021). Broad neutralization of H1 and H3 viruses by adjuvanted influenza HA stem vaccines in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 13, eabe5449. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe5449>.
130. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., and Kattinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1100–1108. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.1100-1108.1996>.
131. Saelens, X. (2019). The role of matrix protein 2 ectodomain in the development of universal influenza vaccines. *J. Infect. Dis.* 219, S68–S74. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz003>.
132. Han, A., Czajkowski, L., Rosas, L.A., Cervantes-Medina, A., Xiao, Y., Gouzoulis, M., Lombard, K., Hunsberger, S., Reed, S., Athota, R., et al. (2021). Safety and efficacy of CR6261 in an influenza A H1N1 healthy human challenge model. *Clin. Infect. Dis.* 73, e4260–e4268. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1725>.
133. Park, J.K., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Rosas, L.A., Fong, S., Matthews, A.M., Freeman, A.D., Gouzoulis, M.A., Batchenkova, N.A., Yang, X., et al. (2020). Pre-existing immunity to influenza virus hemagglutinin stalk might drive selection for antibody-escape mutant viruses in a human challenge model. *Nat. Med.* 26, 1240–1246. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0937-x>.
134. Tungatt, K., Dolton, G., Morgan, S.B., Attaf, M., Fuller, A., Whalley, T., Hemmink, J.D., Porter, E., Szomolay, B., Montoya, M., et al. (2018). Induction of influenza-specific local CD8 T-cells in the respiratory tract after aerosol delivery of vaccine antigen or virus in the Babraham inbred pig. *PLoS Pathog.* 14, e1007017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007017>.
135. Morgan, S.B., Hemmink, J.D., Porter, E., Harley, R., Shelton, H., Aramouni, M., Everett, H.E., Brookes, S.M., Bailey, M., Townsend, A.M., et al. (2016). Aerosol delivery of a candidate universal influenza vaccine reduces viral load in pigs challenged with pandemic H1N1 virus. *J. Immunol.* 196, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502632>.
136. Henry, C., Zheng, N.Y., Huang, M., Cabanov, A., Rojas, K.T., Kaur, K., Andrews, S.F., Palm, A.E., Chen, Y.Q., Li, Y., et al. (2019). Influenza virus vaccination elicits poorly adapted B cell responses in elderly individuals. *Cell Host Microbe* 25, 357–366.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.002>.
137. King, R.G., Silva-Sanchez, A., Peel, J.N., Botta, D., Meza-Perez, S., Allie, R., Schultz, M.D., Liu, M., Bradley, J.E., Qiu, S., et al. (2020). Single-dose intranasal administration of AdCOVID elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 in mice. <https://doi.org/10.1101/2020.10.10.331348>.
138. Krishnaswamy, J.K., Gowthaman, U., Zhang, B., Mattsson, J., Szeponik, L., Liu, D., Wu, R., White, T., Calabro, S., Xu, L., et al. (2017). Migratory CD11b(+) conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. *Sci. Immunol.* 2, eaam9169. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9169>.
139. Lund, F.E., and Randall, T.D. (2021). Scent of a vaccine. *Science* 373, 397–399. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>.
140. van Doremalen, N., Purushotham, J.N., Schulz, J.E., Holbrook, M.G., Bushmaker, T., Carmody, A., Port, J.R., Yinda, C.K., Okumura, A., Saturday, G., et al. (2021). Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/ADZ1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models. *Sci. Transl. Med.* 13, eab0755. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.ab0755>.
141. Ye, Z.W., Ong, C.P., Tang, K., Fan, Y., Luo, C., Zhou, R., Luo, P., Cheng, Y., Gray, V.S., Wang, P., et al. (2022). Intranasal administration of a single dose of a candidate live attenuated vaccine derived from an NSP16-deficient SARS-CoV-2 strain confers sterilizing immunity in animals. *Cell. Mol. Immunol.* 19, 588–601. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00855-4>.
142. Hagey, R.J., Elazar, M., Pham, E.A., Tian, S., Ben-Avi, L., Bernardin-Souibgui, C., Yee, M.F., Moreira, F.R., Rabinovitch, M.V., Meganck, R.M., et al. (2022). Programmable antivirals targeting critical conserved viral RNA secondary structures from influenza A virus and SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 28, 1944–1955. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01908-x>.
143. Sterlin, D., and Gorochov, G. (2021). When therapeutic IgA antibodies might come of age. *Pharmacology* 106, 9–19. <https://doi.org/10.1159/000510251>.
144. van Splunter, M., van Hoffen, E., Floris-Vollenbroek, E.G., Timmerman, H., de Bos, E.L., Meijer, B., Ulfman, L.H., Witteman, B., Wells, J.M., Brugman, S., et al. (2018). Oral cholera vaccination promotes homing of IgA(+) memory B cells to the large intestine and the respiratory tract. *Mucosal Immunol.* 11, 1254–1264. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0006-7>.
145. Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., et al. (2012). IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484, 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature10921>.
146. D'Agnillo, F., Walters, K.A., Xiao, Y., Sheng, Z.M., Scherler, K., Park, J., Gygli, S., Rosas, L.A., Sadler, K., Kalish, H., et al. (2021). Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. *Sci. Transl. Med.* 13, eabj7790. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7790>.
147. Ziegler, C.G.K., Miao, V.N., Owings, A.H., Navia, A.W., Tang, Y., Bromley, J.D., Lotfy, P., Sloan, M., Laird, H., Williams, H.B., et al. (2021). Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell* 184, 4713–4733.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.023>.
148. Green, C.A., Sande, C.J., de Lara, C., Thompson, A.J., Silva-Reyes, L., Napolitano, F., Pierantoni, A., Capone, S., Vitelli, A., Klennerman, P., and Pollard, A.J. (2018). Humoral and cellular immunity to RSV in infants, children and adults. *Vaccine* 36, 6183–6190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.056>.
149. Zinkernagel, R.M. (2018). What if protective immunity is antigen-driven and not due to so-called "memory" B and T cells? *Immunol. Rev.* 283, 238–246. <https://doi.org/10.1111/immr.12648>.
150. Mao, T., Israelow, B., Suberi, A., Zhou, L., Reschke, M., Peña-Hernández, M.A., Dong, H., Homer, R.J., Saltzman, W.M., and Iwasaki, A. (2022). Unadjuvanted intranasal spike vaccine booster elicits robust protective mucosal immunity against sarbecoviruses. <https://doi.org/10.1101/2022.01.24.477597>.

Perspektive

Überdenken der nächsten Generation von Impfstoffen gegen Coronaviren, Influenzaviren und andere Atemwegsviren

David M. Morens,¹ Jeffery K. Taubenberger,^{2,*} und Anthony S. Fauci¹¹ Büro des Direktors, Nationales Institut für Allergien und Infektionskrankheiten, Nationale Gesundheitsinstitute, Bethesda, MD 20892, USA² Abteilung für virale Pathogenese und Evolution, Labor für Infektionskrankheiten, Nationales Institut für Allergien und Infektionskrankheiten, Nationale Gesundheitsinstitute, Bethesda, MD 20892, USA*Korrespondenz: taubenbergerj@niaid.nih.gov <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.016>

ZUSAMMENFASSUNG

Viren, die sich in der Schleimhaut der menschlichen Atemwege vermehren, ohne den gesamten Körper zu infizieren, darunter Influenza A, SARS-CoV-2, endemische Coronaviren, RSV und viele andere „Erkältungsviren“, verursachen eine erhebliche Mortalität und Morbidität und sind ein wichtiges Thema für die öffentliche Gesundheit. Da diese Viren in der Regel keine vollständige und dauerhafte schützende Immunität hervorrufen, konnten sie bisher weder durch zugelassene noch durch experimentelle Impfstoffe wirksam bekämpft werden. In dieser Übersicht untersuchen wir die Herausforderungen, die die Entwicklung wirksamer mukosaler Atemwegsimpfstoffe behindert haben, und betonen, dass sich alle diese Viren extrem schnell im Oberflächenepithel vermehren und innerhalb eines engen Zeitfensters, bevor adaptive Immunantworten vollständig mobilisiert sind, schnell auf andere Wirte übertragen werden. Wir diskutieren mögliche Ansätze für die Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation gegen diese Viren unter Berücksichtigung verschiedener Variablen wie Impfstoff-Antigenkonfiguration, Dosis und Adjuvans, Art und Zeitpunkt der Impfung, Impfstoffverstärkung, Begleittherapien und Optionen für Impfstrategien im Bereich der öffentlichen Gesundheit.

EINLEITUNG

Wirksame Impfstoffe und Impfstrategien gegen endemische und neu auftretende Atemwegsviren sind von entscheidender Bedeutung, da diese Krankheitserreger weltweit jährlich bis zu 5 Millionen Menschenleben fordern. So starben beispielsweise in den letzten zehn Jahren in den Vereinigten Staaten jedes Jahr 12.000 bis 52.000 Menschen an Influenza¹ und diese Krankheit zählt zu den häufigsten Ursachen für verlorene produktive Lebensjahre (YPLL). Endemische Atemwegsviren wie das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) und die Parainfluenzaviren fordern viele weitere Todesopfer, und bisher unbekannte Atemwegsviren wie SARS-CoV-2, der Erreger von COVID-19, sind unerwartet aufgetreten. SARS-CoV-2 hat in den Vereinigten Staaten bisher mehr als eine Million Menschen getötet. Die zunehmende Häufigkeit des Auftretens solcher pandemischer Atemwegsviren könnte ein wesentliches Merkmal einer neuen Pandemie-Ära sein⁽²⁾ und zwingt uns, den Stand der Atemwegsvirus-Vakzinologie neu zu überdenken (Abbildung 1).^{(2) (3)}

Bis zum Auftreten von COVID-19 war die Influenza jahrzehntlang die tödlichste durch Impfung vermeidbare virale Atemwegserkrankung, für die nur suboptimale Impfstoffe zur Verfügung standen. Überraschenderweise hat sich seit 1957, als Influenza-Impfstoffe erstmals im Rahmen nationaler Impfprogramme in den USA verabreicht wurden, wenig geändert. Im Laufe der Jahre waren Influenza-Impfstoffe nie in der Lage, eine dauerhafte schützende Immunität gegen saisonale Influenzavirustämme zu erzeugen, selbst gegen nicht driftende Stämme nicht.^(4–7) Obwohl die aktuellen Influenza-Impfstoffe das Risiko einer schweren Erkrankung, eines Krankenhausaufenthalts und eines Todesfalls bis zu einem gewissen Grad verringern, ist ihre Wirksamkeit gegen klinisch manifeste Infektionen mit 14 % bis 60 % in den letzten 15 Influenza-Saisons eindeutig suboptimal.

Jahreszeiten.¹ Darüber hinaus wird die Dauer der durch den Impfstoff hervorgerufenen Immunität nur in Monaten gemessen. Aktuelle Impfstoffe erfordern eine jährliche Wiederholungsimpfung mit aktualisierten Formulierungen, die häufig nicht genau auf die zirkulierenden Virusstämme abgestimmt sind.⁸ Obwohl jährliche Grippeimpfungen für die meisten Menschen und insbesondere für Personen in Risikogruppen, darunter ältere Menschen, Menschen mit chronischen Erkrankungen und Schwangere, dringend empfohlen werden, ist die Akzeptanz des Impfstoffs in der Bevölkerung nicht ideal.⁹ Nach mehr als 60 Jahren Erfahrung mit Grippeimpfstoffen sind bis zum Jahr 2022 nur sehr geringe Verbesserungen bei der Prävention von Infektionen durch Impfstoffe zu verzeichnen. Wie bereits vor Jahrzehnten festgestellt wurde und auch heute noch gilt, wäre die Wirksamkeit unserer besten zugelassenen Grippeimpfstoffe für die Zulassung der meisten anderen durch Impfungen vermeidbaren Krankheiten unzureichend.⁷ Selbst jahrzehntelange Bemühungen zur Entwicklung besserer, sogenannter „universeller“ Influenza-Impfstoffe – Impfstoffe, die eine breitere schützende Immunität schaffen würden, vorzugsweise über einen längeren Zeitraum^{8,10} – haben noch nicht zu Impfstoffen der nächsten Generation mit breitem Schutz geführt, obwohl sich eine große Anzahl experimenteller Impfstoffe in der präklinischen oder frühen klinischen Entwicklung.¹¹

Während der COVID-19-Pandemie hat die schnelle Entwicklung und der schnelle Einsatz von SARS-CoV-2-Impfstoffen unzählige Leben gerettet und dazu beigetragen, die Pandemie frühzeitig teilweise unter Kontrolle zu bringen.¹² Mit dem Auftreten von SARS-CoV-2-Varianten sind jedoch Mängel dieser Impfstoffe deutlich geworden, die an Influenza-Impfstoffe erinnern. Die Impfstoffe für diese beiden sehr unterschiedlichen Viren haben gemeinsame Merkmale: Sie bieten nur einen unvollständigen und kurzlebigen Schutz gegen sich entwickelnde Virusvarianten, die der Immunität der Bevölkerung entkommen.^(12–15) In Anbetracht dessen, dass Impfstoffe



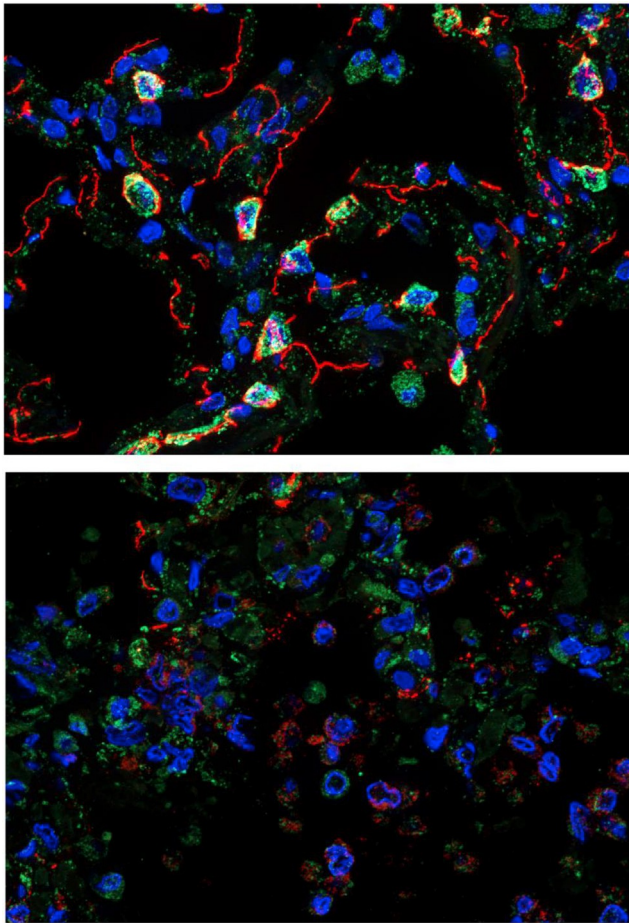


Abbildung 1. Alveoläre Schäden in tödlichen COVID-19-Lungenautopsieproben
Mehrfarbige Immunfluoreszenz, die die Expression von Prosulfactant-Protein C (grün) und E-Cadherin (rot) in normalem Lungengewebe (oben) und in einem COVID-19-Lungenautopsiefall (unten) zeigt. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Normales Lungengewebe zeigt eine ausgeprägte Expression von Prosulfactant-Protein C und E-Cadherin in Lungenalveolarzellen vom Typ 2 bzw. in Epithelverbindungen, im Vergleich zu tödlichem COVID-19-Lungengewebe, das einen deutlichen Verlust der Prosulfactant-Protein-C- und E-Cadherin-Färbung in den Alveolarsepten und eine intraalveoläre Ansammlung von positiv gefärbten Epithelresten aufweist.
Die Bilder zeigen die umfangreichen Schäden an der Lunge, die bei einem tödlichen COVID-19-Fall beobachtet wurden. Neue Generationen von Impfstoffen gegen Atemwegsviren wie SARS-CoV-2 und Influenzaviren sind von entscheidender Bedeutung für die Prävention von Lungenerkrankungen, schweren Erkrankungen und Todesfällen.
Die Bilder einer normalen Lunge und eines COVID-19-Autopsiefalls stammen aus D'Agnillo F, et al. *Sci Transl Med.* 2021;13(620):eabj7790. Bilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. Felice D'Agnillo von der US-amerikanischen Food and Drug Administration.

Die Entwicklung und Zulassung ist ein langwieriger und komplexer Prozess, der jahrelange präklinische und klinische Daten zur Sicherheit und Wirksamkeit erfordert. Die Einschränkungen der Influenza- und SARS-CoV-2-Impfstoffe erinnern uns daran, dass Impfstoffkandidaten für die meisten anderen Atemwegsviren bisher keinen ausreichenden Schutz bieten, um eine Zulassung in Betracht zu ziehen, darunter Impfstoffkandidaten gegen RSV, eine der häufigsten Todesursachen bei Säuglingen und älteren Menschen,^{16–21} Parainfluenzaviren, endemische Coronaviren²² und viele andere „Erkältungsviren“, die erhebliche Morbidität und wirtschaftliche Verluste verursachen.

Vor mehr als 50 Jahren weckte die Entwicklung erfolgreicher Impfstoffe gegen einige der wichtigsten Atemwegsviren, darunter Masern, Mumps und Röteln, die Hoffnung, dass

bald Impfstoffe für alle anderen Atemwegsviren entwickelt werden könnten. Natürliche Infektionen mit diesen drei durch Impfstoffe kontrollierten Atemwegsviren sowie mit Pocken und Varizella-Zoster-Viren (VZV) sind jedoch nicht repräsentativ für Infektionen, die durch die meisten Atemwegsviren verursacht werden. Sie unterscheiden sich in mindestens drei entscheidenden Punkten, die für ihre erfolgreiche Bekämpfung mit Impfstoffen von Bedeutung sind (Tabelle 1):

- (1) Nachdem sie sich zunächst in der Schleimhaut vermehrt haben, verursachen diese systemischen Atemwegsviren alle eine signifikante Virämie, die eine enorme Anzahl infektiöser Virionen im gesamten Körper verbreitet und sie mit mehreren Immunkompartimenten und immunkompetenten Zelltypen in Kontakt bringt.
- (2) sie haben relativ lange Inkubationszeiten, die die anfängliche Vermehrung in der Schleimhaut und die anschließende systemische Ausbreitung infektiöser Virionen widerspiegeln, was Zeit für die Induktion der vollen Kraft der adaptiven Immunität lässt, und
- (3) sie lösen eine langfristige oder lebenslange schützende Immunität aus (Tabelle 1).

Im krassen Gegensatz dazu haben nicht-systemische Atemwegsviren wie Influenzaviren, SARS-CoV-2 und RSV tendenziell deutlich kürzere Inkubationszeiten (Tabelle 1) und einen schnelleren Verlauf der Virusvermehrung. Sie replizieren sich vorwiegend im lokalen Schleimhautgewebe, ohne eine Virämie zu verursachen, und treffen nicht in nennenswertem Umfang auf das systemische Immunsystem oder die volle Kraft der adaptiven Immunantwort, deren Reifung mindestens 5–7 Tage dauert, in der Regel weit nach dem Höhepunkt der Virusreplikation und der Weiterübertragung auf andere. Es wurde über eine „RNA-ämie“ (Zirkulation viraler RNA im Blutkreislauf, wie sie bei den meisten Infektionen mit respiratorischen Schleimhautviren auftritt, im Unterschied zur Virämie, bei der infektiöse Viren aus dem Blut kultiviert werden können) durch SARS-CoV-2 berichtet, und die RT-PCR-Werte der viralen RNA wurden mit schweren Erkrankungen in Verbindung gebracht^{23,24} ähnlich wie in Studien zur Influenza-RNAämie.^{25,26} Infolgedessen neigen nicht systemisch replizierende Atemwegsviren, zu denen offenbar auch SARS-CoV-2 gehört,^{13–15} dazu, Menschen im Laufe ihres Lebens wiederholt zu infizieren, ohne jemals einen vollständigen und dauerhaften Schutz auszulösen.²⁷

Ein weiterer wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden muss, ist, dass RNA-Viren zwar eine ähnliche inhärente Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase aufweisen,²⁸ verschiedene Viren (und verschiedene offene Leserahmen innerhalb ihrer Genome) jedoch eine unterschiedliche Toleranz gegenüber Mutationen haben. Mutationsbeschränkungen können mit häufig überlappenden offenen Leserahmen²⁸ oder funktionellen Beschränkungen beim Erwerb nicht-synonymer Mutationen zusammenhängen, wie dies beispielsweise beim Masernvirus der Fall ist.²⁹ Im Gegensatz dazu sind die externen Hämagglutinin- und Neuraminidase-Proteine des Influenza-A-Virus vergleichsweise plastisch, und positiv selektierte nicht-synonyme Mutationen führen zu einer immunologisch signifikanten Antigendrift^{30,31} durch den Erwerb nicht-synonymer Mutationen in antigenen Epitopen sowie durch die Veränderung der N-gebundenen Glykosylierungsmuster.³² Eine schnelle Antigendrift beeinträchtigt die Bekämpfung der jährlichen Influenzaepidemien⁶ und erschwert die Bemühungen um die Herstellung breit schützender, „universeller“ Influenza-Impfstoffe. Das Spike-Protein von SARS-CoV-2 hat eine ähnliche Plastizität gezeigt, wobei mehrere Varianten mit veränderter Antigenität³³ aufgetreten sind, was die Bekämpfung durch aktuelle Impfstrategien erschwert hat.³⁴

Obwohl die rasche Entwicklung von antigenisch variablen Schleimhautviren wie Influenza-A-Viren³⁵ und SARS-CoV-2 die Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation erschwert, gibt es andere ausschließlich die Schleimhäute befallende Atemwegsviren

Tabelle 1. Epidemiologische und immunologische Parameter ausgewählter humaner Atemwegsviren und Impfstoffe zu ihrer Bekämpfung

Virus	Inkubationszeit ^a	Ausgeprägte Virämie	Infektion löst langfristige schützende Immunität aus	Reinfektionen sind selten	Impfstoffe lösen eine langfristige schützende Immunität aus	Impfstofftyp
Masern (bis zum Prodrom)	z10 Tage	ja	ja	ja	Ja	Replikationsimpfstoff
Mumps	z16 Tage	ja	ja	ja	ja	Replikation
Röteln	z16 Tage	ja	ja	ja	ja	Replikation
Pocken ^b	z12 Tage	ja	ja	ja	ja	Replikation
VZV ^c	z14 Tage	ja	ja	ja	ja	Replikation
Endemische Coronaviren	z5 Tage	nein	nein	nein	nein	keine
Influenzavirus	z2 Tage	nein	nein	nein	nein	Replikation, andere
Parainfluenzaviren	z4 Tage	nein	nein	nein	nein	keine
RSV	z5 Tage	nein	nein	nein	nein	keine
SARS-CoV-2	z4 Tage	nein ^d	nein	nein	nein	nicht replizierend

^a Virale Inkubationszeiten, insbesondere kürzere Inkubationszeiten, weisen in der Regel sehr große Schwankungsbreiten auf; diese Schätzungen stammen aus Querschnitten der Literatur.

^b Pocken wurden 1978 aus dem natürlichen Kreislauf ausgerottet.

^c Das Wiederaufflammen des Varicella-Zoster-Virus (VZV) (bekannt als Zoster, Zona oder „Gürtelrose“) resultiert aus der Freisetzung latenter Viren aus den Ganglien; exogene Infektionen der Atemwege bei gesunden Personen sind selten.

^d Obwohl SARS-CoV-2-Antigene in mehreren Geweben nachgewiesen wurden, scheint das Virus nicht mit einer signifikanten „freien“ Virämie in Verbindung zu stehen, wie was durch die Schwierigkeit, infektiöse Virionen aus Blut oder Geweben zu kultivieren, und durch die schwache Auslösung einer breiten und dauerhaften schützenden systemischen Immunität belegt wird.

Viren wie RSV weisen eine deutlich geringere Antigenplastizität auf ^{36–38}; dennoch verursachen sie im Laufe des Lebens wiederholte Infektionen, ohne dass eine langfristige schützende Immunität entwickelt wird. ^{39,40} Obwohl die genetische und antigene Variabilität von Viren wie Influenza und SARS-CoV-2 die Entwicklung von Impfstoffen erschwert, können diese Faktoren allein nicht vollständig erklären, warum keine langfristige schützende Immunität gegen andere Viren der Atemwegsschleimhaut wie das phänotypisch stabilere RSV hervorgerufen wird.

Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren ist es nicht verwunderlich, dass keines der vorwiegend mukosalen Atemwegsviren jemals durch Impfstoffe wirksam bekämpft werden konnte. Diese Beobachtung wirft eine Frage von grundlegender Bedeutung auf: Wenn natürliche mukosale Atemwegsvirusinfektionen keine vollständige und langfristige schützende Immunität gegen eine erneute Infektion hervorrufen, wie können wir dann erwarten, dass Impfstoffe, insbesondere systemisch verabreichte, nicht replizierende Impfstoffe, dies tun? Dies ist eine große Herausforderung für die zukünftige Impfstoffentwicklung, und ihre Bewältigung ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Impfstoffen der „nächsten Generation“.

Die wichtigsten Herausforderungen (zusammengefasst in Tabelle 2) werden im Folgenden zusammen mit Möglichkeiten zu ihrer Bewältigung bei der Suche nach neuen und verbesserten Impfstoffen gegen Atemwegsviren erörtert.

NATÜRLICHE INFEKTIONEN MIT MUKOSALEN RESPIRATORISCHEN VIREN KÖNNEN MÖGLICHERWEISE NICHT VOLLSTÄNDIG DURCH DIE IMMUNREAKTIONEN DES MENSCHEN KONTROLLIERT WERDEN, DA SICH DAS MENSCHLICHE IMMUNSYSTEM DAHIN ENTWICKELT HAT, SIE WÄHREND SEHR KURZER INTERVALLIEN DER MUKOSALEN VIRUSREPLIKATION ZU TOLERIEREN

Die Anzeichen und Symptome vieler verschiedener Infektionen mit mukosalen Atemwegsviren sind bemerkenswert ähnlich: eine kurze Krankheitsdauer und ein typischerweise unkomplizierter Verlauf mit Schnupfen, Niesen, Halsschmerzen, variablem Husten, Unwohlsein und in vielen Fällen niedrigem oder fehlendem Fieber. ⁴¹ Diese Gemeinsamkeiten deuten stark auf

auf ähnliche pathogene Mechanismen dieser Viren hin, die mit Entzündungsreaktionen und angeborenen Immunreaktionen des Wirtsorganismus einhergehen.

Die Unfähigkeit von Schleimhaut-Respirationsviren, eine dauerhafte schützende Immunität hervorzurufen, spiegelt neben vielen anderen Faktoren die evolutionäre Anpassung des Virus an den Wirt und des Wirts an das Virus wider. In dieser evolutionären Beziehung haben Viren zwei wichtige Vorteile: (1) Das menschliche Atemwegssystem hat sich so entwickelt, dass es eine komplexe Toleranzregulation (siehe unten) aufweist, die eine wirksame Eliminierung des Virus durch das Immunsystem in den ersten 5 bis 7 Tagen nach der Infektion, in denen die angeborenen Immunantworten überwiegen, hemmen kann; und (2) sehr kurze Inkubationszeiten (Tabelle 1) ermöglichen eine erhebliche und ungehinderte Virusvermehrung und weitere Virusausbreitung, bevor adaptive Immunantworten ausreichend aufgebaut werden können, um sie zu eliminieren. ^{42,43}

Darüber hinaus funktionieren die verschiedenen Kompartimente des respiratorischen Immunsystems auf deutlich andere Weise als die Kompartimente des Immunsystems in anderen Organsystemen. Insbesondere befindet sich das respiratorische Immunsystem in separaten gewebespezifischen Bereichen der semi-organisierten, mukosaassoziierten lymphatischen Gewebe (MALTs) des tränen-/bindehautassoziierten lymphatischen Gewebes (TALT), des nasopharyngealen lymphatischen Gewebes (NALT), des bronchialassoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) ⁴⁴ und in separaten Lungenkompartimenten. Jedes dieser Kompartimente erkennt unabhängig voneinander Virusinfektionen und Antigenpräsentationen, interagiert mit den anderen Kompartimenten und mit dem systemischen Immunsystem, initiiert lokale Effektorantworten und hält einen variabel tolerierten Immunstatus aufrecht.

Die Begriffe „Krankheitstoleranz“ und „Immuntoleranz“ beziehen sich auf die noch nicht vollständig charakterisierte, aber eindeutige Kategorie von Immunabwehrmechanismen bei Säugetieren, die es dem Wirt ermöglichen, Infektionen und andere antigene Reize zu „akzeptieren“, um das Überleben zu optimieren (überprüft in Medzhitov et al. ⁴² und Iwasaki et al. ⁴³). Da Menschen mit jedem Atemzug und jedem Bissen enorme Mengen an exogenen Proteinen einatmen und aufnehmen, haben sich die Immunabteilungen der Atemwege und des Magen-Darm-Trakts so entwickelt, dass sie

Tabelle 2. Zentrale Herausforderungen bei der Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation gegen mukosale Atemwegsviren, darunter SARS-CoV-2, Influenza-A-Viren sowie neu auftretende Pandemieviren und andere wichtige Viren

- (1) Natürliche Infektionen mit mukosalen Atemwegsviren können möglicherweise nicht vollständig durch die Immunantwort des Menschen kontrolliert werden, da sich das menschliche Immunsystem so entwickelt hat, dass es diese während sehr kurzer Intervalle der mukosalen Virusreplikation toleriert
 - (2) Da die mukosale und systemische Immunität nur teilweise vor Infektionen mit mukosalen Atemwegsviren schützen, müssen wir alternative Immunmechanismen des Wirts nutzen
 - (3) Die immunologischen Korrelate des Schutzes gegen mukosale Atemwegsviren sind noch nicht vollständig verstanden, variieren zwischen Virusstämmen und Subtypen, unterliegen einer Virusdrift und weisen interindividuelle Unterschiede auf
 - (4) Im Zusammenhang mit Impfstoffen sind Fragen zur Verabreichungsform, zur Antigenkonfiguration Konfiguration, Adjuvans und Zusammenhang mit einer Begleittherapie sind für die aktuelle Forschung von großer Bedeutung
 - (5) Geimpfte Wirte und Risikogruppen sind zahlreich und heterogen
 - (6) Überlegungen zur öffentlichen Gesundheit im Zusammenhang mit Atemwegsimpfstoffen der nächsten Generation
- Atemwegsimpfstoffen müssen in die Gestaltung des Impfstoffdesigns einfließen, einschließlich Impfplan, Rolle der Auffrischungsimpfung, Häufigkeit der Impfung und Dauer/Vollständigkeit des Schutzes, Nebenwirkungen und öffentliche Akzeptanz

sich mit kontinuierlichen und massiven antigenen Angriffen von außen auseinandersetzen. (Immunreaktionen auf Virusinfektionen der Magen-Darm-Schleimhaut wurden kürzlich untersucht ⁴⁵ und werden hier nicht behandelt.) Inhierte und aufgenommene Proteine müssen identifiziert und entweder toleriert oder angegriffen und eliminiert werden. Dies erfordert eine hochentwickelte und komplizierte „Entscheidungsstrategie“ des Immunsystems, die gleichzeitig harmlose Fremdproteine akzeptiert und gleichzeitig die Immunreaktionen auf Infektionserreger und Allergene herunterreguliert, die andernfalls zu Schäden am umliegenden Gewebe führen könnten. ^(46–50)

Aus teleologischer Sicht des Erregers haben sich mukosal replizierende/nicht-systemische Atemwegsviren über Jahrtausende hinweg an tolerierte Immunumgebungen des Wirts angepasst, um sich optimal zu infizieren, zu replizieren und schnell zu verbreiten, bevor adaptive Immunantworten vollständig mobilisiert werden können, um sie zu kontrollieren. Unter anderem tun sie dies, indem sie die Interferon (IFN)-Reaktionen des Wirts hemmen (wie auch andere sich systemisch replizierende RNA-Viren), Lockantigene exprimieren und abweichende Immunreaktionen induzieren, die das Überleben des Virus fördern, ohne das Gewebe des Wirts signifikant zu schädigen. ¹⁶ Das respiratorische Mikrobiom des Wirts trägt ebenfalls zu diesem Gleichgewicht bei, einerseits durch die Begrenzung der Infektion (z. B. durch die Regulierung der IFN-Produktion) und andererseits durch die Förderung der Infektion (z. B. durch die Induktion antiviraler Zustände der Immuntoleranz). ^{46,51–53} Das Darmmikrobiom wurde ebenfalls mit individuellen Unterschieden in der Impfstoffreaktion in Verbindung gebracht, und auch dieser Zusammenhang muss noch eingehender untersucht werden. ^{54,55}

Ein besseres Verständnis des afferenten Arms dieser Systeme ^{46,49,51,52,(56–63)} ist erforderlich, einschließlich der Rolle der Epithelzellen der oberen Atemwege (die eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von Fremdstoffen, einschließlich viraler Pathogene, spielen). Transepitheliale Antigen-erkennende und -präsentierende Zellen wie M-Zellen und intraepitheliale dendritische Zellen, Immunregulation, Toleranzhomöostase, IgA-Kontrolle sowie die Expression und Wirkungen von klassenumschaltetem IgA. ⁶⁴ Letzteres wird lokal durch eindringende mukosale Anti-

gens und bietet zusätzlich zu seiner Virusneutralisierung und anderen Effektorfunktionen einen stärkeren Kreuzschutz als andere Immunglobuline in seiner sekretorischen Form. ^{65,66} initiiert die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und ist ein Immunregulator. ^{67–70} Die Bedeutung von sekretorischem IgA (sIgA) in der Schleimhaut für die pathogen-spezifische Reaktion auf respiratorische Virusinfektionen ist seit langem für Influenzaviren bekannt. ^{65,(71)} RSV, ⁽⁷²⁾ und in jüngerer Zeit auch bei SARS-CoV-2. ⁽⁷⁴⁾ ⁽⁷⁵⁾

Der immunologische „Faustische Pakt“ zwischen Toleranz und Infektionskontrolle, der eine vorübergehende, moderate Infektion durch Atemwegserreger mit geringer oder mittlerer Pathogenität zulässt, um die zerstörerischen Kräfte einer immunologischen Eliminierungsreaktion einzudämmen, ^{16,59} kann für die Impfstoffkontrolle von Atemwegsviren problematisch sein, nicht nur hinsichtlich der lokalen und systemischen Erkennung von Impfstoffantigenen, sondern auch hinsichtlich der Auslösung optimaler Immunantworten. Es überrascht nicht, dass die Immuntoleranz in den oberen Atemwegen, wo Atemwegsviren injiziert werden, im Vergleich zu den unteren Atemwegen am ausgeprägtesten ist, ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁷⁶⁾ wo sich einige Atemwegsviren ausbreiten können, wenn sie nicht eingedämmt werden (siehe unten). Dies stellt eine zusätzliche Herausforderung für die Entwicklung von Impfstoffen dar, die im Idealfall sowohl die Auslösung einer Virusinfektion dämpfen als auch die Infektion nach der Impfung kontrollieren sollten.

Das Paradigma der menschlichen Toleranz/Immunantwort ist kein Einzelfall. Eine extremere Version findet sich bei einigen Fledermausarten: Während ihrer langen Winterruhe sparen Fledermäuse Überlebensenergie, indem sie über lange Zeiträume hinweg enorme Infektionslasten tolerieren. ⁽⁷⁷⁾ Dieses Phänomen ist von mehr als nur vorübergehendem Interesse, da es teilweise erklären könnte, warum Fledermäuse so wichtige Inkubatoren für zahlreiche Viren (Coronaviren, Filoviren, Henipaviren, Tollwutviren usw.) sind, die auf den Menschen übertragbar sind. Ironischerweise können Immuntoleranzmechanismen bei Fledermäusen und anderen Wirtsarten wichtige Determinanten für das Auftreten von Epidemien und Pandemien beim Menschen sein, genauso wie sie die Übertragung von an den Menschen angepassten Viren von Mensch zu Mensch erleichtern.

DA DIE MUKOSALE UND SYSTEMISCHE IMMUNITÄT NUR TEILWEISE VOR EINER INFektion MIT MUKOSALEN RESPIRATORISCHEN VIREN SCHÜTZT, MÜSSEN WIR ALTERNATIVE IMMUNMECHANISMEN DES WIRTS NUTZEN

Beispielsweise könnte das seit kurzem bekannte Phänomen der „trainierten angeborenen Immunität“ ^{46–50} die Hoffnung wecken, dass zukünftige Impfstoffe eines Tages in der Lage sein könnten, die angeborene Immunantwort entweder auf bestimmte Krankheitserreger oder unspezifisch zu verstärken. Eine wichtige Frage bleibt jedoch unbeantwortet: Wie lassen sich diese Reaktionen kontrollieren, um schädliche entzündliche Folgen zu vermeiden? ⁷⁸

Viele Studien an Menschen und Versuchstieren, von denen einige vor der Entdeckung von sIgA durchgeführt wurden, ^{22,58,79–81} deuten darauf hin, dass die sekretorische Schleimhautimmunität bei der Bekämpfung von Schleimhaut-Respirationsviren im Allgemeinen wirksamer ist als die systemische Immunität. ^{18,(79)} ⁽⁸²⁾ und dass gewebesresidente Gedächtnis-T-Zellen bei der schnellen Reaktion auf Schleimhautinfektionen wirksam sein können. ⁽⁸³⁾ Die wichtigsten humoralen Effektoren an Schleimhautstellen sind sIgA, auf Schleimhautoberflächen durch lokale IgA-sekretierende Plasmazellen/Plasmablasten und T-Zell-Gedächtnis- und Effektorzellen im MALT exprimiert werden. ^{18,58,61,70,81,84–86} Nasales sIgA ist der beste Korrelat für den Schutz in RSV-Challenge-Studien, ¹⁸ selbst wenn keine systemischen IgA-produzierenden B-Zellen vorhanden sind. Ähnliche Ergebnisse werden bei anderen Viren, einschließlich SARS-CoV-2, beobachtet. ^(87–) ⁽⁹⁰⁾

Obwohl nicht systemisch replizierende Schleimhautviren systemische Effektorzellen hervorrufen, darunter systemische IgA-produzierende Plasmazellen und in einigen Fällen hohe Serum-IgA- und IgG-Spiegel, funktionieren weder zirkulierende Antikörper, Plasmablasten noch systemische B- oder T- oder T-Effektorzellen an Schleimhautstellen optimal. Dies ist zum Teil auf die Verdünnung der transsudierten Antikörper und die Tatsache zurückzuführen, dass vielen dieser Effektorzellen die Transportsignale zu diesen Stellen fehlen.⁽⁸⁵⁾

Es ist daher wichtig, natürliche Situationen zu berücksichtigen, in denen die erworbene antikörpervermittelte Immunität nicht-systemische mukosale Atemwegsviren kontrolliert. Bereits 1918 wurde gezeigt, dass passiv verabreichtes Influenza-Immuplasma die Influenza-Infektion beim Menschen begrenzen kann.⁹¹ In den 1940er Jahren wurde auch gezeigt, dass inhalierte aerosolisierte Influenza-Antikörper eine Wirkung gegen die klinische Influenza haben.⁹² Eine Influenza-Infektion erzeugt dauerhafte systemische Immunantworten, wie der Nachweis spezifischer Gedächtnis-B-Zellklone 90 Jahre nach der Infektion mit dem Influenza-Virus von 1918 zeigt⁹³; jedoch bieten niedrige Konzentrationen zirkulierender Immunglobuline und die zeitliche Verzögerung zwischen Infektion und Entwicklung einer anamnestischen Reaktion möglicherweise keinen neutralisierenden Schutz gegen ein sich schnell replizierendes Influenza-Virus. Ähnliche Beobachtungen wurden bei anderen mukosalen Atemwegsviren gemacht. Beispielsweise schützen mütterliche IgG-Antikörper, insbesondere Antikörper gegen das RSV-F-Protein, vor RSV bei Säuglingen^(16–19), und ein parenteral verabreichter humanisierter monoklonaler Antikörper verhindert eine RSV-Infektion bei Risikokindern⁽²⁰⁾.

Die Wirksamkeit von zirkulierendem Ig hängt in diesen Situationen jedoch von der Transsudation sehr hoher Antikörpertiter mit Spezifität für wichtige virale Epitope auf die Schleimhautoberflächen ab. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie diese Transsudation gesteuert wird, wie antivirales IgA so reguliert wird, dass es sowohl bei der passiven Immunität als auch bei der Immunregulation wirkt.^{67,94} oder wie solche hohen Antikörperspiegel durch Impfungen hervorgerufen und aufrechterhalten werden können.

Neben der Prävention einer Erstinfektion ist es auch wichtig, die Rolle der Wirtsimmunität bei der Begrenzung der Virusausbreitung nach einer Infektion zu berücksichtigen. Atemwegsviren infizieren in der Regel zunächst die Schleimhaut der oberen Atemwege, wo IgA bei der antiviralen Kontrolle am wirksamsten ist;⁹⁵ einige können sich jedoch weiter auf die unteren Atemwege und sogar auf die Lungenbläschen ausbreiten. Dies ist von erheblicher Bedeutung für eine Untergruppe pneumogener Atemwegsviren wie Influenza, RSV und möglicherweise SARS-CoV-2. Diese Viren sind normalerweise auf die oberen Atemwege beschränkt, können jedoch der Immunabwehr entkommen und sich in die Lunge ausbreiten, wo sie eine primäre virale Pneumonie mit oder ohne sekundäre bakterielle Pneumonie verursachen, die häufig die Haupttodesursache bei diesen Infektionen ist.⁹⁶ Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine virale-bakterielle Koinfektion die virale und virale/bakterielle Übertragung über die Luft erleichtert⁹⁷ und sogar die Sterblichkeitsrate erhöhen kann, ein Phänomen, das bereits 1917 beobachtet wurde.⁹⁸

Die Lunge unterscheidet sich funktionell und immunologisch von den oberen Atemwegen, da sie sowohl residente Alveolarmakrophagen in den Alveolen als auch residente Immun- und Gedächtniszellen in peribronchiolären Nischen enthält.⁸⁵ Letztere bestehen aus Immunzellen, die bei der Geburt noch nicht vorhanden sind, sich aber als Reaktion auf postnatale Antigenexpositionen entwickeln,⁹⁶ die sich von Individuum zu Individuum stark unterscheiden und als Reaktion auf Antigenstimulationen expandieren können. Da das pulmonale Immunsystem semi-autonom ist, kann es für systemisch verabreichte oder in den oberen Atemwegen verabreichte Impfstoffe, die zur Vorbeugung von Infektionen entwickelt wurden, schwierig sein, zusätzlich eine Lungeninfektion zu verhindern, wenn die oberen Atemwege

Die Infektion breitet sich auf die Lunge aus. Da beispielsweise IgA offenbar eine bessere Wirkung in den oberen Atemwegen hat, während IgG besser in der Lunge wirkt,⁸² könnte es schwierig sein, einzelne Impfstoffe zu entwickeln, die vor allen Atemwegserkrankungen schützen. Die Auswirkungen auf die Impfstoffkunde sind klar: Die Prävention viraler Infektionen der oberen Atemwege und die Begrenzung der Ausbreitung des Virus auf benachbarte Atemwegsbereiche nach der Infektion sind beide von entscheidender Bedeutung, lassen sich jedoch mit einzelnen Impfstoffen möglicherweise nicht ohne Weiteres erreichen.

Um zu verstehen, wie Impfstoffe vor Infektionen der unteren Atemwege schützen können, müssen wir lernen, wie die „Wechselwirkung“ zwischen dem oberen und unteren Atemweg sowie dem systemischen Immunsystem auf der Ebene der Zellrezeptoren, der Antigenerkennung, der Antigenpräsentation und zahlreicher Effektorfunktionen koordiniert und gesteuert wird.^{49,50,61,(82)} Wir müssen auch die Entwicklung und Aufrechterhaltung virusspezifischer Lungen-residenter Gedächtnis-B- und T-Zellen weiter untersuchen, wie ihre Persistenz in der Lunge erhöht werden kann und wie schnell sie zu infizierten Schleimhautstellen mobilisiert werden können.^{(99) (100)}

IMMUNKORRELATE DES SCHUTZES GEGEN VIREN DER ATEMWEGSCHLEIMHÜLLE SIND NOCH NICHT VOLLSTÄNDIG VERSTANDEN, VARIIEREN JE NACH VIRUSSTAMM UND SUBTYP, UNTERLIEGEN EINER VIRALEN DRIFT UND ZEIGEN INTERINDIVIDUELLE VARIATIONEN.

Bei der Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation müssen wir starke immunologische Korrelate für den Schutz gegen jedes mukosale Atemwegsvirus identifizieren und uns über deren Relevanz für die Impfziele im Bereich der öffentlichen Gesundheit einig sein.^{80,101,102} Weitere Studien zu Immunkorrelaten beim Menschen sind eindeutig erforderlich und sollten eine Forschungspriorität darstellen. Nach einer Influenza-Infektion beim Menschen wurden in Studien seit langem Korrelate im Serum und in den Schleimhaut-Immunglobulinen^(103–105) sowie T-Zell-Immunkorrelate identifiziert.^{104,106,107} Im Gegensatz dazu konnte eine Studie zur Influenza-Exposition beim Menschen nach Impfung mit inaktivierten Impfstoffen oder attenuierten Lebendimpfstoffen (LAIV), gefolgt von einer LAIV-Exposition, keine immunologischen Korrelate des Schutzes finden.¹⁰⁸

Das Immunsystem ist komplex und umfasst viele Effektoren. Die Serum-Antikörpertiter gegen verschiedene virale Epitope stehen möglicherweise nur indirekt mit dem Schutz in Zusammenhang, da sie mit anderen, kritischeren (aber in der Regel nicht gemessenen) Immuneffektoren assoziiert sind, wie beispielsweise mukosale Immunglobuline⁶⁵ oder beispielsweise sterischen Wechselwirkungen von Hämagglutinin-Stamm-Antikörpern, die zu einer Neuraminidase-Hemmung führen.¹⁰⁹ In aktuellen Humanstudien korrelierten die Serum-Neuraminidase-Antikörpertiter stärker mit verschiedenen Schutzmaßen als die Hämagglutinin-Kopf- oder -Stamm-Antikörpertiter.^{110,111} Neuraminidase bleibt ein unterschätztes Impfstoffziel für die Entwicklung von Influenza-Impfstoffen der nächsten Generation.¹¹² Kurz gesagt, Korrelationen zwischen Serumantikörpertitern und der Anfälligkeit für Influenza-Infektionen mögen in großen Studien statistisch valide sein, sind jedoch im Kontext individueller Variationen, schneller Virusentwicklung und abnehmender Titer unvollkommen.

Für jedes Schleimhautvirus müssen wir uns auch auf die gewünschten Schutzniveaus einig sein; Ziele für den Schutz könnten beispielsweise sein:

- vollständige Verhinderung einer Infektion, wie dies bei Impfstoffen gegen systemische Atemwegsviren der Fall sein kann (Tabelle 1);

- d die Virusvermehrung einschränken oder die Übertragung verhindern, wie dies bei der Influenza-Anti-Neuraminidase-Immunität der Fall ist;
- a die Krankheit verhindern; oder
- a nur schwere Erkrankungen (z. B. mit Krankenhausaufenthalt) verhindern, wie dies bei einigen Influenza- und SARS-CoV-2-Impfstoffen der Fall zu sein scheint.

Ein solcher Konsens ist erforderlich, wenn wir die besten Impfstoffe und optimierte Impfstrategien und -richtlinien für deren Einsatz entwickeln wollen. Bei der Influenza beispielsweise wurden Impfstoffe in der Vergangenheit entwickelt, um Infektionen der oberen Atemwege zu verhindern, nicht jedoch sekundäre Lungeninfektionen, die mit einer Ausbreitung aus den oberen Atemwegen einhergehen. Dies hat sich als problematisch erwiesen, da die derzeitigen Influenza-Impfstoffe sowohl bei der Vorbeugung von Infektionen als auch bei der Auslösung einer Lungenimmunität nicht optimal wirken.¹¹³ Obwohl Influenza- und SARS-CoV-2-Impfstoffe die Schwere der Erkrankung verringern, wenn die Impfstoffe die Infektion nicht verhindern können, kommt es immer noch zu einer erheblichen Zahl von Todesfällen, was in den Vereinigten Staaten jährlich zu Zehntausenden von Todesfällen durch Influenza führt.^{114–116} Angesichts der Unzulänglichkeiten dieser Impfstoffe scheint es aus Sicht der öffentlichen Gesundheit unerlässlich, intensiv nach besseren Impfstoffen und Impfstrategien zu suchen.

IMPFSTOFFBEZOGENE FRAGEN ZUR VERABREICHUNGSFORM, ANTIGENKONFIGURATION, ADJUVANZ UND ZUSAMMENHANG MIT ADJUVANTER THERAPIE SIND FÜR DIE AKTUELLE FORSCHUNG VON GROSSER BEDEUTUNG

Die Schleimhautoberflächen des Menschen umfassen eine Fläche von 30 bis 40 Quadratfuß⁸² und sind fast vollständig mit aktivem Lymphgewebe unterlegt. Der vorherrschende Antikörper an den meisten dieser Stellen ist IgA, der außergewöhnliche 65 % bis 70 % aller menschlichen Immunglobuline ausmacht.⁽⁸¹⁾ Es setzt sich zunehmend die Erkenntnis durch, dass die Art der Verabreichung eines Impfstoffs (z. B. intramuskulär, intranasal, konjunktival oder als Aerosol) ein entscheidender Faktor für die Reaktion der Schleimhäute der Atemwege ist.

Im Allgemeinen und wenn möglich scheint die mukosale Immunisierung der optimale Ansatz für Atemwegsviren zu sein.^{52,58,61,70,81,86,(117)} bei der Entwicklung von Impfstoffen der nächsten Generation müssen wir jedoch möglicherweise auch optimierte Formulierungen, höhere Impfstoffdosen, eine häufigere Verabreichung des Impfstoffs und die Überwindung von Herausforderungen im Zusammenhang mit der Immuntoleranz berücksichtigen.

Für jedes Virus ist es wichtig, wichtige Fragen zu beantworten, wie zum Beispiel:

- (1) Können nicht-replizierende Impfstoffe, die möglicherweise deutlich weniger wirksam bei der Auslösung von IgA sind,⁸² genauso wirksam sein wie replizierende Impfstoffe, wie z. B. attenuierte Lebendimpfstoffe und Lebendimpfstoffvektoren, die wichtige virale Proteine exprimieren?
- (2) Können Einzel- oder Pauci-Antigen-Impfstoffe einen Schutz bieten, der dem von antigenisch komplexeren Impfstoffen entspricht?
- (3) Können höhere Antigendosen oder wiederholte Impfungen eine bessere Immunität hervorrufen?
- (4) Was sind die unterschiedlichen Wirkungen von löslichen und partikulären Antigenen?⁸²
- (5) Wie sieht das ideale Verhältnis zwischen der Antigenlast des Impfstoffs und der systemischen oder mukosalen Adjuvanz aus?¹¹⁸
- (6) Was sind die optimalen Strategien für die Art und den Zeitpunkt der Impfung: mukosale/systemische „Prime-Boost“-Impfung? Neuere Strategien wie „Prime-Pull“ und „Prime-Deploy“ (Impfstrategien zur Auslösung systemischer T-Zell-Reaktionen, gefolgt von der Rekrutierung aktivierter T-Zellen über Lockstoffe

bzw. Rekrutierung residenter Gedächtnis-T-Zellen in die Lunge)^{119–122} und andere?

Es ist bemerkenswert, dass alle Impfstoffe, die gegen systemische Atemwegsviren erfolgreich sind (Tabelle 1) – diejenigen, die im Allgemeinen eine breitere und länger anhaltende humorale und zellvermittelte Immunität hervorrufen – systemisch replizierende Lebendvirus-Impfstoffe sind, die vollständig auf das mukosale und systemische Immunsystem des Wirts treffen. Die unvollkommenen Schutzeigenschaften des LAIV-Nasensprays stellen eine Ausnahme dar, die möglicherweise auf eine übermäßige Abschwächung, eine bereits bestehende LAIV-Immunität, die Zusammensetzung, eine Antigen drift oder andere noch nicht erkannte Faktoren zurückzuführen ist.^{123,124} In den letzten Jahrzehnten wurden aus Zeitgründen und aufgrund mangelnder Anstrengungen aufgrund der Kosten, der potenziellen Sicherheit und der Schwierigkeiten bei der schnellen Anpassung an die Antigen drift weniger häufig Lebendimpfstoffe entwickelt; wir sind jedoch der Meinung, dass dieser potenziell wirkungsvolle Ansatz energisch verfolgt werden muss.

In Bezug auf die Konfiguration des Impfstoffantigens (Immunogens) ist es wichtig zu fragen, ob Impfstoffe, die eine Immunität gegen bestimmte konservierte Epitope hervorrufen, eine komplexe schützende Immunität erzeugen können, die derjenigen entspricht, die bei komplexeren Antigenpräsentationen, wie z. B. Multi-Antigen-Cocktails, beobachtet wird, und ob Impfstoffe, die Antigenkomponenten wie Influenza HA/NA und HA/Stamm¹²⁵ entkoppeln, die Antigenität zuverlässig erhöhen können. Es ist auch anzumerken, dass bei einigen nicht-respiratorischen Viren, wie z. B. dermal injizierten (Mücken) systemisch infizierenden Flaviviren – zu denen das Gelbfiebervirus, das Dengue-Virus, Zika-Virus und Japanisches Enzephalitis-Virus – eine komplexe kreuzreaktive Immunität auf der Grundlage gemeinsamer Epitope auf verwandten Viren und Virusstämmen, wenn sie nacheinander auftreten, einen breiten Schutz gegen etwas entfernt verwandte Viren hervorrufen kann, der mit anamnестischen Antikörperreaktionen verbunden ist.⁽¹²⁶⁾ In ähnlicher Weise ruft ein experimenteller intranasaler Influenza-Impfstoff mit mehreren Subtypen eine experimentelle schützende Immunität gegen Influenza-A-Virus-Subtypen hervor, die im Impfstoff selbst nicht enthalten sind.¹²⁷ Was sind die viralen und immunologischen Grundlagen dieser starken Kreuzschutzphänomene, und können sie mit mukosalen Atemwegs-Impfstoffen repliziert werden? Wie können wir Determinanten der Multi-Antigen-Verwandtschaft und -Komplexität identifizieren, die ausreichen, um Impfstoffe mit größerer Breite gegen unterschiedliche, aber verwandte Virustypen herzustellen?

Eine eng damit verbundene Frage ist, ob Impfstoffe, die nur Immunantworten gegen einzelne kritische Epitope hervorrufen, die über Virusstämme und Subtypen hinweg konserviert sind, oder gegen eine begrenzte Anzahl solcher Epitope, genauso gut wirken können wie Impfstoffe, die breite humorale und zellvermittelte Antworten gegen mehrere Epitope hervorrufen. Obwohl solche konservierten Epitope ideale Kandidaten zu sein scheinen, waren Impfstoffe, die auf diesem Ansatz basieren, bisher nicht besonders erfolgreich. Das konservierte gp120-Muster-Katinger-Epitop des HIV, das Influenza-M2-Protein und konservierte Stamm-Epitope des Influenzavirus galten alle als vielversprechende Kandidaten für Impfstoffe, haben jedoch in klinischen Studien noch keine starke schützende Immunität hervorgerufen, obwohl sich viele Kandidaten in der präklinischen oder nur in frühen klinischen Entwicklungsstadien befinden.^{128–133} Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die Immunantworten des Wirts komplex und miteinander verknüpft sind und dass die Herstellung von Impfstoffen mit breitem Schutz eine Herausforderung darstellt.

Impfwege, Dosierungen und Wiederholungsimpfungen müssen sorgfältig abgewogen werden, einschließlich Impfwegen, die die Entwicklung von B- und T-Zellen des mukosalen Immungedächtnisses sowie von IgA maximieren; die möglichen unterschiedlichen Vorteile der oberen

Atemwege, untere Atemwege und systemische Impfung^{44,76,134–141}; oder optimierte Kombinationen davon. Der Versuch, mukosale Atemwegsviren mit systemisch verabreichten, nicht replizierenden Impfstoffen zu bekämpfen, war bisher weitgehend erfolglos, was darauf hindeutet, dass neue Ansätze erforderlich sind. Kann beispielsweise in Zeiten einer signifikanten Virusverbreitung in der Bevölkerung durch wiederholte Dosierung oder durch sequenzielle mukosale und systemische Impfungen ein besserer Schutz erreicht werden? Ist eine häufige Auffrischungsimpfung eine praktikable Impfung, z. B. durch selbst verabreichte nasale Impfstoffe für zu Hause? Zu berücksichtigen sind auch mögliche ergänzende Funktionen für prophylaktische antivirale Medikamente, darunter „programmierbare antivirale Medikamente“, die auf konservierte Strukturen abzielen,⁽¹⁴²⁾ Antikörper, darunter therapeutisches IgA⁽¹⁴³⁾ und Stimulatoren der angeborenen Immunität als Ergänzung zu unvollkommenen Impfstoffen. Es bleibt abzuwarten, ob Impfungen und Prophylaxe auf Bevölkerungsebene wirksam kombiniert werden können.

Diese provokanten Fragen sollten alle berücksichtigt werden, wenn wir daran arbeiten, Impfstrategien zu optimieren. Ein interessanter Ansatz wäre, wie oben erwähnt, die Herstellung von Impfstoffen, die die angeborene Immunität stimulieren⁵⁰ und die sich ideal für „Hit-and-Run“-Infektionen durch mukosale Atemwegsviren eignen könnten, die typischerweise infizieren, sich lokal ausbreiten und auf andere übertragen werden, bevor adaptive Immunantworten, die sie kontrollieren können, aufgebaut werden können. Schließlich gibt es derzeit nur begrenzte Möglichkeiten für die Adjuvierung von Schleimhautimpfstoffen⁽⁸²⁾ (.).⁽¹⁴⁴⁾ Wenn Daten belegen, dass eine Adjuvierung von Schleimhautimpfstoffen erforderlich und möglich ist, müssen wir potenzielle Fallstricke bewerten, darunter mögliche Toxizität und Nebenwirkungen einer wiederholten hochdosierten Schleimhautimmunisierung/Adjuvierung, und wie diese am besten am Menschen untersucht werden kann.

GEIMPFTEN WIRTSORGANISMEN UND RISIKOGRUPPEN SIND VIELZÄHLIG UND HETEROGEN

Eine zentrale Herausforderung für Impfstoffe der nächsten Generation besteht darin, zu bestimmen, ob Einheitsimpfstoffe oder Impfstoffe, die auf bestimmte Risikogruppen zugeschnitten sind, sinnvoll sind. Es ist unvermeidlich, dass verschiedene Risikogruppen unterschiedliche Impfstoffe oder Impfstoffformulierungen benötigen. Beispielsweise wissen wir, dass RSV-Infektionen bei Kindern am besten durch humorale Immunität verhindert werden, bei älteren Menschen hingegen durch zellvermittelte Immunität.⁽¹³⁶⁾ Darüber hinaus benötigen Kinder möglicherweise andere Impfstoffdosen als junge Erwachsene, die wiederum andere Dosen benötigen als ältere Menschen mit einem eingeschränkten B-Zell- und insbesondere T-Zell-Repertoire für virale Antigene.⁽¹³⁶⁾

Es scheint in der Tat wahrscheinlich, dass Atemwegsimpfstoffe, die keine robuste zellvermittelte Immunität hervorrufen, für ältere Menschen suboptimal sind – aber auch, dass Impfstoffe, die stärkere zellvermittelte Reaktionen hervorrufen, das Risiko immunopathogener Effekte erhöhen könnten. Wenn dies der Fall ist, lassen sich dann optimale Kompromisse finden? Ältere Menschen sind die wichtigste Risikogruppe für die Impfprävention gegen Influenza, SARS-CoV-2, RSV und andere Atemwegsviren, da sie am ehesten schwere und tödliche Verläufe erleiden und am wenigsten auf Impfungen ansprechen – Faktoren, die eine erfolgreiche Impfung älterer Menschen zu einem Maßstab für andere Gruppen machen. Es wird auch wichtig sein, mehr über genetische Unterschiede zwischen Individuen in Bezug auf die Erkennung von viralen Antigenen in den Schleimhäuten, die Anfälligkeit für schwere Krankheitsverläufe und den Impfschutz zu erfahren, beispielsweise über Variationen in IFITM3⁽¹⁴⁵⁾ und anderen mit dem IFN-Signalweg assoziierten Genen, da viele Hinweise darauf hindeuten, dass schwere virale

Atemwegserkrankungen spiegeln häufig die genetische Anfälligkeit des Wirts wider (Faktoren).^{16,51,146,147}

GESUNDHEITSPOLITISCHE ÜBERLEGUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT ATEMWEGSIMPFSTOFFEN DER NÄCHSTEN GENERATION MÜSSEN IN DIE GESTALTUNG DES IMPFSTOFFDESIGNS EINFLIEßEN, EINSCHLIEßLICH IMPFPLAN, DIE ROLLE DER AUFFRISCHUNGsimpfung, DIE HÄUFIGKEIT DER IMPFUNG UND DIE DAUER/VOLLSTÄNDIGKEIT DES SCHUTZES, NEBENWIRKUNGEN UND DIE AKZEPTANZ IN DER ÖFFENTLICHKEIT

Sobald verbesserte Impfstoffe entwickelt sind, müssen die Impfstoffrezepturen und -pläne optimiert werden, um eine dauerhafte schützende Schleimhautimmunität zu erzielen, insbesondere bei multivalenten oder Auffrischungsimpfstoffen, bei denen die Antigen-Immundominanz und das Gleichgewicht zwischen humoralen und zellvermittelten Immunantworten komplex sein können.

Im Hinblick auf den Nutzen und die Akzeptanz im Bereich der öffentlichen Gesundheit wird es wichtig sein, die Rolle von hochdosierten oder häufig aufgefrischtem Impfstoffantigenen, gemischten sequenziellen Impfstoffen (z. B. Prime-Boost mit verschiedenen Impfstoffen) zu berücksichtigen und zu prüfen, ob diese Ansätze von Anbietern, Aufsichtsbehörden und der Öffentlichkeit akzeptiert werden. Die Beobachtung, dass wiederholte Expositionen von Säuglingen gegenüber RSV schwere Erkrankungen bei einer späteren Infektion reduzieren⁽¹⁴⁸⁾, in Verbindung mit experimentellen Daten legt nahe, dass der Zeitpunkt und die Häufigkeit von Atemwegsimpfungen wichtig sein können⁽¹⁹⁾. Tatsächlich geht eine aktuelle umstrittene Theorie davon aus, dass der entscheidende Faktor für den Impfschutz nicht das Immungedächtnis und die Immunantwort sind, sondern wiederholte Antigenexpositionen⁽¹⁴⁹⁾. Dieser Vorschlag scheint durch viele beobachtbare Phänomene widerlegt zu werden, steht aber gleichzeitig im Einklang mit der Beobachtung, dass die Aufrechterhaltung von Gedächtnis-T-Zellen in der Lunge mit wiederholter Antigenexposition verbunden ist⁽⁸²⁾. Aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Impfstoffkunde kann und sollte diese Frage experimentell untersucht werden. Sie veranlasst auch dazu, viele akzeptierte Ansätze zu überdenken, wie beispielsweise die einmalige jährliche Grippeimpfung zu Beginn der Grippesaison.

Wir müssen uns auch fragen, ob es andere Impfansätze gibt, die in Betracht gezogen werden sollten, wie beispielsweise sequenzielle saisonale Impfungen und ergänzende Schleimhautimpfstoffe zur Stimulierung einer spezifischen Immunität der oberen Atemwege oder einer unspezifischen angeborenen Immunität. Solche Ansätze könnten Prime-Boost-Ansätze umfassen, beispielsweise eine Kombination aus systemischer und Schleimhautimmunität, möglicherweise mit einer systemischen Grundimmunisierung, gefolgt von einer Auffrischungsimpfung durch intranasale Impfung oder umgekehrt.^{35,82,150} Über die intranasale Impfung hinaus müssen wir die Reaktionen auf Impfungen in anderen Bereichen des Atemwegsimmunsystems, wie z. B. die Impfung der Bindehaut mit Augentropfen¹¹⁷ und insbesondere die Aerosolimpfung gegen bestimmte Atemwegsviren, genauer untersuchen, wie dies in experimentellen Studien an Menschen und Tieren zu Influenza und anderen Atemwegsviren vorgeschlagen wurde.^{44,135}

SCHLUSSBEMERKUNGEN

Bislang ist es trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, Impfstoffe zu entwickeln, die einen dauerhaften Schutz gegen nicht-systemische mukosale Atemwegsviren mit hoher Mortalitätsrate bieten.

Die Herausforderungen bei der Entwicklung von Atemwegsimpfstoffen der nächsten Generation sind vielfältig und komplex (Tabelle 2). Wir müssen besser verstehen, warum multiple aufeinanderfolgende Schleimhautinfektionen mit demselben zirkulierenden

Atemwegsviren, die sich über Jahrzehnte hinweg ausbreiten, lösen keine natürliche schützende Immunität aus, insbesondere bei Viren ohne signifikante Antigendrift (z. B. RSV und Parainfluenzaviren) ^{17–19,22} wenn wir rationale Impfstoffe zu ihrer Vorbeugung entwickeln wollen. Wir müssen über den Tellerrand hinausblicken, um Impfstoffe der nächsten Generation zu entwickeln, die eine Immunabwehr gegen Viren hervorrufen, die in menschlichen Populationen überleben, weil sie sich weitgehend außerhalb der vollständigen Schutzreichweite der angeborenen und adaptiven Immunität des Menschen befinden.

Die bisherigen erfolglosen Versuche, einen soliden Schutz gegen mukosale Atemwegsviren zu erreichen und die von ihnen verursachten tödlichen Ausbrüche und Pandemien zu kontrollieren, waren ein wissenschaftliches und gesundheitspolitisches Versagen, das dringend angegangen werden muss. Wir sind begeistert und motiviert, dass viele Forscher und Kooperationsgruppen alle unsere bisherigen Annahmen und Ansätze zur Prävention wichtiger viraler Atemwegserkrankungen von Grund auf überdenken und daran arbeiten, mutige neue Wege für die Zukunft zu finden.

DANK

Diese Arbeit wurde durch das Intramural Research Program der NIH und NIAID unterstützt.

INTERESSENERKLÄRUNG

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

REFERENZEN

- CDC (2022). Schätzungen zur Wirksamkeit von Impfstoffen in vergangenen Saisons. <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/past-seasons-estimates.html>.
- Morens, D.M., und Fauci, A.S. (2020). Neu auftretende Pandemiekrankheiten: Wie es zu COVID-19 kam. *Cell* 182, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>.
- Graham, B.S., und Sullivan, N.J. (2018). Neu auftretende Viruserkrankungen aus Sicht der Impfstoffforschung: Vorbereitung auf die nächste Pandemie. *Nat. Immunol.* 19, 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0007-9>.
- Belongia, E.A., Simpson, M.D., King, J.P., Sundaram, M.E., Kelley, N.S., Osterholm, M.T., und McLean, H.Q. (2016). Variable Wirksamkeit von Influenza-Impfstoffen nach Subtyp: eine systematische Überprüfung und Metaanalyse von Studien mit testnegativem Design. *Lancet Infect. Dis.* 16, 942–951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8).
- Memoli, M.J., Han, A., Walters, K.A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Angela Rosas, L., Cervantes-Medina, A., Park, J.K., Morens, D.M., et al. (2020). Influenza-A-Reinfektion bei sequenzieller Infektion beim Menschen: Auswirkungen auf die schützende Immunität und die Entwicklung eines „universellen“ Impfstoffs. *Clin. Infect. Dis.* 70, 748–753. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz281>.
- Tricco, A.C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M.H., Tashkandi, M., Bauch, C.T., und Loeb, M. (2013). Vergleich der Wirksamkeit von Grippeimpfstoffen gegen nicht übereinstimmende und übereinstimmende Stämme: eine systematische Überprüfung und Metaanalyse. *BMC Med.* 11, 153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>.
- Langmuir, A.D., Henderson, D.A. und Serfling, R.E. (1964). Die epidemiologische Grundlage für die Bekämpfung der Influenza. *Am. J. Public Health Nations Health* 54, 563–571. <https://doi.org/10.2105/ajph.54.4.563>.
- Morens, D.M., und Taubenberger, J.K. (2019). Herstellung universeller Grippeimpfstoffe: Lehren aus der Pandemie von 1918. *J. Infect. Dis.* 219, S5–S13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy728>.
- Schmid, P., Rauber, D., Betsch, C., Lidolt, G. und Denker, M.L. (2017). Hindernisse für die Absicht und das Verhalten zur Grippeimpfung – Eine systematische Übersicht über die Zurückhaltung gegenüber Grippeimpfungen, 2005–2016. *PLoS One* 12, e0170550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170550>.
- Erbelding, E.J., Post, D.J., Stemmy, E.J., Roberts, P.C., Augustine, A.D., Ferguson, S., Paules, C.I., Graham, B.S. und Fauci, A.S. (2018). Eine universelle Sal-Influenza-Impfstoff: Der strategische Plan des Nationalen Instituts für Allergien und Infektionskrankheiten. *J. Infect. Dis.* 218, 347–354. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy103>.
- CIRDAP (2022). Der Fahrplan für Influenza-Impfstoffe: Überblick über die Technologie universeller Influenza-Impfstoffe. <https://ivr.cidrap.umn.edu/universal-influenza-vaccine-technology-landscape>.
- Golob, J.L., Lugogo, N., Luring, A.S. und Lok, A.S. (2021). SARS-CoV-2-Impfstoffe: ein Triumph der Wissenschaft und Zusammenarbeit. *JCI Insight* 6, e149187. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.149187>.
- Liu, M. und Li, Y. (2022). Fortschritte bei COVID-19-Impfstoffen und neuen Coronavirus-Varianten. *Front. Med.* 9, 888631. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.888631>.
- Sette, A., und Crotty, S. (2022). Immunologisches Gedächtnis für SARS-CoV-2-Infektionen und COVID-19-Impfstoffe. *Immunol. Rev.* 310, 27–46. <https://doi.org/10.1111/imr.13089>.
- Shrestha, L.B., Foster, C., Rawlinson, W., Tedla, N., und Bull, R.A. (2022). Evolution der SARS-CoV-2-Omikron-Varianten BA.1 bis BA.5: Auswirkungen auf die Immunflucht und Übertragung. *Rev. Med. Virol.* 32, e2381. <https://doi.org/10.1002/rmv.2381>.
- Bergeron, H.C. und Tripp, R.A. (2021). Immunopathologie von RSV: eine aktuelle aktualisierte Übersicht. *Viruses* 13, 2478. <https://doi.org/10.3390/v13122478>.
- Bueno, S.M., Gonz lez, P.A., Pacheco, R., Leiva, E.D., Cautivo, K.M., Tobar, H.E., Mora, J.E., Prado, C.E., Zú iga, J.P., Jiménez, J., et al. (2008). Host immunity during RSV pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1320–1329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.012>.
- Habibi, M.S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., DeVincenzo, J.P., de Haan, C.A., Wrammert, J., Openshaw, P.J., Chiu, C., et al. (2015). Beeinträchtigte Antikörper-vermittelte Schutzfunktion und defektes IgA-B-Zell-Gedächtnis bei experimenteller Infektion von Erwachsenen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1040–1049. <https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2256OC>.
- Lambert, L., Sagfors, A.M., Openshaw, P.J. und Culley, F.J. (2014). Immunität gegen RSV im frühen Lebensalter. *Front. Immunol.* 5, 466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00466>.
- Shadman, K.A. und Wald, E.R. (2011). Eine Übersicht über Palivizumab und neue Therapien für das Respiratorische Synzytial-Virus. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1455–1467. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.608062>.
- Shi, T., McAllister, D.A., O'Brien, K.L., Simoes, E.A.F., Madhi, S.A., Gessner, B.D., Polack, F.P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., et al. (2017). Globale, regionale und nationale Schätzungen zur Krankheitslast durch akute Infektionen der unteren Atemwege aufgrund des Respiratorischen Synzytial-Virus bei Kleinkindern im Jahr 2015: eine systematische Überprüfung und Modellstudie. *Lancet* 390, 946–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8).
- Callow, K.A., Parry, H.F., Sergeant, M. und Tyrrell, D.A. (1990). Der zeitliche Verlauf der Immunantwort auf eine experimentelle Coronavirus-Infektion beim Menschen. *Epidemiol. Infect.* 105, 435–446. <https://doi.org/10.1017/s0950268800048019>.
- Carden so Domingo, L., Roy Vallejo, E., Zurita Cruz, N.D., Chicot Llano, M., A valos Pe rez-Ur a, E., Barrios, A., Hern ndez Santos, J., Ortiz, J., Ro dr guez Garc a, S.C., Mart n Ram rez, A., et al. (2022). Relevante SARS-CoV-2-Virämie steht im Zusammenhang mit dem Schweregrad von COVID-19: prospektive Kohortenstudie und Validierungskohorte. *J. Med. Virol.* 94, 5260–5270. <https://doi.org/10.1002/jmv.27989>.
- Jacobs, J.L., und Mellors, J.W. (2021). Nachweis von RNA des schweren akuten respiratorischen Syndroms Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) im Blut von Patienten mit Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID-19): Was bedeutet das? *Clin. Infect. Dis.* 73, e2898–e2900. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1316>.
- Campbell, A.P., Jacob, S.T., Kuypers, J., Wald, A., Englund, J.A., Corey, L. und Boeckh, M. (2010). Atemversagen aufgrund der neuen Influenza A/H1N1 von 2009 bei einem Empfänger einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation: Nachweis von extrapulmonaler H1N1-RNA und Verwendung von intravenösem Peramivir. *Ann. Intern. Med.* 152, 619–620. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-9-201005040-00022>.
- Lee, N., Chan, P.K., Wong, C.K., Wong, K.T., Choi, K.W., Joynt, G.M., Lam, P., Chan, M.C., Wong, B.C., Lui, G.C., et al. (2011). Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalized for pandemic

- 2009 Influenza-A(H1N1)-Virus-Pneumonie. *Antivir. Ther.* 16, 237–247. <https://doi.org/10.3851/IMP1722>.
27. Yewdell, J.W. (2021). Individuen können sich nicht auf die Herdenimmunität gegen COVID-19 verlassen: Eine dauerhafte Immunität gegen Viruserkrankungen ist auf Viren mit obligater virämischer Ausbreitung beschränkt. *PLoS Pathog.* 17, e1009509. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009509>.
28. Holmes, E.C. (2003). Fehlergrenzen und die Einschränkungen der RNA-Virus-Evolution. *Trends Microbiol.* 11, 543–546. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.10.006>.
29. Fulton, B.O., Sachs, D., Beaty, S.M., Won, S.T., Lee, B., Palese, P. und Heaton, N.S. (2015). Die Mutationsanalyse des Masernvirus deutet auf Einschränkungen der antigenen Variation der Glykoproteine hin. *Cell Rep.* 11, 1331–1338. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.054>.
30. Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al. (2008). Auswahl von Influenza-Impfstoffstämmen und aktuelle Studien zur globalen Migration saisonaler Influenzaviren. *Vaccine* 26, D31–D34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.078>.
31. Taubenberger, J.K., und Kash, J.C. (2010). Influenzavirus-Evolution, Wirtsanpassung und Pandemieentstehung. *Cell Host Microbe* 7, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>.
32. Altman, M.O., Angel, M., Ko'si'k, I., Trova'o, N.S., Zost, S.J., Gibbs, J.S., Casalino, L., Amaro, R.E., Hensley, S.E., Nelson, M.I., und Yewdell, J.W. (2019). Die Glykanentwicklung des Hämagglutinin-Proteins des menschlichen Influenza-A-Virus folgt einem zeitlichen Muster bis zu einer Glykan-Grenze. *mBio* 10, e. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-19>.
33. van der Straten, K., Guerra, D., van Gils, M.J., Bontjer, I., Daniels, T.G., van Willigen, H.D.G., Wynberg, E., Poniman, M., Burger, J.A., Bouhuijs, J.H., et al. (2022). Antigen Kartografie unter Verwendung von Seren aus sequenzbestätigten Infektionen mit besorgniserregenden SARS-CoV-2-Varianten zeigt die antigene Divergenz von Omicron. *Immunity* 55, 1725–1731.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.07.018>.
34. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., und Fauci, A.S. (2022). Universelle Coronavirus-Impfstoffe – ein dringender Bedarf. *N. Engl. J. Med.* 386, 297–299. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2118468>.
35. Tang, J., Zeng, C., Cox, T.M., Li, C., Son, Y.M., Cheon, I.S., Wu, Y., Behl, S., Taylor, J.J., Chakarabarty, R., et al. (2022). Respiratorische Schleimhautimmunität gegen SARS-CoV-2 nach mRNA-Impfung. *Sci. Immunol.* 7, eadd4853. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4853>.
36. Do, L.A.H., Wilm, A., van Doorn, H.R., Lam, H.M., Sim, S., Sukumaran, R., Tran, A.T., Nguyen, B.H., Tran, T.T.L., Tran, Q.H., et al. (2015). Die direkte Tiefensequenzierung des gesamten Genoms des humanen Respiratorischen Synzytial-Virus A und B von vietnamesischen Kindern identifiziert unterschiedliche Muster der Inter- und Intra-Wirt-Evolution. *J. Gen. Virol.* 96, 3470–3483. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000298>.
37. Rios Guzman, E., und Hultquist, J.F. (2022). Klinische und biologische Folgen der genetischen Vielfalt des Respiratorischen Synzytial-Virus. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 9, 20499361221128091. <https://doi.org/10.1177/20499361221128091>.
38. Tan, L., Lemey, P., Houspie, L., Viveen, M.C., Jansen, N.J., van Loon, A.M., Wiertz, E., van Bleek, G.M., Martin, D.P., und Coenjaerts, F.E. (2012). Genetische Variabilität unter vollständigen Genomen des humanen Respiratorischen Synzytial-Virus der Untergruppe A: Überbrückung molekularer Evolutionsdynamik und Epidemiologie. *PLoS One* 7, e51439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051439>.
39. Bont, L., Versteegh, J., Swelsen, W.T., Heijnen, C.J., Kavelaars, A., Brus, F., Draaisma, J.M., Pekelharing-Berghuis, M., van Diemen-Steenvoorde, R.A. und Kimpen, J.L. (2002). Eine natürliche Reinfektion mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus stärkt die viruspezifische T-Zell-Immunität nicht. *Pediatr. Res.* 52, 363–367. <https://doi.org/10.1203/00006450-200209000-00009>.
40. Yang, K., und Varga, S.M. (2014). Schleimhautimpfstoffe gegen das Respiratorische Synzytial-Virus. *Curr. Opin. Virol.* 6, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.009>.
41. Newton, A.H., Cardani, A., und Braciale, T.J. (2016). Die Immunantwort des Wirts bei Infektionen mit Atemwegsviren: Gleichgewicht zwischen Virusclearance und Immunpathologie. *Semin. Immunopathol.* 38, 471–482. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>.
42. Medzhitov, R., Schneider, D.S., und Soares, M.P. (2012). Krankheitstoleranz als Abwehrstrategie. *Science* 335, 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>.
43. Iwasaki, A., Foxman, E.F. und Molony, R.D. (2017). Frühe lokale Immunabwehr im Atemtrakt. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>.
44. Low, N., Bavdekar, A., Jeyaseelan, L., Hirve, S., Ramanathan, K., Andrews, N.J., Shaikh, N., Jodi, R.S., Rajagopal, A., Brown, K.E., et al. (2015). Eine randomisierte, kontrollierte Studie zu einem aerosolisierten Impfstoff gegen Masern. *N. Engl. J. Med.* 372, 1519–1529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407417>.
45. James, K.R., Elmentaite, R., Teichmann, S.A., und Hold, G.L. (2022). Neudefinition der Darmimmunität mit Einzelzell-Transkriptomik. *Mucosal Im-munol.* 15, 531–541. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00470-y>.
46. Bekkering, S., Domínguez-André, s, J., Joosten, L.A.B., Riksen, N.P. und Netea, M.G. (2021). Trainierte Immunität: Neuprogrammierung der angeborenen Immunität bei Gesundheit und Krankheit. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>.
47. Netea, M.G., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Domínguez-André, s, J., Cur-tis, N., van Crevel, R., van de Veerdonk, F.L., und Bonten, M. (2020). Trainierte Immunität: ein Instrument zur Verringerung der Anfälligkeit für und der Schwere von SARS-CoV-2-Infektionen. *Cell* 181, 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>.
48. Netea, M.G., Quintin, J. und van der Meer, J.W. (2011). Trainierte Immunität: ein Gedächtnis für die angeborene Abwehr des Wirts. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
49. Randall, T.D., und Mebius, R.E. (2014). Die Entwicklung und Funktion von mukosalen lymphatischen Geweben: ein Balanceakt mit Mikroorganismen. *Mucosal Immunol.* 7, 455–466. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.11>.
50. Xing, Z., Afkhami, S., Bavanthasivam, J., Fritz, D.K., D'Agostino, M.R., Vaseghi-Shanjani, M., Yao, Y., und Jeyanathan, M. (2020). Angeborenes Immungedächtnis von gewebsresidenten Makrophagen und trainierte angeborene Immunität: Überarbeitung des Impfstoffkonzepts und der Strategien. *J. Leukoc. Biol.* 108, 825–834. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0220-446R>.
51. Denney, L., und Ho, L.P. (2018). Die Rolle des Atemwegsepithels bei der Abwehr von Influenzavirusinfektionen durch den Wirt. *Biomed J.* 41, 218–233. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.004>.
52. Zimmermann, P., und Curtis, N. (2019). Faktoren, die die Immunantwort auf Impfungen beeinflussen. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00084–e00018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
53. Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S. und Iwasaki, A. (2011). Die Mikrobiota reguliert die Immunabwehr gegen Infektionen der Atemwege mit dem Influenza-A-Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5354–5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>.
54. Hagan, T., Cortese, M., Roupael, N., Boudreau, C., Linde, C., Maddur, M.S., Das, J., Wang, H., Guthmiller, J., Zheng, N.Y. et al. (2019). Antibiotika-bedingte Störungen des Darmmikrobioms verändern die Immunität gegenüber Impfstoffen beim Menschen. *Cell* 178, 1313–1328.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.010>.
55. Oh, J.Z., Ravindran, R., Chassaing, B., Carvalho, F.A., Maddur, M.S., Bower, M., Hakimpour, P., Gill, K.P., Nakaya, H.I., Yarovinsky, F., et al. (2014). Die TLR5-vermittelte Erkennung der Darmmikrobiota ist für die Antikörperreaktionen auf saisonale Grippeimpfungen notwendig. *Immunity* 41, 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.009>.
56. Bradley, K.C., Finsterbusch, K., Schnepf, D., Crotta, S., Llorian, M., Da-vidson, S., Fuchs, S.Y., Staeheli, P., und Wack, A. (2019). Mikrobiota-gesteuerte tonische Interferonsignale in Lungenstromazellen schützen vor Influenzavirusinfektionen. *Cell Rep.* 28, 245–256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.105>.
57. Crane, M.J., Lee, K.M., FitzGerald, E.S. und Jamieson, A.M. (2018). Überleben tödlicher Lungeninfektionen: angeborene Toleranzmechanismen des Wirts im Lungensystem. *Front. Immunol.* 9, 1421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01421>.
58. Gould, V.M.W., Francis, J.N., Anderson, K.J., Georges, B., Cope, A.V. und Tregoning, J.S. (2017). Nasales IgA bietet Schutz vor humanen

- Influenza-Exposition bei Freiwilligen mit niedrigem Influenza-Antikörpertiter im Serum. *Front. Microbiol.* 8, 900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00900>.
59. Hansen, I.S., Baeten, D.L.P. und den Dunnen, J. (2019). Die Entzündungsfunktion von humanem IgA. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2976-8>.
 60. Holtzman, M.J., Byers, D.E., Alexander-Brett, J. und Wang, X. (2014). Die Rolle von Atemwegsepithelzellen und angeborenen Immunzellen bei chronischen Atemwegserkrankungen. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nri3739>.
 61. Lamichhane, A., Azegamia, T. und Kiyono, H. (2014). Das mukosale Immunsystem für die Impfstoffentwicklung. *Vaccine* 32, 6711–6723. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.089>.
 62. Whitsett, J.A. und Alenghat, T. (2015). Respiratorische Epithelzellen koordinieren die angeborene Immunität der Lunge. *Nat. Immunol.* 16, 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.
 63. Zimmermann, P., und Curtis, N. (2018). Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Impfstoffreaktionen. *Vaccine* 36, 4433–4439. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.066>.
 64. Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claeÿ, L., Quentric, P., Fadallah, J., Devillers, H., Ghilani, P., et al. (2021). IgA dominiert die frühe neutralisierende Antikörperreaktion auf SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd2223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>.
 65. Taylor, H.P., und Dimmock, N.J. (1985). Der Mechanismus der Neutralisierung des Influenzavirus durch sekretorisches IgA unterscheidet sich von dem des monomeren IgA oder IgG. *J. Exp. Med.* 161, 198–209. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.198>.
 66. Corthe' sy, B. (2013). Vielfältige Funktionen von sekretorischem IgA an Schleimhautoberflächen. *Front. Immunol.* 4, 185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>.
 67. Ben Mkaddem, S., Rossato, E., Heming, N. und Monteiro, R.C. (2013). Entzündungshemmende Rolle des IgA-Fc-Rezeptors (CD89): von Autoimmunität zu therapeutischen Perspektiven. *Autoimmun. Rev.* 12, 666–669. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.011>.
 68. Callow, K.A. (1985). Wirkung spezifischer humoraler Immunität und einiger unspezifischer Faktoren auf die Resistenz von Freiwilligen gegenüber respiratorischen Coronavirus-Infektionen. *J. Hyg.* 95, 173–189. <https://doi.org/10.1017/S0022172400062410>.
 69. Favre, L., Spertini, F. und Corthe' sy, B. (2005). Sekretorisches IgA besitzt intrinsische modulatorische Eigenschaften, die die mukosale und systemische Immunantwort stimulieren. *J. Immunol.* 175, 2793–2800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2793>.
 70. Rose, M.A. (2014). Mucosal immunization in perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 2115–2117. <https://doi.org/10.4161/hv.29609>.
 71. Suzuki, T., Aina, A. und Hasegawa, H. (2017). Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von sekretorischen IgA-Antikörpern, die durch mukosale Impfstoffe gegen das Influenzavirus hervorgerufen werden. *Vaccine* 35, 5297–5302. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.093>.
 72. Wiseman, D.J., Thwaites, R.S., Drysdale, S.B., Janet, S., Donaldson, G.C., Wedzicha, J.A. und Openshaw, P.J.; RESCEU Investigators (2020). Immunologische und entzündliche Biomarker für Anfälligkeit und Schweregrad bei Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus bei Erwachsenen. *J. Infect. Dis.* 222, S584–S591. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa063>.
 73. Russell, C.D., Unger, S.A., Walton, M. und Schwarze, J. (2017). Die menschliche Immunantwort auf Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 481–502. <https://doi.org/10.1128/CMR.00090-16>.
 74. Takamatsu, Y., Omata, K., Shimizu, Y., Kinoshita-Iwamoto, N., Terada, M., Suzuki, T., Morioka, S., Uemura, Y., Ohmagari, N., Maeda, K. und Mitsuya, H. (2022). Die SARS-CoV-2-neutralisierende humorale IgA-Reaktion tritt früher auf, ist jedoch moderat und lässt schneller nach als die IgG-Reaktion. *Microbiol. Spectr.* e0271622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02716-22>.
 75. Ameratunga, R., Leung, E., Woon, S.T., Lea, E., Allan, C., Chan, L., Steele, R., Lehnert, K. und Longhurst, H. (2022). Selektiver IgA-Mangel könnte ein unterschätzter Risikofaktor für einen schweren COVID-19-Verlauf sein. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.10.002>.
 76. Li, M., Wang, Y., Sun, Y., Cui, H., Zhu, S.J. und Qiu, H.J. (2020). Schleimhautimpfstoffe: Strategien und Herausforderungen. *Immunol. Lett.* 217, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.013>.
 77. Irving, A.T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D.E. und Wang, L.F. (2021). Lehren aus den Abwehrmechanismen von Fledermäusen, einem einzigartigen Virusreservoir. *Nature* 589, 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>.
 78. Arneth, B. (2021). Trainierte angeborene Immunität. *Immunol. Res.* 69, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09170-y>.
 79. Smith, C.B., Purcell, R.H., Bellanti, J.A. und Chanock, R.M. (1966). Schutzwirkung von Antikörpern gegen das Parainfluenza-Virus Typ 1. *N. Engl. J. Med.* 275, 1145–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJM196611242752101>.
 80. Plotkin, S.A. (2020). Aktuelles zu immunologischen Korrelaten der durch Impfstoffe induzierten Schutzwirkung. *Vaccine* 38, 2250–2257. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.046>.
 81. Russell, M.W., Moldoveanu, Z., Ogra, P.L. und Mestecky, J. (2020). Schleimhautimmunität bei COVID-19: Ein vernachlässigter, aber entscheidender Aspekt der SARS-CoV-2-Infektion. *Front. Immunol.* 11, 611337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611337>.
 82. Lavelle, E.C. und Ward, R.W. (2022). Schleimhautimpfstoffe – Stärkung der Abwehrkräfte. *Nat. Rev. Immunol.* 22, 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>.
 83. Schenkel, J.M. und Masopust, D. (2014). Gewebsresidente Gedächtnis-T-Zellen. *Immunity* 41, 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>.
 84. Allie, S.R., und Randall, T.D. (2017). Pulmonale Immunität gegen Viren. *Clin. Sci. (Lond.)* 131, 1737–1762. <https://doi.org/10.1042/CS20160259>.
 85. Seong, Y., Lazarus, N.H., Sutherland, L., Habtezion, A., Abramson, T., He, X.S., Greenberg, H.B. und Butcher, E.C. (2017). Trafficking-Rezeptor-Signaturen definieren Blutplasmablasten, die auf gewebspezifische Immunreaktionen reagieren. *JCI Insight* 2, e90233. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90233>.
 86. Turner, D.L., Bickham, K.L., Thome, J.J., Kim, C.Y., D'Ovidio, F., Wherry, E.J. und Farber, D.L. (2014). Lungen-Nischen für die Bildung und Aufrechterhaltung von gewebsresidenten Gedächtnis-T-Zellen. *Mucosal Immunol.* 7, 501–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.67>.
 87. Sheikh-Mohamed, S., Sanders, E.C., Gommerman, J.L. und Tal, M.C. (2022). Wächter der Mund- und Nasen-Rachen-Galaxie: IgA und Schutz vor SARS-CoV-2-Infektionen. *Immunol. Rev.* 309, 75–85. <https://doi.org/10.1111/immr.13118>.
 88. Primorac, D., Vrdoljak, K., Brlek, P., Pavelić, E., Molnar, V., Matić, V., Erceg Ivko, I. und Parčina, M. (2022). Adaptive Immunantworten und Immunität gegen SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* 13, 848582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848582>.
 89. Mouro, V., und Fischer, A. (2022). Umgang mit einer viralen Pandemie der Schleimhäute: Lehren aus COVID-19-Impfstoffen. *Mucosal Immunol.* 15, 584–594. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00517-8>.
 90. Hennings, V., Thø m, K., Albinsson, S., Lingblom, C., Andersson, K., Andersson, C., Jærbur, K., Pullerits, R., Idom, M., Paludan, S.R., et al. (2022). Das Vorhandensein von Serum-Anti-SARS-CoV-2-IgA scheint Mitarbeiter im primären Gesundheitswesen vor COVID-19 zu schützen. *Eur. J. Immunol.* 52, 800–809. <https://doi.org/10.1002/eji.202149655>.
 91. Luke, T.C., Kilbane, E.M., Jackson, J.L. und Hoffman, S.L. (2006). Meta-Analyse: Rekonvaleszenz-Blutprodukte bei spanischer Grippe-Pneumonie: eine zukünftige H5N1-Behandlung? *Ann. Intern. Med.* 145, 599–609. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139>.
 92. Smorodintzev, A.A., Gulamow, A.G. und Tschalkina, O.M. (1940). Über die spezifische Prophylaxe der epidemischen Grippe durch Inhalation antigrippösen Serums. *Z. Klin. Med.* 138, 687–806.
 93. Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Neutralisierende Antikörper aus den B-Zellen von Überlebenden der Influenza-Pandemie von 1918. *Nature* 455, 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature07231>.

94. Englund, J.A. (1994). Passiver Schutz gegen respiratorische Synzytialvirus-Erkrankungen bei Säuglingen: die Rolle mütterlicher Antikörper. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, 449–453. <https://doi.org/10.1097/00006454-199405000-00037>.
95. Renegar, K.B., Small, P.A., Jr., Boykins, L.G. und Wright, P.F. (2004). Die Rolle von IgA gegenüber IgG bei der Bekämpfung von Influenza-Virusinfektionen in den Atemwegen von Mäusen. *J. Immunol.* 173, 1978–1986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1978>.
96. Morens, D.M., Taubenberger, J.K. und Fauci, A.S. (2008). Vorrangige Rolle der bakteriellen Lungenentzündung als Todesursache bei einer Influenza-Pandemie: Implikationen für die Vorbereitung auf eine Influenza-Pandemie. *J. Infect. Dis.* 198, 962–970. <https://doi.org/10.1086/591708>.
97. Rowe, H.M., Livingston, B., Margolis, E., Davis, A., Meliopoulos, V.A., Echlin, H., Schultz-Cherry, S. und Rosch, J.W. (2020). Atemwegsbakterien stabilisieren und fördern die Übertragung des Influenza-A-Virus über die Luft. *mSystems* 5, e00762–e00720. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00762-20>.
98. Morens, D.M., und Taubenberger, J.K. (2015). Eine vergessene Epidemie, die die Medizin veränderte: Masern in der US-Armee, 1917–18. *Lancet Infect. Dis.* 15, 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00109-7).
99. Szabo, P.A., Miron, M., und Farber, D.L. (2019). Lage, Lage, Lage: Gewebsresidente Gedächtnis-T-Zellen bei Mäusen und Menschen. *Sci. Immunol.* 4, eaas9673. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>.
100. Gray, J.I. und Farber, D.L. (2022). Gewebsresidente Immunzellen beim Menschen. *Annu. Rev. Immunol.* 40, 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-112809>.
101. Krammer, F. (2021). Korrelate des Schutzes vor einer SARS-CoV-2-Infektion. *Lancet* 397, 1421–1423. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00782-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00782-0).
102. Hall, V., Foulkes, S., Insalata, F., Saei, A., Kirwan, P., Atti, A., Wellington, E., Khawam, J., Munro, K., Cole, M., et al. (2021). Wirksamkeit und Dauerhaftigkeit des Schutzes vor einer zukünftigen SARS-CoV-2-Infektion durch COVID-19-Impfung und frühere Infektion; Ergebnisse der prospektiven SIREN-Kohortenstudie des Vereinigten Königreichs mit Beschäftigten im Gesundheitswesen von März 2020 bis September 2021. Vorabdruck bei medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.21267006>.
103. Brown, T.A., Murphy, B.R., Radl, J., Haaijman, J.J. und Mestecky, J. (1985). Subklassenverteilung und molekulare Form von Immunglobulin-A-Hämagglutinin-Antikörpern in Seren und Nasensekreten nach experimenteller Sekundärinfektion mit dem Influenza-A-Virus beim Menschen. *J. Clin. Microbiol.* 22, 259–264. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.2.259-264.1985>.
104. Dolin, R., Richman, D.D., Murphy, B.R. und Fauci, A.S. (1977). Zellvermittelte Immunantworten beim Menschen nach induzierter Infektion mit dem Influenza-A-Virus. *J. Infect. Dis.* 135, 714–719. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.5.714>.
105. Ng, S., Nachbagauer, R., Balmaseda, A., Stadlbauer, D., Ojeda, S., Patel, M., Rajabathor, A., Lopez, R., Guglia, A.F., Sanchez, N., et al. (2019). Neue Korrelate zum Schutz vor einer Infektion mit dem pandemischen H1N1-Influenza-A-Virus. *Nat. Med.* 25, 962–967. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0463-x>.
106. Hayward, A.C., Wang, L., Goonetilleke, N., Fragaszy, E.B., Bermingham, A., Copas, A., Dukes, O., Millett, E.R., Nazareth, I., Nguyen-Van-Tam, J.S., et al. (2015). Natürlicher T-Zell-vermittelter Schutz gegen saisonale und pandemische Influenza. Ergebnisse der Flu Watch-Kohortenstudie. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1422–1431. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-1988OC>.
107. Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., Bean, T., Barclay, W., Deeks, J.J. und Lalvani, A. (2013). Zelluläre Immunkorrelate des Schutzes vor symptomatischer pandemischer Influenza. *Nat. Med.* 19, 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>.
108. Wright, P.F., Hoen, A.G., Ilyushina, N.A., Brown, E.P., Ackerman, M.E., Wieland-Alter, W., Connor, R.I., Jegaskanda, S., Rosenberg-Hasson, Y., Haynes, B.C., et al. (2016). Korrelate der Immunität gegen Influenza, bestimmt durch die Exposition von Kindern mit einem lebenden, attenuierten Influenza-Impfstoff. *Open Forum Infect. Dis.* 3, ofw108. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw108>.
109. Kosik, I., Angeletti, D., Gibbs, J.S., Angel, M., Takeda, K., Kosikova, M., Nair, V., Hickman, H.D., Xie, H., Brooke, C.B. und Yewdell, J.W. (2019). Die Hemmung der Neuraminidase trägt zur Neutralisierung des Influenza-A-Virus durch Anti-Hämagglutinin-Stamm-Antikörpern. *J. Exp. Med.* 216, 304–316. <https://doi.org/10.1084/jem.20181624>.
110. Memoli, M.J., Shaw, P.A., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Fargis, S., Risos, K., Powers, J.H., et al. (2016). Bewertung von Anti-Hämagglutinin- und Anti-Neuraminidase-Antikörpern als Korrelate des Schutzes in einem gesunden menschlichen Challenge-Modell mit dem Influenza-A/H1N1-Virus. *mBio* 7, e00417–e00416. <https://doi.org/10.1128/mBio.00417-16>.
111. Park, J.K., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Ro-sas, L.A., Cervantes-Medina, A., Taubenberger, J.K. und Memoli, M.J. (2018). Bewertung von bereits vorhandenen Anti-Hämagglutinin-Stiel-Antikörpern als Korrelat für den Schutz bei einer Infektion gesunder Freiwilliger mit dem Influenza-A/H1N1pdm-Virus. *mBio* 9, e02284–e02217. <https://doi.org/10.1128/mBio.02284-17>.
112. Eichelberger, M.C., Morens, D.M. und Taubenberger, J.K. (2018). Neuraminidase als Influenza-Impfstoffantigen: eine leicht zu erreichende Möglichkeit zur Verbesserung der Impfstoffwirksamkeit. *Curr. Opin. Immunol.* 53, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025>.
113. Cox, R.J., Brokstad, K.A. und Ogra, P. (2004). Influenzavirus: Immunität und Impfstrategien. Vergleich der Immunantwort auf inaktivierte und lebende, attenuierte Influenza-Impfstoffe. *Scand. J. Immunol.* 59, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01382.x>.
114. Alcendor, D.J., Matthews-Juarez, P., Smoot, D., Hildreth, J.E.K., Lamar, K., Tabatabai, M., Wilus, D. und Juarez, P.D. (2022). Durchbruchinfektionen mit COVID-19 in den USA: Auswirkungen auf die Verlängerung der Pandemie. *Vaccines* 10, 755. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050755>.
115. Demicheli, V., Jefferson, T., Di Pietrantonj, C., Ferroni, E., Thorning, S., Thomas, R.E. und Rivetti, A. (2018). Impfstoffe zur Vorbeugung von Influenza bei älteren Menschen. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD004876. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004876.pub4>.
116. Vardeny, O., Kim, K., Udell, J.A., Joseph, J., Desai, A.S., Farkouh, M.E., Hegde, S.M., Hernandez, A.F., McGeer, A., Talbot, H.K., et al. (2021). Wirkung einer hochdosierten trivalenten Impfung im Vergleich zu einer standarddosierten quadrivalenten Grippeimpfung auf die Mortalität oder kardiopulmonale Hospitalisierung bei Patienten mit hochriskanten Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Eine randomisierte klinische Studie. *JAMA* 325, 39–49. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.23649>.
117. Lee, J.S., Yoon, S., Han, S.J., Kim, E.D., Kim, J., Shin, H.S. und Seo, K.Y. (2022). Impfung mit Augentropfen: ein vielversprechender Impfweg für wirksame Reaktionen auf Pandemien. *Expert Rev. Vaccines* 21, 91–101. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2008246>.
118. Calzas, C. und Chevalier, C. (2019). Innovative mukosale Impfstoffformulierungen gegen Influenza-A-Virusinfektionen. *Front. Immunol.* 10, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01605>.
119. Hodgins, B., Pillet, S., Landry, N., und Ward, B.J. (2019). Prime-Pull-Impfung mit einem pflanzlichen virusähnlichen Partikel-Influenza-Impfstoff löst eine breite Immunantwort aus und schützt ältere Mäuse nach einer Infektion vor Tod und Gebrechlichkeit. *Immun. Ageing* 16, 27. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0167-6>.
120. Chung, H., Kim, E.A. und Chang, J. (2021). Eine „Prime-and-Deploy“-Strategie für einen universellen Influenza-Impfstoff, der auf Nukleoproteine abzielt, induziert in der Lunge ansässige CD8-Gedächtnis-T-Zellen. *Immune Netw.* 21, e28. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e28>.
121. Gary, E.N., Tursi, N.J., Warner, B., Parzych, E.M., Ali, A.R., FRASE, D., Moffat, E., Embury-Hyatt, C., Smith, T.R.F., Broderick, K.E., et al. (2022). Mukosales Chemokin-Adjuvans verstärkt die durch synDNA-Impfstoffe vermittelten Reaktionen auf SARS-CoV-2 und bietet in vivo heterologen Schutz. *Cell. Reprod. Med.* 3, 100693. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100693>.
122. Bernstein, D.I., Cardin, R.D., Bravo, F.J., Awasthi, S., Lu, P., Pullum, D.A., Dixon, D.A., Iwasaki, A., und Friedman, H.M. (2019). Erfolgreiche Anwendung der Prime-and-Pull-Strategie für einen therapeutischen HSV-Impfstoff. *npj Vaccines* 4, 33. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0129-1>.
123. Poehling, K.A., Caspard, H., Peters, T.R., Belongia, E.A., Congeni, B., Gaglani, M., Griffin, M.R., Irving, S.A., Kavathekar, P.K., McLean, H.Q., et al. (2018). Wirksamkeit von attenuierten Lebendimpfstoffen und inaktivierten Influenza-Impfstoffen bei Kindern in den Vereinigten Staaten im Zeitraum 2015–2016. *Clin. Infect. Dis.* 66, 665–672. <https://doi.org/10.1093/cid/cix869>.

124. Isakova-Sivak, I., Matyushenko, V., Kotomina, T., Kiseleva, I., Krutikova, E., Donina, S., Rekestin, A., Larionova, N., Mezhenkaya, D., Sivak, K., et al. (2019). Sequentielle Immunisierung mit universellen attenuierten Influenza-Impfstoffkandidaten schützt Frettchen vor einer hohen Dosis heterologer Viren. *Vaccines* 7, 61. Basel. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030061>.
125. Angeletti, D., Kosik, I., Santos, J.J.S., Yewdell, W.T., Boudreau, C.M., Mallajosyula, V.V.A., Mankowski, M.C., Chambers, M., Prabhakaran, M., Hickman, H.D., et al. (2019). Umgehung der Immundominanz zur Bekämpfung subdominanter, breit neutralisierender Epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 13474–13479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816300116>.
126. Price, W.H., und Thind, I.S. (1972). Der Mechanismus der Kreuzschutzwirkung des Dengue-Virus gegen das West-Nil-Virus bei Hamstern. *J. Hyg.* 70, 611–617. Lond. <https://doi.org/10.1017/s0022172400022476>.
127. Park, J., Fong Legaspi, S.L., Schwartzman, L.M., Gygli, S.M., Sheng, Z.M., Freeman, A.D., Matthews, L.M., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Batchenko, N.A., et al. (2022). Ein inaktivierter multivalenter Influenza-A-Virus-Impfstoff bietet einen breiten Schutz bei Mäusen und Frettchen. *Sci. Transl. Med.* 14, eabo2167. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo2167>.
128. Folschweiller, N., Vanden Abeele, C., Chu, L., Van Damme, P., Garci'a-Sastre, A., Krammer, F., Nachbagauer, R., Palese, P., Solo' rzano, A., Bi, D., et al. (2022). Reaktogenität, Sicherheit und Immunogenität von chimären Hämagglutinin-Influenza-Split-Virion-Impfstoffen, adjuviert mit AS01 oder AS03 oder nicht adjuviert: eine randomisierte kontrollierte Phase-1–2-Studie. *Lancet Infect. Dis.* 22, 1062–1075. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00024-X).
129. Darricar' re, N., Qiu, Y., Kanekiyo, M., Creanga, A., Gillespie, R.A., Moin, S.M., Saleh, J., Sancho, J., Chou, T.H., Zhou, Y., et al. (2021). Breite Neutralisierung von H1- und H3-Viren durch adjuvierte Influenza-HA-Stamm-Impfstoffe bei nichtmenschlichen Primaten. *Sci. Transl. Med.* 13, eabe5449. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe5449>.
130. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P. und Kattinger, H. (1996). Der humane monoklonale Antikörper 2G12 definiert ein charakteristisches Neutralisationsepitop auf dem gp120-Glykoprotein des humanen Immundefizienzvirus Typ 1. *J. Virol.* 70, 1100–1108. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.1100-1108.1996>.
131. Saelens, X. (2019). Die Rolle der Ektodomäne des Matrixproteins 2 bei der Entwicklung universeller Influenza-Impfstoffe. *J. Infect. Dis.* 219, S68–S74. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz003>.
132. Han, A., Czajkowski, L., Rosas, L.A., Cervantes-Medina, A., Xiao, Y., Gouzoulis, M., Lombard, K., Hunsberger, S., Reed, S., Athota, R., et al. (2021). Sicherheit und Wirksamkeit von CR6261 in einem Influenza-A-H1N1-Challenge-Modell an gesunden Menschen. *Clin. Infect. Dis.* 73, e4260–e4268. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1725>.
133. Park, J.K., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Rosas, L.A., Fong, S., Matthews, A.M., Freeman, A.D., Gouzoulis, M.A., Batchenko, N.A., Yang, X., et al. (2020). Eine bereits vorhandene Immunität gegen das Hämagglutinin-Stielprotein des Influenzavirus könnte in einem Human-Challenge-Modell die Selektion von Antikörper-escape-Mutanten begünstigen. *Nat. Med.* 26, 1240–1246. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0937-x>.
134. Tungatt, K., Dolton, G., Morgan, S.B., Attaf, M., Fuller, A., Whalley, T., Hemmink, J.D., Porter, E., Szomolay, B., Montoya, M., et al. (2018). Induktion von Influenza-spezifischen lokalen CD8-T-Zellen in den Atemwegen nach Aerosolverabreichung von Impfstoffantigen oder Virus bei Babraham-Inzucht-Schweinen. *PLoS Pathog.* 14, e1007017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007017>.
135. Morgan, S.B., Hemmink, J.D., Porter, E., Harley, R., Shelton, H., Aramouni, M., Everett, H.E., Brookes, S.M., Bailey, M., Townsend, A.M., et al. (2016). Die Verabreichung eines universellen Influenza-Impfstoffkandidaten über Aerosol reduziert die Viruslast bei Schweinen, die mit dem pandemischen H1N1-Virus infiziert wurden. *J. Immunol.* 196, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502632>.
136. Henry, C., Zheng, N.Y., Huang, M., Cabanov, A., Rojas, K.T., Kaur, K., Andrews, S.F., Palm, A.E., Chen, Y.Q., Li, Y., et al. (2019). Die Influenza-Virus-Impfung löst bei älteren Menschen schlecht angepasste B-Zell-Reaktionen aus. *Cell Host Microbe* 25, 357–366.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.002>.
137. King, R.G., Silva-Sanchez, A., Peel, J.N., Botta, D., Meza-Perez, S., Allie, R., Schultz, M.D., Liu, M., Bradley, J.E., Qiu, S., et al. (2020). Die intranasale Verabreichung einer Einzeldosis AdCOVID löst bei Mäusen eine systemische und mukosale Immunität gegen SARS-CoV-2 aus. <https://doi.org/10.1101/2020.10.10.331348>.
138. Krishnaswamy, J.K., Gowthaman, U., Zhang, B., Mattsson, J., Szeponik, L., Liu, D., Wu, R., White, T., Calabro, S., Xu, L., et al. (2017). Migrierende CD11b(+) konventionelle dendritische Zellen induzieren T-Follikelhelferzell-abhängige Antikörperreaktionen. *Sci. Immunol.* 2, eaam9169. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9169>.
139. Lund, F.E., und Randall, T.D. (2021). Der Duft eines Impfstoffs. *Science* 373, 397–399. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>.
140. van Doremalen, N., Purushotham, J.N., Schulz, J.E., Holbrook, M.G., Bushmaker, T., Carmody, A., Port, J.R., Yinda, C.K., Okumura, A., Satur-day, G., et al. (2021). Die intranasale Impfung mit ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 reduziert die Virusausscheidung nach SARS-CoV-2 D614G-Exposition in präklinischen Modellen. *Sci. Transl. Med.* 13, eabh0755. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abh0755>.
141. Ye, Z.W., Ong, C.P., Tang, K., Fan, Y., Luo, C., Zhou, R., Luo, P., Cheng, Y., Gray, V.S., Wang, P., et al. (2022). Die intranasale Verabreichung einer Einzeldosis eines Kandidaten für einen attenuierten Lebendimpfstoff, der aus einem NSP16-defizienten SARS-CoV-2-Stamm gewonnen wurde, verleiht Tieren eine sterilisierende Immunität. *Cell. Mol. Immunol.* 19, 588–601. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00855-4>.
142. Hagey, R.J., Elazar, M., Pham, E.A., Tian, S., Ben-Avi, L., Bernardin-Souibgui, C., Yee, M.F., Moreira, F.R., Rabinovitch, M.V., Meganck, R.M., et al. (2022). Programmierbare antivirale Mittel, die auf kritische konservierte sekundäre Strukturen der viralen RNA des Influenza-A-Virus und SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 28, 1944–1955. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01908-x>.
143. Sterlin, D., und Gorochoy, G. (2021). Wann therapeutische IgA-Antikörper ausgereift sein könnten. *Pharmacology* 106, 9–19. <https://doi.org/10.1159/000510251>.
144. van Splunter, M., van Hoffen, E., Floris-Vollenbroek, E.G., Timmerman, H., de Bos, E.L., Meijer, B., Ulfman, L.H., Witteman, B., Wells, J.M., Brugman, S., et al. (2018). Orale Cholera-Impfung fördert die Ansiedlung von IgA(+)-Gedächtnis-B-Zellen im Dickdarm und in den Atemwegen. *Mucosal Immunol.* 11, 1254–1264. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0006-7>.
145. Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., et al. (2012). IFITM3 begrenzt die Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit Influenza. *Nature* 484, 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature10921>.
146. D'Agnillo, F., Walters, K.A., Xiao, Y., Sheng, Z.M., Scherler, K., Park, J., Gygli, S., Rosas, L.A., Sadtler, K., Kalish, H., et al. (2021). Lungeneithel- und Endothelschäden, Verlust der Gewebereparatur, Hemmung der Fibrinolyse und zelluläre Seneszenz bei tödlichem COVID-19. *Sci. Transl. Med.* 13, eabj7790. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7790>.
147. Ziegler, C.G.K., Miao, V.N., Owings, A.H., Navia, A.W., Tang, Y., Bromley, J.D., Lotfy, P., Sloan, M., Laird, H., Williams, H.B., et al. (2021). Beeinträchtigte lokale intrinsische Immunität gegen SARS-CoV-2-Infektion bei schwerem COVID-19. *Cell* 184, 4713–4733.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.023>.
148. Green, C.A., Sande, C.J., de Lara, C., Thompson, A.J., Silva-Reyes, L., Napolitano, F., Pierantoni, A., Capone, S., Vitelli, A., Klennerman, P. und Pollard, A.J. (2018). Humorale und zelluläre Immunität gegen RSV bei Säuglingen, Kindern und Erwachsenen. *Vaccine* 36, 6183–6190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.056>.
149. Zinkernagel, R.M. (2018). Was wäre, wenn die schützende Immunität antigenabhängig wäre und nicht auf sogenannte „Gedächtnis“-B- und T-Zellen zurückzuführen wäre? *Immunol. Rev.* 283, 238–246. <https://doi.org/10.1111/immr.12648>.
150. Mao, T., Israelow, B., Suberi, A., Zhou, L., Reschke, M., Pen' a-Herna' n-dez, M.A., Dong, H., Homer, R.J., Saltzman, W.M. und Iwasaki, A. (2022). Unadjuvanted intranasal spike vaccine booster elicits robust pro-TECTIVE mucosal immunity against sarbecoviruses. <https://doi.org/10.1101/2022.01.24.477597>.

Prospettiva

Ripensare i vaccini di nuova generazione per coronavirus, virus influenzali e altri virus respiratori

David M. Morens,¹ Jeffery K. Taubenberger,^{2,*} e Anthony S. Fauci¹¹ Ufficio del Direttore, Istituto Nazionale di Allergie e Malattie Infettive, Istituti Nazionali di Sanità, Bethesda, MD 20892, USA² Sezione Patogenesi e Evoluzione Virale, Laboratorio di Malattie Infettive, Istituto Nazionale di Allergie e Malattie Infettive, Istituti Nazionali di Sanità, Bethesda, MD 20892, USA*Corrispondenza: taubenbergerj@niaid.nih.gov <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.016>

SINTESI

I virus che si replicano nella mucosa respiratoria umana senza infettare sistematicamente, tra cui l'influenza A, il SARS-CoV-2, i coronavirus endemici, l'RSV e molti altri virus del "raffreddore comune", causano una mortalità e una morbilità significative e rappresentano un importante problema di salute pubblica. Poiché questi virus generalmente non provocano da soli un'immunità protettiva completa e duratura, finora non sono stati controllati efficacemente da vaccini autorizzati o sperimentali. In questa revisione, esaminiamo le sfide che hanno ostacolato lo sviluppo di vaccini respiratori mucosali efficaci, sottolineando che tutti questi virus si replicano molto rapidamente nell'epitelio superficiale e vengono trasmessi rapidamente ad altri ospiti, in un breve lasso di tempo prima che le risposte immunitarie adattative siano completamente mobilitate. Discutiamo i possibili approcci per lo sviluppo di vaccini di nuova generazione contro questi virus, tenendo conto di diverse variabili quali la configurazione dell'antigene vaccinale, la dose e l'adiuvante, la via e i tempi di vaccinazione, il richiamo vaccinale, le terapie aggiuntive e le opzioni per le politiche di vaccinazione di salute pubblica.

INTRODUZIONE

Vaccini efficaci e strategie di prevenzione vaccinale contro i virus respiratori endemici ed emergenti sono di fondamentale importanza, poiché questi agenti patogeni uccidono ogni anno fino a 5 milioni di persone in tutto il mondo. Ad esempio, nell'ultimo decennio, l'influenza ha ucciso ogni anno negli Stati Uniti tra le 12.000 e le 52.000 persone¹ e si colloca tra le principali cause di anni di vita produttiva persi (YPLL). I virus respiratori endemici come il virus respiratorio sinciziale (RSV) e i parainfluenzavirus causano molte altre vittime, mentre virus respiratori precedentemente sconosciuti come il SARS-CoV-2, responsabile del COVID-19, sono emersi in modo inaspettato. Il SARS-CoV-2 ha causato finora più di un milione di vittime negli Stati Uniti. La crescente frequenza con cui emergono tali virus respiratori pandemici potrebbe essere una caratteristica fondamentale di una nuova era pandemica,⁽²⁾ costringendoci a riconsiderare lo stato dell'arte della vaccinologia dei virus respiratori (Figura 1).^{(2) (3)}

Fino alla comparsa del COVID-19, l'influenza era stata per molti decenni la malattia respiratoria virale prevenibile con vaccino più letale, per la quale erano disponibili solo vaccini non ottimali. Sorprendentemente, poco è cambiato nei vaccini antinfluenzali dal 1957, quando furono somministrati per la prima volta nei programmi nazionali di vaccinazione degli Stati Uniti. Nel corso degli anni, i vaccini antinfluenzali non sono mai stati in grado di suscitare un'immunità protettiva duratura contro i ceppi del virus dell'influenza stagionale, nemmeno contro i ceppi non mutati.⁽⁴⁻⁷⁾ Sebbene gli attuali vaccini antinfluenzali riducano in una certa misura il rischio di malattia grave, ospedalizzazione e morte, la loro efficacia contro l'infezione clinicamente evidente è decisamente subottimale, con una percentuale che varia dal 14% al 60% negli ultimi 15 anni di influenza.

stagioni.¹ Inoltre, la durata dell'immunità indotta dal vaccino è misurata solo in mesi. Gli attuali vaccini richiedono una rivaccinazione annuale con formulazioni aggiornate che spesso non corrispondono esattamente ai ceppi virali circolanti.⁸ Sebbene le vaccinazioni antinfluenzali annuali siano fortemente raccomandate per la maggior parte della popolazione e in particolare per le persone appartenenti a gruppi ad alto rischio, tra cui gli anziani, i malati cronici e le donne in gravidanza, l'accettazione del vaccino da parte della popolazione non è ideale.⁹ A partire dal 2022, dopo oltre 60 anni di esperienza con i vaccini antinfluenzali, si è notato un miglioramento molto limitato nella prevenzione dell'infezione da parte dei vaccini. Come sottolineato decenni fa, e ancora oggi vero, i tassi di efficacia dei nostri migliori vaccini antinfluenzali approvati sarebbero inadeguati per l'autorizzazione alla commercializzazione per la maggior parte delle altre malattie prevenibili con il vaccino.⁷ Anche i decennali sforzi per sviluppare vaccini antinfluenzali migliori, cosiddetti "universali" - vaccini che creerebbero un'immunità protettiva più ampia, preferibilmente di durata più lunga^{8,10} - non hanno ancora portato alla creazione di vaccini di nuova generazione con un'ampia protezione, sebbene un gran numero di vaccini sperimentali siano in fase preclinica o iniziale.

sviluppo clinico.¹¹

Durante la pandemia di COVID-19, il rapido sviluppo e la rapida distribuzione dei vaccini contro il SARS-CoV-2 hanno salvato innumerevoli vite e contribuito a ottenere un controllo parziale della pandemia in una fase precoce.¹² Tuttavia, con la comparsa di varianti del SARS-CoV-2, sono diventate evidenti le carenze di questi vaccini, che ricordano quelle dei vaccini antinfluenzali. I vaccini per questi due virus molto diversi hanno caratteristiche comuni: provocano una protezione incompleta e di breve durata contro le varianti del virus in evoluzione che sfuggono all'immunità della popolazione.⁽¹²⁻¹⁵⁾ Considerando che il vaccino



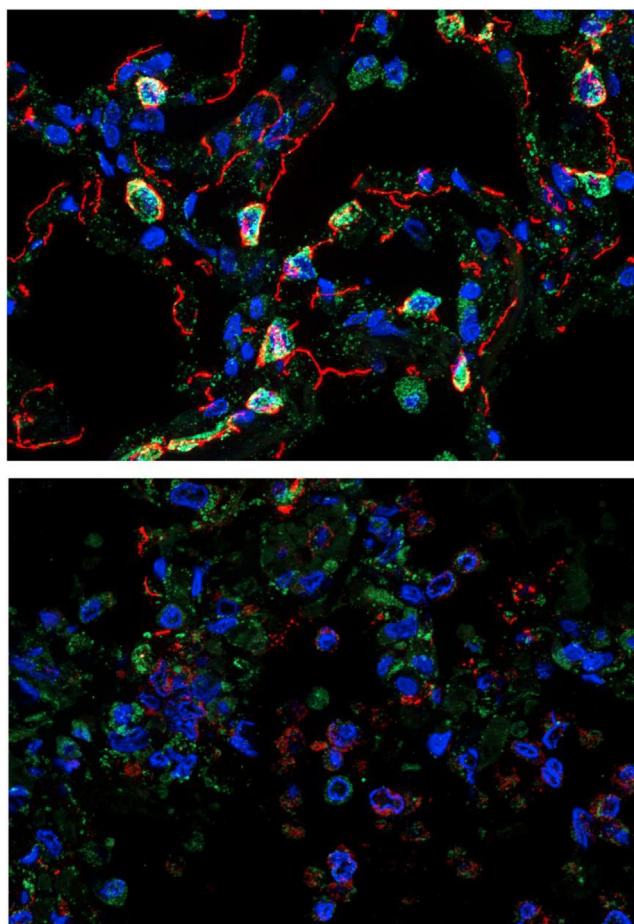


Figura 1. Danno alveolare in campioni autopsici polmonari di COVID-19 fatale. Immunofluorescenza multicolore che mostra l'espressione della proteina C pro-surfattante (verde) e della E-caderina (rossa) nel tessuto polmonare normale (in alto) e in un caso autopsico polmonare di COVID-19 (in basso). I nuclei sono colorati in blu. I setti alveolari del tessuto polmonare normale mostrano un'espressione prominente della proteina C pro-surfattante e della E-caderina rispettivamente nelle cellule alveolari di tipo 2 e nelle giunzioni epiteliali, rispetto al tessuto polmonare COVID-19 fatale, che mostra una marcata perdita della colorazione della proteina C pro-surfattante e della E-caderina nei setti alveolari e un accumulo intra-alveolare di detriti epiteliali colorati positivamente. Le immagini mostrano l'esteso danno polmonare osservato in un caso fatale di COVID-19. Le nuove generazioni di vaccini contro i virus respiratori come SARS-CoV-2 e i virus influenzali sono di fondamentale importanza per prevenire patologie polmonari, malattie gravi e decessi. Le immagini di un polmone normale e di un caso di autopsia COVID-19 sono tratte da D'Agnillo F, et al. *Sci Transl Med*. 2021;13(620):eabj7790. Immagini per gentile concessione del dottor Felice D'Agnillo della Food and Drug Administration statunitense.

Lo sviluppo e l'autorizzazione all'immissione in commercio sono un processo lungo e complesso che richiede anni di dati preclinici e clinici sulla sicurezza e l'efficacia. I limiti dei vaccini contro l'influenza e la SARS-CoV-2 ci ricordano che i vaccini candidati per la maggior parte degli altri virus respiratori non hanno finora offerto una protezione sufficiente per poter essere autorizzati, compresi i vaccini candidati contro l'RSV, una delle principali cause di morte tra i neonati e gli anziani,¹⁶⁻²¹ i parainfluenzavirus, i coronavirus endemici²² e molti altri virus del "raffreddore comune" che causano una morbidità significativa e perdite economiche.

Più di 50 anni fa, lo sviluppo di vaccini efficaci contro alcuni dei più importanti virus respiratori, tra cui il morbillo, la parotite e la rosolia, ha fatto sperare che

presto si potessero sviluppare vaccini per tutti gli altri virus respiratori. Tuttavia, le infezioni naturali da questi tre virus respiratori controllati dai vaccini, così come il vaiolo e il virus varicella-zoster (VZV), non sono rappresentative delle infezioni causate dalla maggior parte dei virus respiratori. Esse differiscono per almeno tre aspetti di fondamentale importanza che sono correlati al loro controllo efficace con i vaccini (Tabella 1):

- (1) Dopo essersi inizialmente replicati a livello mucoso, questi virus respiratori sistemici causano tutti una viremia significativa che diffonde un numero enorme di virioni infettivi in tutto il corpo, mettendoli in contatto con più compartimenti immunitari e tipi di cellule immunocompetenti.
- (2) hanno periodi di incubazione relativamente lunghi che riflettono la replicazione iniziale a livello delle mucose e la successiva diffusione sistemica dei virioni infettivi, il che consente di indurre la piena efficacia dell'immunità adattativa, e
- (3) suscitano un'immunità protettiva a lungo termine o permanente (Tabella 1).

In netto contrasto, i virus respiratori non sistemici come i virus dell'influenza, SARS-CoV-2 e RSV tendono ad avere periodi di incubazione significativamente più brevi (Tabella 1) e un rapido decorso della replicazione virale. Si replicano prevalentemente nel tessuto mucoso locale, senza causare viremia, e non incontrano in modo significativo il sistema immunitario sistemico o la piena forza delle risposte immunitarie adattative, che richiedono almeno 5-7 giorni per maturare, di solito ben dopo il picco della replicazione virale e la trasmissione ad altri. È stata segnalata la presenza di "RNAemia" da SARS-CoV-2 (circolazione di RNA virale nel flusso sanguigno, come si osserva nella maggior parte delle infezioni da virus respiratori delle mucose, a differenza della viremia, in cui i virus infettivi possono essere coltivati dal sangue), e i livelli di RNA virale rilevati mediante RT-PCR sono stati associati a malattie gravi,^{23,24} in modo simile agli studi sull'RNAemia influenzale.^{25,26} Di conseguenza, i virus respiratori che non si replicano a livello sistemico, tra cui apparentemente il SARS-CoV-2,¹³⁻¹⁵ tendono a reinfezionare ripetutamente le persone nel corso della loro vita senza mai suscitare una protezione completa e duratura.²⁷

Un altro fattore importante da considerare è che, sebbene i virus a RNA condividano un tasso di errore intrinseco simile della RNA polimerasi RNA-dipendente,²⁸ virus diversi (e diversi frame di lettura aperti all'interno dei loro genomi) differiscono nella loro tolleranza alla mutazione. I vincoli mutazionali possono essere correlati a frequenti frame di lettura aperti sovrapposti²⁸ o a vincoli funzionali sull'acquisizione di mutazioni non sinonime, come nel caso, ad esempio, del virus del morbillo.²⁹ Al contrario, le proteine esterne dell'emagglutinina e della neuraminidasi del virus dell'influenza A sono relativamente plastiche e le mutazioni non sinonime selezionate positivamente provocano una deriva antigenica immunologicamente significativa,^{30,31} attraverso l'acquisizione di mutazioni non sinonime negli epitopi antigenici, nonché attraverso l'alterazione dei modelli di glicosilazione N-legata.³² La rapida deriva antigenica influisce sul controllo delle epidemie influenzali annuali⁹ e complica gli sforzi per produrre vaccini antinfluenzali "universali" ad ampia protezione. La proteina spike del SARS-CoV-2 ha mostrato una plasticità simile, con la comparsa di molteplici varianti con antigenicità alterata³³ che ha complicato il suo controllo attraverso le attuali strategie di vaccinazione.³⁴

Sebbene la rapida evoluzione dei virus delle mucose antigenicamente variabili come i virus dell'influenza A³⁵ e SARS-CoV-2 complichino la progettazione dei vaccini di nuova generazione, altri virus respiratori che colpiscono esclusivamente le mucose

Tabella 1. Parametri epidemiologici e immunologici di alcuni virus respiratori umani e dei vaccini utilizzati per controllarli

Virus	Periodo di incubazione ^a	Viremia marcata	L'infezione induce un'immunità protettiva a lungo termine	Le reinfezioni sono rare	I vaccini provocano un'immunità protettiva a lungo termine	Tipo di vaccino
Morbillo (fino al prodromo)	z10 giorni	sì	sì	sì	sì	Replicante
Parotite	z16 giorni	sì	sì	sì	sì	replicante
Rosolia	z16 giorni	sì	sì	sì	sì	replicante
Vaiolo ^b	z12 giorni	sì	sì	sì	sì	replicante
VZV ^c	z14 giorni	sì	sì	sì	sì	Replicazione
Coronavirus endemici	z5 giorni	no	no	no	no	nessuno
Virus dell'influenza	z2 giorni	no	no	no	no	replicante, altro
Parainfluenzavirus	z4 giorni	no	no	no	no	nessuno
RSV	z5 giorni	no	no	no	no	nessuno
SARS-CoV-2	z4 giorni	no ^d	no	no	no	non replicante

^a I periodi di incubazione virale, specialmente quelli più brevi, hanno in genere intervalli molto ampi; queste stime sono tratte da sezioni trasversali della letteratura.

^b Il vaiolo è stato eradicato dalla circolazione naturale nel 1978.

^c La recrudescenza del virus varicella-zoster (VZV) (nota come zoster, zona o "herpes zoster") è causata dal rilascio di virus latenti dai gangli; le seconde infezioni esogene

Le infezioni respiratorie esogene nelle persone normali sono rare.

^d Sebbene gli antigeni SARS-CoV-2 siano stati rilevati in più tessuti, il virus non sembra essere associato a una significativa viremia "libera", come dimostrato dalla difficoltà di coltivare virioni infettivi dal sangue o dai tessuti e dalla debole induzione di un'immunità sistemica protettiva ampia e duratura.

I virus, come l'RSV, hanno dimostrato una plasticità antigenica molto inferiore³⁶⁻³⁸; tuttavia, causano ancora infezioni ripetute nel corso della vita senza lo sviluppo di un'immunità protettiva a lungo termine.^{39,40} Pertanto, sebbene la variabilità genetica e antigenica di virus come l'influenza e il SARS-CoV-2 renda più difficile la progettazione dei vaccini, questi fattori da soli non possono spiegare completamente la mancata induzione di un'immunità protettiva a lungo termine contro altri virus delle mucose respiratorie come l'RSV, più stabile dal punto di vista fenotipico.

Tenendo conto di tutti questi fattori, non sorprende che nessuno dei virus respiratori prevalentemente mucosali sia mai stato controllato efficacemente dai vaccini. Questa osservazione solleva una questione di fondamentale importanza: se le infezioni naturali da virus respiratori mucosali non inducono un'immunità protettiva completa e a lungo termine contro la reinfezione, come possiamo aspettarci che i vaccini, in particolare quelli non replicanti somministrati per via sistemica, lo facciano? Questa è una sfida importante per lo sviluppo futuro dei vaccini, e superarla è fondamentale mentre lavoriamo per sviluppare vaccini di "nuova generazione".

Le sfide principali (riassunte nella Tabella 2) sono discusse di seguito, insieme ai modi per affrontarle nella ricerca di vaccini nuovi e migliorati contro i virus respiratori.

LE INFEZIONI NATURALI DA VIRUS RESPIRATORI MUCOSALI POTREBBERO NON ESSERE COMPLETAMENTE CONTROLLATE DALLE RISPOSTE IMMUNITARIE UMANE, POICHÉ IL SISTEMA IMMUNITARIO UMANO SI È EVOLUTO PER TOLLERARLE DURANTE INTERVALLI MOLTO BREVI DI REPLICAZIONE VIRALE MUCOSALE

I segni e i sintomi di molte diverse infezioni da virus respiratori delle mucose sono notevolmente simili: una breve durata della malattia e un decorso tipicamente non complicato caratterizzato da rinorrea, starnuti, mal di gola, tosse variabile, malessere e, in molti casi, febbre bassa o assente.⁴¹ Queste caratteristiche comuni suggeriscono fortemente

meccanismi patogeni simili per questi virus che coinvolgono le risposte infiammatorie e immunitarie innate dell'ospite.

L'incapacità dei virus respiratori delle mucose di suscitare un'immunità protettiva duratura riflette, tra molti altri fattori, l'adattamento evolutivo del virus all'ospite e dell'ospite al virus. In questa relazione evolutiva, i virus hanno due importanti vantaggi: (1) il sistema immunitario respiratorio umano si è evoluto per esprimere una complessa regolazione della tolleranza (vedi sotto) che può inibire l'efficace eliminazione immunitaria virale durante i primi 5-7 giorni dopo l'inoculazione, quando predominano le risposte immunitarie innate; e (2) periodi di incubazione molto brevi (Tabella 1) consentono una replicazione virale sostanziale e incontrastata e la successiva diffusione virale prima che le risposte immunitarie adattative possano essere adeguatamente attivate per eliminarle.^{42,43}

Inoltre, i diversi compartimenti del sistema immunitario respiratorio funzionano in modo significativamente diverso rispetto ai compartimenti del sistema immunitario presenti in altri sistemi organici. In particolare, il sistema immunitario respiratorio risiede in aree separate specifiche dei tessuti dei tessuti linfoidi associati alle mucose (MALT) semi-organizzati, del tessuto linfoide associato alle lacrime/congiuntiva (TALT), del tessuto linfoide associato al rinofaringe (NALT), del tessuto linfoide associato ai bronchi (BALT)⁴⁴ e in compartimenti polmonari separati. Ciascuno di questi compartimenti rileva in modo indipendente l'infezione virale e la presentazione dell'antigene, interagisce con gli altri compartimenti e con il sistema immunitario sistemico, avvia risposte effettrici locali e mantiene uno stato immunitario tollerato in modo variabile.

I termini "tolleranza alla malattia" e "tolleranza immunitaria" si riferiscono alla categoria ancora non completamente caratterizzata ma distinta dei meccanismi di difesa immunitaria dei mammiferi che consentono agli ospiti di "accettare" l'infezione e altri stimoli antigenici per ottimizzare la sopravvivenza (rivisto in Medzhitov et al.⁴² e Iwasaki et al.⁴³). Poiché gli esseri umani inalano e ingeriscono enormi quantità di proteine esogene ad ogni respiro e boccone, i compartimenti immunitari respiratorio e gastrointestinale si sono evoluti per

Tabella 2. Sfide chiave nello sviluppo di vaccini di nuova generazione contro i virus respiratori delle mucose, tra cui SARS-CoV-2, virus dell'influenza A, virus pandemici emergenti e altri virus di importanza

(1) Le infezioni naturali da virus respiratori delle mucose potrebbero non essere completamente controllate dalle risposte immunitarie umane, poiché il sistema immunitario umano si è evoluto per tollerarle durante intervalli molto brevi di replicazione virale delle mucose
(2) Poiché l'immunità mucosale e sistemica protegge solo parzialmente contro l'infezione da virus respiratori delle mucose, dobbiamo sfruttare meccanismi immunitari alternativi dell'ospite
(3) Le correlazioni immunitarie della protezione contro i virus respiratori delle mucose non sono completamente comprese, variano tra i ceppi e i sottotipi virali, con deriva virale, e presentano variazioni interindividuali
(4) Le questioni relative ai vaccini, quali la via di somministrazione, la configurazione dell'antigene, adiuvanti e associazione con terapie aggiuntive sono di grande importanza per la ricerca attuale
(5) Gli ospiti vaccinati e i gruppi a rischio sono numerosi ed eterogenei
(6) Le considerazioni di salute pubblica relative ai vaccini respiratori di nuova generazione devono contribuire a definire la progettazione dei vaccini, compresi il calendario vaccinale, il ruolo del richiamo, la frequenza della vaccinazione e la durata/completeness della protezione, gli effetti collaterali e l'accettazione da parte del pubblico

affrontare continui e massicci attacchi antigenici provenienti dal mondo esterno. (Le risposte immunitarie alle infezioni virali della mucosa gastrointestinale sono state recentemente oggetto di revisione ⁴⁵ e non vengono trattate in questa sede). Le proteine inalate e ingerite devono essere identificate e tollerate oppure attaccate ed eliminate. Ciò richiede una strategia immunitaria di "decisione" altamente evoluta e complessa che accetti contemporaneamente le proteine estranee innocue e riduca le risposte immunitarie agli agenti infettivi e agli allergeni che altrimenti potrebbero causare danni ai tessuti circostanti ⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾.

Dal punto di vista teleologico del patogeno, i virus respiratori che si replicano a livello mucoso/non sistemico si sono adattati nel corso dei millenni agli ambienti immunitari tolleranti dell'ospite per infettare, replicarsi e diffondersi rapidamente in modo ottimale, prima che le risposte immunitarie adattative possano essere completamente mobilitate per controllarli. Tra le altre tattiche, lo fanno inibendo le risposte dell'interferone (IFN) dell'ospite (come fanno altri virus RNA che si replicano sistemicamente), esprimendo antigeni esca e inducendo risposte immunitarie aberranti che promuovono la sopravvivenza virale senza causare danni significativi ai tessuti dell'ospite.¹⁶ Anche il microbioma respiratorio dell'ospite contribuisce a questo equilibrio, da un lato limitando l'infezione (ad esempio, regolando la produzione di IFN) e dall'altro promuovendo l'infezione (ad esempio, inducendo stati antivirali di tolleranza immunitaria).^{46,51-53} Il microbioma intestinale è stato anche associato alla variazione individuale nella risposta al vaccino, e anche questa associazione necessita di ulteriori approfondimenti^{54,55}

Una migliore comprensione del braccio afferente di questi sistemi^{46,49,51,52,(56-63)}, compresi i ruoli delle cellule epiteliali delle vie aeree superiori (che svolgono un ruolo chiave nella rilevazione di materiali estranei, compresi i patogeni virali), delle cellule transepiteliali di rilevazione e presentazione dell'antigene, come le cellule M e le cellule dendritiche intraepiteliali, la regolazione immunitaria, l'omeostasi della tolleranza, il controllo delle IgA e l'espressione e gli effetti delle IgA sottoposte a commutazione di classe.⁶⁴ Quest'ultimo è stimolato localmente dall'arrivo di anticorpi mucosali anti-

gens e, oltre alla sua neutralizzazione virale e ad altre funzioni effettrici, offre una protezione incrociata maggiore rispetto ad altre immunoglobuline nella sua forma secretoria,^{65,66} avvia la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) ed è un regolatore immunitario.⁶⁷⁻⁷⁰ L'importanza dell'IgA secretoria mucosale (sIgA) nelle risposte specifiche ai patogeni contro le infezioni virali respiratorie è stata a lungo apprezzata per i virus dell'influenza,^{65,(71)} RSV,⁽⁷²⁾ (⁷³) e più recentemente SARS-CoV-2.⁽⁷⁴⁾ (⁷⁵)

Il "patto faustiano" immunologico tra tolleranza e controllo delle infezioni, che consente un'infezione transitoria e moderata da agenti respiratori a bassa o media patogenicità per frenare le forze distruttive di una risposta di eliminazione immunitaria,^{16,59} può essere problematico per il controllo dei virus respiratori tramite vaccini, non solo nella percezione locale e sistemica degli antigeni vaccinali, ma anche nell'indurre risposte immunitarie ottimali. Non sorprende che la tolleranza immunitaria sia più pronunciata nel tratto respiratorio superiore, dove vengono inoculati i virus respiratori, rispetto al tratto respiratorio inferiore,⁽⁴⁹⁾ (⁵⁷) (⁷⁶) dove alcuni virus respiratori possono diffondersi se non contenuti (vedi sotto). Ciò rappresenta un'ulteriore sfida per lo sviluppo di vaccini che idealmente dovrebbero sia attenuare l'insorgenza dell'infezione virale sia controllare l'infezione dopo l'inoculazione.

Il paradigma della tolleranza/risposta immunitaria umana non è unico. Una versione più estrema si riscontra in alcune specie di pipistrelli: durante i lunghi periodi di ibernazione, i pipistrelli conservano l'energia necessaria alla sopravvivenza tollerando enormi carichi di infezioni per lunghi periodi ⁽⁷⁷⁾. Questo fenomeno è più che interessante perché può spiegare, in parte, perché i pipistrelli sono incubatori così importanti di numerosi virus (coronavirus, filovirus, henipavirus, virus della rabbia, ecc.) con potenziale di trasmissione all'uomo. Ironia della sorte, i meccanismi di tolleranza immunitaria nei pipistrelli e in altre specie ospiti possono essere determinanti importanti per l'insorgenza di epidemie e pandemie umane, proprio come facilitano la diffusione da uomo a uomo dei virus adattati all'uomo.

POICHÉ L'IMMUNITÀ MUCOSALE E SISTEMICA PROTEGGE SOLO PARZIALMENTE DALL'INFEZIONE DA VIRUS RESPIRATORI MUCOSALI, DOBBIAMO SFRUTTARE MECCANISMI IMMUNITARI OSPITI ALTERNATIVI

Ad esempio, il fenomeno recentemente apprezzato dell'"immunità innata addestrata" ⁴⁶⁻⁵⁰ può offrire la promessa che i futuri vaccini potrebbero un giorno essere in grado di potenziare le risposte immunitarie innate sia verso patogeni specifici che in modo non specifico. Tuttavia, una questione chiave ancora senza risposta rimane come controllare queste risposte per evitare conseguenze infiammatorie dannose.⁷⁸

Molti studi condotti su esseri umani e animali da laboratorio, alcuni dei quali precedenti al riconoscimento delle sIgA,^{22,58,79-81} indicano che l'immunità secretoria delle mucose è generalmente più efficace dell'immunità sistemica nel controllo dei virus respiratori delle mucose^{18,(79)} (⁸²) e che i linfociti T di memoria residenti nei tessuti possono essere efficaci nel rispondere rapidamente alle infezioni delle mucose.⁽⁸³⁾ I principali effettori umorali nei siti mucosali sono le sIgA espresse sulle superfici mucosali dai plasmacellule/plasmablasti locali che secernono IgA e dai linfociti T di memoria e dalle cellule effettrici nel MALT.^{18,58,61,70,81,84-86} Le sIgA nasali sono il miglior correlato di protezione negli studi di sfida con RSV,¹⁸ anche in assenza di cellule B produttrici di IgA sistemiche. Risultati simili si osservano con altri virus, tra cui il SARS-CoV-2.⁽⁸⁷⁻⁾ (⁹⁰)

Sebbene i virus delle mucose che non si replicano a livello sistemico provochino effettori sistemici, tra cui plasmacellule produttrici di IgA sistemiche e, in alcuni casi, livelli elevati di IgA e IgG sieriche, né gli anticorpi circolanti, né i plasmablasti, né le cellule B o T o T effetttrici sistemiche funzionano in modo ottimale nei siti mucosali. Ciò è dovuto in parte alla diluizione dell'anticorpo trasudato e al fatto che molte di queste cellule effetttrici non dispongono dei segnali di traffico verso questi siti.⁽⁸⁵⁾

È quindi importante considerare le situazioni naturali in cui l'immunità acquisita mediata dagli anticorpi controlla i virus respiratori mucosali non sistemici. Già nel 1918 era stato dimostrato che i plasmici immunitari antinfluenzali somministrati passivamente potevano limitare l'infezione influenzale umana.⁹¹ Negli anni '40, anche gli anticorpi antinfluenzali aerosolizzati per via inalatoria hanno dimostrato di avere un effetto contro l'influenza clinica.⁹² L'infezione influenzale genera risposte immunitarie sistemiche durature, come indicato dal rilevamento di cloni specifici di cellule B di memoria 90 anni dopo l'infezione con il virus influenzale del 1918⁹³; tuttavia, bassi livelli di immunoglobuline circolanti e il lasso di tempo che intercorre tra l'infezione e lo sviluppo di una risposta anamnestica potrebbero non offrire una protezione neutralizzante contro un virus influenzale a rapida replicazione. Osservazioni simili sono state fatte con altri virus respiratori delle mucose. Ad esempio, gli anticorpi IgG materni, in particolare gli anticorpi contro la proteina F dell'RSV, proteggono dall'RSV infantile⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ e un anticorpo monoclonale umanizzato somministrato per via parenterale previene l'infezione da RSV nei neonati a rischio⁽²⁰⁾.

Tuttavia, l'efficacia delle Ig circolanti in queste situazioni dipende dalla trasduzione sulle superfici mucosali di titoli molto elevati di anticorpi con specificità per epitopi virali chiave. Non è ancora del tutto chiaro come venga controllata tale trasduzione, come venga regolata l'IgA antivirale affinché funzioni sia nell'immunità passiva che nella regolazione immunitaria,^{67,94} né come sia possibile indurre e mantenere livelli così elevati di anticorpi con la vaccinazione.

Oltre a prevenire l'infezione iniziale, è anche importante considerare il ruolo dell'immunità dell'ospite nel limitare la diffusione virale una volta che l'infezione si è manifestata. I virus respiratori di solito infettano prima la mucosa del tratto respiratorio superiore, dove le IgA sono più efficaci nel controllo antivirale;⁹⁵ tuttavia, alcuni possono diffondersi in modo contiguo al tratto respiratorio inferiore, persino agli alveoli polmonari. Ciò è di notevole importanza per un sottogruppo di virus respiratori pneumogenici come l'influenza, l'RSV e, possibilmente, il SARS-CoV-2. Questi virus sono normalmente limitati al tratto respiratorio superiore, ma possono sfuggire al controllo immunitario e diffondersi nei polmoni causando polmonite virale primaria con o senza polmonite batterica secondaria, spesso le cause principali di morte da queste infezioni.⁹⁶ Inoltre, le prove suggeriscono che la coinfezione virale-batterica può facilitare la trasmissione virale e virale/batterica per via aerea⁹⁷ e può persino aumentare la mortalità, un fenomeno osservato già nel 1917.⁹⁸

Il polmone è funzionalmente e immunologicamente diverso dal tratto respiratorio superiore, poiché contiene sia macrofagi alveolari residenti all'interno degli alveoli sia cellule immunitarie e di memoria residenti nelle nicchie peribronchiolari.⁸⁵ Queste ultime nicchie sono composte da cellule immunitarie che sono assenti alla nascita ma che si sviluppano in risposta all'esposizione antigenica postnatale,⁸⁶ che varia notevolmente da individuo a individuo e può espandersi in risposta alla stimolazione antigenica. Poiché il sistema immunitario polmonare è semi-autonomo, può essere difficile per i vaccini somministrati per via sistemica o per via respiratoria superiore, progettati per prevenire l'infezione, prevenire anche l'infezione polmonare se il tratto respiratorio superiore

L'infezione si diffonde ai polmoni. Ad esempio, poiché l'IgA sembra essere un effettore più efficace nel tratto respiratorio superiore, mentre l'IgG è più efficace nei polmoni,⁸² potrebbe essere difficile sviluppare vaccini singoli che proteggano tutti i tessuti respiratori. Le implicazioni per la vaccinologia sono chiare: prevenire l'infezione virale delle vie respiratorie superiori e limitare la diffusione virale post-infezione ai compartimenti respiratori contigui sono entrambi aspetti critici, ma potrebbero non essere facilmente realizzabili con vaccini singoli.

Per comprendere in che modo i vaccini potrebbero proteggere dalle infezioni delle vie respiratorie inferiori, dovremo capire come viene coordinata e controllata l'interazione tra il sistema immunitario delle vie respiratorie superiori, quello delle vie respiratorie inferiori e quello sistemico, a livello dei recettori cellulari, della rilevazione degli antigeni, della presentazione degli antigeni e di numerose funzioni effetttrici.^{49,50,61,(82)} Dobbiamo anche indagare ulteriormente lo sviluppo e il mantenimento delle cellule B e T di memoria residenti nei polmoni specifiche per i virus, come aumentare la loro persistenza nei polmoni e quanto velocemente possono essere mobilitate verso i siti mucosali infetti.^{(99) () (100)}

I CORRELATI IMMUNITARI DELLA PROTEZIONE CONTRO I VIRUS DELLE MUCOSE RESPIRATORIE NON SONO COMPLETAMENTE COMPRESI, VARIANO A SECONDA DEI CEPPI E DEI SOTTOTIPI VIRALI, CON DRIFT VIRALE, E PRESENTANO VARIANZE INTERINDIVIDUALI.

Nello sviluppo dei vaccini di nuova generazione, sarà necessario identificare forti correlati immunologici di protezione contro ciascun virus respiratorio delle mucose e concordare sulla loro rilevanza per gli obiettivi di vaccinazione della sanità pubblica.^{80,101,102} Sono chiaramente necessari ulteriori studi sui correlati immunologici nell'uomo, che dovrebbero costituire una priorità di ricerca. A seguito dell'infezione influenzale nell'uomo, studi hanno da tempo identificato correlati immunologici sierici e mucosali⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾ e correlati immunologici delle cellule T.^{104,106,107} Al contrario, uno studio di sfida dell'influenza umana dopo vaccinazione con vaccini inattivati o vaccino antinfluenzale vivo attenuato (LAIV), seguito da sfida con LAIV, non è stato in grado di trovare alcun correlato immunologico di protezione.⁽¹⁰⁸⁾

Il sistema immunitario è complesso e comprende molti effettori. I titoli anticorpali sierici verso vari epitopi virali possono essere correlati solo indirettamente alla protezione a causa dell'associazione con altri effettori immunitari più critici (ma solitamente non misurati), come le immunoglobuline mucosali⁶⁵ o, ad esempio, le interazioni steriche degli anticorpi dello stelo dell'emoagglutinina che determinano l'inibizione della neuraminidasi.¹⁰⁹ In recenti studi di sfida sull'uomo, i titoli anticorpali sierici contro la neuraminidasi erano più fortemente correlati con diverse misure di protezione rispetto ai titoli anticorpali contro la testa o il gambo dell'emoagglutinina.^{110,111} La neuraminidasi rimane un bersaglio sottovalutato per la progettazione dei vaccini antinfluenzali di prossima generazione.¹¹² In breve, le correlazioni tra i titoli anticorpali sierici e la suscettibilità all'infezione influenzale possono essere statisticamente valide in studi su larga scala, ma imperfette nel contesto delle variazioni individuali, della rapida evoluzione virale e del calo dei titoli.

Per ogni virus delle mucose, dobbiamo anche raggiungere un consenso sui livelli di protezione desiderati; ad esempio, gli obiettivi di protezione potrebbero essere:

- α prevenire completamente l'infezione, come possono fare i vaccini per i virus respiratori sistemici (Tabella 1);

- α limitare la replicazione virale o prevenire la trasmissione, come nel caso dell'immunità anti-neuraminidasi dell'influenza;
- α prevenire la malattia; oppure
- α prevenire solo le forme gravi della malattia (ad esempio quelle che richiedono il ricovero in ospedale), come sembra essere il caso di alcuni vaccini contro il virus dell'influenza e il SARS-CoV-2.

Tale consenso è necessario se vogliamo sviluppare i migliori vaccini e strategie e politiche di vaccinazione ottimizzate per il loro utilizzo. Nel caso dell'influenza, ad esempio, i vaccini sono stati storicamente progettati per prevenire le infezioni delle vie respiratorie superiori, non le infezioni polmonari secondarie associate alla diffusione dal tratto respiratorio superiore. Ciò si è rivelato problematico perché gli attuali vaccini antinfluenzali non sono ottimali né nella prevenzione dell'infezione né nell'indurre l'immunità polmonare.¹¹³ Sebbene i vaccini contro l'influenza e la SARS-CoV-2 riducano la gravità della malattia quando i vaccini non riescono a prevenire l'infezione, si verificano ancora un numero significativo di decessi, con decine di migliaia di morti all'anno per influenza negli Stati Uniti.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Date le imperfezioni di questi vaccini, sembra imperativo per la salute pubblica perseguire con determinazione vaccini e strategie di vaccinazione migliori.

LE QUESTIONI RELATIVE AI VACCINI, COME LA VIA DI SOMMINISTRAZIONE, LA CONFIGURAZIONE DELL'ANTIGENE, L'ADIVANTE E L'ASSOCIAZIONE CON LA TERAPIA ADIVANTE, SONO DI GRANDE IMPORTANZA PER LA RICERCA ATTUALE.

Le superfici mucose umane misurano circa 30-40 piedi quadrati⁸² e sono quasi interamente ricoperte da tessuti linfoidei attivi. L'anticorpo predominante nella maggior parte di questi siti è la sIgA, che rappresenta un eccezionale 65-70% di tutte le immunoglobuline umane.⁽⁸¹⁾ È sempre più accettato che la via di somministrazione del vaccino (ad esempio, intramuscolare, intranasale, congiuntivale o aerosol) sia un fattore determinante della risposta respiratoria delle mucose.

In generale, e quando fattibile, l'immunizzazione delle mucose sembra l'approccio ottimale per i virus respiratori.^{52,58,61,70,81,86,(117)} tuttavia, nel contemplare i vaccini di nuova generazione, potremmo anche aver bisogno di formulazioni ottimizzate, dosi di vaccino più elevate, maggiore frequenza di somministrazione del vaccino e superare le sfide della tolleranza immunitaria.

È importante per ogni virus rispondere a domande chiave quali:

- (1) I vaccini non replicanti, che possono essere notevolmente meno efficaci nel suscitare IgA,⁸² possono essere efficaci quanto i vaccini replicanti, come i vaccini a virus vivo attenuato e i vettori vaccinali vivi che esprimono proteine virali chiave?
- (2) I vaccini a singolo antigene o a pochi antigeni possono fornire una protezione equivalente a quella dei vaccini più complessi dal punto di vista antigenico?
- (3) Dosi più elevate di antigene o vaccinazioni ripetute possono indurre una migliore immunità?
- (4) Quali sono gli effetti differenziali degli antigeni solubili rispetto a quelli particellari?⁸²
- (5) Quali sono le relazioni ideali tra il carico antigenico del vaccino e l'adivante sistemico o mucosale?¹¹⁸
- (6) Quali sono le strategie ottimali per le vie e i tempi di vaccinazione: "prime-boost" mucosale/sistemico? Strategie più recenti come "prime-pull" e "prime-deploy" (strategie di vaccinazione per suscitare risposte sistemiche delle cellule T seguite dal reclutamento di cellule T attivate tramite attrattivi

o il reclutamento di cellule T di memoria residenti, rispettivamente, nei polmoni)¹¹⁹⁻¹²² e altre?

È interessante notare che tutti i vaccini efficaci contro i virus respiratori sistemici (Tabella 1), quelli che generalmente inducono un'immunità umorale e cellulosa-mediata più ampia e duratura, sono vaccini a virus vivi che si replicano sistemicamente e che incontrano pienamente il sistema immunitario mucosale e sistemico dell'ospite. Le proprietà protettive imperfette dello spray nasale LAIV rappresentano un'eccezione che potrebbe derivare da un'eccessiva attenuazione, dall'immunità LAIV preesistente, dall'equilibrio compositivo, dalla deriva antigenica o da altri fattori non ancora apprezzati.^{123,124} Negli ultimi decenni, i vaccini a virus vivo sono stati sviluppati meno frequentemente per motivi di tempo e mancanza di impegno dovuti ai costi, alla potenziale sicurezza e alle difficoltà di adattarsi rapidamente alla deriva antigenica; tuttavia, riteniamo che questo approccio potenzialmente potente debba essere perseguito con energia.

Per quanto riguarda la configurazione dell'antigene vaccinale (immunogeno), è importante chiedersi se i vaccini che inducono l'immunità a specifici epitopi conservati possano creare un'immunità protettiva complessa equivalente a quella osservata con presentazioni antigeniche più complesse, come i cocktail multi-antigenici, e se i vaccini che separano i componenti antigenici, come l'HA/NA dell'influenza e l'HA/stem⁽¹²⁵⁾ possano aumentare in modo affidabile l'antigenicità. È inoltre importante notare che per alcuni virus non respiratori, come i flavivirus inoculati per via cutanea (zanzara) che infettano sistematicamente l'organismo, tra cui il virus della febbre gialla, il virus della dengue, virus Zika e virus dell'encefalite giapponese - un'immunità crociata complessa basata su epitopi condivisi su virus e ceppi virali correlati, quando incontrati in sequenza, può suscitare un'ampia protezione contro virus in qualche modo lontanamente correlati, associata a risposte anticorpali anamnestiche.⁽¹²⁶⁾ Allo stesso modo, un vaccino antinfluenzale intranasale multisottotipo sperimentale suscita un'immunità protettiva sperimentale contro i sottotipi del virus dell'influenza A assenti nel vaccino stesso.¹²⁷ Quali sono le basi virali e immunologiche di questi potenti fenomeni di protezione incrociata e possono essere replicati con vaccini respiratori mucosali? Come possiamo identificare i determinanti della correlazione e della complessità multi-antigenica sufficienti a rendere i vaccini più ampi contro tipi virali diversi ma correlati?

Una questione strettamente correlata è se i vaccini che generano risposte immunitarie solo contro singoli epitopi critici conservati in tutti i ceppi e sottotipi di virus, o un numero limitato di tali epitopi, possano funzionare altrettanto bene dei vaccini che provocano ampie risposte umorali e cellulosa-mediate contro epitopi multipli. Sebbene tali epitopi conservati sembrino candidati ideali, i vaccini basati su questo approccio non hanno avuto particolare successo. L'epitopo conservato gp120 Muster-Katinger dell'HIV, la proteina M2 dell'influenza e gli epitopi conservati del virus dell'influenza sono stati tutti considerati candidati promettenti per i vaccini, ma non hanno ancora dimostrato di suscitare una forte immunità protettiva negli studi clinici, sebbene molti candidati siano in fase preclinica o solo nelle prime fasi cliniche di sviluppo.¹²⁸⁻¹³³ Questi risultati sottolineano che le risposte immunitarie dell'ospite sono complesse e interconnesse e che la realizzazione di vaccini ampiamente protettivi sarà una sfida.

Le vie di somministrazione dei vaccini, le dosi e i programmi di rivaccinazione devono essere valutati con attenzione, comprese le vie di vaccinazione che massimizzano lo sviluppo delle cellule B e T della memoria immunitaria delle mucose e delle sIgA; i possibili vantaggi differenziali delle vie superiori

vaccinazione respiratoria, delle vie respiratorie inferiori e sistemica^{44,76,134-141}; o combinazioni ottimizzate di queste. Il tentativo di controllare i virus respiratori delle mucose con vaccini non replicanti somministrati per via sistemica è stato finora in gran parte infruttuoso, indicando la necessità di nuovi approcci. Ad esempio, durante i periodi di significativa circolazione virale nella popolazione umana, è possibile ottenere una protezione migliore con dosi ripetute o con vaccinazioni sequenziali delle mucose e sistemiche? Il richiamo frequente è un'opzione vaccinale praticabile, ad esempio tramite vaccini nasali auto-somministrati a casa? Occorre inoltre considerare i possibili ruoli ausiliari degli antivirali profilattici, compresi gli "antivirali programmabili" che prendono di mira strutture conservate,⁽¹⁴²⁾ gli anticorpi, compresa l'IgA terapeutica⁽¹⁴³⁾ e gli stimolatori dell'immunità innata come coadiuvanti di vaccini imperfetti. Resta da vedere se la vaccinazione e la profilassi possano essere efficacemente combinate a livello di popolazione.

Queste domande provocatorie dovrebbero essere tutte prese in considerazione mentre lavoriamo per ottimizzare le strategie di vaccinazione. Un approccio interessante da perseguire, come osservato sopra, sarebbe quello di produrre vaccini che stimolino l'immunità innata⁵⁰, che potrebbero essere ideali per combattere le infezioni "mordi e fuggi" causate dai virus respiratori delle mucose, che tipicamente infettano, si diffondono localmente e vengono trasmessi ad altri prima che possa essere attivata una risposta immunitaria adattativa in grado di controllarli. Infine, attualmente le opzioni per l'adiuvazione dei vaccini mucosali sono limitate.^{(82) (144)} Se i dati confermano la necessità e la fattibilità dell'adiuvazione dei vaccini mucosali, sarà necessario valutare i potenziali rischi, tra cui la possibile tossicità e gli effetti collaterali di ripetute immunizzazioni/adiuvazioni mucosali ad alto dosaggio, e il modo migliore per studiarli nell'uomo.

GLI OSPITI VACCINATI E I GRUPPI A RISCHIO SONO MOLTEPLICI ED ETEROGENEI

Una sfida fondamentale per i vaccini di nuova generazione è determinare se saranno utili vaccini universali o vaccini mirati a gruppi a rischio specifici. È inevitabile che diversi gruppi a rischio possano richiedere vaccini o formulazioni vaccinali differenti. Ad esempio, sappiamo che le infezioni da RSV sono prevenibili al meglio dall'immunità umorale nei bambini, ma dall'immunità cellulo-mediata negli anziani.⁽¹³⁶⁾ Inoltre, i bambini potrebbero necessitare di dosi di vaccino diverse rispetto ai giovani adulti, che a loro volta potrebbero necessitare di dosi diverse rispetto agli anziani con repertori di cellule B e soprattutto di cellule T ridotti agli antigeni virali.⁽¹³⁶⁾

Infatti, sembra probabile che i vaccini respiratori che non riescono a suscitare una forte immunità cellulo-mediata possano essere subottimali per gli anziani, ma anche che i vaccini che suscitano risposte cellulo-mEDIATE più forti potrebbero aumentare il rischio di effetti immunopatogenici. Se così fosse, è possibile trovare un compromesso ottimale? Gli anziani sono il gruppo di rischio più importante per la prevenzione vaccinale dell'influenza, della SARS-CoV-2, dell'RSV e di altri virus respiratori, perché sono i più esposti a esiti gravi e fatali e i meno reattivi alla vaccinazione, fattori che rendono il successo della vaccinazione degli anziani un punto di riferimento per altri gruppi. Sarà inoltre importante approfondire le differenze genetiche tra gli individui in relazione alla percezione degli antigeni virali delle mucose, alla predisposizione alla gravità della malattia e alla protezione vaccinale; ad esempio, le variazioni nell'IFITM3⁽¹⁴⁵⁾ e in altri geni associati alla via dell'IFN, poiché molte prove suggeriscono che la gravità virale

Le malattie respiratorie riflettono spesso la suscettibilità genetica dell'ospite (fattori).^{16,51,146,147}

LE CONSIDERAZIONI DI SALUTE PUBBLICA RELATIVE AI VACCINI RESPIRATORI DI NUOVA GENERAZIONE DEVONO CONTRIBUIRE A DEFINIRE LA PROGETTAZIONE DEI VACCINI, COMPRESI IL CALENDARIO VACCINALE, RUOLO DEL RINFORZO, FREQUENZA DELLA VACCINAZIONE E DURATA/COMPLETEZZA DELLA PROTEZIONE, EFFETTI COLLATERALI E ACCETTAZIONE DA PARTE DEL PUBBLICO

Una volta sviluppati vaccini migliorati, sarà necessario ottimizzare le formulazioni e i calendari vaccinali per ottenere la migliore immunità protettiva duratura delle mucose, in particolare con vaccini multivalenti o di richiamo, per i quali l'immunodominanza dell'antigene e l'equilibrio tra le risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate possono essere complessi.

Per quanto riguarda l'utilità e l'accettazione da parte della popolazione, sarà importante considerare il ruolo degli antigeni vaccinali ad alto dosaggio o con richiami frequenti, dei vaccini misti sequenziali (ad esempio, prime-boost con vaccini diversi) e se questi approcci saranno accettati dai fornitori, dalle autorità di regolamentazione e dal pubblico. L'osservazione che l'esposizione ripetuta dei neonati al RSV riduce la gravità della malattia in caso di infezione successiva⁽¹⁴⁸⁾, insieme ai dati sperimentali, suggerisce che la tempistica e la frequenza dei vaccini respiratori possono essere importanti⁽¹⁹⁾. Infatti, una recente teoria controversa ipotizza che il fattore determinante della protezione immunitaria/vaccinale non sia la memoria immunitaria e il richiamo, ma l'esposizione ripetuta agli antigeni⁽¹⁴⁹⁾. Questa proposta sembra essere contraddetta da molti fenomeni osservabili, ma allo stesso tempo è coerente con l'osservazione che il mantenimento delle cellule T di memoria nei polmoni è associato a ripetute esposizioni antigeniche⁽⁸²⁾. A causa delle sue implicazioni per la vaccinologia, questa questione può e deve essere studiata sperimentalmente. Essa induce anche a riconsiderare molti approcci accettati, come la vaccinazione antinfluenzale annuale una tantum all'inizio della stagione influenzale.

Dobbiamo anche chiederci se esistano altri approcci vaccinali da prendere in considerazione, come vaccinazioni stagionali sequenziali e vaccini mucosali supplementari per stimolare l'immunità specifica delle vie respiratorie superiori o l'immunità innata non specifica. Tali approcci potrebbero includere approcci prime-boost, ad esempio combinando l'attivazione dell'immunità sistemica e mucosale, magari con una vaccinazione sistemica iniziale seguita da un richiamo con vaccinazione intranasale o viceversa.^{35,82,150} Oltre alla vaccinazione intranasale, sarà necessario esplorare più approfonditamente le risposte alla vaccinazione in altri compartimenti immunitari respiratori, come la vaccinazione congiuntivale con collirio¹¹⁷ e in particolare la vaccinazione con aerosol per alcuni virus respiratori, come suggerito da studi sperimentali su esseri umani e animali per l'influenza e altre malattie virali respiratorie.^{44,135}

CONSIDERAZIONI FINALI

I vaccini che garantiscono una protezione duratura contro i virus respiratori mucosali non sistemici con alti tassi di mortalità hanno finora eluso gli sforzi di sviluppo dei vaccini.

Le sfide per lo sviluppo di vaccini respiratori di nuova generazione sono molteplici e complesse (Tabella 2). Dobbiamo comprendere meglio perché infezioni mucosali multiple sequenziali con lo stesso virus circolante

I virus respiratori, diffusi nel corso di decenni di vita, non riescono a suscitare un'immunità protettiva naturale, specialmente nel caso di virus che non presentano una significativa deriva antigenica (ad esempio, RSV e parainfluenzavirus)^{17–19,22} se vogliamo sviluppare in modo razionale vaccini in grado di prevenirli. Dobbiamo pensare fuori dagli schemi per realizzare vaccini di nuova generazione che stimolino la protezione immunitaria contro i virus che sopravvivono nelle popolazioni umane grazie alla loro capacità di rimanere significativamente al di fuori della portata protettiva completa dell'immunità innata e adattativa umana.

I tentativi falliti in passato di suscitare una protezione solida contro i virus respiratori delle mucose e di controllare le epidemie mortali e le pandemie che causano sono stati un fallimento scientifico e di salute pubblica che deve essere affrontato con urgenza. Siamo entusiasti e stimolati dal fatto che molti ricercatori e gruppi di collaborazione stiano ripensando, partendo da zero, tutte le nostre ipotesi e approcci passati alla prevenzione di importanti malattie virali respiratorie e stiano lavorando per trovare nuove strade audaci da percorrere.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato sostenuto dal Programma di ricerca intramurale del NIH e del NIAID.

DICHIARAZIONE DI INTERESSI

Gli autori dichiarano di non avere interessi in conflitto.

REFERIMENTI

1. CDC (2022). Stime sull'efficacia dei vaccini nelle stagioni passate. <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/past-seasons-estimates.html>.
2. Morens, D.M., e Fauci, A.S. (2020). Malattie pandemiche emergenti: come siamo arrivati al COVID-19. *Cell* 182, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>.
3. Graham, B.S., e Sullivan, N.J. (2018). Malattie virali emergenti dal punto di vista della vaccinologia: prepararsi alla prossima pandemia. *Nat. Immunol.* 19, 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0007-9>.
4. Belongia, E.A., Simpson, M.D., King, J.P., Sundaram, M.E., Kelley, N.S., Osterholm, M.T., e McLean, H.Q. (2016). Efficacia variabile del vaccino antinfluenzale in base al sottotipo: una revisione sistematica e una meta-analisi di studi con disegno test-negativo. *Lancet Infect. Dis.* 16, 942–951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8).
5. Memoli, M.J., Han, A., Walters, K.A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Angela Rosas, L., Cervantes-Medina, A., Park, J.K., Morens, D.M., et al. (2020). Reinfezione da influenza A in sfida sequenziale sull'uomo: implicazioni per l'immunità protettiva e lo sviluppo di un vaccino "universale". *Clin. Infect. Dis.* 70, 748–753. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz281>.
6. Tricco, A.C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M.H., Tashkandi, M., Bauch, C.T., e Loeb, M. (2013). Confronto dell'efficacia del vaccino antinfluenzale contro ceppi non corrispondenti e corrispondenti: una revisione sistematica e una meta-analisi. *BMC Med.* 11, 153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>.
7. Langmuir, A.D., Henderson, D.A. e Serfling, R.E. (1964). Le basi epidemiologiche per il controllo dell'influenza. *Am. J. Public Health Nations Health* 54, 563–571. <https://doi.org/10.2105/ajph.54.4.563>.
8. Morens, D.M., e Taubenberger, J.K. (2019). Realizzazione di vaccini antinfluenzali universali: lezioni dalla pandemia del 1918. *J. Infect. Dis.* 219, S5–S13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy728>.
9. Schmid, P., Rauber, D., Betsch, C., Lidolt, G., e Denker, M.L. (2017). Ostacoli all'intenzione e al comportamento di vaccinazione antinfluenzale - Una revisione sistematica dell'esitazione nei confronti del vaccino antinfluenzale, 2005–2016. *PLoS One* 12, e0170550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170550>.
10. Erbeling, E.J., Post, D.J., Stemmy, E.J., Roberts, P.C., Augustine, A.D., Ferguson, S., Paules, C.I., Graham, B.S. e Fauci, A.S. (2018). Un univer-

- Vaccino antinfluenzale: il piano strategico dell'Istituto Nazionale di Allergie e Malattie Infettive. *J. Infect. Dis.* 218, 347–354. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy103>.
11. CIRDRAP (2022). La roadmap dei vaccini antinfluenzali: panorama tecnologico dei vaccini antinfluenzali universali. <https://ivr.cidrap.umn.edu/universal-influenza-vaccine-technology-landscape>.
 12. Golob, J.L., Lugogo, N., Luring, A.S. e Lok, A.S. (2021). Vaccini SARS-CoV-2: un trionfo della scienza e della collaborazione. *JCI Insight* 6, e149187. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.149187>.
 13. Liu, M. e Li, Y. (2022). Progressi nei vaccini contro il COVID-19 e nuove varianti del coronavirus. *Front. Med.* 9, 888631. Losanna. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.888631>.
 14. Sette, A., e Crotty, S. (2022). Memoria immunologica dell'infezione da SARS-CoV-2 e dei vaccini contro il COVID-19. *Immunol. Rev.* 310, 27–46. <https://doi.org/10.1111/imr.13089>.
 15. Shrestha, L.B., Foster, C., Rawlinson, W., Tedla, N., e Bull, R.A. (2022). Evoluzione delle varianti omicron BA.1-BA.5 del SARS-CoV-2: implicazioni per la fuga immunitaria e la trasmissione. *Rev. Med. Virol.* 32, e2381. <https://doi.org/10.1002/rmv.2381>.
 16. Bergeron, H.C. e Tripp, R.A. (2021). Immunopatologia dell'RSV: una revisione aggiornata. *Viruses* 13, 2478. <https://doi.org/10.3390/v13122478>.
 17. Bueno, S.M., Gonza'lez, P.A., Pacheco, R., Leiva, E.D., Cautivo, K.M., To-bar, H.E., Mora, J.E., Prado, C.E., Zu'ñiga, J.P., Jime'nez, J., et al. (2008). Immunità dell'ospite durante la patogenesi dell'RSV. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1320–1329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.012>.
 18. Habibi, M.S., Jozwik, A., Makris, S., Dunning, J., Paras, A., DeVincenzo, J.P., de Haan, C.A., Wrammert, J., Openshaw, P.J., Chiu, C., et al. (2015). Protezione mediata dagli anticorpi compromessa e memoria delle cellule B IgA difettosa nell'infezione sperimentale di adulti con virus respiratorio sinciziale. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1040–1049. <https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2256OC>.
 19. Lambert, L., Sagfors, A.M., Openshaw, P.J. e Culley, F.J. (2014). Immunità al RSV nella prima infanzia. *Front. Immunol.* 5, 466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00466>.
 20. Shadman, K.A. e Wald, E.R. (2011). Una revisione del palivizumab e delle terapie emergenti per il virus respiratorio sinciziale. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1455–1467. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.608062>.
 21. Shi, T., McAllister, D.A., O'Brien, K.L., Simoes, E.A.F., Madhi, S.A., Gessner, B.D., Polack, F.P., Balsells, E., Acacio, S., Aguayo, C., et al. (2017). Stime globali, regionali e nazionali del carico di malattia delle infezioni acute delle vie respiratorie inferiori dovute al virus respiratorio sinciziale nei bambini piccoli nel 2015: una revisione sistematica e uno studio di modellizzazione. *Lancet* 390, 946–958. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8).
 22. Callow, K.A., Parry, H.F., Sergeant, M. e Tyrrell, D.A. (1990). Andamento temporale della risposta immunitaria all'infezione sperimentale da coronavirus nell'uomo. *Epidemiol. Infect.* 105, 435–446. <https://doi.org/10.1017/s0950268800048019>.
 23. Carden'oso Domingo, L., Roy Vallejo, E., Zurita Cruz, N.D., Chicot Llano, M., A'valos Pe'rez-Urria, E., Barrios, A., Hernando Santos, J., Ortiz, J., Ro-dri'guez Garc'a, S.C., Mart'i'n Ram'i'ez, A., et al. (2022). SARS rilevante La viremia da CoV-2 è associata alla gravità del COVID-19: studio prospettico di coorte e coorte di validazione. *J. Med. Virol.* 94, 5260–5270. <https://doi.org/10.1002/jmv.27989>.
 24. Jacobs, J.L., e Mellors, J.W. (2021). Rilevazione dell'RNA del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) nel sangue di pazienti affetti da malattia da coronavirus 2019 (COVID-19): cosa significa? *Clin. Infect. Dis.* 73, e2898–e2900. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1316>.
 25. Campbell, A.P., Jacob, S.T., Kuypers, J., Wald, A., Englund, J.A., Corey, L. e Boeckh, M. (2010). Insufficienza respiratoria causata dal nuovo virus dell'influenza A/H1N1 del 2009 in un ricevente di trapianto di cellule staminali ematopoietiche: rilevamento di RNA H1N1 extrapolmonare e uso di peramivir per via endovenosa. *Ann. Intern. Med.* 152, 619–620. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-9-201005040-00022>.
 26. Lee, N., Chan, P.K., Wong, C.K., Wong, K.T., Choi, K.W., Joynt, G.M., Lam, P., Chan, M.C., Wong, B.C., Lui, G.C., et al. (2011). Clearance virale e modelli di risposta infiammatoria negli adulti ricoverati in ospedale per pandemia

- Polmonite da virus dell'influenza A(H1N1) del 2009. *Antivir. Ther.* 16, 237–247. <https://doi.org/10.3851/IMP1722>.
27. Yewdell, J.W. (2021). Gli individui non possono fare affidamento sull'immunità di gregge al COVID-19: l'immunità duratura alle malattie virali è limitata ai virus con diffusione virale obbligatoria. *PLoS Pathog.* 17, e1009509. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009509>.
28. Holmes, E.C. (2003). Soglie di errore e limiti all'evoluzione dei virus a RNA. *Trends Microbiol.* 11, 543–546. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.10.006>.
29. Fulton, B.O., Sachs, D., Beaty, S.M., Won, S.T., Lee, B., Palese, P. e Heaton, N.S. (2015). L'analisi mutazionale del virus del morbillo suggerisce vincoli alla variazione antigenica delle glicoproteine. *Cell Rep.* 11, 1331–1338. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.054>.
30. Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al. (2008). Selezione dei ceppi vaccinali antinfluenzali e studi recenti sulla migrazione globale dei virus influenzali stagionali. *Vaccine* 26, D31–D34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.078>.
31. Taubenberger, J.K., e Kash, J.C. (2010). Evoluzione del virus dell'influenza, adattamento all'ospite e formazione della pandemia. *Cell Host Microbe* 7, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>.
32. Altman, M.O., Angel, M., Ko'si'k, I., Trova' o, N.S., Zost, S.J., Gibbs, J.S., Casalino, L., Amaro, R.E., Hensley, S.E., Nelson, M.I., e Yewdell, J.W. (2019). L'evoluzione dei glicani dell'emoagglutina del virus dell'influenza umana A segue un modello temporale fino a un limite glicano. *mBio* 10, e. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-19>.
33. van der Straten, K., Guerra, D., van Gils, M.J., Bontjer, I., Caniels, T.G., van Willigen, H.D.G., Wynberg, E., Poniman, M., Burger, J.A., Bouhuijs, J.H., et al. (2022). La cartografia antigenica utilizzando sieri provenienti da infezioni da varianti preoccupanti di SARS-CoV-2 confermate dalla sequenza rivela la divergenza antigenica di Omicron. *Immunity* 55, 1725–1731.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.07.018>.
34. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., e Fauci, A.S. (2022). Vaccini universali contro il coronavirus: un'esigenza urgente. *N. Engl. J. Med.* 386, 297–299. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2118468>.
35. Tang, J., Zeng, C., Cox, T.M., Li, C., Son, Y.M., Cheon, I.S., Wu, Y., Behl, S., Taylor, J.J., Chakarabarty, R., et al. (2022). Immunità delle mucose respiratorie contro il SARS-CoV-2 dopo la vaccinazione con mRNA. *Sci. Immunol.* 7, eadd4853. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4853>.
36. Do, L.A.H., Wilm, A., van Doorn, H.R., Lam, H.M., Sim, S., Sukumaran, R., Tran, A.T., Nguyen, B.H., Tran, T.T.L., Tran, Q.H., et al. (2015). Il sequenziamento diretto dell'intero genoma dei virus respiratori sinciziali umani A e B provenienti da bambini vietnamiti identifica modelli distinti di evoluzione inter- e intra-ospite. *J. Gen. Virol.* 96, 3470–3483. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000298>.
37. Rios Guzman, E., e Hultquist, J.F. (2022). Conseguenze cliniche e biologiche della diversità genetica del virus respiratorio sinciziale. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 9, 20499361221128091. <https://doi.org/10.1177/20499361221128091>.
38. Tan, L., Lemey, P., Houspie, L., Viveen, M.C., Jansen, N.J., van Loon, A.M., Wiertz, E., van Bleek, G.M., Martin, D.P., e Coenjaerts, F.E. (2012). Variabilità genetica tra i genomi completi del sottogruppo A del virus respiratorio sinciziale umano: collegamento tra dinamiche evolutive molecolari ed epidemiologia. *PLoS One* 7, e51439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051439>.
39. Bont, L., Versteegh, J., Swelsen, W.T., Heijnen, C.J., Kavelaars, A., Brus, F., Draaisma, J.M., Pekelharing-Berghuis, M., van Diemen-Steenvoorde, R.A. e Kimpen, J.L. (2002). La reinfezione naturale con il virus respiratorio sinciziale non potenzia l'immunità delle cellule T specifiche per il virus. *Pediatr. Res.* 52, 363–367. <https://doi.org/10.1203/00006450-200209000-00009>.
40. Yang, K., e Varga, S.M. (2014). Vaccini mucosali contro il virus respiratorio sinciziale. *Curr. Opin. Virol.* 6, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.009>.
41. Newton, A.H., Cardani, A., e Braciale, T.J. (2016). La risposta immunitaria dell'ospite nell'infezione da virus respiratorio: equilibrio tra eliminazione del virus e immunopatologia. *Semin. Immunopathol.* 38, 471–482. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>.
42. Medzhitov, R., Schneider, D.S., e Soares, M.P. (2012). La tolleranza alle malattie come strategia di difesa. *Science* 335, 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>.
43. Iwasaki, A., Foxman, E.F. e Molony, R.D. (2017). Prime difese immunitarie locali nel tratto respiratorio. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>.
44. Low, N., Bavdekar, A., Jeyaseelan, L., Hirve, S., Ramanathan, K., Andrews, N.J., Shaikh, N., Jadi, R.S., Rajagopal, A., Brown, K.E., et al. (2015). Uno studio randomizzato e controllato su un vaccino aerosolizzato contro il morbillo. *N. Engl. J. Med.* 372, 1519–1529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407417>.
45. James, K.R., Elmentait, R., Teichmann, S.A., e Hold, G.L. (2022). Ridefinire l'immunità intestinale con la trascrittomica a singola cellula. *Mucosal Immunol.* 15, 531–541. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00470-y>.
46. Bekkering, S., Domínguez-André's, J., Joosten, L.A.B., Riksen, N.P. e Netea, M.G. (2021). Immunità addestrata: riprogrammazione dell'immunità innata nella salute e nella malattia. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 667–693. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>.
47. Netea, M.G., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Domínguez-André's, J., Cur-tis, N., van Crevel, R., van de Veerdonk, F.L., e Bonten, M. (2020). Immunità addestrata: uno strumento per ridurre la suscettibilità e la gravità dell'infezione da SARS-CoV-2. *Cell* 181, 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.042>.
48. Netea, M.G., Quintin, J. e van der Meer, J.W. (2011). Immunità addestrata: una memoria per la difesa innata dell'ospite. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>.
49. Randall, T.D., e Mebius, R.E. (2014). Lo sviluppo e la funzione dei tessuti linfoidi mucosali: un equilibrio con i microrganismi. *Mucosal Immunol.* 7, 455–466. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.11>.
50. Xing, Z., Afkhami, S., Bavananthasivam, J., Fritz, D.K., D'Agostino, M.R., Vaseghi-Shanjani, M., Yao, Y., e Jeyanathan, M. (2020). Memoria immunitaria innata dei macrofagi residenti nei tessuti e immunità innata addestrata: rinnovamento del concetto e delle strategie vaccinali. *J. Leukoc. Biol.* 108, 825–834. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0220-446R>.
51. Denney, L., e Ho, L.P. (2018). Il ruolo dell'epitelio respiratorio nella difesa dell'ospite contro l'infezione da virus influenzale. *Biomed J.* 41, 218–233. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.08.004>.
52. Zimmermann, P., e Curtis, N. (2019). Fattori che influenzano la risposta immunitaria alla vaccinazione. *Clin. Microbiol. Rev.* 32, e00084–e00018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-18>.
53. Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., e Iwasaki, A. (2011). Il microbiota regola la difesa immunitaria contro l'infezione da virus dell'influenza A delle vie respiratorie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5354–5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>.
54. Hagan, T., Cortese, M., Rouphael, N., Boudreau, C., Linde, C., Maddur, M.S., Das, J., Wang, H., Guthmiller, J., Zheng, N.Y., et al. (2019). La perturbazione del microbioma intestinale causata dagli antibiotici altera l'immunità ai vaccini negli esseri umani. *Cell* 178, 1313–1328.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.010>.
55. Oh, J.Z., Ravindran, R., Chassaing, B., Carvalho, F.A., Maddur, M.S., Bower, M., Hakimpour, P., Gill, K.P., Nakaya, H.I., Yarovinsky, F., et al. (2014). Il rilevamento del microbiota intestinale mediato dal TLR5 è necessario per le risposte anticorpali alla vaccinazione contro l'influenza stagionale. *Immunity* 41, 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.009>.
56. Bradley, K.C., Finsterbusch, K., Schnepf, D., Crotta, S., Llorian, M., Davidson, S., Fuchs, S.Y., Staeheli, P., e Wack, A. (2019). I segnali tonici dell'interferone guidati dal microbiota nelle cellule stromali polmonari proteggono dall'infezione da virus influenzale. *Cell Rep.* 28, 245–256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.105>.
57. Crane, M.J., Lee, K.M., FitzGerald, E.S. e Jamieson, A.M. (2018). Sopravvivere alle infezioni polmonari mortali: meccanismi di tolleranza innata dell'ospite nel sistema polmonare. *Front. Immunol.* 9, 1421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01421>.
58. Gould, V.M.W., Francis, J.N., Anderson, K.J., Georges, B., Cope, A.V. e Tregoning, J.S. (2017). L'IgA nasale fornisce protezione contro l'influenza umana.

- Esposizione all'influenza in volontari con basso titolo anticorpale sierico contro l'influenza. *Front. Microbiol.* 8, 900. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00900>.
59. Hansen, I.S., Baeten, D.L.P. e den Dunnen, J. (2019). La funzione infiammatoria delle IgA umane. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1041–1055. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2976-8>.
 60. Holtzman, M.J., Byers, D.E., Alexander-Brett, J. e Wang, X. (2014). Il ruolo delle cellule epiteliali delle vie aeree e delle cellule immunitarie innate nelle malattie respiratorie croniche. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nri3739>.
 61. Lamichhane, A., Azegam, T. e Kiyono, H. (2014). Il sistema immunitario delle mucose per lo sviluppo di vaccini. *Vaccine* 32, 6711–6723. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.089>.
 62. Whitsett, J.A., e Alenghat, T. (2015). Le cellule epiteliali respiratorie orchestrano l'immunità innata polmonare. *Nat. Immunol.* 16, 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.
 63. Zimmermann, P., e Curtis, N. (2018). L'influenza del microbioma intestinale sulle risposte ai vaccini. *Vaccine* 36, 4433–4439. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.066>.
 64. Sterlin, D., Mathian, A., Miyara, M., Mohr, A., Anna, F., Claes, L., Quentrec, P., Fadlallah, J., Devilliers, H., Ghilani, P., et al. (2021). L'IgA domina la risposta anticorpale neutralizzante precoce al SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 13, eabd2223. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2223>.
 65. Taylor, H.P., e Dimmock, N.J. (1985). Il meccanismo di neutralizzazione del virus dell'influenza da parte delle IgA secretorie è diverso da quello delle IgA o IgG monomeriche. *J. Exp. Med.* 161, 198–209. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.198>.
 66. Corthe'sy, B. (2013). Funzioni multifattoriali dell'IgA secretoria sulle superfici mucosali. *Front. Immunol.* 4, 185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>.
 67. Ben Mkaddem, S., Rossato, E., Heming, N. e Monteiro, R.C. (2013). Ruolo antinfiammatorio del recettore Fc delle IgA (CD89): dall'autoimmunità alle prospettive terapeutiche. *Autoimmun. Rev.* 12, 666–669. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.10.011>.
 68. Callow, K.A. (1985). Effetto dell'immunità umorale specifica e di alcuni fattori non specifici sulla resistenza dei volontari all'infezione respiratoria da coronavirus. *J. Hyg.* 95, 173–189. <https://doi.org/10.1017/S0022172400062410>.
 69. Favre, L., Spertini, F. e Corthe'sy, B. (2005). L'IgA secretoria possiede proprietà modulanti intrinseche che stimolano le risposte immunitarie mucosali e sistemiche. *J. Immunol.* 175, 2793–2800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2793>.
 70. Rose, M.A. (2014). Mucosal immunization in perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 2115–2117. <https://doi.org/10.4161/hv.29609>.
 71. Suzuki, T., Aina, A. e Hasegawa, H. (2017). Caratteristiche funzionali e strutturali degli anticorpi IgA secretori indotti dai vaccini mucosali contro il virus dell'influenza. *Vaccine* 35, 5297–5302. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.093>.
 72. Wiseman, D.J., Thwaites, R.S., Drysdale, S.B., Janet, S., Donaldson, G.C., Wedzicha, J.A. e Openshaw, P.J.; Ricercatori RESCEU (2020). Biomarcatori immunologici e infiammatori di suscettibilità e gravità nelle infezioni da virus respiratorio sinciziale negli adulti. *J. Infect. Dis.* 222, S584–S591. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa063>.
 73. Russell, C.D., Unger, S.A., Walton, M. e Schwarze, J. (2017). La risposta immunitaria umana all'infezione da virus respiratorio sinciziale. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 481–502. <https://doi.org/10.1128/CMR.00090-16>.
 74. Takamatsu, Y., Omata, K., Shimizu, Y., Kinoshita-Iwamoto, N., Terada, M., Suzuki, T., Morioka, S., Uemura, Y., Ohmagari, N., Maeda, K. e Mitsuya, H. (2022). La risposta umorale IgA neutralizzante il SARS-CoV-2 si verifica prima, ma è modesta e diminuisce più rapidamente rispetto alla risposta IgG. *Mi-crobiol. Spectr.* e0271622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02716-22>.
 75. Ameratunga, R., Leung, E., Woon, S.T., Lea, E., Allan, C., Chan, L., Steele, R., Lehnert, K. e Longhurst, H. (2022). La carenza selettiva di IgA può essere un fattore di rischio sottovalutato per il COVID-19 grave. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.10.002>.
 76. Li, M., Wang, Y., Sun, Y., Cui, H., Zhu, S.J. e Qiu, H.J. (2020). Vaccini mucosali: strategie e sfide. *Immunol. Lett.* 217, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.013>.
 77. Irving, A.T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D.E. e Wang, L.F. (2021). Lezioni dalle difese dell'ospite dei pipistrelli, un serbatoio virale unico. *Nature* 589, 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>.
 78. Arneth, B. (2021). Immunità innata addestrata. *Immunol. Res.* 69, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09170-y>.
 79. Smith, C.B., Purcell, R.H., Bellanti, J.A. e Chanock, R.M. (1966). Effetto protettivo dell'anticorpo contro il virus della parainfluenza di tipo 1. *N. Engl. J. Med.* 275, 1145–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJM196611242752101>.
 80. Plotkin, S.A. (2020). Aggiornamenti sui correlati immunologici della protezione indotta dal vaccino. *Vaccine* 38, 2250–2257. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.046>.
 81. Russell, M.W., Moldoveanu, Z., Ogra, P.L. e Mestecky, J. (2020). Immunità mucosale nel COVID-19: un aspetto trascurato ma fondamentale dell'infezione da SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* 11, 611337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611337>.
 82. Lavelle, E.C., e Ward, R.W. (2022). Vaccini mucosali: rafforzare le frontiere. *Nat. Rev. Immunol.* 22, 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00583-2>.
 83. Schenkel, J.M., e Masopust, D. (2014). Cellule T di memoria residenti nei tessuti. *Immunity* 41, 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>.
 84. Allie, S.R., e Randall, T.D. (2017). Immunità polmonare ai virus. *Clin. Sci. (Lond.)* 131, 1737–1762. <https://doi.org/10.1042/CS20160259>.
 85. Seong, Y., Lazarus, N.H., Sutherland, L., Habtezion, A., Abramson, T., He, X.S., Greenberg, H.B. e Butcher, E.C. (2017). Le firme dei recettori di traffico definiscono i plasmablasti del sangue che rispondono alla sfida immunitaria specifica dei tessuti. *JCI Insight* 2, e90233. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90233>.
 86. Turner, D.L., Bickham, K.L., Thome, J.J., Kim, C.Y., D'Ovidio, F., Wherry, E.J. e Farber, D.L. (2014). Nicchie polmonari per la generazione e il mantenimento dei linfociti T di memoria residenti nei tessuti. *Mucosal Immunol.* 7, 501–510. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.67>.
 87. Sheikh-Mohamed, S., Sanders, E.C., Gommerman, J.L. e Tal, M.C. (2022). Guardiani della galassia orale e rinofaringea: IgA e protezione contro l'infezione da SARS-CoV-2. *Immunol. Rev.* 309, 75–85. <https://doi.org/10.1111/imr.13118>.
 88. Primorac, D., Vrdoljak, K., Brlek, P., Pavelić, E., Molnar, V., Matić, V., Erceg Ivko, I. e Parčina, M. (2022). Risposte immunitarie adattative e immunità al SARS-CoV-2. *Front. Immunol.* 13, 848582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.848582>.
 89. Mouro, V. e Fischer, A. (2022). Affrontare una pandemia virale delle mucose: lezioni dai vaccini contro il COVID-19. *Mucosal Immunol.* 15, 584–594. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00517-8>.
 90. Hennings, V., Thörn, K., Albinsson, S., Lingblom, C., Andersson, K., Andersson, C., Järfur, K., Pullerits, R., Idom, M., Paludan, S.R., et al. (2022). La presenza di IgA anti-SARS-CoV-2 nel siero sembra proteggere gli operatori sanitari di base dal COVID-19. *Eur. J. Immunol.* 52, 800–809. <https://doi.org/10.1002/eji.202149655>.
 91. Luke, T.C., Kilbane, E.M., Jackson, J.L. e Hoffman, S.L. (2006). Meta-analisi: prodotti ematici da convalescenti per la polmonite da influenza spagnola: un futuro trattamento per l'H5N1? *Ann. Intern. Med.* 145, 599–609. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139>.
 92. Smorodintzev, A.A., Gulamov, A.G. e Tschalkina, O.M. (1940). Über die spezifische Prophylaxe der epidemischen Grippe durch Inhalation antigrippösen Serums. *Z. Klin. Med.* 138, 687–806.
 93. Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Anticorpi neutralizzanti derivati dalle cellule B dei sopravvissuti alla pandemia influenzale del 1918. *Nature* 455, 532–536. <https://doi.org/10.1038/nature07231>.

94. Englund, J.A. (1994). Protezione passiva contro la malattia da virus respiratorio sinciziale nei neonati: il ruolo degli anticorpi materni. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, 449–453. <https://doi.org/10.1097/00006454-199405000-00037>.
95. Renegar, K.B., Small, P.A., Jr., Boykins, L.G. e Wright, P.F. (2004). Ruolo delle IgA rispetto alle IgG nel controllo dell'infezione virale influenzale nel tratto respiratorio murino. *J. Immunol.* 173, 1978–1986. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1978>.
96. Morens, D.M., Taubenberger, J.K. e Fauci, A.S. (2008). Ruolo predominante della polmonite batterica come causa di morte nell'influenza pandemica: implicazioni per la preparazione all'influenza pandemica. *J. Infect. Dis.* 198, 962–970. <https://doi.org/10.1086/591708>.
97. Rowe, H.M., Livingston, B., Margolis, E., Davis, A., Meliopoulos, V.A., Echlin, H., Schultz-Cherry, S. e Rosch, J.W. (2020). I batteri respiratori stabilizzano e favoriscono la trasmissione per via aerea del virus dell'influenza A. *mSystems* 5, e00762–e00720. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00762-20>.
98. Morens, D.M., e Taubenberger, J.K. (2015). Un'epidemia dimenticata che ha cambiato la medicina: il morbillo nell'esercito statunitense, 1917–18. *Lancet Infect. Dis.* 15, 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00109-7).
99. Szabo, P.A., Miron, M., e Farber, D.L. (2019). Posizione, posizione, posizione: cellule T di memoria residenti nei tessuti nei topi e negli esseri umani. *Sci. Immunol.* 4, eaas9673. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>.
100. Gray, J.I. e Farber, D.L. (2022). Cellule immunitarie residenti nei tessuti nell'uomo. *Annu. Rev. Immunol.* 40, 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-112809>.
101. Krammer, F. (2021). Correlazioni di protezione dall'infezione da SARS-CoV-2. *Lancet* 397, 1421–1423. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00782-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00782-0).
102. Hall, V., Foulkes, S., Insalata, F., Saei, A., Kirwan, P., Atti, A., Wellington, E., Khawam, J., Munro, K., Cole, M., et al. (2021). Efficacia e durata della protezione contro future infezioni da SARS-CoV-2 conferita dalla vaccinazione contro il COVID-19 e da precedenti infezioni; risultati dello studio prospettico di coorte SIREN condotto nel Regno Unito su operatori sanitari da marzo 2020 a settembre 2021. Preprint su medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.21267006>.
103. Brown, T.A., Murphy, B.R., Radl, J., Haaijman, J.J. e Mestecky, J. (1985). Distribuzione delle sottoclassi e forma molecolare degli anticorpi immunoglobulina A emoagglutinina nel siero e nelle secrezioni nasali dopo infezione secondaria sperimentale con virus dell'influenza A nell'uomo. *J. Clin. Microbiol.* 22, 259–264. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.2.259-264.1985>.
104. Dolin, R., Richman, D.D., Murphy, B.R. e Fauci, A.S. (1977). Risposte immunitarie cellulo-mediate nell'uomo dopo infezione indotta con il virus dell'influenza A. *J. Infect. Dis.* 135, 714–719. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.5.714>.
105. Ng, S., Nachbagauer, R., Balmaseda, A., Stadlbauer, D., Ojeda, S., Patel, M., Rajabhatthor, A., Lopez, R., Guglia, A.F., Sanchez, N., et al. (2019). Nuove correlazioni di protezione contro l'infezione da virus dell'influenza A H1N1 pandemica. *Nat. Med.* 25, 962–967. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0463-x>.
106. Hayward, A.C., Wang, L., Goonetilleke, N., Fragaszy, E.B., Birmingham, A., Copas, A., Dukes, O., Millett, E.R., Nazareth, I., Nguyen-Van-Tam, J.S., et al. (2015). Protezione naturale mediata dai linfociti T contro l'influenza stagionale e pandemica. Risultati dello studio di coorte Flu Watch. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1422–1431. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-1988OC>.
107. Sridhar, S., Begom, S., Birmingham, A., Hoschler, K., Adamson, W., Carman, W., Bean, T., Barclay, W., Deeks, J.J. e Lalvani, A. (2013). Correlati immunitari cellulari di protezione contro l'influenza pandemica sintomatica. *Nat. Med.* 19, 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/nm.3350>.
108. Wright, P.F., Hoen, A.G., Ilyushina, N.A., Brown, E.P., Ackerman, M.E., Wieland-Alter, W., Connor, R.I., Jegaskanda, S., Rosenberg-Hasson, Y., Haynes, B.C., et al. (2016). Correlazioni dell'immunità all'influenza determinate dall'esposizione di bambini al vaccino antinfluenzale vivo attenuato. *Open Forum Infect. Dis.* 3, ofw108. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw108>.
109. Kosik, I., Angeletti, D., Gibbs, J.S., Angel, M., Takeda, K., Kosikova, M., Nair, V., Hickman, H.D., Xie, H., Brooke, C.B., e Yewdell, J.W. (2019). L'inibizione della neuraminidasi contribuisce alla neutralizzazione del virus dell'influenza A da parte degli anticorpi anti-stelo emoagglutinina. *J. Exp. Med.* 216, 304–316. <https://doi.org/10.1084/jem.20181624>.
110. Memoli, M.J., Shaw, P.A., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Fargis, S., Riso, K., Powers, J.H., et al. (2016). Valutazione degli anticorpi anti-emoagglutinina e anti-neuraminidasi come correlati di protezione in un modello di sfida umana sana con il virus dell'influenza A/H1N1. *mBio* 7, e00417–e00416. <https://doi.org/10.1128/mBio.00417-16>.
111. Park, J.K., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., Ro-sas, L.A., Cervantes-Medina, A., Taubenberger, J.K. e Memoli, M.J. (2018). Valutazione dell'anticorpo anti-emoagglutinina preesistente come correlato di protezione in un volontario sano esposto al virus dell'influenza A/H1N1pdm. *mBio* 9, e02284–e02217. <https://doi.org/10.1128/mBio.02284-17>.
112. Eichelberger, M.C., Morens, D.M. e Taubenberger, J.K. (2018). La neuraminidasi come antigene del vaccino antinfluenzale: un obiettivo facile da raggiungere, pronto per essere sfruttato per migliorare l'efficacia del vaccino. *Curr. Opin. Immunol.* 53, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025>.
113. Cox, R.J., Brokstad, K.A. e Ogra, P. (2004). Virus dell'influenza: strategie di immunità e vaccinazione. Confronto tra la risposta immunitaria ai vaccini antinfluenzali inattivati e quelli vivi attenuati. *Scand. J. Immunol.* 59, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01382.x>.
114. Alcendor, D.J., Matthews-Juarez, P., Smoot, D., Hildreth, J.E.K., Lamar, K., Tabatabai, M., Wilus, D. e Juarez, P.D. (2022). Infezioni da COVID-19 negli Stati Uniti: implicazioni per il prolungamento della pandemia. *Vaccini* 10, 755. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050755>.
115. Demicheli, V., Jefferson, T., Di Pietrantonj, C., Ferroni, E., Thorming, S., Thomas, R.E. e Rivetti, A. (2018). Vaccini per la prevenzione dell'influenza negli anziani. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD004876. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004876.pub4>.
116. Vardeny, O., Kim, K., Udell, J.A., Joseph, J., Desai, A.S., Farkouh, M.E., Hegde, S.M., Hernandez, A.F., McGeer, A., Talbot, H.K., et al. (2021). Effetto del vaccino antinfluenzale trivalente ad alto dosaggio rispetto al vaccino quadrivalente a dosaggio standard sulla mortalità o sui ricoveri ospedalieri per cause cardiopolmonari in pazienti con malattie cardiovascolari ad alto rischio: uno studio clinico randomizzato. *JAMA* 325, 39–49. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.23649>.
117. Lee, J.S., Yoon, S., Han, S.J., Kim, E.D., Kim, J., Shin, H.S. e Seo, K.Y. (2022). Vaccinazione con collirio: una via di immunizzazione promettente per una risposta efficace alle pandemie. *Expert Rev. Vaccines* 21, 91–101. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2008246>.
118. Calzas, C. e Chevalier, C. (2019). Formulazioni innovative di vaccini mucosali contro le infezioni da virus dell'influenza A. *Front. Immunol.* 10, 1605. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01605>.
119. Hodgins, B., Pillet, S., Landry, N., e Ward, B.J. (2019). La vaccinazione prime-pull con un vaccino antinfluenzale a particelle simili al virus di origine vegetale provoca un'ampia risposta immunitaria e protegge i topi anziani dalla morte e dalla fragilità dopo l'esposizione al virus. *Immun. Ageing* 16, 27. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0167-6>.
120. Chung, H., Kim, E.A. e Chang, J. (2021). Una strategia "prime and deploy" per un vaccino antinfluenzale universale mirato alla nucleoproteina induce cellule T CD8 di memoria residenti nei polmoni. *Immune Netw.* 21, e28. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e28>.
121. Gary, E.N., Tursi, N.J., Warner, B., Parzych, E.M., Ali, A.R., FRASE, D., Moffat, E., Embury-Hyatt, C., Smith, T.R.F., Broderick, K.E., et al. (2022). L'adiuvante chemochinico mucosale potenzia le risposte mediate dal vaccino synDNA al SARS-CoV-2 e fornisce protezione eterologa in vivo. *Cell. Reprod. Med.* 3, 100693. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100693>.
122. Bernstein, D.I., Cardin, R.D., Bravo, F.J., Awasthi, S., Lu, P., Pullum, D.A., Dixon, D.A., Iwasaki, A. e Friedman, H.M. (2019). Applicazione di successo della strategia prime and pull per un vaccino terapeutico contro l'HSV. *npj Vaccines* 4, 33. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0129-1>.
123. Poehling, K.A., Caspard, H., Peters, T.R., Belongia, E.A., Congeni, B., Gaglani, M., Griffin, M.R., Irving, S.A., Kavathekar, P.K., McLean, H.Q., et al. (2018). Efficacia dei vaccini antinfluenzali vivi attenuati e inattivati nei bambini negli Stati Uniti nel periodo 2015-2016. *Clin. Infect. Dis.* 66, 665–672. <https://doi.org/10.1093/cid/cix869>.

124. Isakova-Sivak, I., Matyushenko, V., Kotomina, T., Kiseleva, I., Krutikova, E., Donina, S., Reksin, A., Larionova, N., Mezhenkaya, D., Sivak, K., et al. (2019). L'immunizzazione sequenziale con vaccini candidati universali vivi attenuati contro l'influenza protegge i furetti da un'esposizione a dosi elevate di virus eterologhi. *Vaccini* 7, 61. Basilea. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030061>.
125. Angeletti, D., Kosik, I., Santos, J.J.S., Yewdell, W.T., Boudreau, C.M., Mallajosyula, V.V.A., Mankowski, M.C., Chambers, M., Prabhakaran, M., Hickman, H.D., et al. (2019). Superare l'immunodominanza per colpire epitopi subdominanti ampiamente neutralizzanti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 13474–13479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816300116>.
126. Price, W.H., e Thind, I.S. (1972). Il meccanismo di protezione incrociata offerto dal virus della dengue contro il virus del Nilo occidentale nei criceti. *J. Hyg.* 70, 611–617. Lond. <https://doi.org/10.1017/S0022172400022476>.
127. Park, J., Fong Legaspi, S.L., Schwartzman, L.M., Gygli, S.M., Sheng, Z.M., Freeman, A.D., Matthews, L.M., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Batchen-kova, N.A., et al. (2022). Un vaccino multivalente inattivato contro il virus dell'influenza A offre un'ampia protezione nei topi e nei furetti. *Sci. Transl. Med.* 14, eabo2167. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo2167>.
128. Folschweiller, N., Vanden Abeele, C., Chu, L., Van Damme, P., Garci'a-Sastre, A., Krammer, F., Nachbagauer, R., Palese, P., Solo' rzano, A., Bi, D., et al. (2022). Reattogenicità, sicurezza e immunogenicità dei vaccini antinfluenzali a virioni frazionati con emoagglutina chimerica, con adiuvante AS01 o AS03 o senza adiuvante: uno studio controllato randomizzato di fase 1-2. *Lancet Infect. Dis.* 22, 1062-1075. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00024-X).
129. Daricarré, N., Qiu, Y., Kanekiyo, M., Creanga, A., Gillespie, R.A., Moin, S.M., Saleh, J., Sancho, J., Chou, T.H., Zhou, Y., et al. (2021). Ampia neutralizzazione dei virus H1 e H3 mediante vaccini antinfluenzali HA con adiuvante nei primati non umani. *Sci. Transl. Med.* 13, eabe5449. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe5449>.
130. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P. e Katinger, H. (1996). L'anticorpo monoclonale umano 2G12 definisce un epitopo di neutralizzazione distintivo sulla glicoproteina gp120 del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1. *J. Virol.* 70, 1100–1108. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.2.1100-1108.1996>.
131. Saelens, X. (2019). Il ruolo dell'ectodominio della proteina matrice 2 nello sviluppo di vaccini antinfluenzali universali. *J. Infect. Dis.* 219, S68–S74. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz003>.
132. Han, A., Czajkowski, L., Rosas, L.A., Cervantes-Medina, A., Xiao, Y., Gouzoulis, M., Lumbard, K., Hunsberger, S., Reed, S., Athota, R., et al. (2021). Sicurezza ed efficacia del CR6261 in un modello di sfida umana sana con influenza A H1N1. *Clin. Infect. Dis.* 73, e4260–e4268. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1725>.
133. Park, J.K., Xiao, Y., Ramuta, M.D., Rosas, L.A., Fong, S., Matthews, A.M., Freeman, A.D., Gouzoulis, M.A., Batchenkova, N.A., Yang, X., et al. (2020). L'immunità preesistente allo stelo dell'emoagglutina del virus dell'influenza potrebbe favorire la selezione di virus mutanti in grado di eludere gli anticorpi in un modello di sfida umana. *Nat. Med.* 26, 1240–1246. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0937-x>.
134. Tungatt, K., Dolton, G., Morgan, S.B., Attaf, M., Fuller, A., Whalley, T., Hemmink, J.D., Porter, E., Szomolay, B., Montoya, M., et al. (2018). Induzione di cellule T CD8 locali specifiche per l'influenza nel tratto respiratorio dopo somministrazione per aerosol di antigene vaccinale o virus nel suino inbred Babrahama. *PLoS Pathog.* 14, e1007017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007017>.
135. Morgan, S.B., Hemmink, J.D., Porter, E., Harley, R., Shelton, H., Aramouni, M., Everett, H.E., Brookes, S.M., Bailey, M., Townsend, A.M., et al. (2016). La somministrazione tramite aerosol di un vaccino antinfluenzale universale candidato riduce la carica virale nei suini esposti al virus pandemico H1N1. *J. Immunol.* 196, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502632>.
136. Henry, C., Zheng, N.Y., Huang, M., Cabanov, A., Rojas, K.T., Kaur, K., Andrews, S.F., Palm, A.E., Chen, Y.Q., Li, Y., et al. (2019). La vaccinazione contro il virus dell'influenza provoca risposte delle cellule B scarsamente adattate negli anziani. *Cell Host Microbe* 25, 357–366.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.002>.
137. King, R.G., Silva-Sanchez, A., Peel, J.N., Botta, D., Meza-Perez, S., Allie, R., Schultz, M.D., Liu, M., Bradley, J.E., Qiu, S., et al. (2020). La somministrazione intranasale di una singola dose di AdCOVID induce l'immunità sistemica e mucosa contro SARS-CoV-2 nei topi. <https://doi.org/10.1101/2020.10.10.331348>.
138. Krishnaswamy, J.K., Gowthaman, U., Zhang, B., Mattsson, J., Szeponik, L., Liu, D., Wu, R., White, T., Calabro, S., Xu, L., et al. (2017). Le cellule dendritiche convenzionali CD11b(+) migratorie inducono risposte anticorpali dipendenti dalle cellule T helper follicolari. *Sci. Immunol.* 2, eaam9169. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9169>.
139. Lund, F.E., e Randall, T.D. (2021). Il profumo di un vaccino. *Science* 373, 397–399. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>.
140. van Doremalen, N., Purushotham, J.N., Schulz, J.E., Holbrook, M.G., Bushmaker, T., Carmody, A., Port, J.R., Yinda, C.K., Okumura, A., Satur-day, G., et al. (2021). La vaccinazione intranasale con ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 riduce la diffusione virale dopo l'esposizione al SARS-CoV-2 D614G in modelli preclinici. *Sci. Transl. Med.* 13, eab0755. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.ab0755>.
141. Ye, Z.W., Ong, C.P., Tang, K., Fan, Y., Luo, C., Zhou, R., Luo, P., Cheng, Y., Gray, V.S., Wang, P., et al. (2022). La somministrazione intranasale di una singola dose di un vaccino candidato vivo attenuato derivato da un ceppo SARS-CoV-2 carente di NSP16 conferisce immunità sterilizzante negli animali. *Cell. Mol. Immunol.* 19, 588–601. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00855-4>.
142. Hagey, R.J., Elazar, M., Pham, E.A., Tian, S., Ben-Avi, L., Bernardin-Souibgui, C., Yee, M.F., Moreira, F.R., Rabinovitch, M.V., Meganck, R.M., et al. (2022). Antivirali programmabili che prendono di mira strutture secondarie conservate critiche dell'RNA virale del virus dell'influenza A e SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 28, 1944–1955. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01908-x>.
143. Sterlin, D., e Gorochoy, G. (2021). Quando gli anticorpi IgA terapeutici potrebbero raggiungere la maturità. *Farmacologia* 106, 9–19. <https://doi.org/10.1159/000510251>.
144. van Splunter, M., van Hoffen, E., Floris-Vollenbroek, E.G., Timmerman, H., de Bos, E.L., Meijer, B., Ulfman, L.H., Witteman, B., Wells, J.M., Brugman, S., et al. (2018). La vaccinazione orale contro il colera favorisce l'homing delle cellule B di memoria IgA(+) nell'intestino crasso e nel tratto respiratorio. *Mucosal Immunol.* 11, 1254–1264. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0006-7>.
145. Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., et al. (2012). IFITM3 limita la morbilità e la mortalità associate all'influenza. *Nature* 484, 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature10921>.
146. D'Agnillo, F., Walters, K.A., Xiao, Y., Sheng, Z.M., Scherler, K., Park, J., Gygli, S., Rosas, L.A., Sadtler, K., Kalish, H., et al. (2021). Danno epiteliale ed endoteliale polmonare, perdita di riparazione tissutale, inibizione della fibrolisi e senescenza cellulare nel COVID-19 fatale. *Sci. Transl. Med.* 13, eabj7790. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7790>.
147. Ziegler, C.G.K., Miao, V.N., Owings, A.H., Navia, A.W., Tang, Y., Bromley, J.D., Lotfy, P., Sloan, M., Laird, H., Williams, H.B., et al. (2021). Immunità intrinseca locale compromessa all'infezione da SARS-CoV-2 nei casi gravi di COVID-19. *Cell* 184, 4713–4733.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.023>.
148. Green, C.A., Sande, C.J., de Lara, C., Thompson, A.J., Silva-Reyes, L., Napolitano, F., Pierantoni, A., Capone, S., Vitelli, A., Klenerman, P. e Pollard, A.J. (2018). Immunità umorale e cellulare al RSV nei neonati, nei bambini e negli adulti. *Vaccine* 36, 6183–6190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.056>.
149. Zinkernagel, R.M. (2018). E se l'immunità protettiva fosse guidata dall'antigene e non dovuta alle cosiddette cellule B e T "di memoria"? *Immunol. Rev.* 283, 238–246. <https://doi.org/10.1111/immr.12648>.
150. Mao, T., Israelow, B., Suberi, A., Zhou, L., Reschke, M., Pen' a-Herna' n-dez, M.A., Dong, H., Homer, R.J., Saltzman, W.M. e Iwasaki, A. (2022). Il richiamo con vaccino intranasale spike senza adiuvante induce una robusta immunità protettiva delle mucose contro i sarbecovirus. <https://doi.org/10.1101/2022.01.24.477597>.

[Advanced Search](#)[View current version of this article](#)[🔔 Follow this preprint](#)

Effectiveness of the Influenza Vaccine During the 2024-2025 Respiratory Viral Season

 Nabin K. Shrestha, Patrick C. Burke, Amy S. Nowacki, Steven M. Gordon

doi: <https://doi.org/10.1101/2025.01.30.25321421>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should *not* be used to guide clinical practice.

[Abstract](#)[Full Text](#)[Info/History](#)[Metrics](#)[📄 Preview PDF](#)

ABSTRACT

Background The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the influenza vaccine during the 2024-2025 respiratory viral season.

Methods Employees of Cleveland Clinic in employment in Ohio on October 1, 2024, were included. The cumulative incidence of influenza among those in the vaccinated and unvaccinated states was compared over the following 25 weeks. Protection provided by vaccination (analyzed as a time-dependent covariate) was evaluated using Cox proportional hazards regression.

Results Among 53402 employees, 43857 (82.1%) had received the influenza vaccine by the end of the study. Influenza occurred in 1079 (2.02%) during the study. The cumulative incidence of influenza was similar for the vaccinated and unvaccinated states early, but over the course of the study the cumulative incidence of influenza increased more rapidly among the vaccinated than the unvaccinated. In an analysis adjusted for age, sex, clinical nursing job, and employment location, the risk of influenza was significantly higher for the vaccinated compared to the unvaccinated state (HR, 1.27; 95% C.I., 1.07 – 1.51; $P = 0.007$), yielding a calculated vaccine effectiveness of –26.9% (95% C.I., –55.0 to –6.6%).

Conclusions This study found that influenza vaccination of working-aged adults was associated with a higher risk of influenza during the 2024-2025 respiratory viral season, suggesting that the vaccine has not been effective in preventing influenza this season.

Summary Among 53402 working-aged Cleveland Clinic employees, we were unable to find that the influenza vaccine has been effective in preventing infection during the 2024-2025 respiratory viral season.

Competing Interest Statement

The authors have declared no competing interest.

Funding Statement

This study did not receive any funding

Author Declarations

I confirm all relevant ethical guidelines have been followed, and any necessary IRB and/or ethics committee approvals have been obtained.

Yes

The details of the IRB/oversight body that provided approval or exemption for the research described are given below:

The study was approved by the Cleveland Clinic Institutional Review Board as exempt research (IRB no. 23-625). A waiver of informed consent and waiver of HIPAA authorization were approved to allow the research team access to the required data.

I confirm that all necessary patient/participant consent has been obtained and the appropriate institutional forms have been archived, and that any patient/participant/sample identifiers included were not known to anyone (e.g., hospital staff, patients or participants themselves) outside the research group so cannot be used to identify individuals.

Yes

I understand that all clinical trials and any other prospective interventional studies must be registered with an ICMJE-approved registry, such as ClinicalTrials.gov. I confirm that any such study reported in the manuscript has been registered and the trial registration ID is provided (note: if posting a prospective study registered retrospectively, please provide a statement in the trial ID field explaining why the study was not registered in advance).

Yes

I have followed all appropriate research reporting guidelines, such as any relevant EQUATOR Network research reporting checklist(s) and other pertinent material, if applicable.

Yes

Copyright

The copyright holder for this preprint is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under a CC-BY-NC-ND 4.0 International license.

bioRxiv and medRxiv thank the following for their generous financial support:

The Chan Zuckerberg Initiative, Cold Spring Harbor Laboratory, the Sergey Brin Family Foundation, California Institute of Technology, Centre National de la Recherche Scientifique, Fred Hutchinson Cancer Center, Imperial College London, Massachusetts Institute of Technology, Stanford University, The University of Edinburgh, University of Washington, and Vrije Universiteit Amsterdam.

[^ Back to top](#)

[< Previous](#)

[Next >](#)

Posted April 04, 2025.

- [Download PDF](#)
- [Print/Save Options](#)
- [Author Declarations](#)
- [Data/Code](#)
- [Revision Summary](#)

- [Email](#)
- [Share](#)
- [Citation Tools](#)
- [Get QR code](#)

Subject Area

Infectious Diseases (except HIV/AIDS) 

Reviews and Context

- 15 [Comment](#) 
- 0 [TRIP Peer Reviews](#) 
- 0 [Community Reviews](#) 
- 0 [Automated Services](#) 
- 15 [Blogs/Media](#) 
- 0 [Author Videos](#) 

Subject Areas

All Articles

Addiction Medicine

Allergy and Immunology

Anesthesia

Cardiovascular Medicine

Dentistry and Oral Medicine

Dermatology

Emergency Medicine

Endocrinology (including Diabetes Mellitus and Metabolic Disease)

Epidemiology

Forensic Medicine

Gastroenterology

Genetic and Genomic Medicine

Geriatric Medicine

Health Economics

Health Informatics

Health Policy

Health Systems and Quality Improvement

Hematology

HIV/AIDS

Infectious Diseases (except HIV/AIDS)

Intensive Care and Critical Care Medicine

Medical Education

Medical Ethics

Nephrology

Neurology

Nursing

Nutrition

Obstetrics and Gynecology

Occupational and Environmental Health

Oncology

Ophthalmology

Orthopedics

Otolaryngology

Pain Medicine

Palliative Medicine

Pathology

Pediatrics

Pharmacology and Therapeutics

Primary Care Research

Psychiatry and Clinical Psychology

Public and Global Health

Radiology and Imaging

Rehabilitation Medicine and Physical Therapy

Respiratory Medicine

Rheumatology

Sexual and Reproductive Health

Sports Medicine

Surgery

Toxicology

Transplantation

Urology

Wirksamkeit der Grippeimpfung während der Atemwegsviren-Saison 2024–2025

Saison

Nabin K. Shrestha,¹ Patrick C. Burke,² Amy S. Nowacki,³ Steven M. Gordon¹ 5

¹ Abteilung für Infektionskrankheiten, ² Infektionsprävention, ³ Quantitative Gesundheitswissenschaften, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, USA.

Schlüsselwörter: Influenza; Wirksamkeit von Impfstoffen; Impfstoffe;

Laufender Titel: Wirksamkeit von Grippeimpfstoffen 11

Korrespondenz: N. K. Shrestha, 9500 Euclid Avenue / G-21, Cleveland, OH 44195, USA
(shrestn@ccf.org)

Alternativer korrespondierender Autor: S. M. Gordon, MD, 9500 Euclid Avenue / G-21, Cleveland, OH 44195, USA (gordons@ccf.org)

Zusammenfassung: Unter 53.402 Mitarbeitern der Cleveland Clinic im erwerbsfähigen Alter konnten wir keine Hinweise darauf finden, dass

Grippeimpfung während der Atemwegsvirus-saison 2024–2025 eine wirksame Infektionsprävention darstellte.

24 ZUSAMMENFASSUNG

25 **Hintergrund.** Der Zweck dieser Studie war es, die Wirksamkeit des Influenza-Impfstoffs während
26 der Atemwegsvirusaison 2024–2025 zu bewerten.

27 **Methoden.** Es wurden Mitarbeiter der Cleveland Clinic berücksichtigt, die am 1. Oktober 2024 in Ohio beschäftigt waren
28 in die Studie einbezogen. Die kumulative Influenza-Inzidenz unter den geimpften und ungeimpften Personen
29 wurde über die folgenden 25 Wochen verglichen. Der durch die Impfung gebotene Schutz (analysiert als zeitabhängige Kovariable
30 abhängige Kovariate) wurde anhand einer Cox-Proportional-Hazards-Regression bewertet.

31 **Ergebnisse.** Von 53.402 Mitarbeitern hatten 43.857 (82,1 %) bis Ende
32 Die Studie. Während der Studie traten 1079 Fälle (2,02 %) von Influenza auf. Die kumulative Inzidenz von Influenza war
33 zu Beginn ähnlich, aber im Verlauf der Studie stieg die kumulative
34 In einer Analyse
35 , die hinsichtlich Alter, Geschlecht, klinischem Pflegeberuf und Arbeitsort angepasst wurde, war das Influenzarisiko signifikant
36 höher für die Geimpften im Vergleich zu den Nichtgeimpften (HR, 1,27; 95 % KI, 1,07 – 1,51; $P = 0,007$),
37 was einer berechneten Impfstoffwirksamkeit von -26,9 % (95 % KI, -55,0 bis -6,6 %) entspricht.

38 **Schlussfolgerungen.** Diese Studie ergab, dass die Grippeimpfung von Erwachsenen im erwerbsfähigen Alter mit einem
39 einem höheren Influenzarisiko während der Atemwegsvirusaison 2024–2025 verbunden war, was darauf hindeutet, dass der Impfstoff
40 in dieser Saison nicht wirksam zur Vorbeugung von Influenza beigetragen hat.

41

EINLEITUNG

Influenza ist eine häufige virale Atemwegsinfektion mit potenziell hoher Mortalität und und wurde 2017 weltweit für 145 000 Todesfälle in allen Altersgruppen verantwortlich gemacht [1].

Die Sterblichkeit könnte bei regelmäßig auftretenden Pandemien noch viel höher sein.

verheerendste davon war die Influenza-Pandemie von 1918, die schätzungsweise

Die Sterblichkeitsrate lag bei 2,5 % und wurde für mehr als 50 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich gemacht [2].

Die Erkrankung weist ein saisonales Muster auf, wobei die meisten Infektionen in den Wintermonaten auftreten [3]. Das

Influenzavirus entwickelt sich im Laufe der Zeit weiter [4], und in diesem Zuge wird ein immer größerer Teil der

Bevölkerung anfällig für die neu entwickelten Stämme.

Influenza ist auch eine durch Impfung vermeidbare Krankheit. Influenza-Impfstoffe induzieren jedoch keine langfristige

dauerhafte Antikörpertiter, und eine jährliche Grippeimpfung wird zu Beginn jeder

Atemwegsvirensaison in den Herbstmonaten der nördlichen Hemisphäre empfohlen. Darüber hinaus hängt die Wirksamkeit

des Impfstoffs in einem bestimmten Jahr davon ab, wie ähnlich die im Impfstoff enthaltenen Stämme den

die in diesem Jahr Infektionen verursachen. Der am häufigsten verwendete saisonale Grippeimpfstoff ist der trivalente

inaktivierter Impfstoff (TIV), der aus zwei Influenza-A-Virustypen (H3N2 und H1N1) und einem

Influenza-B-Virenstamm [5]. Jedes Jahr wird ein neuer Impfstoff hergestellt, um die Impfstoffstämme

mit den Stämmen abzustimmen, die voraussichtlich in der kommenden Grippesaison am häufigsten auftreten werden. Da der derzeitige Prozess

der Entwicklung des Impfstoffs in der Regel einige Monate dauert, muss die Entscheidung darüber, welche Stämme in den

Der Impfstoff muss mehrere Monate im Voraus hergestellt werden. In Jahren, in denen eine gute Übereinstimmung zwischen den

Impfstoffstämme und dem infizierenden Stamm übereinstimmen, ist eine gute Wirksamkeit des Impfstoffs zu erwarten. In Jahren, in denen

die Impfstoffstämme und der zirkulierende Infektionsstamm schlecht übereinstimmen, ist die Wirksamkeit des Impfstoffs

dürfte die Wirksamkeit des Impfstoffs gering sein.

Angeichts der hohen Morbiditäts- und Mortalitätsbelastung durch Influenza ist eine universelle jährliche Impfung gegen

Die Impfung wird vom Beratenden Ausschuss für Impfpraktiken empfohlen [6]. In den letzten

66 Jahrzehnten wurden Richtlinien zur obligatorischen jährlichen Impfung von Gesundheitspersonal
 67 in immer mehr Gesundheitseinrichtungen eingeführt [7].

68 Die Nutzung von Ressourcen im Gesundheitswesen, einschließlich Krankenhausaufenthalten, und der Ressourcenbedarf, wie z.
 B. die Menge an
 69 benötigter antiviraler Medikamente, werden stark davon beeinflusst, wie wirksam der Impfstoff während einer Atemwegserkrankung ist.

70 Virale Saison. Frühe Schätzungen zur Wirksamkeit des Grippeimpfstoffs während jeder Saison mit respiratorischen Viren
 71 können Informationen liefern, die Gesundheitseinrichtungen und Apotheken dabei helfen, sich auf den
 72 Rest der Saison vorbereiten können.

73 Der Zweck dieser Studie war es, die Wirksamkeit des Influenza-Impfstoffs während der
 74 Atemwegsvirus-saison 2024–2025 in Nordamerika zu bewerten.

75

METHODEN

Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive Kohortenstudie, die am Cleveland Clinic Health System (CCHS) in die Vereinigten Staaten.

Einverständniserklärung der Patienten

Die Studie wurde vom Institutional Review Board der Cleveland Clinic als ausgenommene Forschung genehmigt (IRB Nr. 23-625) genehmigt. Eine Befreiung von der Einverständniserklärung und eine Befreiung von der HIPAA-Genehmigung wurden genehmigt, um , um dem Forschungsteam den Zugang zu den erforderlichen Daten zu ermöglichen.

Umfeld

Seit mehreren Jahren gibt es an der Cleveland Clinic ein obligatorisches Influenza-Impfprogramm , das von den Mitarbeitern verlangt, sich entweder jährlich gegen Grippe impfen zu lassen oder eine Befreiung zu beantragen. medizinischen oder religiösen Gründen. Der Impfstoff wird dem Gesundheitspersonal kostenlos zur Verfügung gestellt. Wenn das medizinische Personal akute Atemwegserkrankungen entwickelt, wird es aufgefordert, einen Arzt aufzusuchen, und Die Entscheidung, einen Influenza-Test durchzuführen, wird von Fall zu Fall vom behandelnden Arzt entweder in der Arbeitsmedizin oder in der Praxis ihres persönlichen Arztes.

Teilnehmer

CCHS-Mitarbeiter, die zum Zeitpunkt des Studienbeginns an einem Standort der Cleveland Clinic in Ohio beschäftigt waren wurden in die Studie einbezogen. Personen, für die keine Angaben zu Alter oder Geschlecht vorlagen, wurden ausgeschlossen.

98 Variablen

99 Die erhobenen Variablen waren das Datum der Grippeimpfung, Alter, Geschlecht, Arbeitsort, Einstufung der Tätigkeit
100 in klinische Pflege oder andere Tätigkeiten sowie das Datum des positiven Influenza-Tests. Die institutionelle Datenverwaltung in Bezug
auf
101 Mitarbeiterdaten schränkte unsere Möglichkeiten zur Erfassung zusätzlicher klinischer Variablen ein.
102 Influenza wurde definiert als ein positiver Nukleinsäureamplifikationstest für Influenza A oder B zu einem beliebigen Zeitpunkt.
103 nach dem Studienbeginn. Nur molekulare Tests (einschließlich molekularer Point-of-Care-Tests), die innerhalb von
104 Cleveland Clinic Health System durchgeführt wurden, wurden berücksichtigt.

106 Ergebnis

107 Das Studienergebnis war die Zeit bis zum Auftreten einer Influenza. Die Ergebnisse wurden bis zum 26. März 2025 verfolgt.

109 Statistische Analyse

110 Für die Grippesaison 2024–2025 wurde der Impfstoff am 1. Oktober 2024 verfügbar. Dieses Datum
111 wurde als Studienbeginn angesehen.
112 Um zu beurteilen, ob es einen Unterschied in der Testbereitschaft zwischen Geimpften und
113 nicht geimpften Personen besteht, wurde das Verhältnis zwischen dem Anteil der geimpften Personen, die sich testen ließen, und dem
Anteil der
114 nicht geimpften Personen, die sich an jedem Tag der Studie testen ließen, sowie das Verhältnis des Anteils der
115 Tests von geimpften Personen, die positiv waren, zum Anteil der Tests von nicht geimpften Personen, die
116 positiv an jedem Tag der Studie.
117 Es wurde ein Simon-Makuch-Hazard-Plot [8] erstellt, um die kumulative Influenza-Inzidenz in
118 geimpften und ungeimpften Staaten zu vergleichen, wobei die Grippeimpfung als zeitabhängige Kovariate behandelt wurde
119 [9,10] behandelt wurde. Personen galten 7 Tage nach Erhalt einer Einzeldosis eines Influenza-Impfstoffs als geimpft.
120 Probanden, die keine Influenza entwickelt hatten, wurden am Ende des Nachbeobachtungszeitraums der Studie zensiert. Diejenigen
121 Diejenigen, deren Arbeitsverhältnis während des Untersuchungszeitraums vor einer Influenza-Erkrankung beendet wurde, wurden am

Datum der Beendigung des Arbeitsverhältnisses zensiert. Die Kurven für den nicht geimpften Zustand basierten auf Daten, während der Impfstatus der Probanden „ungeimpft“ blieb. Die Kurven für den geimpften Zustand basierten auf Daten ab dem Datum, an dem sich der Influenza-Impfstatus zu „geimpft“ änderte.

Multivariate Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodelle wurden angepasst, um den Zusammenhang zwischen verschiedene Variablen mit der Zeit bis zur Influenza. Die Influenza-Impfung wurde als zeitabhängige Kovariable einbezogen. Es wurden Varianzinflationsfaktoren bewertet, um sicherzustellen, dass in den Modellen keine Multikollinearität vorlag. Die Annahme der proportionalen Gefahren wurde durch Untersuchung der Schonfeld-Residuen überprüft, und es gab keine signifikante Verstöße festgestellt. Die Impfstoffwirksamkeit (VE) wurde anhand der Hazard Ratios (HR) für die Influenza in den Modellen unter Verwendung der Formel $VE = 1 - HR$ berechnet.

Die Analyse wurde von N. K. S. und A. S. N. unter Verwendung des Survival-Pakets und der R-Version 4.4.2 (R Foundation for Statistical Computing) [11].

ERGEBNISSE

Insgesamt blieben 53.402 Arbeitnehmer in Ohio übrig, nachdem 1.700 Probanden (3,1 %) ausgeschlossen worden waren, bei denen das Alter oder Geschlecht fehlten. Diese Mitarbeiter bildeten die Studienkohorte, und insgesamt 43857 (82,1 %) waren bis zum Ende der Studie geimpft. Bei 98,7 % der Geimpften handelte es sich um den inaktivierten 3-valenten Grippeimpfstoff der Geimpften. Insgesamt erkrankten 1079 Mitarbeiter (2,02 %) während der 25 Wochen der Studie an Influenza. Davon waren 1066 (98,8 %) Influenza-A-Infektionen, die übrigen waren Influenza-B-Infektionen. Insgesamt 2740 Probanden (5,13 %) wurden während des Studienzeitraums aufgrund von Kündigung vor Ende der Studie.

Ausgangsmerkmale

Tabelle 1 zeigt die Merkmale der in die Studie einbezogenen Probanden. Bemerkenswert ist, dass es sich um eine relativ junge Population mit einem Durchschnittsalter von 42 Jahren, und 75 % waren weiblich. Etwa 20 % hatten eine klinische Pflegeerfahrung.

Unterschiede zwischen Geimpften und Nicht-Geimpften bei den Tests

Das Verhältnis zwischen dem Anteil der Geimpften, die sich testen ließen, und dem Anteil der Nicht-Geimpften Die Anzahl der Personen, die an jedem Tag der Studie auf Influenza getestet wurden, lag für den Großteil der Studie deutlich über 1,00 Studie deutlich über 1,00 (Abbildung 1), was darauf hindeutet, dass die Geimpften an jedem bestimmten Tag eher getestet wurden als die Nicht-Geimpften. Nach Ausschluss von Ausreißerwerten (> 3 SDs vom Mittelwert entfernt) betrug die Steigung der Regressionsgeraden betrug 0,0009 und die Steigung unterschied sich nicht signifikant von Null (P-Wert 0,38), was darauf hindeutet, dass sich die Tendenz, dass Geimpfte häufiger getestet wurden als Nicht-Geimpfte, sich im Laufe der Zeit nicht wesentlich verändert hat. Allerdings war das Verhältnis zwischen dem Anteil der positiven Tests von geimpften Personen und dem Anteil der positiven Tests von nicht geimpften Personen an jedem Tag der Studie nicht signifikant unterschiedlich von 1,00, während des Zeitraums, in dem die meisten Infektionen auftraten (Abbildung 2), was darauf hindeutet, dass die

zusätzlichen Tests bei den Geimpften nicht auf eine höhere Testbereitschaft zurückzuführen sind, sondern vielmehr auf eine höheren Anzahl von Infektionen selbst.

Wirksamkeit der Grippeimpfung

Nur sehr wenige Probanden erkrankten in den ersten zwei Monaten der Studie an Influenza A, und die tägliche Anzahl Die Infektionszahlen begannen etwa 70 Tage nach Beginn der Studie stetig anzusteigen. Die kumulative Inzidenz der Influenza schien zwischen den geimpften und ungeimpften Bundesstaaten zunächst nicht signifikant unterschiedlich zu sein, aber im Verlauf der Studie stieg die kumulative Infektionsinzidenz bei den Geimpften schneller an bei den Geimpften als bei den Ungeimpften (Abbildung 1). Das Influenzarisiko war signifikant höher für die Geimpften im Vergleich zu den Ungeimpften in der unbereinigten Cox-Proportional-Hazards-Regression (HR, 1,27; 95 % CI, 1,07–1,51; $P = 0,007$). In einem multivariablen Modell, das hinsichtlich Alter, Geschlecht, klinischer Pflegeberuf und primärer Arbeitsort, blieb das Influenzarisiko bei den Geimpften im Vergleich zu den Nichtgeimpften signifikant erhöht (HR, 1,27; 95 % KI, 1,07 – 1,51; $P = 0,007$). Punktschätzungen und 95 %-Konfidenzintervalle für Hazard Ratios für die Influenza-Infektion für die verschiedenen Variablen in unbereinigten und bereinigten Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodellen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Basierend auf dem multivariablen Modell hätte der Grippeimpfstoff eine Wirksamkeit von -26,9 % (95 % C.I., -51,0 bis -6,6 %).

DISKUSSION

Diese Studie ergab ein signifikant höheres Influenzarisiko bei den Geimpften im Vergleich zu den nicht geimpfter Zustand im Norden Ohios während der Grippezeit 2024–2025. Zu den Stärken unserer Studie gehört eine Stichprobengröße, die groß genug war, um einen signifikanten Unterschied in der Influenza-Inzidenz zwischen den geimpften und ungeimpften Bundesstaaten zu ermitteln, sowie ein Studiendesign, das eine tatsächliche Berechnung des Risikos ermöglichte, anstatt eine Extrapolation aus Odds Ratios, die aus „testnegativen“ Studien gewonnen wurden.

negativen” Designstudien, wie es in jüngsten Studien zur Wirksamkeit von Impfstoffen üblich geworden ist. „Testnegativ” Designstudien sind Fall-Kontroll-Studien, und aus Fall-Kontroll-Studien lassen sich keine relativen Risiken ableiten. Man kann man Odds Ratios erhalten, aber Odds Ratios übertreiben immer die Größe des Effekts im Vergleich zu relativen Risiken, und wenn das Ereignis nicht selten ist, wie es in der Regel bei veröffentlichten Studien mit „testnegativem” Design der Fall ist, kann dieser Unterschied erheblich sein [12]. Aus diesem Grund sind Schätzungen der Impfstoffwirksamkeit aus „testnegativen” Designstudien, die Odds Ratios wie relative Risiken behandeln, um die Wirksamkeit von Impfstoffen zu schätzen Wirksamkeit zu schätzen, überschätzen systematisch die tatsächliche Wirksamkeit des Impfstoffs. Eine wichtige Stärke der Studie war die Berücksichtigung der Möglichkeit, dass sich das Testverhalten von geimpften und nicht geimpften Personen unterscheiden könnte. Diese Analyse ergab, dass im Verlauf der Studie trotz der Personen im geimpften Zustand Da sie sich eher auf Influenza testen lassen als diejenigen, die nicht geimpft sind, unterschied sich der Anteil der positiven Tests unter den Geimpften nicht vom Anteil der positiven Tests unter den nicht geimpften Personen, was darauf hindeutet, dass die überdurchschnittlich hohe Anzahl an Tests bei den Geimpften auf eine überdurchschnittlich hohe Anzahl an Infektionen zurückzuführen war und nicht auf unterschiedliches Testverhalten zurückzuführen sind. Die Studienmethodik, bei der die Impfung als zeitlich Die abhängige Kovariate ermöglichte auch die Bestimmung der Wirksamkeit des Impfstoffs in Echtzeit, wodurch wir innerhalb weniger Wochen nach den ersten diagnostizierten Influenza-Fällen der Influenza-Diagnosen.

Die Studie weist mehrere Einschränkungen auf. Bei dem Impfstoff handelte es sich um den 3-valenten inaktivierten Influenza-Impfstoff, der etwa 99 % unserer Studienkohorte. Die Möglichkeit, dass andere Influenza-Impfstoffe möglicherweise wirksamer gewesen wären Eine Wirksamkeit kann nicht ausgeschlossen werden. Infektionen, die allein auf der Grundlage von Heimtest-Kits diagnostiziert wurden, wären übersehen worden. Die Studie war nicht darauf ausgelegt, das Risiko einer influenzaassoziierten Krankenhausbehandlung oder zu untersuchen, ob der Impfstoff den Schweregrad der Erkrankung verringert hat, da diese Ergebnisse nicht in ausreichender Zahl zu erwarten, um eine aussagekräftige Analyse zu ermöglichen. Unsere Studie zum Gesundheitswesen Das Personal umfasste keine Kinder und nur wenige ältere Personen und bestand hauptsächlich aus Personen, die gesund genug waren, um einer Beschäftigung nachzugehen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass eine Minderheit schwer immunsupprimiert gewesen sein.

Die Ergebnisse lassen sich auf relativ gesunde Erwachsene in den USA übertragen, die eine wichtige Zielgruppe Erwachsenen-Influenza-Impfkampagnen. Obwohl die Studie im Norden Ohios durchgeführt wurde, gibt es wenig Grund zu der Annahme, dass Annehmen, dass die Wirksamkeit des Impfstoffs in einer anderen geografischen Region innerhalb der kontinentalen USA anders gewesen wäre.

Angesichts all der Variablen, die die Wirksamkeit des Grippeimpfstoffs in einem bestimmten und angesichts unserer derzeitigen Verfahren zur Entwicklung des Impfstoffs ist es möglicherweise zu viel verlangt, zu erwarten, dass der Impfstoff Jahr für Jahr hochwirksam ist. Daher ist es wichtig, die Wirksamkeit zu bewerten.

des Impfstoffs jedes Jahr. Diese Studie ergab, dass die Grippeimpfung mit einem höheren Risiko für Influenza bei Erwachsenen im Gesundheitswesen im Norden Ohios, USA, während des Winters 2024-2025 verbunden war , was darauf hindeutet, dass der Impfstoff in dieser Saison nicht wirksam zur Vorbeugung von Influenza beigetragen hat.

Anmerkungen

Beiträge der Autoren. N. K. S.: Konzeption, Methodik, Validierung, Untersuchung, Datenkuratierung, Software, formale Analyse, Visualisierung, Verfassen des Originalentwurfs, Verfassen, Überprüfen und Bearbeiten, Aufsicht, Projektverwaltung. P. C. B.: Ressourcen, Untersuchung, Validierung, Verfassen, Überprüfen und Bearbeitung. A. S. N.: Methodik, formale Analyse, Visualisierung, Validierung, Verfassen, Überprüfen und Bearbeiten. S. M. G.: Ressourcen, Verfassen, Überprüfen und Bearbeiten.

Mögliche Interessenkonflikte. Die Autoren: Keine Interessenkonflikte gemeldet. Konflikte, die die Herausgeber als relevant für den Inhalt des Manuskripts erachten, wurden offengelegt.

Finanzierung. Keine.

REFERENZEN

1. GBD 2017 Influenza Collaborators. Mortalität, Morbidität und Krankenhausaufenthalte aufgrund von Influenza-Infektionen der unteren Infektionen der unteren Atemwege, 2017: eine Analyse für die Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med* **2019**; 7:69–89.
2. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza 1918: die Mutter aller Pandemien. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12:15–22.
3. Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Influenza Seasonality: Underlying Ursachen und Modellierungstheorien. *J Virol* **2007**; 81:5429–5436.
4. Petrova VN, Russell CA. Die Entwicklung saisonaler Influenzaviren. *Nat Rev Microbiol* **2018**; 16:47–60.
5. Wong S-S, Webby RJ. Traditionelle und neue Influenza-Impfstoffe. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:476–492.
6. Grohskopf LA. Prävention und Bekämpfung der saisonalen Influenza mit Impfstoffen: Empfehlungen des des Beratenden Ausschusses für Impfpraktiken – Vereinigte Staaten, Grippesaison 2024–25. *MMWR Recomm Rep* **2024**; 73. Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/73/rr/rr7305a1.htm>. Zugriff am 28. November 2024.
7. Greene MT, Linder KA, Fowler KE, Saint S. Influenza-Impfvorschriften für Mitarbeiter im Gesundheitswesen in US-Krankenhäusern. *JAMA Netw Open* **2024**; 7:e2416861.
8. Simon R, Makuch RW. Eine nichtparametrische grafische Darstellung der Beziehung zwischen Überleben und dem Auftreten eines Ereignisses: Anwendung auf die Verzerrung durch Responder und Non-Responder. *Stat Med* **1984**; 3:35–44.
9. Therneau TM, Crowson C, Atkinson E. Verwendung zeitabhängiger Kovariaten und zeitabhängiger Koeffizienten im Cox-Modell. **2021**; Verfügbar unter: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/timedep.pdf>. Zugriff am 8. Mai 2021.
10. Therneau TM, Grambsch PM. Modellierung von Überlebensdaten: Erweiterung des Cox-Modells. New York, NY: Springer International Publishing, **2000**.
11. R Core Team. R: Eine Sprache und Umgebung für statistische Berechnungen. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing, **2024**.
12. Davies HTO, Crombie IK, Tavakoli M. Wann können Odds Ratios irreführend sein? *BMJ* **1998**; 316:989–991.

258 TABELLEN

259 Tabelle 1

260 Tabelle 1. Ausgangsmerkmale von 53.402 Mitarbeitern der Cleveland Clinic in Ohio

Merkmale	Gesamt ^a
Alter in Jahren, Mittelwert (SD)	42,0 (13,4)
Geschlecht	
Weiblich	40 130 (75,1)
Männlich	13 272 (24,9)
Hauptarbeitsort	
Cleveland Clinic Hauptsitz	20 536 (38,5)
Regionale Krankenhäuser ^b	21 880 (41,0)
Ambulante Zentren	9351 (17,5)
Verwaltungszentren	1635 (3,1)
Art der Tätigkeit	
Klinische Pflege	10 840 (20,3)
Nicht-klinischer Pflegeberuf	42562 (79,7)

261 ^aDie Daten werden, sofern nicht anders angegeben, als Anzahl (%) dargestellt.

262 ^b Umfasst die Krankenhäuser Akron General, Ashtabula, Euclid, Fairview, Hillcrest, Lodi Community, Lutheran, Marymount, Medina, Mentor, Mercy (Canton),

263 Southpointe und Union, die alle zum Cleveland Clinic Health System gehören.

Tabelle 2

Tabelle 2. Unbereinigte und bereinigte Zusammenhänge mit der Zeit bis zur Influenza in Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodellen

Merkmale	Unbereinigtes Modell		Angepasstes Modell	
	HR (95 % KI) ^a	<i>P</i>	HR (95 % KI) ^a	<i>P</i>
Geimpfter Zustand^b	1,27 (1,07–1,51)	.007	1,27 (1,07–1,51)	0,007
Alter	1,003 (0,998–1,007)	.22	1,003 (0,998–1,008)	.20
Männliches Geschlecht^c	0,69 (0,59–0,80)	<0,001	0,71 (0,61–0,83)	<.001
Klinische Pflegeberufe^d	1,18 (1,03–1,36)	.02	1,15 (0,99–1,33)	.07
Primärer Arbeitsort^e				
Verwaltungszentren	0,78 (0,52–1,17)	0,23	0,80 (0,53–1,20)	0,28
Ambulante Zentren	1,37 (1,17–1,61)	<0,001	1,32 (1,12–1,55)	0,002
Regionale Krankenhäuser	0,95 (0,83–1,09)	.48	0,92 (0,80–1,06)	0,26

Abkürzung: CI, Konfidenzintervall; HR, Hazard Ratio; COVID-19, Coronavirus-Krankheit 2019;

^aAus multivariablen Cox-Proportional-Hazards-Regressionsmodellen, wobei der Status der Impfung mit dem bivalenten Impfstoff als zeitabhängige Kovariate behandelt wurde.

^b Zeitabhängige Kovariate

^c Referenz ist weibliches Geschlecht

^d Referenz ist keine klinische Pflegearbeit

^e Referenz ist der Hauptcampus der Cleveland Clinic

^f Referenzwert ist niedrig

275 **ABBILDUNGSLEGENDE**

276 **Abbildung 1.** Vergleich des Verhältnisses zwischen dem Anteil der Geimpften, die sich testen ließen, und dem Anteil der
 277 nicht geimpften Personen, die sich an jedem Tag der Studie auf Influenza testen ließen. Jeder Tag wird durch einen Punkt dargestellt.
 278 Die gestrichelte Linie stellt die Referenzlinie dar, bei der die Testanteile für Geimpfte und Nichtgeimpfte gleich sind
 279 geimpften und nicht geimpften Personen gleich sind. Punkte, die Tage darstellen, an denen ein höherer Anteil der geimpften als der nicht
 geimpften Personen
 280 Personen auf Influenza getestet wurden, liegen über der Referenzlinie, und Punkte für Tage, an denen
 281 an denen ein geringerer Anteil geimpfter als nicht geimpfter Personen auf Influenza getestet wurde, liegen
 282 unterhalb der Referenzlinie. Die rote Linie stellt die beste Passgerade für das oben genannte Verhältnis durch lineare Regression dar,
 283 nach Ausschluss von Ausreißern (Werte > 3 Standardabweichungen vom mittleren Verhältnis), wobei die schattierten Bereiche
 284 stellen das 95 %-Konfidenzintervall dar.
 285

286 **Abbildung 2.** Vergleich des Verhältnisses der positiven Tests von geimpften Personen zu den
 287 Anteil der Tests von nicht geimpften Personen, die an jedem Tag der Studie positiv waren. Jeder Tag ist
 288 durch einen Punkt dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die Referenzlinie dar, bei der der Anteil der positiven Tests
 289 bei geimpften und nicht geimpften Personen gleich ist. Punkte, die Tage darstellen, an denen der Anteil der positiven Tests bei geimpften
 290 Personen
 291 höheren Anteil an positiven Tests als die nicht geimpften Personen hatten, liegen über der Referenzlinie, und Punkte für
 292 An Tagen, an denen der Anteil der positiven Tests bei den Geimpften geringer war als bei den Ungeimpften, liegt der Wert unterhalb der
 293 Referenzlinie.
 294 die Referenzlinie fallen. Die rote Linie stellt die beste Passgerade für das oben genannte Verhältnis durch lineare Regression dar, nach
 295 Ausschluss von Ausreißern (Werte > 3 Standardabweichungen vom mittleren Verhältnis), wobei die schattierten Bereiche
 296 das 95 %-Konfidenzintervall. Dies basierte auf Daten für Tage, an denen sowohl Geimpfte als auch Ungeimpfte
 297 Mindestens ein Test durchgeführt. Die Daten reichten nicht aus, um Datenpunkte vor dem 76. Tag der Studie zu erhalten.

298

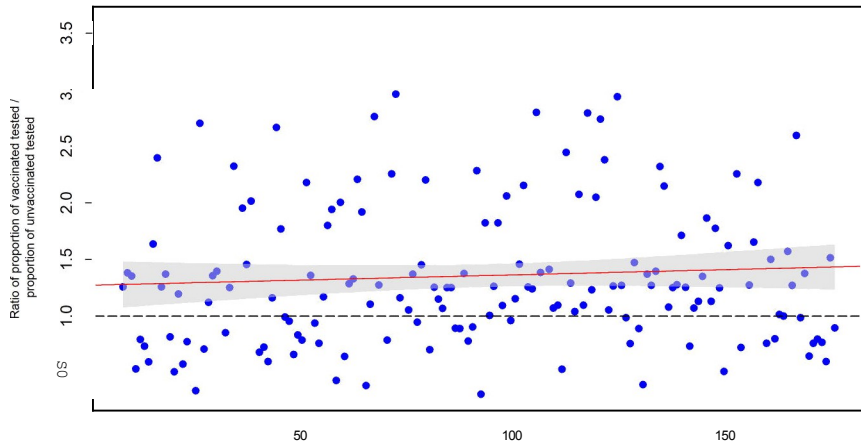
299 **Abbildung 3.** Simon-Makuch-Diagramm zum Vergleich der kumulativen Influenza-Inzidenz bei Probanden, gestaffelt nach

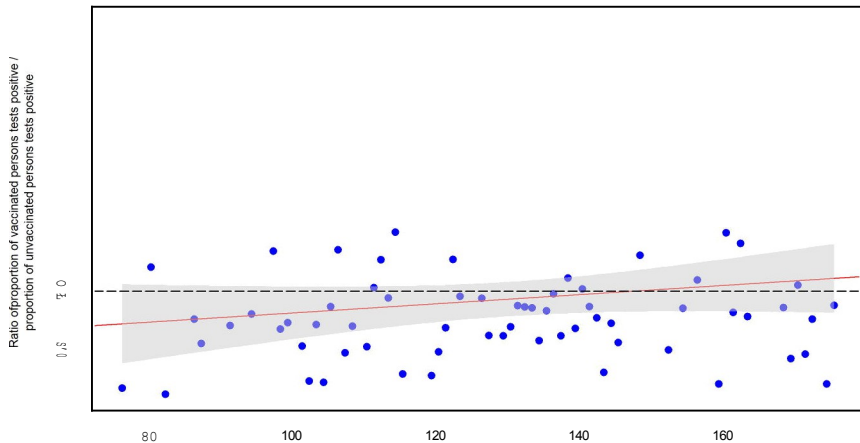
300 Impfstatus. Tag Null war der 1. Oktober 2024, der Tag, an dem die Grippeimpfung den Mitarbeitern angeboten wurde

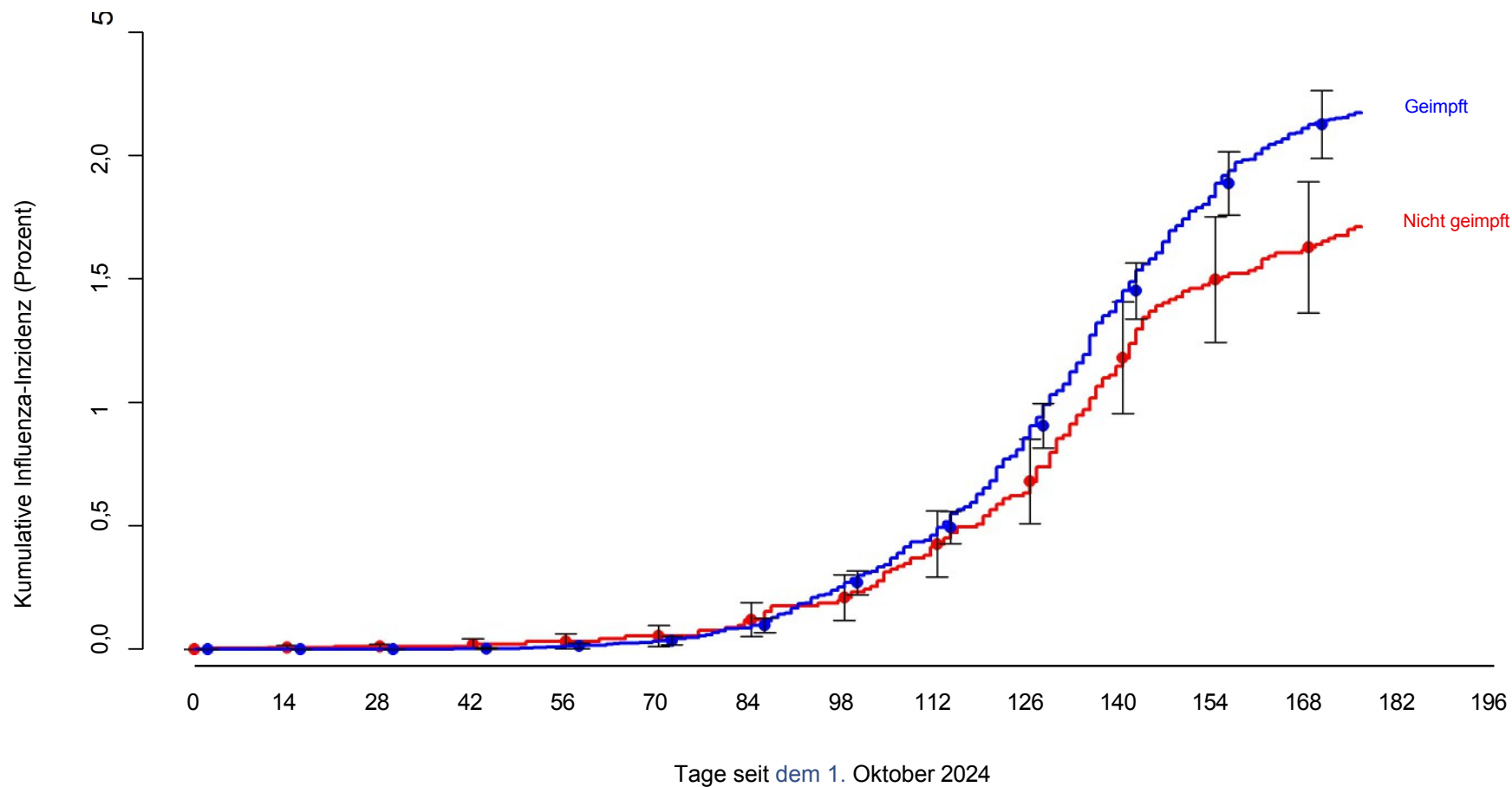
301 Mitarbeitern für die Saison der Atemwegsviren angeboten wurde. Punktschätzungen und 95 %-Konfidenzintervalle sind entlang

302 x-Achse verteilt, um die Sichtbarkeit zu verbessern.

303







Gefährdete Zahlen:

- ----Nicht geimpft

Geimpft

53402	40858	23.900	9682	9339	9148	8989	8823	8693	8581	8457	8351	8262
0	12456	29162	43079	43217	43162	43066	42864	42669	42373	41995	41672	41427

Efficacia del vaccino antinfluenzale durante la stagione virale respiratoria 2024-2025 stagione

Nabin K. Shrestha,¹ Patrick C. Burke,² Amy S. Nowacki,³ Steven M. Gordon¹ 5

¹ Dipartimenti di Malattie Infettive, ² Prevenzione delle Infezioni, ³ Scienze della Salute Quantitative, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, USA.

Parole chiave: influenza; efficacia del vaccino; vaccini;

Titolo provvisorio: Efficacia del vaccino

antinfluenzale 11

Corrispondenza: N. K. Shrestha, 9500 Euclid Avenue / G-21, Cleveland, OH 44195, USA
(shrestn@ccf.org)

Autore corrispondente alternativo: S. M. Gordon, MD, 9500 Euclid Avenue / G-21, Cleveland, OH 44195, USA (gordons@ccf.org)

Sommario: Tra i 53.402 dipendenti in età lavorativa della Cleveland Clinic, non siamo riusciti a riscontrare che il vaccino antinfluenzale sia stato efficace nel prevenire l'infezione durante la stagione virale respiratoria 2024-2025.

24 **ABSTRACT**

25 **Contesto.** Lo scopo di questo studio era valutare l'efficacia del vaccino antinfluenzale durante
26 la stagione virale respiratoria 2024-2025.

27 **Metodi.** Sono stati inclusi i dipendenti della Cleveland Clinic impiegati in Ohio al 1° ottobre 2024
28 inclusi. L'incidenza cumulativa dell'influenza tra coloro che si trovavano negli stati vaccinati e non vaccinati
29 è stata confrontata nelle 25 settimane successive. La protezione fornita dalla vaccinazione (analizzata come covariata dipendente dal
tempo
30 dipendente dal tempo) è stata valutata utilizzando la regressione dei rischi proporzionali di Cox.

31 **Risultati.** Tra i 53.402 dipendenti, 43.857 (82,1%) avevano ricevuto il vaccino antinfluenzale entro la fine di
32 Lo studio. Durante lo studio si sono verificati 1079 casi di influenza (2,02%). L'incidenza cumulativa dell'influenza era
33 simile per gli stati vaccinati e non vaccinati all'inizio, ma nel corso dello studio l'incidenza cumulativa
34 incidenza cumulativa dell'influenza è aumentata più rapidamente tra i vaccinati rispetto ai non vaccinati. In un'analisi
35 aggiustata per età, sesso, lavoro infermieristico clinico e luogo di lavoro, il rischio di influenza era significativamente
36 più elevato per i vaccinati rispetto ai non vaccinati (HR, 1,27; IC al 95%, 1,07-1,51; $P = 0,007$),
37 con un'efficacia del vaccino calcolata pari a -26,9% (95% C.I., da -55,0 a -6,6%).

38 **Conclusioni.** Questo studio ha rilevato che la vaccinazione antinfluenzale degli adulti in età lavorativa era associata a un
39 rischio più elevato di influenza durante la stagione virale respiratoria 2024-2025, suggerendo che il vaccino non è stato
40 efficace nella prevenzione dell'influenza in questa stagione.

41

INTRODUZIONE

L'influenza è un'infezione virale respiratoria comune con un potenziale di mortalità e morbilità sostanziale morbilità, e si stima che nel 2017 sia stata responsabile di 145 000 decessi in tutto il mondo tra tutte le fasce d'età [1]. La mortalità potrebbe essere molto più elevata in caso di pandemie, che si verificano periodicamente, la la più devastante mai registrata è stata la pandemia influenzale del 1918, che si stima abbia causato un caso tasso di mortalità del 2,5% ed è stata ritenuta responsabile di oltre 50 milioni di decessi in tutto il mondo [2]. La malattia presenta un andamento stagionale, con la maggior parte delle infezioni che si verificano durante i mesi invernali [3]. Il virus dell'influenza si evolve nel tempo [4] e, man mano che ciò accade, una percentuale sempre maggiore della popolazione diventa suscettibile ai ceppi di nuova evoluzione.

L'influenza è anche una malattia prevenibile con il vaccino. Tuttavia, i vaccini antinfluenzali non inducono una lunga titoli anticorpali duraturi, e la vaccinazione antinfluenzale annuale è raccomandata all'inizio di ogni stagione virale respiratoria nei mesi autunnali nell'emisfero settentrionale. Inoltre, l'efficacia del vaccino in un dato anno dipende dalla somiglianza tra i ceppi contenuti nel vaccino e i ceppi che causano l'infezione quell'anno. Il vaccino antinfluenzale stagionale più utilizzato è il vaccino trivalente vaccino inattivato (TIV), composto da due tipi di virus dell'influenza A (H3N2 e H1N1) e da un tipo di virus dell'influenza B [5]. Ogni anno viene prodotto un nuovo vaccino nel tentativo di adattare i ceppi vaccinali ai ceppi che si prevede saranno più diffusi nella stagione influenzale imminente. Poiché l'attuale processo di sviluppo del vaccino richiede in genere alcuni mesi, la decisione sui ceppi da includere nel Il vaccino deve essere preparato con diversi mesi di anticipo. Negli anni in cui vi è una buona corrispondenza tra i ceppi del vaccino e il ceppo infettivo, l'efficacia del vaccino dovrebbe essere buona. Negli anni in cui c'è una scarsa corrispondenza tra i ceppi vaccinali e il ceppo infettivo circolante, l'efficacia del vaccino è scarsa.

Data l'elevata incidenza di morbilità e mortalità dell'influenza, la vaccinazione annuale universale contro L'infezione è raccomandata dal Comitato consultivo sulle pratiche di immunizzazione [6]. Negli ultimi

due decenni, le politiche di vaccinazione annuale obbligatoria del personale sanitario sono state
sempre più adottate nelle istituzioni sanitarie [7].

L'utilizzo delle risorse sanitarie, compresi i ricoveri ospedalieri, e il fabbisogno di risorse quali la quantità di
farmaci antivirali necessari, sono fortemente influenzati dall'efficacia del vaccino durante qualsiasi infezione respiratoria.
stagione virale. Le prime stime sull'efficacia del vaccino antinfluenzale durante qualsiasi stagione virale respiratoria
possono fornire informazioni utili alle istituzioni sanitarie e alle farmacie per prepararsi al
resto della stagione.

Lo scopo di questo studio era valutare l'efficacia del vaccino antinfluenzale durante la
stagione virale respiratoria 2024-2025 in Nord America.

METODI

Progetto dello studio

Si trattava di uno studio prospettico di coorte condotto presso il Cleveland Clinic Health System (CCHS) a gli Stati Uniti.

Dichiarazione di consenso del paziente

Lo studio è stato approvato dal Comitato di revisione istituzionale della Cleveland Clinic come ricerca esente (IRB n. 23-625). Sono state approvate una deroga al consenso informato e una deroga all'autorizzazione HIPAA per consentire al team di ricerca di accedere ai dati richiesti.

Contesto

Da diversi anni la Cleveland Clinic ha un programma di vaccinazione antinfluenzale a partecipazione obbligatoria, che richiede ai dipendenti di sottoporsi a una vaccinazione antinfluenzale annuale o di richiedere un'esenzione motivi medici o religiosi. Il vaccino è fornito gratuitamente al personale sanitario. Quando il personale sanitario sviluppa malattie respiratorie acute, è incoraggiato a rivolgersi a un medico e la decisione di eseguire il test per l'influenza viene presa caso per caso dal medico curante presso le cliniche di medicina del lavoro o presso gli studi dei propri medici curanti.

Partecipanti

Dipendenti CCHS impiegati in qualsiasi sede della Cleveland Clinic in Ohio alla data di inizio dello studio sono stati inclusi nello studio. Sono stati esclusi quelli per i quali mancavano i dati relativi all'età o al sesso.

Variabili

Le variabili raccolte erano la data di vaccinazione antinfluenzale, l'età, il sesso, il luogo di lavoro, la categorizzazione del tipo di lavoro in infermieristica clinica o altro, e la data del test positivo per l'influenza. La governance dei dati istituzionali relativi dati dei dipendenti ha limitato la nostra capacità di raccogliere ulteriori variabili cliniche.

L'influenza è stata definita come un test di amplificazione dell'acido nucleico positivo per l'influenza A o B in qualsiasi momento dopo la data di inizio dello studio. Solo test molecolari (compresi i test molecolari point-of-care) eseguiti entro Cleveland Clinic Health System.

Risultato

Il risultato dello studio era il tempo di insorgenza dell'influenza. I risultati sono stati monitorati fino al 26 marzo 2025.

Analisi statistica

Per la stagione influenzale 2024-2025, il vaccino è stato reso disponibile il 1° ottobre 2024. Questa data è stata considerata la data di inizio dello studio.

Per valutare se vi fosse una differenza nella propensione a sottoporsi al test tra i vaccinati e non vaccinati, è stato esaminato il rapporto tra la percentuale di vaccinati che si sono sottoposti al test e la percentuale di non vaccinati che si sono sottoposti al test ogni giorno dello studio, così come il rapporto tra la percentuale di test delle persone vaccinate risultate positive rispetto alla proporzione dei test delle persone non vaccinate risultate positivo in ogni giorno dello studio.

È stato creato un grafico di rischio Simon-Makuch [8] per confrontare l'incidenza cumulativa dell'influenza negli Stati in cui era stata somministrata la vaccinazione e in quelli in cui non era stata somministrata, considerando la vaccinazione antinfluenzale come una covariata dipendente dal tempo [9,10]. Gli individui sono stati considerati vaccinati 7 giorni dopo aver ricevuto una singola dose di vaccino antinfluenzale. I soggetti che non avevano sviluppato l'influenza sono stati censurati alla fine del periodo di follow-up dello studio. Quelli coloro il cui rapporto di lavoro è stato interrotto durante il periodo di studio prima che avessero contratto l'influenza sono stati censiti alla

122 data di cessazione del rapporto di lavoro. Le curve relative allo stato di non vaccinazione si basavano sui dati, mentre lo
123 stato di vaccinazione dei soggetti rimaneva "non vaccinato". Le curve per lo stato di vaccinazione si basavano sui dati
124 a partire dalla data in cui lo stato di vaccinazione antinfluenzale è cambiato in "vaccinato".

125 Sono stati adattati modelli di regressione multivariabile dei rischi proporzionali di Cox per esaminare l'associazione di
126 varie variabili con il tempo rispetto all'influenza. La vaccinazione antinfluenzale è stata inclusa come covariata dipendente dal
tempo.

127 Sono stati valutati i fattori di inflazione della varianza per garantire che non vi fosse multicollinearità nei modelli. L'ipotesi di rischio
proporzionale è stata verificata esaminando i residui di Schonfeld e non sono state riscontrate anomalie

128 ipotesi di proporzionalità dei rischi è stata verificata esaminando i residui di Schonfeld e non sono state riscontrate
129 violazioni significative. L'efficacia del vaccino (VE) è stata calcolata dai rapporti di rischio (HR) per la vaccinazione antinfluenzale
130 nei modelli utilizzando la formula: $VE = 1 - HR$.

131 L'analisi è stata eseguita da N. K. S. e A. S. N. utilizzando il pacchetto *survival* e la versione R
132 4.4.2 (R Foundation for Statistical Computing) [11].

RISULTATI

Dopo aver escluso 1700 soggetti (3,1%) per i quali mancavano i dati relativi all'età o sesso mancanti. Questi dipendenti hanno formato la coorte dello studio e un totale di 43857 (82,1%) erano vaccinati entro la fine dello studio. Il vaccino era il vaccino antinfluenzale trivalente inattivato nel 98,7% dei persone vaccinate. Complessivamente, 1079 dipendenti (2,02%) hanno contratto l'influenza durante le 25 settimane dello studio. Di questi, 1066 (98,8%) erano infezioni da influenza A, mentre i restanti erano infezioni da influenza B. Un totale di 2740 soggetti (5,13%) sono stati censurati durante il periodo di studio a causa della cessazione del lavoro prima della fine dello studio.

Caratteristiche di base

La tabella 1 mostra le caratteristiche dei soggetti inclusi nello studio. In particolare, si trattava di una popolazione relativamente giovane, con un'età media di 42 anni, e il 75% era di sesso femminile. Circa il 20% aveva una formazione clinica infermieristica.

Differenze nei test tra vaccinati e non vaccinati

Il rapporto tra la percentuale di vaccinati che si sono sottoposti al test e la percentuale di non vaccinati Il numero di persone sottoposte al test dell'influenza ogni giorno dello studio era significativamente superiore a 1,00 per la maggior parte dello studio (Figura 1), suggerendo che i vaccinati erano più propensi a sottoporsi al test rispetto ai non vaccinati in qualsiasi un dato giorno. Dopo aver escluso i valori anomali (> 3 deviazioni standard dalla media), la pendenza della linea di regressione era pari a 0,0009 e la pendenza non era significativamente diversa da zero (valore P 0,38), suggerendo che la tendenza dei vaccinati a sottoporsi a test più spesso rispetto ai non vaccinati non è cambiata in modo significativo nel tempo.

Tuttavia, il rapporto tra la percentuale di test positivi delle persone vaccinate e la proporzione di test positivi delle persone non vaccinate in ciascun giorno dello studio non era significativamente diverso da 1,00, durante il periodo in cui si è verificata la maggior parte delle infezioni (Figura 2), suggerendo che i

test aggiuntivi tra i vaccinati non derivassero da una maggiore propensione a sottoporsi al test, ma piuttosto da un numero più elevato di infezioni stesse.

Efficacia del vaccino antinfluenzale

Pochissimi soggetti hanno sviluppato l'influenza A nei primi due mesi dello studio e il numero giornaliero Il numero di infezioni ha iniziato ad aumentare costantemente circa 70 giorni dopo la data di inizio dello studio. L'incidenza cumulativa dell'influenza non sembrava essere significativamente diversa tra gli Stati vaccinati e quelli non vaccinati all'inizio, ma nel corso dello studio l'incidenza cumulativa dell'infezione è aumentata più rapidamente tra i vaccinati rispetto ai non vaccinati (Figura 1). Il rischio di influenza era significativamente più elevato per i vaccinati rispetto ai non vaccinati nella regressione di Cox proporzionale dei rischi non aggiustata (HR, 1,27; IC al 95%, 1,07 - 1,51; $P = 0,007$). In un modello multivariabile che ha tenuto conto dell'età, del sesso, lavoro infermieristico clinico e luogo di lavoro principale, il rischio di influenza è rimasto significativamente più elevato per i vaccinati rispetto ai non vaccinati (HR, 1,27; IC al 95%, 1,07-1,51; $P = 0,007$). Le stime puntuali e gli intervalli di confidenza al 95% per i rapporti di rischio di contrarre l'influenza, per le varie variabili nei modelli di regressione dei rischi proporzionali di Cox non aggiustati e aggiustati, sono riportate nella Tabella 2. Sulla base del modello multivariabile, il vaccino antinfluenzale avrebbe avuto un'efficacia del -26,9% (95% C.I., da -51,0 a -6,6%).

DISCUSSIONE

Questo studio ha riscontrato un rischio significativamente più elevato di influenza tra i vaccinati rispetto ai stato non vaccinato nell'Ohio settentrionale durante la stagione influenzale 2024-2025. I punti di forza del nostro studio includono una dimensione del campione sufficientemente ampia da individuare una differenza significativa differenza nell'incidenza dell'influenza tra gli Stati vaccinati e quelli non vaccinati, e un disegno di studio che ha consentito il calcolo effettivo del rischio piuttosto che un'estrapolazione dai rapporti di probabilità ottenuti da studi di progettazione "test-negativi"

negativi", come è diventata la tendenza nei recenti studi sull'efficacia dei vaccini. "Test negativi"

Gli studi di progettazione sono studi caso-controllo, e non è possibile ottenere rischi relativi dagli studi caso-controllo. È possibile

È possibile ottenere rapporti di probabilità, ma questi esagerano sempre l'entità dell'effetto rispetto ai rischi relativi

e quando l'evento non è raro, come di solito accade negli studi pubblicati con disegno "test-negativo", questa

differenza può essere sostanziale [12]. Ecco perché le stime dell'efficacia del vaccino da studi di progettazione "test-negativi"

studi di progettazione, che trattano gli odds ratio come se fossero rischi relativi al fine di stimare l'efficacia del vaccino

, sovrastimano sistematicamente l'efficacia reale del vaccino. Un importante punto di forza dello studio

è stata la considerazione della possibilità che il comportamento di sottoporsi al test potesse differire tra i soggetti vaccinati e quelli

non vaccinati. Questa analisi ha rilevato che nel corso dello studio, nonostante le persone nello stato vaccinato

essendo più propensi a sottoporsi al test per l'influenza rispetto a quelli non vaccinati, la percentuale di test

positivi tra i vaccinati non era diversa dalla percentuale di test positivi tra i

non vaccinati, suggerendo che l'eccesso di test tra i vaccinati fosse dovuto a un eccesso di infezioni

piuttosto che da differenze nel comportamento di test. La metodologia dello studio di trattare la vaccinazione come un tempo-

La covariata dipendente ha anche permesso di determinare l'efficacia del vaccino in tempo reale, fornendoci

segnali molto precoci sull'entità dell'efficacia del vaccino entro poche settimane dalla diagnosi dei primi casi

di influenza diagnosticati.

Lo studio presenta diverse limitazioni. Il vaccino era il vaccino antinfluenzale inattivato trivalente in

circa il 99% della nostra coorte di studio. La possibilità che altri vaccini antinfluenzali potessero essere più

efficace non può essere escluso. Le infezioni diagnosticate solo sulla base dei kit di test domiciliari sarebbero state

trascurate. Lo studio non era stato progettato per confrontare il rischio di ospedalizzazione o mortalità associate all'influenza

o di esaminare se il vaccino riducesse la gravità della malattia, poiché questi esiti non erano

previsti in numero sufficiente da consentire un'analisi significativa. Il nostro studio sull'assistenza sanitaria

Il personale non includeva bambini e pochi soggetti anziani ed era composto principalmente da individui

abbastanza sani da poter essere assunti. Ci si sarebbe aspettati che una minoranza fosse gravemente

immunodeficienza grave.

I risultati sono generalizzabili agli adulti relativamente sani negli Stati Uniti, che sono uno dei principali obiettivi delle campagne di vaccinazione antinfluenzale degli adulti. Sebbene lo studio sia stato condotto nell'Ohio settentrionale, non vi è motivo di supponiamo che l'efficacia del vaccino sarebbe stata diversa in una regione geografica diversa all'interno degli Stati Uniti continentali.

Considerando tutte le variabili che possono influenzare l'efficacia del vaccino antinfluenzale in un dato anno e i nostri attuali processi di sviluppo del vaccino, potrebbe essere troppo pretendere che il vaccino sia altamente efficace anno dopo anno. Diventa quindi importante valutare l'efficacia del vaccino ogni anno. Questo studio ha rilevato che la vaccinazione antinfluenzale era associata a un rischio più elevato di influenza tra gli adulti che lavorano nel settore sanitario nell'Ohio settentrionale, USA, durante l'inverno 2024-2025, suggerendo che il vaccino non è stato efficace nella prevenzione dell'influenza in questa stagione.

Note

Contributi degli autori. N. K. S.: Concettualizzazione, metodologia, convalida, indagine, cura dei dati, software, analisi formale, visualizzazione, redazione della bozza originale, revisione e modifica, Supervisione, amministrazione del progetto. P. C. B.: Risorse, ricerca, convalida, redazione, revisione e editing. A. S. N.: Metodologia, analisi formale, visualizzazione, convalida, scrittura, revisione e editing. S. M. G.: Risorse, redazione, revisione e modifica.

Potenziati conflitti di interesse. Gli autori: Nessun conflitto di interesse segnalato. I conflitti che gli editori ritengono rilevanti per il contenuto del manoscritto sono stati resi noti.

Finanziamenti. Nessuno.

228 RIFERIMENTI

- 229 1. GBD 2017 Influenza Collaborators. Mortalità, morbilità e ricoveri ospedalieri dovuti alle infezioni delle vie respiratorie
inferiori causate dall'influenza
230 , 2017: un'analisi per lo studio Global Burden of Disease 2017. *Lancet*
231 *Respir Med* **2019**; 7:69–89.
- 232 2. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza del 1918: la madre di tutte le pandemie. *Emerg Infect Dis* **2006**;
233 12:15–22.
- 234 3. Lofgren E, Fefferman NH, Naumov YN, Gorski J, Naumova EN. Stagionalità dell'influenza: cause sottostanti
235 e teorie di modellizzazione. *J Virol* **2007**; 81:5429–5436.
- 236 4. Petrova VN, Russell CA. L'evoluzione dei virus dell'influenza stagionale. *Nat Rev Microbiol* **2018**;
237 16:47–60.
- 238 5. Wong S-S, Webby RJ. Vaccini antinfluenzali tradizionali e nuovi. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:476–
239 492.
- 240 6. Grohskopf LA. Prevenzione e controllo dell'influenza stagionale con i vaccini: raccomandazioni del
241 Comitato consultivo sulle pratiche di immunizzazione — Stati Uniti, stagione influenzale 2024–25.
242 *MMWR Recomm Rep* **2024**; 73. Disponibile all'indirizzo:
243 <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/73/rr/rr7305a1.htm>. Accesso effettuato il 28 novembre 2024.
- 244 7. Greene MT, Linder KA, Fowler KE, Saint S. Requisiti di vaccinazione antinfluenzale per il personale sanitario
245 negli ospedali statunitensi. *JAMA Netw Open* **2024**; 7:e2416861.
- 246 8. Simon R, Makuch RW. Una rappresentazione grafica non parametrica della relazione tra
247 sopravvivenza e il verificarsi di un evento: applicazione al bias responder/non responder. *Stat*
248 *Med* **1984**; 3:35–44.
- 249 9. Therneau TM, Crowson C, Atkinson E. Utilizzo di covariate dipendenti dal tempo e dipendenti dal tempo
250 coefficienti nel modello di Cox. **2021**; Disponibile all'indirizzo: [https://cran.r-](https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/timedep.pdf)
251 [project.org/web/packages/survival/vignettes/timedep.pdf](https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/timedep.pdf). Accesso effettuato l'8 maggio 2021.
- 252 10. Therneau TM, Grambsch PM. Modellizzazione dei dati di sopravvivenza: estensione del modello di Cox. New York, NY:
253 Springer International Publishing, **2000**.
- 254 11. R Core Team. R: un linguaggio e un ambiente per l'elaborazione statistica. Vienna, Austria: R
255 Foundation for Statistical Computing, **2024**.
- 256 12. Davies HTO, Crombie IK, Tavakoli M. Quando gli odds ratio possono essere fuorvianti? *BMJ* **1998**; 316:989–991.
- 257

258 TABELLE

259 Tabella

260 Tabella 1. Caratteristiche di base dei 53.402 dipendenti della Cleveland Clinic in Ohio

Caratteristiche	Totale ^a
Età in anni, media (SD)	42,0 (13,4)
Sesso	
Femmina	40 130 (75,1)
Maschio	13 272 (24,9)
Luogo di lavoro principale	
Cleveland Clinic Main	20 536 (38,5)
Ospedali regionali ^b	21 880 (41,0)
Centri ambulatoriali	9351 (17,5)
Centri amministrativi	1635 (3,1)
Tipo di lavoro	
Lavoro infermieristico clinico	10 840 (20,3)
Lavoro non infermieristico clinico	42562 (79,7)

^a I dati sono presentati in numero (%) salvo diversa indicazione.

^b Comprende Akron General, Ashtabula, Euclid, Fairview, Hillcrest, Lodi Community, Lutheran, Marymount, Medina, Mentor, Mercy (Canton),

Southpointe e Union, tutti parte del Cleveland Clinic Health System.

Tabella 2

Tabella 2. Associazioni non aggiustate e aggiustate con il tempo di insorgenza dell'influenza nei modelli di regressione proporzionale dei rischi di Cox

Modelli di regressione

Caratteristiche	Modello non corretto		Modello corretto	
	HR (95% CI) ^a	<i>P</i>	HR (95% CI) ^a	<i>P</i>
Stato vaccinale^b	1,27 (1,07-1,51)	.007	1,27 (1,07-1,51)	.007
Età	1,003 (0,998-1,007)	.22	1,003 (0,998-1,008)	.20
Sesso maschile^c	0,69 (0,59-0,80)	<0,001	0,71 (0,61-0,83)	<.001
Lavoro infermieristico clinico^d	1,18 (1,03-1,36)	.02	1,15 (0,99-1,33)	.07
Luogo di lavoro principale^e				
Centri amministrativi	0,78 (0,52-1,17)	0,23	0,80 (0,53-1,20)	.28
Centri ambulatoriali	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,32 (1,12-1,55)	.002
Ospedali regionali	0,95 (0,83-1,09)	.48	0,92 (0,80-1,06)	0,26

Abbreviazioni: CI, intervallo di confidenza; HR, rapporto di rischio; COVID-19, malattia da coronavirus 2019;

^a Da modelli di regressione multivariabile di Cox con proporzionalità dei rischi, in cui lo stato di vaccinazione bivalente è trattato come covariata dipendente dal tempo.

^b Covariata dipendente dal tempo

^c Il riferimento è il sesso femminile

^d Il riferimento non è il lavoro infermieristico clinico

^e Il riferimento è il campus principale della Cleveland Clinic

^f Il riferimento è basso

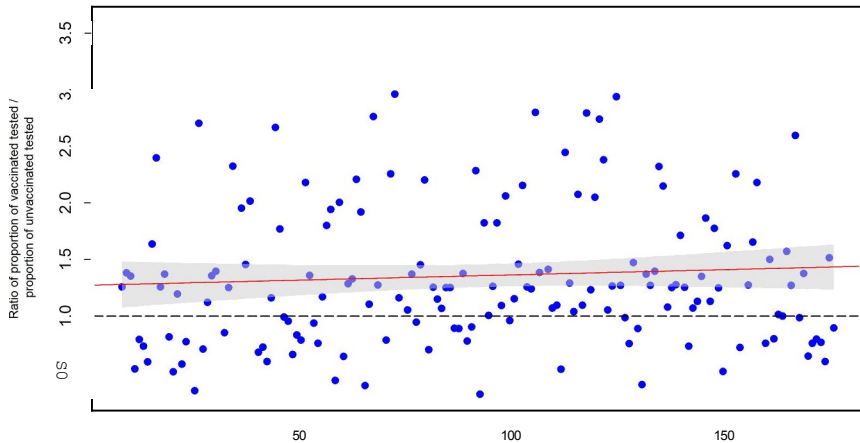
275 **LEGENDA DELLE FIGURE**

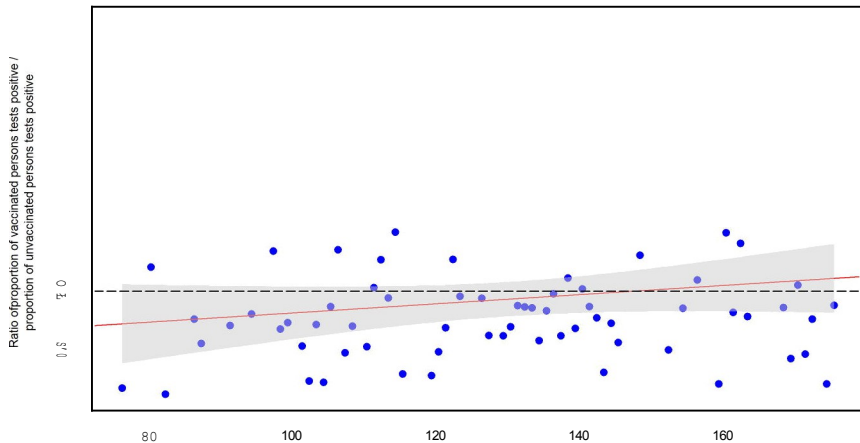
276 **Figura 1.** Confronto tra la percentuale di vaccinati sottoposti a test e la percentuale di
 277 persone non vaccinate sottoposte al test per l'influenza in ciascun giorno dello studio. Ogni giorno è rappresentato da un punto.
 278 La linea tratteggiata rappresenta la linea di riferimento in cui le proporzioni dei test sono le stesse per i
 279 vaccinati e non vaccinati. I punti che rappresentano i giorni in cui una percentuale più alta di vaccinati rispetto ai non
 280 vaccinati è stata sottoposta al test dell'influenza si troveranno al di sopra della linea di riferimento, mentre i punti relativi ai giorni in
 281 una percentuale inferiore di individui vaccinati rispetto a quelli non vaccinati sottoposti a test per l'influenza si troveranno
 282 sotto la linea di riferimento. La linea rossa rappresenta la linea di miglior adattamento per il rapporto sopra indicato mediante
 regressione lineare,
 283 dopo aver escluso i valori anomali (valori >3 deviazioni standard dal rapporto medio), con le aree ombreggiate
 284 rappresentano il suo intervallo di confidenza al 95%.
 285

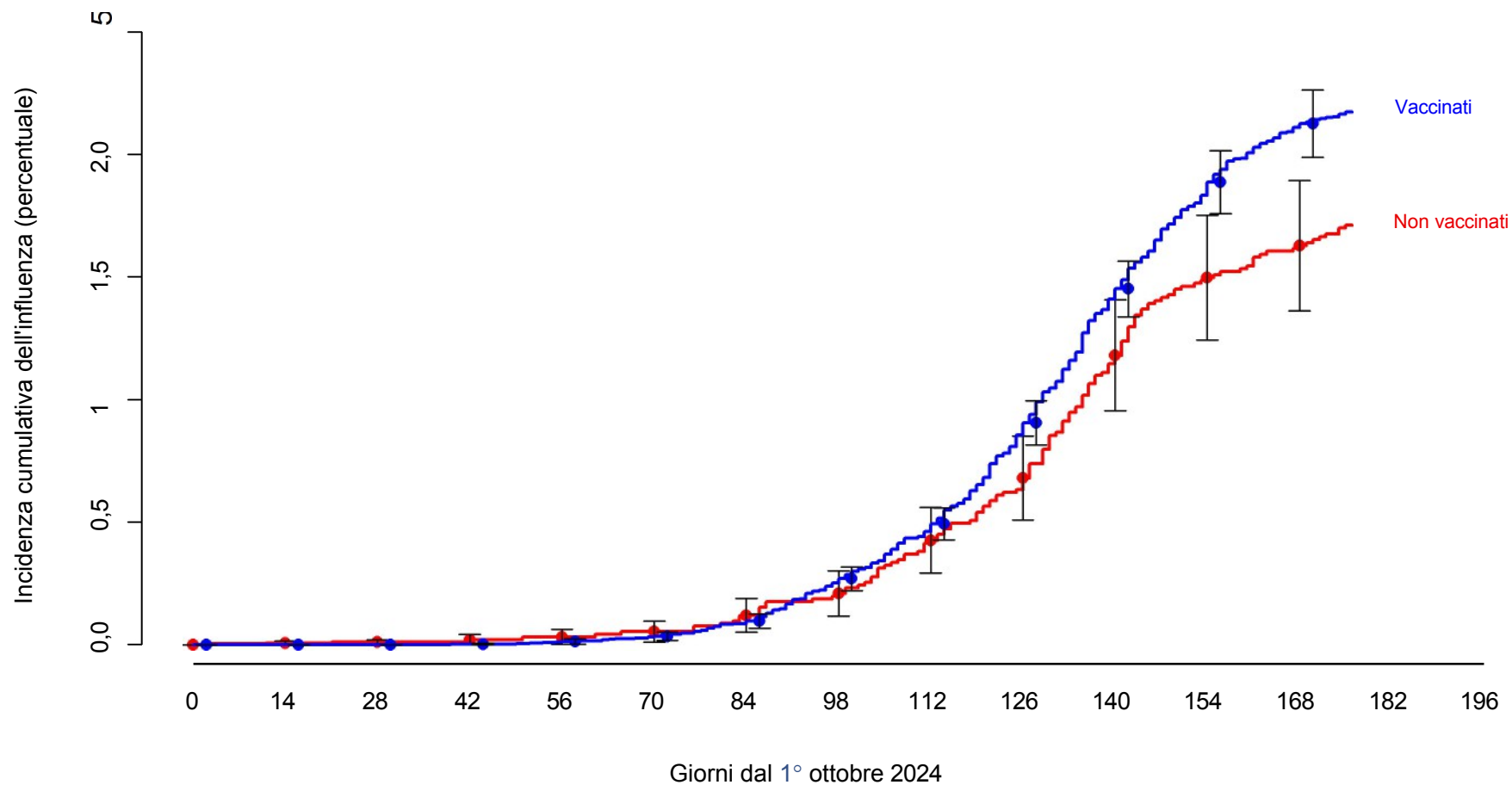
286 **Figura 2.** Confronto tra il rapporto tra la percentuale di test positivi delle persone vaccinate e il
287 percentuale di test positivi effettuati su persone non vaccinate in ciascun giorno dello studio. Ogni giorno è
288 rappresentato da un punto. La linea tratteggiata rappresenta la linea di riferimento dove la percentuale di test positivi
289 è la stessa per le persone vaccinate e non vaccinate. I punti che rappresentano i giorni in cui le persone vaccinate hanno avuto una
290 una percentuale di test positivi superiore rispetto ai non vaccinati si troveranno al di sopra della linea di riferimento, mentre i punti
relativi ai
291 i giorni in cui i vaccinati hanno avuto una percentuale di test positivi inferiore rispetto ai non vaccinati scenderanno al di sotto della
292 linea di riferimento. La linea rossa rappresenta la linea di miglior adattamento per il rapporto sopra indicato mediante regressione
lineare, dopo
293 esclusione dei valori anomali (valori >3 deviazioni standard dal rapporto medio), con le aree ombreggiate che rappresentano
294 il suo intervallo di confidenza al 95%. Ciò si basa sui dati relativi ai giorni in cui sia i vaccinati che i non vaccinati avevano
295 almeno un test effettuato. I dati erano insufficienti per ottenere punti di riferimento prima del giorno 76 dello studio.
296
297

298

299 **Figura 3.** Grafico di Simon-Makuch che confronta l'incidenza cumulativa dell'influenza per i soggetti stratificati in base allo
300 stato vaccinale. Il giorno zero era il 1° ottobre 2024, giorno in cui è stata avviata la somministrazione del vaccino antinfluenzale ai
301 dipendenti per la stagione virale respiratoria. Le stime puntuali e gli intervalli di confidenza al 95% sono jitterati lungo
302 l'asse x per migliorare la visibilità.
303







Numeri a rischio:

-----Non vaccinati

Vaccinato

53402	40858	23.900	9682	9339	9148	8989	8823	8693	8581	8457	8351	8262
0	12456	29162	43079	43217	43162	43066	42864	42669	42373	41995	41672	41427

Prot. Datum | data prot. 17.10.2025 Prot. Nr. | n. prot. LTG_0006175 Prot. Typ | tipo prot. Eingang - entrata



REPUBBLICA ITALIANA
IN NOME DEL POPOLO ITALIANO
TRIBUNALE DI ASTI

Il Giudice Ivana Lo Bello ha pronunciato la seguente

SENTENZA

ex art. 429 c.p.c. all'udienza da remoto del 26/09/2025 nel procedimento portante il n. 1070 dell'anno 2024 promosso da

Parte_1

rappresentata e difesa dagli avv.ti Renato Ambrosio e Chiara Ghibaudo

parte ricorrente

C O N T R O

Controparte_1

in persona del suo legale rappresentante pro-tempore, rappresentato e difeso dall'Avvocatura distrettuale dello Stato

parte resistente

E C O N T R O

Controparte_2

in persona del suo legale rappresentante pro-tempore, rappresentato e difeso dall'Avvocatura distrettuale dello Stato

parte resistente

MOTIVI DELLA DECISIONE

Con ricorso depositato in data 09/09/2024 la ricorrente in epigrafe indicata conveniva in giudizio il *Controparte_1* e l' *Controparte_2* al fine di ottenere l'indennizzo di cui alla n. 210/1992, oltre accessori di legge.

A sostegno della domanda esponeva di essere stata sottoposta, nelle date del 07/04/2021 e 28/04/2021, al ciclo vaccinale anti Sars -Cov – 2 con somministrazione del vaccino Comirnaty e di aver manifestato una reazione avversa concretizzatasi in “*atassia da poliradicolonevrite acuta tipo Miller Fisher*”, che aveva determinato vari

ricoveri nei mesi successivi a quello della vaccinazione e la necessità di numerose visite neurologiche.

Aggiungeva di essere stata ricoverata in data 10/02/2022 presso l'Ospedale di Orbassano "per sospetta mielite di natura infiammatoria" e che nella lettera di dimissione del 17/02/2022 il medico aveva concluso affermando "*non escludibile un ruolo scatenante vaccिनico*".

Precisava che, presentata domanda di indennizzo ai sensi della L. n. 210/92, la Commissione Medica di Milano aveva riconosciuto l'ascrivibilità della patologia a una delle otto categorie della tabella A allegata al DPR n. 834/1981, e la tempestività della domanda, escludendo nondimeno il nesso causale tra l'infermità e la vaccinazione anti - Covid 19.

Ritualmente instauratosi il contraddittorio, si costituivano in giudizio le Amministrazioni convenute, deducendo l'assenza di nesso causale tra la malattia e la vaccinazione di cui è causa, stante peraltro la sussistenza di altre condizioni preesistenti aventi ruolo causale nell'evento in esame.

La controversia veniva istruita mediante consulenza medico-legale, affidata ai dott. *Persona_1* e *Persona_2* ; indi all'odierna udienza i procuratori delle parti discutevano la causa, richiamando le rispettive conclusioni.

* * * * *

1. L'oggetto del contendere è rappresentato dall'accertamento del nesso causale tra la vaccinazione anti-SARS-COV-2 con Comirnaty, effettuato dalla ricorrente rispettivamente in data 07/04/2021 e in data 28/04/2021, e la sindrome di cui la stessa è portatrice, ai fini di cui all'art. 1 della L. 210/92, che riconosce il diritto ad un indennizzo da parte dello Stato, alle condizioni e nei modi stabiliti dalla presente legge, a chiunque abbia riportato, a causa di vaccinazioni obbligatorie per legge o per ordinanza di una autorità sanitaria italiana, lesioni o infermità, dalle quali sia derivata una menomazione permanente della integrità psico-fisica.

Giova, altresì, precisare che ai sensi dell'art 1 bis della medesima disposizione l'indennizzo di cui al comma 1 spetta anche a coloro che abbiano riportato lesioni o infermità, dalle quali sia derivata una menomazione permanente della integrità psico-fisica, a causa della vaccinazione anti SARS-CoV-2 raccomandata dall'autorità sanitaria italiana.

1.1. La giurisprudenza di legittimità ha chiarito che *“Per il riconoscimento del diritto al beneficio assistenziale derivante da menomazioni psico - fisiche la prova a carico dell'interessato ha ad oggetto, a seconda dei casi, l'effettuazione della terapia trasfusionale o la somministrazione dei vaccini, il verificarsi di danni e il nesso causale tra la prima e i secondi, da valutarsi secondo un criterio di ragionevole probabilità scientifica”* (cfr. Cass. civ. n. 26875/2017) e che *“la prova a carico dell'interessato ha ad oggetto l'effettuazione della somministrazione vaccinale e il verificarsi dei danni alla salute e il nesso causale tra la prima e i secondi, da valutarsi secondo un criterio di ragionevole probabilità scientifica, mentre nel caso il nesso causale costituisce solo un'ipotesi possibile”* (si veda Cass. civ. n. 2474/2021).

2. Tanto sopra premesso, le conclusioni cui sono pervenuti i CTU - che questo Giudice condivide, in quanto fondate sull'anamnesi delle condizioni di salute della parte ed immuni da errori di metodo o vizi logici - riconoscono la sussistenza di un nesso eziologico tra il ciclo vaccinale e la patologia da cui l'istante è affetta, comprovandosi il soddisfacimento del requisito sanitario per beneficiare dell'indennizzo della L. n. 210/92.

Le indicazioni degli ausiliari in merito alla sussistenza del nesso causale tra le vaccinazioni somministrate alla ricorrente e l'infermità da quest'ultima presentata, pur se non formulate in senso di certezza, consentono quindi di ritenere sufficientemente dimostrato, in termini probabilistici, tenuto conto di tutti i complessivi elementi descritti nella relazione peritale, che il ciclo vaccinale di cui si discute abbia causato la patologia di mielite/poliradicolonevrite.

2.1. Invero, i CTU hanno rilevato che:

“Come noto la pandemia da SARS-CoV-2 ha richiesto lo sviluppo urgente di vaccini di cui molti sono arrivati alla fase clinica ed i principali hanno mostrato una elevata efficacia dopo la seconda dose.

Ed in questo contesto, sebbene la maggior parte degli effetti collaterali sia descritta come lieve, è da ricordare che sono stati segnalati rari ma gravi eventi avversi neurologici rappresentati da sindrome di Guillain-Barré (GBS), da paralisi di Bell, da mielite trasversa (ATM), da encefalite ed encefalomielite acuta disseminata (ADEM), da sindrome di Miller-Fisher, da ictus e da trombosi cerebrale.

Vero è che sebbene Comirnaty abbia dimostrato elevata efficacia e buon profilo di sicurezza, è da considerare che sono comunque riportate reazioni avverse neurologiche importanti e che, tra queste, è compresa la mielite trasversa acuta (ATM), condizione infiammatoria del midollo spinale in grado di determinare paralisi, disturbi sensitivi e disfunzioni autonome.

In particolare, e per quanto di specifico interesse, è da evidenziare che il sistema di sorveglianza VAERS ha registrato 593 casi di mielite trasversa dopo la vaccinazione fino al 2022 e che, di questi, 280 sono stati associati al vaccino Comirnaty.

Ed ancora, uno studio del 2024 ha identificato la mielite trasversa come un possibile ma raro effetto collaterale, con incidenza di 1,82 casi per milione di dosi somministrate.

I meccanismi biologici causativi non sono, oggi, del tutto noti ma è comunque ipotizzato un mimetismo molecolare, una iperattivazione immunitaria od un coinvolgimento di IL-6 e IL-17 nella consapevolezza che la seconda dose di vaccino può essere associata ad una intensificazione della risposta infiammatoria proprio per l'aumento dei livelli sierici di IL-6.

Ciò che è certo è che si innescano reazioni immunitarie anomale con complicanze neurologiche e che la temporalità degli eventi e l'intensità della risposta immunitaria indotta dalla seconda dose di vaccino consente di individuare, soprattutto in soggetti che possono essere in qualche modo predisposti, l'esistenza di un rapporto causale per attivazione o riattivazione di processi autoimmunitari con coinvolgimento del midollo spinale anche perché, nel caso di specie, è dimostrata l'esclusione di possibili cause alternative".

2.2. Dopo una accurata ricostruzione anamnestica e la specifica dissertazione sugli studi anche recentissimi, sopra riportati, gli ausiliari hanno concluso che *"considerati sia i gravi sintomi neurologici certificati a distanza di una settimana dalla seconda dose di Comirnaty che l'assenza di identificabili fattori causali alternativi prevalenti in grado di giustificare autonoma insorgenza di quanto determinatosi, è da ritenersi più probabile che non che si tratti di danno neurologico su base immuno-mediata post-vaccinale"*.

3. Nemmeno le, sia pur qualificate, contestazioni mosse dal CTP delle parti convenute hanno modificato le conclusioni cui sono giunti i CTU, che vanno in questa sede integralmente recepite e confermate, anche con riferimento alla non rilevanza causale di altra patologia dalla quale la ricorrente era affetta al momento della somministrazione dei vaccini e che il Tribunale ritiene di riportare testualmente:

“Per quanto riguarda, poi, il generico riferimento ad una possibile eziologia multifattoriale della poliradicolonevrite con richiamo alla positività sierologica per virus di Epstein-Barr (EBV) e citomegalovirus (CMV), è da rilevare che tale rilievo non è coerente con il significato clinico delle positività delle IgG, con il quadro clinico e non era presente nessun segno sistemico di infezione.

Ne consegue che l'ipotesi infettiva come causa scatenante è stata esclusa clinicamente e laboratoristicamente e che i soli segni di immunità pregressa non possono ovviamente spiegare la comparsa acuta della sintomatologia.

Vi è, in ultimo, generico riferimento ad altri possibili fattori di rischio come stile di vita, predisposizione genetica o uso di farmaci ma è da prendere atto che, nel caso in esame, il soggetto era affetto da epatite autoimmune/colangite sclerosante in terapia con azatioprina da lungo tempo, senza precedenti eventi neurologici e che non è documentato alcun cambiamento farmacologico, clinico o infettivologico che possa giustificare l'esordio acuto a pochi giorni dalla seconda dose vaccinale.

È noto che le comorbidità possono semmai configurare un terreno predisponente ma, senz'altro, non forniscono alternativa eziologica concreta o prevalente all'evento scatenante.

Il richiamo alla multifattorialità ed all'eziologia sconosciuta della poliradicolonevrite non può contraddire un nesso quando tempistica, quadro clinico ed assenza di alternative evidenti convergono verso una spiegazione immuno-mediata post-vaccinale.

Sulla presenza di patologie autoimmuni come causa alternativa è importante chiarire che le malattie autoimmuni croniche preesistenti, pur configurando una condizione predisponente, non costituiscono di per sé causa efficiente autonoma per la comparsa di una sindrome neurologica acuta immuno-mediata come una poliradicolonevrite tipo Miller-Fisher o una mielite trasversa.

Le patologie autoimmuni erano clinicamente stabili da tempo, come indicato dagli esami di funzionalità epatica pre-vaccinali, e non avevano mai determinato sintomi neurologici prima del maggio 2021 essendo peraltro noto che l'assetto autoimmune di un soggetto rappresenta un fattore di vulnerabilità a risposte immunitarie abnormi post-stimolo.

Ed è ovvio che l'assetto autoimmune non può configurare una causa alternativa ma un eventuale terreno favorente l'evento immunomediato post-vaccinale condizione, questa, coerente con la nozione di "ospite predisposto" spesso citata in letteratura.

Sulla "condizione precedente alla somministrazione" è da sottolineare che il soggetto è stata sottoposto ad indagini estese subito dopo l'esordio che non hanno evidenziato fattori eziologici alternativi.

La storia clinica, confermata dalla disponibile documentazione, dimostra che non vi erano eventi neurologici pregressi né modifiche terapeutiche rilevanti pre-vaccinazione e la proposta ipotesi di causa preesistente ignota non può ovviamente prevalere su una sequenza clinica temporale ben definita e coerente con l'ipotesi di evento post-vaccinale.

Ne consegue che la presenza di una patologia autoimmune preesistente non rappresenta una causa autonoma e sufficiente dell'evento neurologico bensì una eventuale condizione favorente che, nel caso in esame, ha probabilmente facilitato una risposta immunitaria aberrante in seguito al vaccino Comirnaty.

Il soggetto era astrattamente a maggior rischio di disreattività a diversi fattori ed agenti esterni ma è di tutta evidenza che le gravi manifestazioni cliniche si sono manifestate ad una settimana dalla somministrazione della seconda dose di Comirnaty configurando, e non potrebbe essere diversamente, un elemento cronologico di causalità che non può essere ridotto a semplice coincidenza parrebbero essere travisate le finalità dei criteri Brighton che sono nati per la standardizzazione della sorveglianza vaccinale epidemiologica e certamente non per escludere la diagnosi clinica in ambito neurologico o medico-legale.

[...]

I dati pregressi mostrano stabilità delle patologie autoimmuni senza segni di scompenso o sintomi neurologici e non risultano modifiche terapeutiche recenti, né sospetti clinici di infezioni attive in atto al momento dell'esordio.

Per queste motivazioni la completezza della documentazione clinico-assistenziale dopo l'evento è ampiamente sufficiente per esprimere un giudizio fondato, come da prassi consolidata.

Sulla questione, poi, secondo cui positività sierologica per EBV/CMV (IgG) ed urinocoltura positiva per streptococco agalactiae rappresenterebbero fattori di rischio per la mielite è da ribadire che tali considerazioni risultano alquanto deboli sia clinicamente che scientificamente poiché la presenza di IgG positive indica esposizione pregressa ma non infezione attiva, la PCR è risultata negativa, non sono riportati sintomi/segni compatibili con infezione attiva da EBV o CMV e lo streptococco agalactiae è riscontrato in urinocoltura dopo l'esordio neurologico.

Ne consegue che nessuna delle infezioni menzionate è da considerarsi compatibile con una causa scatenante acuta del quadro e, pertanto, non vi sono spiegazioni alternative valide.

E sull'asserita presenza di una "pregressa polineuropatia acuta a componente sensitiva prevalente" è da prendere atto che dalla disponibile documentazione non risulta alcun episodio pregresso conciliabile con una poliradicolonevrite acuta o con una mielite prima del maggio 2021.

Non vi sono dati dimostranti un quadro neurologico simile in precedenza o una diagnosi analoga.

L'episodio di maggio 2021 è chiaramente descritto come esordio acuto ed è documentato con progressivo peggioramento con assenza di eventi analoghi in anamnesi.

Non vi è evidenza di "recidiva" e/o di condizione neurologica cronica preesistente.

Ed in relazione alla presenza di patologie autoimmuni, di ipertensione arteriosa e di tabagismo come possibile causa alternativa si conferma, come peraltro già rilevato, che tali condizioni non rappresentano cause dirette note di mielite o di polineuropatia acuta ma, piuttosto, definiscono un terreno predisposto a risposte

immunitarie abnormi come quelle attese dopo una stimolazione antigenica intensa.

Nel caso in esame il soggetto era un ospite immunologicamente predisposto come spesso descritto nei casi di mielite o di sindrome di Guillain-Barrè post-vaccinale.

In conclusione, nessuno dei presunti fattori alternativi elencati è in grado di spiegare l'evento neurologico acuto occorso a sette giorni dalla seconda dose del vaccino Comirnaty".

3.1. Il giudizio espresso dai CTU, esaurientemente e logicamente motivato, soddisfa il criterio logico di accertamento della causalità civile adottato dalla giurisprudenza di legittimità con riferimento a fattispecie del tutto analoghe alla presente, vale a dire il criterio del "più probabile che non", secondo cui il nesso causale può ritenersi provato quando la relazione probabilistica fra il fatto (la vaccinazione) e l'evento di danno sia giudicata assai più alta rispetto a tutte le altre ipotesi individuate come possibili, ma in realtà assai improbabili, oltre che oggetto di mere e indimostrate congetture, di guisa che la domanda attorea può trovare accoglimento dovendosi affermare il diritto dell'istante ad ottenere l'indennizzo di cui alla L. n. 210/92 con decorrenza dalla domanda amministrativa.

3.2. Deve altresì evidenziarsi che l'indennizzo dovuto ai soggetti danneggiati da vaccinazioni obbligatorie, trasfusioni ed emoderivati previsto dalla L. n. 210/92, ha natura non risarcitoria, ma assistenziale in senso lato, riconducibile alle prestazioni poste a carico dello Stato sociale in ragione del dovere di solidarietà sociale, ed è alternativo alla pretesa risarcitoria volta ad ottenere l'integrale risarcimento dei danni subiti in conseguenza del contagio; ne consegue che sono dovuti, in caso di ritardo nella erogazione, gli interessi legali con l'applicabilità di tutte le disposizioni che regolano la materia (cfr. Cass. civ. n. 17047/2003; in termini Cass. civ. n. 26883/2008).

Poiché ai sensi dell'art. 7 L. n. 533/73 l'indennizzo è esigibile decorsi 120 giorni dalla presentazione della domanda, deve ritenersi che dopo tale scadenza comincino a decorrere gli interessi senza che sia necessaria la costituzione in mora.

4. Le spese di lite seguono la soccombenza e vanno poste a carico del CP_1 convenuto, con rinvio al dispositivo per la relativa liquidazione eseguita alla luce dei valori minimi previsti dal D.M. 55/14, stante la particolarità e complessità dell'accertamento, individuandosi lo scaglione di riferimento in ragione del valore

indeterminabile della causa di bassa complessità, dunque in quello compreso tra € 26.000 e 52.000.

Sussistono al contrario giusti motivi per compensare le spese di lite tra il ricorrente e l' *CP_2* convenuta, considerata la peculiare posizione processuale assunta da quest'ultima nel presente giudizio.

4.1. In ragione del principio della causalità le spese di C.T.U. si pongono definitivamente a carico del *Controparte_1* .

P.Q.M.

Uditi i procuratori delle parti, definitivamente pronunciando, disattese ogni diversa domanda, eccezione e istanza, dichiara che la ricorrente ha diritto ad ottenere l'indennizzo di cui alla L. n. 210/92 con decorrenza dal primo giorno del mese successivo alla presentazione della domanda amministrativa e condanna il [...] *CP_1* al pagamento in suo favore dei ratei già maturati alla data odierna, oltre accessori come per legge.

Condanna il *Controparte_1* , in persona del suo legale rappresentante pro-tempore, alla rifusione in favore della ricorrente delle spese di giudizio, che si liquidano in complessivi € 4.700, oltre € 43 per esposti, IVA, CPA e rimborso forfettario delle spese generali nelle misure di legge.

Dichiara interamente compensate le spese di lite nei rapporti tra la ricorrente e l' *Controparte_2* .

Pone definitivamente a carico del *CP_1* le spese di CTU, già liquidate in corso di causa.

Così deciso in Asti, 26/09/2025

Il Giudice
Ivana Lo Bello



ITALIENISCHE REPUBLIK
IM NAMEN DES ITALIENISCHEN VOLKES
GERICHT VON ASTI

Die Richterin Ivana Lo Bello hat folgendes Urteil gefällt

URTEIL

gemäß Art. 429 der italienischen Zivilprozessordnung in der Fernverhandlung vom 26.09.2025 im
Verfahren Nr. 1070 des Jahres 2024, eingeleitet von

Parte_1

vertreten und verteidigt durch die Rechtsanwälte Renato Ambrosio und
Chiara Ghibaudo

Kläger

GEGEN

Gegenpartei_1

in Person , des , seines , seines Rechtsanwalts , seines Vertreters , pro-tempore, ,
vertreten durch , und , verteidigt

durch die Bezirksstaatsanwaltschaft

Beklagte

GEGEN

Gegenpartei_2

in Person des seines Rechtsbeistands Vertreters pro-tempore, vertreten durch und
verteidigt

durch die Bezirksstaatsanwaltschaft

Beklagte

GRÜNDE DER ENTSCHEIDUNG

Mit der am 09.09.2024 eingereichten Klage hat die oben genannte Klägerin

vor Gericht *Gegenpartei_1* u n d die *Gegenpartei_2* vor Gericht, u m
Entschädigung gemäß Nr. 210/1992 zuzüglich gesetzlicher Nebenkosten zu erwirken.

Zur Begründung ihrer Klage führte sie an, dass sie am 07.04.2021 und am 28.04.2021 die
Impfung gegen Sars -Cov-2 -I m p f z y k l u s mit Verabreichung des Impfstoffs Comirnaty
unterzogen worden sei und eine Nebenwirkung in Form einer „akuten Polyradikuloneuritis vom
Typ Miller Fisher“ gezeigt habe, die zu mehreren

Krankenhausaufenthalte in den Monaten nach der Impfung und zahlreiche neurologische Untersuchungen erforderlich gemacht habe.

Sie fügte hinzu, dass sie am 10.02.2022 im Krankenhaus von Orbassano „wegen Verdachts auf entzündliche Myelitis“ stationär aufgenommen worden sei und dass der Arzt in seinem Entlassungsschreiben vom 17.02.2022 zu dem Schluss gekommen sei, dass „*eine auslösende Rolle des Impfstoffs nicht ausgeschlossen werden kann*“.

Er präzisierte, dass nach Einreichung des Entschädigungsantrags gemäß Gesetz Nr. 210/92 die Medizinische Kommission von Mailand anerkannt habe, dass die Erkrankung einer der acht Kategorien der Tabelle A im Anhang zum Präsidialdekret Nr. 834/1981 zuzuordnen sei und der Antrag rechtzeitig gestellt worden sei, jedoch den Kausalzusammenhang zwischen der Erkrankung und der Covid-19-Impfung ausgeschlossen habe.

Nach ordnungsgemäßer Einleitung des kontradiktorischen Verfahrens traten die beklagten Behörden dem Verfahren bei und machten geltend, dass kein Kausalzusammenhang zwischen der Krankheit und der Impfung bestehe, zumal andere bereits zuvor bestehende Erkrankungen eine ursächliche Rolle bei dem vorliegenden Ereignis gespielt hätten.

Der Rechtsstreit wurde durch ein medizinisch-rechtliches Gutachten untersucht, das Dr.

Person_1 und *Person_2* ; in der heutigen Verhandlung erörterten die Anwälte der Parteien

die Rechtssache und verwiesen auf ihre jeweiligen Schlussfolgerungen.

* * * * *

1. Gegenstand des Rechtsstreits ist die Feststellung des Kausalzusammenhangs zwischen der SARS-COV-2-Impfung mit Comirnaty, die die Klägerin am 07.04.2021 bzw. am 28.04.2021 erhalten hat, und dem von ihr getragenen Syndrom, im Sinne von Art. 1 des Gesetzes 210/92, das jedem, der aufgrund von gesetzlich oder durch Verordnung einer italienischen Gesundheitsbehörde vorgeschriebenen Impfungen Verletzungen oder Gebrechen erlitten hat, die zu einer dauerhaften Beeinträchtigung der psychophysischen Integrität geführt haben.

Es sei außerdem darauf hingewiesen, dass gemäß Art. 1 bis derselben Bestimmung die Entschädigung gemäß Absatz 1 auch denjenigen zusteht, die aufgrund der von der italienischen Gesundheitsbehörde empfohlenen SARS-CoV-2-Impfung Verletzungen oder Krankheiten erlitten haben, die zu einer dauerhaften Beeinträchtigung der psychophysischen Integrität geführt haben.

1.1. Die Rechtsprechung hat klargestellt, dass *„für die Anerkennung des Anspruchs auf Sozialleistungen aufgrund psychischer oder physischer Beeinträchtigungen der Nachweis durch den Betroffenen je nach Fall die Durchführung der Transfusionstherapie oder die Verabreichung von Impfstoffen, das Auftreten von Schäden und den Kausalzusammenhang zwischen ersteren und letzteren umfasst, der nach einem Kriterium der angemessenen wissenschaftlichen Wahrscheinlichkeit zu beurteilen ist“* (vgl. Kassationsgericht, Zivilkammer, Nr. 26875/2017) und dass *„der Nachweis, den die betroffene Person zu erbringen hat, die Durchführung der Impfung und das Auftreten von Gesundheitsschäden sowie den Kausalzusammenhang zwischen der ersten und den zweiten betrifft, der nach einem Kriterium der wissenschaftlichen Plausibilität zu beurteilen ist, während im vorliegenden Fall der Kausalzusammenhang nur eine mögliche Hypothese darstellt“* (siehe Kassationsgericht, Zivilkammer, Nr. 2474/2021).

2. Vor diesem Hintergrund kommen die Sachverständigen zu dem Schluss – die dieser Richter teilt, da sie auf der Anamnese des Gesundheitszustands der Partei beruhen und frei von methodischen Fehlern oder logischen Mängeln sind – erkennen das Vorliegen eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen der Impfung und der Erkrankung der Klägerin an, wodurch die gesundheitliche Voraussetzung für den Anspruch auf Entschädigung gemäß Gesetz Nr. 210/92 erfüllt ist.

Die Angaben der Sachverständigen zum Vorliegen eines Kausalzusammenhangs zwischen den der Klägerin verabreichten Impfungen und der von ihr geltend gemachten Erkrankung lassen, auch wenn sie nicht mit Sicherheit formuliert sind, unter Berücksichtigung aller im Sachverständigengutachten beschriebenen Elemente probabilistisch gesehen als ausreichend bewiesen erscheinen, dass die fragliche Impfserie die Erkrankung an Myelitis/Polyradikuloneuritis verursacht hat.

2.1. Tatsächlich haben die Sachverständigen festgestellt, dass:

„Bekanntlich erforderte die SARS-CoV-2-Pandemie die dringende Entwicklung von Impfstoffen, von denen viele die klinische Phase erreicht haben und die wichtigsten nach der zweiten Dosis eine hohe Wirksamkeit gezeigt haben.

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass zwar die meisten Nebenwirkungen als leicht beschrieben werden, jedoch seltene, aber schwerwiegende neurologische Nebenwirkungen wie das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), Bell-Lähmung, transversale Myelitis (ATM), Enzephalitis und akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM), Miller-Fisher-Syndrom, Schlaganfall und zerebrale Thrombose.

Es stimmt zwar, dass Comirnaty eine hohe Wirksamkeit und ein gutes Sicherheitsprofil aufweist, jedoch ist zu berücksichtigen, dass dennoch schwerwiegende neurologische Nebenwirkungen gemeldet wurden, darunter auch die akute transverse Myelitis (ATM), eine entzündliche Erkrankung des Rückenmarks, die zu Lähmungen, Sensibilitätsstörungen und autonomen Dysfunktionen führen kann.

Insbesondere und von besonderem Interesse ist, dass das VAERS-Überwachungssystem bis 2022 593 Fälle von transversaler Myelitis nach der Impfung registriert hat, von denen 280 mit dem Impfstoff Comirnaty in Verbindung gebracht wurden.

Darüber hinaus hat eine Studie aus dem Jahr 2024 die transverse Myelitis als mögliche, aber seltene Nebenwirkung mit einer Inzidenz von 1,82 Fällen pro Million verabreichter Dosen identifiziert.

Die ursächlichen biologischen Mechanismen sind heute noch nicht vollständig bekannt, aber es wird dennoch eine molekulare Mimikry, eine Immunhyperaktivierung oder eine Beteiligung von IL-6 und IL-17 vermutet, da bekannt ist, dass die zweite Impfdosis mit einer Verstärkung der Entzündungsreaktion gerade wegen des Anstiegs der IL-6-Serumspiegel in Verbindung gebracht werden kann.

Sicher ist, dass abnormale Immunreaktionen mit neurologischen Komplikationen ausgelöst werden und dass die zeitliche Abfolge der Ereignisse und die Intensität der durch die zweite Impfdosis ausgelösten Immunantwort es ermöglichen, insbesondere bei Personen, die in gewisser Weise prädisponiert sein können, ein kausaler Zusammenhang für die Aktivierung oder Reaktivierung von Autoimmunprozessen unter Beteiligung des Rückenmarks festgestellt werden kann, auch weil im vorliegenden Fall mögliche alternative Ursachen ausgeschlossen sind.

2.2. Nach einer sorgfältigen Anamnese und der spezifischen Erörterung der oben genannten, auch sehr aktuellen Studien kamen die Sachverständigen zu dem Schluss, *dass „angesichts der schweren neurologischen Symptome, die eine Woche nach der zweiten Dosis Comirnaty festgestellt wurden, und des Fehlens identifizierbarer alternativer Ursachen, die das Auftreten der Symptome erklären könnten, es wahrscheinlicher ist, dass es sich um eine immunvermittelte neurologische Schädigung nach der Impfung handelt“.*

3. Auch die, wenn auch qualifizierten, Einwände des CTP der beklagten Parteien haben die Schlussfolgerungen der CTU nicht geändert, die hier vollständig übernommen und bestätigt werden, auch in Bezug auf die nicht kausale Relevanz einer anderen Erkrankung, an der die Klägerin zum Zeitpunkt der Verabreichung der Impfstoffe litt und die das Gericht wörtlich wiedergibt:

„Was den allgemeinen Hinweis auf eine mögliche multifaktorielle Ätiologie der Polyradikuloneuritis unter Verweis auf die serologische Positivität für das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Cytomegalievirus (CMV) betrifft, so ist anzumerken, dass diese Feststellung nicht mit der klinischen Bedeutung der IgG-Positivität und dem klinischen Bild vereinbar ist und dass keine systemischen Anzeichen einer Infektion vorlagen.

Daraus folgt, dass die Infektionshypothese als Auslöser klinisch und labortechnisch ausgeschlossen wurde und dass die Anzeichen einer früheren Immunität allein natürlich nicht das akute Auftreten der Symptomatik erklären können.

Schließlich wird allgemein auf andere mögliche Risikofaktoren wie Lebensstil, genetische Veranlagung oder Medikamenteneinnahme hingewiesen, aber es ist zu beachten, dass im vorliegenden Fall der Patient an einer Autoimmunhepatitis/sklerosierenden Cholangitis litt und seit langem mit Azathioprin behandelt wurde, ohne dass zuvor neurologische Ereignisse aufgetreten waren, und dass keine pharmakologischen, klinischen oder infektiologischen Veränderungen dokumentiert sind, die das akute Auftreten wenige Tage nach der zweiten Impfdosis rechtfertigen könnten.

Es ist bekannt, dass Komorbiditäten zwar einen prädisponierenden Faktor darstellen können, aber sicherlich keine konkrete oder vorherrschende ätiologische Alternative zum auslösenden Ereignis bieten.

Der Verweis auf die Multifaktorialität und die unbekannte Ätiologie der Polyradikuloneuritis kann einen Zusammenhang nicht widerlegen, wenn Zeitpunkt, Krankheitsbild und das Fehlen offensichtlicher Alternativen auf eine immunvermittelte Erklärung nach der Impfung hindeuten.

Was das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen als alternative Ursache angeht, ist es wichtig zu klären, dass bereits bestehende chronische Autoimmunerkrankungen zwar eine prädisponierende Bedingung darstellen, aber an sich keine eigenständige Ursache für das Auftreten eines akuten immunvermittelten neurologischen Syndroms wie einer Polyradikuloneuritis vom Typ Miller-Fisher oder einer transversalen Myelitis sind.

Die Autoimmunerkrankungen waren seit langem klinisch stabil, wie aus den vor der Impfung durchgeführten Leberfunktionstests hervorgeht, und hatten vor Mai 2021 nie neurologische Symptome verursacht, wobei bekannt ist, dass die Autoimmunität eines Menschen einen Risikofaktor für abnormale Immunreaktionen nach einer Stimulation darstellt.

Es ist offensichtlich, dass die Autoimmunität keine alternative Ursache darstellen kann, sondern lediglich einen möglichen Nährboden für das immunvermittelte Ereignis nach der Impfung, was mit dem in der Literatur häufig zitierten Begriff des „prädisponierten Wirts“ übereinstimmt.

In Bezug auf den „Zustand vor der Verabreichung“ ist zu betonen, dass die Person unmittelbar nach dem Ausbruch umfangreichen Untersuchungen unterzogen wurde, die keine alternativen ätiologischen Faktoren ergaben.

Die Krankengeschichte, die durch die verfügbaren Unterlagen bestätigt wird, zeigt, dass es vor der Impfung weder neurologische Vorfälle noch relevante therapeutische Veränderungen gab, und die vorgeschlagene Hypothese einer unbekannten vorbestehenden Ursache kann natürlich nicht über eine klar definierte klinische Zeitsequenz, die mit der Hypothese eines postvakzinalen Ereignisses übereinstimmt, triumphieren.

Daraus folgt, dass das Vorliegen einer vorbestehenden Autoimmunerkrankung keine eigenständige und ausreichende Ursache für das neurologische Ereignis darstellt, sondern lediglich eine möglicherweise begünstigende Bedingung, die im vorliegenden Fall wahrscheinlich eine abweichende Immunreaktion nach der Impfung mit Comirnaty begünstigt hat.

Das Subjekt war abstrakt gesehen einem höheren Risiko der Reaktivität auf verschiedene externe Faktoren und Wirkstoffe ausgesetzt, aber es ist offensichtlich, dass die schweren klinischen Symptome eine Woche nach Verabreichung der zweiten Dosis Comirnaty auftraten, was, wie es nicht anders sein kann, ein chronologischer Kausalzusammenhang, der nicht auf einen bloßen Zufall reduziert werden kann. Die Ziele der Brighton-Kriterien, die zur Standardisierung der epidemiologischen Impfüberwachung und sicherlich nicht zum Ausschluss der klinischen Diagnose im neurologischen oder medizinisch-rechtlichen Bereich entwickelt wurden, scheinen hier falsch interpretiert worden zu sein.

[...]

Die bisherigen Daten zeigen eine Stabilität der Autoimmunerkrankungen ohne Anzeichen einer Dekompensation oder neurologische Symptome, und es liegen weder kürzlich erfolgte therapeutische Änderungen noch klinischer Verdacht auf aktive Infektionen zum Zeitpunkt des Ausbruchs vor.

Aus diesen Gründen reicht die Vollständigkeit der klinischen und pflegerischen Dokumentation nach dem Ereignis völlig aus, um eine fundierte Beurteilung abzugeben, wie es gängige Praxis ist.

Was die Frage betrifft, ob eine serologische Positivität für EBV/CMV (IgG) und eine positive Urinkultur für *Streptococcus agalactiae* Risikofaktoren für Myelitis darstellen, ist zu betonen, dass diese Überlegungen sowohl klinisch als auch wissenschaftlich eher schwach sind, da das Vorhandensein von positiven IgG auf eine frühere Exposition, aber nicht auf eine aktive Infektion hinweist, die PCR negativ war, keine Symptome/Anzeichen vorliegen, die mit einer aktiven EBV- oder CMV-Infektion vereinbar sind, und *Streptococcus agalactiae* in der Urinkultur nach dem neurologischen Debüt festgestellt wurde.

Daraus folgt, dass keine der genannten Infektionen als akute Auslöserin des Krankheitsbildes in Betracht kommt und es daher keine anderen plausiblen Erklärungen gibt.

Was die behauptete „vorherige akute Polyneuropathie mit vorwiegend sensorischer Komponente“ betrifft, ist anzumerken, dass aus den verfügbaren Unterlagen keine früheren Episoden hervorgehen, die mit einer akuten Polyradikuloneuritis oder einer Myelitis vor Mai 2021 vereinbar wären.

Es gibt keine Daten, die ein ähnliches neurologisches Bild in der Vergangenheit oder eine ähnliche Diagnose belegen.

Der Vorfall im Mai 2021 wird eindeutig als akuter Beginn beschrieben und ist mit einer fortschreitenden Verschlechterung ohne ähnliche Ereignisse in der Anamnese dokumentiert.

Non vi è evidenza di „recidiva“ e/o di condizione neurologica cronica vorbestehend.

In Bezug auf das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen, arterieller Hypertonie und Tabakkonsum als mögliche alternative Ursachen wird bestätigt, dass diese Erkrankungen, wie bereits erwähnt, keine direkten bekannten Ursachen für Myelitis oder akute Polyneuropathie darstellen, sondern vielmehr einen Boden für abnormale Immunreaktionen

abnormale Immunreaktionen darstellen, wie sie nach einer intensiven Antigenstimulation zu erwarten sind.

Im vorliegenden Fall handelte es sich um einen immunologisch prädisponierten Patienten, wie er häufig in Fällen von Myelitis oder postvakzinalen Guillain-Barré-Syndrom beschrieben wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der aufgeführten alternativen Faktoren das akute neurologische Ereignis sieben Tage nach der zweiten Dosis des Impfstoffs Comirnaty erklären kann.

3.1. Das von den Sachverständigen abgegebene Urteil, das ausführlich und logisch begründet ist, erfüllt das logische Kriterium der Feststellung der zivilrechtlichen Kausalität, das von der Rechtsprechung in Bezug auf Fälle, die dem vorliegenden Fall völlig ähnlich sind, angenommen wurde, nämlich das Kriterium des „eher wahrscheinlich als nicht“, wonach der Kausalzusammenhang als bewiesen angesehen werden kann, wenn der Wahrscheinlichkeitszusammenhang zwischen dem Ereignis (der Impfung) und dem Schadensereignis als wesentlich höher eingeschätzt wird als alle anderen als möglich identifizierten Hypothesen, in Wirklichkeit jedoch höchst unwahrscheinlich und Gegenstand bloßer und unbewiesener Vermutungen sind, so dass der Antrag des Klägers stattgegeben werden kann, da das Recht des Antragstellers auf Entschädigung gemäß Gesetz Nr. 210/92 mit Wirkung ab dem Zeitpunkt des Verwaltungsantrags bestätigt werden muss.

3.2. Es ist auch hervorzuheben, dass die Entschädigung, die den durch obligatorische Impfungen, Transfusionen und Blutprodukte geschädigten Personen gemäß Gesetz Nr. 210/92 zusteht, keinen Entschädigungscharakter hat, sondern im weiteren Sinne als Sozialleistung zu verstehen ist, die auf die Leistungen des Sozialstaates aufgrund der Pflicht zur sozialen Solidarität zurückzuführen ist und eine Alternative zu Schadensersatzansprüchen darstellt, die auf den vollständigen Ersatz der durch die Ansteckung erlittenen Schäden abzielen; daraus folgt, dass bei verspäteter Auszahlung die gesetzlichen Zinsen unter Anwendung aller einschlägigen Bestimmungen zu zahlen sind (vgl. Kassationsgericht, Zivilkammer, Nr. 17047/2003; in Bezug auf Kassationsgericht Nr. 26883/2008).

Da gemäß Art. 7 des Gesetzes Nr. 533/73 die Entschädigung 120 Tage nach Einreichung des Antrags fällig ist, ist davon auszugehen, dass nach Ablauf dieser Frist die Zinsen zu laufen beginnen, ohne dass eine Inverzugsetzung erforderlich ist.

4. Die Prozesskosten richten sich nach dem Unterliegen und gehen zu Lasten des Beklagten CP_1, mit Verweis auf die Entscheidung über die entsprechende Abrechnung unter Berücksichtigung der Mindestwerte gemäß Ministerialdekret 55/14, angesichts der Besonderheit und Komplexität der Feststellung, wobei die Referenzstufe aufgrund des unbestimmbaren Werts der Ursache geringer Komplexität festgelegt wird, also in dem zwischen 100 und 200 Euro liegenden Bereich.

des nicht bestimmbaren Wertes der Rechtssache mit geringer Komplexität, also zwischen 26.000 €

26.000 und 52.000 Euro.

Es bestehen hingegen berechnigte Gründe für einen Ausgleich der Prozesskosten zwischen dem Kläger und

CP_2 Beklagte, in Anbetracht der besonderen Position im Verfahren eingenommen von

letztere im vorliegenden Verfahren eingenommen wurde.

4.1. Aufgrund des Kausalitätsprinzips gehen die Kosten des Sachverständigen endgültig zu Lasten der *Gegenpartei_1* .

P.Q.M.

Nach Anhörung der Prozessbevollmächtigten der Parteien und unter endgültiger Zurückweisung aller anderen Anträge, Einwendungen und Klagen erklärt das Gericht, dass die Klägerin Anspruch auf die Entschädigung gemäß Gesetz Nr. 210/92 hat, beginnend mit dem ersten Tag des Monats nach Einreichung des Verwaltungsantrags, und verurteilt die italienische Steuerbehörde () [...]

CP_1 zur Zahlung der bis zum heutigen Tag bereits aufgelaufenen Beträge zuzüglich gesetzlichen Nebenleistungen.

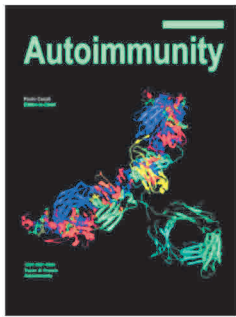
Verurteilt die *Gegenpartei_1* in der Person seines gesetzlichen Vertreters pro-tempore, die Erstattung der Prozesskosten zugunsten der Klägerin, die sich auf insgesamt 4.700 € zuzüglich 43 € für Beschwerden, Mehrwertsteuer, CPA und pauschale Erstattung der allgemeinen Kosten in gesetzlicher Höhe belaufen.

Er erklärt die Prozesskosten zwischen der Klägerin und der *Gegenpartei_2* .

Es legt endgültig fest, dass die Kosten von der *CP_1* Die Kosten für den Sachverständigen, die bereits im Laufe des Verfahrens beglichen wurden

So beschlossen in Asti, am 26.09.2025

Richterin Ivana
Lo Bello



Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada

David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan

To cite this article: David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada, *Autoimmunity*, 58:1, 2551517, DOI: [10.1080/08916934.2025.2551517](https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



View supplementary material [↗](#)



Published online: 06 Sep 2025.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 7100



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaut20>

RESEARCH ARTICLE



Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada

David J. Speicher^a , Jessica Rose^b  and Kevin McKernan^c 

^aDepartment of Pathobiology, University of Guelph, Guelph, ON, Canada; ^bIndependent Researcher, Ontario, Canada;

^cMedicinal Genomics, Beverly, MA, USA

ABSTRACT

For some of the COVID-19 vaccines, the drug substances released to market were manufactured differently than those used in clinical trials. Manufacturing nucleoside-modified mRNA (modRNA) for commercial COVID-19 vaccines relies on RNA polymerase transcription of a plasmid DNA template. Previous studies identified high levels of plasmid DNA in vials of modRNA vaccines, suggesting that the removal of residual DNA template is problematic. Therefore, we quantified the DNA load in a limited number of Pfizer-BioNTech and Moderna COVID-19 modRNA vaccine vials using two independent methods. Total DNA and specific DNA targets were quantified by Qubit fluorometry and quantitative polymerase chain reaction (qPCR), respectively on 32 vials representing 16 unique vaccine lots. RNase A treatment was used to assess the impact of RNA crosstalk in DNA fluorometry. A preliminary assessment of DNA fragment length and DNase I sensitivity were also performed. Total DNA ranged 371–1,548 ng/dose and 1,130–6,280 ng/dose in Pfizer and Moderna products, respectively. Specific DNA of multiple plasmid DNA targets ranged 0.22–7.28 ng/dose for Pfizer, and 0.01–0.78 ng/dose for Moderna. The SV40 promoter-enhancer-ori (0.25–23.72 ng/dose) was only detected in Pfizer vials. Oxford Nanopore sequencing of one vial found mean and maximum DNA fragment lengths of 214 bp and 3.5 kb, respectively. These data demonstrate the presence of 1.23×10^8 to 1.60×10^{11} plasmid DNA fragments per dose encapsulated in lipid nanoparticles. Using fluorometry, total DNA in all vials tested exceeded the regulatory limit for residual DNA set by the US Food & Drug Administration (FDA) and the World Health Organization (WHO) by 36–153-fold for Pfizer and 112–627-fold for Moderna after accounting for nonspecific binding to modRNA. When tested by qPCR, all Moderna vials were within the regulatory limit, but 2/6 Pfizer lots (3 vials) exceeded the regulatory limit for the SV40 promoter-enhancer-ori by 2-fold. The presence of the SV40 promoter-enhancer element in Pfizer vials raises significant safety concerns. This study emphasizes the importance of methodological considerations when quantifying residual plasmid DNA in modRNA products, considering increased LNP transfection efficiency, and cumulative dosing presents significant and unquantified risks to human health.

ARTICLE HISTORY

Received 16 April 2025

Revised 16 July 2025

Accepted 10 August 2025

KEYWORDS

COVID-19; vaccine; modRNA; mRNA; residual DNA; DNA contamination

Introduction

Chemical synthesis of large RNA (>200 bp) is expensive and error prone. Therefore, a T7 polymerase is used to generate long modified RNAs (modRNA) from DNA templates. DNA templates are easier to synthesize but need to be removed from the final drug product. Due to the limitations of chemical synthesis of DNA, fragments or oligos of DNA are first chemically synthesized, stitched together with enzymatic ligation and polymerization, and finally cloned into replication competent plasmids as their full-length products. Purifying plasmid DNA from *Escherichia coli* (*E. coli*) can be done through direct lysis of the *E. coli* and plasmid DNA purification or through purification *via* Polymerase Chain Reaction (PCR) of the targeted plasmid insert. These two different methods of purification can have

CONTACT David J. Speicher  speicher@uoguelph.ca, research@davidspeicher.com  Department of Pathobiology, University of Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>.

© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

dramatic differences in the amount and type of residual DNA in the vaccines. These purification steps are emphasized in Moderna's patent US10898574B2 and rely on a PCR-free method that directly purifies plasmid DNA from *E. coli* cultured in a kanamycin broth. Moderna's patent states that a genetically engineered DNA (e.g. naked plasmid DNA) packaged in a lipid nanoparticle (LNP) is directly injected into a living host and could cause insertional mutagenesis and activation of oncogenes or the inhibition of tumor suppressor genes [1].

After the US Food & Drug Administration (FDA) approval and rollout of the COVID-19 vaccine, Pfizer changed its manufacturing process from PCR amplification of a DNA template (Process 1) for the randomized clinical trial (RCT) to a PCR-free purification process using DNA plasmids (Process 2) like that used by Moderna [2]. BioNTech patent US20230183769A1 provides a method for the large-scale production of pharmaceutical grade RNA using *in vitro* transcription reactions and reduces the process-related contaminant dsRNA at the same time [3]. However, as Process 2 used a 7.8Kb bacterial plasmid instead of the 4.2Kb PCR amplicon used in Process 1 for the in-vitro transcription it is probable that there was a large increase of the residual DNA in the final drug product [1].

Due to the different DNA backbones between Process 1 and Process 2, the single qPCR assay used by Pfizer to detect a specific portion of the DNA may not be sufficient for accurate quantification. The PCR based methods used in Pfizer's clinical trial contain very different background DNA compared to the vaccines given to the public as the PCR process only amplified the portion of the plasmid encoding the spike mRNA sequence. The Process 2 *E. coli* purification method contains the plasmid vector sequence with the spike sequence cloned insert. Therefore, residual DNA quantification methods that assess both the plasmid and the insert, unlike Pfizer's process that only performed PCR on the KAN gene (i.e. kanamycin resistance gene) from the plasmid vector, are required for complete quantitation. Pfizer disclosed to the regulators a qPCR assay for the spike region to confirm the presence of the spike insert but provided no quantification from this validated second assay. This is relevant as DNase I is known to fail to digest RNA:DNA hybrids. These hybrids will exist in the spike sequence after *in vitro* transcription (IVT) and may also exist in the form of residual RNA from the plasmid expression of the AmpR-SV40-KAN gene as it is propagated in *E. coli*. Thus, the DNase I activity may vary in different locations of the plasmid. Assays only measuring one location of the plasmid will fail to accurately quantify the residual DNA in the final drug product [4].

The Pfizer and Moderna plasmids share many features but most notably differ in that Pfizer's plasmid is a derivative of pcDNA3.1, which is a shuttle vector capable of both bacterial and mammalian replication *via* SV40 origins of replication, SV40 enhancers, SV40 promoters and SV40 polyA signals [5]. Plasmid DNA template used by Pfizer (7,824bp) and Moderna (6,777bp) both contain a *ColE1* bacterial origins of replication (generically termed *ori*) active in *E. coli*. Both plasmids also contain an aminoglycoside phosphotransferase gene (*Neo/Kan*) that allows for selection of bacteria carrying the plasmid in media containing kanamycin. The *E. coli* cells are then harvested and lysed. The plasmid DNA is extracted, purified, and then linearized with the restriction enzyme *Eam1104I*. This linear DNA then acts as the template for IVT using T7 RNA polymerase in the presence of N1-methyl-pseudouridine. It is the addition of N1-methyl-pseudouridine that makes these products bioengineered nucleoside-modified mRNA (i.e. modRNA) vaccines. After the IVT, DNA is enzymatically hydrolyzed with DNase I, reducing its prevalence in the final drug product. Documents supplied by Pfizer to the European Medicines Agency (EMA) [6] noted that residual DNA in modRNA products made by this process could vary significantly [7].

In 2023, McKernan et al. subjected COVID-19 modRNA vaccine vials to next-generation RNA sequencing and, found unexpected evidence of DNA derived from the template plasmids used during manufacturing [8]. This showed that both Pfizer and Moderna vaccines contained high copy plasmid components with different residual DNA sequences. Additionally, McKernan et al. found that all Pfizer vaccines contained SV40 promoter-enhancer-ori and SV40 polyA signal sequences being utilized as the promoter for the Kan/Neo selectable marker. These residual DNA components were absent from the required disclosures in EMA regulatory documents (pg 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7].

Based on this information, McKernan et al. developed a qPCR method to quantify the level of residual plasmid DNA in the vaccine vials targeting multiple loci in the Moderna and Pfizer plasmids [8]. Therefore, the aim of this research was to verify the presence and quantity of residual plasmid

DNA and the SV40 promoter-enhancer-ori in the Pfizer and Moderna COVID-19 modRNA vaccine and compare the results to adverse events (AEs) reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). To investigate this, we obtained 32 vials COVID-19 modRNA vaccines that had been distributed in Ontario, Canada. The quantity of specific DNA targets, i.e. spike, plasmid *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori*, were determined by qPCR and total DNA loads by Qubit® fluorometry. We also extended the observations of an earlier work (McKernan et al.) by studying the size distribution of DNA fragments as well as the DNase I sensitivity of the vaccine to determine whether the residual DNA is packaged in the LNPs. We then queried VAERS for any AEs, including serious AEs (SAEs), associated with these lots [9]. This study is an expanded version of a previous preprint [10].

Materials and methods

For this study, we used the terms “residual DNA,” “DNA mass,” or “impurities,” (or similar) rather than “contamination” in keeping with regulatory definitions of impurities which arise from the manufacturing process [11,12]. Based on the FDA and US Pharmacopeia (USP) guidelines “impurities” are unwanted substances that are inherent to the manufacturing process or raw materials used in vaccine production. Impurities are typically expected, predictable, and arise from the materials, reagents, or intermediates used during production. Impurities would include the dsRNA, RNA:DNA hybrids, short RNA fragments, and the residual plasmid DNA fragments. Whereas “contamination” refers to unintended, extraneous substances introduced into the vaccine product through external sources, such as environmental factors, equipment, or human error, that are not part of the intended manufacturing process. Contamination is typically unexpected and can include microbial contaminants (e.g. bacteria, fungi), adventitious agents (e.g. viruses), or foreign particulates.

COVID-19 vaccine batches

Vials of Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 vials; 6 lots) and Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 vials, 10 lots) were obtained from various pharmacies in Ontario, Canada (Figure 1 and Table 1). An unopened sterile injectable vial of alprostadil 66 mcg/mL in combination with papaverine 21.7 mg/mL and phentolamine 1 mg/mL (TriMix) was used as the negative control. The unopened vials were untampered with as they had in-tact flip-off plastic caps with printed lot numbers and expiration dates. Vials had been stored in pharmacies in purpose-built vaccine storage units at +2–8 °C and were transported in insulated containers with frozen gel packs prior to being placed in the testing laboratory fridge within 5 h of receipt. One Moderna vial lacked a printed expiration date but had a QR code that required scanning by a pharmacist. The Moderna XBB.1.5 vials were similarly stored by the pharmacy. The remnants of recently used vials (within 30 min of administration) were placed in an insulated container with frozen gel packs and transported to the testing laboratory fridge within 12 h.

qPCR analysis of spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori* DNA

qPCR assays targeted spike and plasmid *ori* sequences shared by the Moderna and Pfizer expression plasmids (Table 2). These primers were also used to test COVID-19 modRNA vaccine vials in Australia [15]. The uniplex SV40 Enhancer assay was designed to amplify the nuclear targeting sequence unique to the Pfizer plasmid [16]. All qPCR assays used 1 µL from each vial directly added to 17.8 µL of master mix. qPCR kits were sourced from Medicinal Genomics (Part# 420201, Beverly, USA) with the master mix containing 8.8 µL reaction consisting of 3.8 µL polymerase enzyme (Medicinal Genomics Part# 420201), 0.8 µL reaction buffer and 1.0 µL of Primer-Probe mix, and 12.2 µL of ddH₂O. A primer-probe mix was assembled using 12.5 µL 100 µM *ori* probe, 12.5 µL of 100 µM spike probe, 25 µL of 100 µM spike forward primer, 25 µL of 100 µM spike reverse primer, 25 µL of 100 µM *ori* forward primer, 25 µL 100 µM *ori* reverse primer, and 75 µL of ddH₂O. All



Figure 1. Vials of Pfizer/BioNTech BNT162b2 and Moderna Spikevax mRNA-1273 COVID-19 vaccine from Ontario, Canada: (A) Pfizer/BioNTech adult monovalent and bivalent; (B) Moderna adult monovalent XBB.1.5; (C) Pfizer-BioNTech adult monovalent; (D) Moderna child/adult monovalent; (E) child/adult bivalent Wuhan-BA.1; (F) child/adult bivalent Wuhan-BA.1 and adult Wuhan-bivalent BA.4/5; and (G) mix of Moderna child/adult monovalent and adult monovalent XBB.1.5, and Pfizer-BioNTech adult monovalent XBB.1.5. One vial of Moderna child/adult monovalent wasn't photographed.

qPCR assays used a synthetic gDNA control (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) of known concentration (1 ng/ μ L) to generate a 10-fold serial dilution derived calibration curve.

Cycling was performed on a QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) with an initial denaturation of 95°C for 3 min followed by 35 cycles of 95°C for 10 s and 65°C for 30 s. Cq conversion to ng/ μ L was calculated using the QuantStudio software v2.7.0 (ThermoFisher Scientific). Amplicon mass, as determined with the New England BioLabs DNA calculator [17] and length (105 bp for *ori*, 114 bp for spike, and 152 bp for the SV40 promoter-enhancer-*ori*), were used to estimate the total nanograms (ng) of DNA present by adjusting for the length of the plasmids (7,824 bp for Pfizer and 6,777 bp for Moderna). Copy number per dose was adjusted first for the dilutions (e.g. 1:5 dilution for the Pfizer Adult Monovalent) and then for the volume of each adult injection dose (300 μ L for Pfizer and 500 μ L for Moderna). Serial dilutions were performed on the three Pfizer lots that showed the highest residual DNA concentration to investigate PCR inhibition by the LNPs, since qPCR was performed directly without any treatment or extraction.

Table 1. Description of mRNA COVID-19 vaccine lots examined in this study.

Vaccine manufacturing information							VAERS data	
Manufacturer	Mono/bivalent	Lot #	Sealed	HC approval date	Expiry date	Expired	Total AES	Total SAEs
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FD0810	Sealed	2021-07-29	2022-05-31	Expired	941	154
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FM7380	Sealed	2022-01-05	2022-11-30	Expired	64	25
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FN7934a	Sealed	2022-01-11	2022-10-31	Expired	50	25
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FN7934b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FX4343a	Sealed	2022-04-13	2023-07-31	Expired	4	1
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent	FX4343b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932a	Sealed	2022-10-19	2024-02-29	In code	20	2
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932b	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Bivalent	GK0932c	Sealed					
Pfizer-BioNTech	Adult Monovalent XBB.1.5	HD9867	Sealed	2023-09-28	2024-10-31	In code	14	5
Moderna	Child/Adult Monovalent	092D21A	Sealed	2021-06-13	2022-02-13	Expired	49	41
Moderna	Child/Adult Monovalent	020E21Aa	Sealed	2021-07-08	2022-03-04	Expired	6	2
Moderna	Child/Adult Monovalent	020E21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	062H21Aa	Sealed	2021-10-27	2022-05-31	Expired	10	3
Moderna	Child/Adult Monovalent	062H21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	020J21A	Sealed	2021-11-18	2022-06-30	Expired	7	5
Moderna	Child/Adult Monovalent	055K21A	Sealed	2021-12-16	2022-07-31	Expired	2	2
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Aa	Sealed	2022-02-11	2022-09-30	Expired	2	1
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ab	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ac	Sealed					
Moderna	Child/Adult Monovalent	033M21Ad	Sealed					
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Da	Sealed	2022-09-23	2023-04-02	Expired	0	0
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Db	Sealed					
Moderna	Child/Adult Bivalent BA.1	AS0467Dc	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Ba	Sealed	2022-11-28	2023-10-30	Expired	0	0
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bb	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bc	Sealed					
Moderna	Adult Bivalent BA4/5	AT0709Bd	Sealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Aa	Unsealed	2023-09-15	2024-07-29	In code	0	0
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Ab	Unsealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	020G23Ac	Unsealed					
Moderna	Adult Monovalent XBB.1.5	025G23A	Unsealed	2023-09-15	2024-08-10	In code	0	0

Sorted by health Canada lot approval date as recorded in the Canadian national vaccine catalog [13]. adverse events (AEs) and serious AEs and SAEs sourced from Canada) were extracted from the VAERS database available for public download (<https://vaers.hhs.gov>) [14]. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot.

Table 2. Primer and probe sequences targeting spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori*.

Primer/probe name	Sequence (5'-3') ^a	Amplicon Length
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Forward	AGATGGCCTACCGTTCA	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse	TCAGGCTGCTCTGGATCTT	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe	5'-6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATGCCAA-3'IABkFQ ^b	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Forward	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	105 bp
MedGen_Vax-Vector_Ori_Reverse	GCGCCTTATCCGGTAATATC	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Probe	SHEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'IABkFQ ^c	
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Forward	GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGT	152 bp
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Reverse	GGTTGCTGACTAATTGAGATGC	
MedGen_SV40-promoter-enhancer-ori_Probe	5TEX615-CCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGC-3'IAbRQSp ^d	

^aPfizer bivalent expression vector BNT162b2 (OR134577.1) and Modern mRNA1273 expression vector (OR134578.1) sequences were used for primer design.

^bProbe had 5' terminus labeled with a 6-FAM (6-carboxy-fluorescein) fluorophore, a ZEN™ internal quencher, and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® FQ.

^cProbe had 5' terminus labeled with a SHEX (Hexachlorofluorescein) fluorophore, a ZEN™ internal quencher, and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® FQ.

^dProbe had 5' terminus labeled with a TEX 615 fluorophore and 3' terminus labeled with 3' Iowa Black® RQ.

Qubit® fluorometry quantitation

AccuGreen® HS fluorometric reagents (AccuGreen #99820 and DNA Quantification Buffer #99979) and standards were acquired from Biotium (San Francisco, USA) for Qubit® analysis (ThermoFisher Scientific). Fluorometry readings were initially performed directly on the vaccines in a 200 µL mixture containing fluorometric reagents (190 µL of a stock made from 995 µL HS Buffer and 5 µL 200X AccuGreen® dye) and 10 µL of vaccine. Samples were read following the manufacturer's instructions on a Qubit® 3.0 Fluorometer. These samples were then heated to 95 °C for 8 min and cooled to 4 °C for 5 min to disrupt the LNPs and enable fluorometric dyes to access the DNA. To assess potential

signal derived from AccuGreen® binding to modified RNA, 1 µL of 20 mg/mL RNase A (NEB# T3018L) was added to the samples after the heating/cooling step and incubated at 37°C, during which time a time series of fluorescent measurements was collected. Fluorometry measurements were collected before RNase A addition and 1, 2, 3, 5 and 10 min after RNase A addition.

Vaccine adverse event reporting system (VAERS) data

The VAERS database was analyzed using the Language and Environment for Statistical Computing package in R [18] and included data spanning December 17, 2020 through October 6, 2023. The U.S.-based VAERS data is available for download in three separate comma separated values (csv) data files representing: i) general data for each report; ii) the reported AEs or “symptoms,” and iii) vaccine data including vaccine manufacturer and lot number [9]. A non-U.S.-based (foreign) VAERS data set is also available for download and contains AE reports filed to regulatory authorities from non-U.S. countries worldwide. A VAERS ID number is assigned to preserve confidentiality when a report is filed. To assess the AEs related to a particular vaccine, it is necessary to merge the three data files using the VAERS IDs as a linking variable. For this study, only COVID-19 VAX_TYPE (COVID19-1 (monovalent) and COVID19-2 (bivalent)) were included. Other relevant variables included VAERS ID*, vaccine lot (VAX_LOT), vaccine manufacturer (VAX_MANU), hospitalizations (HOSPITAL), disability (DISABLE), emergency room visits (ER_ED_VISIT), birth defects (BIRTH_DEFECT), life-threatening occurrences (L_THREAT) and deaths (DIED). Data were grouped by VAX_LOT and the total number of AE and SAE reports were counted. SAE reports included deaths, hospitalizations, emergency room visits, disability reports, birth defects and life-threatening reports. The US- and non-U.S.-based data were queried and for the purposes of this study, only Canadian lot counts are reported in the primary results. Canadian reports were distinguished from non-U.S.-based (foreign) reports using the SPLTTYPE variable which provides the country code - in the case of Canada “CA” - as the first 2-character place holders. Correlations between VAERS data and DNA levels for spike, *ori* and SV40 were plotted and calculated using the Pearson correlation coefficient.

Oxford nanopore sequencing

DNA fragment size distributions were estimated using a previously sequenced vaccine lot (Pfizer children’s monovalent Lot# FL8095) [8] as a standard using an Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) and the Oxford Nanopore Ligation sequencing kit (SQK-LSK114) according to the manufacturer’s instructions. Reads were mapped to NCBI OR134577.1 with the Burrow-Wheeler Aligner with maximum exact matches (BWA-MEM) [19]. ONT sequencing read length is unlimited, but DNA isolation procedures required to run ONT sequencing can bias the length of the molecules captured in the ONT ligation reaction. Shorter fragments may be lost with the SPRI based DNA capture used in these methods. Single molecule reads were counted and binned according to their mapped read length with BWA-MEM.

Assessment of nuclease sensitivity

Pfizer Lot# FL8095 was also used as a standard to assess DNase I sensitivity of vaccine material. Packaged DNA in LNP should be inaccessible and thus resistant to DNase I, while DNA outside of the LNP should be DNase I labile.

Nuclease protected DNA was estimated by treating 20 µL of the vaccine with 2.5 µL of DNase I-XT (2 units/µL, NEB#M0570S, New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) in Grim Reefer 10X buffer (Medicinal Genomics #420123-125) and incubating at 37°C for 30 min. For the control, 2.5 µL of ddH₂O was used instead of the DNase I-XT. The DNase I-XT reaction was terminated using 2.5 µL of MGC lysis buffer (Medicinal Genomics #420001). After the DNase I kill step, a qPCR-amplifiable internal control DNA was spiked-in to verify that the DNase I-XT had been fully inactivated (Medicinal Genomics #420123-125). Subsequently, 54 µL of SenSATIVax magnetic beads (Medicinal Genomics) were used to

purify DNA from the DNase I-XT assay and the DNase I-XT negative control samples. The magnetic beads were pipette-mixed 10 times with the sample, incubated at room temperature for 5 min, separated magnetically and washed twice with 70% v/v ethanol. The ethanol was removed, and the beads dried for 2 min at room temperature. Samples were eluted in 30 μ L of ddH₂O and 1 μ L of eluate was examined by qPCR for spike and *ori* in an 18.8 μ L reaction. An additional DNase I inactivation control primer and probe (0.5 μ L CY5 labeled probe) were added to the assay for a total of 19.3 μ L reaction.

Results

qPCR testing of residual DNA

We validated the accuracy of the qPCR quantification method using an 8-log serial dilution standard curve that was used to calibrate sample C_q values and generated R² values of 0.998, 0.999, 0.906 and efficiencies of 99.8%, 94.7%, and 93.6% for spike, *ori*, and SV40 promoter-enhancer-*ori* amplicons, respectively. On all plates, negative controls and no template (ddH₂O) controls (NTC) were tested in triplicate and found to be negative.

Initial testing, performed on undiluted vaccine samples showed that all Pfizer vials were positive for spike, *ori*, and SV40 promoter-enhancer-*ori*. For individual vials, qPCR for Pfizer amplified at similar times for spike, *ori*, and SV40 enhancer-promoter-*ori* (average Δ C_q 0.89 $\pm$ 0.28). Despite Pfizer lot FX4343 amplifying slightly later than the other vials, the inter-vial difference was small (spike Δ C_q 17.86 $\pm$ 1.58; *ori* Δ C_q 17.91 $\pm$ 2.05; SV40 promoter-enhancer-*ori* Δ C_q 15.46 $\pm$ 2.02). The inter-vial difference of each of the targets was also small for Moderna (spike C_q 20.65 $\pm$ 0.88; *ori* C_q 25.48 $\pm$ 1.32). However, for all Moderna vials, except lot AS0467D (Bivalent BA.1), *ori* consistently amplified 2.95 $\pm$ 0.30 cycles later than spike. The SV40 promoter-enhancer-*ori* was detected in all Pfizer vials but in none of the Moderna vials.

To assess LNP inhibition on the qPCR reaction efficiency, vials of lots FM7380 and FN7934 were subject to 10-fold serial dilution. The expected $\sim$ 3.3 quantification cycle (C_q) response was observed only after the 1:10 dilution suggesting that there is some LNP inhibition that could impact the quantitation of DNA at these dilutions. Therefore, the data from the 1:10 dilutions were used for further analysis. This dilution, as well as the fact that some of the doses were designed to be diluted before use, was accounted for in our calculations.

Amount of specific residual DNA fragments determined by qPCR

qPCR testing of the vials diluted 1:10 produced C_q values for *ori* and spike of 18.44–24.87, and 18.03–23.83 for Pfizer, and 25.24–30.10 and 22.35–24.53 for Moderna, respectively (Table 3). The SV40 promoter-enhancer-*ori* assay produced C_q values of 17.46–24.65 in the Pfizer vials and did not amplify in the Moderna vials. The reproducibility of the spike, *ori* and SV40 assays was 0.72 $\pm$ 0.14, 0.74 $\pm$ 0.23, and 0.65 $\pm$ 0.16 for Pfizer, and 0.83 $\pm$ 0.14, 0.89 $\pm$ 0.18, and negative for Moderna, respectively. After calculations, the amount of residual DNA varied substantially between the Pfizer lots analyzed [0.22–2.43 ng/dose for spike, 0.28–7.28 ng/dose for *ori*, and 0.25 to 23.72 ng/dose for SV40 promoter-enhancer-*ori*] but was more consistent in the Moderna lots [0.25–0.78 ng/dose for spike and 0.01–0.34 ng/dose]. While Pfizer had a substantially higher amount of residual DNA than Moderna, only the SV40 promoter-enhancer-*ori* DNA from lots FM7380 and FN7934 were over the FDA 10 ng DNA/dose guidance (Figure 2). Lots FM7380 and FN7934 were Pfizer monovalent purple top vials with a PBS formulation.

Total DNA determined by fluorometry

Fluorometer-based measurements (e.g. Qubit®) of the vaccines showed that the Moderna vials consistently had a much greater amount of total DNA than the Pfizer vials (Figure 3). The total DNA detected in the neat vaccine (i.e. directly from the vials) was 621 $\pm$ 282 ng/dose (range: 262 to

Table 3. qPCR Testing on all Pfizer-BioNTech and moderna vials diluted 1:10 with results for SARS-CoV-2 spike, *ori*, and the SV40 promoter-enhancer-*ori* on.

Manufacturer	Lot #	Spike			Plasmid Origin of Replication (<i>ori</i>)			SV40 promoter-enhancer- <i>ori</i>		
		Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose	Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose	Cq	Total ng/dose	Total Copies/dose
Pfizer-BioNTech	FD0810	20.17	0.43	3.69E+09	19.90	2.80	2.60E+10	20.76	0.43	2.92E+09
Pfizer-BioNTech	FM7380	18.03	2.43	2.07E+10	18.57	3.92	3.64E+10	18.18	16.06	1.09E+11
Pfizer-BioNTech	FN7934a	18.47	1.79	1.53E+10	18.77	3.43	3.18E+10	17.46	23.72	1.60E+11
Pfizer-BioNTech	FN7934b	18.19	2.18	1.86E+10	18.44	4.27	3.96E+10	17.96	18.10	1.22E+11
Pfizer-BioNTech	FX4343a	23.53	0.27	2.30E+09	24.71	0.32	2.94E+09	24.59	0.26	1.73E+09
Pfizer-BioNTech	FX4343b	23.83	0.22	1.86E+09	24.87	0.28	2.64E+09	24.65	0.25	1.68E+09
Pfizer-BioNTech	GK0932a	20.46	2.25	1.92E+10	21.01	3.81	3.54E+10	20.27	2.61	1.77E+10
Pfizer-BioNTech	GK0932b	20.60	2.05	1.75E+10	21.22	3.32	3.08E+10	20.49	2.35	1.59E+10
Pfizer-BioNTech	GK0932c	20.66	1.97	1.68E+10	21.21	3.33	3.09E+10	20.29	2.58	1.74E+10
Pfizer-BioNTech	HD9867	21.24	0.99	8.46E+09	20.81	7.28	6.75E+10	20.12	2.84	1.92E+10
Moderna	092D21A	22.35	0.66	5.64E+09	27.88	0.04	4.16E+08	Negative		
Moderna	020E21Aa	23.66	0.35	3.02E+09	29.47	0.02	1.87E+08	Negative		
Moderna	020E21Ab	24.52	0.50	4.24E+09	29.99	0.09	8.26E+08	Negative		
Moderna	062H21Aa	22.52	0.78	6.69E+09	29.21	0.02	2.23E+08	Negative		
Moderna	062H21Ab	22.76	0.66	5.64E+09	29.37	0.02	2.00E+08	Negative		
Moderna	020J21A	23.21	0.48	4.12E+09	30.10	0.01	1.23E+08	Negative		
Moderna	055K21A	22.94	0.58	4.98E+09	29.58	0.02	1.74E+08	Negative		
Moderna	033M21Aa	23.04	0.54	4.65E+09	29.46	0.02	1.88E+08	Negative		
Moderna	033M21Ab	22.81	0.64	5.44E+09	29.38	0.02	1.99E+08	Negative		
Moderna	033M21Ac	23.59	0.37	3.18E+09	29.87	0.02	1.43E+08	Negative		
Moderna	033M21Ad	23.26	0.47	3.98E+09	29.39	0.02	1.97E+08	Negative		
Moderna	AS0467Da	23.20	0.49	4.17E+09	25.24	0.34	3.20E+09	Negative		
Moderna	AS0467Db	24.16	0.25	2.14E+09	26.08	0.20	1.82E+09	Negative		
Moderna	AS0467Dc	23.75	0.33	2.85E+09	25.74	0.25	2.28E+09	Negative		
Moderna	AT0709Ba	23.68	0.35	2.99E+09	29.30	0.02	2.09E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bb	23.56	0.38	3.24E+09	29.25	0.02	2.16E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bc	23.63	0.36	3.09E+09	29.34	0.02	2.04E+08	Negative		
Moderna	AT0709Bd	23.80	0.32	2.74E+09	29.44	0.02	1.91E+08	Negative		
Moderna	020G23Aa	24.42	0.73	6.26E+09	29.42	0.23	2.13E+09	Negative		
Moderna	020G23Ab	24.46	0.71	6.11E+09	29.87	0.03	2.33E+08	Negative		
Moderna	020G23Ac	24.53	0.68	5.84E+09	29.74	0.03	2.55E+08	Negative		
Moderna	025G23A	24.38	0.54	4.62E+09	29.30	0.13	1.20E+09	Negative		

Calculations for Pfizer and moderna were based on adult doses of 0.30 mL and 0.50 mL, respectively. Moderna is also indicated to be given to children aged 6–12 years of age with a dose 0.25 mL making the resultant total ng/dose half of that given to adults. Total ng/dose was adjusted for the length of the amplicon (105 bp *ori*, 114 bp spike) only representing a fraction of the 7,824 bp Pfizer and 6,777 bp moderna plasmid. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot. $\approx$ SV40 promoter-enhancer-*ori*.

1,116 ng/dose) for Pfizer and $1,661 \pm 793$ ng/dose (range: 379 to 3,430 ng/dose) for Moderna. Boiling of the fluorometric solution containing the vaccine caused the lysis of the lipid nanoparticles, releasing both residual DNA and modRNA, and greatly increasing the amount of total DNA detected to $1,696 \pm 987$ ng/dose (range: 590 to 3,180 ng/dose) for Pfizer and $5,210 \pm 2,095$ ng/dose (range: 2,980 to 9,700 ng/dose) for Moderna. This increase in fluorometry was also due to crosstalk between the modRNA and the fluorometric dyes [21]. The addition of RNase A quickly degraded the modRNA and reduced the fluorometry, which stabilized after 1 min. After 10 min of RNase A the total DNA detected in the vaccine vials was 775 ± 448 ng/dose (range: 371 to 1,548 ng/dose) for Pfizer and $2,821 \pm 1,244$ ng/dose (range: 1,130 to 6,280 ng/dose) for Moderna. This high amount of total DNA in both the vaccines suggests that a high fraction of the DNA is under the size range of the qPCR amplicons (i.e. is heavily degraded), and that Moderna used had a substantially higher amount of plasmid DNA.

Due to method development and acquiring of the vaccines at various times the vaccines were tested several times by fluorometry (Figure 4). The average variance directly from the vial (pre-boil) was 317 ± 278 ng/dose (range: 43–727 ng/dose) and 456 ± 121 ng/dose (range: 199–675 ng/dose), after boiling was $1,145 \pm 533$ ng/dose (range: 519–1,949 ng/dose) and $1,554 \pm 1,023$ ng/dose (range: 176–3,169 ng/dose), and after RNase A treatment was 297 ± 217 ng/dose (range: 100–765 ng/dose) and $1,065 \pm 624$ ng/dose (range: 113–2,365 ng/dose) for Pfizer and Moderna, respectively.

We plotted residual DNA values obtained by Qubit fluorometry against those obtained by qPCR (Figure 5). For the Pfizer product, the trend lines for *ori* and spike estimates both had a positive slope. The graph for the Moderna product differs from that of the Pfizer product with little overlap

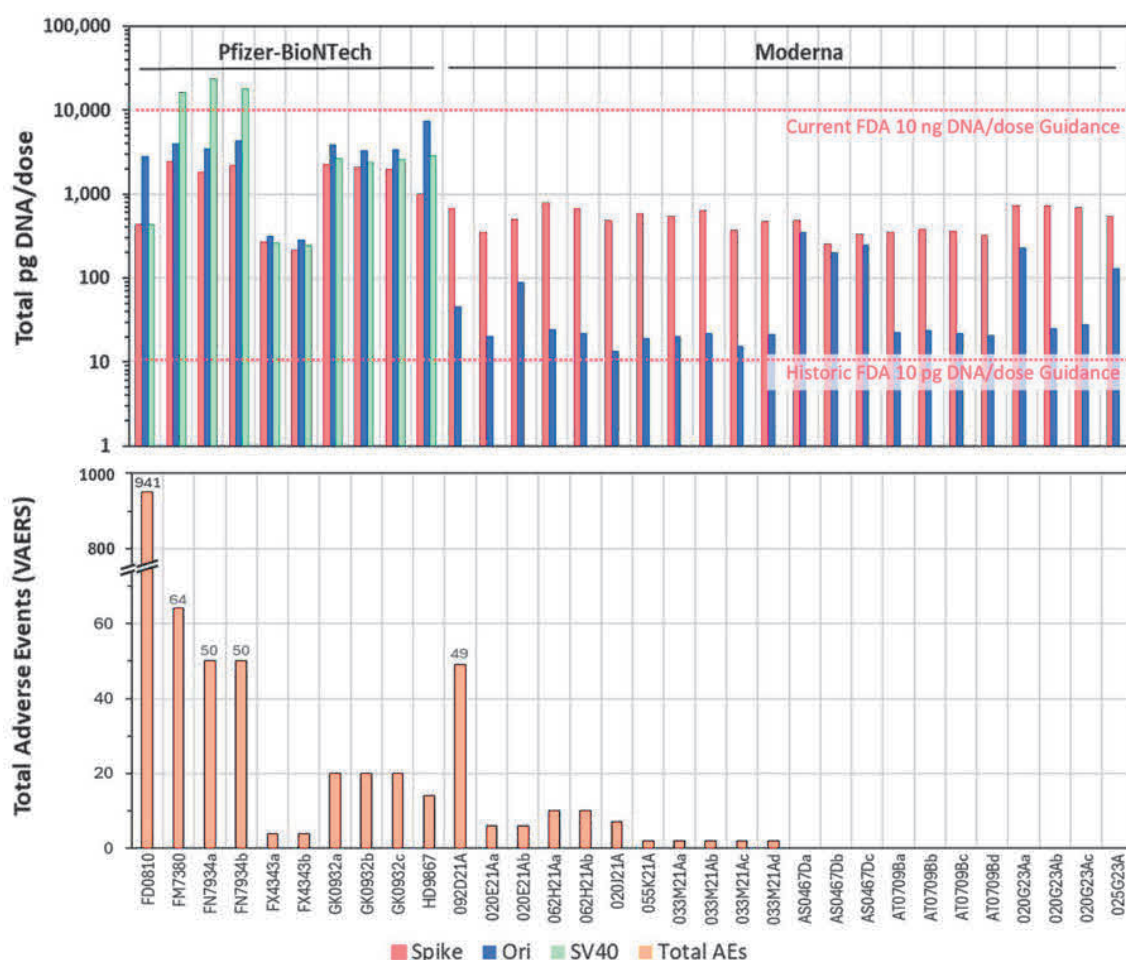


Figure 2. Comparison of residual DNA content of spike (red) *ori* (blue), SV40 promoter-enhancer-*ori* (green) as measured by qPCR, and the total number of adverse events (orange) reported to VAERS. The historic (10pg/dose) and current (10ng/dose) FDA and WHO regulatory guideline [12,20] for residual DNA is shown by a red dotted line. Vials are sorted by health Canada lot approval date as recorded in the Canadian national vaccine catalog [13]. Lower case letters at the end of lot numbers indicate different vials of the same lot. The total number of AEs was determined per lot and reproduced for each vial in the same lot.

of values in either axis, with much shallower slopes. Although a detailed view of the Moderna plots suggests a negative slope for the *ori* values, this trendline may be influenced by three outlying values. These values were obtained from vials of the Moderna BA.1-Wuhan bivalent vaccines.

Other than Moderna lots AS0709D, AS0467D and 020G23A, VAERS reports were filed for all lots examined in this study (Table 2 and Figure 2). Of the 16 lots examined, the lots with the highest numbers of reports filed to VAERS worldwide were FD0810, FM7380, FN7934 and 092D21A with 944, 64, 50 and 49 reports, respectively. In the case of these lots, 157 (17%), 25 (39%), 25 (50%) and 42 (86%) of individuals reported an SAE. These percentages far exceed the upper limit for the expected percentage of SAEs in any given VAERS data set as per the VAERS data use guide [22]. Also of note, 1/6 (17%) reports of SAEs involved death for Moderna lot 020E21A.

Regarding Canadian VAERS reports, the same trend was seen where FD0810, FM7380, FN7934 and 092D21A had 134, 27, 48 and 40 reports, respectively. In the case of these lots, 77 (57%), 16 (59%), 23 (48%) and 38 (95%) of individuals reported an SAE. These percentages far exceed the upper limit for the expected percentage of SAEs in any given VAERS data set as per the VAERS data use guide[22]. In the case of Moderna lot 092D21A almost all reports were SAEs. The percentage of SAEs for all lots combined originating from Canada is very high at 58%.

Lot FD0180 is the only lot in this study that was primarily distributed and administered in the United States. Of the total reports for lot FD0810 ($n=944$), 682 (72%) were reported in various states

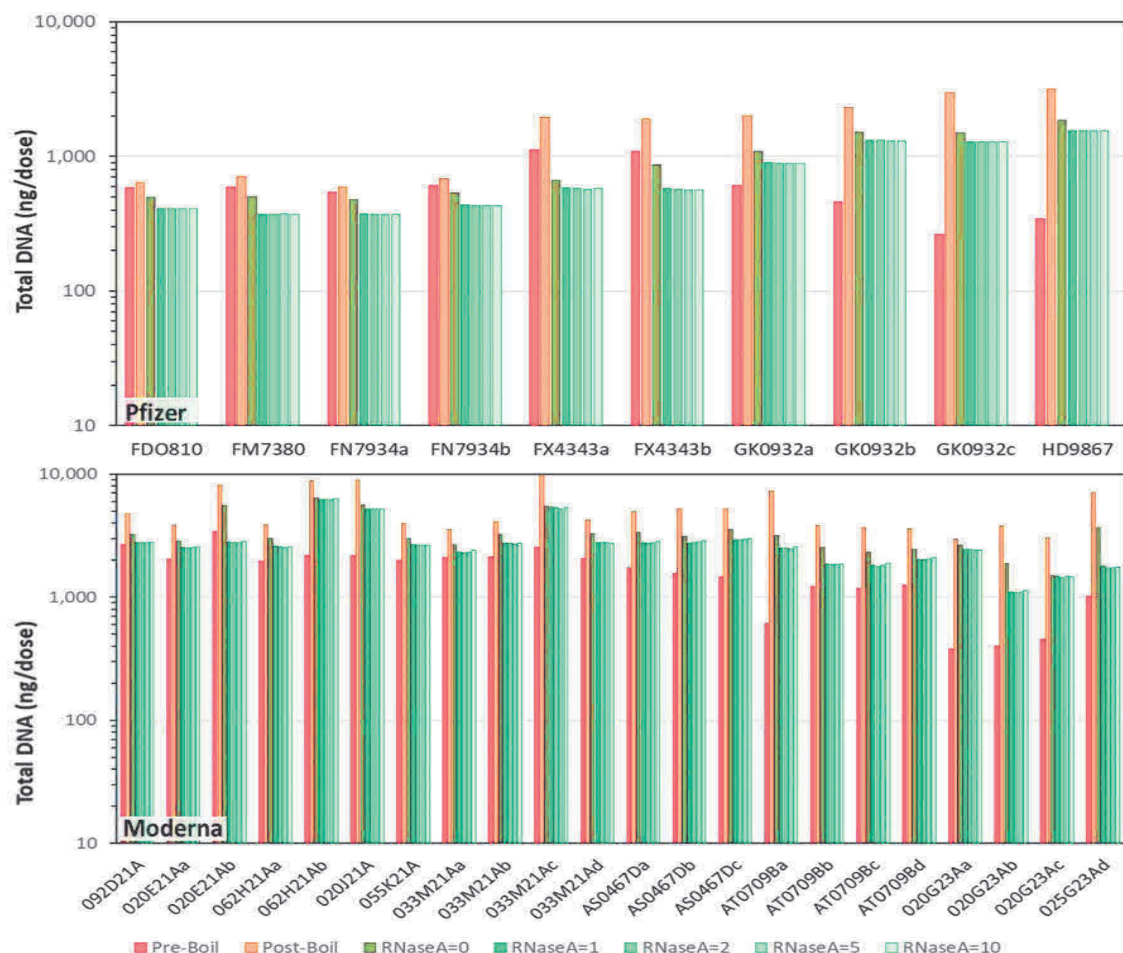


Figure 3. Total DNA was measured by Qubit® fluorometry directly from the vial (pre-boil), after a 95°C boil step (post-boil) and at 5 different time points with RNase A digestion.

in the USA and more specifically, 546 (58%) were reported in Colorado alone (Supplementary Table 3). Of the non-USA-based (foreign) lots reported to VAERS for this lot, 83% were reported in Canada. 84% of all foreign reports (non-USA-based) were reported in Canada indicating that these vials were primarily distributed and administered in Canada.

Fragment length analysis

The Pfizer children's monovalent (Lot FL8095) described by McKernan et al. [8] was sequenced with Oxford Nanopore (ONT) to assess the read length distributions after mapping the reads to the reference sequence of the plasmid in NCBI (Figure 6). The longest read detected in 865 reads was 3.5kb with read mapping to most of the plasmid backbone (Figure 7).

Nuclease sensitivity of the Pfizer vaccine was assessed using DNase I-XT. This DNA nuclease is optimized for IVT reactions rich in RNA-DNA hybrids. This treatment showed ≤ 1 Cq offset while a naked DNA control spiked into LNPs was reduced from a Cq of 15 to undetectable under the same conditions. This indicates that the DNA present in the vaccines is protected by encapsulation in the LNPs (Figures 8 and 9).

Discussion

Residual DNA was detected in all 32 vaccine vials surveyed. Multiple vials from the same lots produced very similar loads for all targets showing assay reliability, reproducibility, and consistency within

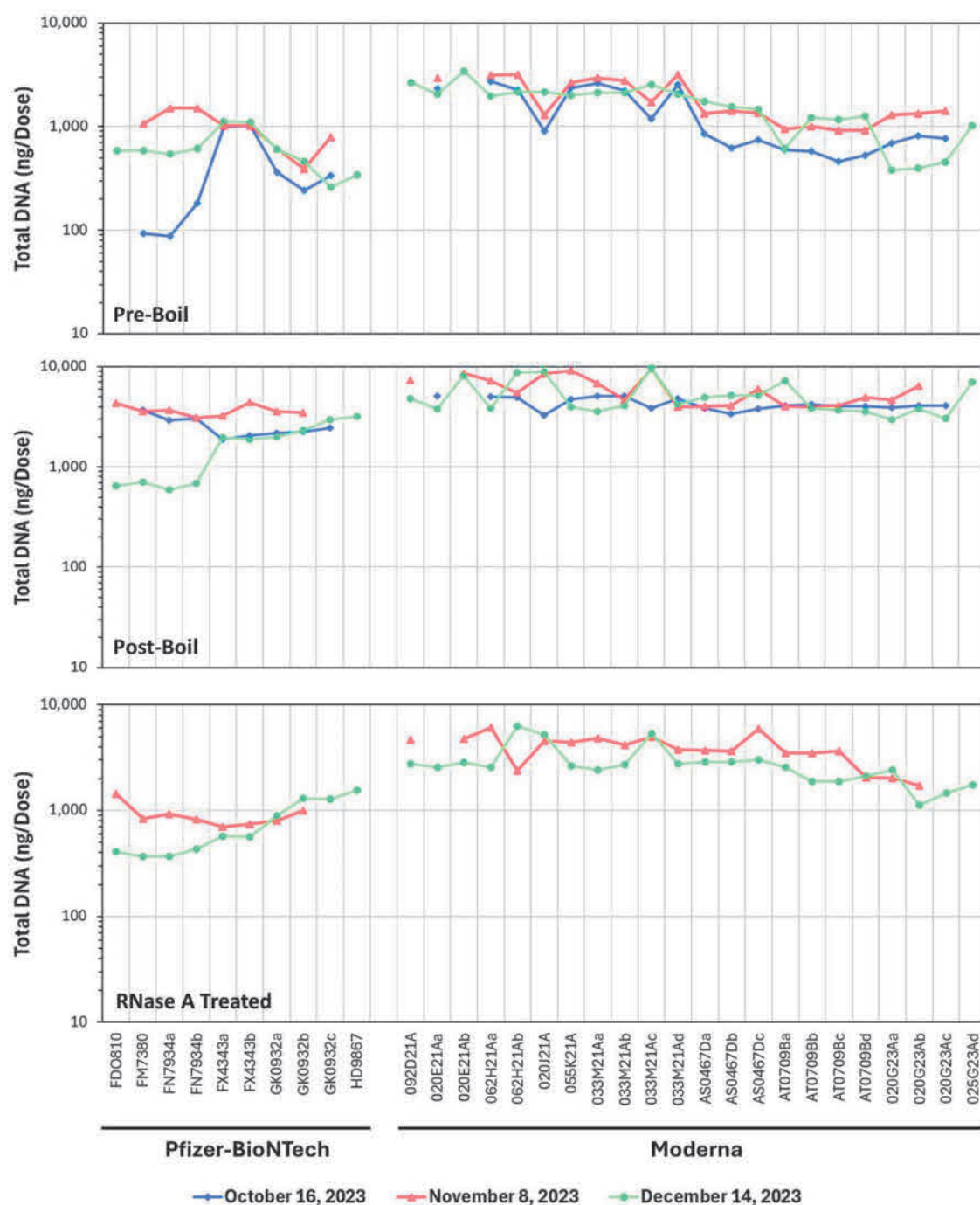


Figure 4. Qubit measurements were repeated after a freeze-thaw cycle to understand the variance one may observe shipping frozen vials lab to lab. Qubit® measurements were taken at three different time points (October, November and December 2023) directly from the vial (pre-boil), after a 95°C boil step (post-boil) and at three time points after RNase A digestion.

the lots. These data involving vaccine vials distributed in Canada are consistent with several non-peer reviewed and peer reviewed reports of DNA contamination in modRNA vaccines (McKernan, Buckhaults, Konig, Raoult, Kämmerer, Wang) [8,23–26].

Moderna had the lowest DNA concentration by qPCR but the highest concentration with Qubit. The Moderna vials had the most consistent levels of DNA between vials suggesting a more robust and standardized manufacturing process. In each vial of the Moderna product, except for lot AS0467D, *ori* displayed lower loads (Ct > 6) than spike suggesting a more effective removal of the vector DNA.

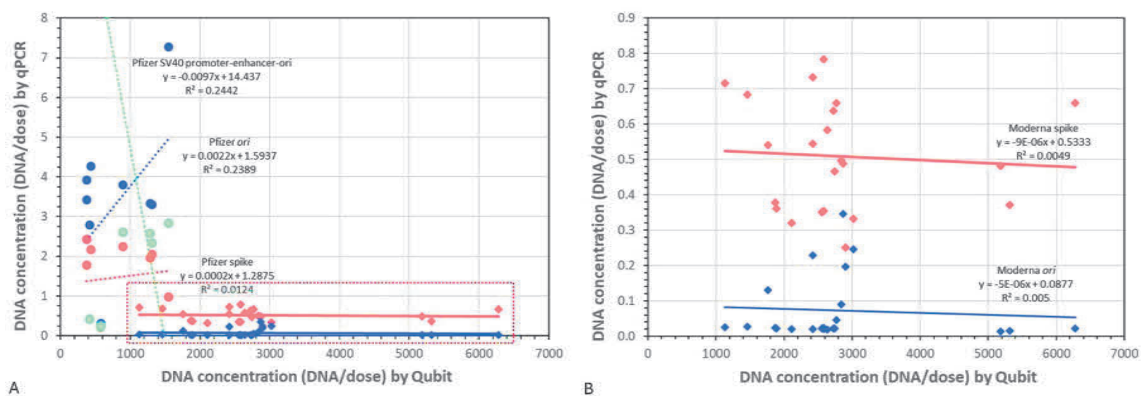


Figure 5. Graphical comparison of residual DNA concentration for spike (red), *ori* (blue), and SV40 promoter-enhancer-*ori* (green) determined by qPCR and total residual DNA concentration in individual vials as determined by qubit[®]. In panel a both Pfizer and Moderna data are plotted on the same scale. The Y-axis was adjusted to see all samples, except the three SV40 promoter-enhancer-*ori* results. The Moderna data are enclosed in a red box and displayed separately with an enlarged scale in panel B, to display detail.

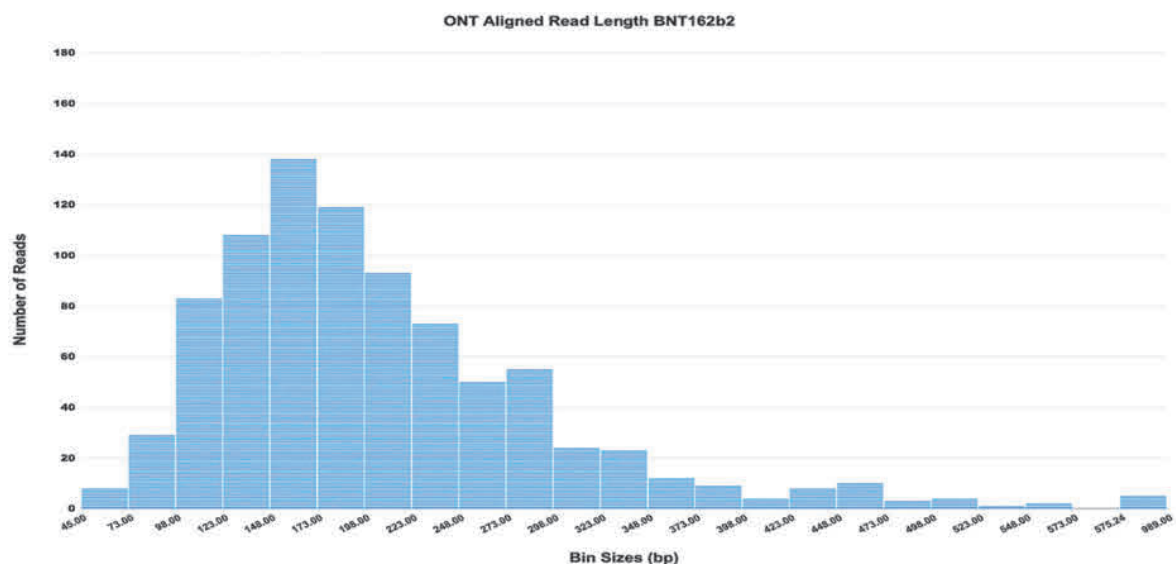
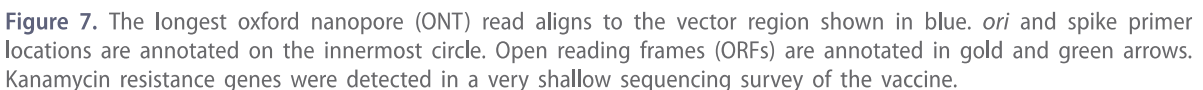


Figure 6. Oxford nanopore (ONT) read length distributions from 865 reads mapped to the vector sequence (NCBI OR134577.1). Mean = 214 bp. Max = 3.5 kb.

Possibly, homologous modified RNA may prevent digestion of template DNA by hybridization [4]. Of note, AS0467D represents bivalent BA.1 vaccine, which was noted to consist of two separate LNPs containing different purities of mRNA that were mixed together in the final product [27]. As DNase I is inhibited by RNA-DNA hybrids, the different modRNA constructs may present different secondary structure or hybridization potential with DNA and alter DNase I activity compared to other Moderna vaccines. This extreme difference in the spike and *ori* genetic targets points to a manufacturing variance that should not exist and highlights the importance that the regulators should not rely on a single PCR assay to determine the load of the residual plasmid DNA in the final drug product.

The vials with the highest DNA concentration were from two lots of Pfizer monovalent purple top vials with a PBS formulation and require dilution before administration. On October 29, 2021, the US FDA authorized a change of formulation to a Tris/sucrose buffer; the grey topped monovalent adult vaccine, and an orange topped vaccine for children aged 6–11 years. This change was made to increase stability, to simplify storage requirements and to provide a ready-to-use formulation [28,29]. These purple-topped Pfizer lots were also associated with some of the highest number of AEs and SAEs reported in VAERS among all the lots tested. The reason for this difference is not known, but



The inter and intra-lot variability in residual DNA continues to be demonstrated even after 3 years of manufacturing experience. This continued variability, especially in the Pfizer vials, is perhaps more fundamental than achieving a low level of impurities since it demonstrates an inconsistent manufacturing process and likely occurs with other process and product-related impurities. DNase purity and robustness may differ between vendors or lots of the DNase enzyme [33]. Small differences in the IVT process or other factors may also play a role in the variability of residual DNA. The DNase digestion step of the Pfizer/BioNTech vaccine was subject to a recommendation by the EMA to enhance the robustness of the method at the time of approval [34]. However, a FOIA obtained in Germany showed ongoing issues with the consistency of residual DNA levels within and among Pfizer/BioNTech manufacturing sites, the use of in-house “standards,” and a lack of

Significant fractions of the LNPs are DNaseI protected

This implies 10-30% of the nucleic acid isn't packaged in an LNP

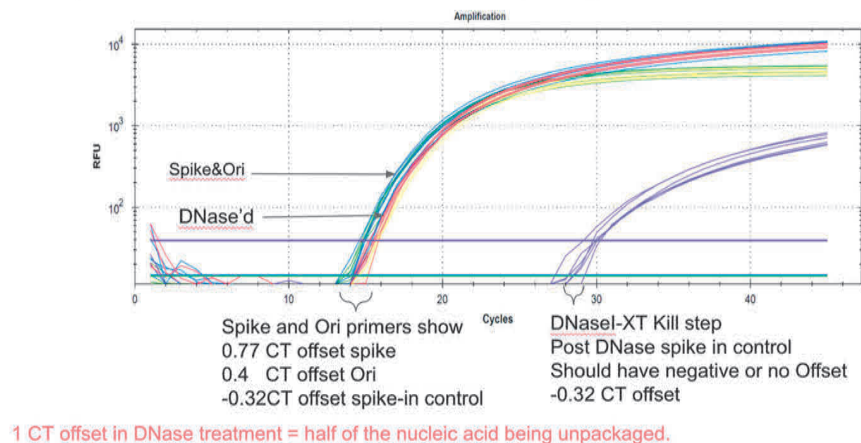


Figure 8. DNase I-XT treatment of Pfizer vaccine demonstrates nuclease resistance of the DNA in the vaccines.

Grim Reefer method eliminates all DNA at 37°C in 30 minutes.
2ul in qPCR of a 1:10 dilution of GR control = 15CT
LNPs protect against this activity.

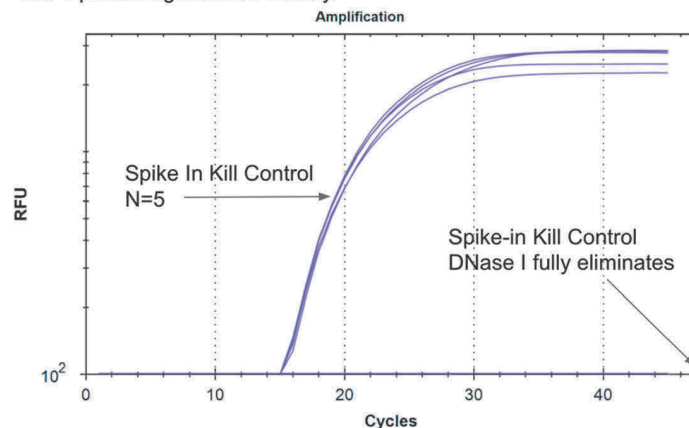


Figure 9. DNase I-XT positive control demonstrates the digestion assay eliminates all spiked in DNA under the same conditions used to assess the vaccine nuclease sensitivity.

correlation between the activity of the DNase enzyme and residual DNA a full 15 months after authorization [35]. This demonstrates ongoing efforts to remove DNA fragments were met with limited success.

Our exploratory analysis of the relationship between the residual DNA content and SAEs reported to VAERS is preliminary and limited in sample size but warrants confirmation by examining many more lots and vials. This preliminary analysis appears to show a correlation between the adverse events reported for each lot and the levels of DNA, especially in the context of the *ori*. More testing of vials from other independent laboratories, including prospective long-term monitoring, is required to confirm our results and confirm whether a correlation exists. When tested by qPCR, Pfizer lot FD0810, the oldest Pfizer lot examined, exhibited lower levels of spike and SV40 promoter-enhancer-ori with comparable *ori* DNA levels to other adult monovalent (purple-topped) vials, yet it was associated with the highest reported total AEs in VAERS. We only tested a single vial, which may not represent the entire lot. Without knowing the lot sizes or how many people received doses from each lot, correlating SAEs to specific lots is challenging with data from just 16 lots. If a lot associated with high SAEs was administered to significantly more people it could skew the SAEs-per-person ratio, further complicating efforts to establish a clear correlation. However, our findings suggests that beyond

plasmid DNA levels, issues related to the LNPs, toxicity, autoimmunity and/or aberrant immune responses due to ribosomal frameshifting may attribute to AEs, including Complement Activation-Related Pseudoallergy (CARPA), may contribute to AEs shortly after vaccination [36–41]. The random composition of DNA fragments in these vials complicates direct correlation between plasmid DNA levels and specific adverse reactions because the genotoxic effects of each fragment vary unpredictably depending on their sequence and interaction with the host genome. This variability makes it impossible to precisely estimate adverse effects based solely on DNA quantity. Higher DNA loads might also contribute to long-term health risks, such as cancer from genomic integration events. VAERS primarily captures short-term AEs and may underreport long-term effects. Further vial testing is needed to establish a dose-response curve using VAERS data. Long-term prospective monitoring is essential to assess the impact of genetic vaccines, especially since the spike protein has been detected up to 704 days post-vaccination [42].

Different relationships were observed for Moderna lots for qPCR data as well as for plots based on residual DNA estimated by fluorometry for both Pfizer and Moderna lots. These observations may reflect differences between the two products such as dose volume, quantity of DNA, the size distribution of DNA fragments, the composition and sequence of the plasmid vector and composition of lipid nanoparticles. Other differences, both between the two products and between different lots of each product, may also contribute to our observations. These differences include variations in levels of contaminants or impurities. One major source of impurity is fragmented mRNA for which several toxicological mechanisms have been proposed, such as its effects on miRNA processes [43]. dsRNA is another type of impurity that occurs secondarily to the T7 RNA polymerase promoter. dsRNA can induce pro-inflammatory cytokines [44] and has been hypothesized to contribute to immune-inflammatory reactions such as myocarditis [45]. Lipopolysaccharides in cells from endotoxin can bind both the S1 and S2 subunits of the spike protein which may result in enhanced inflammatory responses [46].

Wider sampling will likely reveal greater detail in terms of event types, such as death, as well as comparisons with other works, such as that reported by Schmeling et al. who reported a correlation of AEs to various vaccine lot numbers [47]. None of the presently studied vaccine lots were included in the Schmeling study and more work is needed to understand if and how this DNA contamination is related to AEs.

While the SV40 enhancer facilitates nuclear targeting [16,48], genomic integration of DNA fragments has yet to be demonstrated for the COVID-19 mRNA products [49]. However, it is known that DNA contamination could trigger an unwarranted innate immune response and may be pro-thrombotic, particularly for fragments with high GC content [50]. dsDNA may also be a significant factor in ischemic diseases including stroke [51]. Cytosolic DNA is also known to trigger cGAS-STING and chronic stimulation of this pathway is believed to be pro-oncogenic [52]. Moderna US patent #10,898,574 also emphasizes the insertional mutagenesis risk of residual DNA in their vaccines. While there appears to be a correlation between high DNA contamination and SAEs more research is needed to expand the sample size and elucidate any potential mechanism at work.

It is important to emphasize that as qPCR cannot quantitate molecules smaller than the size of the amplicon (105–114bp), qPCR underestimates the total DNA in each vaccine. The failure for qPCR to fully quantitate residual DNA in mRNA vaccines is described in Moderna patent #US 10,077,439. It is important to emphasize that the use of a single amplicon for qPCR can lead to 100-fold different estimates in some vaccines. The Spike DNA in some Moderna vaccines is ~100 fold more prevalent (~6CTs) than the non-spike DNA suggestive of DNase I inhibition with complementary RNA [4].

This explains the large differences we have observed in residual DNA levels estimated by qPCR compared with Qubit® fluorometry particularly between the Pfizer and Moderna products. The much larger values obtained for the Moderna product could partially be due to the larger dose volume but also suggests that there is a higher fraction of small fragmented residual DNA than in the Pfizer product. This is consistent with a more thorough nuclease digestion step. This illustrates the residual DNA guidelines recommended by the FDA are highly dependent on the methods used to quantitate the DNA. Furthermore, PCR assay robustness and reliability needs to be established given the actions of N-1-methylpseudouridine, the presence of RNA-DNA hybrids.

König et al. also found high DNA contamination using Qubit® fluorometry [24]. However, this study lacked an RNase A treatment and is likely over-estimating the amount of the DNA present due to the cross talk of DNA specific dyes intercalating with RNA. While the specificity of these DNA specific fluorometric dyes is well published, little is known about the impact on their specificity when in use with samples that have high concentrations of N1-methyl-pseudouridine modRNA or GC rich RNA prone to secondary structure and minor groove formation. Our Qubit® data showed that variance between sampling and freeze-thaw cycles do occur. This variance could be due to crude nature of the fluorometric assays, freeze-thaw cycles, or due to sampling error especially as sample vortexing and multiple pipetting can introduce air bubble that will alter the LNP size and settling [53]. However, our RNase A data demonstrate that Qubit® fluorometry must be coupled with the removal of the vaccine modRNA to properly quantitate the residual DNA when high concentrations of RNA are co-present.

This fluorometry assessment is of particular interest as fluorometry and UV spectrophotometry were used to quantitate RNA in the Pfizer COVID-19 vaccines, as described in EMA documents [7], while qPCR was used to quantitate DNA. This selective use of different methods to quantitate RNA/DNA ratios can lead to vastly different results for the ratio-metric guidelines in place at the EMA.

This elevated fluorometry quantitation compared to qPCR quantitation is consistent with the ONT read length distributions that also suggest a portion of the DNA may be smaller than the amplicon size. While the ONT sequencer detects molecules shorter than 100 bp, the methods for library construction for ONT use a 0.7X Ampure DNA purification step which drastically selects against purifying molecules <150 bp in size. As a result, the read length distributions for ONT reads are biased toward fragments >150 bp and are not a perfect reflection of the smaller fragments that may be present and undercounted by both ONT and qPCR.

Similarly, Georgiou et al. demonstrate that Fluorometric dyes produce 70% lower signal after DNase I treatment as the dyes provide non-linear signal for longer molecules of the same mass of DNA [54]. These data have not been compensated for this effect and likely reflect an underestimate of the actual quantity in the fluorometric assay. These smaller DNA molecules are also frequently lost during commonly used DNA isolation procedures such as Phenol/Chloroform purification or Ethanol precipitation. Kaiser et al. measured much lower amounts of DNA in their vaccines, but their methods did not ascertain the loss of short DNA fragments after multiple ethanol precipitations [55]. As DNA fragments <100 bp can be lost during purification methods, including ethanol precipitation, it is best to quantify the total DNA directly on the final drug product without any purification steps.

Currently, the US FDA recommends manufacturers of viral vaccines to limit the amount of residual DNA in the final product to below 10 ng/dose for parenteral inoculations and the size of the DNA to below the size of a functional gene, or ~200 base pairs [12]. This is also in keeping with recommendations from the World Health Organization (WHO) [20,56], and is for “naked” DNA, i.e. DNA that is not associated with proteins, lipids, or other molecules for protection or packaging. Previous residual DNA levels were set by the FDA at 10 pg/dose in 1985. A 1986 WHO study group concluded that the risk is negligible up to 100 pg/dose and in 1996 the WHO further increased levels up to 10 ng per dose [20]. However, as the residual DNA is encapsulated in the LNPs and is transfected efficiently directly into cells the DNA guidelines for modRNA vaccines need to be re-evaluated.

The FDA and WHO guidelines for allowable DNA in vaccines are influenced by work published by FDA scientists Sheng-Fowler et al. [57]. This work focused on host cell genomic DNA contamination and made note of the increased number of molecules present when small viral vectors are the contaminating species. For these high copy per nanogram contaminants, femtograms to attograms of DNA are considered the equivalent of nanograms of cell substrate genomic DNA. Given the short fragment size in the modRNA vaccines, the number of molecules in each dose can reach over 100 billion molecules. The residual DNA in these vaccines is high in copy number and rich in promoters, SV40 mammalian origins of replication, ORFs and nuclear targeting sequences. The FDA and WHO guidelines did not consider packaging of DNA in lipid nanoparticles, likely resulting in longer DNA persistence as well as increased transfection efficiency. Furthermore, the guidelines did not consider

cumulative dosing with LNP-based modRNA. Data have shown that LNPs are capable of increasing RNA or DNA cell entry by 10–100-fold [58–60].

In Japan, 13% of the population received seven doses of COVID-19 vaccines with a booster dose interval sometimes as short as 2 months [61]. Moreover, the risks of cumulative dosing by vaccines targeting other infections but using the same plasmid and LNP-based modRNA platform has not been considered in setting the residual DNA guidelines.

The FDA guidelines are also written to only quantitate DNA fragments of 200 bp or greater, in part because fragments smaller than this were not considered to be able to produce a functional gene. However, Klinman et al. suggests that fragments as small as 7 bp can pose integration risks [62]. Furthermore, the guidelines may also have considered that fragments of naked DNA shorter than 200 bp would be more rapidly hydrolyzed by host nuclease activity than larger molecules [63]. This accelerated destruction cannot be assumed of the vaccines due to the DNA being encapsulated and protected by the LNPs.

Klinman et al. also observe that *“in evaluating the potential harm of plasmid integration, it should be noted that the risk of introducing plasmids with strong regulatory regions into the host genome far exceeds that associated with random point mutations.”*

Finally, the guidelines do not consider if the residual DNA contains nuclear targeting sequences, mammalian origins of replication and mammalian promoters that exist in the Pfizer vaccine [49]. Vacik et al. demonstrated that the SV40 enhancer present in the Pfizer vector is a potent nuclear targeting sequence showing promise for gene therapy [48]. Senigl et al. demonstrate the SV40 enhancer is a somatic hypermutability element with tumorigenic potential [64]. Finally, Drayman et al. demonstrate the SV40 Enhancer in the Pfizer vaccine binds to P53, reminding us that the simple nanogram limits of residual DNA need to be reconsidered based on the functionality and replicative capacity of that DNA [65].

Conclusion

These data demonstrate the presence of billions to hundreds of billions of DNA molecules per dose in the modRNA COVID-19 products tested. Using fluorometry coupled with RNase A digestion, all products tested exceeded the guidelines for residual DNA set by the FDA and WHO of 10 ng/dose by 36–627-fold. qPCR testing showed that all Moderna vials were within the regulatory limit and that 3 Pfizer vials exceeded the regulatory limit for the SV40 promoter-enhancer-ori and showed much greater intra- and inter-lot variability. qPCR underestimates the total DNA with results varying greatly by genomic target emphasizing the importance of using more than one assay to accurately determine the DNA load. It is important that regulators produce clear and consistent guidelines on how to quantify mRNA and plasmid DNA in modRNA vaccines. The PCR results for the most recent XBB.1.5 Moderna and Pfizer vaccines suggest that DNA residues have not been reduced from previous vaccine versions.

Our findings extend existing concerns about vaccine safety and call into question the relevance of guidelines conceived before the introduction of efficient transfection using LNPs. With several obvious limitations, we urge that our work is replicated under forensic conditions and that guidelines be revised to account for highly efficient DNA transfection and cumulative dosing.

This work highlights the need for regulators and industry to adhere to the precautionary principle and provide sufficient and transparent evidence that products are safe and effective, and disclose the details of their composition and method of manufacture.

Author contributions

CRedit: **David J. Speicher**: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Writing – original draft, Writing – review & editing; **Jessica Rose**: Formal analysis, Methodology, Software, Writing – review & editing; **Kevin McKernan**: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Disclosure statement

Kevin McKernan is employed by Medicinal Genomics and provided qPCR and Qubit® reagents free of charge. No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This project was self-funded with reagents supplied by Kevin McKernan.

ORCID

David J. Speicher  <http://orcid.org/0000-0002-1745-3263>

Jessica Rose  <http://orcid.org/0000-0002-9091-4425>

Kevin McKernan  <http://orcid.org/0000-0002-3908-1122>

Data availability statement

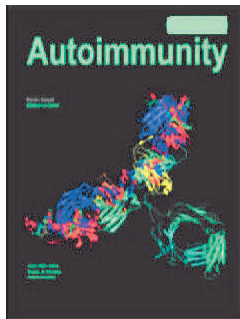
FASTQ file for the mapped ONT sequencing data: <https://mega.nz/file/UZhkiTBQ#8vjDK5JV5N5Dj2On34B6zdRObEKGBY3ZC7w8q2t9UVc>

References

- [1] de Fougères A, Elbashir SM. Delivery and formulation of engineered nucleic acids. United States Patent and Trademark Office, Modernatx, Inc; 2021. <https://patents.google.com/patent/US10898574B2/en>, <https://patentimages.storage.googleapis.com/29/f1/5c/fda42b8d8dd5ca/US10898574.pdf>
- [2] Guetzkow JA, Levi R. Effect of mRNA vaccine manufacturing processes on efficacy and safety still an open question. *BMJ*. 2023;378:o1731.
- [3] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. In vitro transcription technologies. United States Patent and Trademark Office; 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d2995c9653/US20230183769A1.pdf>
- [4] Sutton DH, Conn GL, Brown T, et al. The dependence of DNase I activity on the conformation of oligodeoxynucleotides. *Biochem J*. 1997;321(Pt 2):481–486. doi: 10.1042/bj3210481
- [5] Thorn CR, Sharma D, Combs R, et al. The journey of a lifetime - development of Pfizer's COVID-19 vaccine. *Curr Opin Biotechnol*. 2022;78:102803. doi: 10.1016/j.copbio.2022.102803
- [6] Tinari S. The EMA covid-19 data leak, and what it tells us about mRNA instability. *BMJ*. 2021;372:n627. doi: 10.1136/bmj.n627
- [7] EMEA/H/C/005735/RR. Rapporteur rolling review critical assessment report: quality aspects. European Medicines Agency; 2020. <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/>
- [8] McKernan K, Helbert Y, Kane LT, et al. Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose. *OSFio*. 2023. doi: 10.31219/osf.io/b9t7m. https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1
- [9] Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, et al. Safety monitoring in the vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Vaccine*. 2015;33(36):4398–4405. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.035
- [10] Speicher DJ, Rose J, Gutsch LM, et al. DNA fragments detected in monovalent and bivalent Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada: exploratory dose response relationship with serious adverse events. *OSF Preprints*; 2023. doi: 10.31219/osf.io/mjc97. https://osf.io/preprints/osf/mjc97_v1
- [11] International Council for Harmonisation (ICH). Q6B: specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products; 1999. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>
- [12] Food and Drug Administration. Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs). U.S. Department of Health and Human Services; 2020. from <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
- [13] Public Health Agency of Canada. National Vaccine Catalogue: Vaccine lot. 2024. Retrieved from <https://nvc-cnvc.canada.ca/en/vaccine-lots>
- [14] VAERS Team. Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) Standard Operating Procedures for COVID-19 (as of 29 January 2021) Retrieved from <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf>
- [15] Port Hedland. Australia - special council meeting agenda - 11 October 2024 attachments. Council of the Town of Port Hedland; 2024. Retrieved from <https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/>

- special-council-meetings/special-council-meeting-11-october-2024/247/documents/attachments_scm_11102024.pdf
- [16] Dean DA, Dean BS, Muller S, et al. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res.* 1999;253(2):713–722. doi: 10.1006/excr.1999.4716
 - [17] New England Biolabs. NEBioCalculator; 2023.
 - [18] R Development Core Team. R: The R project for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2010. Retrieved from <http://www.R-project.org>
 - [19] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
 - [20] Shin J, Wood D, Robertson J, et al. WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland, 7-8 April 2005. *Biologicals.* 2007;35(1):63–71. doi: 10.1016/j.biologicals.2005.12.005
 - [21] Ban E, Kim A. PicoGreen assay for nucleic acid quantification - Applications, challenges, and solutions. *Anal Biochem.* 2024;692:115577. doi: 10.1016/j.ab.2024.115577
 - [22] VAERS Team. VAERS data users guide; 2020. Retrieved from https://vaers.hhs.gov/docs/VAERSDataUseGuide_November2020.pdf
 - [23] South Carolina Senate. SC Senate Hearing - USC Professor Dr. Phillip Buckhaults; 2023.
 - [24] König B, Kirchner, J.O. Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty®. *Methods Protoc.* 2024, 7(41):1-8. doi: 10.3390/mps7030041
 - [25] Kämmerer U, Schulz V, Steger K. BioNTech RNA-Based COVID-19 Injections Contain Large Amounts Of Residual DNA Including An SV40 Promoter/Enhancer Sequence. *Science, Public Health Policy and the Law*, 5:1-22. Retrieved from <https://publichealthpolicyjournal.com/biontech-rna-based-covid-19-injections-contain-large-amounts-of-residual-dna-including-an-sv40-promoter-enhancer-sequence/>
 - [26] Wang TJ, Kim A, Kim K. A rapid detection method of replication-competent plasmid DNA from COVID-19 mRNA vaccines for quality control. *J High School Sci.* 2024;8(4):427–439. doi: 10.64336/001c.127890
 - [27] European Medicines Agency. EMA/896245/2022: Assessment report for Spikevax. 2022 Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-h-c-005791-ii-0075-g-epar-assessment-report-variation_en.pdf
 - [28] U.S. Food and Drug Administration. Emergency use authorization (EUA) for an unapproved product review memorandum. 2021. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/153947/download>
 - [29] Food and Drug Administration. Letter of authorization; 2023. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/150386/download>
 - [30] U.S. Department of Health and Human Services. Inspection of Injectable Products for Visible Particulates Guidance for Industry, 2021. Retrieved from <https://www.fda.gov/media/154868/download>
 - [31] Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, et al. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. *Nat Commun.* 2021;12(1):6777. doi: 10.1038/s41467-021-26926-0
 - [32] Hashiba K, Taguchi M, Sakamoto S, et al. Overcoming thermostability challenges in mRNA-lipid nanoparticle systems with piperidine-based ionizable lipids. *Commun Biol.* 2024;7(1):556. doi: 10.1038/s42003-024-06235-0
 - [33] Bushon RN, Kephart CM, Koltun GF, 3rd, et al. Statistical assessment of DNA extraction reagent lot variability in real-time quantitative PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50(3):276–282. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02788.x
 - [34] EMEA/H/C/005735/0000. Comirnaty European Public Assessment Report (EPAR). 2021. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
 - [35] European Medicines Agency. EMA/CHMP/50784/2022: type IB variation report; 2022. Retrieved from <https://postvac.org/wp-content/uploads/wpforo/attachments/3025/1252-Type-IB-variation-report.pdf>
 - [36] Oldfield PR, Gutschi LM, McCullough PA, et al. Pfizer/BioNTech's COVID-19 modRNA vaccines: dangerous genetic mechanism of action released before sufficient preclinical testing. *J Am Phys Surgeons.* 2024;29:118–126.
 - [37] Greenhawt M, Abrams EM, Shaker M, et al. The risk of allergic reaction to SARS-CoV-2 vaccines and recommended evaluation and management: a systematic review, meta-analysis, GRADE assessment, and international consensus approach. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(10):3546–3567. doi: 10.1016/j.jaip.2021.06.006
 - [38] Song J, Su D, Wu H, et al. Implications of anaphylaxis following mRNA-LNP vaccines: it is urgent to eliminate PEG and find alternatives. *Pharmaceutics.* 2025;17(6):798. doi: 10.3390/pharmaceutics17060798
 - [39] Wiseman DM, Gutschi LM, Speicher DJ, et al. Ribosomal frameshifting and misreading of mRNA in COVID-19 vaccines produces “off-target” proteins and immune responses eliciting safety concerns: comment on UK study by Mulrone et al. *OSF Preprints*; 2023. Retrieved from 10.31219/osf.io/nt8jh
 - [40] Mulrone TE, Pöyry T, Yam-Puc JC, et al. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature.* 2024;625(7993):189–194. doi: 10.1038/s41586-023-06800-3
 - [41] Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M, et al. Review: n 1-methyl-pseudouridine (m1Ψ): friend or foe of cancer? *Int J Biol Macromol.* 2024;267(Pt 1):131427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131427

- [42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS, et al. Immunological and antigenic signatures associated with chronic illnesses after COVID-19 vaccination. medRxiv. 2025. 2025.02.18.25322379; doi: [10.1101/2025.02.18.25322379](https://doi.org/10.1101/2025.02.18.25322379)
- [43] Stati G, Amerio P, Nubile M, et al. Concern about the effectiveness of mRNA vaccination technology and its long-term safety: potential interference on miRNA machinery. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1404. doi: [10.3390/ijms24021404](https://doi.org/10.3390/ijms24021404)
- [44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaaz6893. doi: [10.1126/sciadv.aaz6893](https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6893)
- [45] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Myocarditis and COVID-19 mRNA vaccines: a mechanistic hypothesis involving dsRNA. *Future Virol.* 2022, 17:191–196 doi: [10.2217/fvl-2021-0280](https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0280)
- [46] Samsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. SARS-CoV-2 spike protein as a bacterial lipopolysaccharide delivery system in an overzealous inflammatory cascade. *J Mol Cell Biol.* 2023;14: 1–14.
- [47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Batch-dependent safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Eur J Clin Invest.* 2023;53(8):e13998. doi: [10.1111/eci.13998](https://doi.org/10.1111/eci.13998)
- [48] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, et al. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999;6(6):1006–1014. doi: [10.1038/sj.gt.3300924](https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300924)
- [49] Lim S, Yocum RR, Silver PA, et al. High spontaneous integration rates of end-modified linear DNAs upon mammalian cell transfection. *Sci Rep.* 2023;13(1):6835. doi: [10.1038/s41598-023-33862-0](https://doi.org/10.1038/s41598-023-33862-0)
- [50] Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A, et al. Double-stranded DNA induces a prothrombotic phenotype in the vascular endothelium. *Sci Rep.* 2017;7(1):1112. doi: [10.1038/s41598-017-01148-x](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01148-x)
- [51] Ma X, Xin D, She R, et al. Novel insight into cGAS-STING pathway in ischemic stroke: from pre- to post-disease. *Front Immunol.* 2023;14:1275408. doi: [10.3389/fimmu.2023.1275408](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1275408)
- [52] Kwon J, Bakhoum SF. The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(1):26–39. doi: [10.1158/2159-8290.CD-19-0761](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0761)
- [53] Matthessen R, Van Pottelberge R, Goffin B, et al. Impact of mixing and shaking on mRNA-LNP drug product quality characteristics. *Sci Rep.* 2024;14(1):19590. doi: [10.1038/s41598-024-70680-4](https://doi.org/10.1038/s41598-024-70680-4)
- [54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocol for the quantitative assessment of DNA concentration and damage (fragmentation and nicks). *Nat Protoc.* 2009;4(2):125–131. doi: [10.1038/nprot.2008.222](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.222)
- [55] Kaiser S, Kaiser S, Reis J, et al. Quantification of objective concentrations of DNA impurities in mRNA vaccines. *Vaccine.* 2025;55:127022. doi: [10.1016/j.vaccine.2025.127022](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127022)
- [56] World Health Organization. Annex 3: requirements for the use of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biologic medicinal products and the characterization of cell banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series No. 878; 2013. Retrieved from https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_978_annex_3.pdf
- [57] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines. *Biologicals.* 2009;37(3):190–195. doi: [10.1016/j.biologicals.2009.02.015](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.015)
- [58] Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribution and non-linear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size. *Pharm Res.* 2022;39(1):105–114. doi: [10.1007/s11095-022-03166-5](https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5)
- [59] Phua KK, Leong KW, Nair SK. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format. *J Control Release.* 2013;166(3):227–233. doi: [10.1016/j.jconrel.2012.12.029](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.029)
- [60] Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM, et al. Myocardial delivery of lipidoid nanoparticle carrying modRNA induces rapid and transient expression. *Mol Ther.* 2016;24(1):66–75. doi: [10.1038/mt.2015.193](https://doi.org/10.1038/mt.2015.193)
- [61] Prime Minister's Office of Japan. COVID-19 vaccines; 2024. <https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm>
- [62] Klinman DM, Klaschik S, Tross D, et al. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine.* 2010;28(16):2801–2805. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.11.025](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.025)
- [63] André M, Reghin S, Boussard E, et al. Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines. *Biologicals.* 2016;44(3):139–149. doi: [10.1016/j.biologicals.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.03.002)
- [64] Šenigl F, Soikkeli AI, Prost S, et al. The SV40 virus enhancer functions as a somatic hypermutation-targeting element with potential tumorigenic activity. *Tumour Virus Res.* 2024;18:200293. doi: [10.1016/j.tvr.2024.200293](https://doi.org/10.1016/j.tvr.2024.200293)
- [65] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O, Butin-Israeli V, et al. p53 elevation in human cells halt SV40 infection by inhibiting T-ag expression. *Oncotarget.* 2016;7(33):52643–52660. doi: [10.18632/oncotarget.10769](https://doi.org/10.18632/oncotarget.10769)



Quantifizierung von residualer Plasmid-DNA und SV40-Promotor-Enhancer-Sequenzen in den mRNA-COVID-19-Impfstoffen von Pfizer/BioNTech und Moderna aus Ontario, Kanada

David J. **Speicher**, Jessica Rose & Kevin McKernan

Zitierweise dieses Artikels: David J. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Quantifizierung von residualer Plasmid-DNA und SV40-Promotor-Enhancer-Sequenzen in Pfizer/BioNTech- und Moderna-modRNA-COVID-19-Impfstoffen aus Ontario, Kanada, *Autoimmunity*, 58:1, 2551517, DOI: [10.1080/08916934.2025.2551517](https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517)

Link zu diesem Artikel: <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>



© 2025 Die Autoren. Veröffentlicht von Informa UK Limited, firmierend als Taylor & Francis Group

Zusätzliches Material anzeigen G¹

Online veröffentlicht: 06. September 2025.

Reichen Sie Ihren Artikel bei dieser Zeitschrift ein G²

Artikelaufrufe: 7100

Verwandte Artikel anzeigen G³

Crossmark-Daten anzeigen G⁴

Die vollständigen Nutzungsbedingungen finden Sie unter
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaut20>

Quantifizierung von residualer Plasmid-DNA und SV40-Promotor-Enhancer-Sequenzen in den mRNA-COVID-19-Impfstoffen von Pfizer/BioNTech und Moderna aus Ontario, Kanada

David J. Speicher^a, Jessica Rose^b und Kevin McKernan^c

Abteilung für Pathobiologie, Universität Guelph, Guelph, ON, Kanada; ^aUnabhängiger Forscher, Ontario, Kanada; Medicinal Genomics, Beverly, MA, USA

ZUSAMMENFASSUNG

Bei einigen COVID-19-Impfstoffen wurden die auf den Markt gebrachten Wirkstoffe anders hergestellt als die in klinischen Studien verwendeten. Die Herstellung von nukleosidmodifizierter mRNA (modRNA) für kommerzielle COVID-19-Impfstoffe basiert auf der RNA-Polymerase-Transkription einer Plasmid-DNA-Matrize. Frühere Studien haben hohe Konzentrationen von Plasmid-DNA in Ampullen mit modRNA-Impfstoffen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die Entfernung von DNA-Matrizenresten problematisch ist. Daher haben wir die DNA-Belastung in einer begrenzten Anzahl von Pfizer-BioNTech- und Moderna-COVID-19-modRNA-Impfstofffläschchen mit zwei unabhängigen Methoden quantifiziert. Die Gesamt-DNA und spezifische DNA-Zielsequenzen wurden mittels Qubit-Fluorometrie bzw. quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) an 32 Fläschchen aus 16 verschiedenen Impfstoffchargen quantifiziert. Zur Bewertung des Einflusses von RNA-Crosstalk in der DNA-Fluorometrie wurde eine RNase-A-Behandlung durchgeführt. Eine vorläufige Bewertung der DNA-Fragmentlänge und der DNase-I-Empfindlichkeit wurde ebenfalls durchgeführt. Die Gesamt-DNA lag bei Pfizer- und Moderna-Produkten zwischen 371 und 1.548 ng/Dosis bzw. zwischen 1.130 und 6.280 ng/Dosis. Die spezifische DNA mehrerer Plasmid-DNA-Zielsequenzen lag bei Pfizer zwischen 0,22 und 7,28 ng/Dosis und bei Moderna zwischen 0,01 und 0,78 ng/Dosis für Moderna. Der SV40-Promotor-Enhancer-ori (0,25–23,72 ng/Dosis) wurde nur in Pfizer-Fläschchen nachgewiesen. Die Oxford-Nanopore-Sequenzierung einer Ampulle ergab eine mittlere und maximale DNA-Fragmentlänge von 214 bp bzw. 3,5 kb. Diese Daten belegen das Vorhandensein von 1,23 x 10³ bis 1,60 x 10³ Plasmid-DNA-Fragmenten pro Dosis, die in Lipid-Nanopartikeln eingekapselt sind. Unter Verwendung der Fluorometrie überschreitet die Gesamt-DNA in allen getesteten Fläschchen den von der US-amerikanischen Food & Drug Administration (FDA) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegten Grenzwert für Rest-DNA um das 36- bis 153-fache für Pfizer und um das 112- bis 627-fache für Moderna, nachdem die unspezifische Bindung an modRNA berücksichtigt wurde. Bei der Untersuchung mittels qPCR lagen alle Moderna-Fläschchen innerhalb des regulatorischen Grenzwerts, aber 2/6 Pfizer-Chargen (3 Fläschchen) überschritten den regulatorischen Grenzwert für den SV40-Promotor-Enhancer-ori um das 2-fache. Das Vorhandensein des SV40-Promotor-Enhancer-Elements in Pfizer-Fläschchen wirft erhebliche Sicherheitsbedenken auf. Diese Studie unterstreicht die Bedeutung methodischer Überlegungen bei der Quantifizierung von residualer Plasmid-DNA in modRNA-Produkten, da eine erhöhte LNP-Transfektionseffizienz und eine kumulative Dosierung erhebliche und nicht quantifizierbare Risiken für die menschliche Gesundheit darstellen.

ARTIKELVERLAUF

Eingegangen am 6. April 2025
Überarbeitet am 16. Juli 2023
Angenommen am 0. August 2025

SCHLÜSSELWÖRTER

COVID-J 9; Impfstoff;
modRNA; mRNA; Rest-DNA;
DNA-Kontamination

Ein

Die chemische Synthese großer RNA-Moleküle (>200 bp) ist teuer und fehleranfällig. Daher wird eine T7-Polymerase verwendet, um aus DNA-Vorlagen lange modifizierte RNAs (modRNA) zu erzeugen. DNA-Templates sind einfach zu synthetisieren, müssen jedoch aus dem endgültigen Arzneimittelprodukt entfernt werden. Aufgrund der Einschränkungen der chemischen Synthese von DNA werden zunächst Fragmente oder Oligos der DNA chemisch synthetisiert, durch enzymatische Ligation und Polymerisation miteinander verbunden und schließlich als Produkte in voller Länge in replikationskompetente Plasmide kloniert. Die Reinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (*E. coli*) kann durch direkte Lyse der *E. coli* und Plasmid-DNA-Reinigung oder durch Reinigung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) des gewünschten Plasmid-Inserts erfolgen. Diese beiden unterschiedlichen Reinigungsmethoden können

KONTAKT David J. Speicher speicherWuoguelph.ca, researchWdavidspeicher.com Abteilung für Pathobiologie, Universität Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2WJ, Kanada.

Ergänzende Daten zu diesem Artikel sind online unter <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517> verfügbar.

© 2025 Die Autoren. Veröffentlicht von Informa UK Limited, firmierend als Taylor & Francis Group

Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution NonCommercial License verbreitet wird. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), die die uneingeschränkte nichtkommerzielle Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium gestattet, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Die Bedingungen, unter denen dieser Artikel veröffentlicht wurde, erlauben die Veröffentlichung des akzeptierten Manuskripts in einem Repository durch den/die Autor(en) oder mit deren Zustimmung.

Dramatische Unterschiede in der Menge und Art der Rest-DNA in den Impfstoffen. Diese Reinigungsschritte werden in Modernas Patent US10898574B2 hervorgehoben und basieren auf einer PCR-freien Methode, bei der Plasmid-DNA aus in Kanamycin-Bouillon kultivierten *E. coli* direkt gereinigt wird. Das Patent von Moderna besagt, dass eine gentechnisch veränderte DNA (z. B. nackte Plasmid-DNA), die in einem Lipid-Nanopartikel (LNP) verpackt ist, direkt in einen lebenden Wirt injiziert wird und eine Insertionsmutagenese und Aktivierung von Onkogenen oder die Hemmung von Tumorsuppressorgen verursachen könnte[1].

Nach der Zulassung und Einführung des COVID-19-Impfstoffs durch die US-amerikanische Food & Drug Administration (FDA) änderte Pfizer seinen Herstellungsprozess von der PCR-Amplifikation einer DNA-Matrize (Prozess 1) für die randomisierte klinische Studie (RCT) zu einem PCR-freien Reinigungsprozess unter Verwendung von DNA-Plasmiden (Prozess 2), wie er auch von Moderna verwendet wird [2]. Das BioNTech-Patent US20230183769A1 beschreibt ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung von RNA in pharmazeutischer Qualität unter Verwendung von *In-vitro*-Transkriptionsreaktionen, wobei gleichzeitig die prozessbedingten Verunreinigungen durch dsRNA reduziert werden [3]. Da jedoch in Prozess 2 anstelle des in Prozess 1 verwendeten 4,2-kb-PCR-Amplikons ein 7,8-kb-Bakterienplasmid für die In-vitro-Transkription verwendet wurde, ist es wahrscheinlich, dass es zu einem starken Anstieg der Rest-DNA im endgültigen Arzneimittelprodukt gekommen ist [1].

Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Rückgründe zwischen Prozess 1 und Prozess 2 reicht der von Pfizer zur Erkennung eines bestimmten Teils der DNA verwendete einzelne qPCR-Assay möglicherweise nicht für eine genaue Quantifizierung aus. Die in der klinischen Studie von Pfizer verwendeten PCR-basierten Methoden enthalten im Vergleich zu den öffentlich verabreichten Impfstoffen sehr unterschiedliche Hintergrund-DNA, da der PCR-Prozess nur den Teil des Plasmids amplifiziert hat, der die Spike-mRNA-Sequenz kodiert. Die *E. coli*-Reinigungsmethode von Prozess 2 enthält die Plasmidvektorsequenz mit dem klonierten Insert der Spike-Sequenz. Daher sind für eine vollständige Quantifizierung Methoden zur Quantifizierung von Rest-DNA erforderlich, die sowohl das Plasmid als auch das Insert bewerten, im Gegensatz zum Verfahren von Pfizer, bei dem nur eine PCR auf das KAN-Gen (d. h. das Kanamycin-Resistenzgen) aus dem Plasmidvektor durchgeführt wurde. Pfizer legte den Aufsichtsbehörden einen qPCR-Assay für die Spike-Region vor, um das Vorhandensein des Spike-Inserts zu bestätigen, lieferte jedoch keine Quantifizierung aus diesem validierten zweiten Assay. Dies ist relevant, da bekannt ist, dass DNase I RNA:DNA-Hybride nicht verdauen kann. Diese Hybride sind nach der *In-vitro*-Transkription (IVT) in der Spike-Sequenz vorhanden und können auch in Form von Rest-RNA aus der Plasmid-Expression des AmpR-SV40-KAN-Gens vorliegen, da dieses in *E. coli* vermehrt wird. Daher kann die DNase I-Aktivität an verschiedenen Stellen des Plasmids variieren. Assays, die nur eine Stelle des Plasmids messen, können die Rest-DNA im endgültigen Arzneimittel nicht genau quantifizieren [4].

Die Plasmide von Pfizer und Moderna weisen viele Gemeinsamkeiten auf, unterscheiden sich jedoch vor allem darin, dass das Plasmid von Pfizer ein Derivat von pcDNA3.1 ist, einem Shuttle-Vektor, der sowohl bakterielle als auch Säugetier-Replikation über SV40-Replikationsursprünge, SV40-Enhancer, SV40-Promotoren und SV40-PolyA-Signale ermöglicht [5]. Die von Pfizer (7.824 bp) und Moderna (6.777 bp) verwendeten Plasmid-DNA-Templates enthalten beide einen ColE1-Bakterien-Replikationsursprung (allgemein als *ori* bezeichnet), der in *E. coli* aktiv ist. Beide Plasmide enthalten außerdem ein Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen (*Neo/Kan*), das die Selektion von Bakterien, die das Plasmid tragen, in Medien mit Kanamycin ermöglicht. Die *E. coli*-Zellen werden dann geerntet und lysiert. Die Plasmid-DNA wird extrahiert, gereinigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert. Diese lineare DNA dient dann als Template für die IVT unter Verwendung von T7-RNA-Polymerase in Gegenwart von N1-Methyl-Pseudouridin. Durch die Zugabe von N1-Methyl-Pseudouridin werden diese Produkte zu bioengineerten nukleosidmodifizierten mRNA-Impfstoffen (d. h. modRNA-Impfstoffen). Nach der IVT wird die DNA enzymatisch mit DNase I hydrolysiert, wodurch ihre Prävalenz im endgültigen Arzneimittel reduziert wird. In den von Pfizer der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) vorgelegten Unterlagen [6] wurde darauf hingewiesen, dass die Rest-DNA in modRNA-Produkten, die nach diesem Verfahren hergestellt werden, erheblich variieren kann [7].

Im Jahr 2023 unterzogen McKernan et al. COVID-19-modRNA-Impfstoffampullen einer RNA-Sequenzierung der nächsten Generation und fanden unerwartete Hinweise auf DNA, die aus den bei der Herstellung verwendeten Template-Plasmiden stammte [8]. Dies zeigte, dass sowohl die Impfstoffe von Pfizer als auch von Moderna hochkodierte Plasmidkomponenten mit unterschiedlichen Rest-DNA-Sequenzen enthielten. Darüber hinaus stellten McKernan et al. fest, dass alle Pfizer-Impfstoffe SV40-Promotor-Enhancer-ori- und SV40-PolyA-Signalsequenzen enthielten, die als Promotor für den Kan/Neo-Selektionsmarker verwendet wurden. Diese Rest-DNA-Komponenten fehlten in den erforderlichen Angaben in den EMA-Zulassungsunterlagen (S. 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7].

Auf der Grundlage dieser Informationen entwickelten McKernan et al. eine qPCR-Methode zur Quantifizierung des Gehalts an residualer Plasmid-DNA in den Impfstoffampullen, die auf mehrere Loci in den Moderna- und Pfizer-Plasmiden abzielt [8]. Das Ziel dieser Forschung war es daher, das Vorhandensein und die Menge an residuellem Plasmid zu überprüfen.

DNA und den SV40-Promotor-Enhancer-ori in den COVID-19-modRNA-Impfstoffen von Pfizer und Moderna und vergleichen die Ergebnisse mit den unerwünschten Ereignissen (AEs), die dem Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) gemeldet wurden. Zu diesem Zweck haben wir 32 Fläschchen mit COVID-19-modRNA-Impfstoffen beschafft, die in Ontario, Kanada, verteilt worden waren. Die Menge spezifischer DNA-Zielsequenzen, d. h. Spike, *Plasmid-ori* und SV40-Promotor-Enhancer-ori, wurde mittels qPCR bestimmt, die Gesamt-DNA-Menge mittels Qubit-Fluorometrie. Wir haben außerdem die Beobachtungen einer früheren Arbeit (McKernan et al.) erweitert, indem wir die Größenverteilung der DNA-Fragmente sowie die DNase-1-Empfindlichkeit des Impfstoffs untersucht haben, um festzustellen, ob die Rest-DNA in den LNPs verpackt ist. Anschließend haben wir VAERS auf etwaige unerwünschte Ereignisse (AE), einschließlich schwerwiegender unerwünschter Ereignisse (SAE), im Zusammenhang mit diesen Chargen abgefragt [9]. Diese Studie ist eine erweiterte Version e i n e s früheren Preprints [10].

Materialien und Methoden

Für diese Studie verwendeten wir die Begriffe „Rest-DNA“, „DNA-Masse“ oder „Verunreinigungen (oder ähnliches)“ anstelle von „Kontamination“, um den regulatorischen Definitionen von Verunreinigungen zu entsprechen, die aus dem Herstellungsprozess stammen [11,12]. Basierend auf den Richtlinien der FDA und der US-Arzneibuchkommission (USP) sind „Verunreinigungen“ unerwünschte Substanzen, die dem Herstellungsprozess oder den bei der Impfstoffherstellung verwendeten Rohstoffen innewohnen. Verunreinigungen sind in der Regel zu erwarten, vorhersehbar und entstehen durch die bei der Herstellung verwendeten Materialien, Reagenzien oder Zwischenprodukte. Zu den Verunreinigungen zählen dsRNA, RNA:DNA-Hybride, kurze RNA-Fragmente und residuale Plasmid-DNA-Fragmente. Der Begriff „Kontamination“ bezieht sich hingegen auf unbeabsichtigte, fremde Substanzen, die durch externe Quellen wie Umweltfaktoren, Geräte oder menschliches Versagen in das Impfstoffprodukt gelangen und nicht Teil des beabsichtigten Herstellungsprozesses sind. Kontaminationen sind in der Regel unerwartet und können mikrobielle Kontaminanten (z. B. Bakterien, Pilze), zufällige Erreger (z. B. Viren) oder Fremdpartikel umfassen.

COVID-19-Impfstoffchargen

Ampullen mit Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 Ampullen; 6 Chargen) und Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 Ampullen, 10 Chargen) wurden von verschiedenen Apotheken in Ontario, Kanada, bezogen (Abbildung 1 und Tabelle 1). Als Negativkontrolle wurde eine ungeöffnete sterile Injektionsampulle mit Alprostadil 66 mcg/ml in Kombination mit Papaverin 21,7 mg/ml und Phentolamin 1 mg/ml (TriMix) verwendet. Die ungeöffneten Fläschchen waren unversehrt, da sie über intakte Flip-Off-Kunststoffkappen mit aufgedruckten Chargennummern und Verfallsdaten verfügten. Die Fläschchen wurden in Apotheken in speziell dafür vorgesehenen Impfstoff-Lagereinheiten bei +2–8 °C gelagert und in isolierten Behältern mit gefrorenen Gelpackungen transportiert, bevor sie innerhalb von 1 h nach Erhalt in den Kühlschrank des Testlabors gestellt wurden. Auf einer Moderna-Ampulle fehlte d a s aufgedruckte Verfallsdatum, aber es war ein QR-Code vorhanden, der von e i n e m Apotheker gescannt werden musste. Die Moderna XBB.1.5-Ampullen wurden von der Apotheke auf ähnliche Weise gelagert. Die Reste kürzlich verwendeter Ampullen (innerhalb von 30 Minuten nach der Verabreichung) wurden in einen isolierten Behälter mit gefrorenen Gelpackungen gelegt und innerhalb von 12 Stunden zum Kühlschrank des Testlabors transportiert.

qPCR-Analyse von *Spike*, *ori* und der *SV40-Promotor-Enhancer-ori*-DNA

Die qPCR-Assays zielten auf Spike- und *Plasmid*-Ori-Sequenzen ab, die den Expressionsplasmiden von Moderna und Pfizer gemeinsam sind (Tabelle 2). Diese Primer wurden auch zum Testen von COVID-19-modRNA-Impfstoffampullen in Australien verwendet [11]. Der Uniplex-SV40-Enhancer-Assay wurde entwickelt, um die für das Pfizer-Plasmid einzigartige nukleäre Zielsequenz zu amplifizieren [11]. Bei allen qPCR-Assays wurde 1 µl aus jeder Ampulle direkt zu 178 µl Mastermix hinzugefügt. Die qPCR-Kits wurden von Medicinal Genomics (Teilenummer 420201, Beverly, USA), wobei der Mastermix 8,8 µl Reaktionskonsistenz enthielt, bestehend aus 3,8 µl Polymeraseenzym (Medicinal Genomics Teilenummer 420201), 0,5 µl Reaktionspuffer und 1,0 µl Primer-Probe-Mix sowie 12,2 µl ddH₂O. E i n e Primer-Probe-Mischung wurde unter Verwendung von 12,5 µl 100 µM Ori-Probe, 12,5 µl 100 µM Spike-Sonde, 25 µl 100 µM Spike-Forward-Primer, 25 µl 100 µM Spike-Reverse-Primer, 25 µl 100 µM Ori-Forward-Primer, 25 µl 100 µM Ori-Reverse-Primer und 75 µl ddH₂O. Alle



Abbildung 1. Fläschchen mit dem COVID-19-Impfstoff BNT162b2 von Pfizer/BioNTech und Spikevax mRNA-1 273 von Moderna aus Ontario, Kanada:

(A) Pfizer/BioNTech monovalent und bivalent für Erwachsene; (B) Moderna monovalent XBB.1.5 für Erwachsene; (C) Pfizer-BioNTech monovalent für Erwachsene; (D) Moderna monovalent für Kinder/Erwachsene; (E) bivalent Wuhan-BA.1 für Kinder/Erwachsene; (F) bivalenter Impfstoff für Kinder/Erwachsene Wuhan-BA.1 und bivalenter Impfstoff für Erwachsene Wuhan-BA.4/5; und (G) Mischung aus monovalentem Impfstoff für Kinder/Erwachsene und monovalentem Impfstoff für Erwachsene XBB.1.5 von Moderna sowie monovalentem Impfstoff für Erwachsene XBB.1.5 von Pfizer-BioNTech. Eine Ampulle mit dem monovalenten Impfstoff für Kinder/Erwachsene von Moderna wurde nicht fotografiert.

Bei den qPCR-Assays wurde eine synthetische gDNA-Kontrolle (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) mit bekannter Konzentration (1 ng/pL) verwendet, um eine 10-fache serielle Verdünnung zur Erstellung einer Kalibrierungskurve zu erzeugen.

Die Zyklen wurden auf einem QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt, mit einer anfänglichen Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen bei 95 °C für 10 Sekunden und 65 °C für 30 Sekunden. Die Umrechnung von C_q in ng/pL wurde mit der QuantStudio-Software v2.7.0 (ThermoFisher Scientific) berechnet. Die Amplikonmasse, bestimmt mit dem New England BioLabs DNA-Rechner [17], und die Länge (105 bp für *ori*, 114 bp für Spike und 152 bp für den SV40-Promotor-Enhancer-ori) wurden verwendet, um die Gesamtmenge an Nanogramm (ng) der vorhandenen DNA zu schätzen, indem die Länge der Plasmide (7.824 bp für Pfizer und 6.777 bp für Moderna) berücksichtigt wurde. Die Kopienzahl pro Dosis wurde zunächst um die Verdünnungen (z. B. 1:5-Verdünnung für den monovalenten Impfstoff für Erwachsene von Pfizer) und dann um das Volumen jeder Injektionsdosis für Erwachsene (300 pL für Pfizer und 500 pL für Moderna) bereinigt. An den drei Pfizer-Chargen, die die höchste Rest-DNA-Konzentration aufwiesen, wurden serielle Verdünnungen durchgeführt, um die PCR-Hemmung durch die LNPs zu untersuchen, da die qPCR direkt ohne jegliche Behandlung oder Extraktion durchgeführt wurde.

Tabelle 1. Beschreibung der in dieser Studie untersuchten Chargen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs.

Informationen zur Impfstoffherstellung							VAERS-Daten	
Hersteller	Mono-/bivalent	Chargennummer	Versiegelt	HC-Zulassungsdatum	Verfallsdatum	Abgelaufen	Gesamt-AES	Gesamt SAES
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FD0810	Versiegelt	29.07.2021	31.05.2022	Abgelaufen	941	154
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FM7380	Versiegelt	05.01.2022	30.11.2022	Abgelaufen	64	25
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FN7934a	Versiegelt	11.01.2022	31.10.2022	Abgelaufen	50	25
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FN7934b	Versiegelt					
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FX4343a	Versiegelt	13.04.2022	31.07.2023	Abgelaufen	4	
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent	FX4343b	Versiegelt					
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Bivalent	GK0932a	Versiegelt	19.10.2022	29.02.2024	Im Code	20	2
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Bivalent	GK0932b	Versiegelt					
Pfizer-BioNTech	Erwachsene, bivalent	GK0932c	Versiegelt					
Pfizer-BioNTech	Erwachsene Monovalent XBB.1.5	HD9867	Versiegelt	28.09.2023	31.10.2024	Im Code	14	5
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	092D21 A	Versiegelt	13.06.2021	13.02.2022	Abgelaufen	49	41
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	020E21 Aa	Versiegelt	08.07.2021	04.03.2022	Abgelaufen	6	2
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	020E21 Ab	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	062H21 Aa	Versiegelt	27.10.2021	31.05.2022	Abgelaufen	0	3
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	062H21 Ab	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	020J21 A	Versiegelt	18.11.2021	30.06.2022	Abgelaufen	7	5
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	055K21 A	Versiegelt	16.12.2021	31.07.2022	Abgelaufen	2	2
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	033M21 Aa	Versiegelt	11.02.2022	30.09.2022	Abgelaufen	2	1
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	033M21 Ab	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	033M21 Ac	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Monovalent	033M21 Ad	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Bivalent BA.1	AS0467Da	Versiegelt	23.09.2022	02.04.2023	Abgelaufen	0	0
Moderna	Kind/Erwachsener Bivalent BA.1	AS0467Db	Versiegelt					
Moderna	Kind/Erwachsener Bivalent BA.1	AS0467Dc	Versiegelt					
Moderna	Erwachsene Bivalent BA.4/5	AT0709Ba	Versiegelt	28.11.2022	30.10.2023	Abgelaufen	0	0
Moderna	Erwachsene Bivalent BA.4/5	AT0709Bb	Versiegelt					
Moderna	Erwachsene Bivalent BA.4/5	AT0709Bc	Versiegelt					
Moderna	Erwachsene Bivalent BA.4/5	AT0709Bd	Versiegelt					
Moderna	Erwachsene Monovalent XBB.1.3	020G23 Aa	Unversiegelt	13.09.2023	19.07.2024	Im Code	0	0
Moderna	Erwachsene Monovalent XBB.1.3	020G23Ab	Unversiegelt					
Moderna	Erwachsene Monovalent XBB.1.5	020G23Ac	Unversiegelt					
Moderna	Erwachsene Monovalent XBB.1.3	025G23A	Unversiegelt	2023-09-13	10.08.2024	Im Code	0	0

Sortiert nach dem Datum der Zulassung durch Health Canada, wie im kanadischen nationalen Impfstoffkatalog[13] verzeichnet. Unerwünschte Ereignisse (UE) und schwerwiegende UE sowie SAEs aus Kanada wurden aus der VAERS-Datenbank extrahiert, die öffentlich zum Download verfügbar ist (<https://vaers.hhs.gov/>)[14]. Kleinbuchstaben am Ende der Chargennummern kennzeichnen verschiedene Flaschen derselben Charge.

Tabelle 2. Primer- und Sondensequenzen, die auf Spike, *ori* und den SV40-Promotor-Enhancer-ori abzielen.

Primer-/Sondenbezeichnung	Sequenz (5' -3') ^a	Amplifikationslänge
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Vorwärts	AGATGGCCTACCGGTTCACAGGCTGCTCGGATCTT	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Rückwärts	5'-6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATCGCCAA-3'-IABkFQ ^Δ	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Sonde	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	
MedGen_Vax-Vektor_Ori_Vorwärts	GCGCCTTATCCGGTAACATC	103 bp
MedGen_Vax-Vektor_Ori_Rückwärts	5HEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'-IABkFQ ^Δ	
MedGen_Vax-Vektor_Ori_Probe	GTCACTTAGGGTGTGGAAAGT	
MedGen_SV40-Promotor-Enhancer-ori_Vorwärts	GGTTGCTG ACTAATTGAG ATGC	152bp
MedGen_SV40-Promotor-Enhancer-ori_Rückwärts	STEX61 S-CCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAGC-3'-IABRQSp ^Δ	
MedGen_SV40-Promotor-Enhancer-ori_Sonde		

^aFür das Primerdesign wurden die Sequenzen des bivalenten Expressionsvektors BNT162b2 (OR134377.1) von Pfizer und des Expressionsvektors Moderna mRNA 1273 (OR134378.1) verwendet.

Die Sonde war am 5'-Ende mit einem 6-FAM (6-Carboxyfluorescein)-Fluorophor, einem internen ZEN[™]-Quencher und am 3'-Ende mit 3'-Iowa Black[™] FQ markiert. Die Sonde hatte einen 3'-Terminus, der mit 5HEX (Hexachlorfluorescein)-Fluorophor, einem internen ZEN[™]-Quencher, markiert und das 3'-Ende mit 3'-Iowa Black[™] FQ markiert.

Die Sonde hatte einen 3'-Terminus, der mit einem TEX 615-Fluorophor markiert war, und einen 3'-Terminus, der mit 3'-Iowa Black[™] RQ markiert war.

Qubit[™]-Fluorometrie-Quantifizierung

AccuGreen[®] HP-Fluorometrie-Reagenzien (AccuGreen #99820 und DNA-Quantifizierungspuffer #99979) und Standards wurden von Biotium (San Francisco, USA) für die Qubit-Analyse (ThermoFisher Scientific) bezogen. Die Fluorometrie-Messungen wurden zunächst direkt an den Impfstoffen in einer 200 μ L-Mischung durchgeführt, die fluorometrische Reagenzien (190 μ L einer Stammlösung aus 995 μ L HS-Puffer und 5 μ L 200X AccuGreen[™]-Farbstoff) und 10 μ L Impfstoff. Die Proben wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers auf einem Qubit[®] 3.0 Fluorometer gemessen. Diese Proben wurden dann 8 Minuten lang auf 9 °C erhitzt und 5 Minuten lang auf 4 °C abgekühlt, um die LNPs aufzubrechen und den fluorometrischen Farbstoffen den Zugang zur DNA zu ermöglichen. Zur Bewertung des Potenzials

Signal abgeleitet von der Bindung von AccuGreen an modifizierte RNA, 1 qL von 20 mg/mL RNase A (NEB# T301SL) wurde nach dem Erhitzen/Abkühlen zu den Proben hinzugefügt und bei 37 °C inkubiert, wobei eine Zeitreihe von Fluoreszenzmessungen erfasst wurde. Die Fluorometrie-Messungen wurden vor der Zugabe von RNase A und 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten nach der Zugabe von RNase A durchgeführt.

Daten des Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)

Die VAERS-Datenbank wurde mit dem Paket „Language and Environment for Statistical Computing“ in R [18] analysiert und umfasste Daten vom 17. Dezember 2020 bis zum 6. Oktober 2023. Die in den USA gespeicherten VAERS-Daten können in drei separaten CSV-Dateien (Comma Separated Values) heruntergeladen werden, die Folgendes enthalten: i) allgemeine Daten zu jedem Bericht; ii) die gemeldeten unerwünschten Ereignisse oder „Symptome“ und iii) Impfstoffdaten, einschließlich Impfstoffhersteller und Chargennummer [9]. Ein nicht in den USA ansässiger (ausländischer) VAERS-Datensatz steht ebenfalls zum Download zur Verfügung und enthält AE-Meldungen, die von Nicht-US-Ländern weltweit an die Aufsichtsbehörden übermittelt wurden. Um die Vertraulichkeit zu wahren, wird bei der Einreichung eines Berichts eine VAERS-ID-Nummer vergeben. Um die unerwünschten Ereignisse im Zusammenhang mit einem bestimmten Impfstoff zu bewerten, müssen die drei Datendateien unter Verwendung der VAERS-IDs als Verknüpfungsvariable zusammengeführt werden. Für diese Studie wurden nur COVID-19-Impfstofftypen (COVID 19-1 (monovalent) und COVID 19-2 (bivalent)) berücksichtigt. Weitere relevante Variablen waren die VAERS-ID*, die Impfstoffcharge (VAX LOT), der Impfstoffhersteller (VAX MANU), Krankenhausaufenthalte (HOSPITAL), Behinderungen (DISABLE), Notaufnahmen (ER ED VISIT), Geburtsfehler (BIRTH DEFECT), lebensbedrohliche Ereignisse (L THREAT) und Todesfälle (DIED). Die Daten wurden nach VAX LOT gruppiert und die Gesamtzahl der AE- und SAE-Meldungen gezählt. Die SAE-Meldungen umfassten Todesfälle, Krankenhausaufenthalte, Notaufnahmen, Meldungen über Behinderungen, Geburtsfehler und lebensbedrohliche Ereignisse. Es wurden Daten aus den USA und aus anderen Ländern abgefragt, und für die Zwecke dieser Studie werden in den primären Ergebnissen nur die kanadischen Chargenzahlen angegeben. Kanadische Meldungen wurden von Meldungen außerhalb der USA (aus dem Ausland) anhand der Variable fiPLTTYPE unterschieden, die den Ländercode – im Falle Kanadas „CA“ – als ersten zweistelligen Platzhalter angibt. Die Korrelationen zwischen den VAERS-Daten und den DNA-Werten für Spike, Ori und SV40 wurden grafisch dargestellt und anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Flanoporesequenzierung

Die DNA-Fragmentgrößenverteilungen wurden unter Verwendung einer zuvor sequenzierten Impfstoffcharge (Pfizer Kinder-Monovalent Charge Nr. FLS095) [8] als Standard unter Verwendung eines Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) und des Oxford Nanopore Ligation Sequencing Kits (SQK-LSK114) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Reads wurden mit dem Burrow-Wheeler Aligner mit maximalen exakten Übereinstimmungen (BWA-MEM) [19] auf NCBI OR134S77.1 gemappt. Die Leselänge der ONT-Sequenzierung ist unbegrenzt, aber die für die Durchführung der ONT-Sequenzierung erforderlichen DNA-Isolierungsverfahren können die Länge der in der ONT-Ligationsreaktion erfassten Moleküle verzerren. Kürzere Fragmente können bei der in diesen Methoden verwendeten SPRI-basierten DNA-Erfassung verloren gehen. Die einzelnen Molekül-Reads wurden gezählt und entsprechend ihrer zugeordneten Leselänge mit BWA-MEM sortiert.

Bewertung der Nukleaseempfindlichkeit

Pfizer Lot# FLS09S wurde ebenfalls als Standard zur Bewertung der DNase-I-Empfindlichkeit des Impfstoffmaterials verwendet. In LNP verpackte DNA sollte unzugänglich und somit resistent gegen DNase I sein, während DNA außerhalb des LNP DNase I-labil sein sollte.

Die nuklease-geschützte DNA wurde durch Behandlung von 20 µl des Impfstoffs mit 2,5 µl DNase I-XT (2 Einheiten/µl, NEB#M05705, New England Bio Labs Inc, Ipswich, USA) in Grim Reefer I0X-Puffer (Medicinal Genomics #420123-125) behandelt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden anstelle von DNase I-XT 2,5 µl ddH₂O verwendet. Die DNase I-XT-Reaktion wurde mit 2,5 qL MGC-Lysepuffer (Medicinal Genomics #420001) beendet. Nach dem DNase I-Inaktivierungsschritt wurde eine qPCR-amplifizierbare interne Kontroll-DNA hinzugefügt, um zu überprüfen, ob die DNase I-XT vollständig inaktiviert worden war (Medicinal Genomics #420123-125). Anschließend wurden 54 µL SenSATIVax-Magnetkügelchen (Medicinal Genomics) verwendet, um

Reinigung der DNA aus dem DNase I-XT-Assay und den DNase I-XT-Negativkontrollproben. Die Magnetkügelchen wurden 10 Mal mit der Probe pipettiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, magnetisch getrennt und zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde entfernt und die Kügelchen 2 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden in 30 µL ddH₂O eluiert und 1 µL Eluat wurde mittels qPCR auf Spike und *Ori* in einer 18,8 µL-Reaktion untersucht. Ein zusätzlicher DNase I-Inaktivierungskontrollprimer und eine Sonde (0,5 µL CY5-markierte Sonde) wurden dem Assay hinzugefügt, sodass insgesamt 19,3 µL Reaktion vorlagen.

Ergebnisse

qPCR-Testung von Rest-DNA

Wir haben die Genauigkeit der qPCR-Quantifizierungsmethode anhand einer 8-log-Serienverdünnungs-Standardkurve validiert, die zur Kalibrierung der C_q-Werte der Proben verwendet wurde, und R²-Werte von 0,998, 0,999, 0,906 sowie Wirkungsgrade von 99,8 %, 94,7 % und 93,6 % für Spike-, *Ori*- und SV40-Promotor-Enhancer-*Ori*-Amplikons. Auf allen Platten wurden Negativkontrollen und Kontrollen ohne Template (ddH₂O) (NTC) dreifach getestet und als negativ befunden.

Erste Tests, die an unverdünnten Impfstoffproben durchgeführt wurden, zeigten, dass alle Pfizer-Fläschchen positiv auf Spike, *Ori* und SV40-Promotor-Enhancer-*Ori* getestet wurden. Bei einzelnen Fläschchen amplifizierte qPCR für Pfizer zu ähnlichen Zeitpunkten für Spike, *Ori* und SV40 Enhancer-Promotor-*Ori* (Durchschnitt C_q 0,89 + 0,28). Obwohl die Amplifikation bei der Pfizer-Charge FX4343 etwas später erfolgte als bei den anderen Fläschchen, war der Unterschied zwischen den Fläschchen gering (Spike C_q 17,86 + 1,58; *ori* C_q 17,91 + 2,05; SV40-Promotor-Enhancer-*ori* qC_q 15,46 + 2,02). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Fläschchen waren auch bei Moderna gering (Spike C_q 20,65 + 0,55; *ori* C_q 25,45 + 1,32). Bei allen Moderna-Fläschchen mit Ausnahme von Lot AS0467D (Bivalent BA.1) wurde *ori* jedoch durchweg 2,95–0,30 Zyklen später als Spike amplifiziert. Der SV40-Promotor-Enhancer-*ori* wurde in allen Pfizer-Fläschchen, jedoch in keinem der Moderna-Fläschchen nachgewiesen.

Um die Hemmung der qPCR-Reaktionseffizienz durch LNP zu bewerten, wurden Fläschchen der Chargen FM73S0 und FN7934 einer 10-fachen seriellen Verdünnung unterzogen. Die erwartete Quantifizierungszyklusreaktion (C_q) von -3,3 wurde erst nach der 1:10-Verdünnung beobachtet, was darauf hindeutet, dass eine gewisse LNP-Hemmung vorliegt, die die Quantifizierung der DNA bei diesen Verdünnungen beeinflussen könnte. Daher wurden die Daten aus den 1:10-Verdünnungen für die weitere Analyse verwendet. Diese Verdünnung sowie die Tatsache, dass einige der Dosen vor der Verwendung verdünnt werden sollten, wurden in unseren Berechnungen berücksichtigt.

Menge spezifischer DNA-Restfragmente, bestimmt durch qPCR

Die qPCR-Untersuchung der 1:10 verdünnten Fläschchen ergab C_q-Werte für *ori* und spike von 18,44–24,57 und 15,03–23,83 für Pfizer und 25,24–30,10 bzw. 22,35–24,53 für Moderna (Tabelle 3). Der SV40-Promotor-Enhancer-*Ori*-Assay ergab C_q-Werte von 17,46–24,65 in den Pfizer-Fläschchen und amplifizierte nicht in den Moderna-Fläschchen. Die Reproduzierbarkeit der Spike-, *ori*- und SV40-Assays betrug 0,72 + 0,14, 0,74 + 0,23 und 0,65 + 0,16 für Pfizer und 0,83 + 0,14, 0,89 + 0,18 und negativ für Moderna. Nach den Berechnungen variierte die Menge an Rest-DNA zwischen den analysierten Pfizer-Chargen erheblich [0,22–2,43 ng/Dosis für Spike, 0,25–7,26 ng/Dosis für *ori* und 0,25 bis 23,72 ng/Dosis für SV40-Promotor-Enhancer-*ori*], war jedoch in den Moderna-Chargen konsistenter [0,25–0,75 ng/Dosis für Spike und 0,01–0,34 ng/Dosis]. Während Pfizer eine wesentlich höhere Menge an Rest-DNA aufwies als Moderna, lagen nur die SV40-Promotor-Enhancer-*ori*-DNA aus den Chargen FM73S0 und FN7934 über der FDA-Richtlinie von 10 ng DNA/Dosis (Abbildung 2). Die Chargen FM7380 und FN7934 waren monovalente Purple-Top-Fläschchen von Pfizer mit einer PBS-Formulierung.

Gesamt-DNS, bestimmt durch Fluorometrie

Fluorometerbasierte Messungen (z. B. Qubit[®]) der Impfstoffe zeigten, dass die Moderna-Fläschchen durchweg eine viel größere Menge an Gesamt-DNA enthielten als die Pfizer-Fläschchen (Abbildung 3). Die im reinen Impfstoff (d. h. direkt aus den Fläschchen) nachgewiesene Gesamt-DNA betrug 621 + 282 ng/Dosis (Bereich: 262 bis

Tabelle 3. qPCR-Tests an allen Pfizer-BioNTech- und Moderna-Fläschchen, verdünnt im Verhältnis 1:10, mit Ergebnissen für SARS-CoV-2-Spike, *ori* und dem SV40-Promotor-Enhancer-ori.

		Spike			Plasmid Origin of Replication [ori]			SV40-Promotor-Enhancer-ori		
		Gesamtzahl der Dosis	Exemplare/ Cq	Gesamtzahl der Hersteller ng/Dosis	Exemplare/ Los-Nr. Cq	Cq	Gesamt ng/Dosis	Gesamt Kopien/ ng/Dosis	Gesamt ng/Dosis	
Pfizer-BioNTech	FD0810	20,17	0,43	3,69E+09	19,90	2,80	2,60E+ 10	20,76	0,43	2,92E + 09
Pfizer-BioNTech	FM7380	18,03	2,43	2,07E+ 10	18,57	3,92	3,64E+ 10	18,18	16,06	1,09E + 11
Pfizer-BioNTech	FN7934a	18,47	1,79	1,53E+ 10	18,77	3,43	3,18E+ 10	17,46	23,72	1,60E + 11
Pfizer-BioNTech	FN7934b	18,19	2,18	1,86E+ 10	18,44	4,27	3,96E+ 10	17,96	18,10	1,22E + 11
Pfizer-BioNTech	FX4343a	23,53	0,27	2,30E+09	24,71	0,32	2,94E+09	24,59	0,26	1,73E + 09
Pfizer-BioNTech	FX4343b	23,83	0,22	1,86E+09	24,87	0,28	2,64E+09	24,65	0,25	1,68E + 09
Pfizer-BioNTech	GK0932a	20,46	2,25	1,92E+ 10	21,01	3,81	3,54E+ 10	20,27	2,61	1,77E + 10
Pfizer-BioNTech	GK0932b	20,60	2,05	1,75E+ 10	21,22	3,32	3,08E+ 10	20,49	2,35	1,59E + 10
Pfizer-BioNTech	GK0932c	20,66	1,97	1,68E+ 10	21,21	3,33	3,09E+ 10	20,29	2,58	1,74E + 10
Pfizer-BioNTech	HD9867	21,24	0,99	8,46E+09	20,81	7,28	6,75E+ 10	20,12	2,84	1,92E + 10
Moderna	092D21A	22,35	0,66	5,64E + 09	27,88	0,04	4,16E + 08	Negativ		
Moderna	020E21Aa	23,66	0,35	3,02E + 09	29,47	0,02	1,87E + 08	Negativ		
Moderna	020E21Ab	24,52	0,50	4,24E + 09	29,99	0,09	8,26E + 08	Negativ		
Moderna	062H21Aa	22,52	0,78	6,69E + 09	29,21	0,02	2,23E + 08	Negativ		
Moderna	062H21Ab	22,76	0,66	5,64E + 09	29,37	0,02	2,00E + 08	Negativ		
Moderna	020J21A	23,21	0,48	4,12E + 09	30,10	0,01	1,23E + 08	Negativ		
Moderna	055K21A	22,94	0,58	4,98E + 09	29,58	0,02	1,74E + 08	Negativ		
Moderna	033M21Aa	23,04	0,54	4,65E + 09	29,46	0,02	1,88E + 08	Negativ		
Moderna	033M21Ab	22,81	0,64	5,44E + 09	29,38	0,02	1,99E + 08	Negativ		
Moderna	033M21Ac	23,59	0,37	3,18E + 09	29,87	0,02	1,43E + 08	Negativ		
Moderna	033M21Ad	23,26	0,47	3,98E + 09	29,39	0,02	1,97E + 08	Negativ		
Moderna	AS0467Da	23,20	0,49	4,17E + 09	25,24	0,34	3,20E + 09	Negativ		
Moderna	AS0467Db	24,16	0,25	2,14E + 09	26,08	0,20	1,82E + 09	Negativ		
Moderna	AS0467Dc	23,75	0,33	2,85E + 09	25,74	0,25	2,28E + 09	Negativ		
Moderna	AT0709Ba	23,08	0,35	2,99E + 09	29,30	0,02	2,09E + 08	Negativ		
Moderna	AT0709Bb	23,66	0,38	3,24E + 09	29,25	0,02	2,16E + 08	Negativ		
Moderna	AT0709Bc	23,63	0,36	3,09E + 09	29,34	0,02	2,04E + 08	Negativ		
Moderna	AT0709Bd	23,80	0,32	2,74E + 09	29,44	0,02	1,91E + 08	Negativ		
Moderna	020G23Aa	24,42	0,73	6,26E + 09	29,42	0,23	2,13E + 09	Negativ		
Moderna	020G23Ab	24,46	0,71	6,11E + 09	29,87	0,03	2,33E + 08	Negativ		
Moderna	020G23Ac	24,53	0,68	5,84E + 09	29,74	0,03	2,55E + 08	Negativ		
Moderna	025G23A	24,38	0,54	4,62E + 09	29,30	0,13	1,20E + 09	Negativ		

Die Berechnungen für Pfizer und Moderna basierten auf Erwachsenenendosen von 0,30 ml bzw. 0,50 ml. Moderna ist auch für Kinder im Alter von 6–12 Jahren mit einer Dosis von 0,25 ml indiziert, wodurch die resultierende Gesamtmenge an ng/Dosis halb so hoch ist wie die für Erwachsene. Die Gesamtmenge in ng/Dosis wurde an die Länge des Amplikons (105 bp *ori*, 114 bp *spike*) angepasst, das nur einen Bruchteil des 7.824 bp Pfizer- und 6.777 bp Moderna-Plasmids ausmacht. Kleinbuchstaben am Ende der Chargennummern kennzeichnen verschiedene Fläschchen derselben Charge. *efSV40-Promotor-Enhancer-ori*.

1.116 ng/Dosis) für Pfizer und 1.661 + 793 ng/Dosis (Bereich: 379 bis 3.430 ng/Dosis) für Moderna. Das Kochen der fluorometrischen Lösung, die den Impfstoff enthielt, führte zur Lyse der Lipidnanopartikel, wodurch sowohl Rest-DNA als auch modRNA freigesetzt wurden und die Menge der nachgewiesenen Gesamt-DNA stark anstieg, und zwar auf 1.696 + 987 rig/Dosis (Bereich: 590 bis 3.180 ng/Dosis) für Pfizer und 5.210 + 2.095 rig/Dosis (Bereich: 2.980 bis 9.700 ng/Dosis) für Moderna. Dieser Anstieg der Fluorometrie war auch auf eine Wechselwirkung zwischen der modRNA und den fluorometrischen Farbstoffen zurückzuführen [21]. Durch die Zugabe von RNase A wurde die modRNA schnell abgebaut und die Fluorometrie reduziert, die sich nach 1 Minute stabilisierte. Nach 10 Minuten **RNase A** betrug die in den Impfstofffläschchen nachgewiesene Gesamt-DNA 775 + 448 ng/Dosis (Bereich: 371 bis 1.548 ng/Dosis) für Pfizer und 2.821 + 1.244 ng/Dosis (Bereich: 1.130 bis 6.280 ng/Dosis) für Moderna. Diese hohe Gesamt-DNA-Menge in beiden Impfstoffen deutet darauf hin, dass ein hoher Anteil der DNA unterhalb des Größenbereichs der qPCR-Amplikons liegt (d. h. stark degradiert ist) und dass der verwendete Impfstoff von Moderna eine wesentlich höhere Menge an Plasmid-DNA enthielt.

Aufgrund der Methodenentwicklung und des Erwerbs der Impfstoffe zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Impfstoffe mehrmals mittels Fluorometrie getestet (Abbildung 4). Die **durchschnittliche** Varianz direkt aus der **Durchstechflasche** (vor dem Erhitzen) betrug 317 + 278 ng/Dosis (Bereich: 43–727 ng/Dosis) und 456 + 121 ng/Dosis (Bereich: 199–675 ng/Dosis) nach dem Erhitzen.

Das Siedeverhalten betrug 1.145 + 533 rig/Dosis (Bereich: 519–1.949 rig/Dosis) und 1.554 + 1.023 rig/Dosis (Bereich: 176–3.169 ng/Dosis) und nach der RNase-A-Behandlung 297 + 217 ng/Dosis (Bereich: 100–765 ng/Dosis) bzw. 1.065 + 624 ng/Dosis (Bereich: 113–2.365 ng/Dosis) für Pfizer und Moderna.

Wir haben die durch Qubit-Fluorometrie erhaltenen Rest-DNA-Werte gegen die durch qPCR erhaltenen Werte aufgetragen (Abbildung 5). Für das Produkt von Pfizer wiesen die Trendlinien für die Schätzungen von *ori* und *spike* beide eine positive Steigung auf. Die Grafik für das Produkt von Moderna unterscheidet sich von der für das Produkt von Pfizer und weist nur geringe Überschneidungen auf.

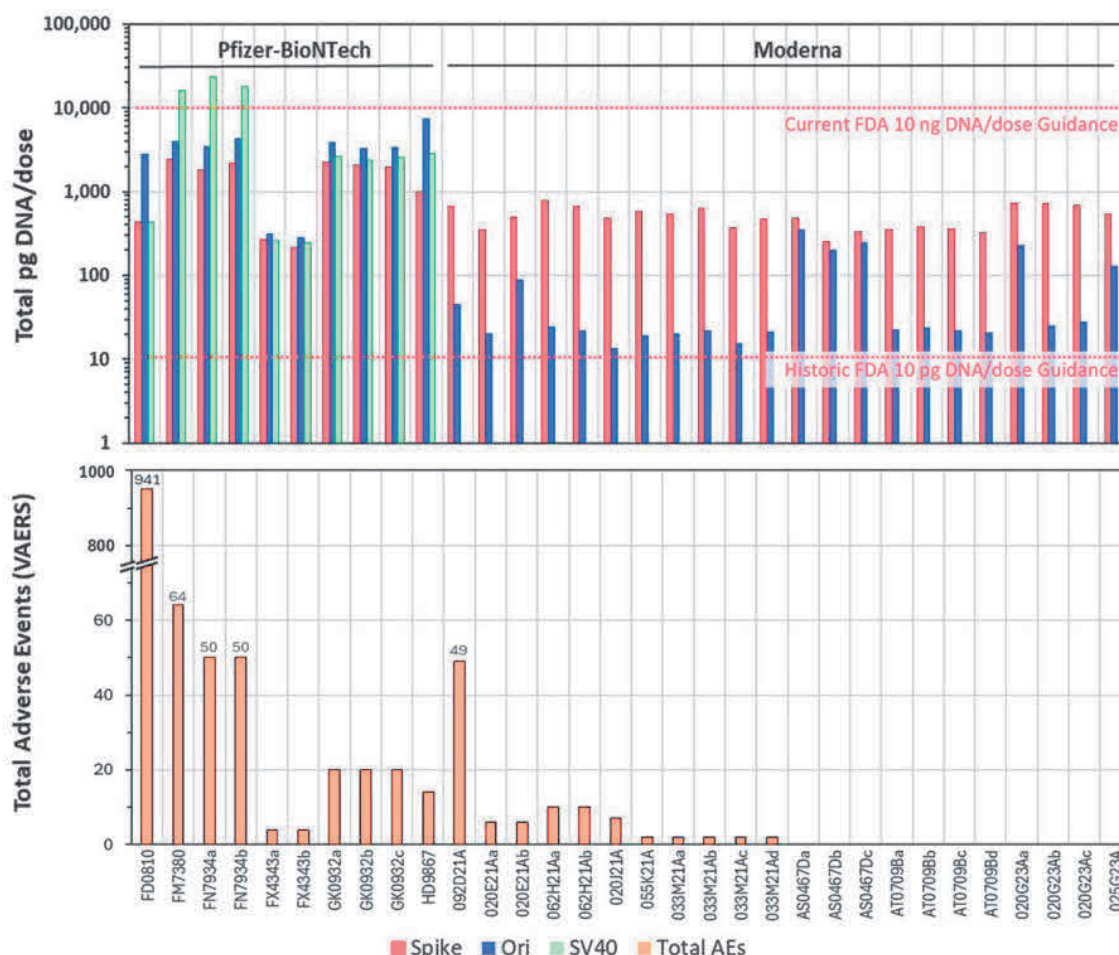


Abbildung 2. Vergleich des Rest-DNA-Gehalts von Spike (rot) ori (blau), SV40-Promotor-Enhancer-ori (grün), gemessen mittels qPCR, und der Gesamtzahl der an VAERS gemeldeten unerwünschten Ereignisse (orange). Die historischen (10 pg/Dosis) und aktuellen (10 ng/Dosis) regulatorischen Richtlinien der FDA und der WHO [12,20] für Rest-DNA sind durch eine rote gepunktete Linie dargestellt. Die Flaschchen sind nach dem Datum der Zulassung durch Health Canada sortiert, wie es im kanadischen nationalen Impfstoffkatalog [13] verzeichnet ist. Kleinbuchstaben am Ende der Chargennummern kennzeichnen verschiedene Flaschchen derselben Charge. Die Gesamtzahl der unerwünschten Ereignisse wurde pro Charge ermittelt und für jedes Flaschchen derselben Charge wiedergegeben.

der Werte auf beiden Achsen, mit deutlich flacheren Steigungen. Obwohl eine detaillierte Betrachtung der Moderna-Diagramme eine negative Steigung für die ori-Werte nahelegt, könnte diese Trendlinie durch drei Ausreißerwerte beeinflusst sein. Diese Werte wurden aus Flaschchen des bivalenten Impfstoffs Moderna BA.1-Wuhan gewonnen.

Mit Ausnahme der Moderna-Chargen AS0709D, AS0467D und 020G23A wurden VAERS-Meldungen für alle in dieser Studie untersuchten Chargen eingereicht (Tabelle 2 und Abbildung 2). Von den 16 untersuchten Chargen waren die Chargen mit der weltweit höchsten Anzahl von Meldungen an VAERS FD0810, FM7380, FN7934 und 092D21A mit 944, 64, 50 bzw. 49 Meldungen. Bei diesen Chargen meldeten 157 (17 %), 25 (39 %), 25 (50 %) bzw. 42 (86 %) der Personen eine SAE. Diese Prozentsätze liegen weit über der Obergrenze für den erwarteten Prozentsatz von SAEs in einem bestimmten VAERS-Datensatz gemäß dem VAERS-Datenverwendungsleitfaden [22]. Bemerkenswert ist auch, dass 1/6 (17 %) der Meldungen über SAEs im Zusammenhang mit der Charge 020E21A von Moderna Todesfälle betrafen.

In Bezug auf die kanadischen VAERS-Meldungen war derselbe Trend zu beobachten, wobei FD0810, FM7380, FN7934 und 092D21A jeweils 134, 27, 48 und 40 Meldungen aufwiesen. Bei diesen Chargen waren es 77 (57 %), 16

(59 %), 23 (48 %) und 38 (95 %) der Personen meldeten einen SAE. Diese Prozentsätze liegen weit über der Obergrenze für den erwarteten Prozentsatz von SAEs in einem bestimmten VAERS-Datensatz gemäß dem VAERS-Datenverwendungsleitfaden[22]. Im Fall der Moderna-Charge 092D21A handelte es sich bei fast allen Meldungen um SAEs. Der Prozentsatz der SAEs für alle Chargen aus Kanada zusammen ist mit 58 % sehr hoch.

Die Charge FD0180 ist die einzige Charge in dieser Studie, die hauptsächlich in den Vereinigten Staaten vertrieben und verabreicht wurde. Von den insgesamt gemeldeten Fällen für die Charge FD0810 ($n = 944$) wurden 682 (72 %) in verschiedenen Bundesstaaten gemeldet

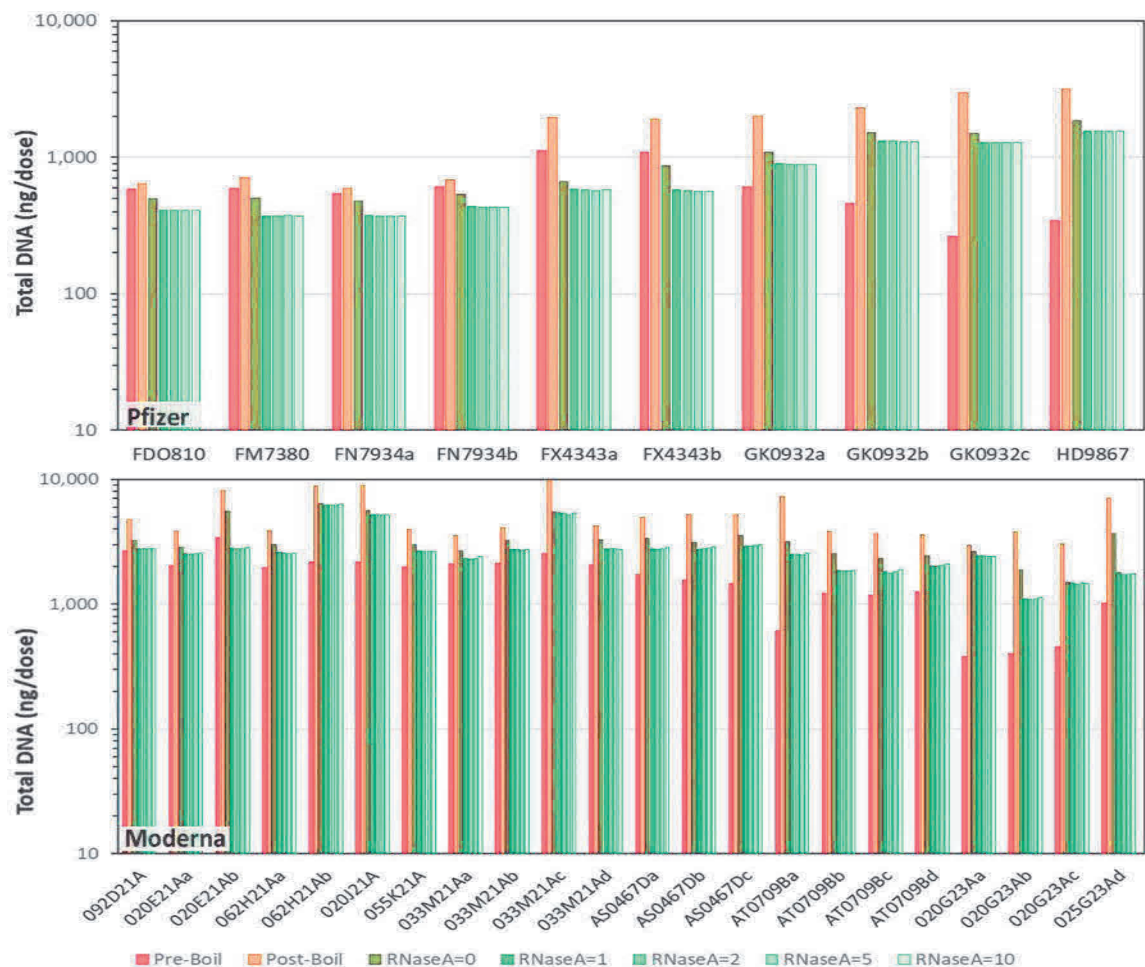


Abbildung 3. Die Gesamt-DNA wurde mittels Qubit-Fluorometrie direkt aus der Ampulle (vor dem Kochen), nach einem Kochschritt bei 95 °C (nach dem Kochen) und zu 5 verschiedenen Zeitpunkten mit RNase-A-Verdauung gemessen.

in den USA, genauer gesagt wurden 546 (58 %) allein in Colorado gemeldet ([Ergänzungstabelle 3](#)). Von den nicht in den USA ansässigen (ausländischen) Chargen, die VAERS für diese Charge gemeldet wurden, wurden 83 % in Kanada gemeldet. 84 % aller ausländischen Meldungen (nicht in den USA ansässig) wurden in Kanada gemeldet, was darauf hindeutet, dass diese Flaschen hauptsächlich in Kanada vertrieben und verabreicht wurden.

Fragmentlängenanalyse

Das von McKernan et al. [S] beschriebene monovalente Kinderimpfstoff von Pfizer (Lot FL8095) wurde mit Oxford Nanopore (ONT) sequenziert, um die Leselängenverteilungen nach dem Mapping der Lesungen auf die Referenzsequenz des Plasmids in NCBI zu bewerten ([Abbildung 6](#)). Die längste in 8fi5 Lesungen festgestellte Lesung betrug

3,5 kb lang, wobei das Read auf den größten Teil des Plasmid-Backbones gemappt wurde ([Abbildung 7](#))

Die Nukleaseempfindlichkeit des Pfizer-Impfstoffs wurde mit DNase I-XT bewertet. Diese DNA-Nuklease ist für IVT-Reaktionen optimiert, die reich an RNA-DNA-Hybriden sind. Diese Behandlung zeigte einen AI-Cq-Offset, während eine in LNPs versetzte Nackte-DNA-Kontrolle unter denselben Bedingungen von einem Cq-Wert von 15 auf einen nicht nachweisbaren Wert reduziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die in den Impfstoffen vorhandene DNA durch die Einkapselung in den LNPs geschützt ist ([Abbildungen 6 und 9](#))

Diskussion

In allen 32 untersuchten Impfstoffampullen wurde Rest-DNA nachgewiesen. Mehrere Ampullen aus denselben Chargen ergaben für alle Zielmoleküle sehr ähnliche Werte, was die Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Konsistenz des Assays innerhalb

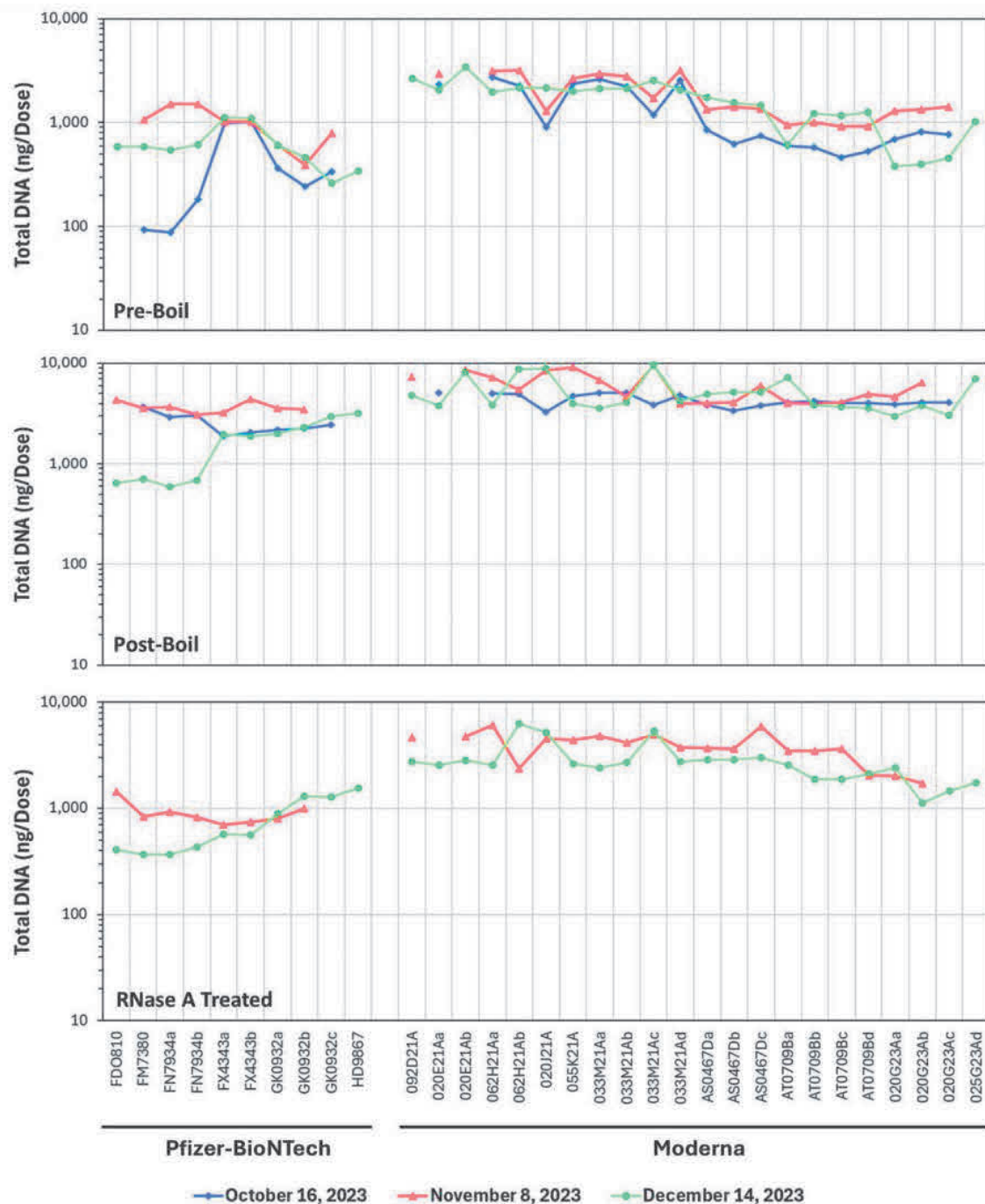


Abbildung 4. Die Qubit-Messungen wurden nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus wiederholt, um die Abweichungen zu verstehen, die beim Transport gefrorener Fläschchen von Labor zu Labor auftreten können. Die Qubit-Messungen wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Oktober, November und Dezember 2023) direkt aus dem Fläschchen (vor dem Kochen), nach einem Kochschritt bei 95 °C (nach dem Kochen) und zu drei Zeitpunkten nach der RNase-A-Verdauung durchgeführt.

Die Daten zu den in Kanada vertriebenen Impfstofffläschchen stimmen mit mehreren nicht begutachteten und begutachteten Berichten über DNA-Kontaminationen in modRNA-Impfstoffen überein (McKernan, Buckhaults, König, Raoult, Kämmerer, Wang) [8,23—26].

Moderna wies die niedrigste DNA-Konzentration mittels qPCR auf, jedoch die höchste Konzentration mit Qubit. Die Moderna-Fläschchen wiesen die konsistentesten DNA-Werte zwischen den Fläschchen auf, was auf einen robusteren und standardisierten Herstellungsprozess hindeutet. In jedem Fläschchen des Moderna-Produkts, mit Ausnahme der Charge AS0467D, wies *ori* niedrigere Belastungen (Ct > 6) als Spike auf, was auf eine effektivere Entfernung der Vektor-DNA hindeutet.

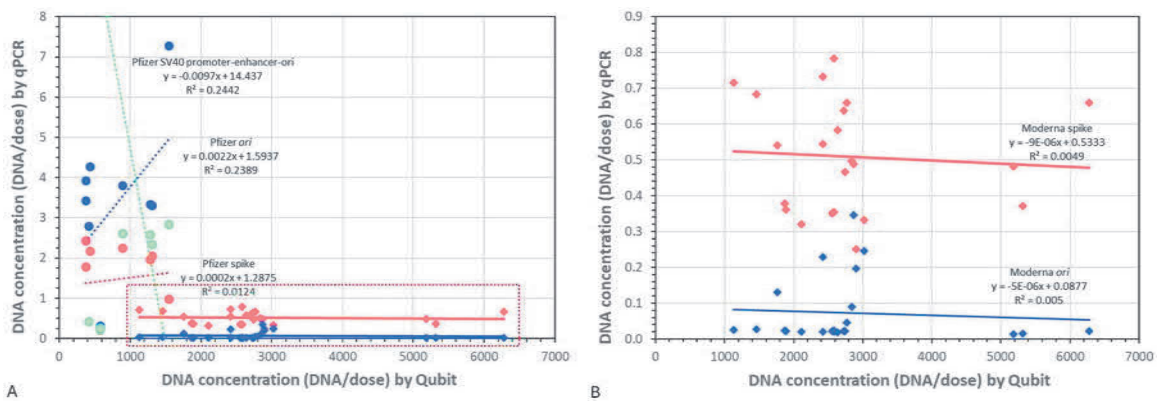


Abbildung 5. Grafischer Vergleich der Rest-DNA-Konzentration für Spike (rot), *ori* (blau) und SV40-Promotor-Enhancer-ori (grün), bestimmt durch qPCR, und der gesamten Rest-DNA-Konzentration in einzelnen Fläschchen, bestimmt durch Qubit. In Panel a sind sowohl die Daten von Pfizer als auch die von Moderna auf derselben Skala dargestellt. Die Y-Achse wurde angepasst, um alle Proben außer den drei SV40-Promotor-Enhancer-ori-Ergebnissen anzuzeigen. Die Daten von Moderna sind in einem roten Kasten eingezeichnet und werden in Panel B separat mit einer vergrößerten Skala angezeigt, um Details darzustellen.

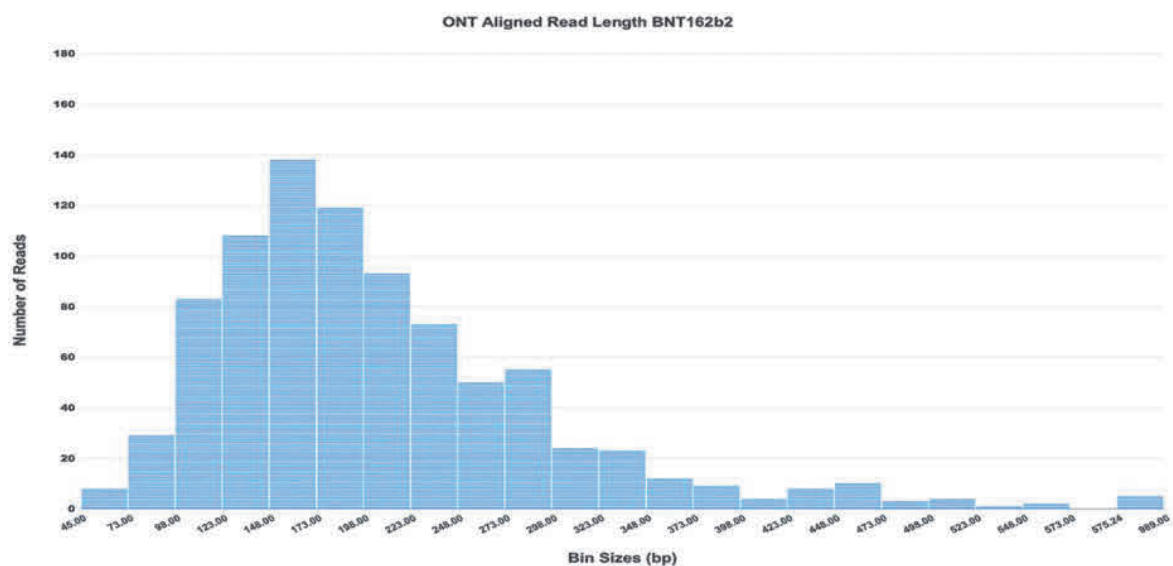


Abbildung 6. Oxford Nanopore (ONT)-Leselängenverteilungen aus 865 Lesungen, die auf die Vektorsequenz (NCBI OR134577.1) gemappt wurden. Mittelwert = 214 bp. Maximalwert = 3,5 kb.

Möglicherweise kann homolog modifizierte RNA die Verdauung der Template-DNA durch Hybridisierung verhindern [4]. Bemerkenswert ist, dass AS0467D einen bivalenten BA.1-Impfstoff darstellt, der aus zwei separaten LNPs mit unterschiedlicher Reinheit der mRNA besteht, die im Endprodukt miteinander vermischt wurden [27]. Da DNase I durch RNA-DNA-Hybride gehemmt wird, können die verschiedenen modRNA-Konstrukte im Vergleich zu anderen Moderna-Impfstoffen unterschiedliche Sekundärstrukturen oder Hybridisierungspotenziale mit DNA aufweisen und die DNase-I-Aktivität verändern. Dieser extreme Unterschied in den genetischen Zielstrukturen Spike und *ori* deutet auf eine Herstellungsabweichung hin, die nicht existieren sollte, und unterstreicht, wie wichtig es ist, dass die Regulierungsbehörden sich nicht auf einen einzigen PCR-Test verlassen, um die Belastung des endgültigen Arzneimittels mit residualer Plasmid-DNA zu bestimmen.

Die Fläschchen mit der höchsten DNA-Konzentration stammten aus zwei Chargen monovalenter Pfizer-Fläschchen mit violettem Verschluss und einer PBS-Formulierung und müssen vor der Verabreichung verdünnt werden. Am 29. Oktober 2021 genehmigte die US-amerikanische FDA eine Änderung der Formulierung zu einem Tris/Saccharose-Puffer: den monovalenten Impfstoff für Erwachsene mit grauem Verschluss und einen Impfstoff mit orangefarbenem Verschluss für Kinder im Alter von 6 bis 11 Jahren. Diese Änderung wurde vorgenommen, um die Stabilität zu erhöhen, die Lagerungsanforderungen zu vereinfachen und eine gebrauchsfertige Formulierung bereitzustellen [28,29]. Diese Chargen von Pfizer mit violettem Verschluss waren auch mit einigen der höchsten Zahlen von unerwünschten Ereignissen (AEs) und schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (SAEs) verbunden, die in VAERS unter allen getesteten Chargen gemeldet wurden. Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt, aber

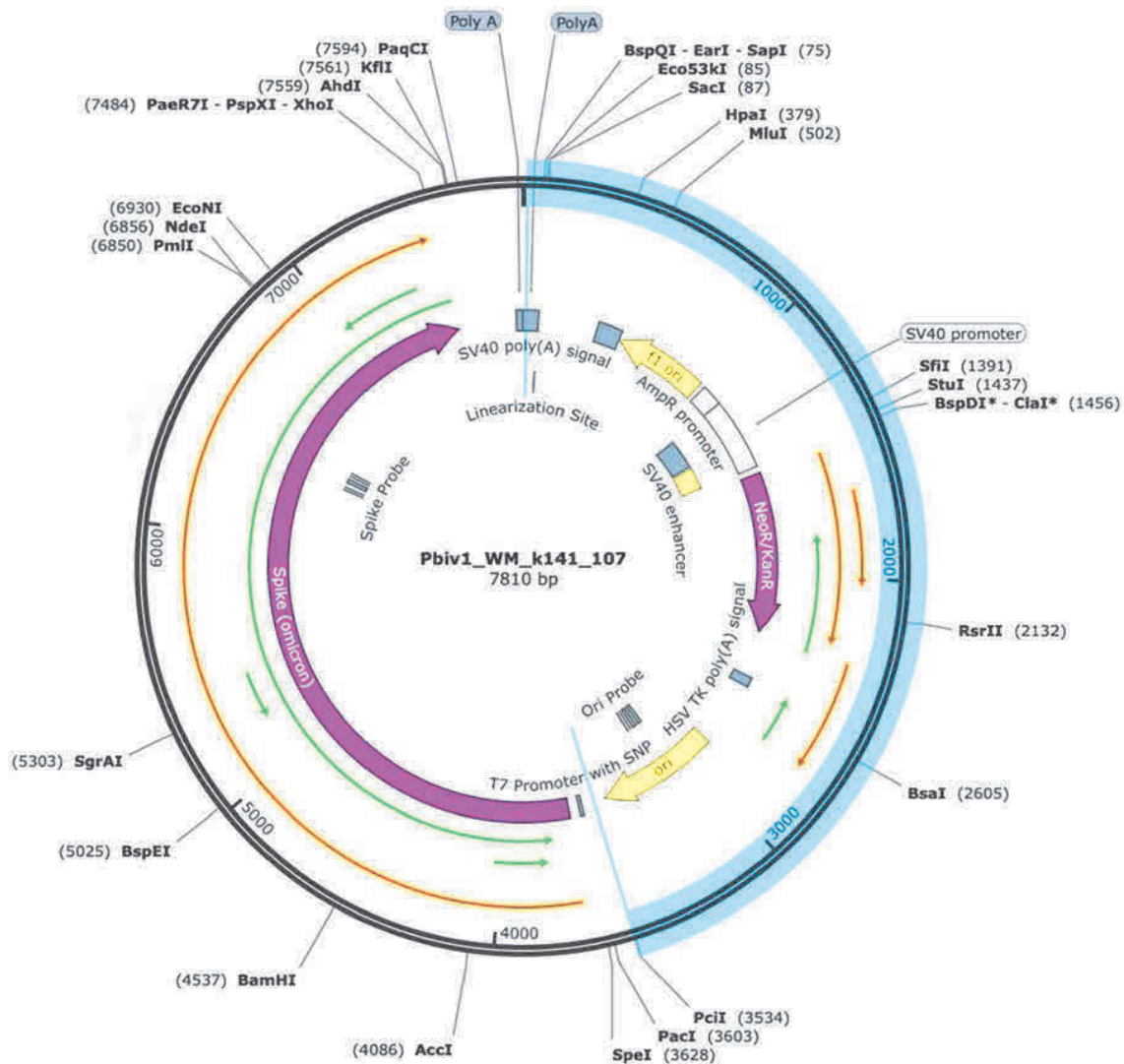


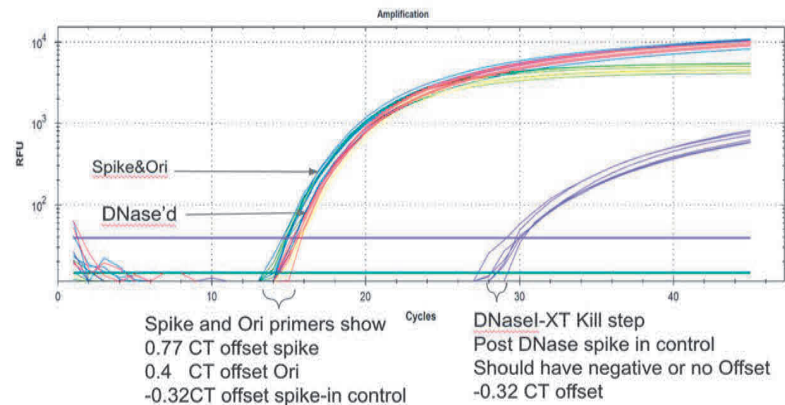
Abbildung 7. Das längste Oxford Nanopore (ONT)-Read passt zu dem blau dargestellten Vektorbereich. Die Positionen von *ori* und Spike-Primer sind auf dem innersten Kreis vermerkt. Offene Leserahmen (ORFs) sind mit goldenen und grünen Pfeilen gekennzeichnet. Kanamycin-Resistenzgene wurden in einer sehr oberflächlichen Sequenzierungsuntersuchung des Impfstoffs nachgewiesen.

Die Verwendung von PBS-Puffer führte zu sichtbaren Partikeln im endgültigen Arzneimittel, die mit Toxizitäten wie Mikroembolien und Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht werden können [30]. Darüber hinaus wurden Lipidverunreinigungen aufgrund von Lipidhydrolyse und Aldehydbildung beobachtet, die zu Lipidaddukten führten, die toxikologische Auswirkungen haben können. Die Verwendung eines Tris-Puffers wirkt als „Aldehyd-Senke“ und reduziert LNP-Verunreinigungen, wie von Wissenschaftlern von Moderna festgestellt wurde [31]. Addukte führen zum Verlust der modRNA-Funktion und können die höhere Struktur der mRNA beeinträchtigen, wobei Veränderungen der mRNA-Kinetik oder andere unbekannte Faktoren dafür verantwortlich sein können [32].

Die Variabilität der Rest-DNA innerhalb und zwischen den Chargen zeigt sich auch nach drei Jahren Produktionserfahrung weiterhin. Diese anhaltende Variabilität, insbesondere bei den Pfizer-Fläschchen, ist möglicherweise grundlegender als das Erreichen eines niedrigen Verunreinigungsgrades, da sie auf einen inkonsistenten Herstellungsprozess hinweist und wahrscheinlich auch bei anderen prozess- und produktbezogenen Verunreinigungen auftritt. Die Reinheit und Robustheit der DNase kann je nach Anbieter oder Charge des DNase-Enzyms variieren [33]. Geringfügige Unterschiede im IVT-Prozess oder andere Faktoren können ebenfalls eine Rolle bei der Variabilität der Rest-DNA spielen. Der DNase-Verdauungsschritt des Pfizer/BioNTech-Impfstoffs unterlag zum Zeitpunkt der Zulassung einer Empfehlung der EMA, die Robustheit der Methode zu verbessern [34]. Eine in Deutschland erhaltene FOIA zeigte jedoch anhaltende Probleme mit der Konsistenz der Rest-DNA-Werte innerhalb und zwischen den Produktionsstätten von Pfizer/BioNTech, der Verwendung interner „Standards“ und einem Mangel an

Significant fractions of the LNPs are DNaseI protected

This implies 10-30% of the nucleic acid isn't packaged in an LNP



1 CT offset in DNase treatment = half of the nucleic acid being unpackaged.

Abbildung 8. Die Behandlung des Pfizer-Impfstoffs mit DNase I-XT zeigt die Nuklease-Resistenz der DNA in den Impfstoffen.

Grim Reefer method eliminates all DNA at 37°C in 30 minutes.
2ul in qPCR of a 1:10 dilution of GR control = 15CT
LNPs protect against this activity.

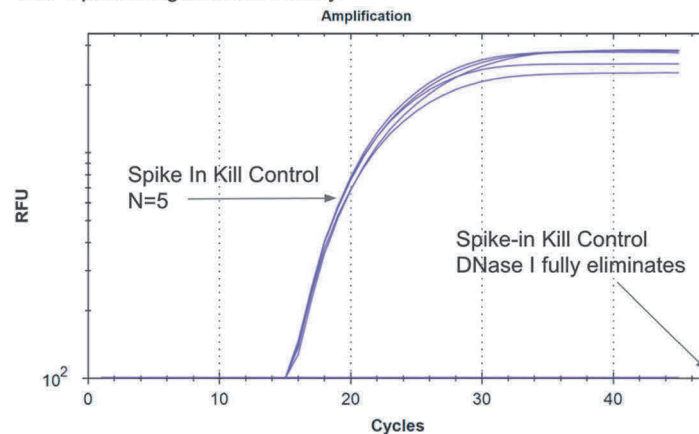


Abbildung 9. Die DNase I-XT-Positivkontrolle zeigt, dass der Verdauungstest alle zugesetzten DNA-Fragmente unter denselben Bedingungen eliminiert, die zur Bewertung der Nukleaseempfindlichkeit des Impfstoffs verwendet werden.

Korrelation zwischen der Aktivität des DNase-Enzyms und der Rest-DNA volle 15 Monate nach der Zulassung [35]. Dies zeigt, dass die fortgesetzten Bemühungen zur Entfernung von DNA-Fragmenten nur begrenzt erfolgreich waren.

Unsere explorative Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Rest-DNA-Gehalt und den an VAERS gemeldeten SAEs ist vorläufig und hinsichtlich der Stichprobengröße begrenzt, muss jedoch durch die Untersuchung vieler weiterer Chargen und Fläschchen bestätigt werden. Diese vorläufige Analyse scheint eine Korrelation zwischen den für jede Charge gemeldeten unerwünschten Ereignissen und den DNA-Konzentrationen zu zeigen, insbesondere im Zusammenhang mit *dem ori*. Um unsere Ergebnisse zu bestätigen und festzustellen, ob eine Korrelation besteht, sind weitere Tests von Fläschchen aus anderen unabhängigen Labors erforderlich, einschließlich einer prospektiven Langzeitüberwachung. Bei der Untersuchung mittels qPCR wies die Charge FD0810 von Pfizer, die älteste untersuchte Charge von Pfizer, niedrigere Konzentrationen an Spike- und SV40-Promotor-Enhancer-ori auf, wobei die ori-DNA-Konzentrationen mit denen anderer monovalenter (violett verschlossener) Fläschchen für Erwachsene vergleichbar waren, jedoch war sie mit der höchsten Gesamtzahl an gemeldeten unerwünschten Ereignissen in VAERS verbunden. Wir haben nur eine einzige Ampulle getestet, die möglicherweise nicht repräsentativ für die gesamte Charge ist. Ohne Kenntnis der Chargengrößen oder der Anzahl der Personen, die Dosen aus jeder Charge erhalten haben, ist es schwierig, SAEs mit bestimmten Chargen in Verbindung zu bringen, wenn nur Daten von 16 Chargen vorliegen. Wenn eine Charge, die mit hohen SAEs in Verbindung gebracht wird, einer deutlich größeren Anzahl von Personen verabreicht wurde, könnte dies das Verhältnis von SAEs pro Person verzerren und die Bemühungen um die Feststellung einer eindeutigen Korrelation weiter erschweren. Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass über

Plasmid-DNA-Spiegel, Probleme im Zusammenhang mit den LNPs, Toxizität, Autoimmunität und/oder abnorme Immunreaktionen aufgrund von Ribosomen-Frameshifting können zu unerwünschten Ereignissen (UE) beitragen, darunter komplementaktivierungsbedingte Pseudoallergien (CARPA), die kurz nach der Impfung auftreten können [36–41]. Die zufällige Zusammensetzung der DNA-Fragmente in diesen Fläschchen erschwert eine direkte Korrelation zwischen den Plasmid-DNA-Konzentrationen und bestimmten Nebenwirkungen, da die genotoxischen Wirkungen der einzelnen Fragmente je nach ihrer Sequenz und ihrer Wechselwirkung mit dem Wirtsgenom unvorhersehbar variieren. Diese Variabilität macht es unmöglich, Nebenwirkungen allein auf der Grundlage der DNA-Menge genau abzuschätzen. Höhere DNA-Konzentrationen könnten auch zu langfristigen Gesundheitsrisiken beitragen, wie z. B. Krebs durch genomische Integrationsereignisse. VAERS erfasst in erster Linie kurzfristige unerwünschte Ereignisse und könnte langfristige Auswirkungen unterbewerten. Weitere Tests der Ampullen sind erforderlich, um **anhand** der VAERS-Daten eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erstellen. Eine langfristige prospektive Überwachung ist unerlässlich, um die Auswirkungen genetischer Impfstoffe zu bewerten, insbesondere da das Spike-Protein bis zu 704 Tage nach der Impfung nachgewiesen wurde [42].

Unterschiedliche Zusammenhänge wurden für Moderna-Chargen bei den qPCR-Daten sowie für Diagramme beobachtet, die auf der mittels Fluorometrie geschätzten Rest-DNA sowohl für Pfizer- als auch für Moderna-Chargen basieren. Diese Beobachtungen spiegeln möglicherweise Unterschiede zwischen den beiden Produkten wider, wie z. B. Dosierungsvolumen, DNA-Menge, Größenverteilung der DNA-Fragmente, Zusammensetzung und Sequenz des Plasmidvektors sowie Zusammensetzung der Lipid-Nanopartikel. Andere Unterschiede, sowohl zwischen den beiden Produkten als auch zwischen verschiedenen Chargen jedes Produkts, können ebenfalls zu unseren Beobachtungen beitragen. Zu diesen Unterschieden gehören Schwankungen im Gehalt an Verunreinigungen oder Fremdstoffen. Eine wichtige Quelle für Verunreinigungen ist fragmentierte mRNA, für die mehrere toxikologische Mechanismen vorgeschlagen wurden, wie beispielsweise ihre Auswirkungen auf miRNA-Prozesse [43]. dsRNA ist eine weitere Art von Verunreinigung, die sekundär zum T7-RNA-Polymerase-Promotor auftritt. dsRNA kann proinflammatorische Zytokine induzieren [44] und trägt vermutlich zu immuninflammatorischen Reaktionen wie Myokarditis bei [45]. Lipopolysaccharide in Zellen aus Endotoxinen können sowohl an die S1- als auch an die S2-Untereinheiten des Spike-Proteins binden, was zu verstärkten Entzündungsreaktionen führen kann [46].

Eine breitere Stichprobe wird wahrscheinlich detailliertere Informationen zu Ereignistypen wie Todesfällen liefern und Vergleiche mit anderen Arbeiten ermöglichen, beispielsweise mit der Studie von Schmeling et al., die einen Zusammenhang zwischen unerwünschten Ereignissen und verschiedenen Impfstoffchargennummern feststellten [47]. Keine der derzeit untersuchten Impfstoffchargen war in **der Studie** von Schmeling enthalten, und es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zu verstehen, ob und wie diese DNA-Kontamination mit unerwünschten Ereignissen zusammenhängt.

Während der SV40-Enhancer die nukleäre Zielfindung erleichtert [16,48], muss die genomische Integration von DNA-Fragmenten für die COVID-19-modRNA-Produkte noch nachgewiesen werden [49]. Es ist jedoch bekannt, dass DNA-Kontamination eine ungerechtfertigte angeborene Immunantwort auslösen und insbesondere bei Fragmenten mit hohem GC-Gehalt prothrombotisch wirken kann [50]. dsDNA kann auch ein bedeutender Faktor bei ischämischen **Erkrankungen** wie Schlaganfällen sein [51]. Es ist auch bekannt, dass cytosolische DNA cGAS-STING auslöst, und eine chronische Stimulation dieses Signalwegs gilt als onkogen [52]. Das US-Patent f10.898.574 von Moderna betont ebenfalls das Risiko einer Insertionsmutagenese durch Rest-DNA in ihren Impfstoffen. Obwohl offenbar ein Zusammenhang zwischen hoher DNA-Kontamination und SAEs besteht, sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Stichprobengröße zu vergrößern und mögliche Wirkmechanismen aufzuklären.

Es ist wichtig zu betonen, dass qPCR Moleküle, die kleiner als die Größe des Amplikons (105–114 bp) sind, nicht quantifizieren kann und daher die Gesamt-DNA in jedem Impfstoff unterschätzt. Das Versagen von qPCR bei der vollständigen Quantifizierung von Rest-DNA in mRNA-Impfstoffen wird im Moderna-Patent Nr. US 10,077,439 beschrieben. Es ist wichtig zu betonen, dass die Verwendung eines einzigen Amplikons für qPCR bei einigen Impfstoffen zu 100-fach unterschiedlichen Schätzungen führen kann. Die Spike-DNA in einigen Moderna-Impfstoffen ist 100-mal häufiger (-6CTs) als die Nicht-Spike-DNA, was auf eine DNAse-I-Hemmung mit komplementärer RNA hindeutet [4].

Dies erklärt die großen Unterschiede, die wir bei den mit qPCR geschätzten Rest-DNA-Konzentrationen im Vergleich zur Qubit-Fluorometrie beobachtet haben, insbesondere zwischen den Produkten von Pfizer und Moderna. Die deutlich höheren Werte für das Produkt von Moderna könnten teilweise auf das größere Dosierungsvolumen zurückzuführen sein, deuten aber auch darauf hin, dass es einen höheren Anteil an kleinen fragmentierten Rest-DNA-Stücken enthält als das Produkt von Pfizer. Dies steht im Einklang mit einem gründlicheren Nuklease-Verdauungsschritt. Dies zeigt, dass die von der FDA empfohlenen Richtlinien für Rest-DNA in hohem Maße von den zur Quantifizierung der DNA verwendeten Methoden abhängen. Darüber hinaus müssen die Robustheit und Zuverlässigkeit des PCR-Assays angesichts der Wirkung von N-1-Methylpseudouridin und des Vorhandenseins von RNA-DNA-Hybriden nachgewiesen werden.

König et al. stellten ebenfalls eine hohe DNA-Kontamination unter Verwendung der Qubit-Fluorometrie fest [24]. Allerdings wurde in dieser Studie keine RNase-A-Behandlung durchgeführt, sodass die vorhandene DNA-Menge aufgrund der Wechselwirkung von DNA-spezifischen Farbstoffen, die sich mit RNA interkalieren, wahrscheinlich überschätzt wurde. Während die Spezifität dieser DNA-spezifischen fluorometrischen Farbstoffe gut dokumentiert ist, ist wenig über die Auswirkungen auf ihre Spezifität bekannt, wenn sie mit Proben verwendet werden, die hohe Konzentrationen an NI-Methyl-Pseudouridin-modRNA oder GC-reicher RNA aufweisen, die zu Sekundärstrukturen und der Bildung kleiner Furchen neigen. Unsere Qubit-Daten zeigten, dass es zu Abweichungen zwischen den Probenahme- und Gefrier-Auftau-Zyklen kommt. Diese Abweichungen könnten auf die Ungenauigkeit der fluorometrischen Assays, die Gefrier-Auftau-Zyklen oder auf Probenahmefehler zurückzuführen sein, insbesondere da durch Vortexen und mehrfaches Pipettieren Luftblasen entstehen können, die die Größe und Sedimentation der LNP verändern [53]. Unsere RNase-A-Daten zeigen jedoch, dass die Qubit-Fluorometrie mit der Entfernung der Impfstoff-modRNA gekoppelt werden muss, um die Rest-DNA bei gleichzeitig hoher RNA-Konzentration korrekt zu quantifizieren.

Diese Fluorometrie-Bewertung ist von besonderem Interesse, da Fluorometrie und UV-Spektralphotometrie zur Quantifizierung der RNA in den COVID-19-Impfstoffen von Pfizer verwendet wurden, wie in den EMA-Dokumenten [7] beschrieben, während qPCR zur Quantifizierung der DNA verwendet wurde. Diese selektive Verwendung verschiedener Methoden zur Quantifizierung des RNA/DNA-Verhältnisses kann zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen für die bei der EMA geltenden Richtlinien zur Verhältnissberechnung führen. Dieser Vergleich zur qPCR-Quantifizierung erhöhte fluorometrische Quantifizierung steht im Einklang mit den ONT-Leselängenverteilungen, die ebenfalls darauf hindeuten, dass ein Teil der DNA kleiner als die Amplifikationsgröße sein könnte. Während der ONT-Sequencer Moleküle mit einer Länge von weniger als 100 bp erkennt, verwenden die Methoden zur Bibliotheks-konstruktion für ONT einen 0,7-fachen Ampure-DNA-Reinigungsschritt, der Moleküle mit einer Größe von weniger als 150 bp drastisch aus der Reinigung aussortiert. Infolgedessen sind die Leselängenverteilungen für ONT-Reads in Richtung Fragmente > 150 bp verzerrt und spiegeln die möglicherweise vorhandenen kleineren Fragmente nicht perfekt wider, sowohl durch ONT als auch durch qPCR zu niedrig angesetzt.

In ähnlicher Weise zeigen Georgiou et al., dass fluorometrische Farbstoffe nach einer DNase-I-Behandlung ein um 70 % schwächeres Signal erzeugen, da die Farbstoffe für längere Moleküle derselben DNA-Masse ein nichtlineares Signal liefern [54]. Diese Daten wurden nicht um diesen Effekt bereinigt und spiegeln wahrscheinlich eine Unterschätzung der tatsächlichen Menge im fluorometrischen Assay wider. Diese kleineren DNA-Moleküle gehen auch häufig bei häufig verwendeten DNA-Isolierungsverfahren wie der Phenol/Chloroform-Reinigung oder der Ethanol-Präzipitation verloren. Kaiser et al. haben in ihren Impfstoffen viel geringere DNA-Mengen gemessen, aber ihre Methoden haben den Verlust kurzer DNA-Fragmente nach mehrfacher Ethanol-Präzipitation nicht berücksichtigt [55]. Da DNA-Fragmente < 100 bp bei Reinigungsverfahren, einschließlich Ethanol-Präzipitation, verloren gehen können, ist es am besten, die Gesamt-DNA direkt am endgültigen Arzneimittelprodukt ohne Reinigungsschritte zu quantifizieren.

Derzeit empfiehlt die US-amerikanische FDA den Herstellern von Virusimpfstoffen, die Menge an Rest-DNA im Endprodukt für parenterale Impfungen auf unter 10 ng/Dosis und die Größe der DNA auf unter die Größe eines funktionellen Gens oder -200 Basenpaare zu begrenzen [12]. Dies steht auch im Einklang mit den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [20,56] und gilt für „nackte“ DNA, d. h. DNA, die nicht mit Proteinen, Lipiden oder anderen Molekülen zum Schutz oder zur Verpackung assoziiert ist. Frühere Rest-DNA-Werte wurden 1985 von der FDA auf 10 pg/Dosis festgelegt. Eine WHO-Studiengruppe kam 1986 zu dem Schluss, dass das Risiko bis zu 100 pg/Dosis vernachlässigbar ist, und 1996 erhöhte die WHO die Werte weiter auf bis zu 10 ng pro Dosis [20]. Da die Rest-DNA jedoch in den LNPs eingekapselt ist und effizient direkt in die Zellen transfiziert wird, müssen die DNA-Richtlinien für modRNA-Impfstoffe neu bewertet werden.

Die Richtlinien der FDA und der WHO für zulässige DNA in Impfstoffen basieren auf einer Veröffentlichung der FDA-Wissenschaftler Sheng-Fowler et al. [57]. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Kontamination mit genomischer DNA der Wirtszelle und stellte fest, dass die Anzahl der Moleküle zunimmt, wenn kleine virale Vektoren die kontaminierenden Spezies sind. Bei diesen Kontaminanten mit hoher Kopienzahl pro Nanogramm werden Femtogramm bis Attogramm DNA als Äquivalent zu Nanogramm genomischer DNA des Zellsubstrats angesehen. Angesichts der kurzen Fragmentgröße in den modRNA-Impfstoffen kann die Anzahl der Moleküle in jeder Dosis über 100 Milliarden Moleküle erreichen. Die Rest-DNA in diesen Impfstoffen weist eine hohe Kopienzahl auf und ist reich an Promotoren, SV40-Replikationsursprüngen aus Säugetieren, ORFs und nukleären Zielsequenzen. Die Richtlinien der FDA und der WHO berücksichtigten nicht die Verpackung von DNA in Lipid-Nanopartikeln, was wahrscheinlich zu einer längeren Persistenz der DNA sowie zu einer erhöhten Transfektionseffizienz führt. Darüber hinaus berücksichtigten die Richtlinien nicht

Kumulative Dosierung mit LNP-basierter modRNA. Daten haben gezeigt, dass LNPs in der Lage sind, den Eintritt von RNA oder DNA in Zellen um das 10- bis 100-fache zu erhöhen [55-60].

In Japan erhielten 13 % der Bevölkerung sieben Dosen COVID-19-Impfstoffe, wobei das Intervall zwischen den Auffrischungsimpfungen manchmal nur zwei Monate betrug [61]. Darüber hinaus wurden die Risiken einer kumulativen Dosierung durch Impfstoffe, die gegen andere Infektionen gerichtet sind, aber dieselbe Plasmid- und LNP-basierte modRNA-Plattform verwenden, bei der Festlegung der Richtlinien für Rest-DNA nicht berücksichtigt.

Die FDA-Richtlinien sehen außerdem vor, dass nur DNA-Fragmente von 200 bp oder mehr quantifiziert werden dürfen, unter anderem weil Fragmente, die kleiner sind, nicht als fähig angesehen wurden, ein funktionsfähiges Gen zu produzieren. Klinnian et al. weisen jedoch darauf hin, dass bereits Fragmente von nur 7 bp Integrationsrisiken bergen können [62]. Darüber hinaus könnte in den Richtlinien auch berücksichtigt worden sein, dass Fragmente nackter DNA, die kürzer als 200 bp sind, durch die Nukleaseaktivität des Wirts schneller hydrolysiert werden als größere Moleküle [63]. Diese beschleunigte Zerstörung kann bei den Impfstoffen nicht angenommen werden, da die DNA durch die LNPs eingekapselt und geschützt ist.

Klinman et al. stellen außerdem fest, dass „bei der Bewertung des potenziellen Schadens durch Plasmidintegration zu beachten ist, dass das Risiko der Einführung von Plasmiden mit starken regulatorischen Regionen in das Wirtsgenom weitaus größer ist als das von OSSOC mit zufälligen Punktmutationen bewertete Risiko.“

Schließlich berücksichtigen die Richtlinien nicht, ob die Rest-DNA nukleäre Zielsequenzen, Replikationsursprünge von Säugetieren und Promotoren von Säugetieren enthält, die im Pfizer-Impfstoff vorhanden sind [49]. Vacik et al. zeigten, dass der im Pfizer-Vektor vorhandene SV40-Enhancer eine potente nukleäre Zielsequenz ist, die vielversprechend für die Gentherapie ist [46]. Senigl et al. zeigen, dass der SV40-Enhancer ein somatisches Hypermutabilitätselement mit tumorigenem Potenzial ist [64]. Schließlich zeigen Drayman et al., dass der SV40-Enhancer im Pfizer-Impfstoff an P53 bindet, was uns daran erinnert, dass die einfachen Nanogramm-Grenzwerte für Rest-DNA auf der Grundlage der Funktionalität und Replikationsfähigkeit dieser DNA überdacht werden müssen [65].

Schlussfolgerung

Diese Daten belegen das Vorhandensein von Milliarden bis Hunderten von Milliarden DNA-Molekülen pro Dosis in den getesteten modRNA COVID-19-Produkten. Unter Verwendung von Fluorometrie in Verbindung mit RNase-A-Verdauung überschritten alle getesteten Produkte die von der FDA und der WHO festgelegten Richtlinien für Rest-DNA von 10 ng/Dosis um das 36- bis 627-fache. qPCR-Tests zeigten, dass alle Moderna-Fläschchen innerhalb der gesetzlichen Grenzwerte lagen und dass 3 Pfizer-Fläschchen den gesetzlichen Grenzwert für den SV40-Promotor-Enhancer-ori überschritten und eine viel größere Variabilität innerhalb und zwischen den Chargen aufwiesen. qPCR unterschätzt die Gesamt-DNA, wobei die Ergebnisse je nach genomischem Ziel stark variieren, was die Bedeutung der Verwendung von mehr als einem Assay zur genauen Bestimmung der DNA-Belastung unterstreicht. Es ist wichtig, dass die Regulierungsbehörden klare und einheitliche Richtlinien zur Quantifizierung von mRNA und Plasmid-DNA in modRNA-Impfstoffen erstellen. Die PCR-Ergebnisse für die neuesten XBB.1.5-Impfstoffe von Moderna und Pfizer deuten darauf hin, dass die DNA-Rückstände gegenüber früheren Impfstoffversionen nicht reduziert wurden.

Unsere Ergebnisse verstärken die bestehenden Bedenken hinsichtlich der Impfstoffsicherheit und stellen die Relevanz von Richtlinien in Frage, die vor der Einführung der effizienten Transfektion mit LNPs entwickelt wurden. Trotz einiger offensichtlicher Einschränkungen fordern wir dringend, dass unsere Arbeit unter forensischen Bedingungen wiederholt und die Richtlinien überarbeitet werden, um der hocheffizienten DNA-Transfektion und der kumulativen Dosierung Rechnung zu tragen.

Diese Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit, dass Regulierungsbehörden und Industrie das Vorsorgeprinzip einhalten und ausreichende und transparente Nachweise für die Sicherheit und Wirksamkeit von Produkten erbringen sowie die Details ihrer Zusammensetzung und Herstellungsmethode offenlegen.

Beiträge der Autoren

CRedit: David J. Speicher: Konzeption, Datenerhebung, Formale Analyse, Untersuchung, Methodik, Projektverwaltung, Verfassen des Originalentwurfs, Verfassen – Überprüfung und Bearbeitung; Jessica Rose: Formale Analyse, Methodik, Software, Verfassen – Überprüfung und Bearbeitung; Kevin McKernan: Konzeption, Formale Analyse, Untersuchung, Methodik, Ressourcen, Verfassen des Originalentwurfs, Verfassen – Überprüfung und Bearbeitung.

Offenlegungserklärung

Kevin McKernan ist bei Medicinal Genomics beschäftigt und hat qPCR- und Qubit"-Reagenzien kostenlos zur Verfügung gestellt. Von den Autoren wurden keine potenziellen Interessenkonflikte gemeldet.

Finanzierung

Dieses Projekt wurde selbst finanziert, wobei die Reagenzien von Kevin McKernan bereitgestellt wurden.

ORCID

David J. Speicher <http://orcid.org/0000-0002-1745-3263>
 Jessica Rr se <http://orcid.org/0000-0002-9091-4420> Kevin
 McKernan <http://orcid.org/0000-0002-3908-1122>

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

FASTQ-Datei für die ma}a}aed ONT-Sequenzierungsdaten: <https://mega.nz/file/UZhkiTBQfhvjDKS{VSNSDj2On34BCzdRObEKGBy3ZC7wSq2t9UVc>

Referenzen

- [1] de Fougerolles A, Elbashir SM. Lieferung und Formulierung von künstlichen Nukleinsäuren. Patent- und Markenamt der Vereinigten Staaten, Mader natx, Inc; 2021. <https://patents.google.com/patent/US10S9SS74B2/en>, <https://patentimages.storage.googleapis.com/29/fl/nc/fda42bSdSddñca/US10S9Sñ74.pdf>
- [2] Guetzkow JA, Levi R. Wirkung der Herstellungsverfahren von mRNA-Impfstoffen auf Wirksamkeit und Sicherheit noch offen. BMJ. 2023;37S:o 1731.
- [5] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. In-vitro-Transkriptionstechnologien. Patent- und Markenamt der Vereinigten Staaten; 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d299Sc9653/US202301S3769A1.pdf>
- [4] Srittran DH, Conn GL, Brown T, et al. Die Abhängigkeit der DNase-I-Aktivität von der Konformation von Oligodesoxynukleotiden. Bicaclaem J. 1997;321 (Pt 2):481–486. dcci: 10.1042/bj3210481
- [6] Thorn CR, Sharma D, Combs R, et al. Die Reise eines Lebens – Entwicklung des COVID-19-Impfstoffs von Pfizer. Cnrr Opin Piotechnol. 2022;7h:102h03. dot: 10.1016/j.copbio.2022.102b03
- [6] Tinari S. Der Datenleck bei der EMA zu COVID-19 und was er uns über die Instabilität von mRNA verrät. BMJ. 2021;372:n627. doi: 10.1136/bmj.n627
- [7] EMEA/H/C/005735/RR. Berichterstatte-Bericht zur kritischen Bewertung der fortlaufenden Überprüfung: Qualitätsaspekte. Europäische Arzneimittelagentur; 2020. <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/>
- [8] Me Her nan Ie, Helbert Y, Kane LT, et al. Die Sequenzierung der bivalenten mRNA-Impfstoffe von Moderna und Pfizer zeigt, dass pro Dosis Nanogramm- bis Mikrogramm-Mengen an Expressionsvektor-dsDNA enthalten sind. OSFio. 2023. doi: 10.31219/osf.io/b9t7m. https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1
- [9] Sh imabukuro TT, Nguyen M, Martin D, et al. Sicherheitsüberwachung im Impfstoff-Nebenwirkungsmeldesystem (VAERS). Vaccine. 201S;33(36):439h—4405. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.035
- [10] Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM, et al. DNA-Fragmente, die in monovalenten und bivalenten mRNA-COVID-19-Impfstoffen von Pfizer/BioNTech und Moderna aus Ontario, Kanada, nachgewiesen wurden: explorative Dosis-Wirkungs-Beziehung mit schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen. OSF Preprints; 2023. doi: 10.31219/osf.io/mjc97. https://osf.io/preprints/osf/n4jc97_v1
- [11] International Council for Harmonisation (ICH). Q6B: Spezifikationen: Testverfahren und Akzeptanzkriterien für biotechnologische/biologische Produkte; 1999. Abgerufen unter <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>
- [12] Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde. Informationen zu Chemie, Herstellung und Kontrolle (CMC) für Anträge auf Zulassung neuer Arzneimittel für die humangenetische Therapie (INDs). US-Gesundheitsministerium; 2020. Abgerufen unter <https://www.fda.gov/media/113760/download>
- [12] Gesundheitsamt von Kanada. Nationaler Impfstoffkatalog: Impfstoffcharge. 2024. Abgerufen unter <https://nvc-cnv.canada.ca/en/vaccine-lots>
- [13] VAERS-Team. Standardarbeitsanweisungen des Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) für COVID-19 (Stand: 29. Januar 2021). Abgerufen unter <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf>
- [14] Port Hedland, Australien – Tagesordnung der außerordentlichen Ratssitzung – 11. Oktober 2024, Anhänge. Rat der Stadt Port Hedland; 2024. Abgerufen unter <https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/>
- [15]

- [42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS, et al. Immunologische und antigene Signaturen im Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen nach COVID-19-Impfung. medRxiv. 2025. 2025.02.15.25322379; doi: 10.1101/2025.02.15.25322379
- [43] Amerio P, Nubile M, et al. Crñcer nüber die Wirksamkeit rñf der RNA-Impftechnologie und ihre langfristige Sicherheit: mögliche Beeinträchtigung des miRNA-Mechanismus. Int J Mol Sci. 2023;24(2):1404. doi: 10.3390/ijms24021404
- [44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Einfluss der mRNA-Chemie und des Herstellungsprozesses auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Sci Adv. 2020;6(26):eaaz6S93. doi: 10.1126/sciadv.aba6653
- [45] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Myokarditis und COVID-19-mRNA-Impfstoffe: eine mechanistische Hypothese unter Einbeziehung von dsRNA. Future Virol. 2022; 17:191—196 doi: 10.2217/fvl-2021-0250
- [46] Sainsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. SARS-CoV-2-Spike-Protein als bakterielles Lipopolysaccharid-Transportsystem in einer übermäßigen Entzündungskaskade. J Mol Cell Biol. 2023;14: 1—14.
- [47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Latch-abhängige Sicherheit des ENT1(i2b2 mRNA COVID-19-Impfstoffs. Eur J Clin Invest. 2023;53(5):e13995. doi: 10.1111/eci.13995
- [48] Vacik J, Dean PS, Dimmer WE, et al. Zellspezifischer Kernimport von Plasmid-DNA. Gene Ther. 1999;6(6):1006—1014. doi: 10.1038/sj.gt.3300924
- [49] Lim S, Yocum RR, Silver PA, et al. Hohe spontane Integrationsraten von endmodifizierten linearen DNAs bei der Transfektion von Säugetierzellen. Sci Rep. 2023;13(1):6835. doi: 10.1038/s41598-023-33862-0
- [50] Gaitzsch E, Czerinak T, Ribeiro A, et al. Doppelsträngige DNA induziert einen prothrombotischen Phänotyp im vaskulären Endothel. Sci Rep. 2017;7(1):1112. doi: 10.1038/s41598-017-01145-x
- [51] Ma X, Xin D, She R, et al. Neue Erkenntnisse zum CGAS-STING-Signalweg bei ischämischem Schlaganfall: vom Vorstadium bis zur Nachsorge. Front Immunol. 2023;14:127540b. doi: 10.3389/fimmu.2023.127540b
- [52] Kwon J, Bakhoum SF. Der zytosolische DNA-sensitiven cGAS-STING-Signalweg bei Krebs. Cancer Discov. 2020;10(1):26—35. doi: 10.1158/2156-8461.CCR-19-0761
- [53] Matthessen R, Van Pöttelberge R, Goffin B, et al. Einfluss von Mischen und Schütteln auf die Qualitätseigenschaften von mRNA-LNP-Arzneimitteln. Sci Rep. 2024;14(1):19590. doi: 10.1038/s41598-024-70680-4
- [54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grntzalis K. Protokoll zur quantitativen Bewertung der DNA-Konzentration und -Schädigung (Fragmentierung und Kerben). Nat Protoc. 2009;4(2):125—131. doi: 10.1038/nprot.2005.222
- [55] Kaiser S, Kaiser S, Reis J, et al. Quantifizierung der objektiven Konzentrationen von DNA-Verunreinigungen in mRNA-Impfstoffen. Vaccine. 2025;33(12):127022. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127022
- [56] Weltgesundheitsorganisation. Anhang 3: Anforderungen für die Verwendung von tierischen Zellkulturen als Substrate für die Herstellung biologischer Arzneimittel und die Charakterisierung von Zellbanken. Ersatz für Anhang 1 des Technischen Berichts der WHO Nr. b7h; 2017. Abgerufen unter https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_97s_annex_3.pdf
- [57] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Probleme im Zusammenhang mit residueller Zell-Substrat-DNA in viralen Impfstoffen. Biologicals. 2009;37(3): 190—195. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.010
- [58] Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribution und nichtlineare Genexpression von mRNA-LNPs, beeinflusst durch Verabreichungsweg und Partikelgröße. Pharm Res. 2022;39(1): 10N—114. doi: 10.1007/s11095-022-03166-8
- [59] Phua KK, Leons KW, Nair SK. Transfektionseffizienz und Transgenexpressionskinetik von mRNA, die in nackter Form und in Form von Nanopartikeln verabreicht wird. J Control Release. 2013;166(3):227—233. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029
- [60] Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM, et al. Die myokardiale Verabreichung von Lipidoid-Nanopartikeln, die modRNA transportieren, induziert eine schnelle und vorübergehende Expression. Mol Ther. 2016;24(1):66—75. doi: 10.1038/mt.2015.193
- [61] Amt des japanischen Premierministers. COVID-19-Impfstoffe; 2024. <https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm>
- [62] KI in man DM, Klaschik S, Tross D, et al. FDA-Leitlinien zu prophylaktischen DNA-Impfstoffen: Analyse und Empfehlungen. Vaccine. 2010;28(16):2801—2805. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.025
- [63] André M, Reghin S, Floussard E, et al. Universeller Echtzeit-PCR-Assay zur Quantifizierung und Größenbewertung von residueller Zell-DNA in humanen Virusimpfstoffen. Biologicals. 2016;44(3):139—149. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.03.002
- [64] Benigkl F, Soikkeli AI, Prost S, et al. Der SV40-Virus-Enhancer fungiert als somatisches Hypermutations-Targeting-Element mit potenzieller tumorigener Aktivität. Tumour Virus Res. 2024;1h:200293. doi: 10.1016/j.tvr.2024.200293
- [65] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O, Butin-Israeli V, et al. Ein Anstieg von p53 in menschlichen Zellen stoppt die SV40-Infektion durch Hemmung der T-ag-Expression. Oncotarget. 2016;7(33):S2643—S2660. doi: 10.18632/oncotarget.10769



Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 Pfizer/BioNTech e Moderna dell'Ontario, Canada

David J. Speicher, Jessica Rose e Kevin McKernan

Per citare questo articolo: David j. Speicher, Jessica Rose & Kevin McKernan (2025) Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 Pfizer/BioNTech e Moderna provenienti dall'Ontario, Canada, Autoimmunity, 58:1, 2551517, DOI: [10.1080/08916934.2025.2551517](https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517)

Per collegarsi a questo articolo: <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>



2025 Gli autori. Pubblicato da Informa UK Limited, che opera con il nome commerciale Taylor & Francis Group

Visualizza materiale supplementare 1*

Pubblicato online: 06 settembre 2025.

Invia il tuo articolo a questa rivista 1*

Visualizzazioni dell'articolo: 71 00

Visualizza articoli correlati 1*

Visualizza i dati Crossmark 1*

I termini e le condizioni completi di accesso e utilizzo sono disponibili all'indirizzo <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaut20>



Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer/BioNTech e Moderna provenienti dall'Ontario, Canada

David 1. Speicher^a, Jessica Rose^b e Kevin McKernan^c

^aDipartimento di Patobiologia, Università di Guelph, Guelph, ON, Canada; ^bRicercatore indipendente, Ontario, Canada;

^cMedicinal Genomics, Beverly, MA, USA

ABSTRACT

Per alcuni dei vaccini contro il COVID-19, i principi attivi immessi sul mercato sono stati prodotti in modo diverso rispetto a quelli utilizzati negli studi clinici. La produzione di mRNA modificato con nucleosidi (modRNA) per i vaccini commerciali contro il COVID-19 si basa sulla trascrizione dell'RNA polimerasi di un modello di DNA plasmidico. Studi precedenti hanno identificato livelli elevati di DNA plasmidico nelle fiale dei vaccini modRNA, suggerendo che la rimozione del modello di DNA residuo è problematica. Pertanto, abbiamo quantificato il carico di DNA in un numero limitato di fiale di vaccini modRNA Pfizer-BioNTech e Moderna COVID-19 utilizzando due metodi indipendenti. Il DNA totale e specifici target di DNA sono stati quantificati mediante fluorimetria Qubit e reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR), rispettivamente su 32 fiale rappresentative di 16 lotti di vaccini unici. Il trattamento con RNasi A è stato utilizzato per valutare l'impatto dell'interferenza dell'RNA nella fluorimetria del DNA. È stata inoltre effettuata una valutazione preliminare della lunghezza dei frammenti di DNA e della sensibilità alla DNasi I. Il DNA totale variava da 371 a 1.548 ng/dose e da 1.130 a 6.280 ng/dose nei prodotti Pfizer e Moderna, rispettivamente. Il DNA specifico di più target di DNA plasmidico variava da 0,22 a 7,28 ng/dose per Pfizer e da 0,01 a 0,78 ng/dose per Moderna. Il promotore-potenziatore-ori SV40 (0,25-23,72 ng/dose) è stato rilevato solo nelle fiale Pfizer. Il sequenziamento Oxford Nanopore di una fiala ha rilevato una lunghezza media e massima dei frammenti di DNA rispettivamente di 214 bp e 3,5 kb. Questi dati dimostrano la presenza di frammenti di DNA plasmidico da $1,23 \times 10^3$ a $1,60 \times 10^3$ per dose incapsulati in nanoparticelle lipidiche. Utilizzando la fluorimetria, il DNA totale in tutte le fiale testate ha superato il limite normativo per il DNA residuo fissato dalla Food & Drug Administration (FDA) statunitense e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) di 36-153 volte per Pfizer e di 112-627 volte per Moderna, dopo aver tenuto conto del legame non specifico con il modRNA. Quando testate con qPCR, tutte le fiale Moderna rientravano nel limite normativo, ma 2/6 lotti Pfizer (3 fiale) superavano di 2 volte il limite normativo per il promotore-potenziatore-ori SV40. La presenza dell'elemento promotore-potenziatore SV40 nelle fiale Pfizer solleva significative preoccupazioni in materia di sicurezza. Questo studio sottolinea l'importanza delle considerazioni metodologiche nella quantificazione del DNA plasmidico residuo nei prodotti modRNA, considerando che l'aumento dell'efficienza di trasfezione LNP e il dosaggio cumulativo presentano rischi significativi e non quantificati per la salute umana.

STORIA DELL'ARTICOLO

Ricevuto il 16 aprile 2025

Rivisto il 16 luglio 2025

Accettato il 10 agosto 2025

PAROLE CHIAVE

COVID-19; vaccino; modRNA; mRNA; DNA residuo; contaminazione da DNA

Introduzione

La sintesi chimica di RNA di grandi dimensioni (>200 bp) è costosa e soggetta a errori. Pertanto, viene utilizzata una polimerasi T7 per generare RNA modificati lunghi (modRNA) da modelli di DNA. I modelli di DNA sono più facili da sintetizzare, ma devono essere rimossi dal prodotto farmaceutico finale. A causa dei limiti della sintesi chimica del DNA, i frammenti o gli oligonucleotidi di DNA vengono prima sintetizzati chimicamente, uniti tramite ligazione enzimatica e polimerizzazione e infine clonati in plasmidi competenti per la replicazione come prodotti a lunghezza intera. La purificazione del DNA plasmidico da *Escherichia coli* (*E. coli*) può essere effettuata attraverso la lisi diretta dell'*E. coli* e la purificazione del DNA plasmidico o attraverso la purificazione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) dell'inserito plasmidico mirato. Questi due diversi metodi di purificazione possono avere

CONTATTI David J. Speicher speicher@uoguelph.ca, research@davidspeicher.com Dipartimento di Patobiologia, Università di Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, ON N1G 2W1, Canada.

I dati supplementari relativi a questo articolo sono disponibili online all'indirizzo <https://doi.org/10.1080/08916934.2025.2551517>.

© 2025 Gli autori. Pubblicato da Informa UK Limited, che opera con il nome commerciale Taylor & Francis Group.

Questo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini della licenza Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), che consente l'uso, la distribuzione e la riproduzione senza restrizioni in qualsiasi mezzo, purché l'opera originale sia correttamente citata. I termini in base ai quali questo articolo è stato pubblicato consentono la pubblicazione del manoscritto accettato in un archivio da parte dell'autore o degli autori o con il loro consenso.

differenze significative nella quantità e nel tipo di DNA residuo nei vaccini. Queste fasi di purificazione sono sottolineate nel brevetto US10898574B2 di Moderna e si basano su un metodo senza PCR che purifica direttamente il DNA plasmidico da *E. coli* coltivato in un brodo di kanamicina. Il brevetto di Moderna afferma che un DNA geneticamente modificato (ad esempio DNA plasmidico nudo) confezionato in una nanoparticella lipidica (LNP) viene iniettato direttamente in un ospite vivente e potrebbe causare mutagenesi inserzionale e attivazione di oncogeni o l'inibizione di geni oncosoppressori [1].

Dopo l'approvazione da parte della Food & Drug Administration (FDA) statunitense e l'introduzione del vaccino contro il COVID-19, Pfizer ha modificato il proprio processo di produzione passando dall'amplificazione PCR di un modello di DNA (Processo 1) per la sperimentazione clinica randomizzata (RCT) a un processo di purificazione senza PCR che utilizza plasmidi di DNA (Processo 2) simile a quello utilizzato da Moderna [2]. Il brevetto BioNTech US20230183769A1 fornisce un metodo per la produzione su larga scala di RNA di grado farmaceutico utilizzando reazioni di trascrizione *in vitro* e riduce allo stesso tempo il dsRNA contaminante correlato al processo [3]. Tuttavia, poiché il Processo 2 utilizzava un plasmide batterico da 7,8 Kb invece dell'amplicone PCR da 4,2 Kb utilizzato nel Processo 1 per la trascrizione *in vitro*, è probabile che vi sia stato un forte aumento del DNA residuo nel prodotto farmaceutico finale [1].

A causa delle differenze nella struttura del DNA tra il Processo 1 e il Processo 2, il singolo test qPCR utilizzato da Pfizer per rilevare una porzione specifica del DNA potrebbe non essere sufficiente per una quantificazione accurata. I metodi basati sulla PCR utilizzati nella sperimentazione clinica di Pfizer contengono un DNA di fondo molto diverso rispetto ai vaccini somministrati al pubblico, poiché il processo PCR ha amplificato solo la porzione del plasmide che codifica la sequenza dell'mRNA spike. Il metodo di purificazione *E. coli* del Processo 2 contiene la sequenza del vettore plasmidico con l'inserito clonato della sequenza spike. Pertanto, per una quantificazione completa sono necessari metodi di quantificazione del DNA residuo che valutino sia il plasmide che l'inserito, a differenza del processo di Pfizer che ha eseguito la PCR solo sul gene KAN (cioè il gene di resistenza alla kanamicina) dal vettore plasmidico. Pfizer ha comunicato alle autorità di regolamentazione un test qPCR per la regione spike per confermare la presenza dell'inserito spike, ma non ha fornito alcuna quantificazione da questo secondo test convalidato. Ciò è rilevante in quanto è noto che la DNasi I non riesce a digerire gli ibridi RNA:DNA. Questi ibridi saranno presenti nella sequenza spike dopo la trascrizione *in vitro* (IVT) e potrebbero anche essere presenti sotto forma di RNA residuo dall'espressione plasmidica del gene AmpR-SV40-KAN, poiché si propaga in *E. coli*. Pertanto, l'attività della DNasi I può variare in diverse posizioni del plasmide. I test che misurano solo una posizione del plasmide non riusciranno a quantificare con precisione il DNA residuo nel prodotto farmaceutico finale [4].

I plasmidi Pfizer e Moderna condividono molte caratteristiche, ma differiscono in particolare per il fatto che il plasmide Pfizer è un derivato del pcDNA3.1, un vettore shuttle in grado di replicarsi sia nei batteri che nei mammiferi *tramite* origini di replicazione SV40, potenziatori SV40, promotori SV40 e segnali polyA SV40 [5]. Il modello di DNA plasmidico utilizzato da Pfizer (7.824 bp) e Moderna (6.777 bp) contiene entrambi un'origine di replicazione batterica *ColEI* (genericamente denominata ori) attiva in *E. coli*. Entrambi i plasmidi contengono anche un gene aminoglicoside fosfotransferasi (*Neo/Kan*) che consente la selezione dei batteri portatori del plasmide in terreni contenenti kanamicina. Le cellule di *E. coli* vengono quindi raccolte e lisate. Il DNA plasmidico viene estratto, purificato e poi linearizzato con l'enzima di restrizione λ am11041. Questo DNA lineare funge quindi da modello per l'IVT utilizzando la RNA polimerasi T7 in presenza di NI-metil-pseudouridina. È l'aggiunta di NI-metil-pseudouridina che rende questi prodotti vaccini a mRNA modificato con nucleosidi bioingegnerizzati (cioè modRNA). Dopo l'IVT, il DNA viene idrolizzato enzimaticamente con DNasi I, riducendone la prevalenza nel prodotto farmaceutico finale. I documenti forniti da Pfizer all'Agenzia europea per i medicinali (EMA) [6] hanno osservato che il DNA residuo nei prodotti modRNA realizzati con questo processo potrebbe variare in modo significativo [7].

Nel 2023, McKernan et al. hanno sottoposto le fiale del vaccino modRNA contro il COVID-19 a RNA di nuova generazione.

sequenziamento e hanno trovato prove inaspettate di DNA derivato dai plasmidi modello usati durante la produzione [8]. Questo ha mostrato che sia il vaccino Pfizer che quello Moderna contenevano componenti plasmidici ad alto numero di copie con diverse sequenze di DNA residue. Inoltre, McKernan et al. hanno scoperto che tutti i vaccini Pfizer contenevano sequenze promotrici-potenziatrici-ori SV40 e sequenze di segnale polyA SV40 utilizzate come promotori per il marcatore selezionabile Kan/Neo. Questi componenti di DNA residuo non erano menzionati nelle informazioni richieste nei documenti normativi dell'EMA (pag. 24 Rapporteur Rolling Review 3) [7]. Sulla base di queste informazioni, McKernan et al. hanno sviluppato un metodo qPCR per quantificare il livello di DNA plasmidico residuo nelle fiale di vaccino, prendendo di mira più loci nei plasmidi Moderna e Pfizer [8]. Pertanto, lo scopo di questa ricerca era verificare la presenza e la quantità di plasmide residuo.

DNA e promotore-potenziatore-ori SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer e Moderna e confrontare i risultati con gli eventi avversi (AE) segnalati al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). A tal fine, abbiamo ottenuto 32 fiale di vaccini modRNA COVID-19 che erano state distribuite in Ontario, Canada. La quantità di specifici target di DNA, ovvero spike, plasmide ori e promotore-potenziatore-ori SV40, è stata determinata mediante qPCR e il carico totale di DNA mediante fluorimetria Qubit. Abbiamo anche esteso le osservazioni di un lavoro precedente (McKernan et al.) studiando la distribuzione dimensionale dei frammenti di DNA e la sensibilità del vaccino alla DNasi 1 per determinare se il DNA residuo fosse confezionato nelle LNP. Abbiamo quindi consultato il VAERS per verificare la presenza di eventuali AE, compresi gli AE gravi (SAE), associati a questi lotti [9]. Questo studio è una versione ampliata di una precedente pre-pubblicazione [10].

Materiali e metodi

Per questo studio, abbiamo utilizzato i termini "DNA residuo", "massa di DNA" o "impurità" (o simili) anziché "contaminazione", in linea con le definizioni normative delle impurità che derivano dal processo di produzione [11,12]. In base alle linee guida della FDA e della Farmacopea degli Stati Uniti (USP), le "impurità" sono sostanze indesiderate inerenti al processo di produzione o alle materie prime utilizzate nella produzione dei vaccini. Le impurità sono tipicamente prevedibili e derivano dai materiali, dai reagenti o dagli intermedi utilizzati durante la produzione. Le impurità includono il dsRNA, gli ibridi RNA:DNA, i frammenti di RNA corti e i frammenti di DNA plasmidico residuo. Il termine "contaminazione" si riferisce invece a sostanze estranee e indesiderate introdotte nel vaccino attraverso fonti esterne, quali fattori ambientali, attrezzature o errori umani, che non fanno parte del processo di produzione previsto. La contaminazione è tipicamente inaspettata e può includere contaminanti microbici (ad esempio batteri, funghi), agenti avventizi (ad esempio virus) o particelle estranee.

Lotti di vaccini contro il COVID-19

Le fiale di Pfizer-BioNTech BNT162b2 (10 fiale; 6 lotti) e Moderna Spikevax mRNA-1273 (22 fiale, 10 lotti) sono state acquistate da varie farmacie dell'Ontario, in Canada (Figura 1 e Tabella 1). Come controllo negativo è stata utilizzata una fiala sterile non aperta di alprostadil 66 mcg/mL in combinazione con papaverina 21,7 mg/mL e fentolamina 1 mg/mL (TriMix). Le fiale non aperte non sono state manomesse in quanto avevano tappi di plastica flip-off intatti con numeri di lotto e date di scadenza stampati. Le fiale erano state conservate nelle farmacie in appositi contenitori per la conservazione dei vaccini a +2-8 °C e sono state trasportate in contenitori isolati con sacchetti di gel congelato prima di essere collocate nel frigorifero del laboratorio di analisi entro 5 ore dal ricevimento. Una fiala Moderna non riportava la data di scadenza stampata, ma era provvista di un codice QR che doveva essere scansionato da un farmacista. Le fiale Moderna XBB.1.5 sono state conservate in modo simile dalla farmacia. I residui delle fiale utilizzate di recente (entro 30 minuti dalla somministrazione) sono stati collocati in un contenitore isolato con sacchetti di gel congelato e trasportati nel frigorifero del laboratorio di analisi entro 12 ore.

Analisi qPCR del DNA spike, ori e promotore-potenziatore-ori SV'40

I test qPCR hanno preso di mira le sequenze spike e plasmid *ori* condivise dai plasmidi di espressione Moderna e Pfizer (Tabella 2). Questi primer sono stati utilizzati anche per testare le fiale del vaccino modRNA COVID-19 in Australia [15]. Il test uniplex SV40 Enhancer è stato progettato per amplificare la sequenza di targeting nucleare unica del plasmide Pfizer [16]. Tutti i test qPCR hanno utilizzato 1 pL da ciascuna fiala aggiunto direttamente a 17,8 JiL di master mix. I kit qPCR sono stati forniti da Medicinal Genomics (codice 420201, Beverly, USA) con il master mix contenente 8,8 JiL di reazione composta da 3,8 JiL di enzima polimerasi (Medicinal Genomics Partf 420201), 0,8 pL di tampone di reazione e 1,0 JiL di miscela Primer-Probe, e 12,2 JiL di ddH₂O. Una miscela primer-sonda è stata assemblata utilizzando 12,5 JiL 100 qM sonda *ori*, 12,5 pL di 100 p.M sonda spike, 25 qL di 100 iM primer forward spike, 25 pL di 100 qM primer reverse spike, 25 qL di 100 JiM primer forward *ori*, 25 JiL di primer *ori* reverse 100 pM e 75 JiL di ddH₂O. Tutti

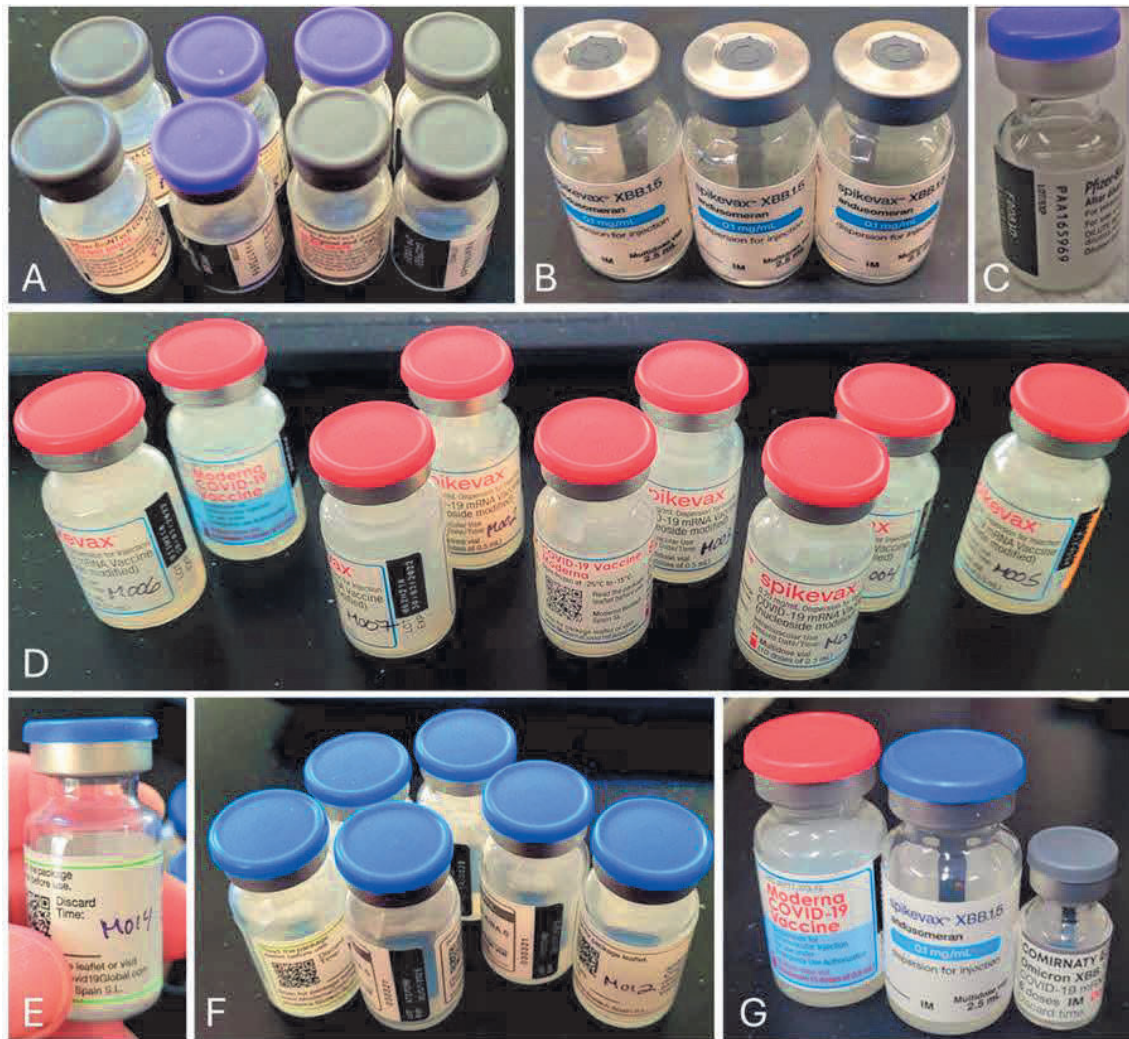


Figura 1. Fiale dei vaccini Pfizer/BioNTech BNT162b2 e Moderna Spikevax mRNA-1273 contro il COVID-19 provenienti dall'Ontario, Canada: (A) Pfizer/BioNTech monovalente e bivalente per adulti; (B) Moderna monovalente XBB.1.5 per adulti; (C) Pfizer-BioNTech monovalente per adulti; (D) Moderna monovalente per bambini/adulti; (E) bivalente Wuhan-BA.1 per bambini/adulti; (F) bivalente per bambini/adulti Wuhan-BA.1 e bivalente per adulti Wuhan BA.4/5; e (G) mix di monovalente per bambini/adulti Moderna e monovalente per adulti Pfizer-BioNTech XBB.1.5. Una fiala di monovalente per bambini/adulti Moderna non è stata fotografata.

I test qPCR hanno utilizzato un controllo gDNA sintetico (gBlock, Integrated DNA Technologies (IDT), San Diego, USA) di concentrazione nota (1 ng/pL) per generare una curva di calibrazione derivata da una diluizione seriale di 10 volte.

Il ciclo è stato eseguito su un QuantStudio 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) con una denaturazione iniziale a 95 °C per 3 minuti seguita da 35 cicli a 95 °C per 10 secondi e 65 °C per 30 secondi. La conversione da Cq a ng/pL è stata calcolata utilizzando il software QuantStudio v2.7.0 (ThermoFisher Scientific). La massa dell'amplicone, determinata con il calcolatore di DNA New England BioLabs [17] e la lunghezza (105 bp per *ori*, 114 bp per spike e 152 bp per il promotore-potenziatore-ori SV40), sono stati utilizzati per stimare il totale di nanogrammi (ng) di DNA presente, adeguando la lunghezza dei plasmidi (7.824 bp per Pfizer e 6.777 bp per Moderna). Il numero di copie per dose è stato prima adeguato alle diluizioni (ad esempio, diluizione 1:5 per il monovalente Pfizer per adulti) e poi al volume di ciascuna dose di iniezione per adulti (300 pL per Pfizer e 500 pL per Moderna). Sono state eseguite diluizioni seriali sui tre lotti Pfizer che hanno mostrato la più alta concentrazione di DNA residuo per studiare l'inibizione della PCR da parte delle LNP, poiché la qPCR è stata eseguita direttamente senza alcun trattamento o estrazione.

Tabella 1. Descrizione dei lotti di vaccino mRNA COVID-19 esaminati in questo studio.

Informazioni sulla produzione del vaccino							Dati VAERS	
Produttore	Mono/bivalente	Numero di lotto	Sigillato	Data di approvazione HC	Data di scadenza	Scaduto	Totale AES	Totale SAES
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FD0810	Sigillato	29/07/2021	31/05/2022	Scaduto	941	154
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FM7380	Sigillato	05/01/2022	30/11/2022	Scaduto	64	25
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FN7934a	Sigillato	11/01/2022	31/10/2022	Scaduto	50	25
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FN7934b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FX4343a	Sigillato	13/04/2022	31/07/2023	Scaduto	4	
Pfizer-BioNTech	Adulti Monovalente	FX4343b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932a	Sigillato	19/10/2022	29/02/2024	In codice	20	2
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932b	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	GK0932c	Sigillato					
Pfizer-BioNTech	Adulti Bivalente	HD9867	Sigillato	28/09/2023	31-10-2024	In codice	14	5
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	092D21 A	Sigillato	13/06/2021	13/02/2022	Scaduto	49	41
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020E21 Aa	Sigillato	08/07/2021	04/03/2022	Scaduto	6	2
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020E21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	062H21 Aa	Sigillato	27/10/2021	31/05/2022	Scaduto	10	3
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	062H21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	020J21 A	Sigillato	2021-1 1-18	30-06-2022	Scaduto	7	5
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	055K21 A	Sigillato	16/12/2021	31/07/2022	Scaduto	2	2
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Aa	Sigillato	2022-02-1 1	30/09/2022	Scaduto	2	1
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ab	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ac	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Monovalente	033M21 Ad	Sigillato					
Moderna	Bambini/Adulti Bivalente BA.1	AS0467Da	Sigillato	23/09/2022	2023-04-02	Scaduto	0	0
Moderna	Bambini/Adulti Bivalente BA.1	AS0467Db	Sigillato					
Moderna	Bivalente BA.1 per bambini/adulti	AS0467Dc	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Ba	Sigillato	2022-1 1-28	30-10-2023	Scaduto	0	0
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bb	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bc	Sigillato					
Moderna	Adulti Bivalente BA4/5	AT0709Bd	Sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Aa	Non sigillato	15/09/2023	2024-07-29	In codice	0	0
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Ab	Non sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	020G23Ac	Non sigillato					
Moderna	Adulti Monovalente XBB.1.5	025G23A	Non sigillato	15/09/2023	10/08/2024	In codice	0	0

Ordinati in base alla data di approvazione del lotto da parte di Health Canada, come riportato nel catalogo nazionale canadese dei vaccini^[13]. Gli eventi avversi (EA) e gli EA gravi e gli SAE provenienti dal Canada sono stati estratti dal database VAERS disponibile per il download pubblico (<https://vaers.hhs.gov>) [14]. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto.

Tabella 2. Sequenze di primer e sonde mirate a spike, ori e al promotore-potenziatore-ori SV40.

Nome primer/sonda	Sequenza (5' -3') ^a	Lunghezza dell'amplicone
MedGen Moderna Pfizer Janssen Vax-Spike Forward	AGATGGCCTACCGGTTCA	114 bp
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse	TCAGGCTGTCTGGATCTT	
MedGen_Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe	5'6-FAM-CGAGAACCA-ZEN-GAAGCTGATCGCCAA-3'IABkFQ [^]	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Forward	CTACATACCTCGCTCTGCTAATC	105 bp
MedGen_Vax-Vector_Ori_Reverse	GCGCCTTATCCGGTA ACTATC	
MedGen_Vax-Vector_Ori_Probe	5HEX-AAGACACGA-ZEN-CTTATCGCCACTGGC-3'IABkFQ [^]	
MedGen_SV40-promotore-potenziatore-ori_Forward	GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGT GGTGCTGACTAATTGAGATGC	152 bp
MedGen_SV40-promotore-potenziatore-ori_Reverse	5TEX615-CCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGC-3'IABRQSp [^]	

^aPer la progettazione dei primer sono state utilizzate le sequenze del vettore di espressione bivalente Pfizer BNT162b2 (OR134577.1) e del vettore di espressione Moderna mRNA1273 (OR134578.1).

[^]La sonda aveva il terminale 5' marcato con un fluoroforo 6-FAM (6-carbossifluoresceina), un quencher interno ZEN[™], e il terminale 3' marcato con 3' Iowa Black[®] FQ.

La sonda aveva il terminale 5' marcato con un fluoroforo SHEx (esaclorofluoresceina), un quencher interno ZEN[™] e il terminale 3' marcato con 3' Iowa Black[®] FQ.

[^]La sonda aveva l'estremità 5' marcata con un fluoroforo TEX 615 e l'estremità 3' marcata con 3' Iowa Black[®] RQ.

Quotidianità quantificazione fluorometrica

I reagenti fluorometrici AccuGreen[™] HS (AccuGreen #99820 e tampone di quantificazione del DNA #99979) e gli standard sono stati acquistati da Biotium (San Francisco, USA) per l'analisi Qubit[™] (ThermoFisher Scientific). Le letture fluorometriche sono state inizialmente eseguite direttamente sui vaccini in una miscela da 200 μ L contenente reagenti fluorometrici (190 μ L di una soluzione madre preparata con 995 μ L di tampone HS e 5 μ L di colorante AccuGreen[™] 200X) e 10 μ L di vaccino. I campioni sono stati letti seguendo le istruzioni del produttore su un fluorimetro Qubit[™] 3.0. Questi campioni sono stati poi riscaldati a 95 °C per 8 minuti e raffreddati a 4 °C per 5 minuti per rompere le LNP e consentire ai coloranti fluorometrici di accedere al DNA. Per valutare il potenziale

segnale derivato dal legame di AccuGreen" all'RNA modificato, 1 JiL di 20 mg/mL RNasi A (NEB# T3018L) è stato aggiunto ai campioni dopo la fase di riscaldamento/raffreddamento e incubato a 37 °C, durante il quale è stata raccolta una serie temporale di misurazioni fluorescenti. Le misurazioni fluorometriche sono state raccolte prima dell'aggiunta di RNasi A e 1, 2, 3, 5 e 10 minuti dopo l'aggiunta di RNasi A.

Dati del sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS)

Il database VAERS è stato analizzato utilizzando il pacchetto Language and Environment for Statistical Computing in R [18] e includeva dati relativi al periodo compreso tra il 17 dicembre 2020 e il 6 ottobre 2023. I dati VAERS relativi agli Stati Uniti sono disponibili per il download in tre file separati in formato CSV (comma separated values) che rappresentano: i) dati generali per ciascuna segnalazione; ii) gli eventi avversi segnalati o "sintomi" e iii) i dati relativi al vaccino, compresi il produttore e il numero di lotto [9]. È inoltre disponibile per il download un set di dati VAERS non statunitense (estero) che contiene le segnalazioni di eventi avversi presentate alle autorità di regolamentazione di paesi non statunitensi in tutto il mondo. Quando viene presentata una segnalazione, viene assegnato un numero ID VAERS per preservarne la riservatezza. Per valutare gli eventi avversi relativi a un particolare vaccino, è necessario unire i tre file di dati utilizzando gli ID VAERS come variabile di collegamento. Per questo studio sono stati inclusi solo i TIPI DI VACCINO COVID-19 (COVID19-1 (monovalente) e COVID19-2 (bivalente)). Altre variabili rilevanti includevano l'ID VAERS*, il lotto del vaccino (VAX LOT), il produttore del vaccino (VAX MANU), i ricoveri ospedalieri (HOSPITAL), la disabilità (DISABLE), le visite al pronto soccorso (ER_ED_VISIT), i difetti alla nascita (BIRTH_DEFECT), gli eventi potenzialmente letali (L THREAT) e i decessi (DIED). I dati sono stati raggruppati per VAX LOT e sono stati conteggiati il numero totale di segnalazioni di AE e SAE. Le segnalazioni di SAE includevano decessi, ricoveri ospedalieri, visite al pronto soccorso, segnalazioni di disabilità, difetti alla nascita e segnalazioni di eventi potenzialmente letali. Sono stati interrogati i dati relativi agli Stati Uniti e ai paesi non statunitensi e, ai fini del presente studio, nei risultati primari sono riportati solo i conteggi dei lotti canadesi. Le segnalazioni canadesi sono state distinte da quelle non statunitensi (straniere) utilizzando la variabile SPLTTYPE che fornisce il codice del paese - nel caso del Canada "CA" - come primi 2 caratteri segnaposto. Le correlazioni tra i dati VAERS e i livelli di DNA per spike, ori e SV40 sono state tracciate e calcolate utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson.

sequenziamento nanopore

La distribuzione delle dimensioni dei frammenti di DNA è stata stimata utilizzando un lotto di vaccino precedentemente sequenziato (Pfizer monovalente per bambini, lotto n. FL8095) [8] come standard utilizzando un Oxford Nanopore Flongle (R.10.4.1, Oxford Nanopore Technologies (ONT), New York, USA) e il kit di sequenziamento Oxford Nanopore Ligation (SQK-LSK114) secondo le istruzioni del produttore. Le letture sono state mappate su NCBI OR134577.1 con il Burrow-Wheeler Aligner con corrispondenze esatte massime (BWA-MEM) [19]. La lunghezza di lettura del sequenziamento ONT è illimitata, ma le procedure di isolamento del DNA necessarie per eseguire il sequenziamento ONT possono influenzare la lunghezza delle molecole catturate nella reazione di ligazione ONT. I frammenti più corti possono andare persi con la cattura del DNA basata su SPRI utilizzata in questi metodi. Le letture di singole molecole sono state contate e raggruppate in base alla loro lunghezza di lettura mappata con BWA-MEM.

Valutazione della sensibilità alla nucleasi

Pfizer Lotf FL8095 è stato utilizzato anche come standard per valutare la sensibilità alla DNasi I del materiale vaccinale. Il DNA confezionato in LNP dovrebbe essere inaccessibile e quindi resistente alla DNasi I, mentre il DNA al di fuori dell'LNP dovrebbe essere labile alla DNasi I.

Il DNA protetto dalla nucleasi è stato stimato trattando 20 pL del vaccino con 2,5 JiL di DNasi I-XT (2 unità/pL, NEB#M0570S, New England BioLabs Inc, Ipswich, USA) in tampone Grim Reefer 10X (Medicinal Genomics #420123-125) e incubando a 37 °C per 30 minuti. Per il controllo, è stato utilizzato 2,5 JiL di ddH₂O al posto della DNasi I-XT. La reazione della DNasi I-XT è stata interrotta utilizzando 2,5 qL di tampone di lisi MGC (Medicinal Genomics f420001). Dopo la fase di inattivazione della DNasi I, è stato aggiunto un DNA di controllo interno amplificabile con qPCR per verificare che la DNasi I-XT fosse stata completamente inattivata (Medicinal Genomics f420123-125). Successivamente, sono stati utilizzati 54 pL di microsfere magnetiche SenSATIVAx (Medicinal Genomics) per

Purificare il DNA dal test DNase I-XT e dai campioni di controllo negativo DNase I-XT. Le sfere magnetiche sono state miscelate con il campione mediante pipetta per 10 volte, incubate a temperatura ambiente per 5 minuti, separate magneticamente e lavate due volte con etanolo al 70% v/v. L'etanolo è stato rimosso e le sfere sono state asciugate per 2 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati eluiti in 30 pL di ddH₂O e 1 qL di eluato è stato esaminato mediante qPCR per spike e *ori* in una reazione da 18,8 J₁L. Un primer e una sonda di controllo aggiuntivi per l'inattivazione della DNasi I (0,5 pL di sonda marcata con CY5) sono stati aggiunti al test per una reazione totale di 19,3 pL.

Risultati

Test qPCR/t del DNA residuo

Abbiamo convalidato l'accuratezza del metodo di quantificazione qPCR utilizzando una curva standard di diluizione seriale a 8 log utilizzata per calibrare i valori C_q del campione e generato valori R² di 0,998, 0,999, 0,906 ed efficienze del 99,8%, 94,7% e 93,6% rispettivamente per gli ampliconi spike, *ori* e SV40 promotore-potenziatore-*ori*. Su tutte le piastre, i controlli negativi e i controlli senza modello (ddH₂O) (NTC) sono stati testati in triplicato e sono risultati negativi.

I test iniziali, eseguiti su campioni di vaccino non diluiti, hanno mostrato che tutte le fiale Pfizer erano positive per spike, *ori* e SV40 promoter-enhancer-*ori*. Per le singole fiale, il qPCR per Pfizer ha amplificato in tempi simili per spike, *ori* e SV40 enhancer-promoter-*ori* (qC_q medio 0,89+ 0,2f). Nonostante il lotto FX4343 di Pfizer si sia amplificato leggermente più tardi rispetto alle altre fiale, la differenza tra le fiale era minima (spike qC_q 17,86+ 1,58; *ori* qC_q 17,91+ 2,05; promotore-potenziatore-*ori* SV40 qC_q 15,46+ 2,02). Anche la differenza tra le fiale di ciascuno dei target era minima per Moderna (spike C_q 20,65+ 0,88; *ori* C_q 25,48+ 1,32). Tuttavia, per tutte le fiale Moderna, ad eccezione del lotto AS0467D (Bivalent BA.1), *ori* ha amplificato in modo coerente.

2,95+ 0,30 cicli dopo il picco. Il promotore-potenziatore-*ori* SV40 è stato rilevato in tutte le fiale Pfizer ma in nessuna delle fiale Moderna.

Per valutare l'inibizione dell'LNP sull'efficienza della reazione qPCR, le fiale dei lotti FM7380 e FN7934 sono state sottoposte a una diluizione seriale di 10 volte. La risposta prevista di -3,3 del ciclo di quantificazione (C_q) è stata osservata solo dopo la diluizione 1:10, suggerendo che esiste una certa inibizione dell'LNP che potrebbe influire sulla quantificazione del DNA a queste diluizioni. Pertanto, i dati delle diluizioni 1:10 sono stati utilizzati per ulteriori analisi. Questa diluizione, così come il fatto che alcune delle dosi erano state progettate per essere diluite prima dell'uso, è stata presa in considerazione nei nostri calcoli.

Quantità di frammenti di DNA residuo specifici determinata mediante qPCR

Il test qPCR delle fiale diluite 1:10 ha prodotto valori C_q per *ori* e spike compresi tra 18,44 e 24,87 e tra 18,03 e 23,83 per Pfizer e 25,24-30,10 e 22,35-24,53 per Moderna, rispettivamente (Tabella 3). Il test SV40 promotore-potenziatore-*ori* ha prodotto valori C_q compresi tra 17,46 e 24,65 nelle fiale Pfizer e non ha amplificato nelle fiale Moderna. La riproducibilità dei test spike, *ori* e SV40 è stata rispettivamente di 0,72+ 0,14, 0,74+ 0,23 e 0,65+ 0,16 per Pfizer e di 0,83+ 0,14, 0,89+ 0,18 e negativa per Moderna. Dopo i calcoli, la quantità di DNA residuo variava in modo sostanziale tra i lotti Pfizer analizzati [0,22-2,43 ng/dose per spike, 0,28-7,28 ng/dose per *ori* e 0,25-23,72 ng/dose per SV40 promotore-potenziatore-*ori*], ma era più consistente nei lotti Moderna [0,25-0,78 ng/dose per spike e 0,01-0,34 ng/dose]. Sebbene Pfizer presentasse una quantità di DNA residuo sostanzialmente superiore rispetto a Moderna, solo il DNA promotore-potenziatore-*ori* SV40 dei lotti FM7380 e FN7934 superava la guida della FDA di 10 ng di DNA/dose (Figura 2). I lotti FM7380 e FN7934 erano fiale monovalenti Pfizer con tappo viola e formulazione PBS.

DNA totale determinato mediante fluorimetria

Le misurazioni basate sul fluorimetro (ad esempio Qubit®) dei vaccini hanno mostrato che le fiale Moderna contenevano costantemente una quantità di DNA totale molto maggiore rispetto alle fiale Pfizer (Figura 3). Il DNA totale rilevato nel vaccino puro (cioè direttamente dalle fiale) era 621+ 282 ng/dose (intervallo: da 262 a

Tabella 3. Test qPCR su tutte le fiale Pfizer-BioNTech e Moderna diluite 1:10 con risultati per SARS-CoV-2 spike, *ori* e SV40 promoter-enhancer-ori on.

Produttore	Lotto	Spike			Plasmide Origine della replicazione (uno)			promotore-potenziatore-ori SV40		
		Cq	Totale ng/dose	Copie totali/dose	Cq	Totale ng/dose	Totale copie/dose	Cq	Totale ng/dose	Copie totali/dose
Pfizer-BioNTech	FD0810	20,17	0,43	3,69E+ 09	19,90	2,80	2,60E+ 10	20,76	0,43	2,92E+ 09
Pfizer-BioNTech	FM7380	18,03	2,43	2,07E+ 10	18,57	3,92	3,64E+ 10	18,18	16,06	1,09E+ 11
Pfizer-BioNTech	FN7934a	18,47	1,79	1,53E+ 10	18,77	3,43	3,18E+ 10	17,46	23,72	1,60E+ 11
Pfizer-BioNTech	FN7934b	18,19	2,18	1,86E+ 10	18,44	4,27	3,96E+ 10	17,96	18,10	1,22E+ 11
Pfizer-BioNTech	FX4343a	23,53	0,27	2,30E+ 09	24,71	0,32	2,94E+ 09	24,59	0,26	1,73E+ 09
Pfizer-BioNTech	FX4343b	23,83	0,22	1,86E+ 09	24,87	0,28	2,64E+ 09	24,65	0,25	1,68E+ 09
Pfizer-BioNTech	GK0932a	20,46	2,25	1,92E+ 10	21,01	3,81	3,54E+ 10	20,27	2,61	1,77E+ 10
Pfizer-BioNTech	GK0932b	20,60	2,05	1,75E+ 10	21,22	3,32	3,08E+ 10	20,49	2,35	1,59E+ 10
Pfizer-BioNTech	GK0932c	20,66	1,97	1,68E+ 10	21,21	3,33	3,09E+ 10	20,29	2,58	1,74E+ 10
Pfizer-BioNTech	HD9867	21,24	0,99	8,46E+ 09	20,81	7,28	6,75E+ 10	20,12	2,84	1,92E+ 10
Moderna	092D21A	22,35	0,66	5,64E+ 09	27,88	0,04	4,16E+ 08	Negativo		
Moderna	020E21Aa	23,66	0,35	3,02E+ 09	29,47	0	1,87E+ 08	Negativo		
Moderna	020E21Ab	24,52	0,50	4,24E+ 09	29,99	0,09	8,26E+ 08	Negativo		
Moderna	062H21Aa	22,52	0,78	6,69E+ 09	29,21	0,02	2,23E+ 08	Negativo		
Moderna	062H21Ab	22,76	0,66	5,64E+ 09	29,37	0,02	2,00E+ 08	Negativo		
Moderna	020J21A	23,21	0,48	4,12E+ 09	30,10	0,01	1,23E+ 08	Negativo		
Moderna	055K21A	22,94	0,58	4,98E+ 09	29,58	0,02	1,74E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Aa	23,04	0,54	4,65E+ 09	29,46	0,02	1,88E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ab	22,81	0,64	5,44E+ 09	29,38	0,02	1,99E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ac	23,59	0,37	3,18E+ 09	29,87	0,02	1,43E+ 08	Negativo		
Moderna	033M21Ad	23,26	0,47	3,98E+ 09	29,39	0,02	1,97E+ 08	Negativo		
Moderna	AS0467Da	23,20	0,49	4,17E+ 09	25,24	0,34	3,20E+ 09	Negativo		
Moderna	AS0467Db	24,16	0,25	2,14E+ 09	26,08	0,20	1,82E+ 09	Negativo		
Moderna	AS0467Dc	23,75	0,33	2,85E+ 09	25,74	0,25	2,28E+ 09	Negativo		
Moderna	AT0709Ba	23,68	0,35	2,99E+ 09	29,30	0,02	2,09E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bb	23,56	0,38	3,24E+ 09	29,25	0,02	2,16E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bc	23,63	0,36	3,09E+ 09	29,34	0,02	2,04E+ 08	Negativo		
Moderna	AT0709Bd	23,80	0,32	2,74E+ 09	29,44	0,02	1,91E+ 08	Negativo		
Moderna	020G23Aa	24,42	0,73	6,26E+ 09	29,42	0,23	2,13E+ 09	Negativo		
Moderna	020G23Ab	24,46	0,71	6,11E+ 09	29,87	0,03	2,33E+ 08	Negativo		
Moderna	020G23Ac	24,53	0,68	5,84E+ 09	29,74	0,03	2,55E+ 08	Negativo		
Moderna	025G23A	24,38	0,54	4,62E+ 09	29,30	0,13	1,20E+ 09	Negativo		

I calcoli per Pfizer e Moderna si basavano su dosi per adulti rispettivamente di 0,30 ml e 0,50 ml. Moderna è indicata anche per i bambini di età compresa tra 6 e 12 anni con una dose di 0,25 ml, il che rende il totale risultante in ng/dose pari alla metà di quello somministrato agli adulti. Il totale ng/dose è stato adeguato in base alla lunghezza dell'amplicone (105 bp *ori*, 114 bp spike), che rappresenta solo una frazione del plasmide Pfizer da 7.824 bp e del plasmide Moderna da 6.777 bp. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto. Promotore-potenziatore-ori 88SV40.

1.116 ng/dose) per Pfizer e 1.661+ 793 ng/dose (intervallo: da 379 a 3.430 ng/dose) per Moderna. L'ebollizione della soluzione fluorometrica contenente il vaccino ha causato la lisi delle nanoparticelle lipidiche, rilasciando sia il DNA residuo che il modRNA e aumentando notevolmente la quantità di DNA totale rilevata a 1.696+ 987 ng/dose (intervallo: da 590 a 3.180 ng/dose) per Pfizer e 5.210+ 2.095 ng/dose (intervallo: da 2.980 a 9.700 ng/dose) per Moderna. Questo aumento della fluorometria era dovuto anche all'interferenza tra il modRNA e i coloranti fluorometrici [21]. L'aggiunta di RNasi A ha rapidamente degradato il modRNA e ridotto la fluorometria, che si è stabilizzata dopo 1 minuto. Dopo 10 minuti di RNasi A, il DNA totale rilevato nelle fiale del vaccino era 775+ 448 ng/dose (intervallo: da 371 a 1.548 ng/dose) per Pfizer e 2.821+ 1.244 ng/dose (intervallo: da 1.130 a 6.280 ng/dose) per Moderna. Questa elevata quantità di DNA totale in entrambi i vaccini suggerisce che un'alta percentuale del DNA è al di sotto della gamma di dimensioni degli ampliconi qPCR (cioè è fortemente degradata) e che Moderna ha utilizzato una quantità sostanzialmente maggiore di DNA plasmidico.

A causa dello sviluppo del metodo e dell'acquisizione dei vaccini in momenti diversi, i vaccini sono stati testati più volte mediante fluorometria (Figura 4). La varianza media direttamente dalla fiala (pre-ebollizione) era di 317+ 278 ng/dose (intervallo: 43-727 ng/dose) e 456+ 121 ng/dose (intervallo: 199-675 ng/dose), dopo la bollitura era pari a 1.145+ 533 ng/dose (intervallo: 519—1.949 ng/dose) e 1.554+ 1.023 ng/dose (intervallo: 176-3.169 ng/dose), mentre dopo il trattamento con RNasi A era pari a 297+ 217 ng/dose (intervallo: 100-765 ng/dose) e 1.065+ 624 ng/dose (intervallo: 113-2.365 ng/dose) rispettivamente per Pfizer e Moderna.

Abbiamo tracciato i valori residui del DNA ottenuti mediante fluorimetria Qubit rispetto a quelli ottenuti mediante qPCR (Figura 5). Per il prodotto Pfizer, le linee di tendenza per le stime *ori* e spike avevano entrambe una pendenza positiva. Il grafico per il prodotto Moderna differisce da quello del prodotto Pfizer con una sovrapposizione minima.

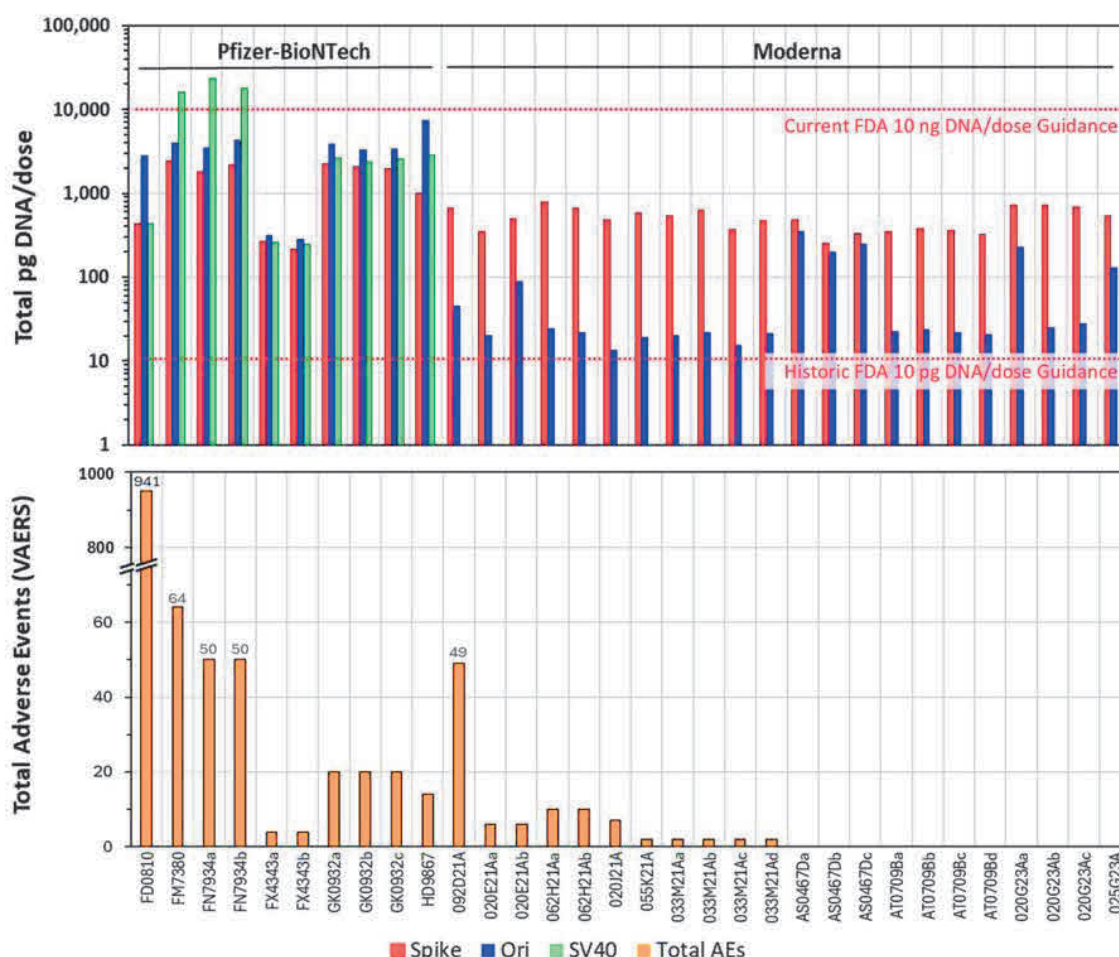


Figura 2. Confronto tra il contenuto di DNA residuo di spike (rosso) *ori* (blu), SV40 promotore-potenziatore-ori (verde) misurato mediante qPCR e il numero totale di eventi avversi (arancione) segnalati al VAERS. La linea guida storica (10 pg/dose) e attuale (10 ng/dose) della FDA e dell'OMS [12,20] per il DNA residuo sono indicate da una linea tratteggiata rossa. Le fiale sono ordinate in base alla data di approvazione del lotto da parte di Health Canada, come registrato nel catalogo nazionale canadese dei vaccini [13]. Le lettere minuscole alla fine dei numeri di lotto indicano fiale diverse dello stesso lotto. Il numero totale di eventi avversi è stato determinato per lotto e riprodotto per ciascuna fiala dello stesso lotto.

dei valori in entrambi gli assi, con pendenze molto più lievi. Sebbene una visione dettagliata dei grafici Moderna suggerisca una pendenza negativa per i valori *ori*, questa linea di tendenza potrebbe essere influenzata da tre valori anomali. Questi valori sono stati ottenuti da fiale dei vaccini bivalenti Moderna BA.1-Wuhan.

Ad eccezione dei lotti Moderna AS0709D, AS0467D e 020G23A, sono state presentate segnalazioni VAERS per tutti i lotti esaminati in questo studio (Ta ella 2 e Figura 2). Dei 16 lotti esaminati, quelli con il maggior numero di segnalazioni presentate al VAERS in tutto il mondo sono stati FD0810, FM7380, FN7934 e 092D21A con rispettivamente 944, 64, 50 e 49 segnalazioni. Nel caso di questi lotti, 157 (17%), 25 (39%), 25 (50%) e 42 (86%) individui hanno segnalato un SAE. Queste percentuali superano di gran lunga il limite massimo della percentuale prevista di SAE in qualsiasi set di dati VAERS, secondo la guida all'uso dei dati VAERS [22]. Da notare inoltre che 1/6 (17%) delle segnalazioni di SAE riguardava decessi relativi al lotto Moderna 020E21A.

Per quanto riguarda le segnalazioni VAERS canadesi, si è osservata la stessa tendenza, con FD0810, FM7380, FN7934 e 092D21A che hanno registrato rispettivamente 134, 27, 48 e 40 segnalazioni. Nel caso di questi lotti, 77 (57%), 16

Il 59% (59), il 48% (23) e il 95% (38) degli individui hanno segnalato un evento avverso grave (SAE). Queste percentuali superano di gran lunga il limite massimo previsto per la percentuale di SAE in qualsiasi set di dati VAERS, secondo la guida all'uso dei dati VAERS[22]. Nel caso del lotto Moderna 092D21A, quasi tutte le segnalazioni erano SAE. La percentuale di SAE per tutti i lotti combinati provenienti dal Canada è molto alta, pari al 58%.

Il lotto FD0180 è l'unico lotto in questo studio che è stato distribuito e somministrato principalmente negli Stati Uniti. Del totale delle segnalazioni relative al lotto FD0810 (*n* —944), 682 (72%) sono state segnalate in vari stati

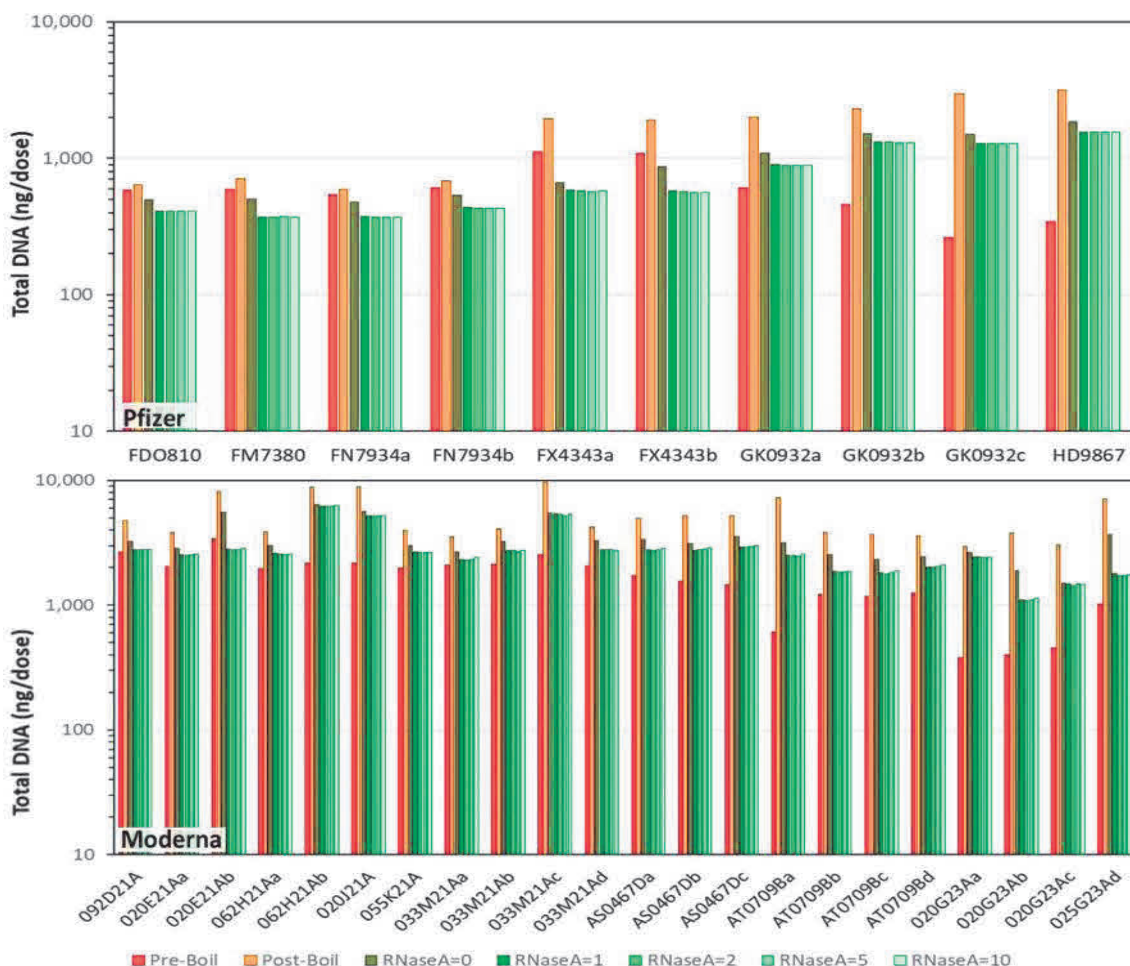


Figura 3. Il DNA totale è stato misurato mediante fluorimetria Qubit direttamente dalla fiala (pre-ebollizione), dopo una fase di ebollizione a 95 °C (post-ebollizione) e in 5 diversi momenti con digestione con RNasi A.

negli Stati Uniti e, più specificamente, 546 (58%) sono state segnalate nel solo Colorado (Tabella supplementare 3). Dei lotti non statunitensi (esteri) segnalati al VAERS per questo lotto, l'83% è stato segnalato in Canada. L'84% di tutte le segnalazioni estere (non statunitensi) è stato segnalato in Canada, indicando che queste fiale sono state distribuite e somministrate principalmente in Canada.

Analisi della lunghezza dei frammenti

Il vaccino monovalente Pfizer per bambini (Lotto FL8095) descritto da McKernan et al. [8] è stato sequenziato con Oxford Nanopore (ONT) per valutare la distribuzione della lunghezza delle letture dopo il mapping delle letture alla sequenza di riferimento del plasmide nell'NCBI (Figura 6). La lettura più lunga rilevata in 865 letture era di

3,5 kb con mappatura della lettura alla maggior parte della struttura del plasmide (Figura 7)

La sensibilità alla nucleasi del vaccino Pfizer è stata valutata utilizzando DNasi I-XT. Questa nucleasi del DNA è ottimizzata per reazioni IVT ricche di ibridi RNA-DNA. Questo trattamento ha mostrato uno scostamento Al Cq, mentre un controllo di DNA nudo aggiunto alle LNP è stato ridotto da un Cq di 15 a un valore non rilevabile nelle stesse condizioni. Ciò indica che il DNA presente nei vaccini è protetto dall'incapsulamento nelle LNP (Figure S e 9)

Discussione

Il DNA residuo è stato rilevato in tutte le 32 fiale di vaccino esaminate. Fiale multiple provenienti dagli stessi lotti hanno prodotto carichi molto simili per tutti i target, dimostrando l'affidabilità, la riproducibilità e la coerenza del test all'interno di

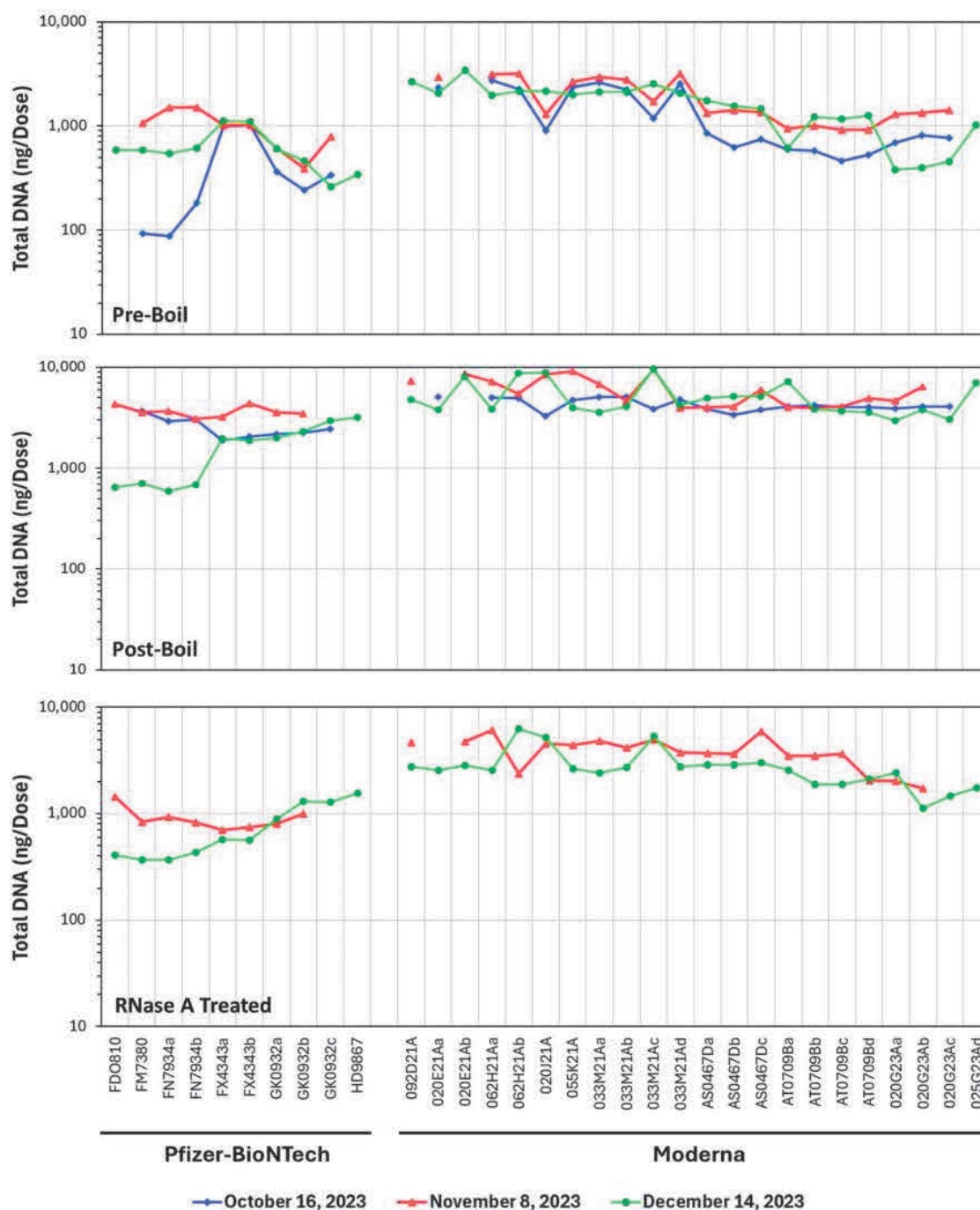


Figura 4. Le misurazioni Qubit sono state ripetute dopo un ciclo di congelamento-scongelo per comprendere la varianza che si può osservare durante il trasporto di fiale congelate da un laboratorio all'altro. Le misurazioni Qubit° sono state effettuate in tre diversi momenti (ottobre, novembre e dicembre 2023) direttamente dalla fiala (pre-ebollizione), dopo una fase di ebollizione a 95 °C (post-ebollizione) e in tre momenti successivi alla digestione con RNasi A.

i lotti. Questi dati relativi alle fiale di vaccino distribuite in Canada sono coerenti con diverse relazioni, sottoposte o meno a revisione paritaria, sulla contaminazione del DNA nei vaccini modRNA (McKernan, Buckhaults, König, Raoult, Kammerer, Wang) [8,23—26].

Moderna presentava la concentrazione di DNA più bassa secondo il qPCR, ma la più alta secondo il Qubit. Le fiale Moderna presentavano i livelli di DNA più uniformi tra le fiale, il che suggerisce un processo di produzione più solido e standardizzato. In ogni fiala del prodotto Moderna, ad eccezione del lotto AS0467D, ora presentava carichi inferiori ($C_t > 6$) rispetto a spike, il che suggerisce una rimozione più efficace del DNA vettoriale.

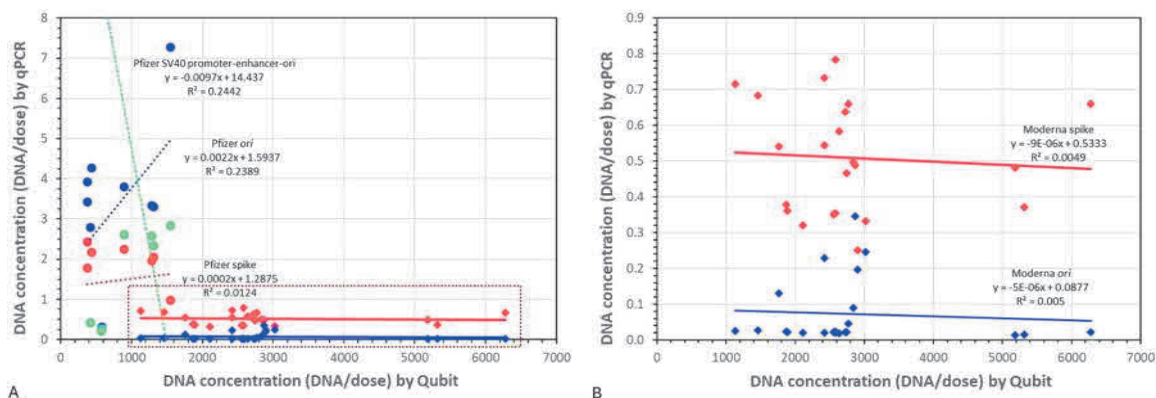


Figura 5. Confronto grafico della concentrazione di DNA residuo per spike (rosso), ori (blu) e promotore-potenziatore-ori SV40 (verde) determinato mediante qPCR e concentrazione totale di DNA residuo in singole fiale determinata mediante qubit. Nel pannello a, i dati di Pfizer e Moderna sono riportati sulla stessa scala. L'asse Y è stato regolato per visualizzare tutti i campioni, ad eccezione dei tre risultati SV40 promotore-potenziatore-ori. I dati Moderna sono racchiusi in un riquadro rosso e visualizzati separatamente con una scala ingrandita nel pannello B, per mostrare i dettagli.

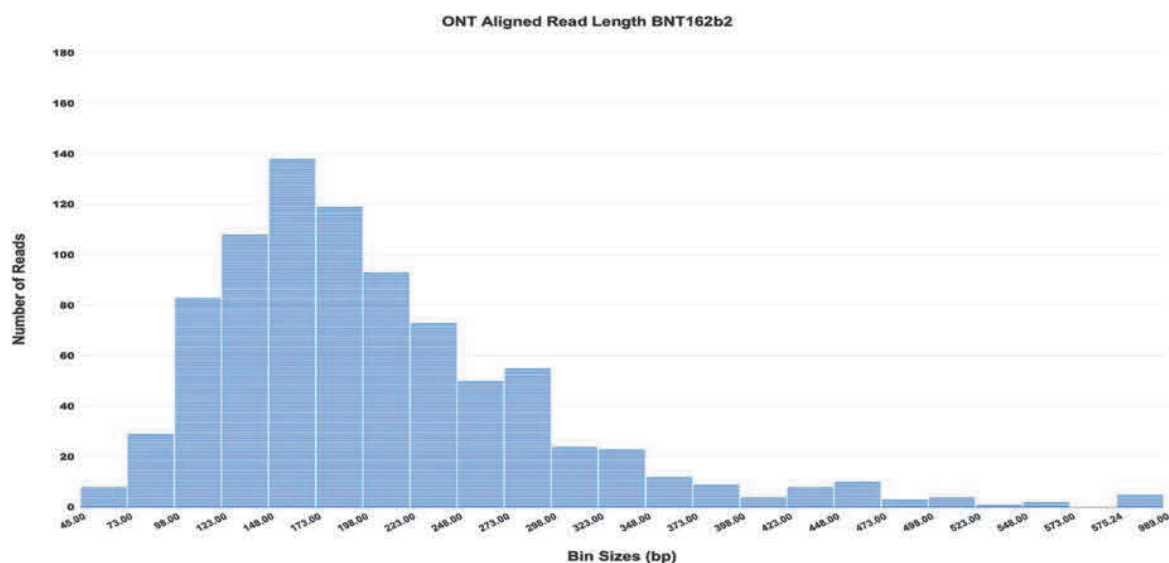


Figura 6. Distribuzione della lunghezza di lettura di Oxford Nanopore (ONT) da 865 letture mappate sulla sequenza vettoriale (NCBI OR134S77.1). Media= 214 bp. Massimo= 3,5 kb.

È possibile che l'RNA modificato omologo impedisca la digestione del DNA modello mediante ibridazione [4]. È importante notare che AS0467D rappresenta il vaccino bivalente BA.1, che è stato osservato essere costituito da due LNP separate contenenti mRNA di diversa purezza che sono state miscelate insieme nel prodotto finale [27]. Poiché la DNasi I è inibita dagli ibridi RNA-DNA, i diversi costrutti modRNA possono presentare una struttura secondaria o un potenziale di ibridazione con il DNA diversi e alterare l'attività della DNasi I rispetto ad altri vaccini Moderna. Questa estrema differenza nei target genetici spike e ori indica una variazione di produzione che non dovrebbe esistere e sottolinea l'importanza che le autorità di regolamentazione non si affidino a un unico test PCR per determinare il carico di DNA plasmidico residuo nel prodotto farmaceutico finale.

Le fiale con la più alta concentrazione di DNA provenivano da due lotti di fiale Pfizer monovalenti con tappo viola e formulazione PBS e richiedono diluizione prima della somministrazione. Il 29 ottobre 2021, la FDA statunitense ha autorizzato una modifica della formulazione con un tampone Tris/saccarosio; il vaccino monovalente per adulti con tappo grigio e un vaccino con tappo arancione per bambini di età compresa tra 6 e 11 anni. Questa modifica è stata apportata per aumentare la stabilità, semplificare i requisiti di conservazione e fornire una formulazione pronta all'uso [28,29]. Questi lotti Pfizer con tappo viola sono stati anche associati ad alcuni dei più alti numeri di AE e SAE segnalati nel VAERS tra tutti i lotti testati. Il motivo di questa differenza non è noto, ma

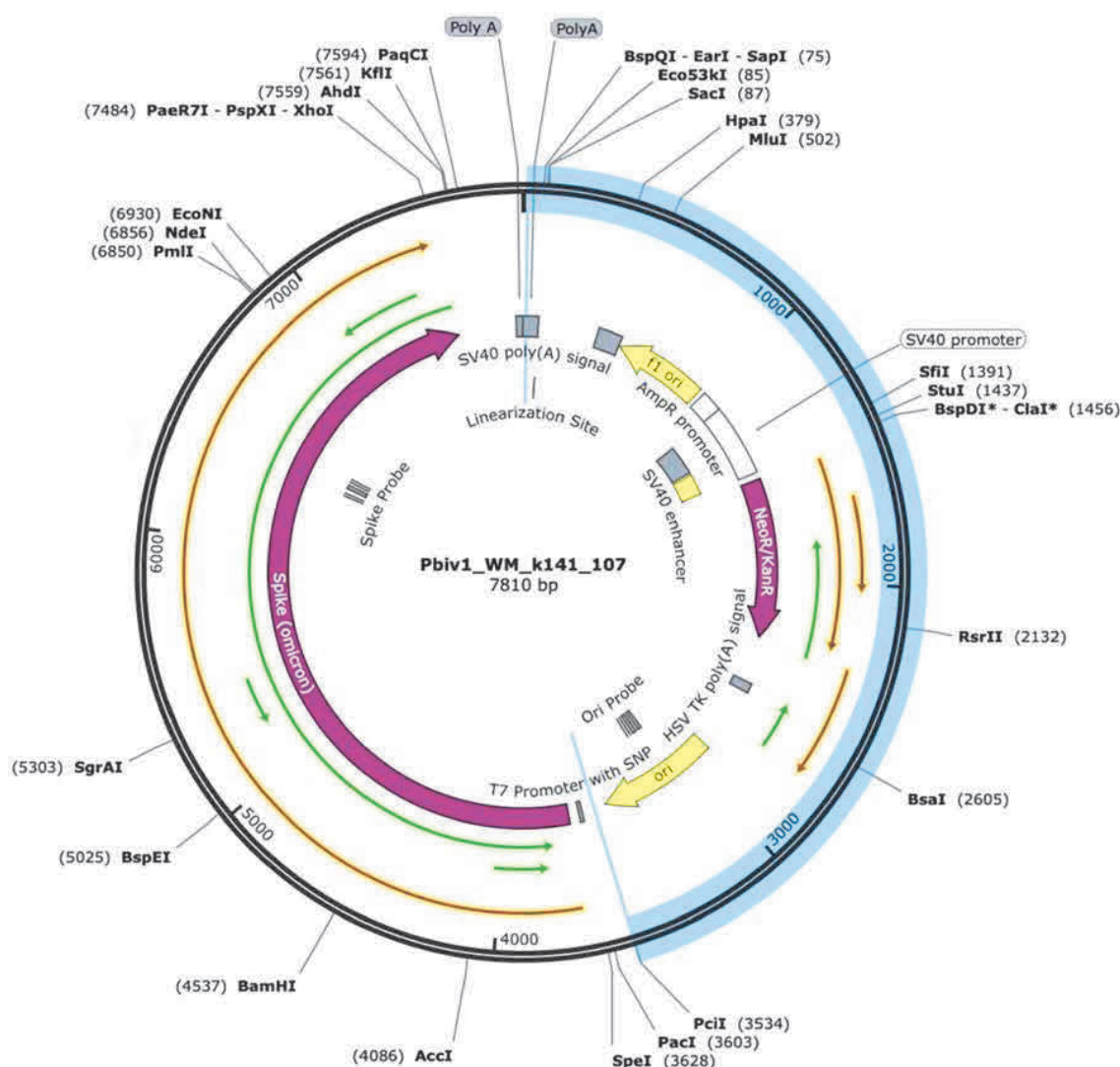


Figura 7. La lettura più lunga di Oxford Nanopore (ONT) si allinea alla regione vettoriale mostrata in blu. Le posizioni dei primer *ori* e spike sono annotate sul cerchio più interno. I frame di lettura aperti (ORF) sono annotati con frecce dorate e verdi. I geni di resistenza alla kanamicina sono stati rilevati in un'indagine di sequenziamento molto superficiale del vaccino.

L'uso del tampone PBS ha provocato la comparsa di particelle visibili nel prodotto farmaceutico finale, che potrebbero essere associate a tossicità, tra cui microembolia e reazioni infiammatorie [30]. Inoltre, sono state osservate impurità lipidiche dovute all'idrolisi dei lipidi e alla formazione di aldeidi, che hanno portato alla formazione di addotti lipidici che potrebbero avere implicazioni tossicologiche. L'uso di un tampone Tris agisce come un "pozzo di aldeide" riducendo le impurità LNP rilevate dagli scienziati di Moderna [31]. Gli addotti causano la perdita della funzione modRNA e possono influenzare la struttura di ordine superiore dell'mRNA; inoltre, possono essere responsabili cambiamenti nella cinetica dell'mRNA o altri fattori sconosciuti [32].

La variabilità inter e intra-lotto nel DNA residuo continua a essere dimostrata anche dopo 3 anni di esperienza nella produzione. Questa variabilità continua, specialmente nelle fiale Pfizer, è forse più fondamentale del raggiungimento di un basso livello di impurità, poiché dimostra un processo di produzione incoerente e probabilmente si verifica con altre impurità legate al processo e al prodotto. La purezza e la robustezza della DNasi possono variare tra i fornitori o i lotti dell'enzima DNasi [33]. Anche piccole differenze nel processo IVT o altri fattori possono influire sulla variabilità del DNA residuo. La fase di digestione con DNasi del vaccino Pfizer/BioNTech è stata oggetto di una raccomandazione da parte dell'EMA per migliorare la robustezza del metodo al momento dell'approvazione [34]. Tuttavia, una FOIA ottenuta in Germania ha evidenziato problemi persistenti relativi alla consistenza dei livelli di DNA residuo all'interno e tra i siti di produzione Pfizer/BioNTech, all'uso di "standard" interni e alla mancanza di

Significant fractions of the LNPs are DNaseI protected

This implies 10-30% of the nucleic acid isn't packaged in an LNP

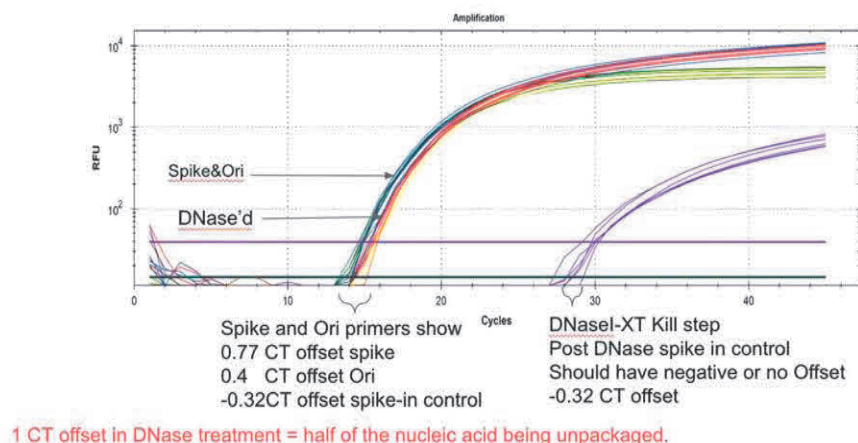


Figura 8. Il trattamento con DNase I-XT del vaccino Pfizer dimostra la resistenza alla nucleasi del DNA contenuto nei vaccini.

Grim Reefer method eliminates all DNA at 37°C in 30 minutes.
2ul in qPCR of a 1:10 dilution of GR control = 15CT
LNPs protect against this activity.

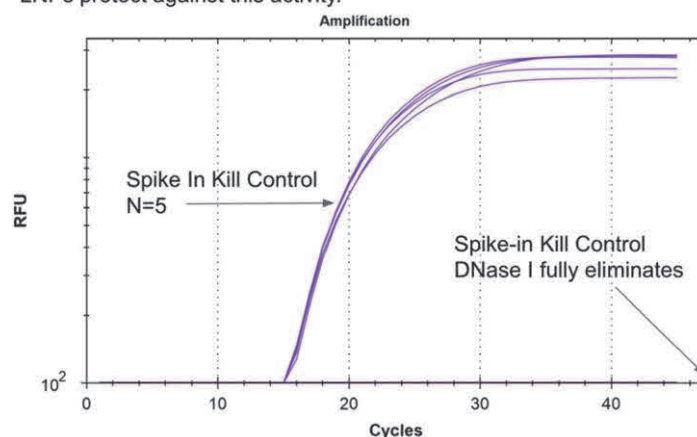


Figura 9. Il controllo positivo con DNase I-XT dimostra che il test di digestione elimina tutto il DNA aggiunto nelle stesse condizioni utilizzate per valutare la sensibilità alla nucleasi del vaccino.

correlazione tra l'attività dell'enzima DNase e il DNA residuo ben 15 mesi dopo l'autorizzazione [35]. Ciò dimostra che gli sforzi continui per rimuovere i frammenti di DNA hanno avuto un successo limitato.

La nostra analisi esplorativa della relazione tra il contenuto di DNA residuo e gli eventi avversi gravi segnalati al VAERS è preliminare e limitata in termini di dimensioni del campione, ma merita una conferma attraverso l'esame di molti più lotti e fiale. Questa analisi preliminare sembra mostrare una correlazione tra gli eventi avversi segnalati per ciascun lotto e i livelli di DNA, in particolare nel contesto *dell'ori*. Sono necessari ulteriori test sulle fiale da parte di altri laboratori indipendenti, compreso un monitoraggio prospettico a lungo termine, per confermare i nostri risultati e verificare l'esistenza di una correlazione. Quando testato con qPCR, il lotto FD0810 di Pfizer, il lotto più vecchio esaminato, ha mostrato livelli inferiori di spike e SV40 promoter-enhancer-ori con livelli di DNA ori paragonabili ad altre fiale monovalenti per adulti (con tappo viola), ma è stato associato al numero più alto di eventi avversi totali segnalati al VAERS. Abbiamo testato solo una singola fiala, che potrebbe non essere rappresentativa dell'intero lotto. Senza conoscere le dimensioni dei lotti o il numero di persone che hanno ricevuto dosi da ciascun lotto, è difficile correlare gli eventi avversi gravi (SAE) a lotti specifici con i dati relativi a soli 16 lotti. Se un lotto associato a un numero elevato di SAE fosse stato somministrato a un numero significativamente maggiore di persone, ciò potrebbe distorcere il rapporto SAE per persona, complicando ulteriormente gli sforzi per stabilire una chiara correlazione. Tuttavia, i nostri risultati suggeriscono che oltre

I livelli di DNA plasmidico, i problemi relativi alle LNP, la tossicità, l'autoimmunità e/o le risposte immunitarie aberranti dovute al frameshifting ribosomiale possono contribuire agli eventi avversi, compresa la pseudoallergia correlata all'attivazione del complemento (CARPA), e possono contribuire agli eventi avversi subito dopo la vaccinazione [36-41]. La composizione casuale dei frammenti di DNA in queste fiale complica la correlazione diretta tra i livelli di DNA plasmidico e le reazioni avverse specifiche, poiché gli effetti genotossici di ciascun frammento variano in modo imprevedibile a seconda della loro sequenza e dell'interazione con il genoma ospite. Questa variabilità rende impossibile stimare con precisione gli effetti avversi basandosi esclusivamente sulla quantità di DNA. Carichi di DNA più elevati potrebbero anche contribuire a rischi per la salute a lungo termine, come il cancro derivante da eventi di integrazione genomica. Il VAERS rileva principalmente gli eventi avversi a breve termine e potrebbe sottostimare gli effetti a lungo termine. Sono necessari ulteriori test sulle fiale per stabilire una curva dose-risposta utilizzando i dati del VAERS. Il monitoraggio prospettico a lungo termine è essenziale per valutare l'impatto dei vaccini genetici, soprattutto perché la proteina spike è stata rilevata fino a 704 giorni dopo la vaccinazione [42].

Sono state osservate relazioni diverse per i lotti Moderna per i dati qPCR e per i grafici basati sul DNA residuo stimato mediante fluorimetria sia per i lotti Pfizer che per quelli Moderna. Queste osservazioni potrebbero riflettere differenze tra i due prodotti, quali il volume della dose, la quantità di DNA, la distribuzione dimensionale dei frammenti di DNA, la composizione e la sequenza del vettore plasmidico e la composizione delle nanoparticelle lipidiche. Altre differenze, sia tra i due prodotti che tra i diversi lotti di ciascun prodotto, possono anche contribuire alle nostre osservazioni. Queste differenze includono variazioni nei livelli di contaminanti o impurità. Una delle principali fonti di impurità è l'mRNA frammentato, per il quale sono stati proposti diversi meccanismi tossicologici, come i suoi effetti sui processi miRNA [43]. Il dsRNA è un altro tipo di impurità che si verifica secondariamente al promotore della RNA polimerasi T7. Il dsRNA può indurre citochine pro-infiammatorie [44] ed è stato ipotizzato che contribuisca a reazioni immuno-infiammatorie come la miocardite [45]. I lipopolisaccaridi nelle cellule provenienti dall'endotossina possono legarsi sia alla subunità S1 che alla subunità S2 della proteina spike, il che può determinare un aumento delle risposte infiammatorie [46].

Un campionamento più ampio rivelerà probabilmente maggiori dettagli in termini di tipi di eventi, come la morte, nonché confronti con altri lavori, come quello riportato da Schmeling et al., che hanno segnalato una correlazione tra gli eventi avversi e vari numeri di lotto dei vaccini [47]. Nessuno dei lotti di vaccini attualmente studiati è stato incluso nello studio di Schmeling ed è necessario ulteriore lavoro per capire se e in che modo questa contaminazione del DNA sia correlata agli eventi avversi.

Sebbene l'enhancer SV40 faciliti il targeting nucleare [16,48], l'integrazione genomica dei frammenti di DNA deve ancora essere dimostrata per i prodotti modRNA COVID-19 [49]. Tuttavia, è noto che la contaminazione da DNA potrebbe innescare una risposta immunitaria innata ingiustificata e potrebbe essere protrombotica, in particolare per i frammenti con un alto contenuto di GC [50]. Il dsDNA può anche essere un fattore significativo nelle malattie ischemiche, compreso l'ictus [51]. È noto inoltre che il DNA citosolico innesca il cGAS-STING e si ritiene che la stimolazione cronica di questa via sia pro-oncogenica [52]. Il brevetto statunitense n. 10.898.574 di Moderna sottolinea anche il rischio di mutagenesi inserzionale del DNA residuo nei loro vaccini. Sebbene sembri esserci una correlazione tra un'elevata contaminazione da DNA e gli eventi avversi gravi, sono necessarie ulteriori ricerche per ampliare la dimensione del campione e chiarire qualsiasi potenziale meccanismo in atto.

È importante sottolineare che, poiché la qPCR non è in grado di quantificare molecole di dimensioni inferiori a quelle dell'amplicone (105-114 bp), la qPCR sottostima il DNA totale presente in ciascun vaccino. L'incapacità della qPCR di quantificare completamente il DNA residuo nei vaccini a mRNA è descritta nel brevetto Moderna n. US 10.077.439. È importante sottolineare che l'uso di un singolo amplicone per la qPCR può portare a stime diverse di 100 volte in alcuni vaccini. Il DNA Spike in alcuni vaccini Moderna è 100 volte più prevalente (-6CT) rispetto al DNA non Spike, il che suggerisce un'inibizione della DNasi I con RNA complementare [4].

Questo spiega le grandi differenze che abbiamo osservato nei livelli di DNA residuo stimati mediante qPCR rispetto alla fluorimetria Qubit", in particolare tra i prodotti Pfizer e Moderna. I valori molto più elevati ottenuti per il prodotto Moderna potrebbero essere in parte dovuti al volume di dose maggiore, ma suggeriscono anche che vi è una percentuale più elevata di DNA residuo frammentato di piccole dimensioni rispetto al prodotto Pfizer. Ciò è coerente con una fase di digestione nucleasica più approfondita. Ciò dimostra che le linee guida sul DNA residuo raccomandate dalla FDA dipendono in larga misura dai metodi utilizzati per quantificare il DNA. Inoltre, è necessario stabilire la robustezza e l'affidabilità del test PCR, date le azioni dell'N-I-metilpseudouridina e la presenza di ibridi RNA-DNA.

Anche König et al. hanno riscontrato un elevato livello di contaminazione da DNA utilizzando la fluorimetria Qubit [24]. Tuttavia, questo studio non prevedeva un trattamento con RNasi A e probabilmente sovrastima la quantità di DNA presente a causa dell'interferenza dei coloranti specifici per il DNA che si intercalano con l'RNA. Sebbene la specificità di questi coloranti fluorometrici specifici per il DNA sia ben documentata, poco si sa dell'impatto sulla loro specificità quando vengono utilizzati con campioni che presentano elevate concentrazioni di NI-metil-pseudouridina modRNA o RNA ricco di GC incline alla formazione di strutture secondarie e solchi minori. I nostri dati Qubit hanno mostrato che si verificano variazioni tra i cicli di campionamento e di congelamento-scongelo. Questa variazione potrebbe essere dovuta alla natura approssimativa dei test fluorometrici, ai cicli di congelamento-scongelo o a errori di campionamento, in particolare perché la vortexatura dei campioni e il pipettaggio multiplo possono introdurre bolle d'aria che alterano le dimensioni e la sedimentazione delle LNP [53]. Tuttavia, i nostri dati RNase A dimostrano che la fluorimetria Qubit deve essere abbinata alla rimozione del modRNA del vaccino per quantificare correttamente il DNA residuo in presenza di elevate concentrazioni di RNA.

Questa valutazione fluorometrica è di particolare interesse poiché la fluorimetria e la spettrofotometria UV sono state utilizzate per quantificare l'RNA nei vaccini Pfizer COVID-19, come descritto nei documenti dell'EMA [7], mentre la qPCR è stata utilizzata per quantificare il DNA. Questo uso selettivo di metodi diversi per quantificare i rapporti RNA/DNA può portare a risultati molto diversi per le linee guida metriche in vigore presso l'EMA. Questa quantificazione fluorometrica elevata rispetto alla quantificazione qPCR è coerente con le distribuzioni della lunghezza di lettura ONT che suggeriscono anche che una parte del DNA potrebbe essere più piccola della dimensione dell'amplicone. Mentre il sequenziatore ONT rileva molecole più corte di 100 bp, i metodi per la costruzione della libreria per ONT utilizzano una fase di purificazione del DNA Ampure 0,7X che seleziona drasticamente contro la purificazione di molecole di dimensioni inferiori a 150 bp. Di conseguenza, le distribuzioni della lunghezza di lettura per le letture ONT sono sbilanciate verso frammenti >150 bp e non riflettono perfettamente i frammenti più piccoli che potrebbero essere presenti e sottostimati sia dall'ONT che dal qPCR.

Analogamente, Georgiou et al. dimostrano che i coloranti fluorometrici producono un segnale inferiore del 70% dopo il trattamento con DNasi I, poiché forniscono un segnale non lineare per molecole più lunghe della stessa massa di DNA [54]. Questi dati non sono stati compensati per questo effetto e riflettono probabilmente una sottostima della quantità effettiva nel test fluorometrico. Queste molecole di DNA più piccole vengono spesso perse anche durante le procedure di isolamento del DNA comunemente utilizzate, come la purificazione con fenolo/cloroformio o la precipitazione con etanolo. Kaiser et al. hanno misurato quantità molto inferiori di DNA nei loro vaccini, ma i loro metodi non hanno accertato la perdita di frammenti di DNA corti dopo precipitazioni multiple con etanolo [55]. Poiché i frammenti di DNA < 100bp possono andare persi durante i metodi di purificazione, compresa la precipitazione con etanolo, è preferibile quantificare il DNA totale direttamente sul prodotto farmaceutico finale senza alcuna fase di purificazione.

Attualmente, la FDA statunitense raccomanda ai produttori di vaccini virali di limitare la quantità di DNA residuo nel prodotto finale a meno di 10 ng/dose per le inoculazioni parenterali e la dimensione del DNA a meno della dimensione di un gene funzionale, ovvero -200 paia di basi [12]. Ciò è anche in linea con le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [20,56] e riguarda il DNA "nudo", ovvero il DNA che non è associato a proteine, lipidi o altre molecole per la protezione o il confezionamento. I precedenti livelli di DNA residuo erano stati fissati dalla FDA a 10 pg/dose nel 1985. Uno studio del 1986 condotto da un gruppo di lavoro dell'OMS ha concluso che il rischio è trascurabile fino a 100 pg/dose e nel 1996 l'OMS ha ulteriormente aumentato i livelli fino a 10 rig per dose [20]. Tuttavia, poiché il DNA residuo è incapsulato nelle LNP e viene trasfettato in modo efficiente direttamente nelle cellule, è necessario rivalutare le linee guida sul DNA per i vaccini a mRNA modificato.

Le linee guida della FDA e dell'OMS relative al DNA ammissibile nei vaccini sono influenzate dal lavoro pubblicato dagli scienziati della FDA Sheng-Fowler et al. [57]. Questo lavoro si è concentrato sulla contaminazione del DNA genomico delle cellule ospiti e ha rilevato un aumento del numero di molecole presenti quando i vettori virali di piccole dimensioni sono le specie contaminanti. Per questi contaminanti ad alto numero di copie per nanogrammo, i femtogrammi e gli attogrammi di DNA sono considerati equivalenti ai nanogrammi di DNA genomico del substrato cellulare. Data la breve dimensione dei frammenti nei vaccini modRNA, il numero di molecole in ciascuna dose può superare i 100 miliardi. Il DNA residuo in questi vaccini è elevato in termini di numero di copie e ricco di promotori, origini di replicazione SV40 dei mammiferi, ORF e sequenze di targeting nucleare. Le linee guida della FDA e dell'OMS non hanno preso in considerazione il confezionamento del DNA in nanoparticelle lipidiche, con conseguente probabile persistenza più lunga del DNA e maggiore efficienza di trasfezione. Inoltre, le linee guida non hanno preso in considerazione

dosaggio cumulativo con modRNA basato su LNP. I dati hanno dimostrato che gli LNP sono in grado di aumentare l'ingresso di RNA o DNA nelle cellule di 10-100 volte [58-60].

In Giappone, il 13% della popolazione ha ricevuto sette dosi di vaccini contro il COVID-19 con un intervallo tra le dosi di richiamo talvolta breve fino a 2 mesi [61]. Inoltre, i rischi del dosaggio cumulativo da parte di vaccini mirati ad altre infezioni ma che utilizzano lo stesso plasmide e la stessa piattaforma modRNA basata su LNP non sono stati considerati nella definizione delle linee guida sul DNA residuo.

Le linee guida della FDA sono state redatte anche per quantificare solo frammenti di DNA di 200 bp o superiori, in parte perché i frammenti più piccoli non erano considerati in grado di produrre un gene funzionale. Tuttavia, Klinman et al. suggeriscono che frammenti di appena 7 bp possono comportare rischi di integrazione [62]. Inoltre, le linee guida potrebbero anche aver considerato che i frammenti di DNA nudo più corti di 200 bp sarebbero stati idrolizzati più rapidamente dall'attività nucleasica dell'ospite rispetto alle molecole più grandi [63]. Questa distruzione accelerata non può essere ipotizzata per i vaccini, poiché il DNA è incapsulato e protetto dalle LNP.

Klinman et al. osservano inoltre che *"nel valutare la potenziale integrazione di OJ plasmidi, occorre tenere presente che il rischio di introdurre plasmidi con regioni regolatorie forti nel genoma ospite supera di gran lunga quello associato alle mutazioni puntiformi casuali"*.

Infine, le linee guida non considerano se il DNA residuo contenga sequenze di targeting nucleare, origini di replicazione dei mammiferi e promotori dei mammiferi presenti nel vaccino Pfizer [49]. Vacik et al. hanno dimostrato che l'enhancer SV40 presente nel vettore Pfizer è una potente sequenza di targeting nucleare che mostra promesse per la terapia genica [48]. Senigl et al. dimostrano che l'enhancer SV40 è un elemento di ipermutabilità somatica con potenziale tumorigenico [64]. Infine, Drayman et al. dimostrano che l'enhancer SV40 nel vaccino Pfizer si lega al P53, ricordandoci che i semplici limiti di nanogrammi di DNA residuo devono essere riconsiderati in base alla funzionalità e alla capacità replicativa di quel DNA [63].

Conclusione

Questi dati dimostrano la presenza di miliardi o centinaia di miliardi di molecole di DNA per dose nei prodotti modRNA COVID-19 testati. Utilizzando la fluorimetria abbinata alla digestione con RNasi A, tutti i prodotti testati hanno superato di 36-627 volte le linee guida per il DNA residuo stabilite dalla FDA e dall'OMS di 10 ng/dose. I test qPCR hanno dimostrato che tutte le fiale Moderna rientravano nel limite normativo e che 3 fiale Pfizer superavano il limite normativo per il promotore-potenziatore-ori SV40 e mostravano una variabilità intra e inter-lotto molto maggiore. La qPCR sottostima il DNA totale con risultati che variano notevolmente a seconda del target genomico, sottolineando l'importanza di utilizzare più di un test per determinare con precisione il carico di DNA. È importante che le autorità di regolamentazione producano linee guida chiare e coerenti su come quantificare l'mRNA e il DNA plasmidico nei vaccini modRNA. I risultati della PCR per i più recenti vaccini XBB.1.5 Moderna e Pfizer suggeriscono che i residui di DNA non sono stati ridotti rispetto alle versioni precedenti dei vaccini.

I nostri risultati ampliano le preoccupazioni esistenti sulla sicurezza dei vaccini e mettono in discussione la pertinenza delle linee guida concepite prima dell'introduzione della trasfezione efficiente mediante LNP. Con alcune ovvie limitazioni, sollecitiamo che il nostro lavoro sia replicato in condizioni forensi e che le linee guida siano riviste per tenere conto della trasfezione di DNA altamente efficiente e del dosaggio cumulativo.

Questo lavoro evidenzia la necessità che le autorità di regolamentazione e l'industria aderiscano al principio di precauzione e forniscano prove sufficienti e trasparenti della sicurezza e dell'efficacia dei prodotti, divulgando i dettagli della loro composizione e del loro metodo di fabbricazione.

Contributi degli autori

CRedit: **David J. Speicher:** Concettualizzazione, Curatela dei dati, Analisi formale, Indagine, Metodologia, Amministrazione del progetto, Scrittura — bozza originale, Scrittura — revisione e modifica; **Jessica Rose:** Analisi formale, Metodologia, Software, Scrittura — revisione e modifica; **Kevin McKernan:** Concettualizzazione, Analisi formale, Indagine, Metodologia, Risorse, Scrittura — bozza originale, Scrittura — revisione e modifica.

Dichiarazione di divulgazione

Kevin McKernan è dipendente della Medicinal Genomics e ha fornito gratuitamente i reagenti qPCR e Qubit". Gli autori non hanno segnalato alcun potenziale conflitto di interessi.

Finanziamenti

Questo progetto è stato autofinanziato con reagenti forniti da Kevin McKernan.

ORCID

David J. Speicher <http://orcid.org/0000-0002-1745-3263>
 Jessica Rose <http://orcid.org/0000-0002-9091-4425> Kevin
 McKernan <http://orcid.org/0000-0002-3908-1122>

Dichiarazione di disponibilità dei dati

File FASTQ per i dati di sequenziamento ONT mappati: <https://mega.nz/file/UZhkiTBQ#8vjDKñJV5N5Dj2On34B6zdRObEKGBY3ZC7wflq2t9UVc>

Riferimenti

- [1] de Fougères A, Elbashir SM. Consegna e formulazione di acidi nucleici ingegnerizzati. Ufficio brevetti e marchi degli Stati Uniti, Modernatx, Inc; 2021. <https://patents.google.com/patent/US1089S574B2/en>, <https://patentimages.storage.googleapis.com/29/f1/5c/fda42b8d8dd5ca/US1089S574.pdf>
- [2] Guetzkow JA, Levi R. L'effetto dei processi di produzione dei vaccini a mRNA sull'efficacia e la sicurezza è ancora una questione aperta. *BMJ*. 2023;378:o1731.
- [3] Rabe I, Buff M, Ziegenhals N. Tecnologie di trascrizione in vitro. Ufficio brevetti e marchi degli Stati Uniti; 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/03/aa/75/b6d7d299ñc9653/US20230183769A1.pdf>
- [4] Sutton DH, Conn GL, Brown T, et al. La dipendenza dell'attività della DNasi I dalla conformazione degli oligodeossinucleotidi. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 2):4fi1—4fi6. doi: [10.1042/bj32104b1](https://doi.org/10.1042/bj32104b1)
- [5] Thorn CR, Sharma D, Combs R, et al. Il viaggio di una vita: lo sviluppo del vaccino COVID-19 di Pfizer. *Curr Opin Biotechnol*. 2022;78:102803. doi: [10.1016/j.copbio.2022.102803](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102803)
- [6] Tinari S. La fuga di dati sull'EMA covid-19 e cosa ci dice sull'instabilità dell'mRNA. *BMJ*. 2021;372:n627. doi: [10.1136/bmj.n627](https://doi.org/10.1136/bmj.n627)
- [7] EMEA/H/C/005735/RR. Relazione di valutazione critica del relatore: aspetti qualitativi. Agenzia europea per i medicinali; 2020. <https://covidvaccinereactions.com/ema-pfizer-leak/>
- [8] McKernan K, Helbert Y, Kane LT, et al. Il sequenziamento dei vaccini bivalenti a mRNA di Moderna e Pfizer rivela quantità da nanogrammi a microgrammi di vettore di espressione dsDNA per dose. *OSFio*. 2023. doi: [10.31219/osf.io/b9t7m](https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m). https://osf.io/preprints/osf/b9t7m_v1
- [9] Shimabukuro TT, Nguyen M, Martin D, et al. Monitoraggio della sicurezza nel sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS). *Vaccine*. 2015;33(36):4398—4405. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.035)
- [10] Speicher DJ, Rose J, Gutschi LM, et al. Frammenti di DNA rilevati nei vaccini monovalenti e bivalenti Pfizer/BioNTech e Moderna modRNA COVID-19 dell'Ontario, Canada: relazione esplorativa dose-risposta con eventi avversi gravi. *OSF Preprints*; 2023. doi: [10.31219/osf.io/mjc97](https://doi.org/10.31219/osf.io/mjc97). https://osf.io/preprints/osf/mjc97_v1
- [11] Consiglio internazionale per l'armonizzazione (ICH). Q6B: specifiche: procedure di prova e criteri di accettazione per prodotti biotecnologici/biologici; 1999. Estratto da <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>
- [12] Food and Drug Administration. Informazioni relative alla chimica, alla produzione e al controllo (CMC) per le domande di autorizzazione all'uso sperimentale di nuovi farmaci (IND) per la terapia genica umana. Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti; 2020. Estratto da <https://www.fda.gov/media/113760/download>.
- [13] Agenzia della sanità pubblica del Canada. Catalogo nazionale dei vaccini: lotto di vaccini. 2024. Tratto da <https://nvc-cnv.canada.ca/en/vaccine-lots>
- [14] Team VAERS. Procedura operativa standard del Sistema di segnalazione degli eventi avversi da vaccino (VAERS) per COVID-19 (al 29 gennaio 2021). Estratto da <https://www.cdc.gov/vaccinesafety/pdf/VAERS-v2-SOP.pdf>
- [15] Port Hedland. Australia - ordine del giorno della riunione straordinaria del consiglio comunale - 11 ottobre 2024 allegati. Consiglio comunale di Port Hedland; 2024. Tratto da <https://www.porthedland.wa.gov.au/council-meetings/>

- riunioni-speciali-del-consiglio/riunione-speciale-del-consiglio-11-ottobre-2024/247/documenti/allegati_scm_11102024.pdf
- [16] Dean DA, Dean BS, Muller S, et al. Requisiti di sequenza per l'importazione nucleare dei plasmidi. *Exp Cell Res.* 1999;253(2):713—722. doi: 10.1006/excr.1999.4716
- [17] New England Biolabs. NEBioCalculator; 2023.
- [18] R Development Core Team. R: Il progetto R per l'elaborazione statistica. R Foundation for Statistical Computing; 2010. Estratto da <http://www.R-project.org>
- [19] Li H, Durbin R. Allineamento veloce e accurato di letture brevi con la trasformata di Burrows-Wheeler. *Bioinformatica.* 2009;25(14):1754—1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- [20] Shin J, Wood D, Robertson J, et al. Consultazione informale dell'OMS sull'applicazione dei metodi molecolari per garantire la qualità, la sicurezza e l'efficacia dei vaccini, Ginevra, Svizzera, 7-8 aprile 2005. *Biologicals.* 2007;35(1):63—71. doi: 10.1016/j.biologicals.2005.12.005
- [21] Ban E, Kim A. Test PicoGreen per la quantificazione dell'acido nucleico - Applicazioni, sfide e soluzioni. *Anal Biochem.* 2024;692:115577. doi: 10.1016/j.ab.2024.115577
- [22] Team VAERS. Guida per gli utenti dei dati VAERS; 2020. Estratto da <https://vaers.hhs.gov/docs/VAERSDataUseGuideNovember2020.pdf>
- [23] Senato della Carolina del Sud. Audizione del Senato della Carolina del Sud - Prof. Phillip Buckhaults, USC; 2023.
- [24] König B., Kirchner, J.O. Considerazioni metodologiche relative alla quantificazione delle impurità del DNA nel vaccino a mRNA Comirnaty contro il COVID-19". *Methods Protoc.* 2024, 7(41):1-S. doi: 10.3390/mps7030041
- [25] Kämmerer U, Schulz V, Steger K. Le iniezioni COVID-19 a base di RNA di BioNTech contengono grandi quantità di DNA residuo, compresa una sequenza promotrice/potenziatrice SV40. *Science, Public Health Policy and the Law,* 5 :1-22. Tratto da <https://publichealthpolicyjournal.com/biontech-rna-based-covid-19-inject-ions-contain-large-amounts-of-residual-dna-including-an-sv40-promoter-enhancer-sequence/>
- [26] Wang TJ, Kim A, Kim K. Un metodo di rilevamento rapido del DNA plasmidico competente alla replicazione dai vaccini a mRNA COVID-19 per il controllo di qualità. *J High School Sci.* 2024;fi(4):427—439. doi: 10.64336/001c.127890
- [27] Agenzia europea per i medicinali .EMA/896245/2022: Relazione di valutazione per Spikevax. 2022 Estratto da https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-h-c-005791-ii-0075-g-e-par-assessment-report-variation_en.pdf
- [28] Food and Drug Administration degli Stati Uniti. Autorizzazione all'uso di emergenza (EUA) per un memorandum di revisione di un prodotto non approvato. 2021. Estratto da <https://www.fda.gov/media/153947/download>
- [29] Food and Drug Administration. Lettera di autorizzazione; 2023. Estratto da <https://www.fda.gov/media/150356/download>
- [30] Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti. Ispezione dei prodotti iniettabili per particelle visibili - Linee guida per l'industria, 2021. Tratto da <https://www.fda.gov/media/154h68/download>
- [31] Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, et al. Un nuovo meccanismo per la perdita di attività dell'mRNA nei sistemi di somministrazione di nanoparticelle lipidiche. *Nat Commun.* 2021;12(1):6777. doi: 10.1038/s41467-021-26926-0
- [32] Hashiba K, Taguchi M, Sakamoto S, et al. Superare le sfide della termostabilità nei sistemi di nanoparticelle lipidiche mRNA con lipidi ionizzabili a base di piperidina. *Commun Biol.* 2024;7(1):556. doi: 10.1038/s42003-024-06275-0
- [33] Bushon RN, Kephart CM, Koltun GF, 3rd, et al. Valutazione statistica della variabilità dei lotti di reagenti per l'estrazione del DNA nella PCR quantitativa in tempo reale. *Lett Appl Microbiol.* 2010;S0(3):276—282. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02758.x
- [34] EMEA/H/C/00S735/0000. Comirnaty European Public Assessment Report (EPAR). 2021. Estratto da https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
- [35] Agenzia europea per i medicinali. EMA/CHMP/50784/2022: relazione sulla variazione di tipo IB; 2022. Tratto da <https://postvac.org/wp-content/uploads/wpforo/attachments/3025/1252-Type-IB-variation-report.pdf>
- [36] Oldfield PR, Gutschi LM, McCullough PA, et al. Vaccini modRNA COVID-19 di Pfizer/BioNTech: meccanismo d'azione genetico pericoloso rilasciato prima di test preclinici sufficienti. *J Am Phys Surgeons.* 2024;29:118—126.
- [37] Greenhawt M, Abrams EM, Shaker M, et al. Il rischio di reazioni allergiche ai vaccini SARS-CoV-2 e la valutazione e la gestione raccomandate: una revisione sistematica, una meta-analisi, una valutazione GRADE e un approccio di consenso internazionale. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021;9(10):3546—3567. doi: 10.1016/j.jaip. 2021.06.006
- [38] Song J, Su D, Wu H, et al. Implicazioni dell'anafilassi a seguito di vaccini mRNA-LNP: è urgente eliminare il PEG e trovare alternative. *Farmaceutica.* 2025;17(6):798. doi: 10.3390/pharmaceutics17060798
- [39] Wiseman DM, Gutschi LM, Speicher DJ, et al. Il frameshifting ribosomiale e la lettura errata dell'mRNA nei vaccini COVID-19 producono proteine "off-target" e risposte immunitarie che suscitano preoccupazioni in termini di sicurezza: commento allo studio britannico di Mulroney et al. *OSF Preprints;* 2023. Tratto da [10.31219/osf.io/nt8jh](https://doi.org/10.31219/osf.io/nt8jh)
- [40] Mulroney TE, Pöyry T, Yann-Puc JC, et al. La N1-metilpseudouridilazione dell'mRNA causa uno spostamento del frame ribosomiale +1. *Nature.* 2024;625(7993):189-194. doi: 10.1038/s41586-023-06800-3
- [41] Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M, et al. Review: ri 1-metil-pseudouridina (m1'1'): amica o nemica del cancro? *Int J Biol Macromol.* 2024;267(Pt 1):131427. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131427

- [42] Bhattacharjee B, Lu P, Monteiro VS, et al. Segni immunologici e antigenici associati a malattie croniche dopo la vaccinazione contro il COVID-19. medRxiv. 2025. 2025.02.18.25322379; doi: 10.1101/2025.02.18.25322379 Stati G ,
- [43] Amerio P , Nubile M , et al. Preoccupazioni sull'efficacia della tecnologia di vaccinazione a mRNA e sulla sua sicurezza a lungo termine: potenziale interferenza sul meccanismo dei miRNA. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1404. doi: 10.3390/ijms24021404
- [44] Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, et al. Impatto della chimica dell'mRNA e del processo di produzione sull'attivazione del sistema immunitario innato. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaaz6893. doi: 10.1126/sciadv.aaz6893
- [45] Milano G, Gal J, Creisson A, et al. Miocardite e vaccini a mRNA contro il COVID-19: un'ipotesi meccanicistica che coinvolge il dsRNA. *Future Virol.* 2022, 17:191—196 doi: 10.2217/fvl-2021-0280
- [46] Samsudin F, Raghuvamsi P, Petruk G, et al. La proteina spike SARS-CoV-2 come sistema di rilascio di lipopolisaccaridi batterici in una cascata infiammatoria eccessiva. *J Mol Cell Biol.* 2023;14: 1—14.
- [47] Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Sicurezza dipendente dal lotto del vaccino BNT 162b2 mRNA COVI D-19. *Eur J Clin Invest.* 2023;53(8):e 13998. doi: 10.1111/eci.13995
- [48] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, et al. Importazione nucleare specifica per cellula del DNA plasmidico. *Gene Ther.* 1999;6(6):1006—1014. doi: 10.1038/sj.gt.3300924
- [49] Lim S, Yocum RR, Silver PA, et al. Elevati tassi di integrazione spontanea di DNA lineare modificato alle estremità in seguito a trasfezione di cellule di mammifero. *Sci Rep.* 2023;13(1):6835. doi: 10.1038/s41598-023-33862-0
- [50] Gaitzsch E, Czermak T, Ribeiro A, et al. Il DNA a doppio filamento induce un fenotipo protrombotico nell'endotelio vascolare. *Sci Rep.* 2017;7(1):1112. doi: 10.1038/s41598-017-01148-x
- [51] Ma X, Xin D, She R, et al. Nuove intuizioni sul percorso cGAS-STING nell'ictus ischemico: dalla fase pre-malattia alla fase post-malattia. *Front Immunol.* 2023;14:1275408. doi: 10.3389/fimmu.2023.1275408
- [52] Kwon J, Bakhoun SF. Il percorso cGAS-STING di rilevamento del DNA citosolico nel cancro. *Cancer Discov.* 2020;10(1):26—39. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0761
- [53] Matthessen R, Van Pottelberge R, Goffin B, et al. Impatto della miscelazione e dell'agitazione sulle caratteristiche qualitative dei farmaci mRNA-LNP. *Sci Rep.* 2024;14(1): 19590. doi: 10.1038/s41598-024-70650-4
- [54] Georgiou CD, Papapostolou I, Grintzalis K. Protocollo per la valutazione quantitativa della concentrazione e del danno al DNA (frammentazione e tagli). *Nat Protoc.* 2009;4(2):125—131. doi: 10.1038/nprot.2005.222 Kaiser S , Kaiser S , Reis J , et al. Quantificazione delle concentrazioni oggettive di impurità del DNA nei vaccini a mRNA. *Vaccine.* 2025;S5:127022. doi: 10.1016/j.vaccine.2025.127022
- [55] Organizzazione Mondiale della Sanità. Allegato 3: requisiti per l'uso di colture cellulari animali come substrati per la produzione di medicinali biologici e la caratterizzazione delle banche cellulari. Sostituzione dell'Allegato 1 della Serie di rapporti tecnici dell'OMS n. 878; 2013. Estratto da https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/documents/trs_978_annex_3.pdf
- [56] Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. Problemi associati al DNA residuo del substrato cellulare nei vaccini virali. *Prodotti biologici.* 2009;37(3): 190—195. doi: 10.1016/j.biologica.2009.02.015
- [57] Di J, Du Z, Wu K, et al. Biodistribuzione ed espressione genica non lineare delle LNP di mRNA influenzate dalla via di somministrazione e dalla dimensione delle particelle. *Pharm Res.* 2022;39(1):10S—114. doi: 10.1007/s 11095-022-03166-5
- [58] Phua KK, Leons KW, Nair SK. Efficienza di trasfezione e cinetica di espressione del transgene dell'mRNA somministrato in formato nudo e nanoparticellare. *J Control Release.* 2013;166(3):227—233. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.029
- [59] Turnbull IC, Eltoukhy AA, Fish KM, et al. Il rilascio miocardico di nanoparticelle lipidoidi che trasportano modRNA induce un'espressione rapida e transitoria. *Mol Ther.* 2016;24(1):66—75. doi: 10.1038/mt.2015.193
- [60] Ufficio del Primo Ministro del Giappone. Vaccini COVID-19; 2024. <https://japan.kantei.go.jp/ongoingtopics/vaccine.htm>
- [61] Klinman DM, Klaschik S, Tross D, et al. Linee guida della FDA sui vaccini profilattici a DNA: analisi e raccomandazioni. *Vaccine.* 2010;28(16):2801—2805. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.025
- [62] André M, Reghin S, Boussard E, et al. Test PCR universale in tempo reale per la quantificazione e la valutazione delle dimensioni del DNA cellulare residuo nei vaccini virali umani. *Biologicals.* 2016;44(3):139—149. doi: 10.1016/j.biologicals. 2016.03.002
- [63] Senigl F, Soikkeli AI, Prost S, et al. L'enhancer del virus SV40 funziona come un elemento che mira all'ipermutazione somatica con potenziale attività tumorigenica. *Tumour Virus Res.* 2024; 18:200293. doi: 10.1016/j.tvr.2024.200293
- [64] Drayman N, Ben-Nun-Shaul O , Butin-Israeli V , et al. L'aumento di p53 nelle cellule umane blocca l'infezione da SV40 inibendo l'espressione di T-ag. *Oncotarget.* 2016;7(33):S2643—S2660. doi: 10.18632/oncotarget.10769
- [65]

Impfstoff ausgelöste Immunantwort. Es wurde beobachtet, dass die GMT 1 Monat nach Dosis 3 wesentlich höher waren und 1 Monat nach Dosis 4 weiter anstiegen und auch 6 Monate nach Dosis 4 hoch blieben, verglichen mit den Werten, die vor der Studienimpfung in allen Altersgruppen und Krankheitsuntergruppen beobachtet wurden.

Kinder und Jugendliche

Die Europäische Arzneimittel-Agentur hat für Comirnaty eine Zurückstellung von der Verpflichtung zur Vorlage von Ergebnissen zu Studien in einer oder mehreren pädiatrischen Altersklassen in der Vorbeugung von COVID-19 gewährt (siehe Abschnitt 4.2 bzgl. Informationen zur Anwendung bei Kindern und Jugendlichen).

5.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Nicht zutreffend.

5.3 Präklinische Daten zur Sicherheit

Nichtklinische Daten zeigten auf der Grundlage konventioneller Studien zur Toxizität bei wiederholter Verabreichung sowie zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität keine besondere Gefahr für den Menschen.

Allgemeine Toxizität

Ratten, denen intramuskulär Comirnaty verabreicht wurde (Gabe von 3 vollen Humandosen einmal wöchentlich, die bei Ratten aufgrund von Körpergewichtsunterschieden relativ höhere Werte erzeugen), zeigten an der Injektionsstelle Ödeme und Erytheme und einen Anstieg der weißen Blutkörperchen (einschließlich basophile und eosinophile Leukozyten), die mit einer Entzündungsreaktion übereinstimmen, sowie eine Vakuolisierung der portalen Hepatozyten ohne Anzeichen einer Leberschädigung. Alle Effekte waren reversibel.

Genotoxizität/Karzinogenität

Es wurden weder Genotoxizitäts- noch Karzinogenitätsstudien durchgeführt. Es wird nicht erwartet, dass die Bestandteile des Impfstoffs (Lipide und mRNA) ein genotoxisches Potential haben.

Reproduktionstoxizität

Die Reproduktions- und Entwicklungstoxizität wurde an Ratten in einer kombinierten Fertilitäts- und Entwicklungstoxizitätsstudie untersucht, bei der weiblichen Ratten Comirnaty vor der Paarung und während der Gravidität intramuskulär verabreicht wurde (Gabe von 4 vollen Humandosen, die bei Ratten aufgrund von Körpergewichtsunterschieden relativ höhere Dosen erzeugen, und sich zwischen dem Tag 21 vor der Paarung und dem Tag 20 der Gravidität erstreckten). SARS-CoV-2 neutralisierende Antikörperreaktionen waren bei den mütterlichen Tieren von vor der Paarung bis zum Ende der Studie am postnatalen Tag 21 sowie bei den Föten und Nachkommen vorhanden. Es gab keine impfstoffbedingten Auswirkungen auf die weibliche Fertilität, die Trächtigkeit oder die Entwicklung des Embryos und Fötus oder der Nachkommen. Es liegen keine Daten zu Comirnaty zum Plazentatransfer des Impfstoffs oder zur Ausscheidung in der Milch vor.

6. PHARMAZEUTISCHE ANGABEN

6.1 Liste der sonstigen Bestandteile

((4-Hydroxybutyl)azandiyl)bis(hexan-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoat) (ALC-0315)
2-[(Polyethylenglykol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamid (ALC-0159)
Colfoscerilstearat (DSPC)

Genotossicità/Potenziale cancerogeno

Non sono stati condotti studi di genotossicità o sul potenziale cancerogeno. Si ritiene che i componenti del vaccino (lipidi e mRNA) non presentino alcun potenziale genotossico.

Tossicità della riproduzione

La valutazione della tossicità della riproduzione e dello sviluppo è stata condotta nei ratti nel corso di uno studio combinato di fertilità e tossicità dello sviluppo, durante il quale femmine di ratto hanno ricevuto Comirnaty per via intramuscolare prima dell'accoppiamento e durante la gestazione (4 dosi complete destinate all'uomo, che generavano livelli relativamente più elevati nei ratti a causa delle differenze di peso corporeo, somministrate dal giorno 21 precedente all'accoppiamento fino al giorno 20 della gestazione). Sono state osservate risposte anticorpali neutralizzanti verso SARS-CoV-2 nelle madri animali da prima dell'accoppiamento al termine dello studio al giorno 21 dopo la nascita, così come nei feti e nella prole. Non si sono verificati effetti correlati al vaccino in termini di fertilità nelle femmine, gravidanza, sviluppo embrionale/fetale o sviluppo della prole. Non sono disponibili dati su Comirnaty relativi al trasferimento placentare o all'escrezione nel latte materno del vaccino.

6. INFORMAZIONI FARMACEUTICHE

6.1 Elenco degli eccipienti

((4-idrossibutil)azanediil)bis(esano-6,1-diil)bis(2-esildecanoato) (ALC-0315)

2-[(polietilenglicole)-2000]-N,N-ditetradecilacetammide (ALC-0159)

1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfolina (DSPC)

Colesterolo

Trometamolo

Trometamolo cloridrato

Saccarosio

Acqua per preparazioni iniettabili

6.2 Incompatibilità

Questo medicinale non deve essere miscelato con altri medicinali.

6.3 Periodo di validità

Flaconcini

Flaconcini chiusi

Il vaccino sarà fornito congelato a una temperatura compresa tra -90 °C e -60 °C.

Alla ricezione, il vaccino congelato può essere conservato a una temperatura compresa tra -90 °C e -60 °C oppure tra 2 °C e 8 °C.

Quando conservati a una temperatura compresa tra -90 °C e -60 °C il periodo di validità è 18 mesi. Durante il periodo di validità di 18 mesi, dopo lo scongelamento, i flaconcini (precedentemente congelati) possono essere conservati per un massimo di 10 settimane a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Procedura di scongelamento

Flaconcini monodose

Se conservate congelate a una temperatura compresa tra -90 °C e -60 °C, le confezioni da 10 flaconcini monodose di vaccino possono essere scongelate a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per 2 ore, oppure è possibile scongelare i singoli flaconcini a temperatura ambiente (non superiore a 30 °C) per 30 minuti.

CORRESPONDENCE

Open Access



1-year risks of cancers associated with COVID-19 vaccination: a large population-based cohort study in South Korea

Hong Jin Kim^{1†} , Min-Ho Kim^{2†} , Myeong Geun Choi³ and Eun Mi Chun^{3*}

Abstract

The oncogenic potential of SARS-CoV-2 has been hypothetically proposed, but real-world data on COVID-19 infection and vaccination are insufficient. Therefore, this large-scale population-based retrospective study in Seoul, South Korea, aimed to estimate the cumulative incidences and subsequent risks of overall cancers 1 year after COVID-19 vaccination. Data from 8,407,849 individuals between 2021 and 2023 were obtained from the Korean National Health Insurance database. The participants were categorized into two groups based on their COVID-19 vaccination status. The risks for overall cancer were assessed using multivariable Cox proportional hazards models, and data were expressed as hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). The HRs of thyroid (HR, 1.351; 95% CI, 1.206–1.514), gastric (HR, 1.335; 95% CI, 1.130–1.576), colorectal (HR, 1.283; 95% CI, 1.122–1.468), lung (HR, 1.533; 95% CI, 1.254–1.874), breast (HR, 1.197; 95% CI, 1.069–1.340), and prostate (HR, 1.687; 95% CI, 1.348–2.111) cancers significantly increased at 1 year post-vaccination. In terms of vaccine type, cDNA vaccines were associated with the increased risks of thyroid, gastric, colorectal, lung, and prostate cancers; mRNA vaccines were linked to the increased risks of thyroid, colorectal, lung, and breast cancers; and heterologous vaccination was related to the increased risks of thyroid and breast cancers. Given the observed associations between COVID-19 vaccination and cancer incidence by age, sex, and vaccine type, further research is needed to determine whether specific vaccination strategies may be optimal for populations in need of COVID-19 vaccination.

Keywords Cancer, COVID-19, Vaccine, mRNA-based vaccine, cDNA-based vaccine

To the editor

Since the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in December 2019, it has become a global concern because of the lack of preventive and treatment options. It is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is linked to high morbidity and mortality among the elderly [1, 2]. With the rapid development of COVID-19 vaccines, the fatal complications caused by COVID-19 have been alleviated; however, several other issues, including adverse events related to vaccines have emerged [3–6].

[†]Hong Jin Kim and Min-Ho Kim contributed equally, as the co-first authors.

*Correspondence:

Eun Mi Chun
cem@ewha.ac.kr

¹Department of Orthopedic Surgery, Kyung-in Regional Military Manpower Administration, Suwon, Korea

²Informatization Department, Ewha Womans University Seoul Hospital, Seoul, Republic of Korea

³Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Ewha Womans University Mokdong Hospital, 1071, Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Republic of Korea



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Similar to other viruses, such as human papillomavirus and Epstein–Barr virus, SARS-CoV-2 shows an oncogenic potential, which has been hypothetically proposed based on its mechanisms of action, including the renin–angiotensin–aldosterone system, viral mutagenicity, and inflammatory cascade [7]. Given the shared structures, such as the spike protein in COVID-19 vaccines, we further hypothesized that COVID-19 vaccines might potentially be associated with cancer risks; however, real-world data are insufficient [8]. In this population-based retrospective study, we estimated the cumulative incidences and risks of cancers 1 year after COVID-19 vaccination. In the South Korean cohort of 8,407,849 individuals between 2021 and 2023, we finally included 595,007 and 2,380,028 individuals after the 1:4 propensity score matching (PSM). For the vaccinated population, 355,896 and 711,792 individuals were included in the non-booster and booster groups, after the 1:2 PSM. The measured outcomes were cumulative incidences and corresponding risks of cancers at one year after COVID-19 vaccination, which was also stratified by the types of vaccine, sex and age (Additional File 1).

Our data showed associations between COVID-19 vaccination and an increased the risk of six cancer types, namely, thyroid (hazard ratio [HR], 1.35; 95% confidence interval [CI], 1.21–1.51), gastric (HR, 1.34; 95% CI, 1.13–1.58), colorectal (HR, 1.28; 95% CI, 1.12–1.47), lung (HR, 1.533; 95% CI, 1.25–1.87), breast (HR, 1.20; 95% CI, 1.07–1.34), and prostate (HR, 1.69; 95% CI, 1.35–2.11) cancers (Fig. 1 and Additional File 2). In terms of vaccine type, cDNA vaccines were associated with the increased risks of thyroid, gastric, colorectal, lung, and prostate

cancers; mRNA vaccines were linked to the increased risks of thyroid, colorectal, lung, and breast cancers; and heterologous vaccination was related to the increased risks of thyroid and breast cancers. Meanwhile, vaccinated males were more vulnerable to gastric and lung cancers, whereas vaccinated females were more susceptible to thyroid and colorectal cancers. In terms of age stratification, the relatively younger population (individuals under 65 years) was more vulnerable to thyroid and breast cancers; by comparison, the older population (75 years and older) was more susceptible to prostate cancer (Additional File 3). Booster doses substantially affected the risk of three cancer types in the vaccinated population: gastric and pancreatic cancers (Table 1). Our findings highlighted various cancer risks associated with different COVID-19 vaccine types.

Given the limited availability of real-world data, our population-based cohort study in Seoul, South Korea suggested epidemiological associations between the cumulative incidence of cancers and COVID-19 vaccination, which varied by sex, age, and vaccine type. However, further studies are warranted to elucidate potential causal relationships, including the underlying molecular mechanisms related to COVID-19 vaccine-induced hyperinflammation.

The concept of a booster dose involves re-exposure to the immunizing antigen to enhance immunity [9]. The protective effect of COVID-19 vaccination diminishes over time; as such, further booster doses are needed to restore immunity [9, 10]. Given the decreasing severity of COVID-19, current concerns regarding the COVID-19 vaccine primarily revolve around AEs even with booster

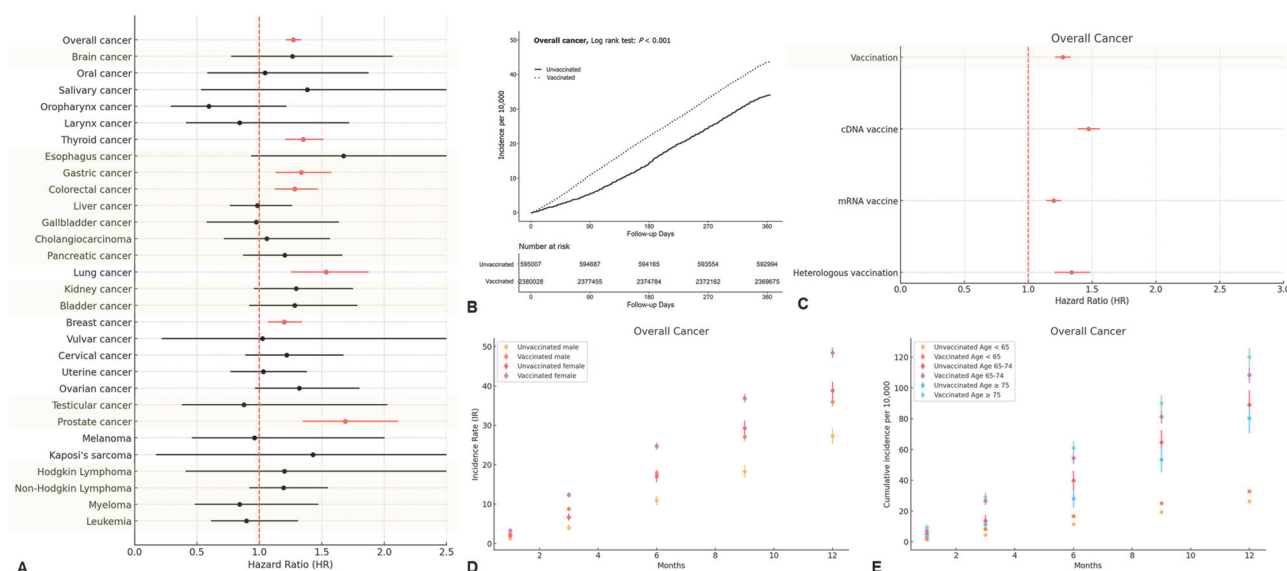


Fig. 1 Risks of cancers associated with COVID-19 vaccines. (A) Hazard ratio of overall and 29 different types of cancers; (B) Cumulative incidences of overall cancers; (C) Hazard ratio of overall cancers according to the vaccine types; (D) Cumulative incidences of overall cancers stratified by sex; (E) Cumulative incidences of overall cancers stratified by age

Table 1 Risk of cancers for the matched vaccinated cohort according to the booster doses of COVID-19 vaccine

Cancer	HR (95% CI)	P-value	Cancer	HR (95% CI)	P-value
Overall cancer	1.01 (0.95–1.06)	0.803	Kidney cancer	0.92 (0.67–1.28)	0.618
Brain cancer	1.24 (0.68–2.27)	0.478	Bladder cancer	1.21 (0.81–1.82)	0.352
Oral cancer	0.94 (0.52–1.69)	0.839	Breast cancer	1.01 (0.89–1.13)	0.932
Salivary cancer	0.67 (0.28–1.59)	0.364	Vulvar cancer	0.34 (0.06–2.02)	0.233
Oropharynx cancer	0.80 (0.36–1.76)	0.578	Cervical cancer	1.27 (0.83–1.93)	0.274
Larynx cancer	0.93 (0.34–2.50)	0.877	Uterine cancer	0.86 (0.61–1.20)	0.360
Thyroid cancer	0.91 (0.79–1.03)	0.139	Ovarian cancer	0.88 (0.63–1.23)	0.449
Esophagus cancer	1.21 (0.58–2.54)	0.609	Testicular cancer	0.67 (0.15–3.01)	0.605
Gastric cancer	1.23 (1.01–1.50)	0.041	Prostate cancer	1.26 (0.95–1.66)	0.104
Colorectal cancer	1.00 (0.86–1.18)	0.962	Melanoma	1.00 (0.38–2.66)	0.997
Liver cancer	1.17 (0.85–1.62)	0.334	Kaposi's sarcoma	N/A (no event)	N/A
Gallbladder cancer	0.68 (0.38–1.21)	0.186	Hodgkin lymphoma	3.01 (0.36–25.01)	0.308
Cholangiocarcinoma	1.55 (0.92–2.60)	0.097	Non-Hodgkin lymphoma	0.76 (0.57–1.00)	0.053
Pancreatic cancer	2.25 (1.44–3.50)	< 0.001	Myeloma	0.58 (0.31–1.07)	0.080
Lung cancer	0.96 (0.78–1.17)	0.677	Leukemia	0.56 (0.35–0.92)	0.020

Bold indicates the data for the statistical significance. HR, hazard ratio; CI, confidence interval

shots. Considering the significantly higher risk of gastric cancer in vaccinated individuals than in unvaccinated individuals, clinicians should prioritize monitoring the risk of gastric cancer in relation to COVID-19 booster doses.

In conclusion, COVID-19 vaccination could be associated with an increased risk of six specific cancer types, including thyroid, gastric, colorectal, lung, breast, and prostate cancers. Notably, this COVID-19 vaccination-associated cancer risk was likely more elevated among individuals aged ≤ 65 years except in individuals with prostate cancer. Given the observed associations between COVID-19 vaccination and cancer incidence by age, sex, and vaccine type, further research is needed to determine whether specific vaccination strategies may be optimal for populations in need of COVID-19 vaccination.

Abbreviations

COVID-19	Coronavirus disease 2019
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
PSM	Propensity score matching
HR	Hazard ratio
CI	Confidence interval

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00831-w>.

- Supplementary Material 1
- Supplementary Material 2
- Supplementary Material 3

Acknowledgements

None.

Author contributions

E.M.C. had full access to all of the data in the study and took responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors (H.J.K., M.-H.K., M.G.C., and E.M.C.) approved the final version before submission. Study concept and design: H.J.K. and E.M.C.; Acquisition, analysis, or interpretation of data: H.J.K., M.-H.K.; Drafting of the manuscript: H.J.K., and M.-H.K.; Critical revision of the manuscript for important intellectual content: H.J.K., M.-H.K., M.G.C., and E.M.C.; Statistical analysis: H.J.K., and M.-H.K.; Study supervision: E.M.C. E.M.C. is guarantor for this study. H.J.K. and M.-H.K. were contributed equally, as co-first authors. The corresponding author attests that all listed authors meet authorship criteria and that no others meeting the criteria have been omitted.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from National Health Insurance Service in South Korea but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of National Health Insurance Service, South Korea.

Declarations

Ethical approval and consent to participate

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of our institute (IRB No.: EUMC 2023-07-003), which waived the requirement for informed consent because data analyses were performed retrospectively using anonymized data derived from the South Korean NHIS database.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 11 July 2025 / Accepted: 21 August 2025

Published online: 26 September 2025

References

1. Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M, Hasell J, Appel C, et al. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nat Hum Behav.* 2021;5:947–53.
2. Narayanan SA, Jamison DA Jr, Guarnieri JW, Zaksas V, Topper M, Koutnik AP, et al. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, part 2: host extracellular to systemic effects of SARS-CoV-2 infection. *Eur J Hum Genet.* 2024;32:10–20.
3. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol.* 2021;21:626–36.
4. Xie Y, Choi T, Al-Aly Z. Postacute sequelae of SARS-CoV-2 infection in the Pre-Delta, delta, and Omicron eras. *N Engl J Med.* 2024;391:515–25.
5. Kim HJ, Kim MH, Park SJ, Choi MG, Chun EM. Autoimmune adverse event following COVID-19 vaccination in seoul, South Korea. *J Allergy Clin Immunol.* 2024;153:1711–20.
6. Kim HJ, Kim MH, Choi MG, Chun EM. Psychiatric adverse events following COVID-19 vaccination: a population-based cohort study in seoul, South Korea. *Mol Psychiatry.* 2024. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02627-0>.
7. Jahankhani K, Ahangari F, Adcock IM, Mortaz E. Possible cancer-causing capacity of COVID-19: is SARS-CoV-2 an oncogenic agent? *Biochimie.* 2023;213:130–8.
8. Chen J, Dai L, Barrett L, James J, Plaisance-Bonstaff K, Post SR, et al. SARS-CoV-2 proteins and anti-COVID-19 drugs induce lytic reactivation of an oncogenic virus. *Commun Biol.* 2021;4:682.
9. Chenchula S, Karunakaran P, Sharma S, Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *J Med Virol.* 2022;94:2969–76.
10. Wu N, Joyal-Desmarais K, Vieira AM, Sanuade C, Jagwani M, Paquet L, et al. COVID-19 boosters versus primary series: update to a living review. *Lancet Respir Med.* 2023;11:e87–8.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

KORRESPONDENZ

Open Access



1-Jahres-Risiko für Krebserkrankungen im Zusammenhang mit COVID-19-Impfungen: eine groß angelegte Bevölkerungsbasierte Kohortenstudie in Südkorea

Hong Jin Kim^{1†} , Min-Ho Kim^{2†} , Myeong Geun Choi³ und Eun Mi Chun^{3*}

Zusammenfassung

Das onkogene Potenzial von SARS-CoV-2 wurde hypothetisch vorgeschlagen, aber es gibt nur unzureichende Daten aus der Praxis zu COVID-19-Infektionen und Impfungen. Daher zielte diese groß angelegte bevölkerungsbasierte retrospektive Studie in Seoul, Südkorea, darauf ab, die kumulativen Inzidenzen und nachfolgenden Risiken für Krebserkrankungen insgesamt ein Jahr nach der COVID-19-Impfung zu schätzen. Daten von 8.407.849 Personen zwischen 2021 und 2023 wurden aus der Datenbank der koreanischen Krankenversicherung bezogen. Die Teilnehmer wurden anhand ihres COVID-19-Impfstatus in zwei Gruppen eingeteilt. Die Risiken für Krebserkrankungen insgesamt wurden anhand multivariabler Cox-Proportional-Hazards-Modelle bewertet, und die Daten wurden als Hazard Ratios (HRs) und 95 %-Konfidenzintervalle (CIs) ausgedrückt. Die HRs für Schilddrüsenkrebs (HR, 1,351; 95 % CI, 1,206–1,514), Magenkrebs (HR, 1,335; 95 % CI, 1,130–1,576), Darmkrebs (HR, 1,283; 95 % CI, 1,122–1,468), Lungenkrebs (HR, 1,533; 95 % CI, 1,254–1,874), Brustkrebs (HR, 1,197; 95 % CI, 1,069–1,340) und Prostatakrebs (HR, 1,687; 95 % CI, 1,348–2,111) Krebserkrankungen nahmen ein Jahr nach der Impfung signifikant zu. In Bezug auf den Impfstofftyp waren cDNA-Impfstoffe mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen-, Magen-, Darm-, Lungen- und Prostatakrebs verbunden; mRNA-Impfstoffe waren mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen-, Darm-, Lungen- und Brustkrebs verbunden; und heterologe Impfungen waren mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen- und Brustkrebs verbunden. Angesichts der beobachteten Zusammenhänge zwischen COVID-19-Impfung und Krebsinzidenz nach Alter, Geschlecht und Impfstofftyp sind weitere Untersuchungen erforderlich, um festzustellen, ob bestimmte Impfstrategien für Bevölkerungsgruppen, die eine COVID-19-Impfung benötigen, optimal sein könnten.

Schlüsselwörter Krebs, COVID-19, Impfstoff, mRNA-basierter Impfstoff, cDNA-basierter Impfstoff

An den Herausgeber

Seit dem Ausbruch der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) im Dezember 2019 ausgebrochen ist, ist sie zu einem globalen Problem geworden.

aufgrund fehlender Präventions- und Behandlungsmöglichkeiten. Es wird durch das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) verursacht, das mit einer hohen Morbidität und Mortalität bei älteren Menschen verbunden ist [1, 2]. Mit der raschen Entwicklung von COVID-19-Impfstoffen konnten die durch COVID-19 verursachten tödlichen Komplikationen gemildert werden; jedoch sind mehrere andere Probleme aufgetreten, darunter unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit Impfstoffen [3–6].

[†]Hong Jin Kim und Min-Ho Kim haben als Co-Erstautoren gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

*Korrespondenz:

Eun Mi Chun cem@ewha.ac.kr

¹ Abteilung für Orthopädische Chirurgie, Kyung-in Regional Military Manpower Administration, Suwon, Korea

² Abteilung für Informatisierung, Ewha Womans University Seoul Hospital, Seoul, Republik Korea

³ Abteilung für Lungen- und Intensivmedizin, Abteilung für Innere Medizin, Ewha Womans University Mokdong Hospital, 1071, Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Republik Korea



© Die Autoren 2025. **Open Access** Dieser Artikel unterliegt einer Creative Commons Attribution 4.0 International License, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium und Format erlaubt, sofern Sie die ursprünglichen Autoren und die Quelle angemessen nennen, einen Link zur Creative Commons-Lizenz angeben und auf etwaige Änderungen hinweisen. Die Bilder oder anderen Materialien von Dritten in diesem Artikel sind in der Creative Commons-Lizenz des Artikels enthalten, sofern in einer Quellenangabe zu dem Material nichts anderes angegeben ist. Wenn Material nicht in der Creative Commons-Lizenz des Artikels enthalten ist und Ihre beabsichtigte Nutzung nicht durch gesetzliche Bestimmungen erlaubt ist oder über die erlaubte Nutzung hinausgeht, müssen Sie die Genehmigung direkt vom Urheberrechtinhaber einholen. Eine Kopie dieser Lizenz finden Sie unter <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Die Creative Commons Public Domain Dedication Waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) gilt für die in diesem Artikel zur Verfügung gestellten Daten, sofern in einer Quellenangabe zu den Daten nichts anderes angegeben ist.

Ähnlich wie andere Viren, beispielsweise das humane Papillomavirus und das Epstein-Barr-Virus, weist SARS-CoV-2 ein onkogenes Potenzial auf, das aufgrund seiner Wirkmechanismen, darunter das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, die virale Mutagenität und die Entzündungskaskade, hypothetisch angenommen wurde [7]. Angesichts der gemeinsamen Strukturen, wie beispielsweise dem Spike-Protein in COVID-19-Impfstoffen, stellten wir die weitere Hypothese auf, dass COVID-19-Impfstoffe möglicherweise mit Krebsrisiken in Verbindung stehen könnten; allerdings sind die Daten aus der Praxis unzureichend [8]. In dieser bevölkerungsbasierten retrospektiven Studie schätzten wir die kumulativen Inzidenzen und Risiken von Krebserkrankungen 1 Jahr nach der COVID-19-Impfung. In der südkoreanischen Kohorte von 8.407.849 Personen zwischen 2021 und 2023 haben wir schließlich 595.007 und 2.380.028 Personen nach dem 1:4 Propensity Score Matching (PSM) einbezogen. Bei der geimpften Population wurden nach dem 1:2-PSM 355.896 und 711.792 Personen in die Nicht-Booster- und Booster-Gruppen aufgenommen. Die gemessenen Ergebnisse waren die kumulativen Inzidenzen und entsprechenden Risiken für Krebserkrankungen ein Jahr nach der COVID-19-Impfung, die ebenfalls nach Impfstofftyp, Geschlecht und Alter stratifiziert wurden (Zusätzliche Datei 1).

Unsere Daten zeigten einen Zusammenhang zwischen der COVID-19-Impfung und einem erhöhten Risiko für sechs Krebsarten, nämlich Schilddrüsenkrebs (Hazard Ratio [HR], 1,35; 95 %-Konfidenzintervall [KI], 1,21–1,51), Magenkrebs (HR, 1,34; 95 %-KI, 1,13–1,58), Darmkrebs (HR, 1,28; 95 %-KI, 1,12–1,47), Lungenkrebs (HR, 1,533; 95 %-KI, 1,25–1,87), Brustkrebs (HR, 1,20; 95 %-KI, 1,07–1,34) und Prostatakrebs (HR, 1,69; 95 %-KI, 1,35–2,11) (Abb. 1 und Zusatzdatei 2). In Bezug auf den Impfstofftyp waren cDNA-Impfstoffe mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen-, Magen-, Darm-, Lungen- und Prostatakrebs verbunden.

Krebserkrankungen; mRNA-Impfstoffe wurden mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen-, Darm-, Lungen- und Brustkrebs in Verbindung gebracht; und heterologe Impfungen standen im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Schilddrüsen- und Brustkrebs. Gleichzeitig waren geimpfte Männer anfälliger für Magen- und Lungenkrebs, während geimpfte Frauen anfälliger für Schilddrüsen- und Darmkrebs waren. In Bezug auf die Altersschichtung war die relativ jüngere Bevölkerung (Personen unter 65 Jahren) anfälliger für Schilddrüsen- und Brustkrebs; im Vergleich dazu war die ältere Bevölkerung (75 Jahre und älter) anfälliger für Prostatakrebs (Zusätzliche Datei 3). Auffrischungsimpfungen hatten einen erheblichen Einfluss auf das Risiko für drei Krebsarten in der geimpften Bevölkerung: Magen- und Bauchspeicheldrüsenkrebs (Tabelle 1). Unsere Ergebnisse hoben verschiedene Krebsrisiken hervor, die mit unterschiedlichen COVID-19-Impfstofftypen verbunden sind.

Angesichts der begrenzten Verfügbarkeit von Daten aus der Praxis deutete unsere bevölkerungsbasierte Kohortenstudie in Seoul, Südkorea, auf epidemiologische Zusammenhänge zwischen der kumulativen Krebsinzidenz und der COVID-19-Impfung hin, die je nach Geschlecht, Alter und Impfstofftyp variierten. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um mögliche kausale Zusammenhänge aufzuklären, einschließlich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen im Zusammenhang mit der durch den COVID-19-Impfstoff induzierten Hyperinflammation.

Das Konzept einer Auffrischungsimpfung beinhaltet die erneute Exposition gegenüber dem immunisierenden Antigen, um die Immunität zu verstärken [9]. Die Schutzwirkung der COVID-19-Impfung nimmt mit der Zeit ab, sodass weitere Auffrischungsimpfungen erforderlich sind, um die Immunität wiederherzustellen [9, 10]. Angesichts der abnehmenden Schwere von COVID-19 drehen sich die aktuellen Bedenken hinsichtlich des COVID-19-Impfstoffs in erster Linie um unerwünschte Ereignisse, selbst bei Auffrischungsimpfungen.

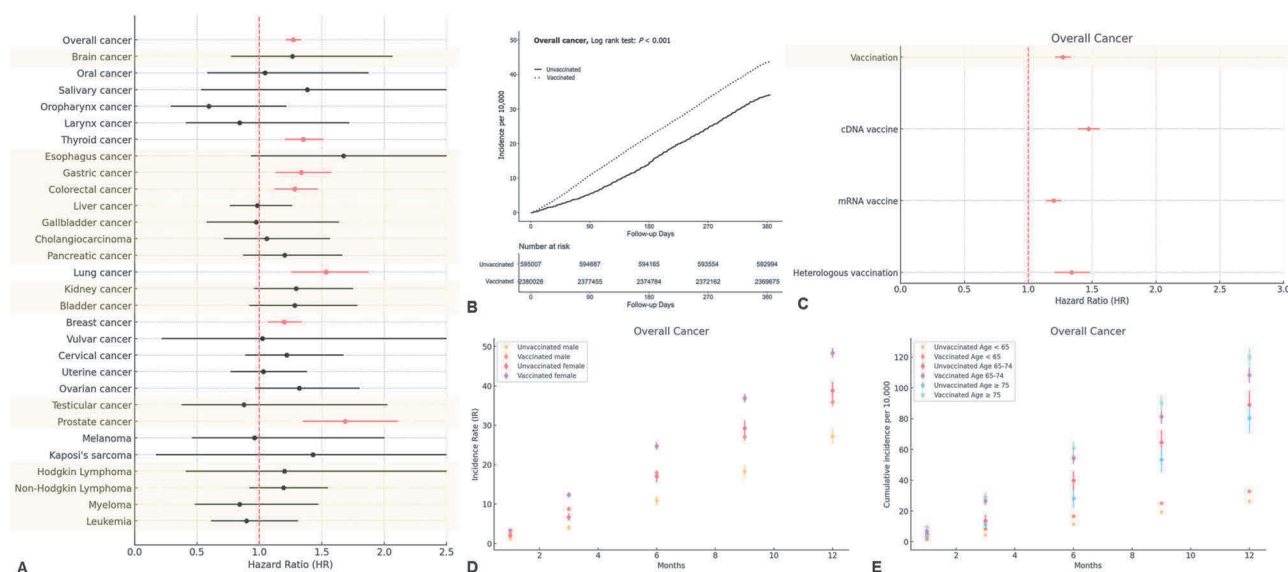


Abb. 1 Risiken für Krebserkrankungen im Zusammenhang mit COVID-19-Impfstoffen. (A) Hazard Ratio für Krebserkrankungen insgesamt und für 29 verschiedene Krebsarten; (B) kumulative Inzidenz von Krebserkrankungen insgesamt; (C) Hazard Ratio für Krebserkrankungen insgesamt nach Impfstofftyp; (D) kumulative Inzidenz von Krebserkrankungen insgesamt, nachgeschichtet nach Geschlecht; (E) kumulative Inzidenz von Krebserkrankungen insgesamt, nachgeschichtet nach Alter

Tabelle 1 Krebsrisiko für die abgestimmte geimpfte Kohorte nach Auffrischungsdosen des COVID-19-Impfstoffs

Krebs	HR (95 % KI)	P-Wert	Krebs	HR (95 % KI)	P-Wert
Gesamtkrebs	1,01 (0,95–1,06)	0,803	Nierenkrebs	0,92 (0,67–1,28)	0,618
Hirntumor	1,24 (0,68–2,27)	0,478	Blasenkrebs	1,21 (0,81–1,82)	0,352
Mundhöhlenkrebs	0,94 (0,52–1,69)	0,839	Brustkrebs	1,01 (0,89–1,13)	0,932
Speicheldrüsenkrebs	0,67 (0,28–1,59)	0,364	Vulvakrebs	0,34 (0,06–2,02)	0,233
Oropharynxkarzinom	0,80 (0,36–1,76)	0,578	Gebärmutterhalskrebs	1,27 (0,83–1,93)	0,274
Kehlkopfkrebs	0,93 (0,34–2,50)	0,877	Gebärmutterkrebs	0,86 (0,61–1,20)	0,360
Schilddrüsenkrebs	0,91 (0,79–1,03)	0,139	Eierstockkrebs	0,88 (0,63–1,23)	0,449
Speiseröhrenkrebs	1,21 (0,58–2,54)	0,609	Hodenkrebs	0,67 (0,15–3,01)	0,605
Magenkrebs	1,23 (1,01–1,50)	0,041	Prostatakrebs	1,26 (0,95–1,66)	0,104
Darmkrebs	1,00 (0,86–1,18)	0,962	Melanom	1,00 (0,38–2,66)	0,997
Leberkrebs	1,17 (0,85–1,62)	0,334	Kaposi-Sarkom	N/A (kein Ereignis)	N/A
Gallenblasenkrebs	0,68 (0,38–1,21)	0,186	Hodgkin-Lymphom	3,01 (0,36–25,01)	0,308
Cholangiokarzinom	1,55 (0,92–2,60)	0,097	Non-Hodgkin-Lymphom	0,76 (0,57–1,00)	0,053
Bauchspeicheldrüsenkrebs	2,25 (1,44–3,50)	<0,001	Myelom	0,58 (0,31–1,07)	0,080
Lungenkrebs	0,96 (0,78–1,17)	0,677	Leukämie	0,56 (0,35–0,92)	0,020

Fettdruck kennzeichnet die Daten für die statistische Signifikanz. HR, Hazard Ratio; CI, Konfidenzintervall

Impfungen. Angesichts des signifikant höheren Risikos für Magenkrebs bei geimpften Personen im Vergleich zu nicht geimpften Personen sollten Ärzte die Überwachung des Risikos für Magenkrebs im Zusammenhang mit COVID-19-Auffrischungsimpfungen priorisieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die COVID-19-Impfung mit einem erhöhten Risiko für sechs spezifische Krebsarten in Verbindung gebracht werden könnte, darunter Schilddrüsen-, Magen-, Darm-, Lungen-, Brust- und Prostatakrebs. Bemerkenswert ist, dass dieses mit der COVID-19-Impfung verbundene Krebsrisiko bei Personen im Alter von ≤ 65 Jahren wahrscheinlich höher war, außer bei Personen mit Prostatakrebs. Angesichts der beobachteten Zusammenhänge zwischen COVID-19-Impfung und Krebsinzidenz nach Alter, Geschlecht und Impfstofftyp sind weitere Untersuchungen erforderlich, um festzustellen, ob bestimmte Impfstrategien für Bevölkerungsgruppen, die eine COVID-19-Impfung benötigen, optimal sind.

Abkürzungen

COVID-19	Coronavirus-Krankheit 2019
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom
Coronavirus 2 PSM	Neigungswert-Matching
HR	Hazard Ratio
KI	Konfidenzintervall

Ergänzende Informationen

Die Online-Version enthält ergänzendes Material, das unter <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00831-w> verfügbar ist.

- Ergänzendes Material 1
- Ergänzendes Material 2
- Ergänzendes Material 3

Danksagungen

Keine.

Beiträge der Autoren

E.M.C. hatte uneingeschränkten Zugriff auf alle Daten der Studie und übernahm die Verantwortung für die Integrität der Daten und die Genauigkeit der Datenanalyse. Alle Autoren (H.J.K., M.-H.K., M.G.C. und E.M.C.) haben die endgültige Fassung vor der Einreichung genehmigt
Einreichung. Studienkonzept und -design: H.J.K. und E.M.C.; Erfassung, Analyse oder Interpretation der Daten: H.J.K., M.-H.K.; Entwurf des Manuskripts: H.J.K. und M.-H.K.; Kritische Überarbeitung des Manuskripts hinsichtlich wichtiger intellektueller Inhalte: H.J.K., M.-H.K., M.G.C. und E.M.C.; statistische Analyse: H.J.K. und M.-H.K.; Studienaufsicht: E.M.C. E.M.C. ist der Garant für diese Studie. H.J.K. und M.-H.K. haben als Co-Erstautoren gleichermaßen zu dieser Studie beigetragen. Der korrespondierende Autor bestätigt, dass alle aufgeführten Autoren die Kriterien für die Autorschaft erfüllen und dass keine anderen Personen, die diese Kriterien erfüllen, ausgelassen wurden.

Finanzierung

Diese Forschung erhielt keine spezifischen Fördermittel von öffentlichen, kommerziellen oder gemeinnützigen Förderinstitutionen.

Verfügbarkeit der Daten

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie stützen, sind beim National Health Insurance Service in Südkorea erhältlich, jedoch gelten Einschränkungen hinsichtlich der Verfügbarkeit dieser Daten, die im Rahmen einer Lizenz für die aktuelle Studie verwendet wurden und daher nicht öffentlich zugänglich sind. Die Daten sind jedoch auf begründete Anfrage und mit Genehmigung des National Health Insurance Service, Südkorea, bei den Autoren erhältlich.

Erklärungen

Ethische Genehmigung und Einwilligung zur Teilnahme

Das Studienprotokoll wurde vom Institutional Review Board unseres Instituts (IRB-Nr.: EUMC 2023-07-003) genehmigt, das auf die Einholung einer Einverständniserklärung verzichtete, da die Datenanalysen retrospektiv unter Verwendung anonymisierter Daten aus der südkoreanischen NHIS-Datenbank durchgeführt wurden.

Einwilligung zur Veröffentlichung

Nicht zutreffend.

Interessenkonflikte

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Eingegangen: 11. Juli 2025 / Angenommen: 21. August 2025

Published online: 26 September 2025

Referenzen

1. Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M, Hasell J, Appel C, et al. Eine globale Datenbank zu COVID-19-Impfungen. *Nat Hum Behav.* 2021;5:947–53.
2. Narayanan SA, Jamison DA Jr., Guarnieri JW, Zaksas V, Topper M, Koutnik AP, et al. Eine umfassende Übersicht über SARS-CoV-2 und COVID-19, Teil 2: Extrazelluläre bis systemische Auswirkungen einer SARS-CoV-2-Infektion auf den Wirt. *Eur J Hum Genet.* 2024;32:10–20.
3. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Fortschritte bei der Entwicklung eines COVID-19-Impfstoffs: Viren, Impfstoffe und Varianten im Vergleich zu Wirksamkeit, Effektivität und Flucht. *Nat Rev Immunol.* 2021;21:626–36.
4. Xie Y, Choi T, Al-Aly Z. Postakute Folgeerscheinungen einer SARS-CoV-2-Infektion in der Prä-Delta-, Delta- und Omikron-Ära. *N Engl J Med.* 2024;391:515–25.
5. Kim HJ, Kim MH, Park SJ, Choi MG, Chun EM. Autoimmunbedingte Nebenwirkungen nach COVID-19-Impfung in Seoul, Südkorea. *J Allergy Clin Immunol.* 2024;153:1711–20.
6. Kim HJ, Kim MH, Choi MG, Chun EM. Psychiatrische Nebenwirkungen nach COVID-19-Impfung: eine bevölkerungsbasierte Kohortenstudie in Seoul, Südkorea. *Mol Psychiatry.* 2024. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02627-0>.
7. Jahankhani K, Ahangari F, Adcock IM, Mortaz E. Mögliche krebserregende Wirkung von COVID-19: Ist SARS-CoV-2 ein onkogenes Agens? *Biochimie.* 2023;213:130–8.
8. Chen J, Dai L, Barrett L, James J, Plaisance-Bonstaff K, Post SR, et al. SARS-CoV-2-Proteine und Anti-COVID-19-Medikamente induzieren die lytische Reaktivierung eines onkogenen Virus. *Commun Biol.* 2021;4:682.
9. Chenchula S, Karunakaran P, Sharma S, Chavan M. Aktuelle Erkenntnisse zur Wirksamkeit einer COVID-19-Auffrischungsimpfung gegen die Omicron-Variante: Eine systematische Übersicht. *J Med Virol.* 2022;94:2969–76.
10. Wu N, Joyal-Desmarais K, Vieira AM, Sanuade C, Jagwani M, Paquet L, et al. COVID-19-Auffrischungsimpfungen im Vergleich zur Erstimpfung: Aktualisierung einer fortlaufenden Übersicht. *Lancet Respir Med.* 2023;11:e87–8.

Anmerkung des Herausgebers

Springer Nature bleibt neutral in Bezug auf rechtliche Ansprüche in veröffentlichten Karten und institutionellen Zugehörigkeiten.

CORRISPONDENZA

Accesso

libero



Rischi di tumori associati alla vaccinazione contro il COVID-19 nell'arco di un anno: un ampio studio di coorte basato sulla popolazione in Corea del Sud

Hong Jin Kim^{1†}, Min-Ho Kim^{2†}, Myeong Geun Choi³ e Eun Mi Chun^{3*}

Abstract

Il potenziale oncogenico del SARS-CoV-2 è stato ipotizzato, ma i dati reali sull'infezione da COVID-19 e sulla vaccinazione sono insufficienti. Pertanto, questo studio retrospettivo su larga scala basato sulla popolazione condotto a Seul, in Corea del Sud, mirava a stimare l'incidenza cumulativa e i rischi conseguenti di tumori in generale a un anno dalla vaccinazione contro il COVID-19. I dati relativi a 8.407.849 individui tra il 2021 e il 2023 sono stati ottenuti dal database dell'assicurazione sanitaria nazionale coreana. I partecipanti sono stati suddivisi in due gruppi in base al loro stato di vaccinazione contro il COVID-19. I rischi di tumori in generale sono stati valutati utilizzando modelli multivariabili di rischio proporzionale di Cox e i dati sono stati espressi come rapporti di rischio (HR) e intervalli di confidenza (IC) al 95%. Gli HR per il cancro alla tiroide (HR, 1,351; IC al 95%, 1,206-1,514), allo stomaco (HR, 1,335; IC al 95%, 1,130-1,576), al colon-retto (HR, 1,283; IC al 95%, 1,122-1,468), polmonare (HR, 1,533; IC al 95%, 1,254-1,874), al seno (HR, 1,197; IC al 95%, 1,069-1,340) e alla prostata (HR, 1,687; IC al 95%, 1,348-2,111) a un anno dalla vaccinazione. In termini di tipo di vaccino, i vaccini cDNA sono stati associati a un aumento del rischio di tumori alla tiroide, allo stomaco, al colon-retto, al polmone e alla prostata; i vaccini mRNA sono stati associati a un aumento del rischio di tumori alla tiroide, al colon-retto, al polmone e al seno; la vaccinazione eterologa è stata associata a un aumento del rischio di tumori alla tiroide e al seno. Date le associazioni osservate tra la vaccinazione contro il COVID-19 e l'incidenza del cancro in base all'età, al sesso e al tipo di vaccino, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare se strategie di vaccinazione specifiche possano essere ottimali per le popolazioni che necessitano della vaccinazione contro il COVID-19.

Parole chiave Cancro, COVID-19, Vaccino, Vaccino a mRNA, Vaccino a cDNA

All'editore

Dall'inizio dell'epidemia di coronavirus 2019 (COVID-19) nel dicembre 2019, questa malattia è diventata una preoccupazione globale a causa della mancanza di opzioni preventive e terapeutiche. È causata dal coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2), che è collegato a un'elevata morbilità e mortalità tra gli anziani [1, 2]. Con il rapido sviluppo dei vaccini contro il COVID-19, le complicanze fatali causate dal COVID-19 sono state alleviate; tuttavia, sono emersi diversi altri problemi, tra cui eventi avversi correlati ai vaccini [3-6].

[†] Hong Jin Kim e Min-Ho Kim hanno contribuito in egual misura, in qualità di coautori principali.

*Corrispondenza:

Eun Mi Chun cem@ewha.ac.kr

¹ Dipartimento di Chirurgia Ortopedica, Amministrazione militare regionale di Kyung-in, Suwon, Corea

² Dipartimento di Informatizzazione, Ewha Womans University Seoul Hospital, Seul, Repubblica di Corea

³ Divisione di Medicina Polmonare e Terapia Intensiva, Dipartimento di Medicina Interna, Ewha Womans University Mokdong Hospital, 1071, Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Repubblica di Corea



© Gli autori 2025. **Accesso libero** Questo articolo è concesso in licenza ai sensi della licenza Creative Commons Attribution 4.0 International License, che consente l'uso, la condivisione, l'adattamento, la distribuzione e la riproduzione in qualsiasi mezzo o formato, a condizione che si attribuisca il giusto riconoscimento agli autori originali e alla fonte, si fornisca un link alla licenza Creative Commons e si indichi se sono state apportate modifiche. Le immagini o altro materiale di terzi presenti in questo articolo sono inclusi nella licenza Creative Commons dell'articolo, salvo diversa indicazione nella linea di credito del materiale. Se il materiale non è incluso nella licenza Creative Commons dell'articolo e l'uso previsto non è consentito dalla normativa vigente o supera l'uso consentito, sarà necessario ottenere l'autorizzazione direttamente dal titolare del copyright. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitare il sito <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. La rinuncia Creative Commons Public Domain Dedication (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) si applica ai dati resi disponibili in questo

articolo, salvo diversa indicazione nella linea di credito relativa ai dati.

Analogamente ad altri virus, come il papillomavirus umano e il virus di Epstein-Barr, il SARS-CoV-2 mostra un potenziale oncogenico, che è stato ipoteticamente proposto sulla base dei suoi meccanismi d'azione, tra cui il sistema renina-angiotensina-aldosterone, la mutagenicità virale e la cascata infiammatoria [7]. Date le strutture comuni, come la proteina spike nei vaccini COVID-19, abbiamo ipotizzato che i vaccini COVID-19 potrebbero essere potenzialmente associati a rischi di cancro; tuttavia, i dati reali sono insufficienti [8]. In questo studio retrospettivo basato sulla popolazione, abbiamo stimato l'incidenza cumulativa e i rischi di cancro a un anno dalla vaccinazione COVID-19. Nella coorte sudcoreana di 8.407.849 individui tra il 2021 e il 2023, abbiamo infine incluso 595.007 e 2.380.028 individui dopo il propensity score matching (PSM) 1:4. Per la popolazione vaccinata, 355.896 e 711.792 individui sono stati inclusi nei gruppi non booster e booster, dopo il PSM 1:2. I risultati misurati sono stati l'incidenza cumulativa e i rischi corrispondenti di tumori a un anno dalla vaccinazione contro il COVID-19, che sono stati anche stratificati in base ai tipi di vaccino, al sesso e all'età (File aggiuntivo 1).

I nostri dati hanno mostrato un'associazione tra la vaccinazione contro il COVID-19 e un aumento del rischio di sei tipi di tumore, ovvero tiroideo (hazard ratio [HR], 1,35; intervallo di confidenza [IC] al 95%, 1,21-1,51), gastrico (HR, 1,34; IC al 95%, 1,13-1,58), coloretale (HR, 1,28; IC al 95%, 1,12-1,47), polmonare (HR, 1,533; IC al 95%, 1,25-1,87), al seno (HR, 1,20; IC al 95%, 1,07-1,34) e alla prostata (HR, 1,69; IC al 95%, 1,35-2,11) (Fig. 1 e File aggiuntivo 2). In termini di tipo di vaccino, i vaccini cDNA sono stati associati a un aumento del rischio di tumori alla tiroide, allo stomaco, al colon-retto, al polmone e alla prostata

tumori; i vaccini a mRNA sono stati associati a un aumento del rischio di tumori alla tiroide, al colon-retto, al polmone e al seno; la vaccinazione eterologa è stata correlata a un aumento del rischio di tumori alla tiroide e al seno. Nel contempo, i maschi vaccinati erano più vulnerabili ai tumori allo stomaco e al polmone, mentre le femmine vaccinate erano più suscettibili ai tumori alla tiroide e al colon-retto. In termini di stratificazione per età, la popolazione relativamente più giovane (individui sotto i 65 anni) era più vulnerabile ai tumori alla tiroide e al seno; al contrario, la popolazione più anziana (75 anni e oltre) era più suscettibile al tumore alla prostata (File aggiuntivo 3). Le dosi di richiamo hanno influenzato in modo sostanziale il rischio di tre tipi di tumore nella popolazione vaccinata: tumori gastrici e pancreatici (Tabella 1). I nostri risultati hanno evidenziato vari rischi di cancro associati ai diversi tipi di vaccino COVID-19.

Data la disponibilità limitata di dati reali, il nostro studio di coorte basato sulla popolazione condotto a Seul, in Corea del Sud, ha suggerito associazioni epidemiologiche tra l'incidenza cumulativa dei tumori e la vaccinazione contro il COVID-19, che variava in base al sesso, all'età e al tipo di vaccino. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per chiarire le potenziali relazioni causali, compresi i meccanismi molecolari sottostanti relativi all'iperinfiammazione indotta dal vaccino contro il COVID-19.

Il concetto di dose di richiamo prevede una nuova esposizione all'antigene immunizzante per potenziare l'immunità [9]. L'effetto protettivo della vaccinazione contro il COVID-19 diminuisce nel tempo; pertanto, sono necessarie ulteriori dosi di richiamo per ripristinare l'immunità [9, 10]. Data la diminuzione della gravità del COVID-19, le attuali preoccupazioni relative al vaccino contro il COVID-19 riguardano principalmente gli eventi avversi, anche con il richiamo.

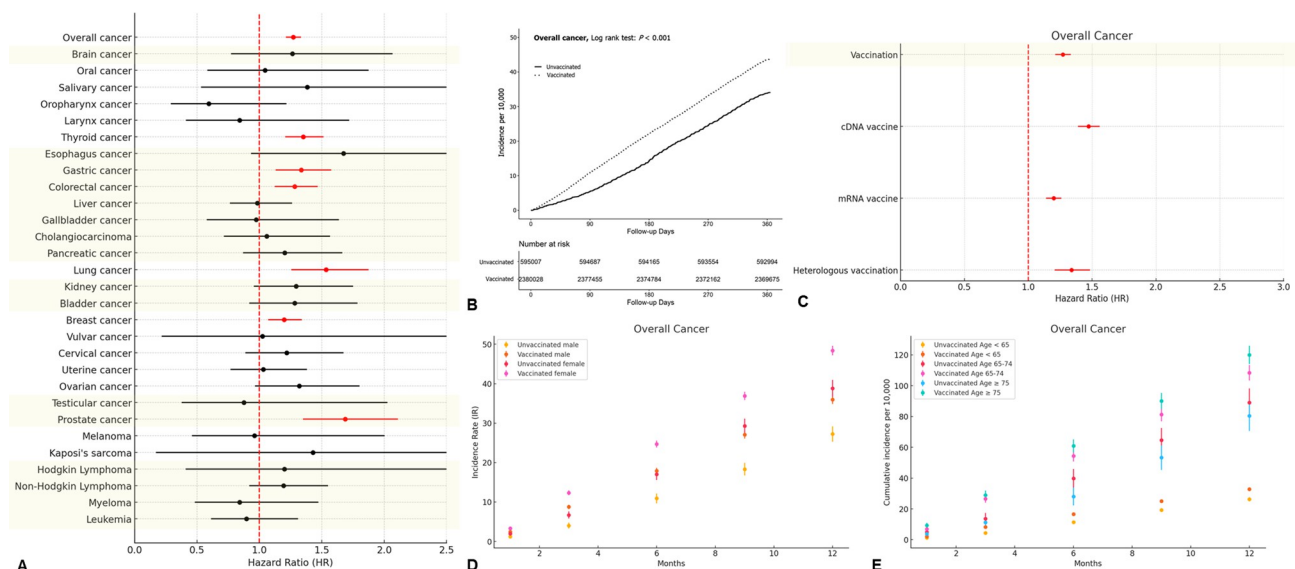


Fig. 1 Rischi di tumori associati ai vaccini contro il COVID-19. (A) Rapporto di rischio complessivo e di 29 diversi tipi di tumori; (B) Incidenza cumulativa dei tumori complessivi; (C) Rapporto di rischio complessivo dei tumori in base ai tipi di vaccino; (D) Incidenza cumulativa dei tumori complessivi stratificata per sesso; (E) Incidenza cumulativa dei tumori complessivi stratificata per età

Tabella 1 Rischio di tumori per la coorte vaccinata abbinata in base alle dosi di richiamo del vaccino contro il COVID-19

Cancro	HR (95% CI)	Valore p	Cancro	HR (95% CI)	Valore P
Tumore complessivo	1,01 (0,95–1,06)	0,803	Cancro al rene	0,92 (0,67–1,28)	0,618
Cancro al cervello	1,24 (0,68–2,27)	0,478	Cancro alla vescica	1,21 (0,81–1,82)	0,352
Cancro orale	0,94 (0,52–1,69)	0,839	Cancro al seno	1,01 (0,89–1,13)	0,932
Cancro della saliva	0,67 (0,28–1,59)	0,364	Cancro vulvare	0,34 (0,06–2,02)	0,233
Cancro dell'orofaringe	0,80 (0,36–1,76)	0,578	Cancro cervicale	1,27 (0,83–1,93)	0,274
Cancro della laringe	0,93 (0,34–2,50)	0,877	Cancro dell'utero	0,86 (0,61–1,20)	0,360
Cancro alla tiroide	0,91 (0,79–1,03)	0,139	Cancro ovarico	0,88 (0,63–1,23)	0,449
Cancro dell'esofago	1,21 (0,58–2,54)	0,609	Cancro ai testicoli	0,67 (0,15–3,01)	0,605
Cancro gastrico	1,23 (1,01–1,50)	0,041	Cancro alla prostata	1,26 (0,95–1,66)	0,104
Cancro del colon-retto	1,00 (0,86–1,18)	0,962	Melanoma	1,00 (0,38–2,66)	0,997
Cancro al fegato	1,17 (0,85–1,62)	0,334	Sarcoma di Kaposi	N/A (nessun evento)	N/A
Cancro alla cistifellea	0,68 (0,38–1,21)	0,186	Linfoma di Hodgkin	3,01 (0,36–25,01)	0,308
Colangiocarcinoma	1,55 (0,92–2,60)	0,097	Linfoma non Hodgkin	0,76 (0,57–1,00)	0,053
Cancro al pancreas	2,25 (1,44–3,50)	<0,001	Mieloma	0,58 (0,31–1,07)	0,080
Cancro ai polmoni	0,96 (0,78–1,17)	0,677	Leucemia	0,56 (0,35–0,92)	0,020

I dati in grassetto indicano la significatività statistica. HR, rapporto di rischio; CI, intervallo di confidenza

iniezioni. Considerando il rischio significativamente più elevato di cancro gastrico nei soggetti vaccinati rispetto a quelli non vaccinati, i medici dovrebbero dare priorità al monitoraggio del rischio di cancro gastrico in relazione alle dosi di richiamo del vaccino contro il COVID-19.

In conclusione, la vaccinazione contro il COVID-19 potrebbe essere associata a un aumento del rischio di sei tipi specifici di tumore, tra cui il tumore alla tiroide, allo stomaco, al colon-retto, al polmone, al seno e alla prostata. In particolare, questo rischio di cancro associato alla vaccinazione contro il COVID-19 era probabilmente più elevato tra le persone di età ≤ 65 anni, ad eccezione dei soggetti affetti da cancro alla prostata. Date le associazioni osservate tra la vaccinazione contro il COVID-19 e l'incidenza del cancro in base all'età, al sesso e al tipo di vaccino, sono necessarie ulteriori ricerche per determinare se strategie di vaccinazione specifiche possano essere ottimali per le popolazioni che necessitano della vaccinazione contro il COVID-19.

Abbreviazioni

COVID-19	Malattia da coronavirus 2019
SARS-CoV-2	Sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2
PSM	Propensity score matching
HR	Rapporto di rischio
CI	Intervallo di confidenza

Informazioni supplementari

La versione online contiene materiale supplementare disponibile all'indirizzo <https://doi.org/10.1186/s40364-025-00831-w>.

- Materiale supplementare 1
- Materiale supplementare 2
- Materiale supplementare 3

Ringraziamenti

Nessuno.

Contributi degli autori

E.M.C. ha avuto pieno accesso a tutti i dati dello studio e si è assunto la responsabilità dell'integrità dei dati e dell'accuratezza dell'analisi dei dati. Tutti gli autori (H.J.K., M.-H.K., M.G.C. ed E.M.C.) hanno approvato la versione finale prima della l'invio. Ideazione e progettazione dello studio: H.J.K. ed E.M.C.; Acquisizione, analisi o interpretazione dei dati: H.J.K., M.-H.K.; Stesura della bozza del manoscritto: H.J.K. e M.-H.K.; Revisione critica del manoscritto per importanti contenuti intellettuali: H.J.K., M.-H.K., M.G.C. ed E.M.C.; analisi statistica: H.J.K. e M.-H.K.; supervisione dello studio: E.M.C. E.M.C. è garante di questo studio. H.J.K. e M.-H.K. hanno contribuito in egual misura, in qualità di coautori principali. L'autore corrispondente attesta che tutti gli autori elencati soddisfano i criteri di paternità dell'opera e che nessun altro autore che soddisfa tali criteri è stato omissso.

Finanziamenti

Questa ricerca non ha ricevuto alcuna sovvenzione specifica da parte di agenzie di finanziamento del settore pubblico, commerciale o no profit.

Disponibilità dei dati

I dati a supporto dei risultati di questo studio sono disponibili presso il Servizio sanitario nazionale della Corea del Sud, ma la loro disponibilità è soggetta a restrizioni, in quanto sono stati utilizzati su licenza per lo studio in questione e non sono quindi accessibili al pubblico. I dati sono tuttavia disponibili presso gli autori su richiesta motivata e previa autorizzazione del Servizio sanitario nazionale della Corea del Sud.

Dichiarazioni

Approvazione etica e consenso alla partecipazione

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato di revisione istituzionale del nostro istituto (IRB n.: EUMC 2023-07-003), che ha rinunciato al requisito del consenso informato poiché le analisi dei dati sono state eseguite in modo retrospettivo utilizzando dati anonimizzati derivati dal database NHIS della Corea del Sud.

Consenso alla pubblicazione

Non applicabile.

Conflitti di interesse

Gli autori dichiarano l'assenza di conflitti di interesse.

Ricevuto: 11 luglio 2025 / Accettato: 21 agosto 2025

Published online: 26 September 2025

Riferimenti

1. Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-Ospina E, Roser M, Hasell J, Appel C, et al. Un database globale sulle vaccinazioni contro il COVID-19. *Nat Hum Behav.* 2021;5:947–53.
2. Narayanan SA, Jamison DA Jr., Guarnieri JW, Zaksas V, Topper M, Koutnik AP, et al. Una revisione completa su SARS-CoV-2 e COVID-19, parte 2: effetti extracellulari e sistemici dell'infezione da SARS-CoV-2 sull'ospite. *Eur J Hum Genet.* 2024;32:10–20.
3. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progressi nella ricerca di un vaccino contro il COVID-19: virus, vaccini e varianti contro efficacia, efficienza e fuga. *Nat Rev Immunol.* 2021;21:626–36.
4. Xie Y, Choi T, Al-Aly Z. Sequele post-acute dell'infezione da SARS-CoV-2 nelle ere Pre-Delta, Delta e Omicron. *N Engl J Med.* 2024;391:515–25.
5. Kim HJ, Kim MH, Park SJ, Choi MG, Chun EM. Eventi avversi autoimmuni a seguito della vaccinazione contro il COVID-19 a Seul, Corea del Sud. *J Allergy Clin Immunol.* 2024;153:1711–20.
6. Kim HJ, Kim MH, Choi MG, Chun EM. Eventi avversi psichiatrici a seguito della vaccinazione contro il COVID-19: uno studio di coorte basato sulla popolazione a Seul, Corea del Sud. *Mol Psychiatry.* 2024. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02627-0>.
7. Jahankhani K, Ahangari F, Adcock IM, Mortaz E. Possibile capacità cancerogena del COVID-19: il SARS-CoV-2 è un agente oncogenico? *Biochimie.* 2023;213:130–8.
8. Chen J, Dai L, Barrett L, James J, Plaisance-Bonstaff K, Post SR, et al. Le proteine SARS-CoV-2 e i farmaci anti-COVID-19 inducono la riattivazione litica di un virus oncogenico dell'. *Commun Biol.* 2021;4:682.
9. Chenchula S, Karunakaran P, Sharma S, Chavan M. Prove attuali sull'efficacia della dose di richiamo del vaccino contro il COVID-19 contro la variante Omicron: una revisione sistematica dell'. *J Med Virol.* 2022;94:2969–76.
10. Wu N, Joyal-Desmarais K, Vieira AM, Sanuade C, Jagwani M, Paquet L, et al. Richiami COVID-19 rispetto alla serie primaria: aggiornamento di una revisione continua. *Lancet Respir Med.* 2023;11:e87–8.

Nota dell'editore

Springer Nature mantiene una posizione neutrale riguardo alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Genomic Integration and Molecular Dysregulation in Aggressive Stage IV Bladder Cancer Following COVID-19 mRNA Vaccination

John A. Catanzaro¹ , Nicolas Hulscher² , and Peter A. McCullough² ,

¹ Neo7Bioscience; john.catanzaro@neo7bioscience.com

² McCullough Foundation; nichulscher@gmail.com

* Correspondence: john.catanzaro@neo7bioscience.com

Abstract:

Background: Bladder cancer is rare in young women, and advanced presentations are exceptionally uncommon. We report a de-identified case of a previously healthy 31-year-old female who developed rapidly progressive stage IV bladder cancer within 12 months of completing a three-dose Moderna mRNA vaccination series (May 2021, June 2021, December 2021).

Case Findings: Comprehensive multi-omic profiling was performed using PBIMA (Molecular Surveillance and Individualized Targeted Immunotherapy Peptide Editing) and REViSS (Spike-associated Transcriptional/Translational Instability Surveillance), incorporating analyses of plasma-derived circulating tumor DNA, whole-blood RNA, and urine exosome proteomics. Dysregulated gene expressions were identified across oncogenic driver genes (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA, and SF3B1), auxiliary tumor-promoting signals (TOP1, PSIP1, and ERBB2), and broad evidence of genome instability with impaired DNA repair (ATM, MSH2). Within circulating tumor DNA, a host–vector chimeric read mapped to chr19:55,482,637–55,482,674 (GRCh38), in cytoband 19q13.42, positioned ~367 kb downstream of the canonical AAVS1 safe harbor and ~158 kb upstream of ZNF580 at the proximal edge of the zinc-finger (ZNF) gene cluster. This sequence aligned with perfect 20/20 bp identity to a segment (bases 5905–5924) within the Spike open reading frame (ORF) coding region (bases 3674–7480) of the Pfizer BNT162b2 DNA plasmid reference (GenBank accession [OR134577.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR134577.1)), despite the patient only receiving Moderna vaccinations. This apparent paradox is best explained by shared Spike ORF sequences within the expression cassette across both vaccine platforms; because Moderna's proprietary plasmid sequence has not been deposited in NCBI, BLAST defaults to Pfizer's published reference as the nearest available match. The integration site was located outside the canonical AAVS1 "safe harbor" and within a gene-dense, recombination-prone regulatory region, raising concern for transcriptional disruption, fusion transcript formation, and oncogenic potential. The probability of a random 20-base sequence perfectly matching a predefined target is approximately 1 in a trillion, making this alignment statistically compelling and highly unlikely to be an incidental artifact.

Conclusions: This sentinel case report provides the first documented evidence of genomic integration of mRNA vaccine-derived genetic material in a human subject, documenting a temporal association between COVID-19 mRNA vaccination and aggressive malignancy, reproducible multi-omic evidence of oncogenic signaling, and a non-safe harbor host–vector integration event. While causality cannot be established from a single case, the convergence of (i) close temporal proximity to vaccination, (ii) genomic integration of a vaccine plasmid–derived spike gene fragment, and (iii) consistent transcriptomic and proteomic instability across biospecimens represents a highly unusual and biologically plausible pattern. These findings highlight an urgent need for systematic genomic surveillance, orthogonal validation with long-read sequencing, and larger cohort studies to rigorously define the impact of synthetic mRNA vaccine platforms on genome integrity and cancer risk.

1. Introduction

Bladder cancer is predominantly a disease of older adults, and its occurrence in young women is exceptionally uncommon[1-8]. When advanced disease is present in this demographic, it is typically aggressive and carries an unfavorable prognosis[9-17]. Such atypical presentations demand close examination of potential molecular drivers and external contributors[18-25].

Synthetic mRNA vaccines introduce heavily modified RNA molecules and lipid nanoparticle carriers that differ fundamentally from endogenous cellular transcripts. Residual plasmid DNA, stabilizing nucleotide analogs, and potential for reverse transcription raise concerns about genomic disruption, transcriptional dysregulation, and oncogenic activation[26-29]. Reports of plasmid DNA contamination, enhancer sequences, and persistence of spike protein expression have intensified scrutiny regarding the role of mRNA vaccines in genomic instability and malignant transformation[30,31].

We describe a 31-year-old previously healthy woman who developed rapidly progressive stage IV bladder cancer within 12 months of completing a three-dose Moderna mRNA vaccination series (May 2021, June 2021, December 2021). Given the rarity of advanced bladder cancer in this demographic, her case warranted in-depth molecular investigation. Multi-omic profiling identified reproducible oncogenic driver activation, DNA repair impairment, transcriptomic instability, and evidence of a vaccine-derived sequence integrated outside a genomic safe harbor[26,32]. This case illustrates a potential association between synthetic mRNA vaccination and the development of aggressive malignancy, underscoring the urgent need for systematic genomic surveillance and independent investigation of the long-term oncogenic risks associated with mRNA vaccine platforms.

2. Case Presentation

A previously healthy 31-year-old female received three Moderna mRNA vaccinations (May 2021, June 2021, December 2021) and, within 12 months, was diagnosed with rapidly progressive stage IV bladder cancer—an unusual and aggressive presentation for this age. The patient underwent comprehensive multi-omic profiling using PBIMA (Molecular Surveillance and Individualized Targeted Immunotherapy Peptide Editing) and REViSS (Spike-associated Transcriptional/Translational Instability Surveillance). Analyses incorporated circulating tumor DNA sequencing from plasma, whole-blood RNA transcriptomics, and urine exosome proteomics, enabling a multidimensional evaluation of genomic and transcriptional dysregulation.

Multi-omic analyses revealed dysregulated oncogenic drivers (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA, SF3B1) and auxiliary tumor-promoting pathways (TOP1, PSIP1, ERBB2) across circulating tumor DNA, blood RNA, and urine exosome proteomics[11,33-36]. DNA repair deficiencies (ATM, MSH2) were also identified, consistent with enhanced susceptibility to genomic instability. The specific oncogenic drivers, auxiliary promoters, and DNA repair deficiencies identified through PBIMA multi-omic profiling are summarized in **Table 1**, highlighting their biospecimen presence and functional consequences.

Gene Target	Classification	Biospecimen Presence	Functional Implications
KRAS	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA, urine	Constitutive RAS–RAF–MEK–ERK activation → uncontrolled proliferation, therapy resistance
ATM	Oncogenic Driver & DNA Repair	ctDNA, blood RNA, urine	Impaired DNA double-strand break recognition and checkpoint control → genomic instability
MAPK1	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA, urine	MAPK effector hyperactivation → invasion, survival signaling
NRAS	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA, urine	MAPK/PI3K signaling amplification → RAF1 dependence, malignant transformation
SF3B1	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA	Spliceosome disruption → aberrant splicing, transcriptomic remodeling
CHD4	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA, urine	NuRD chromatin remodeling dysfunction → impaired DNA repair, angiogenesis, immune evasion
PIK3CA	Oncogenic Driver	ctDNA, blood RNA	PI3K–AKT pathway activation → metabolic rewiring, angiogenesis, immune suppression
TOP1	Auxiliary Promoter	ctDNA, blood RNA, urine (variable)	DNA topology dysregulation → replicative stress, transcriptional collapse
PSIP1	Auxiliary Promoter	ctDNA, blood RNA, urine (variable)	Chromatin co-activator upregulation → immune suppression, angiogenesis
ERBB2 (HER2)	Auxiliary Promoter	ctDNA, blood RNA, urine	Receptor tyrosine kinase amplification → proliferative signaling, invasion, epigenetic reprogramming
MSH2	DNA Repair Gene	ctDNA, blood RNA	Mismatch repair deficiency → microsatellite instability, mutational burden

Table 1. Dysregulated Oncogenic Drivers and Auxiliary Tumor-Promoting Pathways Identified by PBIMA Multi-Omic Profiling

A particularly striking finding was the detection of a host–vector chimeric read mapping to chr19:55,482,637–55,482,674 (GRCh38), within cytogenetic band 19q13.42, located ~367 kb downstream of the canonical AAVS1 safe harbor locus and ~158 kb upstream of ZNF580 at the proximal edge of the zinc-finger (ZNF) gene cluster[37–39]. This sequence aligned with 100% identity to a segment (bases 5905 – 5924) within the Spike Open Reading Frame (ORF) coding region (bases 3674 – 7480) of the Pfizer BNT162b2 DNA plasmid reference (GenBank accession [OR134577.1](#)), despite the patient only receiving Moderna vaccinations. The probability of a random 20-base sequence perfectly matching a predefined target is approximately 1 in a trillion, making this alignment statistically compelling and highly unlikely to be an incidental artifact. The integration site was located outside the canonical AAVS1 “safe harbor” and within a gene-dense, recombination-prone regulatory region, raising concern for transcriptional disruption, fusion transcript formation, and oncogenic potential[40,41].

Notably, the integrated fragment corresponded to a 20-nucleotide segment within the Spike ORF coding region of the engineered expression cassette. The apparent paradox is explained by (i) conservation of the Spike ORF across vaccine platforms and (ii) the absence of a deposited Moderna plasmid reference, which defaults BLAST alignment to Pfizer’s published sequence. Thus, the event represents a vaccine-derived Spike cassette fragment integrated into chr19q13.42, at the proximal edge of the ZNF cluster, with plausible regulatory impact. Supporting evidence is summarized in **Table 2**, which documents the mapping parameters, alignment identity, genomic context, and functional implications of this integration event.

Parameter	Result
Sample Description	Aggressive bladder cancer (post-mRNA vaccination)
Vaccination History	Moderna (3 doses: May 2021, June 2021, December 2021)
Host Mapping	Human chromosome 19, positions 55,482,637 – 55,482,674 (GRCh38), cytoband 19q13.42
Viral Reference	OR134577.1 (Pfizer BNT162b2 expression vector)
Viral Alignment Range	Bases 5905 – 5924 (Spike ORF coding region of the engineered expression cassette)
Alignment Identity	20/20 bp (100%)
Overlap Type	Chimeric, “gap” alignment
Orientation	Host: forward (+); Viral: plus, orientation
Mapping Quality (MQ)	Host: 60 (high confidence), Viral: 6 (low confidence)
Edit Distance	Host: 4; Viral: 2; Total: 43
Integration Classification	Possible Host Translocation: TRUE; Vector Rearrangement: FALSE
Genomic Context	Located at 19q13.42, ~367 kb downstream of the AAVS1 safe harbor (chr19:55.09–55.12 Mb) and ~158 kb upstream of ZNF580.
Functional Relevance	Gene-dense, recombination-prone, transcriptionally active regulatory region; potential for transcriptional disruption, fusion transcripts, and genomic instability

Table 2. DNA Frag analysis of host–vector translocation in a Moderna-vaccinated patient, showing a chimeric read at chr19:55,482,637–55,482,674 (GRCh38), cytoband 19q13.42, with 100% alignment to a segment of the Pfizer BNT162b2 plasmid reference (OR134577.1). The integration site lies ~367 kb downstream of the canonical AAVS1 safe harbor and ~158 kb upstream of ZNF580, placing it within a gene-dense, transcriptionally active, recombination-prone region and raising concern for transcriptional disruption, fusion transcript generation, and genomic instability.

3. Discussion

This case raises several mechanistic concerns regarding the potential role of synthetic mRNA vaccination in malignant transformation. To our knowledge, it represents the first documented evidence of genomic integration of vaccine-derived genetic material in a human subject. Specifically, we identified a vaccine vector–derived sequence integrated at chr19:55,482,637–55,482,674 (GRCh38), within cytoband 19q13.42, positioned ~367 kb downstream of the canonical AAVS1 “safe harbor” and ~158 kb upstream of ZNF580 at the proximal edge of the zinc-finger (ZNF) gene cluster, providing direct molecular evidence of host–vector genomic interaction [42–44]. The integration site lies within a gene-dense, transcriptionally active, recombination-prone regulatory region, a context associated with increased risk of transcriptional disruption, fusion transcript formation, and genomic instability [45].

Second, the paradoxical alignment of the integrated sequence to the Pfizer BNT162b2 plasmid, despite the patient having received only Moderna vaccinations, highlights the issue of cross-platform plasmid homology and manufacturing commonalities. The 100% identity to Pfizer’s deposited vector sequence suggests the presence of shared plasmid backbone elements or spike-encoding motifs across vaccine platforms. Given the absence of a deposited Moderna plasmid reference, BLAST alignment defaulted to Pfizer’s sequence as the nearest available match, further underscoring the need for independent disclosure and validation of proprietary vaccine constructs.

Third, several plausible mechanisms could underlie the observed integration event [26,46,47]. These include (i) persistence and carry-over of residual plasmid DNA fragments from the in vitro transcription template, (ii) reverse

transcription of spike mRNA followed by insertion at double-strand DNA breaks, (iii) misrepair via non-homologous end joining (NHEJ) or microhomology-mediated end joining (MMEJ), (iv) homologous recombination when stretches of sequence similarity exist, (v) LINE-1 retrotransposon activity generating cDNA intermediates, and (vi) topoisomerase-mediated mis-ligation during DNA unwinding. Each of these routes is biologically feasible and consistent with the concurrent detection of DNA repair deficiencies (ATM, MSH2) in this patient, which would increase susceptibility to insertional mutagenesis. Such vulnerabilities may accelerate oncogenic transformation and malignant progression. Supporting this concern, Speicher et al. quantified billions of residual plasmid DNA fragments per vaccine dose, with levels in both bivalent and XBB.1.5 Pfizer-BioNTech and Moderna COVID-19 vaccine products exceeding regulatory safety thresholds by 36–627-fold, thereby providing a plausible source of template DNA for persistent chromosomal integration [28].

In addition to the host–vector integration event, the patient’s multi-omic profile revealed a constellation of dysregulated oncogenic drivers and auxiliary tumor-promoting signals that together create a permissive landscape for aggressive malignancy[29,48,49]. Activating alterations in KRAS and NRAS converge on the MAPK signaling cascade, sustaining proliferative signaling and bypassing normal growth controls[9,50,51]. Concurrent dysregulation of MAPK1 amplifies downstream ERK-driven transcriptional programs that promote cell cycle progression and survival[1-3,35,52,53]. The chromatin remodeler CHD4 and the RNA splicing factor SF3B1 contribute to epigenetic reprogramming and aberrant transcript processing, fostering cellular plasticity and tumor adaptability[4,54-59]. PIK3CA activation drives PI3K/AKT signaling, enhancing metabolic fitness, invasion, and resistance to apoptosis, while auxiliary signals from TOP1, PSIP1, and ERBB2 further reinforce replication stress tolerance, transcriptional activation, and growth factor responsiveness[7,10,12,17,60,61]. Importantly, deficiencies in ATM and MSH2 compromise DNA repair fidelity, predisposing to genomic instability, accumulation of mutations, and chromosomal rearrangements[17,22,25,62]. Together, this pattern of multi-pathway dysregulation provides a mechanistic basis for the patient’s unusually rapid disease evolution, linking vaccine-associated genomic perturbations with a molecular environment primed for malignant transformation.

Emerging evidence supports a link between mRNA vaccination and oncogenesis [63, 64]. A population-wide 30-month cohort study of nearly 300,000 residents of Pescara, Italy, found that receipt of ≥ 1 COVID-19 vaccine dose was associated with a 23% increased risk of cancer hospitalization overall (HR 1.23, 95% CI 1.11–1.37), with the strongest and statistically significant excess risks observed for breast cancer (HR 1.54), bladder cancer (HR 1.62), and colorectal cancer (HR 1.35) [61]. Complementing this epidemiologic evidence, Marik et al. formally defined the syndrome of COVID-19 mRNA vaccine-induced “turbo cancers,” compiling clinical case reports, epidemiologic signals, and mechanistic pathways through which the spike protein may accelerate malignant transformation via metabolic reprogramming, apoptosis resistance, angiogenesis, and immune dysregulation [62]. Taken together, these reports provide convergent epidemiologic and mechanistic support for our present case, in which genomic integration and molecular dysregulation were directly documented.

Together, these observations support a biologically plausible framework in which synthetic mRNA vaccine exposure contributes to genomic instability, oncogenic signaling, and aggressive disease evolution. While causality cannot be inferred from a single case, the convergence of temporal proximity, vector sequence integration, and reproducible multi-omic dysregulation provides a strong hypothesis-generating signal. This warrants urgent systematic genomic surveillance, orthogonal validation with long-read sequencing, and independent investigation of the long-term oncogenic risks associated with mRNA vaccine technologies. A schematic overview of the clinical course, host–vector integration, and multi-omic dysregulation is shown in **Figure 1**.

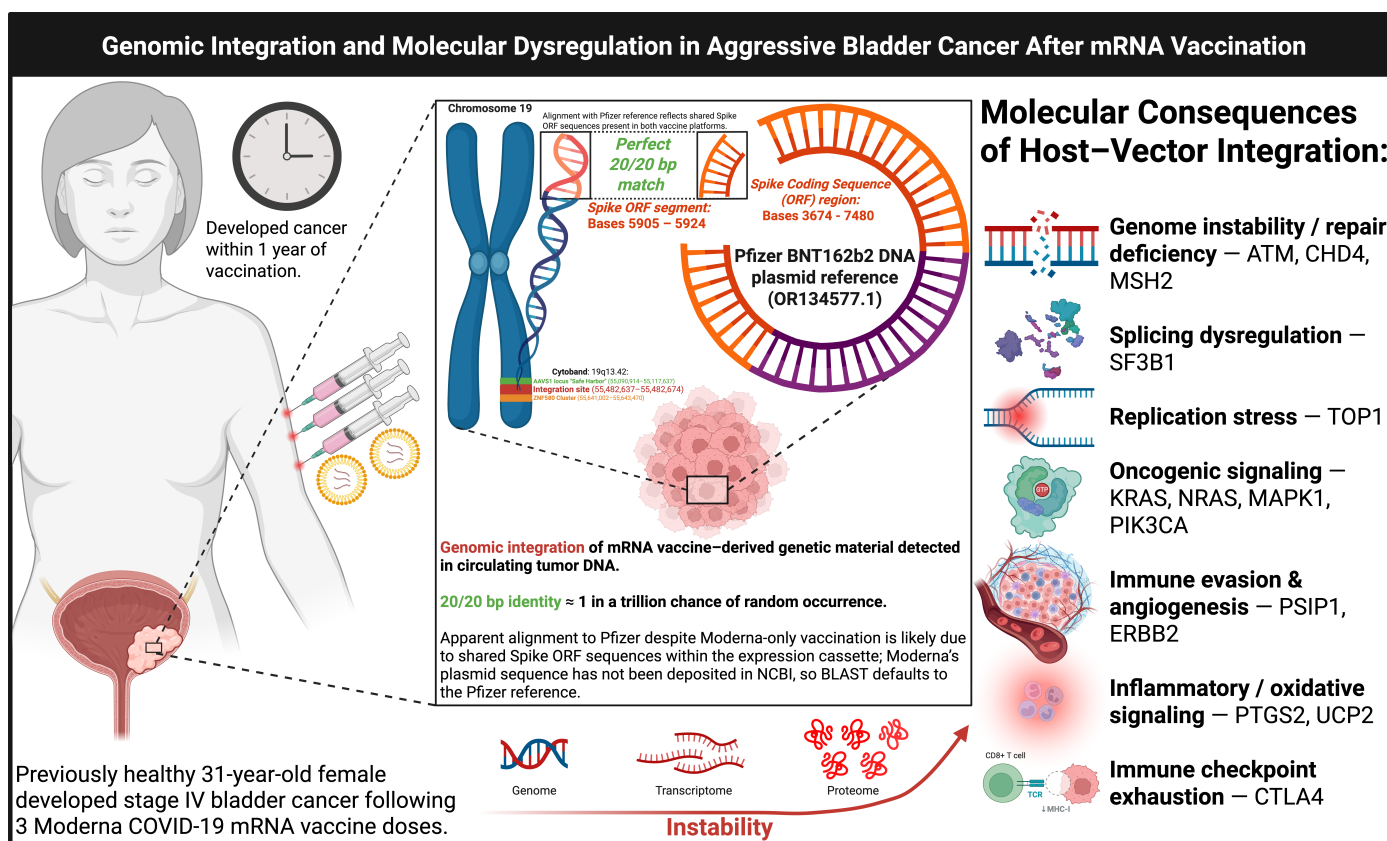


Figure 1. Genomic Integration and Molecular Dysregulation in Aggressive Bladder Cancer After mRNA Vaccination *Created with Biorender.com

4. Conclusions

This sentinel case report describes the rapid onset of aggressive stage IV bladder cancer in a young woman after a Moderna mRNA vaccination series, marked by direct evidence of genomic integration of vaccine-derived genetic material. Multi-omic profiling revealed reproducible oncogenic driver activation, DNA repair deficiencies, transcriptomic instability, and integration of a vaccine vector-derived sequence outside a genomic safe harbor[8,30,31,33,38,39,41,58,65]. While causality cannot be established from a single case, the convergence of temporal proximity, integration evidence, and multi-system molecular disruption raises serious concern regarding the oncogenic potential of synthetic mRNA vaccine platforms. These findings highlight the urgent need for systematic genomic surveillance, independent validation using orthogonal sequencing methods, and rigorous investigation into the long-term genomic and oncologic risks of mRNA vaccination.

5. References

1. Bekele, R.; Samant, A.; Hanlon, T.; Mouw, K. Abstract 1709: MAPK pathway alterations are a targetable vulnerability in bladder cancer. *Cancer Research* **2023**, *83*, 1709-1709, doi:10.1158/1538-7445.am2023-1709.
2. Bekele, R.T.; Samant, A.S.; Nassar, A.H.; So, J.; Garcia, E.P.; Curran, C.R.; Hwang, J.H.; Mayhew, D.L.; Nag, A.; Thorner, A.R.; et al. RAF1 amplification drives a subset of bladder tumors and confers sensitivity to MAPK-directed therapeutics. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci147849.
3. Cheng, G.; Zhou, Z.; Li, S.; Yang, S.; Wang, Y.; Ye, Z.; Ren, C. Predicting bladder cancer survival with high accuracy: insights from MAPK pathway-related genes. *Scientific Reports* **2024**, *14*, doi:10.1038/s41598-024-61302-0.
4. Columbres, R.C.; Chakraborty, A.; Apolo, A.; Banday, R. Abstract 5640: Unlocking the therapeutic potential of SF3B1 inhibitors for bladder cancer treatment. *Cancer Research* **2024**, *84*, 5640-5640, doi:10.1158/1538-7445.am2024-5640.
5. Dadhania, V.; Zhang, M.; Zhang, L.; Bondaruk, J.; Majewski, T.; Siefker-Radtke, A.; Guo, C.C.; Dinney, C.; Cogdell, D.E.; Zhang, S.; et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 105-117, doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.036.
6. Deng, Z.; Shen, D.; Yu, M.; Zhou, F.; Shan, D.; Fang, Y.; Jin, W.; Qian, K.; Li, S.; Wang, G.; et al. Pectolarigenin inhibits bladder urothelial carcinoma cell proliferation by regulating DNA damage/autophagy pathways. *Cell Death Discovery* **2023**, *9*, doi:10.1038/s41420-023-01508-9.
7. Dueñas, M.; Martínez-Fernández, M.; García-Escudero, R.; Villacampa, F.; Marqués, M.; Saiz-Ladera, C.; Duarte, J.; Martínez, V.; Gómez, M.J.; Martín, M.L.; et al. *PIK3CA* gene alterations in bladder cancer are frequent and associate with reduced recurrence in non-muscle invasive tumors. *Molecular Carcinogenesis* **2013**, *54*, 566-576, doi:10.1002/mc.22125.
8. Hoffmann, M.J.; Schulz, W.A. Alterations of Chromatin Regulators in the Pathogenesis of Urinary Bladder Urothelial Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 6040, doi:10.3390/cancers13236040.
9. Hou, S.; Nieva, J.; Desai, N. KRAS G12C mutated NSCLC and bladder cancer xenografts treated with sotorasib and adagrasib in combination with mTOR inhibitors show improved antitumor activity of nab-sirolimus vs everolimus. *European Journal of Cancer* **2022**, *174*, S58-S59, doi:10.1016/S0959-8049(22)00957-1.
10. Kompier, L.C.; Lurkin, I.; van der Aa, M.N.M.; van Rhijn, B.W.G.; van der Kwast, T.H.; Zwarthoff, E.C. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA Mutations in Bladder Cancer and Their Potential as Biomarkers for Surveillance and Therapy. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13821, doi:10.1371/journal.pone.0013821.
11. Lee, K.-H.; Ku, J.H. Targeting splicing factors as molecular non-muscle invasive bladder cancer predictors. *Translational Andrology and Urology* **2018**, *7*, S715-S717, doi:10.21037/tau.2018.10.09.
12. López-Knowles, E.; Hernández, S.; Malats, N.r.; Kogevinas, M.; Lloreta, J.; Carrato, A.; Tardón, A.; Serra, C.; Real, F.X. *PIK3CA* Mutations Are an Early Genetic Alteration Associated with *FGFR3* Mutations in Superficial Papillary Bladder Tumors. *Cancer Research* **2006**, *66*, 7401-7404, doi:10.1158/0008-5472.can-06-1182.
13. Monnin, K.A.; Bronstein, I.B.; Gaffney, D.K.; Holden, J.A. Elevations of DNA topoisomerase I in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: Correlation with DNA topoisomerase II-alpha and p53 expression. *Human Pathology* **1999**, *30*, 384-391, doi:10.1016/s0046-8177(99)90112-0.
14. Montero-Hidalgo, A.J.; Pérez-Gómez, J.M.; Martínez-Fuentes, A.J.; Gómez-Gómez, E.; Gahete, M.D.; Jiménez-Vacas, J.M.; Luque, R.M. Alternative splicing in bladder cancer: potential strategies for cancer diagnosis, prognosis, and treatment. *WIREs RNA* **2022**, *14*, doi:10.1002/wrna.1760.
15. Ouerhani, S.; Bougatef, K.; Soltani, I.; Elgaai, A.B.A.; Abbes, S.; Menif, S. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer. *Molecular Biology Reports* **2013**, *40*, 4109-4114, doi:10.1007/s11033-013-2512-8.
16. Ouerhani, S.; Elgaai, A.B.A. The mutational spectrum of HRAS, KRAS, NRAS and FGFR3 genes in bladder cancer. *Cancer Biomarkers* **2012**, *10*, 259-266, doi:10.3233/cbm-2012-0254.

-
17. Pan, Y.-H.; Zhang, J.-X.; Chen, X.; Liu, F.; Cao, J.-Z.; Chen, Y.; Chen, W.; Luo, J.-H. Predictive Value of the TP53/PIK3CA/ATM Mutation Classifier for Patients With Bladder Cancer Responding to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.643282.
 18. Shuman, L.; Pham, J.; Wildermuth, T.; Wu, X.-R.; Walter, V.; Warrick, J.I.; DeGraff, D.J. Urothelium-Specific Expression of Mutationally Activated Pik3ca Initiates Early Lesions of Noninvasive Bladder Cancer. *The American Journal of Pathology* **2023**, *193*, 2133-2143, doi:10.1016/j.ajpath.2023.07.001.
 19. Stenehjem, D.; Tran, D.; Nkrumah, M.; Gupta, S. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *OncoTargets and Therapy* **2018**, *Volume 11*, 5973-5989, doi:10.2147/ott.s135157.
 20. Wang, Z.; Shang, J.; Li, Z.; Li, H.; Zhang, C.; He, K.; Li, S.; Ju, W. PIK3CA Is Regulated by CUX1, Promotes Cell Growth and Metastasis in Bladder Cancer via Activating Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.536072.
 21. Wu, T.-Z.; Lei, C.-Y.; Li, J.-M.; Guo, Y.-F. Sex discrepancy characterization revealed by somatic DNA alterations in muscle-invasive bladder carcinoma. *Chinese Medical Journal* **2019**, *132*, 2492-2494, doi:10.1097/cm9.0000000000000487.
 22. Yi, R.; Lin, A.; Cao, M.; Xu, A.; Luo, P.; Zhang, J. ATM Mutations Benefit Bladder Cancer Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitors by Acting on the Tumor Immune Microenvironment. *Frontiers in Genetics* **2020**, *11*, doi:10.3389/fgene.2020.00933.
 23. Zargar, P.; Koochakkhani, S.; Hassanzadeh, M.; Ashouri Taziani, Y.; Nasrollahi, H.; Eftekhari, E. Downregulation of topoisomerase 1 and 2 with acriflavine sensitizes bladder cancer cells to cisplatin-based chemotherapy. *Molecular Biology Reports* **2022**, *49*, 2755-2763, doi:10.1007/s11033-021-07087-1.
 24. Zheng, Y.; Izumi, K.; Yao, J.L.; Miyamoto, H. Dihydrotestosterone upregulates the expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 in androgen receptor-positive bladder cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* **2011**, *18*, 451-464, doi:10.1530/erc-11-0010.
 25. Zhou, Y.; Börcsök, J.; Adib, E.; Kamran, S.C.; Neil, A.J.; Stawiski, K.; Freeman, D.; Stormoen, D.R.; Sztupinszki, Z.; Samant, A.; et al. ATM deficiency confers specific therapeutic vulnerabilities in bladder cancer. *Science Advances* **2023**, *9*, doi:10.1126/sciadv.adg2263.
 26. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Current Issues in Molecular Biology* **2022**, *44*, 1115-1126, doi:10.3390/cimb44030073.
 27. Solomon, A.L.; Ratchford, E.V.; Armitage, K.B.; Kovacic, J.C. Vascular Disease Patient Information Page: Vascular considerations with COVID-19 vaccines. *Vascular Medicine* **2021**, *27*, 102-106, doi:10.1177/1358863X211066128.
 28. Speicher, D.J.; Rose, J.; McKernan, K. Quantification of residual plasmid DNA and SV40 promoter-enhancer sequences in Pfizer/BioNTech and Moderna modRNA COVID-19 vaccines from Ontario, Canada. *Autoimmunity* **2025**, *58*, 2551517, doi:10.1080/08916934.2025.2551517.
 29. von Ranke, N.; Zhang, W.; Anokin, P.; Hulscher, N.; McKernan, K.J.; McCullough, P.A.; Catanzaro, J.A. Synthetic mRNA Vaccines and Transcriptomic Dysregulation: Evidence from New-Onset Adverse Events and Cancers Post-Vaccination. *ResearchGate*, **2025**. https://www.researchgate.net/publication/394007467_Synthetic_mRNA_Vaccines_and_Transcriptomic_Dysregulation_Evidence_from_New-Onset_Adverse_Events_and_Cancers_Post-Vaccination
 30. Li, Y.E.; Wang, S.; Reiter, R.J.; Ren, J. Clinical cardiovascular emergencies and the cellular basis of COVID-19 vaccination: from dream to reality? *International Journal of Infectious Diseases* **2022**, *124*, 1-10, doi:10.1016/j.ijid.2022.08.026.
 31. Mohseni Afshar, Z.; Tavakoli Pirzaman, A.; Liang, J.J.; Sharma, A.; Pirzadeh, M.; Babazadeh, A.; Hashemi, E.; Deravi, N.; Abdi, S.; Allahgholipour, A.; et al. Do we miss rare adverse events induced by COVID-19 vaccination? *Frontiers in Medicine* **2022**, *Volume 9* - 2022.

-
32. Bartolomucci, A.; Nobrega, M.; Ferrier, T.; Dickinson, K.; Kaorey, N.; Nadeau, A.; Castillo, A.; Burnier, J.V. Circulating tumor DNA to monitor treatment response in solid tumors and advance precision oncology. *npj Precision Oncology* **2025**, *9*, doi:10.1038/s41698-025-00876-y.
 33. Hanahan, D.; Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 34. Kim, H.; Park, K.U. Clinical Circulating Tumor DNA Testing for Precision Oncology. *Cancer Research and Treatment* **2023**, *55*, 351-366, doi:10.4143/crt.2022.1026.
 35. Raghavan, S.; Kundumani-Sridharan, V.; Kumar, S.; White, C.W.; Das, K.C. Thioredoxin Prevents Loss of UCP2 in Hyperoxia via MKK4–p38 MAPK–PGC1 α Signaling and Limits Oxygen Toxicity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2022**, *66*, 323-336, doi:10.1165/rcmb.2021-0219oc.
 36. Torgovnick, A.; Schumacher, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics* **2015**, *6*, doi:10.3389/fgene.2015.00157.
 37. Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschellà, G. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery* **2017**, *3*, doi:10.1038/cddiscovery.2017.71.
 38. Kamaliyan, Z.; Clarke, T.L. Zinc finger proteins: guardians of genome stability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2024**, *12*, doi:10.3389/fcell.2024.1448789.
 39. Li, X.; Han, M.; Zhang, H.; Liu, F.; Pan, Y.; Zhu, J.; Liao, Z.; Chen, X.; Zhang, B. Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. *Biomarker Research* **2022**, *10*, doi:10.1186/s40364-021-00345-1.
 40. Dutheil, N.; Yoon-Robarts, M.; Ward, P.; Henckaerts, E.; Skrabanek, L.; Berns, K.I.; Campagne, F.; Linden, R.M. Characterization of the Mouse Adeno-Associated Virus <i>AAVS1</i> Ortholog. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 8917-8921, doi:10.1128/jvi.78.16.8917-8921.2004.
 41. Hamilton, H.; Gomos, J.; Berns, K.I.; Falck-Pedersen, E. Adeno-Associated Virus Site-Specific Integration and AAVS1 Disruption. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 7874-7882, doi:10.1128/jvi.78.15.7874-7882.2004.
 42. Cheng, Y.; Liang, P.; Geng, H.; Wang, Z.; Li, L.; Cheng, S.H.; Ying, J.; Su, X.; Ng, K.M.; Ng, M.H.L.; et al. A Novel 19q13 Nucleolar Zinc Finger Protein Suppresses Tumor Cell Growth through Inhibiting Ribosome Biogenesis and Inducing Apoptosis but Is Frequently Silenced in Multiple Carcinomas. *Molecular Cancer Research* **2012**, *10*, 925-936, doi:10.1158/1541-7786.mcr-11-0594.
 43. Jen, J.; Wang, Y.-C. Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science* **2016**, *23*, doi:10.1186/s12929-016-0269-9.
 44. Petre, G.; Lorès, P.; Sartelet, H.; Truffot, A.; Poreau, B.; Brandeis, S.; Martinez, G.; Satre, V.; Harbuz, R.; Ray, P.F.; et al. Genomic duplication in the 19q13.42 imprinted region identified as a new genetic cause of intrauterine growth restriction. *Clinical Genetics* **2018**, *94*, 575-580, doi:10.1111/cge.13449.
 45. Ocegüera-Yanez, F.; Kim, S.-I.; Matsumoto, T.; Tan, G.W.; Xiang, L.; Hatani, T.; Kondo, T.; Ikeya, M.; Yoshida, Y.; Inoue, H.; et al. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods* **2016**, *101*, 43-55, doi:10.1016/j.ymeth.2015.12.012.
 46. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495-506. doi:10.1038/nrm.2017.48
 47. Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):254. Published 2021 Jul 9. doi:10.1038/s41392-021-00648-7
 48. Schaafsma, E.; Fugle, C.M.; Wang, X.; Cheng, C.A.-O. Pan-cancer association of HLA gene expression with cancer prognosis and immunotherapy efficacy.
 49. Szolek, A.; Schubert, B.; Mohr, C.; Sturm, M.; Feldhahn, M.; Kohlbacher, O. OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data.

-
50. Bahar, M.E.; Kim, H.J.; Kim, D.R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023**, *8*, doi:10.1038/s41392-023-01705-z.
 51. Kodaz, H. Frequency of RAS Mutations (KRAS, NRAS, HRAS) in Human Solid Cancer. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology* **2017**, doi:10.14744/ejmo.2017.22931.
 52. Braicu, C.; Buse, M.; Busuioc, C.; Drula, R.; Gulei, D.; Raduly, L.; Rusu, A.; Irimie, A.; Atanasov, A.G.; Slaby, O.; et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1618, doi:10.3390/cancers11101618.
 53. Clark-Garvey, S.; Kim, W.Y. RAF1 amplification: an exemplar of MAPK pathway activation in urothelial carcinoma. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci154095.
 54. Novillo, A.; Fernández-Santander, A.; Gaibar, M.; Galán, M.; Romero-Lorca, A.; El Abdellaoui-Soussi, F.; Gómez-del Arco, P. Role of Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 4 (CHD4) in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.633233.
 55. Wang, J.; Zhong, F.; Li, J.; Yue, H.; Li, W.; Lu, X. The epigenetic factor CHD4 contributes to metastasis by regulating the EZH2/ β -catenin axis and acts as a therapeutic target in ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine* **2023**, *21*, doi:10.1186/s12967-022-03854-1.
 56. Liu, Z.; Yoshimi, A.; Wang, J.; Cho, H.; Chun-Wei Lee, S.; Ki, M.; Bitner, L.; Chu, T.; Shah, H.; Liu, B.; et al. Mutations in the RNA Splicing Factor SF3B1 Promote Tumorigenesis through MYC Stabilization. *Cancer Discovery* **2020**, *10*, 806-821, doi:10.1158/2159-8290.cd-19-1330.
 57. Samy, A.; Ozdemir, M.K.; Alhaji, R. Studying the connection between SF3B1 and four types of cancer by analyzing networks constructed based on published research. *Scientific Reports* **2023**, *13*, doi:10.1038/s41598-023-29777-5.
 58. Goswami, K.; Venkatachalam, K.; Singh, S.P.; Rao, C.V.; Madka, V. Chromatin Remodulator CHD4: A Potential Target for Cancer Interception. *Genes* **2025**, *16*, 225, doi:10.3390/genes16020225.
 59. Xia, L.; Huang, W.; Bellani, M.; Seidman, M.M.; Wu, K.; Fan, D.; Nie, Y.; Cai, Y.; Zhang, Y.W.; Yu, L.-R.; et al. CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 653-668.e657, doi:10.1016/j.ccell.2017.04.005.
 60. Madsen, R.R.; Vanhaesebroeck, B.; Semple, R.K. Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in Molecular Medicine* **2018**, *24*, 856-870, doi:10.1016/j.molmed.2018.08.003.
 61. Ross, R.L.; McPherson, H.R.; Kettlewell, L.; Shnyder, S.D.; Hurst, C.D.; Alder, O.; Knowles, M.A. PIK3CA dependence and sensitivity to therapeutic targeting in urothelial carcinoma. *BMC Cancer* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12885-016-2570-0.
 62. Lee, J.-H. Targeting the ATM pathway in cancer: Opportunities, challenges and personalized therapeutic strategies. *Cancer Treatment Reviews* **2024**, *129*, 102808, doi:10.1016/j.ctrv.2024.102808.
 63. Acuti Martellucci, C.; Capodici, A.; Soldato, G.; et al. COVID-19 vaccination, all-cause mortality, and hospitalization for cancer: 30-month cohort study in an Italian province. *EXCLI Journal* **2025**, *24*, 690-707. doi:10.17179/excli2025-8400.
 64. Marik, P.; Hope, J. COVID-19 mRNA-Induced "Turbo Cancers." *Journal of Independent Medicine* **2025**, *1*, 185-194. doi:10.71189/JIM/2025/V01N03A02.
 65. Mills, A.A. The Chromodomain Helicase DNA-Binding Chromatin Remodelers: Family Traits that Protect from and Promote Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2017**, *7*, a026450, doi:10.1101/cshperspect.a026450.

6. Funding: Neo7Bioscience funded the case study and was involved in its design, data collection, analysis, and preparation of the manuscript.

7. Conflicts of Interest

This study was funded by Neo7Bioscience, which was involved in the study design, data collection, analysis, and manuscript preparation. John Catanzaro, who conceived the case study and served as Principal Investigator, is the CEO and a shareholder of Neo7Bioscience and also receives salary support from the company. Neo7Bioscience is a privately held biotechnology company specializing in the development of personalized therapeutic peptides. Nicolas Hulscher, who provided scientific input, receives salary support from the McCullough Foundation. Peter McCullough, who provided research oversight, is the founder of the McCullough Foundation but receives no compensation from the organization. The McCullough Foundation is a nonprofit entity dedicated to advancing independent public health research, medical ethics, and evidence-based policy.

8. Informed Consent: Informed consent was obtained from the subject involved in the study, and all data were de-identified before analysis.

9. Data Availability Statement: The sequencing datasets generated and analyzed in this study have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) and will be made publicly available under an accession number to be assigned. In the interim, the data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Genomische Integration und molekulare Dysregulation bei aggressivem Blasenkrebs im Stadium IV nach COVID-19-mRNA-Impfung

John A. Catanzaro¹ , Nicolas Hulscher²  und Peter A. McCullough² ,

¹ Neo7Bioscience; john.catanzaro@neo7bioscience.com

² McCullough Foundation; nichulscher@gmail.com

* Korrespondenz: john.catanzaro@neo7bioscience.com

Zusammenfassung:

Hintergrund: Blasenkrebs ist bei jungen Frauen selten, und fortgeschrittene Stadien sind äußerst ungewöhnlich. Wir berichten über einen anonymisierten Fall einer zuvor gesunden 31-jährigen Frau, die innerhalb von 12 Monaten nach Abschluss einer dreiteiligen Moderna-mRNA-Impfserie (Mai 2021, Juni 2021, Dezember 2021) einen schnell fortschreitenden Blasenkrebs im Stadium IV entwickelte.

Fallbefunde: Es wurde ein umfassendes Multi-Omik-Profilung unter Verwendung von PBIMA (Molecular Surveillance and Individualized Targeted Immunotherapy Peptide Editing) und REVISS (Spike-associated Transcriptional/Translational Instability Surveillance) durchgeführt, das Analysen von aus Plasma gewonnener zirkulierender Tumor-DNA, Vollblut-RNA und Urin-Exosom-Proteomik umfasste. Es wurden dysregulierte Genexpressionen bei onkogenen Treibergenen (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA und SF3B1), zusätzlichen tumorfördernden Signalen (TOP1, PSIP1 und ERBB2) und breiten Hinweisen auf Genominstabilität mit beeinträchtigter DNA-Reparatur (ATM, MSH2) festgestellt. Innerhalb der zirkulierenden Tumor-DNA wurde ein chimäres Read von Wirt und Vektor auf chr19:55.482,637–55.482,674 (GRCh38) in Cytoband 19q13.42, positioniert ~367 kb stromabwärts des kanonischen AAVS1-Safe-Harbors und ~158 kb stromaufwärts von ZNF580 am proximalen Rand des Zinkfinger-Genclusters (ZNF). Diese Sequenz stimmte mit einer perfekten 20/20-bp-Identität mit einem Segment (Basen 5905–5924) innerhalb der Spike-Open-Reading-Frame (ORF)-Kodierungsregion (Basen 3674–7480) der Pfizer BNT162b2-DNA-Plasmid-Referenz (GenBank-Zugang [OR134577.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR134577.1)) überein, obwohl der Patient nur Moderna-Impfungen erhalten hatte. Dieses offensichtliche Paradoxon lässt sich am besten durch gemeinsame Spike-ORF-Sequenzen innerhalb der Expressionskassette beider Impfstoffplattformen erklären; da die proprietäre Plasmidsequenz von Moderna nicht in NCBI hinterlegt ist, verwendet BLAST standardmäßig die von Pfizer veröffentlichte Referenz als nächstgelegene verfügbare Übereinstimmung. Die Integrationsstelle befand sich außerhalb des kanonischen AAVS1-„Safe Harbor“ und innerhalb einer reichen, rekombinationsanfälligen regulatorischen Region, was Bedenken hinsichtlich einer Transkriptionsstörung, der Bildung von Fusions-Transkripten und des onkogenen Potenzials aufkommen ließ. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällige 20-Basen-Sequenz perfekt mit einem vordefinierten Ziel übereinstimmt, liegt bei etwa 1 zu einer Billion, was diese Übereinstimmung statistisch gesehen überzeugend und als zufälliges Artefakt höchst unwahrscheinlich macht.

Schlussfolgerungen: Dieser Sentinel-Fallbericht liefert den ersten dokumentierten Nachweis für die genomische Integration von genetischem Material aus mRNA-Impfstoffen in einen Menschen und belegt einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der COVID-19-mRNA-Impfung und einer aggressiven Malignität, reproduzierbare multiomische Hinweise auf onkogene Signalwege und ein nicht sicheres Host-Vektor-Integrationsereignis. Zwar lässt sich anhand eines einzelnen Falls keine Kausalität feststellen, doch stellt die Konvergenz von (i) zeitlicher Nähe zur Impfung, (ii) genomischer Integration eines aus einem Impfstoffplasmid stammenden Spike-Genfragments und (iii) konsistenter transkriptomischer und proteomischer Instabilität in allen Bioproben ein höchst ungewöhnliches und biologisch plausibles Muster dar. Diese Ergebnisse unterstreichen die dringende Notwendigkeit einer systematischen genomischen Überwachung, einer orthogonalen Validierung mit Long-Read-Sequenzierung und größeren Kohortenstudien, um die Auswirkungen synthetischer mRNA-Impfstoffplattformen auf die Genomintegrität und das Krebsrisiko genau zu definieren.

1. Einleitung

Blasenkrebs ist vorwiegend eine Erkrankung älterer Erwachsener, und sein Auftreten bei jungen Frauen ist äußerst selten [1-8]. Wenn bei dieser Bevölkerungsgruppe eine fortgeschrittene Erkrankung vorliegt, ist sie in der Regel aggressiv und mit einer ungünstigen Prognose verbunden [9-17]. Solche atypischen Erscheinungsformen erfordern eine genaue Untersuchung potenzieller molekularer Treiber und externer Einflussfaktoren [18-25].

Synthetische mRNA-Impfstoffe führen stark modifizierte RNA-Moleküle und Lipid-Nanopartikel-Träger ein, die sich grundlegend von endogenen zellulären Transkripten unterscheiden. Residuale Plasmid-DNA, stabilisierende Nukleotidanaloga und das Potenzial für eine reverse Transkription geben Anlass zu Bedenken hinsichtlich genomischer Störungen, transkriptioneller Dysregulation und onkogener Aktivierung[26-29]. Berichte über Plasmid-DNA-Kontamination, Enhancer-Sequenzen und die Persistenz der Spike-Protein-Expression haben die Untersuchung der Rolle von mRNA-Impfstoffen bei genomischer Instabilität und maligner Transformation intensiviert[30,31].

Wir beschreiben den Fall einer 31-jährigen, zuvor gesunden Frau, die innerhalb von 12 Monaten nach Abschluss einer dreiteiligen Moderna-mRNA-Impfserie (Mai 2021, Juni 2021, Dezember 2021) an einem schnell fortschreitenden Blasenkrebs im Stadium IV erkrankte. Angesichts der Seltenheit von fortgeschrittenem Blasenkrebs in dieser Bevölkerungsgruppe rechtfertigte ihr Fall eine eingehende molekulare Untersuchung. Die Multi-Omik-Profilierung identifizierte eine reproduzierbare Aktivierung onkogener Treiber, eine Beeinträchtigung der DNA-Reparatur, transkriptomische Instabilität und Hinweise auf eine aus dem Impfstoff stammende Sequenz, die außerhalb eines genomischen Safe Harbor integriert war [26,32]. Dieser Fall veranschaulicht einen möglichen Zusammenhang zwischen der Impfung mit synthetischer mRNA und der Entwicklung einer aggressiven Malignität und unterstreicht die dringende Notwendigkeit einer systematischen genomischen Überwachung und unabhängigen Untersuchung der langfristigen onkogenen Risiken, die mit mRNA-Impfstoffplattformen verbunden sind.

2. Fallpräsentation

Eine zuvor gesunde 31-jährige Frau erhielt drei Moderna-mRNA-Impfungen (Mai 2021, Juni 2021, Dezember 2021) und wurde innerhalb von 12 Monaten mit schnell fortschreitendem Blasenkrebs im Stadium IV diagnostiziert – eine für dieses Alter ungewöhnliche und aggressive Erkrankung. Die Patientin unterzog sich einer umfassenden Multi-Omik-Profilierung unter Verwendung von PBIMA (Molekulare Überwachung und individualisierte gezielte Immuntherapie-Peptidbearbeitung) und REViSS (Überwachung der Spike-assoziierten transkriptionellen/translationalen Instabilität). Die Analysen umfassten die Sequenzierung zirkulierender Tumor-DNA aus Plasma, Vollblut-RNA-Transkriptomik und Urin-Exosom-Proteomik, was eine multidimensionale Bewertung der genomischen und transkriptionellen Dysregulation ermöglichte.

Multi-Omik-Analysen ergaben dysregulierte onkogene Treiber (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA, SF3B1) und zusätzliche tumorfördernde Signalwege (TOP1, PSIP1, ERBB2) in zirkulierender Tumor-DNA, Blut-RNA und Urin-Exosom-Proteomik[11,33-36]. Es wurden auch DNA-Reparaturdefizite (ATM, MSH2) identifiziert, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für genomische Instabilität einhergehen. Die spezifischen onkogenen Treiber, zusätzlichen Promotoren und DNA-Reparaturdefizite, die durch PBIMA-Multiom-Profilierung identifiziert wurden, sind in **Tabelle 1** zusammengefasst, wobei ihre Biospezies-Präsenz und funktionellen Konsequenzen hervorgehoben werden.

Gen-Target	Klassifizierung	Vorkommen in Bioproben	Funktionelle Implikationen
KRAS	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA, Urin	Konstitutive RAS–RAF–MEK–ERK-Aktivierung → unkontrollierte Proliferation, Therapieresistenz
ATM	Onkogener Treiber & DNA-Reparatur	ctDNA, Blut-RNA, Urin	Beeinträchtigte Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen und Checkpoint-Kontrolle → genomische Instabilität
MAPK1	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA, Urin	MAPK-Effektor-Hyperaktivierung → Invasion, Überleben Signal
NRAS	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA, Urin	MAPK/PI3K-Signalverstärkung → RAF1-abhängige , maligne Transformation
SF3B1	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA	Spliceosomenstörung → abnormales Spleißen, transkriptomische Umgestaltung Transkriptom-Umgestaltung
CHD4	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA, Urin	NuRD-Chromatin-Remodellierungsstörung → im-gepaarte DNA-Reparatur, Angiogenese, Immunumgehung
PIK3CA	Onkogener Treiber	ctDNA, Blut-RNA	Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs → metabolische Umstrukturierung, Angiogenese, Immunsuppression
TOP1	Hilfs-Promotor	ctDNA, Blut-RNA, Urin (variabel)	DNA-Topologie-Dysregulation → replikativer Stress, Transkriptionskollaps
PSIP1	Hilfs-Promotor	ctDNA, Blut-RNA, Urin (variabel)	Chromatin-Coaktivator-Hochregulation → Immununterstützung , Angiogenese
ERBB2 (HER2)	Hilfs-Promotor	ctDNA, Blut-RNA, Urin	Rezeptor-Tyrosinkinase-Amplifikation → proliferative Signalübertragung, Invasion, epigenetische Reprogrammierung
MSH2	DNA-Reparaturen	ctDNA, Blut-RNA	Mismatch-Reparatur-Defizienz → Mikrosatelliteninstabilität , Mutationslast

Tabelle 1. Durch PBIMA-Multi-Omik-Profilng identifizierte dysregulierte onkogene Treiber und zusätzliche tumorfördernde Signalwege

Ein besonders auffälliger Befund war der Nachweis eines chimären Host-Vektor-Reads, der auf chr19:55.482,637–55.482.674 (GRCh38) innerhalb der zytogenetischen Bande 19q13.42, etwa 367 kb stromabwärts vom kanonischen AAVS1-Safe-Harbor-Locus und etwa 158 kb stromaufwärts von ZNF580 am proximalen Rand des Zinkfinger-Genclusters (ZNF) [37–39]. Diese Sequenz stimmte zu 100 % mit einem Segment (Basen 5905 – 5924) innerhalb der Spike-Open-Reading-Frame (ORF)-Kodierungsregion (Basen 3674 – 7480) der Pfizer BNT162b2-DNA-Plasmid-Referenz (GenBank-Zugang [OR134577.1](#)) überein, obwohl der Patient nur Moderna-Impfungen erhalten hatte. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällige 20-Basen-Sequenz perfekt mit einem vordefinierten Ziel übereinstimmt, liegt bei etwa 1 zu einer Billion, was diese Übereinstimmung statistisch überzeugend und als zufälliges Artefakt höchst unwahrscheinlich macht. Die Integrationsstelle befand sich außerhalb des kanonischen AAVS1-„Safe Harbor“ und innerhalb einer genreichen, rekombinationsanfälligen regulatorischen Region, was Bedenken hinsichtlich Transkriptionsstörungen, der Bildung von Fusions-Transkripten und des onkogenen Potenzials aufkommen ließ[40,41].

Bemerkenswert ist, dass das integrierte Fragment einem 20-Nukleotid-Segment innerhalb der Spike-ORF-Kodierungsregion der konstruierten Expressionskassette entsprach. Das offensichtliche Paradoxon lässt sich durch (i) die Konservierung des Spike-ORF über verschiedene Impfstoffplattformen hinweg und (ii) das Fehlen einer hinterlegten Moderna-Plasmidreferenz erklären, wodurch die BLAST-Ausrichtung standardmäßig auf die von Pfizer veröffentlichte Sequenz zurückgreift. Somit handelt es sich bei diesem Ereignis um ein aus einem Impfstoff stammendes Spike-Kassettenfragment, das in chr19q13.42, am proximalen Rand des ZNF-Clusters, integriert ist und plausible regulatorische Auswirkungen hat. Die unterstützenden Beweise sind in **Tabelle 2** zusammengefasst, die die Mapping-Parameter, die Alignment-Identität, den genomischen Kontext und die funktionellen Auswirkungen dieses Integrationsereignisses dokumentiert.

Parameter	Ergebnis
Probenbeschreibung	Aggressiver Blasenkrebs (nach mRNA-Impfung)
Impfgeschichte	Moderna (3 Dosen: Mai 2021, Juni 2021, Dezember 2021)
Wirtskartierung	Menschliches Chromosom 19, Positionen 55.482.637 – 55.482.674 (GRCh38), Zytoband 19q13.42
Virale Referenz	OR134577.1 (Pfizer BNT162b2-Expressionsvektor)
Virus-Ausrichtungsbereich	Basen 5905 – 5924 (Spike-ORF-Kodierungsbereich der konstruierten Expressionskassette)
Alignment-Identität	20/20 bp (100 %)
Überlappungstyp	Chimäre „Gap“-Ausrichtung
Orientierung	Wirt: vorwärts (+); Virus: plus, Ausrichtung
Mapping-Qualität (MQ)	Wirt: 60 (hohe Zuverlässigkeit), Virus: 6 (geringe Zuverlässigkeit)
Bearbeitungsabstand	Wirt: 4; Virus: 2; Gesamt: 43
Integrationsklassifizierung	Mögliche Wirts-Translokation: WAHR; Vektor-Umlagerung: FALSCH
Genomischer Kontext	Befindet sich bei 19q13.42, ~367 kb stromabwärts vom AAVS1-Safe-Harbor (chr19:55.09–55.12 Mb) und ~158 kb stromaufwärts von ZNF580.
Funktionelle Relevanz	Gendichte, rekombinationsanfällige, transkriptionell aktive regulatorische Region; Potenzial für Transkriptionsstörungen, Fusions-Transkripte und genomische Instabilität

Tabelle 2. DNA-Frag-Analyse der Wirts-Vektor-Translokation bei einem mit Moderna geimpften Patienten, die ein chimäres Read bei chr19:55.482.637–55.482.674 (GRCh38), Zytoband 19q13.42, mit 100 % Übereinstimmung mit einem Segment der Pfizer BNT162b2-Plasmidreferenz (OR134577.1). Die Integrationsstelle liegt ~367 kb stromabwärts des kanonischen AAVS1-Safe-Harbors und ~158 kb stromaufwärts von ZNF580, wodurch sie sich in einer genreichen, transkriptionell aktiven, rekombinationsanfälligen Region befindet und Bedenken hinsichtlich einer Transkriptionsstörung, der Bildung von Fusions-Transkripten und einer genomischen Instabilität aufkommen lässt.

3. Diskussion

Dieser Fall wirft mehrere mechanistische Fragen hinsichtlich der potenziellen Rolle von synthetischen mRNA-Impfstoffen bei der malignen Transformation auf. Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich hierbei um den ersten dokumentierten Nachweis einer genomischen Integration von aus Impfstoffen stammendem genetischem Material in einem Menschen. Insbesondere haben wir eine aus einem Impfstoffvektor stammende Sequenz identifiziert, die bei chr19:55.482.637–55.482.674 (GRCh38) innerhalb des Zytobands 19q13.42 integriert ist und sich etwa 367 kb stromabwärts des kanonischen AAVS1 „Safe Harbor“ und ~158 kb stromaufwärts von ZNF580 am proximalen Rand des Zinkfinger-Genclusters (ZNF) positioniert ist, was einen direkten molekularen Nachweis für die genomische Interaktion zwischen Wirt und Vektor liefert [42–44]. Die Integrationsstelle liegt innerhalb einer genreichen, transkriptionell aktiven, rekombinationsanfälligen regulatorischen Region, einem Kontext, der mit einem erhöhten Risiko für Transkriptionsstörungen, Fusions-Transkriptbildung und genomischer Instabilität verbunden ist [45].

Zweitens unterstreicht die paradoxe Übereinstimmung der integrierten Sequenz mit dem Plasmid BNT162b2 von Pfizer, obwohl der Patient nur Moderna-Impfungen erhalten hatte, das Problem der plattformübergreifenden Plasmidhomologie und der Gemeinsamkeiten in der Herstellung. Die 100-prozentige Identität mit der hinterlegten Vektorsequenz von Pfizer deutet auf das Vorhandensein gemeinsamer Plasmid-Backbone-Elemente oder Spike-kodierender Motive über die Impfstoffplattformen hinweg hin. Da keine hinterlegte Moderna-Plasmidreferenz vorhanden war, wurde bei der BLAST-Ausrichtung standardmäßig die Sequenz von Pfizer als nächstgelegene verfügbare Übereinstimmung verwendet, was die Notwendigkeit einer unabhängigen Offenlegung und Validierung proprietärer Impfstoffkonstrukte weiter unterstreicht.

Drittens könnten mehrere plausible Mechanismen dem beobachteten Integrationsereignis zugrunde liegen [26,46,47]. Dazu gehören (i) die Persistenz und der Übertrag von residualen Plasmid-DNA-Fragmenten aus der In-vitro-Transkriptionsvorlage, (ii) die Umkehrung

Transkription von Spike-mRNA, gefolgt von Insertion an doppelsträngigen DNA-Brüchen, (iii) Fehlreparatur durch nicht-homologes Endverknüpfen (NHEJ) oder mikrohomologiemediertes Endverknüpfen (MMEJ), (iv) homologe Rekombination, wenn Sequenzähnlichkeiten vorliegen, (v) LINE-1-Retrotransposon-Aktivität, die cDNA-Zwischenprodukte erzeugt, und (vi) Topoisomerase-vermittelte Fehlverknüpfung während der DNA-Entwindung. Jeder dieser Wege ist biologisch machbar und steht im Einklang mit dem gleichzeitigen Nachweis von DNA-Reparaturdefiziten (ATM, MSH2) bei diesem Patienten, was die Anfälligkeit für Insertionsmutagenese erhöhen würde. Solche Schwachstellen können die onkogene Transformation und das Fortschreiten der Malignität beschleunigen. Speicher et al. stützen diese Befürchtung, indem sie Milliarden von residualen Plasmid-DNA-Fragmenten pro Impfstoffdosis quantifiziert haben, wobei die Werte sowohl bei den bivalenten als auch bei den XBB.1.5-Impfstoffen von Pfizer-BioNTech und Moderna die regulatorischen Sicherheitsgrenzwerte um das 36- bis 627-fache überschritten und damit eine plausible Quelle für Template-DNA für eine persistente chromosomale Integration darstellten [28].

Zusätzlich zum Integrationsereignis zwischen Wirt und Vektor zeigte das Multi-Omik-Profil des Patienten eine Konstellation von dysregulierten onkogenen Treibern und zusätzlichen tumorfördernden Signalen, die zusammen ein günstiges Umfeld für aggressive Malignität schaffen [29,48,49]. Aktivierende Veränderungen in KRAS und NRAS konvergieren in der MAPK-Signalkaskade, wodurch die proliferativen Signale aufrechterhalten und normale Wachstumskontrollen umgangen werden [9,50,51]. Die gleichzeitige Dysregulation von MAPK1 verstärkt nachgeschaltete ERK-gesteuerte Transkriptionsprogramme, die den Zellzyklus und das Überleben fördern [1-3,35,52,53]. Der Chromatin-Remodeler CHD4 und der RNA-Spleißfaktor SF3B1 tragen zur epigenetischen Reprogrammierung und zu einer abnormen Transkriptverarbeitung bei, wodurch die zelluläre Plastizität und die Anpassungsfähigkeit des Tumors gefördert werden [4,54-59].

Die Aktivierung von PIK3CA treibt die PI3K/AKT-Signalübertragung an, verbessert die metabolische Fitness, Invasion und Resistenz gegen Apoptose, während zusätzliche Signale von TOP1, PSIP1 und ERBB2 die Toleranz gegenüber Replikationsstress, die Transkriptionsaktivierung und die Reaktionsfähigkeit auf Wachstumsfaktoren weiter verstärken [7,10,12,17,60,61]. Wichtig ist, dass Defizite in ATM und MSH2 die Genauigkeit der DNA-Reparatur beeinträchtigen und zu genomischer Instabilität, Anhäufung von Mutationen und chromosomalen Umlagerungen führen [17,22,25,62]. Zusammengenommen liefert dieses Muster der Dysregulation mehrerer Signalwege eine mechanistische Grundlage für den ungewöhnlich schnellen Krankheitsverlauf des Patienten und verbindet impfstoffassoziierte genomische Störungen mit einer molekularen Umgebung, die für eine maligne Transformation prädisponiert ist.

Neue Erkenntnisse stützen einen Zusammenhang zwischen mRNA-Impfungen und Onkogenese [63, 64]. Eine bevölkerungsweite 30-monatige Kohortenstudie mit fast 300.000 Einwohnern von Pescara, Italien, ergab, dass die Verabreichung von ≥ 1 COVID-19-Impfdosis mit einem um 23 % erhöhten Risiko für Krebs-Krankenhausaufenthalte insgesamt verbunden war (HR 1,23, 95 % CI 1,11–1,37), wobei die stärksten und statistisch signifikanten Risiken für Brustkrebs (HR 1,54), Blasenkrebs (HR 1,62) und Darmkrebs (HR 1,35) beobachtet wurden [61]. Ergänzend zu diesen epidemiologischen Erkenntnissen definierten Marik et al. formal das Syndrom der durch COVID-19-mRNA-Impfstoffe induzierten „Turbo-Krebserkrankungen“ und stellten klinische Fallberichte, epidemiologische Signale und mechanistische Wege zusammen, über die das Spike-Protein die maligne Transformation durch metabolische Umprogrammierung, Apoptose-Resistenz, Angiogenese und Immundysregulation beschleunigen kann [62]. Zusammengenommen liefern diese Berichte konvergente epidemiologische und mechanistische Belege für unseren vorliegenden Fall, in dem die genomische Integration und molekulare Dysregulation direkt dokumentiert wurden.

Zusammen stützen diese Beobachtungen ein biologisch plausibles Rahmenkonzept, in dem die Exposition gegenüber synthetischen mRNA-Impfstoffen zu genomischer Instabilität, onkogener Signalübertragung und aggressiver Krankheitsentwicklung beiträgt. Zwar lässt sich aus einem einzelnen Fall keine Kausalität ableiten, doch liefert die Konvergenz von zeitlicher Nähe, Vektorsequenzintegration und reproduzierbarer Multi-Omik-Dysregulation ein starkes Signal für die Generierung von Hypothesen. Dies rechtfertigt eine dringende systematische genomische Überwachung, eine orthogonale Validierung mit Long-Read-Sequenzierung und eine unabhängige Untersuchung der langfristigen onkogenen Risiken im Zusammenhang mit mRNA-Impfstofftechnologien. Eine schematische Übersicht über den klinischen Verlauf, die Wirts-Vektor-Integration und die Multi-Omik-Dysregulation ist in **Abbildung 1** dargestellt.

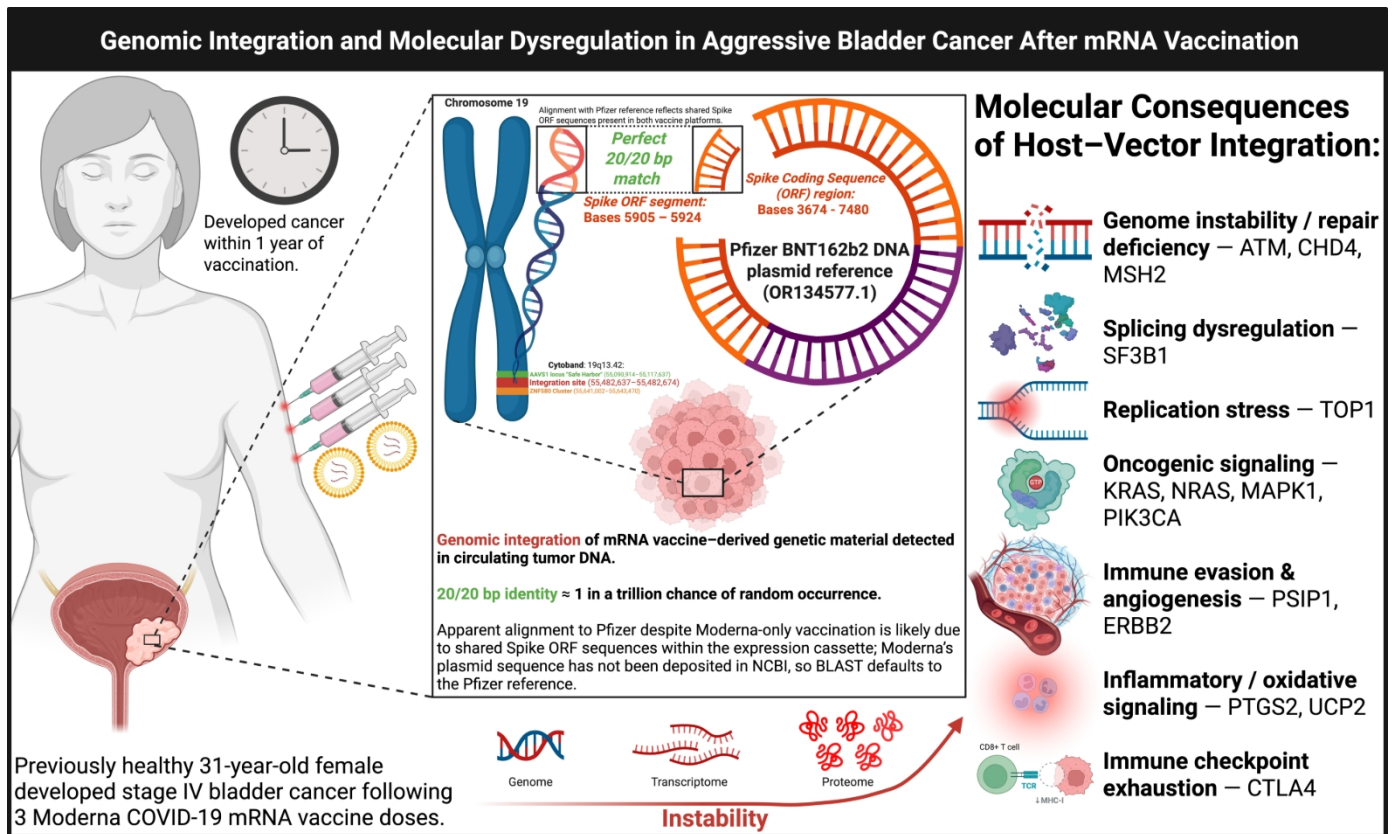


Abbildung 1. Genomische Integration und molekulare Dysregulation bei aggressivem Blasenkrebs nach mRNA-Impfung *Erstellt mit Biorender.com

4. Schlussfolgerungen

Dieser Sentinel-Fallbericht beschreibt das schnelle Auftreten von aggressivem Blasenkrebs im Stadium IV bei einer jungen Frau nach einer Moderna-mRNA-Impfserie, gekennzeichnet durch direkte Hinweise auf die genomische Integration von aus dem Impfstoff stammendem genetischem Material. Die Multi-Omik-Profilierung ergab eine reproduzierbare Aktivierung onkogener Treiber, DNA-Reparaturdefizite, transkriptomische Instabilität und die Integration einer aus dem Impfstoffvektor stammenden Sequenz außerhalb eines genomischen Safe Harbors [8,30,31,33,38,39,41,58,65]. Obwohl anhand eines einzelnen Falls keine Kausalität festgestellt werden kann, gibt die Konvergenz von zeitlicher Nähe, Integrationsnachweisen und molekularen Störungen in mehreren Systemen Anlass zu ernsthaften Bedenken hinsichtlich des onkogenen Potenzials synthetischer mRNA-Impfstoffplattformen. Diese Ergebnisse unterstreichen die dringende Notwendigkeit einer systematischen genomischen Überwachung, einer unabhängigen Validierung unter Verwendung orthogonaler Sequenzierungsmethoden und einer rigorosen Untersuchung der langfristigen genomischen und onkologischen Risiken von mRNA-Impfungen.

5. Referenzen

1. Bekele, R.; Samant, A.; Hanlon, T.; Mouw, K. Abstract 1709: MAPK pathway alterations are a targetable vulnerability in bladder cancer. *Cancer Research* **2023**, *83*, 1709-1709, doi:10.1158/1538-7445.am2023-1709.
2. Bekele, R.T.; Samant, A.S.; Nassar, A.H.; So, J.; Garcia, E.P.; Curran, C.R.; Hwang, J.H.; Mayhew, D.L.; Nag, A.; Thorner, A.R.; et al. Die RAF1-Amplifikation treibt eine Untergruppe von Blasen Tumoren an und verleiht Empfindlichkeit gegenüber MAPK-gerichteten Therapeutika. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci147849.
3. Cheng, G.; Zhou, Z.; Li, S.; Yang, S.; Wang, Y.; Ye, Z.; Ren, C. Hochpräzise Vorhersage der Überlebensrate bei Blasenkrebs: Erkenntnisse aus MAPK-Signalweg-bezogenen Genen. *Scientific Reports* **2024**, *14*, doi:10.1038/s41598-024-61302-0.
4. Columbres, R.C.; Chakraborty, A.; Apolo, A.; Banday, R. Abstract 5640: Erschließung des therapeutischen Potenzials von SF3B1-Inhibitoren für die Behandlung von Blasenkrebs. *Cancer Research* **2024**, *84*, 5640-5640, doi:10.1158/1538-7445.am2024-5640.
5. Dadhania, V.; Zhang, M.; Zhang, L.; Bondaruk, J.; Majewski, T.; Siefker-Radtke, A.; Guo, C.C.; Dinney, C.; Cogdell, D.E.; Zhang, S.; et al. Meta-Analyse der luminalen und basalen Subtypen von Blasenkrebs und Identifizierung charakteristischer immunhistochemischer Marker für den klinischen Einsatz. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 105-117, doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.036.
6. Deng, Z.; Shen, D.; Yu, M.; Zhou, F.; Shan, D.; Fang, Y.; Jin, W.; Qian, K.; Li, S.; Wang, G.; et al. Pectolinarigenin hemmt die Proliferation von Urothelkarzinomzellen der Blase durch Regulierung der DNA-Schädigungs-/Autophagie-Signalwege. *Cell Death Discovery* **2023**, *9*, doi:10.1038/s41420-023-01508-9.
7. Dueñas, M.; Martínez-Fernández, M.; García-Escudero, R.; Villacampa, F.; Marqués, M.; Saiz-Ladera, C.; Duarte, J.; Martínez, V.; Gómez, M.J.; Martín, M.L.; et al. <i>PIK3CA</i>-Genveränderungen treten bei Blasenkrebs häufig auf und stehen in Zusammenhang mit einem geringeren Rezidivrisiko bei nicht-muskelinvasiven Tumoren. *Molecular Carcinogenesis* **2013**, *54*, 566-576, doi:10.1002/mc.22125.
8. Hoffmann, M.J.; Schulz, W.A. Veränderungen der Chromatinregulatoren bei der Pathogenese des Urothelkarzinoms der Harnblase. *Cancers* **2021**, *13*, 6040, doi:10.3390/cancers13236040.
9. Hou, S.; Nieva, J.; Desai, N. Mit KRAS G12C mutierte NSCLC- und Blasenkrebs-Xenotransplantate, die mit Sotorasib und Adagrasib in Kombination mit mTOR-Inhibitoren behandelt wurden, zeigen eine verbesserte Antitumoraktivität von Nab-Sirolimus gegenüber Everolimus. *European Journal of Cancer* **2022**, *174*, S58-S59, doi:10.1016/S0959-8049(22)00957-1.
10. Kompier, L.C.; Lurkin, I.; van der Aa, M.N.M.; van Rhijn, B.W.G.; van der Kwast, T.H.; Zwarthoff, E.C. FGFR3-, HRAS-, KRAS-, NRAS- und PIK3CA-Mutationen bei Blasenkrebs und ihr Potenzial als Biomarker für Überwachung und Therapie. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13821, doi:10.1371/journal.pone.0013821.
11. Lee, K.-H.; Ku, J.H. Targeting splicing factors as molecular non-muscle invasive bladder cancer predictors. *Translational Andrology and Urology* **2018**, *7*, S715-S717, doi:10.21037/tau.2018.10.09.
12. López-Knowles, E.; Hernández, S.; Malats, N.r.; Kogevinas, M.; Lloreta, J.; Carrato, A.; Tardón, A.; Serra, C.; Real, F.X. <i>PIK3CA</i>-Mutationen sind eine frühe genetische Veränderung, die mit <i>FGFR3</i>-Mutationen in oberflächlichen papillären Blasen Tumoren assoziiert ist. *Cancer Research* **2006**, *66*, 7401-7404, doi:10.1158/0008-5472.can-06-1182.
13. Monnin, K.A.; Bronstein, I.B.; Gaffney, D.K.; Holden, J.A. Erhöhungen der DNA-Topoisomerase I bei Übergangszellkarzinomen der Harnblase: Korrelation mit der Expression von DNA-Topoisomerase II-alpha und p53. *Human Pathology* **1999**, *30*, 384-391, doi:10.1016/s0046-8177(99)90112-0.
14. Montero-Hidalgo, A.J.; Pérez-Gómez, J.M.; Martínez-Fuentes, A.J.; Gómez-Gómez, E.; Gahete, M.D.; Jiménez-Vacas, J.M.; Luque, R.M. Alternatives Spleißen bei Blasenkrebs: Mögliche Strategien für die Krebsdiagnose, -prognose und -behandlung. *WIREs RNA* **2022**, *14*, doi:10.1002/wrna.1760.
15. Ouerhani, S.; Bougateg, K.; Soltani, I.; Elgaai, A.B.A.; Abbes, S.; Menif, S. Die Prävalenz und prognostische Bedeutung der KRAS-Mutation bei Blasenkrebs, chronischer myeloischer Leukämie und Darmkrebs. *Molecular Biology Reports* **2013**, *40*, 4109-4114, doi:10.1007/s11033-013-2512-8.
16. Ouerhani, S.; Elgaai, A.B.A. Das Mutationsspektrum der Gene HRAS, KRAS, NRAS und FGFR3 bei Blasenkrebs. *Cancer Biomarkers* **2012**, *10*, 259-266, doi:10.3233/cbm-2012-0254.

-
17. Pan, Y.-H.; Zhang, J.-X.; Chen, X.; Liu, F.; Cao, J.-Z.; Chen, Y.; Chen, W.; Luo, J.-H. Vorhersagewert des TP53/PIK3CA/ATM-Mutationsklassifikators für Patienten mit Blasenkrebs, die auf eine Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie ansprechen. *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.643282.
 18. Shuman, L.; Pham, J.; Wildermuth, T.; Wu, X.-R.; Walter, V.; Warrick, J.I.; DeGraff, D.J. Die urotheliumspezifische Expression von mutiertem Pik3ca löst frühe Läsionen von nicht-invasivem Blasenkrebs aus. *The American Journal of Pathology* **2023**, *193*, 2133-2143, doi:10.1016/j.ajpath.2023.07.001.
 19. Stenehjem, D.; Tran, D.; Nkrumah, M.; Gupta, S. PD1/PDL1-Inhibitoren zur Behandlung von fortgeschrittenem Urothelkarzinom der Blase. *OncoTargets and Therapy* **2018**, *Band 11*, 5973-5989, doi:10.2147/ott.s135157.
 20. Wang, Z.; Shang, J.; Li, Z.; Li, H.; Zhang, C.; He, K.; Li, S.; Ju, W. PIK3CA wird durch CUX1 reguliert und fördert das Zellwachstum und die Metastasierung bei Blasenkrebs durch Aktivierung der epithelial-mesenchymalen Transition. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.536072.
 21. Wu, T.-Z.; Lei, C.-Y.; Li, J.-M.; Guo, Y.-F. Geschlechtsunterschiede, die durch somatische DNA-Veränderungen bei muskelinvasivem Blasenkarzinom aufgezeigt wurden. *Chinese Medical Journal* **2019**, *132*, 2492-2494, doi:10.1097/cm9.0000000000000487.
 22. Yi, R.; Lin, A.; Cao, M.; Xu, A.; Luo, P.; Zhang, J. ATM-Mutationen kommen Blasenkrebspatienten zugute, die mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren behandelt werden, indem sie auf die tumorielle Immunmikroumgebung einwirken. *Frontiers in Genetics* **2020**, *11*, doi:10.3389/fgene.2020.00933.
 23. Zargar, P.; Koochakkhani, S.; Hassanzadeh, M.; Ashouri Taziani, Y.; Nasrollahi, H.; Eftekhari, E. Die Herunterregulierung von Topoisomerase 1 und 2 mit Acriflavin sensibilisiert Blasenkrebszellen für eine Chemotherapie auf Cisplatin-Basis. *Molecular Biology Reports* **2022**, *49*, 2755-2763, doi:10.1007/s11033-021-07087-1.
 24. Zheng, Y.; Izumi, K.; Yao, J.L.; Miyamoto, H. Dihydrotestosteron reguliert die Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors und ERBB2 in Androgenrezeptor-positiven Blasenkrebszellen hoch. *Endocrine-Related Cancer* **2011**, *18*, 451-464, doi:10.1530/erc-11-0010.
 25. Zhou, Y.; Börcsök, J.; Adib, E.; Kamran, S.C.; Neil, A.J.; Stawiski, K.; Freeman, D.; Stormoen, D.R.; Sztupinszki, Z.; Samant, A.; et al. ATM-Mangel führt zu spezifischen therapeutischen Schwachstellen bei Blasenkrebs. *Science Advances* **2023**, *9*, doi:10.1126/sciadv.adg2263.
 26. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Intrazelluläre reverse Transkription des Pfizer BioNTech COVID-19-mRNA-Impfstoffs BNT162b2 in vitro in einer menschlichen Leberzelllinie. *Aktuelle Fragen der Molekularbiologie* **2022**, *44*, 1115-1126, doi:10.3390/cimb44030073.
 27. Solomon, A.L.; Ratchford, E.V.; Armitage, K.B.; Kovacic, J.C. Informationsseite für Patienten mit Gefäßerkrankungen: Gefäßmedizinische Überlegungen zu COVID-19-Impfstoffen. *Vascular Medicine* **2021**, *27*, 102-106, doi:10.1177/1358863X211066128.
 28. Speicher, D.J.; Rose, J.; McKernan, K. Quantifizierung von residualer Plasmid-DNA und SV40-Promotor-Enhancer-Sequenzen in den mRNA-COVID-19-Impfstoffen von Pfizer/BioNTech und Moderna aus Ontario, Kanada. *Autoimmunity* **2025**, *58*, 2551517, doi:10.1080/08916934.2025.2551517.
 29. von Ranke, N.; Zhang, W.; Anokin, P.; Hulscher, N.; McKernan, K.J.; McCullough, P.A.; Catanzaro, J.A. Synthetische mRNA-Impfstoffe und transkriptomische Dysregulation: Belege aus neu auftretenden unerwünschten Ereignissen und Krebserkrankungen nach der Impfung. *ResearchGate*, **2025**, https://www.researchgate.net/publication/394007467_Synthetic_mRNA_Vaccines_and_Transcriptomic_Dysregulation_Evidence_from_New-Onset_Adverse_Events_and_Cancers_Post-Vaccination
 30. Li, Y.E.; Wang, S.; Reiter, R.J.; Ren, J. Klinische kardiovaskuläre Notfälle und die zelluläre Grundlage der COVID-19-Impfung: vom Traum zur Realität? *International Journal of Infectious Diseases* **2022**, *124*, 1-10, doi:10.1016/j.ijid.2022.08.026.
 31. Mohseni Afshar, Z.; Tavakoli Pirzaman, A.; Liang, J.J.; Sharma, A.; Pirzadeh, M.; Babazadeh, A.; Hashemi, E.; Deravi, N.; Abdi, S.; Allahgholipour, A.; et al. Übersehen wir seltene unerwünschte Ereignisse, die durch die COVID-19-Impfung ausgelöst werden? *Frontiers in Medicine* **2022**, *Band 9* – 2022.

-
32. Bartolomucci, A.; Nobrega, M.; Ferrier, T.; Dickinson, K.; Kaorey, N.; Nadeau, A.; Castillo, A.; Burnier, J.V. Zirkulierende Tumor-DNA zur Überwachung des Ansprechens auf die Behandlung bei soliden Tumoren und zur Förderung der präzisen Onkologie. *npj Precision Oncology* **2025**, *9*, doi:10.1038/s41698-025-00876-y.
33. Hanahan, D.; Weinberg, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
34. Kim, H.; Park, K.U. Klinische Tests auf zirkulierende Tumor-DNA für die Präzisionsonkologie. *Krebsforschung und -behandlung* **2023**, *55*, 351-366, doi:10.4143/crt.2022.1026.
35. Raghavan, S.; Kundumani-Sridharan, V.; Kumar, S.; White, C.W.; Das, K.C. Thioredoxin verhindert den Verlust von UCP2 bei Hyperoxie über die MKK4-p38 MAPK-PGC1 α -Signalübertragung und begrenzt die Sauerstofftoxizität. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2022**, *66*, 323-336, doi:10.1165/rcmb.2021-0219oc.
36. Torgovnick, A.; Schumacher, B. DNA-Reparaturmechanismen bei der Entstehung und Therapie von Krebs. *Frontiers in Genetics* **2015**, *6*, doi:10.3389/fgene.2015.00157.
37. Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschellà, G. Zinkfingerproteine in Gesundheit und Krankheit. *Cell Death Discovery* **2017**, *3*, doi:10.1038/cddiscovery.2017.71.
38. Kamaliyan, Z.; Clarke, T.L. Zinkfingerproteine: Wächter der Genomstabilität. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2024**, *12*, doi:10.3389/fcell.2024.1448789.
39. Li, X.; Han, M.; Zhang, H.; Liu, F.; Pan, Y.; Zhu, J.; Liao, Z.; Chen, X.; Zhang, B. Strukturen und biologische Funktionen von Zinkfingerproteinen und ihre Rolle bei Leberzellkarzinomen. *Biomarker Research* **2022**, *10*, doi:10.1186/s40364-021-00345-1.
40. Dutheil, N.; Yoon-Robarts, M.; Ward, P.; Henckaerts, E.; Skrabanek, L.; Berns, K.I.; Campagne, F.; Linden, R.M. Charakterisierung des Maus-Adeno-assoziierten Virus <i>AAVS1</i> Ortholog. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 8917-8921, doi:10.1128/jvi.78.16.8917-8921.2004.
41. Hamilton, H.; Gomos, J.; Berns, K.I.; Falck-Pedersen, E. Adeno-assoziierte Virus-spezifische Integration und AAVS1-Störung. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 7874-7882, doi:10.1128/jvi.78.15.7874-7882.2004.
42. Cheng, Y.; Liang, P.; Geng, H.; Wang, Z.; Li, L.; Cheng, S.H.; Ying, J.; Su, X.; Ng, K.M.; Ng, M.H.L.; et al. Ein neuartiges 19q13-Nukleolar-Zinkfingerprotein unterdrückt das Wachstum von Tumorzellen durch Hemmung der Ribosomenbiogenese und Induktion von Apoptose, wird jedoch häufig in mehreren Karzinomen stillgelegt. *Molecular Cancer Research* **2012**, *10*, 925-936, doi:10.1158/1541-7786.mcr-11-0594.
43. Jen, J.; Wang, Y.-C. Zinkfingerproteine in der Krebsprogression. *Journal of Biomedical Science* **2016**, *23*, doi:10.1186/s12929-016-0269-9.
44. Petre, G.; Lorès, P.; Sartelet, H.; Truffot, A.; Poreau, B.; Brandeis, S.; Martinez, G.; Satre, V.; Harbuz, R.; Ray, P.F.; et al. Genomische Duplikation in der geprägten Region 19q13.42 als neue genetische Ursache für intrauterine Wachstumsrestriktion identifiziert. *Clinical Genetics* **2018**, *94*, 575-580, doi:10.1111/cge.13449.
45. Ocegüera-Yanez, F.; Kim, S.-I.; Matsumoto, T.; Tan, G.W.; Xiang, L.; Hatani, T.; Kondo, T.; Ikeya, M.; Yoshida, Y.; Inoue, H.; et al. Engineering des AAVS1-Lokus für eine konsistente und skalierbare Transgenexpression in humanen iPSCs und ihren differenzierten Derivaten. *Methods* **2016**, *101*, 43-55, doi:10.1016/j.ymeth.2015.12.012.
46. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Nicht-homologe DNA-Endverknüpfung und alternative Wege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495-506. doi:10.1038/nrm.2017.48
47. Huang R, Zhou PK. DNA-Schadensreparatur: historische Perspektiven, mechanistische Wege und klinische Umsetzung für die gezielte Krebstherapie. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):254. Veröffentlicht am 9. Juli 2021. doi:10.1038/s41392-021-00648-7
48. Schaafsma, E.; Fugle, C.M.; Wang, X.; Cheng, C.A.-O. Pan-Krebs-Assoziation der HLA-Genexpression mit Krebsprognose und Immuntherapie-Wirksamkeit.
49. Szolek, A.; Schubert, B.; Mohr, C.; Sturm, M.; Feldhahn, M.; Kohlbacher, O. OptiType: Präzise HLA-Typisierung aus Next-Generation-Sequencing-Daten.

-
50. Bahar, M.E.; Kim, H.J.; Kim, D.R. Targeting des RAS/RAF/MAPK-Signalwegs für die Krebstherapie: vom Mechanismus bis zu klinischen Studien. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023**, *8*, doi:10.1038/s41392-023-01705-z.
51. Kodaz, H. Häufigkeit von RAS-Mutationen (KRAS, NRAS, HRAS) bei soliden Tumoren beim Menschen. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology* **2017**, doi:10.14744/ejmo.2017.22931.
52. Braicu, C.; Buse, M.; Busuioc, C.; Drula, R.; Gulei, D.; Raduly, L.; Rusu, A.; Irimie, A.; Atanasov, A.G.; Slaby, O.; et al. Eine umfassende Übersicht über MAPK: Ein vielversprechendes therapeutisches Ziel bei Krebs. *Cancers* **2019**, *11*, 1618, doi:10.3390/cancers11101618.
53. Clark-Garvey, S.; Kim, W.Y. RAF1-Amplifikation: ein Beispiel für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs bei Urothelkarzinomen. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci154095.
54. Novillo, A.; Fernández-Santander, A.; Gaibar, M.; Galán, M.; Romero-Lorca, A.; El Abdellaoui-Soussi, F.; Gómez-del Arco, P. Rolle des Chromodomain-Helicase-DNA-bindenden Proteins 4 (CHD4) bei Brustkrebs. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.633233.
55. Wang, J.; Zhong, F.; Li, J.; Yue, H.; Li, W.; Lu, X. Der epigenetische Faktor CHD4 trägt durch die Regulierung der EZH2/β-Catenin-Achse zur Metastasierung bei und fungiert als therapeutisches Ziel bei Eierstockkrebs. *Journal of Translational Medicine* **2023**, *21*, doi:10.1186/s12967-022-03854-1.
56. Liu, Z.; Yoshimi, A.; Wang, J.; Cho, H.; Chun-Wei Lee, S.; Ki, M.; Bitner, L.; Chu, T.; Shah, H.; Liu, B.; et al. Mutationen im RNA-Spleißfaktor SF3B1 fördern die Tumorentstehung durch MYC-Stabilisierung. *Cancer Discovery* **2020**, *10*, 806–821, doi:10.1158/2159-8290.cd-19-1330.
57. Samy, A.; Ozdemir, M.K.; Alhajj, R. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen SF3B1 und vier Krebsarten durch Analyse von Netzwerken, die auf der Grundlage veröffentlichter Forschungsergebnisse erstellt wurden. *Scientific Reports* **2023**, *13*, doi:10.1038/s41598-023-29777-5.
58. Goswami, K.; Venkatachalam, K.; Singh, S.P.; Rao, C.V.; Madka, V. Chromatin-Remodulator CHD4: Ein potenzielles Ziel für die Krebsbekämpfung. *Genes* **2025**, *16*, 225, doi:10.3390/genes16020225.
59. Xia, L.; Huang, W.; Bellani, M.; Seidman, M.M.; Wu, K.; Fan, D.; Nie, Y.; Cai, Y.; Zhang, Y.W.; Yu, L.-R.; et al. CHD4 hat onkogene Funktionen bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der epigenetischen Unterdrückung mehrerer Tumorsuppressorgene. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 653–668.e657, doi:10.1016/j.ccell.2017.04.005.
60. Madsen, R.R.; Vanhaesebroeck, B.; Semple, R.K. Krebsassoziierte PIK3CA-Mutationen bei Überwucherungsstörungen. *Trends in Molecular Medicine* **2018**, *24*, 856–870, doi:10.1016/j.molmed.2018.08.003.
61. Ross, R.L.; McPherson, H.R.; Kettlewell, L.; Shnyder, S.D.; Hurst, C.D.; Alder, O.; Knowles, M.A. PIK3CA-Abhängigkeit und Empfindlichkeit gegenüber therapeutischen Zielstrukturen bei Urothelkarzinomen. *BMC Cancer* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12885-016-2570-0.
62. Lee, J.-H. Targeting des ATM-Signalwegs bei Krebs: Chancen, Herausforderungen und personalisierte therapeutische Strategien. *Cancer Treatment Reviews* **2024**, *129*, 102808, doi:10.1016/j.ctrv.2024.102808.
63. Acuti Martellucci, C.; Capodici, A.; Soldato, G.; et al. COVID-19-Impfung, Gesamtmortalität und Krankenhausaufenthalte aufgrund von Krebs: 30-monatige Kohortenstudie in einer italienischen Provinz. *EXCLI Journal* **2025**, *24*, 690–707. doi:10.17179/excli2025-8400.
64. Marik, P.; Hope, J. COVID-19-mRNA-induzierte „Turbo-Krebserkrankungen“. *Journal of Independent Medicine* **2025**, *1*, 185–194. doi:10.71189/JIM/2025/V01N03A02.
65. Mills, A.A. Die Chromodomänen-Helikase-DNA-bindenden Chromatin-Modeller: Familienmerkmale, die vor Krebs schützen und ihn fördern. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2017**, *7*, a026450, doi:10.1101/cshperspect.a026450.

6. Finanzierung: Neo7Bioscience finanzierte die Fallstudie und war an deren Konzeption, Datenerhebung, Analyse und Vorbereitung des Manuskripts beteiligt.

7. Interessenkonflikte

Diese Studie wurde von Neo7Bioscience finanziert, das an der Studienkonzeption, Datenerhebung, Analyse und Manuskriptvorbereitung beteiligt war. John Catanzaro, der die Fallstudie konzipiert hat und als Hauptforscher fungierte, ist CEO und Anteilseigner von Neo7Bioscience und erhält außerdem eine Gehaltsunterstützung von dem Unternehmen. Neo7Bioscience ist ein privat geführtes Biotechnologieunternehmen, das sich auf die Entwicklung personalisierter therapeutischer Peptide spezialisiert hat. Nicolas Hulscher, der wissenschaftliche Beiträge leistete, erhält eine Gehaltsunterstützung von der McCullough Foundation. Peter McCullough, der die Forschungsaufsicht übernahm, ist der Gründer der McCullough Foundation, erhält jedoch keine Vergütung von der Organisation. Die McCullough Foundation ist eine gemeinnützige Einrichtung, die sich der Förderung unabhängiger Forschung im Bereich der öffentlichen Gesundheit, der medizinischen Ethik und evidenzbasierter Politik widmet.

8. Einverständniserklärung: Die Einverständniserklärung wurde von den an der Studie beteiligten Personen eingeholt, und alle Daten wurden vor der Analyse anonymisiert.

9. Erklärung zur Datenverfügbarkeit: Die in dieser Studie generierten und analysierten Sequenzierungsdatensätze wurden an den NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) übermittelt und werden unter einer noch zu vergebenden Zugangsnummer öffentlich zugänglich gemacht. In der Zwischenzeit sind die Daten auf begründete Anfrage beim korrespondierenden Autor erhältlich.

Integrazione genomica e disregolazione molecolare nel carcinoma della vescica aggressivo in stadio IV dopo vaccinazione con mRNA contro il COVID-19

John A. Catanzaro¹, Nicolas Hulscher²*, e Peter A. McCullough²

Neo7Bioscience; john.catanzaro@neo7bioscience.com
Foundation; nichulischer@gmail.com

* Corrispondenza: john.catanzaro@neo7bioscience.com

Abstract:

Contesto: Il cancro alla vescica è raro nelle donne giovani e i casi in stadio avanzato sono eccezionalmente rari. Riportiamo un caso anonimizzato di una donna di 31 anni precedentemente sana che ha sviluppato un cancro alla vescica in stadio IV a rapida progressione entro 12 mesi dal completamento di una serie di tre dosi di vaccino a mRNA Moderna (maggio 2021, giugno 2021, dicembre 2021). **Risultati del caso:** è stata eseguita una profilazione multi-omica completa utilizzando PBIMA (Molecular Surveillance and Individualized Targeted Immunotherapy Peptide Editing) e REViSS (Spike-associated Transcriptional/Translational Instability Surveillance), incorporando analisi del DNA tumorale circolante derivato dal plasma, dell'RNA del sangue intero e della proteomica degli esosomi urinari. Sono state identificate espressioni geniche disregolate nei geni driver oncogenici (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA e SF3B1), nei segnali ausiliari che promuovono il tumore (TOP1, PSIP1 ed ERBB2) e nell'ampia evidenza di instabilità genomica con riparazione del DNA compromessa (ATM, MSH2). All'interno del DNA tumorale circolante, una lettura chimerica ospite-vettore è stata mappata su chr19:55.482.637-55.482.674 (GRCh38), nella cito-banda 19q13.42, posizionata -367 kb a valle del rifugio sicuro canonico AAVS1 e -158 kb a monte di ZNF580 sul bordo prossimale del cluster genico zinc-finger (ZNF). Questa sequenza è allineata con identità perfetta 20/20 bp a un segmento (basi 5905-5924) all'interno della regione codificante del frame di lettura aperto (ORF) Spike (basi 3674-7480) del riferimento del plasmide DNA Pfizer BNT162b2 (accesso GenBank [OR134577.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclorf/134577.1)), nonostante il paziente avesse ricevuto solo vaccinazioni Moderna. Questo apparente paradosso trova la sua migliore spiegazione nelle sequenze ORF Spike condivise all'interno della cassetta di espressione in entrambe le piattaforme vaccinali; poiché la sequenza plasmidica proprietaria di Moderna non è stata depositata nell'NCBI, BLAST utilizza come riferimento predefinito quello pubblicato da Pfizer come corrispondenza disponibile più vicina. Il sito di integrazione era situato al di fuori del "porto sicuro" canonico AAVS1 e all'interno di una regione regolatoria densa di geni e soggetta a ricombinazione, sollevando preoccupazioni per la perturbazione trascrizionale, la formazione di trascrizioni di fusione e il potenziale oncogenico. La probabilità che una sequenza casuale di 20 basi corrisponda perfettamente a un bersaglio predefinito è di circa 1 su un trilione, rendendo questo allineamento statisticamente convincente e altamente improbabile che si tratti di un artefatto accidentale.

Conclusioni: Questo caso clinico sentinella fornisce la prima prova documentata dell'integrazione genomica di materiale genetico derivato dal vaccino a mRNA in un soggetto umano, documentando un'associazione temporale tra la vaccinazione con mRNA contro il COVID-19 e una neoplasia maligna aggressiva, prove multi-omiche riproducibili di segnalazione oncogenica e un evento di integrazione ospite-vettore non sicuro. Sebbene non sia possibile stabilire una causalità sulla base di un singolo caso, la convergenza di (i) stretta vicinanza temporale alla vaccinazione, (ii) integrazione genomica di un frammento del gene spike derivato dal plasmide del vaccino e (iii) instabilità trascrittomica e proteomica coerente in tutti i campioni biologici rappresenta un modello altamente insolito e biologicamente plausibile. Questi risultati evidenziano l'urgente necessità di una sorveglianza genomica sistematica, di una validazione ortogonale con sequenziamento a lettura lunga e di studi di coorte più ampi per definire rigorosamente l'impatto delle piattaforme di vaccini a mRNA sintetico sull'integrità del genoma e sul rischio di cancro.

1. Introduzione

Il cancro alla vescica è una malattia che colpisce prevalentemente gli anziani ed è estremamente raro che si manifesti nelle donne giovani [1-8]. Quando questa popolazione presenta una forma avanzata della malattia, essa è solitamente aggressiva e comporta una prognosi sfavorevole [9-17]. Queste manifestazioni atipiche richiedono un attento esame dei potenziali fattori molecolari e dei fattori esterni che contribuiscono alla malattia [18-25].

I vaccini a mRNA sintetico introducono molecole di RNA fortemente modificate e vettori a nanoparticelle lipidiche che differiscono sostanzialmente dai trascritti cellulari endogeni. Il DNA plasmidico residuo, gli analoghi nucleotidici stabilizzanti e il potenziale di trascrizione inversa sollevano preoccupazioni circa la distruzione genomica, la disregolazione trascrizionale e l'attivazione oncogenica [26-29]. Le segnalazioni di contaminazione da DNA plasmidico, sequenze potenzianti e persistenza dell'espressione della proteina spike hanno intensificato l'attenzione sul ruolo dei vaccini a mRNA nell'instabilità genomica e nella trasformazione maligna [30,31].

Descriviamo il caso di una donna di 31 anni precedentemente sana che ha sviluppato un carcinoma della vescica in stadio IV rapidamente progressivo entro 12 mesi dal completamento di una serie di tre dosi di vaccino Moderna mRNA (maggio 2021, giugno 2021, dicembre 2021). Data la rarità del carcinoma della vescica in stadio avanzato in questa fascia demografica, il suo caso ha richiesto un'indagine molecolare approfondita. Il profilo multi-omico ha identificato l'attivazione riproducibile di driver oncogenici, compromissione della riparazione del DNA, instabilità trascrittomica e prove di una sequenza derivata dal vaccino integrata al di fuori di un rifugio genomico sicuro [26,32]. Questo caso illustra una potenziale associazione tra la vaccinazione con mRNA sintetico e lo sviluppo di neoplasie aggressive, sottolineando l'urgente necessità di una sorveglianza genomica sistematica e di un'indagine indipendente sui rischi oncogenici a lungo termine associati alle piattaforme di vaccini a mRNA.

2. Presentazione del caso

Una donna di 31 anni precedentemente sana ha ricevuto tre vaccinazioni con mRNA Moderna (maggio 2021, giugno 2021, dicembre 2021) e, entro 12 mesi, le è stato diagnosticato un cancro alla vescica in stadio IV a rapida progressione, una forma insolita e aggressiva per questa età. La paziente è stata sottoposta a un profilo multi-omico completo utilizzando PBIMA (Molecular Surveillance and Individualized Targeted Immunotherapy Peptide Editing) e REViSS (Spike-associated Transcriptional/Translational Instability Surveillance). Le analisi hanno incorporato il sequenziamento del DNA tumorale circolante dal plasma, la trascrittomica dell'RNA del sangue intero e la proteomica degli esosomi urinari, consentendo una valutazione multidimensionale della disregolazione genomica e trascrizionale.

Le analisi multi-omiche hanno rivelato driver oncogenici disregolati (KRAS, ATM, MAPK1, NRAS, CHD4, PIK3CA, SF3B1) e vie ausiliarie che promuovono il tumore (TOP1, PSIP1, ERBB2) nel DNA tumorale circolante, nell'RNA ematico e nella proteomica degli esosomi urinari [11,33-36]. Sono state inoltre identificate carenze nella riparazione del DNA (ATM, MSH2), in linea con una maggiore suscettibilità all'instabilità genomica. I driver oncogenici specifici, i promotori ausiliari e le carenze nella riparazione del DNA identificati attraverso il profilo multi-omico PBIMA sono riassunti nella Tabella 1, che evidenzia la loro presenza nelle biospezie e le conseguenze funzionali.

Gene bersaglio	Classificazione	Presenza nel campione biologico	Implicazioni funzionali
KRAS	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue, urina	Attivazione costitutiva di RAS-RAF-MEK-ERK → proliferazione incontrollata controllata, resistenza alla terapia
ATM	Driver oncogenico e riparazione del DNA	ctDNA, RNA nel sangue, urina	Compromissione del riconoscimento delle rotture a doppio filamento del DNA e controllo dei checkpoint → instabilità genomica
MAPKI	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue, urina	iperattivazione dell'effettore MAPK → invasione, sopravvivenza segnalazione
NRAS	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue, urina	Amplificazione della segnalazione MAPK/PI3K → RAF1 dipendente , trasformazione maligna
SF3BI	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue	Interruzione dello spliceosoma → splicing aberrante, rimodellamento trascrittomico rimodellamento trascrittomico
CHD4	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue, urina	Disfunzione del rimodellamento della cromatina NuRD → im- riparazione del DNA appaiato, angiogenesi, evasione immunitaria
PIK3CA	Driver oncogenico	ctDNA, RNA nel sangue	Attivazione della via PI3K-AKT → Riorganizzazione metabolica, angiogenesi, immunosoppressione
TOP1	Promotore ausiliario	ctDNA, RNA nel sangue, urina (variabile)	Deregolazione della topologia del DNA → stress replicativo, collasso trascrizionale
PSIP1	Promotore ausiliario	ctDNA, RNA nel sangue, urina (variabile)	Upregulation del coattivatore della cromatina → supporto immunitario , angiogenesi
ERBB2 (HER2)	Promotore ausiliario	ctDNA, RNA nel sangue, urina	Amplificazione del recettore tirosin-chinasi → proliferazione , invasione, riprogrammazione epigenetica
MSH2	Gene di riparazione del DNA	ctDNA, sangue RNA	Deficit di riparazione dei mismatch → instabilità dei microsatelliti , carico mutazionale

Tabella 1. Fattori oncogenici disregolati e vie ausiliarie che promuovono il tumore identificati dal profilo multi-omico PBIMA

Un risultato particolarmente sorprendente è stata l'individuazione di una mappatura di lettura chimerica ospite-vettore su chr19:55.482.637—55.482.674 (GRCh38), all'interno della banda citogenetica 19q13.42, situata -367 kb a valle del locus canonico AAVS1 safe harbor e -158 kb a monte di ZNF580 all'estremità prossimale del cluster genico zinc-finger (ZNF)[37—39]. Questa sequenza è allineata con identità del 100% a un segmento (basi 5905 — 5924) all'interno della regione codificante Spike Open Reading Frame (ORF) (basi 3674 — 7480) del riferimento del plasmide DNA Pfizer BNT162b2 (accesso GenBank [OR134577.1](#)), nonostante il paziente avesse ricevuto solo vaccinazioni Moderna. La probabilità che una sequenza casuale di 20 basi corrisponda perfettamente a un target predefinito è di circa 1 su un trilione, rendendo questo allineamento statisticamente convincente e altamente improbabile che si tratti di un artefatto accidentale. Il sito di integrazione era situato al di fuori del "porto sicuro" canonico AAVS1 e all'interno di una regione regolatoria densa di geni e soggetta a ricombinazione, sollevando preoccupazioni per la distruzione trascrizionale, la formazione di trascrizioni di fusione e il potenziale oncogenico[40,41].

In particolare, il frammento integrato corrispondeva a un segmento di 20 nucleotidi all'interno della regione codificante dell'ORF Spike della cassetta di espressione ingegnerizzata. L'apparente paradosso è spiegato da (i) la conservazione dell'ORF Spike nelle piattaforme vaccinali e (ii) l'assenza di un riferimento plasmidico Moderna depositato, che imposta di default l'allineamento BLAST alla sequenza pubblicata da Pfizer. Pertanto, l'evento rappresenta un frammento di cassetta Spike derivato dal vaccino integrato in chr19q13.42, sul bordo prossimale del cluster ZNF, con un plausibile impatto regolatorio. Le prove a sostegno sono riassunte nella Tabella 2, che documenta i parametri di mappatura, l'identità dell'allineamento, il contesto genomico e le implicazioni funzionali di questo evento di integrazione.

Parametro	Risultato
Descrizione del campione Storia	Carcinoma della vescica aggressivo (post-vaccinazione con mRNA) Moderna (3 dosi: maggio 2021, giugno 2021, dicembre 2021)
vaccinale Mappatura dell'ospite	Cromosoma umano 19, posizioni 55.482.637 - 55.482.674 (GRCh38), cito-banda 19q13.42 OR134577.1 (vettore di espressione Pfizer BNT162b2)
Riferimento virale	Basi 5905 — 5924 (regione codificante ORF Spike della cassetta di espressione ingegnerizzata)
Allineamento virale	20/20 bp (100%)
Intervallo Identità	Allineamento chimerico, "gap"
dell'allineamento Tipo di sovrapposizione	Ospite: forward (+); Virale: plus, orientamento Ospite: 60 (alta affidabilità), Virale: 6 (bassa affidabilità)
Orientamento	Ospite: 4; Virale: 2; Totale: 43
Qualità della mappatura	Possibile traslocazione dell'ospite: VERO; Riorganizzazione del vettore: FALSO
(MQ) Distanza di modifica	Situato a 19q13.42, -367 kb a valle dell'AAVS1 safe harbor (chr19:55.09—55.12 Mb) e -158 kb a monte di ZNF580.
Classificazione	monte di ZNF580.
dell'integrazione Contesto genomico	Regione regolatoria densa di geni, soggetta a ricombinazione, trascrizionalmente attiva; potenziale di interruzione trascrizionale, trascrizioni di fusione e instabilità genomica
Rilevanza funzionale	

Tabella 2. Analisi del DNA Frag della traslocazione ospite-vettore in un paziente vaccinato con Moderna, che mostra una lettura chimerica in chr19:55.482.637-55.482.674 (GRCh38), citobanda 19q13.42, con allineamento al 100% a un segmento del plasmide di riferimento Pfizer BNT162b2 (OR134577.1). Il sito di integrazione si trova -367 kb a valle del safe harbor canonico AAVS1 e -158 kb a monte di ZNF580, collocandosi all'interno di una regione densa di geni, trascrizionalmente attiva e soggetta a ricombinazione, e sollevando preoccupazioni per la perturbazione trascrizionale, la generazione di trascrizioni di fusione e l'instabilità genomica.

3. Discussione

Questo caso solleva diverse preoccupazioni meccanicistiche riguardo al potenziale ruolo della vaccinazione con mRNA sintetico nella trasformazione maligna. A nostra conoscenza, rappresenta la prima prova documentata dell'integrazione genomica di materiale genetico derivato dal vaccino in un soggetto umano. Nello specifico, abbiamo identificato una sequenza derivata dal vettore vaccinale integrata in chr19:55.482.637-55.482.674 (GRCh38), all'interno della cito-banda 19q13.42, posizionata -367 kb a valle del canonico AAVS1 "safe harbor" e -158 kb a monte di ZNF580 sul bordo prossimale del cluster genico zinc-finger (ZNF), fornendo una prova molecolare diretta dell'interazione genomica ospite-vettore [42-44]. Il sito di integrazione si trova all'interno di una regione regolatoria densamente popolata da geni, trascrizionalmente attiva e soggetta a ricombinazione, un contesto associato a un aumento del rischio di interruzione trascrizionale, formazione di trascrizioni di fusione e instabilità genomica [45].

In secondo luogo, il paradossale allineamento della sequenza integrata al plasmide Pfizer BNT162b2, nonostante il paziente abbia ricevuto solo vaccinazioni Moderna, evidenzia la questione dell'omologia dei plasmidi tra piattaforme diverse e delle similitudini nella produzione. L'identità al 100% con la sequenza vettoriale depositata da Pfizer suggerisce la presenza di elementi comuni del backbone del plasmide o di motivi codificanti lo spike tra le piattaforme vaccinali. Data l'assenza di un riferimento plasmidico Moderna depositato, l'allineamento BLAST ha utilizzato come riferimento la sequenza Pfizer come corrispondenza disponibile più vicina, sottolineando ulteriormente la necessità di una divulgazione e una convalida indipendenti dei costrutti vaccinali proprietari.

In terzo luogo, diversi meccanismi plausibili potrebbero essere alla base dell'evento di integrazione osservato [26,46,47]. Questi includono (i) la persistenza e il trasferimento di frammenti residui di DNA plasmidico dal modello di trascrizione in vitro, (ii) il reverse

trascrizione dell'mRNA spike seguita dall'inserimento in rotture del DNA a doppio filamento, (iii) riparazione errata tramite giunzione di estremità non omologhe (NHEJ) o giunzione di estremità mediata da microomologia (MMEJ), (iv) ricombinazione omologa in presenza di tratti di sequenza simili, (v) attività del retrotrasposone LINE-1 che genera intermedi cDNA e (vi) errata ligazione mediata dalla topoisomerasi durante lo srotolamento del DNA. Ciascuna di queste vie è biologicamente fattibile e coerente con la concomitante rilevazione di carenze nella riparazione del DNA (ATM, MSH2) in questo paziente, che aumenterebbe la suscettibilità alla mutagenesi inserzionale. Tali vulnerabilità possono accelerare la trasformazione oncogenica e la progressione maligna. A sostegno di questa preoccupazione, Speicher et al. hanno quantificato miliardi di frammenti di DNA plasmidico residuo per dose di vaccino, con livelli sia nel vaccino bivalente che in quello XBB.1.5 Pfizer-BioNTech e Moderna COVID-19 che superano di 27 volte le soglie di sicurezza regolamentari 27 volte, fornendo così una fonte plausibile di DNA modello per l'integrazione cromosomica persistente [28].

Oltre all'evento di integrazione ospite-vettore, il profilo multi-omico del paziente ha rivelato una costellazione di driver oncogenici disregolati e segnali ausiliari che promuovono il tumore, che insieme creano un panorama permissivo per la malignità aggressiva [29,48,49]. Le alterazioni attivanti in KRAS e NRAS convergono sulla cascata di segnalazione MAPK, sostenendo la segnalazione proliferativa e aggirando i normali controlli di crescita [9,50,51]. La concomitante disregolazione di MAPK1 amplifica i programmi trascrizionali a valle guidati da ERK che promuovono la progressione del ciclo cellulare e la sopravvivenza [1-3,35,52,53]. Il rimodellatore della cromatina CHD4 e il fattore di splicing dell'RNA SF3B1 contribuiscono alla riprogrammazione epigenetica e all'elaborazione aberrante dei trascritti, favorendo la plasticità cellulare e l'adattabilità del tumore[4,54-59]. L'attivazione di PIK3CA stimola la segnalazione PI3K/AKT, migliorando l'idoneità metabolica, l'invasività e la resistenza all'apoptosi, mentre i segnali ausiliari provenienti da TOP1, PSIP1 ed ERBB2 rafforzano ulteriormente la tolleranza allo stress replicativo, l'attivazione trascrizionale e la reattività ai fattori di crescita[7,10,12,17,60,61]. È importante sottolineare che le carenze di ATM e MSH2 compromettono l'accuratezza della riparazione del DNA, predisponendo all'instabilità genomica, all'accumulo di mutazioni e ai riarrangiamenti cromosomici[17,22,25,62]. Nel complesso, questo modello di disregolazione multi-via fornisce una base meccanicistica per l'evoluzione insolitamente rapida della malattia del paziente, collegando le perturbazioni genomiche associate al vaccino con un ambiente molecolare predisposto alla trasformazione maligna.

Prove emergenti sostengono un legame tra la vaccinazione con mRNA e l'oncogenesi [63, 64]. Uno studio di coorte della durata di 30 mesi condotto su una popolazione di quasi 300.000 residenti a Pescara, in Italia, ha rilevato che la somministrazione di una dose del vaccino k1 COVID-19 era associata a un aumento del 23% del rischio complessivo di ricovero ospedaliero per cancro (HR 1,23, 95% CI 1,11-1,37), con i rischi eccessivi più forti e statisticamente significativi osservati per il cancro al seno (HR 1,54), il cancro alla vescica (HR 1,62) e il cancro colorettale (HR 1,35) [61]. A complemento di queste prove epidemiologiche, Marik et al. hanno formalmente definito la sindrome dei "tumori turbo" indotti dal vaccino a mRNA contro il COVID-19, compilando casi clinici, segnali epidemiologici e percorsi meccanicistici attraverso i quali la proteina spike può accelerare la trasformazione maligna tramite riprogrammazione metabolica, resistenza all'apoptosi, angiogenesi e disregolazione immunitaria [62]. Nel loro insieme, questi rapporti forniscono un supporto epidemiologico e meccanicistico convergente al nostro caso attuale, in cui l'integrazione genomica e la disregolazione molecolare sono state documentate direttamente.

Nel loro insieme, queste osservazioni supportano un quadro biologicamente plausibile in cui l'esposizione al vaccino a mRNA sintetico contribuisce all'instabilità genomica, alla segnalazione oncogenica e all'evoluzione aggressiva della malattia. Sebbene non sia possibile dedurre la causalità da un singolo caso, la convergenza di vicinanza temporale, integrazione della sequenza vettoriale e disregolazione multi-omica riproducibile fornisce un forte segnale che genera ipotesi. Ciò giustifica un'urgente sorveglianza genomica sistematica, una validazione ortogonale con sequenziamento a lettura lunga e un'indagine indipendente sui rischi oncogenici a lungo termine associati alle tecnologie dei vaccini a mRNA. Una panoramica schematica del decorso clinico, dell'integrazione ospite-vettore e della disregolazione multi-omica è mostrata nella Figura 1.

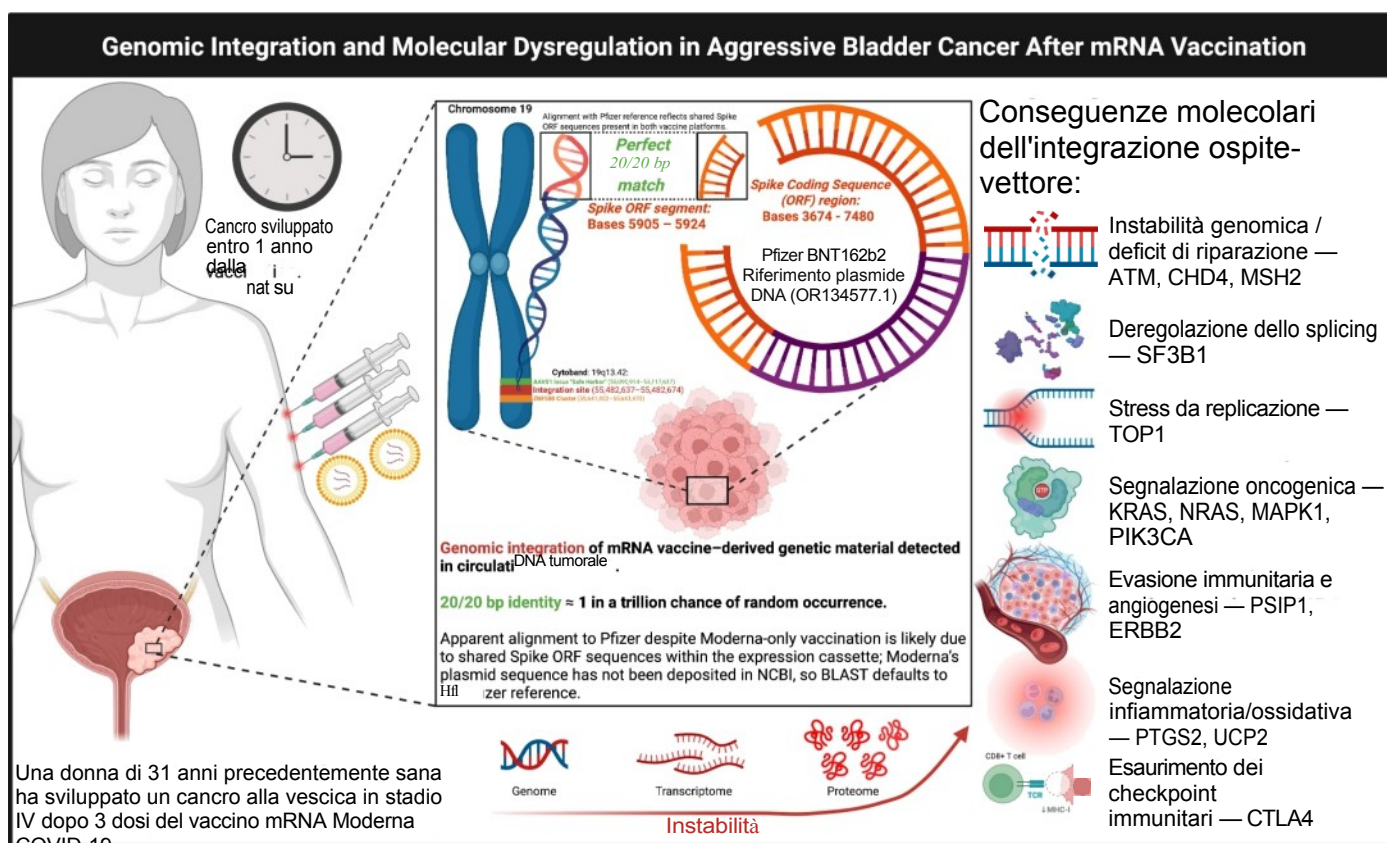


Figura 1. Integrazione genomica e disregolazione molecolare nel carcinoma della vescica aggressivo dopo vaccinazione con mRNA *Creato con Biorender.com

4. Conclusioni

Questo caso clinico descrive la rapida insorgenza di un tumore alla vescica aggressivo in stadio IV in una giovane donna dopo una serie di vaccinazioni con mRNA Moderna, caratterizzata da prove dirette dell'integrazione genomica di materiale genetico derivato dal vaccino. Il profilo multi-omico ha rivelato l'attivazione riproducibile di driver oncogenici, deficienze nella riparazione del DNA, instabilità trascrittomica e integrazione di una sequenza derivata dal vettore vaccinale al di fuori di un rifugio genomico sicuro [8,30,31,33,38,39,41,58,65]. Sebbene non sia possibile stabilire una causalità da un singolo caso, la convergenza di vicinanza temporale, prove di integrazione e disturbo molecolare multisistemico solleva serie preoccupazioni riguardo al potenziale oncogenico delle piattaforme di vaccini a mRNA sintetico. Questi risultati evidenziano l'urgente necessità di una sorveglianza genomica sistematica, di una validazione indipendente utilizzando metodi di sequenziamento ortogonali e di un'indagine rigorosa sui rischi genomici e oncologici a lungo termine della vaccinazione a mRNA.

5. Riferimenti

1. Bekele, R.; Samant, A.; Hanlon, T.; Mouw, K. Abstract 1709: Le alterazioni del percorso MAPK sono una vulnerabilità bersagliabile nel cancro alla vescica. *Cancer Research* **2023**, *83*, 1709-1709, doi:10.1158/1538-7445.am2023-1709.
2. Bekele, R.T.; Samant, A.S.; Nassar, A.H.; So, J.; Garcia, E.P.; Curran, C.R.; Hwang, J.H.; Mayhew, D.L.; Nag, A.; Thorner, A.R.; et al. L'amplificazione di RAF1 determina un sottogruppo di tumori della vescica e la sensibilità dei conteos alle terapie dirette contro la MAPK. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci147849.
3. Cheng, G.; Zhou, Z.; Li, S.; Yang, S.; Wang, Y.; Ye, Z.; Ren, C. Previsione della sopravvivenza al cancro alla vescica con elevata accuratezza: approfondimenti dai geni correlati al percorso MAPK. *Scientific Reports* **2024**, *14*, dor:10.1038/s41598-024-61302-0.
4. Columbres, R.C.; Chakraborty, A.; Apolo, A.; Banday, R. Abstract 5640: Sbloccare il potenziale terapeutico degli inibitori SF3B1 per il trattamento del cancro alla vescica. *Cancer Research* **2024**, *84*, 5640-5640, doi:10.1158/1538-7445.am2024-5640.
5. Dadhania, V.; Zhang, M.; Zhang, L.; Bondaruk, J.; Majewski, T.; Siefker-Radtke, A.; Guo, C.C.; Dinney, C.; Cogdell, D.E.; Zhang, S.; et al. Meta-analisi dei sottotipi luminale e basale del cancro alla vescica e identificazione di marcatori immunoistochimici distintivi per uso clinico. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 105-117, dor:10.1016/j.ebiom.2016.08.036.
6. Deng, Z.; Shen, D.; Yu, M.; Zhou, F.; Shan, D.; Fang, Y.; Jin, W.; Qian, K.; Li, S.; Wang, G.; et al. Il pectolinarigerún inibisce la proliferazione delle cellule del carcinoma uroteliale della vescica regolando i percorsi di danno al DNA/autofagia. *Cell Death Discovery* **2023**, *9*, doi:10.1038/s41420-023-01508-9.
7. Dueñas, M.; Martínez-Fernández, M.; García-Escudero, R.; Villacampa, F.; Marqués, M.; Saiz-Ladera, C.; Duarte, J.; Martínez, V.; Gómez, M.J.; Martín, M.L.; et al. Le alterazioni del gene *PIK3CA* nel cancro alla vescica sono frequenti e associate a una ridotta recidiva nei tumori non invasivi della muscolatura. *Molecular Carcinogenesis* **2013**, *54*, 566-576, doi:10.1002/mc.22125.
8. Hoffmann, M.J.; Schulz, W.A. Alterazioni dei regolatori della cromatina nella patogenesi del carcinoma uroteliale della vescica urinaria. *Cancers* **2021**, *13*, 6040, doi:10.3390/cancers13236040.
9. Hou, S.; Nieva, J.; Desai, N. Xenotrapianti di NSCLC mutato KRAS G12C e cancro alla vescica creati con sotorasib e adagrasib in combinazione con inibitori mTOR mostrano una migliore attività antitumorale di nab-sirolimus rispetto a everolimus. *European Journal of Cancer* **2022**, *174*, S58-559, doi:10.1016/S0959-8049(22)00957-1.
10. Kompier, L.C.; Lurkin, I.; van der Aa, M.N.M.; van Rhijn, B.W.G.; van der Kwast, T.H.; Zwarthoff, E.C. Mutazioni FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS e PIK3CA nel carcinoma della vescica e loro potenziale come biomarcatori per la sorveglianza e la terapia. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13821, doi:10.1371/journal.pone.0013821.
11. Lee, K.-H.; Ku, J.H. Targeting dei fattori di splicing come predittori molecolari del carcinoma della vescica non muscolo-invasivo. *Andrologia e urologia traslazionale* **2018**, *7*, 5715-5717, doi:10.21037/tau.2018.10.09.
12. López-Knowles, E.; Hernández, S.; Malats, N.r.; Kogevinas, M.; Lloreta, J.; Carrato, A.; Tardón, A.; Serra, C.; Real, F.X. Le mutazioni *PIK3CA* sono un'alterazione genetica precoce associata alle mutazioni *FGFR3* nei tumori papillari superficiali della vescica. *Cancer Research* **2006**, *66*, 7401-7404, doi:10.1158/0008-5472.can-06-1182.
13. Monnin, K.A.; Bronstein, I.B.; Gaffney, D.K.; Holden, J.A. Aumento della topoisomerasi I del DNA nel carcinoma a cellule transizionali della vescica urinaria: correlazione con l'espressione della topoisomerasi II-alfa del DNA e della p53. *Human Pathology* **1999**, *30*, 384-391, doi:10.1016/s0046-8177(99)90112-0.
14. Montero-Hidalgo, A.J.; Pérez-Gómez, J.M.; Martínez-Fuentes, A.J.; Gómez-Gómez, E.; Gahete, M.D.; Jiménez-Vacas, J.M.; Luque, R.M. Splicing alternativo nel cancro alla vescica: potenziali strategie per la diagnosi, la prognosi e il trattamento del cancro. *WIREs RNA* **2022**, *14*, doi:10.1002/wrna.1760.
15. Ouerhani, S.; Bougateg, K.; Soltani, I.; Elgaaid, A.B.A.; Abbes, S.; Menif, S. Prevalenza e significato prognostico della mutazione KRAS nel carcinoma della vescica, nella leucemia mieloide cronica e nel carcinoma coloretale. *Molecular Biology Reports* **2013**, *40*, 4109-4114, doi:10.1007/s11033-013-2512-8.
16. Ouerhani, S.; Elgaaid, A.B.A. Lo spettro mutazionale dei geni HRAS, KRAS, NRAS e FGFR3 nel carcinoma della vescica. *Cancer Biomarkers* **2012**, *10*, 259-266, doi:10.3233/cbm-2012-0254.

-
17. Pan, Y.-H.; Zhang, J.-X.; Chen, X.; Liu, F.; Cao, J.-Z.; Chen, Y.; Chen, W.; Luo, J.-H. Valore predittivo del classificatore di mutazioni TP53/PIK3CA/ATM per i pazienti con carcinoma della vescica che rispondono alla terapia con inibitori del checkpoint immunitario. *T-routiers in Immunology* 2021, 12, doi:10.3389/fimmu.2021.643282.
 18. Shuman, L.; Pham, J.; Wildermuth, T.; Wu, X.-R.; Walter, V.; Warrick, J.I.; DeGraff, D.J. L'espressione specifica dell'urotelio della Pik3ca attivata dalla mutazione avvia le lesioni precoci del cancro alla vescica non invasivo. *The American Journal of Pathology* 2023, 193, 2133-2143, doi:10.1016/j.ajpath.2023.07.001.
 19. Stenehjem, D.; Tran, D.; Nkrumah, M.; Gupta, S. Inibitori PD1/PDL1 per il trattamento del carcinoma uroteliale avanzato della vescica. *OncoTargets and Therapy* 2018, Volume 11, 5973-5989, doi:10.2147/ott.s135157.
 20. Wang, Z.; Shang, J.; Li, Z.; Li, H.; Zhang, C.; He, K.; Li, S.; Ju, W. PIK3CA è regolato da CUX1, promuove la crescita cellulare e le metastasi nel cancro alla vescica attraverso l'attivazione della transizione epiteliale-mesenchimale. *Froniers in Oncology* 2020, 10, doi:10.3389/fonc.2020.536072.
 21. Wu, T.-Z.; Lei, C.-Y.; Li, J.-M.; Guo, Y.-F. Caratterizzazione della discrepanza di sesso rivelata dalle alterazioni del DNA somatico nel carcinoma della vescica muscolo-invasivo. *Chinese Medical Journal* 2019, 132, 2492-2494, doi:10.1097/cm9.0000000000000487.
 22. Yi, R.; Lin, A.; Cao, M.; Xu, A.; Luo, P.; Zhang, J. Le mutazioni ATM apportano benefici ai pazienti affetti da cancro alla vescica trattati con inibitori del checkpoint immunitario agendo sul microambiente immunitario del tumore. *Frontiers in Genetics* 2020, 11, doi:10.3389/fgene.2020.00933.
 23. Zargar, P.; Koochakkhani, S.; Hassanzadeh, M.; Ashouri Taziani, Y.; Nasrollahi, H.; Eftekhari, E. La sottoregolazione delle topoisomerasi 1 e 2 con acriflavina sensibilizza le cellule tumorali della vescica alla chemioterapia a base di cisplatino. *Molecular Biology Reports* 2022, 49, 2755-2763, doi:10.1007/s11033-021-07087-1.
 24. Zheng, Y.; Izumi, K.; Yao, J.L.; Miyamoto, H. Il diidrotestosterone upregola l'espressione del recettore del fattore di crescita epidermico e dell'ERBB2 nelle cellule tumorali della vescica positive al recettore degli androgeni. *Endocrine-Related Cancer* 2011, 18, 451-464, doi:10.1530/ers-11-0010.
 25. Zhou, Y.; Börcsök, J.; Adib, E.; Kamran, S.C.; Neil, A.J.; Stawiski, K.; Freeman, D.; Stormoen, D.R.; Sztupinski, Z.; Samant, A.; et al. La carenza di ATM conferisce specifiche vulnerabilità terapeutiche nel cancro alla vescica. *Science Advanced* 2023, 9, doi:10.1126/sciadv.adg2263.
 26. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Trascrizione inversa intracellulare del vaccino a mRNA BNT162b2 contro il COVID-19 di Pfizer BioNTech in vitro in una linea cellulare epatica umana. *Current Issues in Molecular Biology* 2022, 44, 1115-1126, doi:10.3390/cimb44030073.
 27. Solomon, A.L.; Ratchford, E.V.; Armitage, K.B.; Kovacic, J.C. Pagina informativa per i pazienti affetti da malattie vascolari: Considerazioni vascolari relative ai vaccini contro il COVID-19. *Medicina vascolare* 2021, 27, 102-106, doi:10.1177/1358863X211066128.
 28. Speicher, D.J.; Rose, J.; McKernan, K. Quantificazione del DNA plasmidico residuo e delle sequenze promotrici-potenziatrici SV40 nei vaccini modRNA COVID-19 Pfizer/BioNTech e Moderna dell'Ontario, Canada. *Autoimmunolnj* 2025, 58, 2551517, doi:10.1080/08916934.2025.2551517.
 29. von Ranke, N.; Zhang, W.; Anokin, P.; Hulscher, N.; McKernan, K.J.; McCullough, P.A.; Catanzaro, J.A. Vaccini a mRNA sintetico e disregolazione trascrittomica: prove da eventi avversi di nuova insorgenza e tumori post-vaccinazione. *ResearchGate*, 2025. https://www.researchgate.net/publication/394007467_Synthetic_mRNA_Vaccines_and_Transcriptomic_Dysregulation_Evidence_from_New-Onset_Adverse_Events_and_Cancers_Post-Vaccination
 30. Li, Y.E.; Wang, S.; Reiter, R.J.; Ren, J. Emergenze cardiovascolari cliniche e basi cellulari della vaccinazione contro il COVID-19: dal sogno alla realtà? *International Journal of Infectious Diseases* 2022, 124, 1-10, doi:10.1016/j.ijid.2022.08.026.
 31. Mohseni Afshar, Z.; Tavakoli Pirzaman, A.; Liang, J.J.; Sharma, A.; Pirzadeh, M.; Babazadeh, A.; Hashemi, E.; Deravi, N.; Abdi, S.; Allahgholipour, A.; et al. Ci sfuggono gli eventi avversi rari indotti dalla vaccinazione contro il COVID-19? *Frontiers in Medicine* 2022, Volume 9 - 2022.

-
32. Bartolomucci, A.; Nobrega, M.; Ferrier, T.; Dickinson, K.; Kaorey, N.; Nadeau, A.; Castillo, A.; Bumier, J.V. DNA tumorale circolante per monitorare la risposta al trattamento nei tumori solidi e promuovere l'oncologia di precisione. *npj Precision Oncology* 2025, 9, doi:10.1038/s41698-025-00876-y.
33. Hanahan, D.; Weinberg, Robert A. Caratteristiche distintive del cancro: la prossima generazione. *Cell* 2011, 144, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
34. Kim, H.; Park, K.U. Test clinici sul DNA tumorale circolante per l'oncologia di precisione. *Ricerca e trattamento del cancro* 2023, 55, 351-366, doi:10.4143/crt.2022.1026.
35. Raghavan, S.; Kundumani-Sridharan, V.; Kumar, S.; White, C.W.; Das, K.C. La tioredossina previene la perdita di UCP2 nell'iperossia tramite la segnalazione MKK4—p38 MAPK—PGC1a e limita la tossicità dell'ossigeno. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2022, 66, 323-336, doi:10.1165/rcmb.2021-0219oc.
36. Torgovnick, A.; Schumacher, B. Meccanismi di riparazione del DNA nello sviluppo e nella terapia del cancro. *Frontiers in Genetics* 2015, 6, dot:10.3389/fgene.2015.00157.
37. Cassandri, M.; Smimov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschella, G. Proteine zinc-finger nella salute e nella malattia. *Cell Death Discovery* 2017, 3, dot:10.1038/cddiscovery.2017.71.
38. Kamaliyan, Z.; Clarke, T.L. Proteine zinc finger: guardiane della stabilità del genoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2024, 12, dot:10.3389/fcell.2024.1448789.
39. Li, X.; Han, M.; Zhang, H.; Liu, F.; Pan, Y.; Zhu, J.; Liao, Z.; Chen, X.; Zhang, B. Strutture e funzioni biologiche delle proteine zinc finger e loro ruolo nel carcinoma epatocellulare. *Biomarker Research* 2022, 10, dot:10.1186/s40364-021-00345-1.
40. Dutheil, N.; Yoon-Robarts, M.; Ward, P.; Henckaerts, E.; Skrabanek, L.; Berns, K.I.; Campagne, F.; Linden, R.M. Caratterizzazione dell'ortologo del virus adeno-associato murino <i>AAVS1</i>. *Journal of Virology* 2004, 78, 8917-8921, doi:10.1128/jvi.78.16.8917-8921.2004.
41. Hamilton, H.; Gomos, J.; Berns, K.I.; Falck-Pedersen, E. Integrazione sito-specifica del virus adeno-associato e interruzione dell'AAVS1. *JourndJ of Virology* 2004, 78, 7874-7882, doi:10.1128/jvi.78.15.7874-7882.2004.
42. Cheng, Y.; Liang, P.; Geng, H.; Wang, Z.; Li, L.; Cheng, S.H.; Ying, J.; Su, X.; Ng, K.M.; Ng, M.H.L.; et al. Una nuova proteina nucleolare zinc finger 19q13 sopprime la crescita delle cellule tumorali inibendo la biogenesi dei ribosomi e inducendo l'apoptosi, ma è spesso silenziata in diversi carcinomi. *Molecular Cancer Research* 2012, 10, 925-936, doi:10.1158/1541-7786.mcr-11-0594.
43. Jen, J.; Wang, Y.-C. Proteine zinc finger nella progressione del cancro. *Journal of Biomedical Science* 2016, 23, doi:10.1186/s12929-016-0269-9.
44. Petre, G.; Lores, P.; Sartelet, H.; Truffot, A.; Poreau, B.; Brandeis, S.; Martinez, G.; Satre, V.; Harbuz, R.; Ray, P.F.; et al. Duplicazione genomica nella regione impressa 19q13.42 identificata come nuova causa genetica della restrizione della crescita intrauterina. *Clinical Genetics* 2018, 94, 575-580, doi:10.1111/cge.1S449.
45. Oceguera-Yanez, F.; Kim, S.-I.; Matsumoto, T.; Tan, G.W.; Xiang, L.; Hatani, T.; Kondo, T.; Ikeya, M.; Yoshida, Y.; Inoue, H.; et al. Ingegnerizzazione del locus AAVS1 per un'espressione transgenica coerente e scalabile nelle iPSC umane e nei loro derivati differenziati. *Methods* 2016, 101, 43-55, doi:10.1016/j.ymeth.2015.12.012.
46. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Giunzione non omologa delle estremità del DNA e vie alternative alla riparazione delle rotture a doppio filamento. *Net her Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495-506. dot:10.1038/nrm.2017.48
47. Huang R, Zhou PK. Riparazione del danno al DNA: prospettive storiche, vie meccanicistiche e traduzione clinica per la terapia mirata contro il cancro. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):254. Pubblicato il 9 luglio 2021. doi:10.1038/s41392-021 -00648-7
48. Schaafsma, E.; Fugle, C.M.; Wang, X.; Cheng, C.A.-O. Associazione pan-cancerosa dell'espressione genica HLA con la prognosi del cancro e l'efficacia dell'immunoterapia.
49. Szolek, A.; Schubert, B.; Mohr, C.; Sturm, M.; Feldhahn, M.; Kohlbacher, O. OptiType: tipizzazione HLA di precisione dai dati di sequenziamento di nuova generazione.

-
50. Bahar, M.E.; Kim, H.J.; Kim, D.R. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023**, *8*, doi:10.1038/s41392-023-01705-z.
51. Kodaz, H. Frequenza delle mutazioni RAS (KRAS, NRAS, HRAS) nel cancro solido umano. *Euroasian Joornsl of Medicine and Oncology* 2017, doi:10.14744/ejmo.2017.22931.
52. Braicu, C.; Buse, M.; Busuioc, C.; Drula, R.; Gulei, D.; Raduly, L.; Rusu, A.; Irimie, A.; Atanasov, A.G.; Slaby, O.; et al. Una revisione completa su MAPK: un promettente bersaglio terapeutico nel cancro. *Cancers* 2019, *11*, 1618, doi:10.3390/cancers11101618.
53. Clark-Garvey, S.; Kim, W.Y. Amplificazione RAFI: un esempio di attivazione della via MAPK nel carcinoma uroteliale. *Journal of Clinical Investigation* **2021**, *131*, doi:10.1172/jci154095.
54. Novillo, A.; Fernández-Santander, A.; Gaibar, M.; Galán, M.; Romero-Lorca, A.; El Abdellaoui-Soussi, F.; Gómez-del Arco, P. Ruolo della proteina 4 legante il DNA con dominio cromodominio-elicasa (CHD4) nel cancro al seno. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*, doi:10.3389/fonc.2021.633233.
55. Wang, J.; Zhong, F.; Li, J.; Yue, H.; Li, W.; Lu, X. Il fattore epigenetico CHD4 contribuisce alla metastasi regolando l'asse EZH2/β-catenina e agisce come bersaglio terapeutico nel cancro ovarico. *Journal of Translational Medicine* **2023**, *21*, doi:10.1186/s12967-022-03854-1.
56. Liu, Z.; Yoshimi, A.; Wang, J.; Cho, H.; Chun-Wei Lee, S.; Ki, M.; Bitner, L.; Chu, T.; Shah, H.; Liu, B.; et al. Le mutazioni nel fattore di splicing dell'RNA SF3B1 promuovono la tumorigenesi attraverso la stabilizzazione di MYC. *Cancer Discovery* **2020**, *10*, 806-821, doi:10.1158/2159-8290.cd-19-1330.
57. Samy, A.; Ozdemir, M.K.; Alhajj, R. Studio della connessione tra SF3B1 e quattro tipi di cancro attraverso l'analisi di reti costruite sulla base di ricerche pubblicate. *Scientific Reports* 2023, *13*, doi:10.1038/s41598-023-29777-5.
58. Goswami, K.; Venkatachalam, K.; Singh, S.P.; Rao, C.V.; Madka, V. Remodulatore della cromatina CHD4: un potenziale bersaglio per l'intercettazione del cancro. *Genes* **2025**, *16*, 225, doi:10.3390/genes16020225.
59. Xia, L.; Huang, W.; Bellani, M.; Seidman, M.M.; Wu, K.; Fan, D.; Nie, Y.; Cai, Y.; Zhang, Y.W.; Yu, L.-R.; et al. CHD4 ha funzioni oncogeniche nell'avvio e nel mantenimento della soppressione epigenetica di più geni oncosoppressori. *Cancer Cell* 2017, *31*, 653-668.e657, doi:10.1016/j.ccell.2017.04.005.
60. Madsen, R.R.; Vanhaesebroeck, B.; Semple, R.K. Mutazioni PIK3CA associate al cancro nei disturbi da crescita eccessiva. *Trends in Molecular Medicine* 2018, *24*, 856-870, doi:10.1016/j.molmed.2018.08.003.
61. Ross, R.L.; McPherson, H.R.; Kettlewell, L.; Shnyder, S.D.; Hurst, C.D.; Alder, O.; Knowles, M.A. Dipendenza da PIK3CA e sensibilità al targeting terapeutico nel carcinoma uroteliale. *BMC Cancer* **2016**, *16*, doi:10.1186/s12885-016-2570-0.
62. Lee, J.-H. Targeting della via ATM nel cancro: opportunità, sfide e strategie terapeutiche personalizzate. *Cancer Treatment Reviews* 2024, *129*, 102808, doi:10.1016/j.ctrv.2024.102808.
63. Acuti Martellucci, C.; Capodici, A.; Soldato, G.; et al. Vaccinazione contro il COVID-19, mortalità per tutte le cause e ospedalizzazione per cancro: studio di coorte di 30 mesi in una provincia italiana. *EXCLI Journal* 2025, *24*, 690—707. doi:10.17179/excli2025-8400.
64. Marik, P.; Hope, J. COVID-19 mRNA-Induced “Turbo Cancers.” *Journal of Independent Medicine* 2025, *1*, 185—194. doi:10.71189/JIM/2025/V01N03A02.
65. Mills, A.A. I rimodellatori della cromatina che legano il DNA con cromodominio elicasa: tratti familiari che proteggono dal cancro e lo promuovono. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2017**, *7*, a026450, doi:10.1101/cshperspect.a026450.

6. Finanziamenti: Neo7Bioscience ha finanziato il caso di studio e ha partecipato alla sua progettazione, alla raccolta dei dati, all'analisi e alla preparazione del manoscritto.

7. Conflitti di interesse

Questo studio è stato finanziato da Neo7Bioscience, che ha partecipato alla progettazione dello studio, alla raccolta dei dati, all'analisi e alla preparazione del manoscritto. John Catanzaro, che ha ideato il caso di studio e ha ricoperto il ruolo di ricercatore principale, è amministratore delegato e azionista di Neo7Bioscience e riceve anche un sostegno salariale dall'azienda. Neo7Bioscience è un'azienda biotecnologica privata specializzata nello sviluppo di peptidi terapeutici personalizzati. Nicolas Hulscher, che ha fornito il contributo scientifico, riceve un sostegno salariale dalla McCullough Foundation. Peter McCullough, che ha fornito la supervisione della ricerca, è il fondatore della McCullough Foundation, ma non riceve alcun compenso dall'organizzazione. La McCullough Foundation è un'entità senza scopo di lucro dedicata alla promozione della ricerca indipendente sulla salute pubblica, dell'etica medica e delle politiche basate su prove scientifiche.

8. Consenso informato: è stato ottenuto il consenso informato dal soggetto coinvolto nello studio e tutti i dati sono stati resi anonimi prima dell'analisi.

9. Dichiarazione sulla disponibilità dei dati: i set di dati di sequenziamento generati e analizzati in questo studio sono stati inviati al NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) e saranno resi disponibili al pubblico con un numero di accesso che verrà assegnato. Nel frattempo, i dati sono disponibili presso l'autore corrispondente su richiesta ragionevole.

The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines

Maurizio Federico 

National Center for Global Health, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; maurizio.federico@iss.it

Abstract: The action of mRNA-based vaccines requires the expression of the antigen in cells targeted by lipid nanoparticle–mRNA complexes. When the vaccine antigen is not fully retained by the producer cells, its local and systemic diffusion can have consequences depending on both the levels of antigen expression and its biological activity. A peculiarity of mRNA-based COVID-19 vaccines is the extraordinarily high amounts of the Spike antigen expressed by the target cells. In addition, vaccine Spike can be shed and bind to ACE-2 cell receptors, thereby inducing responses of pathogenetic significance including the release of soluble factors which, in turn, can dysregulate key immunologic processes. Moreover, the circulatory immune responses triggered by the vaccine Spike is quite powerful, and can lead to effective anti-Spike antibody cross-binding, as well as to the emergence of both auto- and anti-idiotypic antibodies. In this paper, the immunologic downsides of the strong efficiency of the translation of the mRNA associated with COVID-19 vaccines are discussed together with the arguments supporting the idea that most of them can be avoided with the advent of next-generation, mucosal COVID-19 vaccines.

Keywords: COVID-19 mRNA vaccines; SARS-CoV-2 Spike; mucosal vaccines; ACE-2; autoimmunity



Citation: Federico, M. The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines. *Vaccines* **2024**, *12*, 1281. <https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>

Academic Editor: Pedro Plans-Rubió

Received: 11 October 2024

Revised: 11 November 2024

Accepted: 13 November 2024

Published: 14 November 2024



Copyright: © 2024 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

COVID-19 mRNA-based vaccines have been distributed to many people in both their original and current updated versions. Furthermore, mRNA technology is the basis of additional experimental vaccines as well as the latest generation of anticancer immunotherapies. Hence, it is mandatory to identify, monitor, and deeply analyze the most relevant unexpected events that this technology can produce in humans, even if these occur rarely.

Several features distinguish the mRNA-based COVID-19 vaccines from the “traditional” ones based on attenuated/inactivated viruses, subunit products, or recombinant products, which have been so useful for the elimination/containment of several infectious diseases. First, the vaccine formulation comprises lipidic nanoparticles (LNPs) complexed with mRNA molecules produced through the *in vitro* transcription process. Second, the immunogen is not part of the vaccine formulation, but it is expected to be synthesized by cells internalizing the mRNA/LNP complexes. This evidence justifies the more appropriate definition of prodrug (intended as a pharmacologically inactive substance that is converted in the body into a pharmacologically active drug) rather than vaccine [1]. Third, the immunogen (i.e., the viral protein Spike) is synthesized by target cells at very high levels and persists over time [2]. Fourth, the immunogen recognizes, binds, and activates a widespread signaling cell receptor, i.e., the angiotensin-converting enzyme (ACE)-2, and is stabilized in its prefusion conformation through two consecutive mutations to proline at amino acid positions 986 and 987, which do not negatively impact ACE-2 binding/activation. Hence, the abundance, diffusion, persistency, biologic activity, and stability of the immunogen are key points distinguishing mRNA-based COVID-19 vaccines.

In this paper, the most relevant consequences of both the overproduction of the Spike antigen after mRNA-based COVID-19 vaccination and the rather potent circulatory

immune response evoked are discussed. A comprehensive picture of all possible concerns would be of major utility for the development of safer and more targeted vaccines against SARS-CoV-2 and other airborne infectious agents. Among these, mucosal vaccines deserve some consideration given their action at the virus port of entry and the lack of unwanted systemic effects.

2. High and Persistent Levels of Circulating Spike After Vaccination

mRNA/lipidic nanoparticle (LNP) complexes can enter any cell type. Injection into the deltoid muscle favors their entry into muscle cells; however, the moderate inflammation induced by some lipidic components [3] can attract professional antigen-presenting cells (APCs) to the injection site. APCs can ingest the LNPs, undergo activation, and migrate to the lymph nodes [4]. Moreover, unquantifiable amounts of injected mRNA/LNP complexes escape cell internalization at the site of injection, thus entering into circulation. Consistently, biodistribution studies carried out by a manufacturer of COVID-19 mRNA vaccines highlighted the potential diffusion of intramuscularly injected LNPs in almost all tissues [5].

Both mRNA and vaccine Spike persist in the body for a long time after vaccination. A study carried out on autopsic samples from patients after COVID-19 vaccination demonstrated the persistence of the vaccine mRNA in bilateral axillary lymph nodes up to 30 days after vaccination [6]. Notably, vaccine mRNA was also found in both the heart ventricles up to 20 days after injection, and its presence correlated with myocardial injuries associated with an abnormally high number of myocardial macrophages. In another study, vaccine mRNA was found up to 60 days after the second dose in biopsies from ipsilateral axillary lymph nodes [2].

Part of the intracellularly expressed Spike remains exposed on the plasma membrane of target cells in its trimeric form, while a consistent fraction of it can shed and circulate. Accordingly, a median of 47 pg/mL of free Spike has been measured in the plasma of vaccinees 1–2 days after injection, with peaks of 174 pg/mL [2]. These levels of Spike in plasma appear surprisingly high, ranging, for instance, in the concentrations of inflammatory cytokines detected in subjects with acute systemic inflammation [7]. This evidence is of particular relevance given the high affinity of Spike for ACE-2, i.e., a widespread cell receptor involved in several key physiologic processes.

3. ACE-2: Summary of Functions, Distribution, and Signaling upon Spike Binding

ACE-2 is an 805-amino-acid-long, type I transmembrane protein with an extracellular glycosylated N-terminal region containing the carboxypeptidase domain whose function is removing single amino acids from the C-terminus of its substrates. ACE-2 is a key regulator of the renin–angiotensin–aldosterone system, which controls blood pressure. It catalyzes the conversion of angiotensin I, a decapeptide, to angiotensin 1–9, which can be converted to smaller, vasodilator angiotensin peptides (e.g., angiotensin 1–7) by ACE in the lungs. ACE-2 binds angiotensin II also, i.e., an octapeptide generated by ACE-driven cleavage of angiotensin I, to produce the vasodilator angiotensin 1–7. ACE-2 is also involved in the production of bradykinins, i.e., a group of peptides with potent vasodilator effects [8].

ACE-2 is expressed by a wide variety of cells including enterocytes, cardiomyocytes, renal tubules, vasculature, and ductal cells. Conversely, ACE-2 expression in respiratory tissues is limited to a small number of specialized cell types, i.e., type II alveolar cells and alveolar macrophages [9].

The interaction between ACE-2 and angiotensin II induces various signaling pathways ultimately leading to the release of several cytokines including IL-6, TNF- α , and TGF- β [10]. Notably, the effects of the interaction of ACE-2 with Spike recapitulate those described for it binding with its natural ligands [11]. In particular, in vascular endothelial cells, natural Spike generates a block of mitochondrial functions [12]; meanwhile, switching integrin $\alpha 5 \beta 1$ -dependent signaling leads to nuclear translocation of NF- κ B. These events ultimately induce the expression of VCAM-1, ICAM-1, coagulation factors, and the release

of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and IL-6 inflammatory cytokines [13]. Similar activation mechanisms have been reported for both macrophages and dendritic cells [14,15]. Importantly, natural Spike induces in both epithelial and endothelial cells the release of pleiotropic $\text{TGF-}\beta$ cytokine [16].

4. The SARS-CoV-2 Spike/ACE-2/ $\text{TGF-}\beta$ Axis in the Anti-Tumor Immune Surveillance and the Epithelial to Mesenchymal Transition

The binding of Spike with ACE-2 produces profound alterations in intracellular signaling with the activation of transcription factors and the release of several soluble factors. In particular, human vascular endothelial cells treated with Spike have been found to release both $\text{TGF-}\beta 1$ and $\text{TGF-}\beta 2$ [17], consistent with previous “in vivo” evidence suggesting a key role of $\text{TGF-}\beta$ in COVID-19 pathogenesis [18,19].

$\text{TGF-}\beta$, with its three isoforms, i.e., $-\beta 1$ to $-\beta 3$, is a key regulator of the adaptive immune response [20], acting, for instance, as an inhibitor of the antigen-presenting activity in dendritic cells (DCs) through the downregulation of major histocompatibility complex (MHC) molecules [21,22] (Figure 1). It also reduces the expression of IL-12 and co-stimulatory molecules such as CD40 in macrophages and CD80 , CD83 , and CD86 in DCs, as part of the regulatory mechanisms of APC-mediated immune cell activation [23,24].

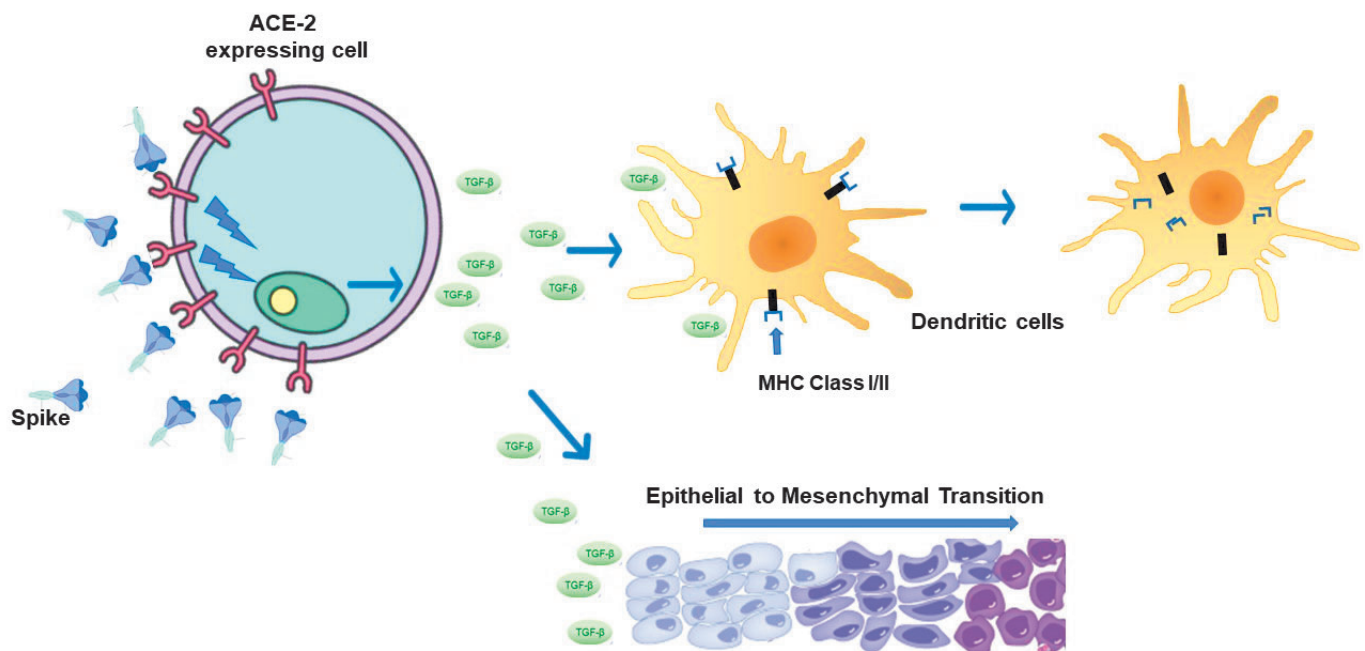


Figure 1. Bystander effects of Spike/ACE-2 binding. Free SARS-CoV-2 Spike protein binds ACE-2-expressing cells, thereby inducing intracellular signaling, leading to the release of soluble factors. Among these, $\text{TGF-}\beta$ is known to downregulate the antigen-presenting activity in APCs through MHC Class I/II downregulation. $\text{TGF-}\beta$ is also a major driver of the epithelial-to-mesenchymal transition that is the basis of the development of both solid tumors and metastasis.

$\text{TGF-}\beta$ can also interfere with the immune surveillance mechanisms controlling tumor cell growth. For instance, $\text{TGF-}\beta$ can induce the polarization of macrophages from M1 (marked by the release of inflammatory cytokines such as $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 , and IL-18) to M2 macrophages, secreting anti-inflammatory cytokines like IL-1ra and IL-10 , and characterized by multiple immunosuppressive properties of the tumor microenvironment [25]. On the other hand, $\text{TGF-}\beta$ is a major driver of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [26], which is the basis of the development of both solid tumors and metastasis. In this scenario, consistent results from the experimental work of two research groups raised the hypothesis that natural Spike can contribute to the EMT (Figure 1). In detail,

Lai and colleagues provided evidence that TGF- β -related signaling is part of the mechanism underlying the acquisition of a mesenchymal-like phenotype of Spike-expressing human breast cancer cells. Most importantly, they demonstrated that the number of lung metastases in mice inoculated with Spike-expressing 4T1 breast cancer cells increased compared to that induced by parental cells [27,28]. Ciszewski and colleagues observed that the treatment with recombinant, wild-type Spike of both HUVECs and HMEC-1 human endothelial cells induces the release of TGF- β associated with cell trans-differentiation. By investigating the underlying mechanism of action, they proved the involvement of the ACE-2/TGF- β /MRTF (myocardin-related transcription factor)- β axis in the observed EMT. Finally, the contribution of TGF- β in the Spike-related EMT was further corroborated by the demonstration that Spike-treated human endothelial cells failed to trans-differentiate in the presence of anti-TGF- β antibodies [17].

The results from these studies pose the question as to whether Spike can contribute to the EMT in humans. Even if no clinical data describing events associated with these pathological immune responses are available so far, the potential implications in terms of the safety of COVID-19 vaccines seem to manifest also considering the evidence that mRNA/LNPs can enter any kind of cell. For instance, the unfortunate entry of mRNA/LNP complexes into already emerged tumor cells may reproduce the conditions described by Lai and colleagues, thus representing a hazard in terms of the formation of metastases. On the other hand, pathogenetic bystander effects can be induced through the local production of high concentrations of Spike by normal cells targeted by the mRNA/LNPs and located in the vicinity of tumor cells, as described by Ciszewski and coll. For these reasons, expanding the studies to additional cell systems as well as to appropriate “in vivo” models appears mandatory considering the possibility that mRNA/LNP complexes circulate in the body after vaccination.

5. mRNA COVID-19 Vaccine-Induced Unspecific Immunity: Antibody Cross-Binding, Autoantibodies, Anti-Idiotypic Antibodies, and Ribosomal Frameshifting

The high levels of vaccine Spike produced after injection are associated with an extraordinarily potent circulatory immune response, with the production of high titers of anti-Spike antibodies. On the one hand, this outcome is considered an advantage in terms of antiviral protection; on the other hand, however, such powerful immunogenicity can be associated with relevant unwanted effects typically emerging in the presence of both high and persistent antigenic stimuli. These include the substantial binding of anti-Spike antibodies cross-reacting with “self” antigens with the induction of non-physiologic/pathogenetic processes, the emergence of autoantibodies, and the generation of anti-idiotypic antibodies. These events have been correlated with the emergence in vaccinees of pathologies like thrombocytopenia, myocarditis, various disturbances to the menstrual cycle, the re-emergence of latent infections, and post-COVID vaccine syndrome (PCVS).

Cross-reacting antibodies bind heterologous targets through the mechanism of molecular mimicry. Most likely, pathogenetic effects can be produced when sufficient amounts of them bind unspecific molecular targets acting in relevant biological processes. Through a computationally investigated analysis of the molecular mimicry between Spike and known human epitopes, it was reported that Spike shares immunogenic linear motifs with, among others, thrombopoietin (TQPLL) and tropomyosin alpha-3 (ELDKY) [29]. These findings appear relevant since the former is a key growth factor required for megakaryocytic differentiation and platelet production, and the latter is a structural component of cardiomyocytes. In another study, it was reported that Spike shares 41 minimal immune determinants with 27 human proteins specific to the female reproductive system relating to oogenesis, uterine receptivity, decidualization, and placentation [30].

Clinical studies provided evidence that the injection of COVID-19 mRNA vaccines can be associated with the production of autoantibodies, i.e., non-anti-Spike antibodies recognizing self-antigens, as a possible consequence of general immune dysregulation. For instance, Xu and colleagues [31] found neutralizing anti-type I interferon antibodies in 10%

of healthy vaccinated individuals, although with a limited sample size. In another study, 18% of patients developing PCVS have been found to produce autoantibodies against neurofilament subunits [32]. Even if, in some instances, autoantibodies may represent innocent bystanders, it is still unclear whether vaccination re-activates latent, pre-existing autoimmunity or induces the “de novo” generation of autoantibodies.

Molecular mimicry is also the basis of the effects of anti-idiotype antibodies (Figure 2).

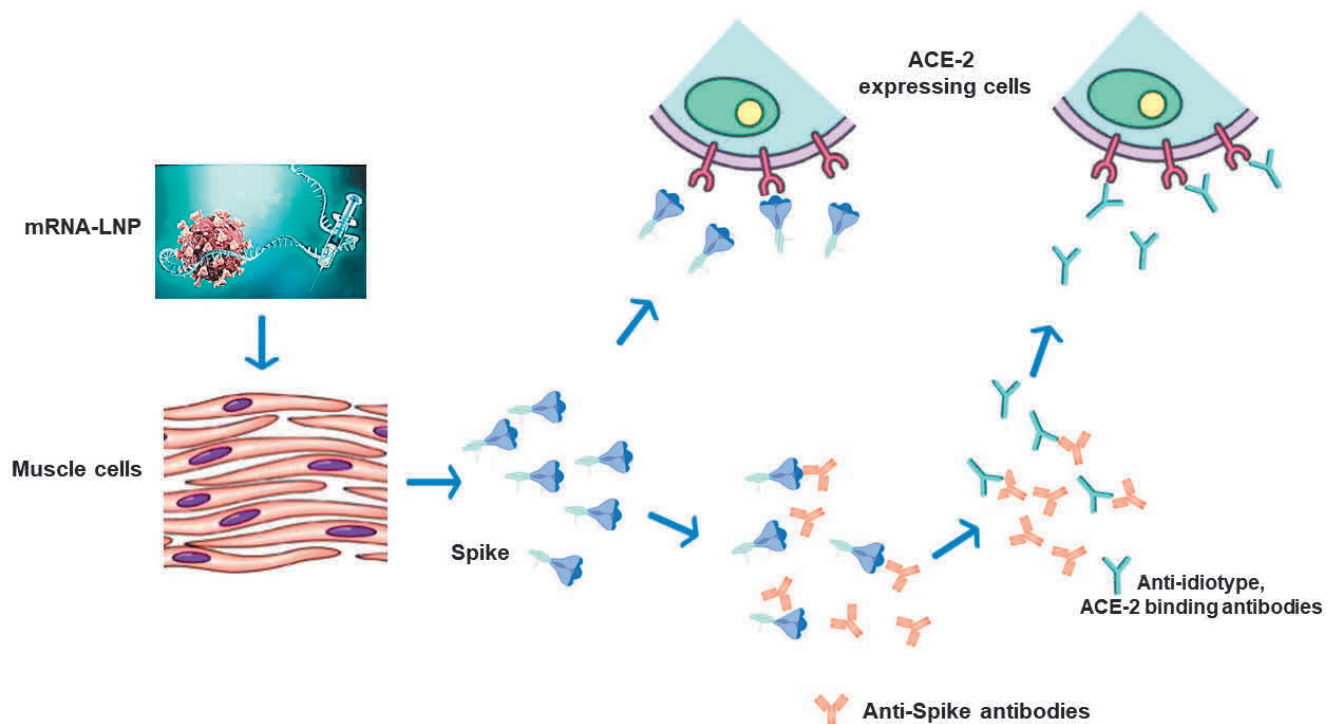


Figure 2. Generation of anti-idiotype antibodies after COVID-19 vaccination. The immune system can generate antibodies against the sequences of anti-Spike antibodies recognizing the Spike domain binding the ACE-2 receptor (receptor-binding domain, RBD). Through a mechanism of molecular mimicry, these antibodies (anti-idiotype antibodies) can bind ACE-2 just like the immunogenic Spike.

In the case that the immunogen is an antigen binding to a molecular partner, the immune system can react against the sequences within the induced anti-antigen antibodies that recognize the region of the antigen that binds its partner, e.g., in the case of Spike, the receptor-binding domain (RBD). Under physiologic conditions, this mechanism contributes to the control of the production of antigen-specific antibodies. However, in the presence of exceeding amounts of antigen-specific antibodies, as in the case of mRNA-based anti-COVID-19 vaccination, the consequent hyper-production of anti-idiotype antibodies can lead to effects mimicking those induced by the binding of Spike with ACE-2 [33]. Bellucci and colleagues have recently demonstrated the side effects associated with the production of ACE-2-binding anti-idiotype antibodies. In particular, they reported neurological clinical complications including radiculitis, myelitis, and Guillain-Barré syndrome in both SARS-CoV-2-infected and uninfected subjects injected with mRNA-based COVID-19 vaccines and developing anti-ACE-2 autoantibodies [34]. Regrettably, both autoantibodies and anti-idiotype antibodies are expected to persist beyond the duration of the anti-Spike immune response.

The recent discovery that the incorporation of N1-methyl-pseudouridine in place of the natural uridine residue in the backbone of vaccine-associated mRNA can induce a +1 ribosomal frameshifting added another layer of complexity in terms of the immune response induced by the vaccine. It was estimated that roughly 8% of the total translated products represent unknown proteins that are immunogenic in humans [35]. The autoimmune

potential of the aberrant protein products generated in this way represents an additional point that must be investigated further in depth.

6. Mucosal Vaccines: An Alternative Potentially Free of Systemic Side Effects

The COVID-19 battlefield is the respiratory system, where the ideal COVID-19 vaccine should develop its most effective immunologic and antiviral strength. Clinical data reported regarding current mRNA-based COVID-19 vaccines support the idea that the strong circulatory immune response is associated with antiviral immunity in the respiratory districts that is too limited [36].

Similarly to what has been demonstrated with natural infections [37], mucosal vaccines have the potential to elicit effective immune responses in the respiratory compartment through the induction of both neutralizing dimeric/secretory IgAs in the oronasopharyngeal district [38], and antiviral resident memory CD8⁺ T lymphocytes in the lower respiratory tract [39]. In this way, effective mucosal vaccines have the incomparable advantage of blocking the transmission chain of SARS-CoV-2 as well as other airborne viruses.

At present, two COVID-19 mucosal vaccines have been approved, and others are in clinical experimentation [40]. Of note, in no cases are these vaccines expected to induce robust systemic immune responses like those observed with current COVID-19 vaccines. However, suboptimal/weak systemic immunization should not be considered a functionally relevant disadvantage considering the compartmentalization of the respiratory immune system [41], which limits the access of neutralizing IgGs and antiviral immune cells from the circulatory district. Conversely, it represents an advantage in terms of a strong reduction in/lack of immunologic systemic effects induced by parenterally injected mRNA-based COVID-19 vaccines, including the production of undesirable circulatory anti-idiotypic antibodies.

7. Conclusions

Several experimental pieces of evidence support the idea that the Spike protein is produced abundantly and persists after mRNA COVID-19 vaccination. However, current mRNA-based COVID-19 vaccines recognize a series of relevant limitations including the rapid waning of the immune response, the inability to mount an effective immune response at the virus port of entry, and the reduced efficacy of updated formulations due to the phenomenon of original antigenic sin [42,43]. On the other hand, powerful mRNA translation coupled with Spike overproduction can lead to the dysregulation of ACE-2 signaling and cytokine production, antibody cross-reaction against unspecific molecular targets, the emersion of both auto- and anti-idiotypic antibodies, and immune responses of uncertain significance against unknown products. In addition, the cytokines produced after Spike/ACE-2 binding can unfavorably influence the fate of still “dormant” tumors and pre-existent autoimmune pathologies as well as chronic inflammation. For these reasons, the current indication of COVID-19 mRNA vaccines for the “fragile” population should be carefully re-evaluated in light of the typology of each specific fragility.

Notwithstanding the remarkable efficiency of antigen production, attempts to ameliorate the performance of these mRNA-based COVID-19 vaccines have been made in the direction of enforcing Spike production through the parenteral injection of self-replicating mRNA-based vectors [44]. Notably, the Japanese Ministry of Health has recently approved a clinical trial for testing the safety and effectiveness of a COVID-19 vaccine based on this technology [45]. This choice appears to be truly questionable given the above-described shortcomings induced by the exceeding production and persistence of circulatory Spike dictated by current mRNA-based COVID-19 vaccines. In this scenario, increasing the amounts and the persistence of circulating Spike is expected to exacerbate both cellular and immunologic side effects, but without acting on the most relevant functional limitation of these vaccines, i.e., their inability to elicit neutralizing immunity in the respiratory tracts due to the immune compartmentalization of the respiratory system. In addition, a too-

potent and persistent immunogenic stimulus is known to induce immunologic tolerance, as also reported in a couple of papers for current COVID-19 vaccines [46,47].

Conversely, a more plausible avenue to be paced is represented by the development of effective mucosal vaccines [48] given their ability to act at the virus port of entry and to avoid most of the systemic side effects observed in intramuscularly injected COVID-19 mRNA vaccines.

mRNA-based technology is currently attracting the interest of many scientists worldwide. In the case of COVID-19 vaccines, it seems more than reasonable that an adequate burden of investigations would be focused on the identification and analysis of unexpected events, with the obvious intent to render this prophylactic strategy safer and commensurate for use in a large number of healthy people.

Funding: This work was supported by the RiPrEI grant, no. Rip 001, from Ministry of Health, Rome, Italy.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data have been created.

Acknowledgments: I thank Rosangela Duranti and Federica Magnani for their secretarial assistance.

Conflicts of Interest: The author declares no conflicts of interest.

References

1. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10881. [CrossRef] [PubMed]
2. Röltgen, K.; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025–1040.e14. [CrossRef] [PubMed]
3. Moghimi, S.M.; Simberg, D. Pro-Inflammatory Concerns with Lipid Nanoparticles. *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 2109–2110. [CrossRef] [PubMed]
4. Lindsay, K.E.; Bhosle, S.M.; Zurla, C.; Beyersdorf, J.; Rogers, K.A.; Vanover, D.; Xiao, P.; Araínga, M.; Shirreff, L.M.; Pitard, B.; et al. Visualization of Early Events in mRNA Vaccine Delivery in Non-Human Primates via PET-CT and near-Infrared Imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 371–380. [CrossRef] [PubMed]
5. EMA. Assessment Report Comirnaty Common Name: COVID-19 mRNA Vaccine (Nucleoside Modified). 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 5 September 2024).
6. Krauson, A.J.; Casimero, F.V.C.; Siddiquee, Z.; Stone, J.R. Duration of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Persistence and Factors Associated with Cardiac Involvement in Recently Vaccinated Patients. *npj Vaccines* **2023**, *8*, 141. [CrossRef]
7. Wong, C.K.; Lam, C.W.K.; Wu, A.K.L.; Ip, W.K.; Lee, N.L.S.; Chan, I.H.S.; Lit, L.C.W.; Hui, D.S.C.; Chan, M.H.M.; Chung, S.S.C.; et al. Plasma Inflammatory Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *136*, 95–103. [CrossRef]
8. Kuba, K.; Yamaguchi, T.; Penninger, J.M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Pathogenesis of ARDS in COVID-19. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 732690. [CrossRef]
9. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Micke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e9610. [CrossRef]
10. Santos, R.A.S.; Sampaio, W.O.; Alzamora, A.C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M.J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 505–553. [CrossRef]
11. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; et al. Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit. Care* **2020**, *24*, 422. [CrossRef]
12. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1323–1326. [CrossRef] [PubMed]
13. Robles, J.P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; de la Escalera, G.M.; Clapp, C. The Spike Protein of SARS-CoV-2 Induces Endothelial Inflammation through Integrin A5β1 and NF-KB Signaling. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101695. [CrossRef] [PubMed]

14. Barhoumi, T.; Alghanem, B.; Shaibah, H.; Mansour, F.A.; Alamri, H.S.; Akiel, M.A.; Alroqi, F.; Boudjelal, M. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 728896. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Winheim, E.; Rinke, L.; Lutz, K.; Reischer, A.; Leutbecher, A.; Wolfram, L.; Rausch, L.; Kranich, J.; Wratil, P.R.; Huber, J.E.; et al. Impaired Function and Delayed Regeneration of Dendritic Cells in COVID-19. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gracie, N.P.; Lai, L.Y.S.; Newsome, T.P. Cellular Signalling by SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microbiol. Aust.* **2024**, *45*, 13–17. [\[CrossRef\]](#)
17. Ciszewski, W.M.; Woźniak, L.A.; Sobierajska, K. Diverse Roles of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins in EndMT Stimulation through the TGF- β -MRTF Axis Inhibited by Aspirin. *Cell Commun. Signal* **2024**, *22*, 296. [\[CrossRef\]](#)
18. Biering, S.B.; Gomes de Sousa, F.T.; Tjang, L.V.; Pahmeier, F.; Zhu, C.; Ruan, R.; Blanc, S.F.; Patel, T.S.; Worthington, C.M.; Glasner, D.R.; et al. SARS-CoV-2 Spike Triggers Barrier Dysfunction and Vascular Leak via Integrins and TGF- β Signaling. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7630. [\[CrossRef\]](#)
19. Carvacho, I.; Piesche, M. RGD-Binding Integrins and TGF- β in SARS-CoV-2 Infections—Novel Targets to Treat COVID-19 Patients? *Clin. Transl. Immunol.* **2021**, *10*, e1240. [\[CrossRef\]](#)
20. Deng, Z.; Fan, T.; Xiao, C.; Tian, H.; Zheng, Y.; Li, C.; He, J. TGF- β Signaling in Health, Disease, and Therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 61. [\[CrossRef\]](#)
21. Battle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924–940. [\[CrossRef\]](#)
22. Nandan, D.; Reiner, N.E. TGF-Beta Attenuates the Class II Transactivator and Reveals an Accessory Pathway of IFN-Gamma Action. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1095–1101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Geissmann, F.; Revy, P.; Regnault, A.; Lepelletier, Y.; Dy, M.; Brousse, N.; Amigorena, S.; Hermine, O.; Durandy, A. TGF-Beta 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 4567–4575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Takeuchi, M.; Alard, P.; Streilein, J.W. TGF-Beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1589–1597. [\[CrossRef\]](#)
25. Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 549–555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Angioni, R.; Sánchez-Rodríguez, R.; Viola, A.; Molon, B. TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13*, 401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Lai, Y.-J.; Chao, C.-H.; Liao, C.-C.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Chou, W.-C.; Wang, J.; Huang, H.-C.; Chang, S.-J.; Lin, Y.-L.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by SARS-CoV-2 Required Transcriptional Upregulation of Snail. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 2278–2290.
28. Huang, H.-C.; Liao, C.-C.; Wang, S.-H.; Lee, I.-J.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Kuo, C.-T.; Wang, J.; Hsieh, W.-C.; Chang, S.-J.; et al. Hyperglycosylated Spike of SARS-CoV-2 Gamma Variant Induces Breast Cancer Metastasis. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 4994–5005.
29. Nunez-Castilla, J.; Stebliankin, V.; Baral, P.; Balbin, C.A.; Sobhan, M.; Cickovski, T.; Mondal, A.M.; Narasimhan, G.; Chapagain, P.; Mathee, K.; et al. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14*, 1415. [\[CrossRef\]](#)
30. Dotan, A.; Kanduc, D.; Muller, S.; Makatsariya, A.; Shoenfeld, Y. Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 and the Female Reproductive System. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2021**, *86*, e13494. [\[CrossRef\]](#)
31. Xu, W.; Wen, X.; Cong, X.; Jiang, W. COVID-19 mRNA Vaccine, but Not a Viral Vector-Based Vaccine, Promotes Neutralizing Anti-Type I Interferon Autoantibody Production in a Small Group of Healthy Individuals. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, e29137. [\[CrossRef\]](#)
32. Murphy, W.J.; Longo, D.L. A Possible Role for Anti-Idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 394–396. [\[CrossRef\]](#)
33. Arlt, F.A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; et al. High Serum Prevalence of Autoreactive IgG Antibodies against Peripheral Nerve Structures in Patients with Neurological Post-COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1404800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Bellucci, M.; Bozzano, F.M.; Castellano, C.; Pesce, G.; Beronio, A.; Farshchi, A.H.; Limongelli, A.; Uccelli, A.; Benedetti, L.; De Maria, A. Post-SARS-CoV-2 Infection and Post-Vaccine-Related Neurological Complications Share Clinical Features and the Same Positivity to Anti-ACE2 Antibodies. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1398028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Mulroney, T.E.; Pöyry, T.; Yam-Puc, J.C.; Rust, M.; Harvey, R.F.; Kalmar, L.; Horner, E.; Booth, L.; Ferreira, A.P.; Stoneley, M.; et al. N1-Methylpseudouridylation of mRNA Causes +1 Ribosomal Frameshifting. *Nature* **2024**, *625*, 189–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tang, J.; Zeng, C.; Cox, T.M.; Li, C.; Son, Y.M.; Cheon, I.S.; Wu, Y.; Behl, S.; Taylor, J.J.; Chakarabarty, R.; et al. Respiratory Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 after mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eadd4853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Mitsi, E.; Diniz, M.O.; Reiné, J.; Collins, A.M.; Robinson, R.E.; Hyder-Wright, A.; Farrar, M.; Liatsikos, K.; Hamilton, J.; Onyema, O.; et al. Respiratory Mucosal Immune Memory to SARS-CoV-2 after Infection and Vaccination. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6815. [\[CrossRef\]](#)
38. Sun, B.; Wang, Q.; Zheng, P.; Niu, X.; Feng, Y.; Guan, W.; Chen, S.; Li, J.; Cui, T.; Deng, Y.; et al. An Intranasally Administered Adenovirus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Mucosal Secretory IgA. *JCI Insight* **2024**, *9*, e180784. [\[CrossRef\]](#)

39. Ma, B.; Tao, M.; Li, Z.; Zheng, Q.; Wu, H.; Chen, P. Mucosal Vaccines for Viral Diseases: Status and Prospects. *Virology* **2024**, *593*, 110026. [\[CrossRef\]](#)
40. Rathore, A.P.S.; St. John, A.L. Promises and Challenges of Mucosal COVID-19 Vaccines. *Vaccine* **2023**, *41*, 4042–4049. [\[CrossRef\]](#)
41. Allie, S.R.; Bradley, J.E.; Mudunuru, U.; Schultz, M.D.; Graf, B.A.; Lund, F.E.; Randall, T.D. The Establishment of Resident Memory B Cells in the Lung Requires Local Antigen Encounter. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 97–108. [\[CrossRef\]](#)
42. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M.M.; Bishop, E.; et al. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 917–924. [\[CrossRef\]](#)
43. Tang, Y.; Boribong, B.P.; Swank, Z.N.; Demokritou, M.; Luban, M.A.F.; Fasano, A.; Du, M.; Wolf, R.L.; Griffiths, J.; Shultz, J.; et al. COVID-19 mRNA Vaccines Induce Robust Levels of IgG but Limited Amounts of IgA within the Oronasopharynx of Young Children. *J. Infect. Dis.* **2024**, jiae450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; et al. Immunogenicity and Safety of a Booster Dose of a Self-Amplifying RNA COVID-19 Vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: A Double-Blind, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3, Non-Inferiority Trial. *Lancet Infect. Dis.* **2024**, *24*, 351–360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Dolgin, E. Self-Copying RNA Vaccine Wins First Full Approval: What's next? *Nature* **2023**, *624*, 236–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Uversky, V.N.; Redwan, E.M.; Makis, W.; Rubio-Casillas, A. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines* **2023**, *11*, 991. [\[CrossRef\]](#)
47. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytopil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; et al. Class Switch toward Noninflammatory, Spike-Specific IgG4 Antibodies after Repeated SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2023**, *8*, eade2798. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhu, F.; Huang, S.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhuang, C.; Zhao, H.; Han, J.; Jaen, A.M.; Do, T.H.; Peter, J.G.; et al. Safety and Efficacy of the Intranasal Spray SARS-CoV-2 Vaccine dNS1-RBD: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Respir. Med.* **2023**, *11*, 1075–1088. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Die immunologischen Nachteile, die mit der kraftvollen Übersetzung der aktuellen COVID-19-Impfstoff-mRNA verbunden sind, können durch Schleimhautimpfstoffe überwunden werden

Maurizio Federico 

Nationales Zentrum für globale Gesundheit, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rom, Italien; maurizio.federico@iss.it

Zusammenfassung: Die Wirkung von Impfstoffen auf mRNA-Basis setzt die Expression des Antigens in Zellen voraus, die von Lipid-Nanopartikeln und mRNA-Komplexen erreicht werden. Wenn das Impfstoff-Antigen nicht vollständig von den produzierenden Zellen zurückgehalten wird, kann seine lokale und systemische Diffusion Folgen haben, die sowohl vom Grad der Antigenexpression als auch von seiner biologischen Aktivität abhängen. Eine Besonderheit der mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffe sind die außerordentlich hohen Mengen des Spike-Antigens, die von den Zielzellen exprimiert werden. Darüber hinaus kann Impfstoff-Spike ausgeschieden werden und an ACE-2-Zellrezeptoren binden, wodurch Reaktionen von pathogenetischer Bedeutung ausgelöst werden, einschließlich der Freisetzung löslicher Faktoren, die ihrerseits wichtige immunologische Prozesse dysregulieren können. Darüber hinaus sind die durch den Impfstoff Spike ausgelösten zirkulären Immunreaktionen sehr stark und können zu einer wirksamen Kreuzbindung von Anti-Spike-Antikörpern sowie zur Entstehung von Auto- und Anti-Idiotyp-Antikörpern führen. In diesem Beitrag werden die immunologischen Nachteile der hohen Effizienz der mRNA-Translation im Zusammenhang mit COVID-19-Impfstoffen erörtert und Argumente angeführt, die dafür sprechen, dass die meisten dieser Nachteile durch die Einführung von COVID-19-Schleimhautimpfstoffen der nächsten Generation vermieden werden können.

Schlüsselwörter: COVID-19 mRNA-Impfstoffe; SARS-CoV-2 Spike; mukosale Impfstoffe; ACE-2; Autoimmunität



Zitat: Federico, M. The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines. *Vaccines* **2024**, *12*, 1281. <https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>

Akademischer Herausgeber: Pedro Plans-Rubió

Eingegangen: 11. Oktober 2024

Überarbeitet: 11. November 2024

Angenommen: 13. November

2024 Veröffentlicht: 14.

November 2024



Copyright: © 2024 durch den Autor. Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution (CC BY) Lizenz (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) verbreitet wird.

1. Einführung

COVID-19-Impfstoffe auf mRNA-Basis wurden sowohl in ihrer ursprünglichen als auch in der aktuellen, aktualisierten Version an viele Menschen verteilt. Darüber hinaus bildet die mRNA-Technologie die Grundlage für weitere experimentelle Impfstoffe sowie für die neueste Generation von Krebsimmuntherapien. Daher ist es zwingend erforderlich, die wichtigsten unerwarteten

Ereignisse, die diese Technologie beim Menschen hervorrufen kann, zu identifizieren, zu überwachen und eingehend zu analysieren, auch wenn sie nur selten auftreten. Die mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffe unterscheiden sich in mehreren Punkten von den "traditionellen"

Impfstoffen, die auf abgeschwächten/inaktivierten Viren, Untereinheiten oder rekombinanten Produkten basieren und sich bei der Bekämpfung verschiedener Infektionskrankheiten als sehr nützlich erwiesen haben. Erstens besteht die Impfstoffformulierung aus Lipid-Nanopartikeln (LNP), die mit mRNA-Molekülen komplexiert sind, die durch In-vitro-Transkription hergestellt werden. Zweitens ist das Immunogen nicht Teil der Impfstoffformulierung, sondern es wird erwartet, dass es von Zellen synthetisiert wird, die die mRNA/LNP-Komplexe internalisieren. Dies rechtfertigt die a n g e m e s s e n e r e Definition von Prodrug (eine pharmakologisch

inaktive Substanz, die im Körper in ein pharmakologisch aktives Medikament umgewandelt wird) und nicht von Impfstoff [1]. Drittens wird das Immunogen (d. h. das virale Protein Spike) von den Zielzellen in sehr hohen Mengen synthetisiert und bleibt über längere Zeit bestehen [2]. Viertens erkennt, bindet und aktiviert das Immunogen einen weit verbreiteten Signalrezeptor, nämlich das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE)-2, und wird in seiner Präfusionskonformation durch zwei aufeinanderfolgende Mutationen zu Prolin an den Aminosäurepositionen 986 und 987 stabilisiert, die sich nicht negativ auf die ACE-2-Bindung/Aktivierung auswirken. Daher sind die Häufigkeit, Verbreitung, Persistenz, biologische Aktivität und Stabilität des Immunogens die Schlüsselpunkte, die mRNA-basierte COVID-19-Impfstoffe auszeichnen. In dieser Arbeit werden die wichtigsten Folgen der

Überproduktion des Spike-Antigens nach der mRNA-basierten COVID-19-Impfung und der ziemlich starken zirkulierenden

die hervorgerufene Immunreaktion werden erörtert. Ein umfassendes Bild aller möglichen Bedenken wäre von großem Nutzen für die Entwicklung sicherer und gezielterer Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 und andere luftübertragene Infektionserreger. Unter diesen Impfstoffen verdienen Schleimhautimpfstoffe eine gewisse Beachtung, da sie an der Eintrittspforte des Virus wirken und keine unerwünschten systemischen Wirkungen haben.

2. Hohe und anhaltende Konzentrationen von zirkulierenden Spikes nach der Impfung

mRNA/Lipid-Nanopartikel (LNP)-Komplexe können in jeden Zelltyp eindringen. Die Injektion in den Deltamuskel begünstigt ihren Eintritt in Muskelzellen; die durch einige Lipidkomponenten [3] ausgelöste moderate Entzündung kann jedoch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) an die Injektionsstelle locken. APCs können die LNPs aufnehmen, aktiviert werden und zu den Lymphknoten wandern [4]. Darüber hinaus entgehen nicht quantifizierbare Mengen der injizierten mRNA/LNP-Komplexe der Zellinternalisierung an der Injektionsstelle und gelangen so in den Blutkreislauf. Dementsprechend haben Studien zur Biodistribution, die von einem Hersteller von COVID-19-mRNA-Impfstoffen durchgeführt wurden, die potenzielle Diffusion von intramuskulär injizierten LNPs in fast alle Gewebe gezeigt [5].

Sowohl die mRNA als auch der Impfstoff Spike persistieren nach der Impfung lange Zeit im Körper. In einer Studie, die an autopsischen Proben von Patienten nach der COVID-19-Impfung durchgeführt wurde, konnte die Persistenz der Impfstoff-mRNA in bilateralen axillären Lymphknoten bis zu 30 Tage nach der Impfung nachgewiesen werden [6]. Bemerkenswerterweise wurde die Impfstoff-mRNA auch in beiden Herzkammern bis zu 20 Tage nach der Injektion gefunden, und ihr Vorhandensein korrelierte mit Myokardverletzungen, die mit einer abnorm hohen Anzahl von Myokardmakrophagen verbunden waren. In einer anderen Studie wurde Impfstoff-mRNA bis zu 60 Tage nach der zweiten Dosis in Biopsien aus ipsilateralen axillären Lymphknoten gefunden [2].

Ein Teil des intrazellulär exprimierten Spike bleibt in seiner trimeren Form auf der Plasmamembran der Zielzellen exponiert, während ein gleichbleibender Teil davon ausgeschieden werden und zirkulieren kann. Dementsprechend wurde 1-2 Tage nach der Injektion ein Medianwert von 47 pg/ml freier Spike im Plasma von Impflingen gemessen, mit Spitzenwerten von 174 pg/ml [2]. Diese Spike-Konzentrationen im Plasma erscheinen überraschend hoch und liegen beispielsweise im Bereich der Konzentrationen von entzündungsfördernden Zytokinen, die bei Personen mit akuter systemischer Entzündung nachgewiesen wurden [7]. Dieser Nachweis ist angesichts der hohen Affinität von Spike für ACE-2, d. h. einen weit verbreiteten Zellrezeptor, der an mehreren wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt ist, von besonderer Bedeutung.

3. ACE-2: Zusammenfassung der Funktionen, der Verteilung und der Signalwirkung bei Spike-Bindung

ACE-2 ist ein 805 Aminosäuren langes Transmembranprotein vom Typ I mit einem extrazellulären, glykosylierten N-terminalen Bereich, der die Carboxypeptidase-Domäne enthält, deren Funktion darin besteht, einzelne Aminosäuren vom C-Terminus ihrer Substrate zu entfernen. ACE-2 ist ein wichtiger Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, das den Blutdruck kontrolliert. Es katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I, einem Dekapeptid, in Angiotensin 1-9, das von ACE in der Lunge in kleinere, gefäßerweiternde Angiotensinpeptide (z. B. Angiotensin 1-7) umgewandelt werden kann. ACE-2 bindet auch Angiotensin II, d. h. ein Oktapeptid, das durch ACE-bedingte Spaltung von Angiotensin I entsteht, um das gefäßerweiternde Angiotensin 1-7 zu produzieren. ACE-2 ist auch an der Produktion von Bradykininen beteiligt, einer Gruppe von Peptiden mit starker gefäßerweiternder Wirkung [8].

ACE-2 wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem von Enterozyten, Kardiomyozyten, Nierentubuli, Gefäßen und Ductuszellen. Im Gegensatz dazu ist die ACE-2-Expression in Atemwegsgeweben auf eine kleine Anzahl spezialisierter Zelltypen beschränkt, d. h. Typ-II-Alveolarzellen und Alveolarmakrophagen [9].

Die Wechselwirkung zwischen ACE-2 und Angiotensin II induziert verschiedene Signalwege, die letztlich zur Freisetzung verschiedener Zytokine wie IL-6, TNF- α und TGF- β führen [10]. Bemerkenswert ist, dass die Auswirkungen der Interaktion von ACE-2 mit Spike denen entsprechen, die für die Bindung an seine natürlichen Liganden beschrieben wurden [11]. Insbesondere in vaskulären Endothelzellen führt natürliches Spike zu einer Blockierung der mitochondrialen Funktionen [12]; in der Zwischenzeit führt die Umschaltung der Integrin- $\alpha 5 \beta 1$ -abhängigen Signalisierung zur nukleären Translokation von NF- κ B. Diese Ereignisse induzieren letztlich die Expression von VCAM-1, ICAM-1, Gerinnungsfaktoren und die Freisetzung von

von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 entzündlichen Zytokinen [13]. Ähnliche Aktivierungsmechanismen wurden sowohl für Makrophagen als auch für dendritische Zellen berichtet [14,15]. Wichtig ist, dass natürlicher Spike sowohl in Epithel- als auch in Endothelzellen die Freisetzung des pleiotropen Zytokins $\text{TGF-}\beta$ induziert [16].

4. Die SARS-CoV-2-Spike/ACE-2/TGF- β -Achse in der Anti-Tumor-Immunüberwachung und der epithelialen zu mesenchymalen Transition

Die Bindung von Spike an ACE-2 führt zu tiefgreifenden Veränderungen der intrazellulären Signalübertragung mit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Freisetzung verschiedener löslicher Faktoren. Insbesondere wurde festgestellt, dass menschliche vaskuläre Endothelzellen, die mit Spike behandelt wurden, sowohl $\text{TGF-}\beta 1$ als auch $\text{TGF-}\beta 2$ freisetzen [17], was mit früheren "in vivo"-Beweisen übereinstimmt, die auf eine Schlüsselrolle von $\text{TGF-}\beta$ bei der COVID-19-Pathogenese hindeuten [18,19].

$\text{TGF-}\beta$ mit seinen drei Isoformen, d.h. $\beta 1$ bis $\beta 3$, ist ein wichtiger Regulator der adaptiven Immunantwort [20] und wirkt beispielsweise als Inhibitor der Antigen-präsentierenden Aktivität in dendritischen Zellen (DCs) durch die Herunterregulierung von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) [21,22] (Abbildung 1). Es reduziert auch die Expression von IL-12 und co-stimulatorischen Molekülen wie CD40 in Makrophagen und CD80 , CD83 und CD86 in DCs als Teil der Regulationsmechanismen der APC-vermittelten Immunzellaktivierung [23,24].

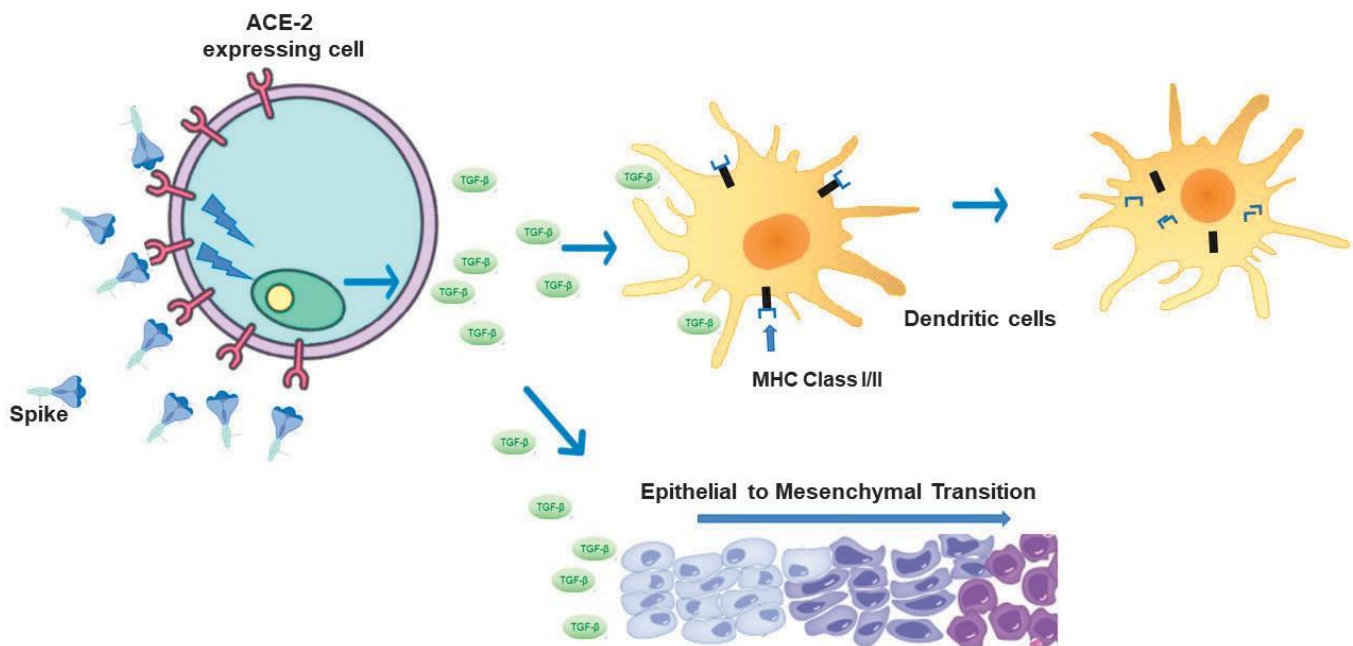


Abbildung 1. Bystander-Effekte der Spike/ACE-2-Bindung. Freies SARS-CoV-2-Spike-Protein bindet ACE-2-exprimierende Zellen und induziert dadurch intrazelluläre Signalübertragung, die zur Freisetzung löslicher Faktoren führt. Von diesen Faktoren ist bekannt, dass $\text{TGF-}\beta$ die Antigen-präsentierende Aktivität in APCs durch MHC-Klasse I/II-Downregulation herunterreguliert. $\text{TGF-}\beta$ ist auch ein wichtiger Faktor für den Übergang von Epithel zu Mesenchym, der die Grundlage für die Entwicklung von soliden Tumoren und Metastasen ist.

$\text{TGF-}\beta$ kann auch in die Mechanismen der Immunüberwachung eingreifen, die das Wachstum von Tumorzellen kontrollieren. So kann $\text{TGF-}\beta$ die Polarisierung von Makrophagen von M1 (gekennzeichnet durch die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen wie $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 und IL-18) zu M2-Makrophagen induzieren, die entzündungshemmende Zytokine wie IL-1ra und IL-10 sezernieren und durch mehrere immunsuppressive Eigenschaften der Tumormikroumgebung gekennzeichnet sind [25]. Andererseits ist $\text{TGF-}\beta$ ein Haupttreiber des epithelialen zu mesenchymalen Übergangs (EMT) [26], der die Grundlage für die Entwicklung von soliden Tumoren und Metastasen ist. In diesem Szenario haben übereinstimmende Ergebnisse aus der experimentellen Arbeit zweier Forschergruppen die Hypothese aufgeworfen, dass natürliche Spike zur EMT beitragen können (Abbildung 1). Im Einzelnen,

Lai und Kollegen wiesen nach, dass die TGF- β -verwandte Signalübertragung Teil des Mechanismus ist, der dem Erwerb eines mesenchymalen Phänotyps von Spike-exprimierenden menschlichen Brustkrebszellen zugrunde liegt. Vor allem zeigten sie, dass die Anzahl der Lungenmetastasen bei Mäusen, die mit Spike-exprimierenden 4T1-Brustkrebszellen geimpft wurden, im Vergleich zu den von den Elternzellen induzierten Metastasen anstieg [27,28]. Ciszewski und Kollegen beobachteten, dass die Behandlung von menschlichen Endothelzellen (HUVECs und HMEC-1) mit rekombinantem Wildtyp-Spike die Freisetzung von TGF- β induziert, was mit einer Transdifferenzierung der Zellen einhergeht. Durch die Untersuchung des zugrundeliegenden Wirkmechanismus konnte die Beteiligung der ACE-2/TGF- β /MRTF (myocardin-related transcription factor)- β Achse an der beobachteten EMT nachgewiesen werden. Schließlich wurde der Beitrag von TGF- β zur Spike-bedingten EMT durch den Nachweis untermauert, dass mit Spike behandelte menschliche Endothelzellen in Gegenwart von Anti-TGF- β -Antikörpern nicht transdifferenzieren [17].

Die Ergebnisse dieser Studien werfen die Frage auf, ob Spike zur EMT beim Menschen beitragen kann. Auch wenn bisher keine klinischen Daten vorliegen, die Ereignisse im Zusammenhang mit diesen pathologischen Immunreaktionen beschreiben, scheinen die potenziellen Auswirkungen auf die Sicherheit von COVID-19-Impfstoffen auch in Anbetracht des Nachweises, dass mRNA/LNPs in jede Art von Zelle eindringen können, offensichtlich zu sein. So könnte der unglückliche Eintritt von mRNA/LNP-Komplexen in bereits entstandene Tumorzellen die von Lai und Kollegen beschriebenen Bedingungen reproduzieren und somit eine Gefahr für die Bildung von Metastasen darstellen. Andererseits können pathogenetische Bystander-Effekte durch die lokale Produktion hoher Konzentrationen von Spike durch normale Zellen, auf die die mRNA/LNPs abzielen und die sich in der Nähe von Tumorzellen befinden, ausgelöst werden, wie von Ciszewski und Kollegen beschrieben. Aus diesen Gründen erscheint eine Ausweitung der Studien auf weitere Zellsysteme sowie auf geeignete "in vivo"-Modelle zwingend erforderlich, wenn man bedenkt, dass die mRNA/LNP-Komplexe nach der Impfung im Körper zirkulieren können.

5. mRNA COVID-19 Impfstoff-induzierte unspezifische Immunität: Antikörper-Kreuzbindungen, Autoantikörper, Anti-Idiotyp-Antikörper und Ribosomen-Rahmenverschiebung

Die hohen Konzentrationen des Impfstoffs Spike, die nach der Injektion gebildet werden, sind mit einer außerordentlich starken zirkulären Immunantwort verbunden, die zur Bildung hoher Titer von Anti-Spike-Antikörpern führt. Einerseits wird dieses Ergebnis als Vorteil für den antiviralen Schutz angesehen; andererseits kann eine solch starke Immunogenität jedoch mit relevanten unerwünschten Wirkungen einhergehen, die typischerweise bei Vorhandensein sowohl hoher als auch anhaltender antigener Stimuli auftreten. Dazu gehören die erhebliche Bindung von Anti-Spike-Antikörpern, die mit "eigenen" Antigenen kreuzreagieren, die Induktion nicht-physiologischer/pathogenetischer Prozesse, das Auftreten von Autoantikörpern und die Bildung von Anti-Idiotyp-Antikörpern. Diese Vorgänge wurden mit dem Auftreten von Krankheiten wie Thrombozytopenie, Myokarditis, verschiedenen Störungen des Menstruationszyklus, dem Wiederauftreten latenter Infektionen und dem Post-COVID-Impfstoff-Syndrom (PCVS) bei den Geimpften in Verbindung gebracht.

Kreuzreagierende Antikörper binden heterologe Ziele durch den Mechanismus der molekularen Mimikry. Höchstwahrscheinlich können pathogenetische Wirkungen erzielt werden, wenn sie in ausreichender Menge unspezifische molekulare Ziele binden, die in relevanten biologischen Prozessen wirken. Durch eine computergestützte Analyse der molekularen Mimikry zwischen Spike und bekannten menschlichen Epitopen wurde berichtet, dass Spike immunogene lineare Motive unter anderem mit Thrombopoietin (TQPLL) und Tropomyosin alpha-3 (ELDKY) teilt [29]. Diese Befunde scheinen relevant zu sein, da ersteres ein wichtiger Wachstumsfaktor ist, der für die Differenzierung der Megakaryozyten und die Produktion von Blutplättchen benötigt wird, und letzteres eine strukturelle Komponente der Kardiomyozyten ist. In einer anderen Studie wurde berichtet, dass Spike 41 minimale Immundeterminanten mit 27 menschlichen Proteinen gemeinsam hat, die für das weibliche Fortpflanzungssystem spezifisch sind und mit der Oogenese, der Rezeptivität der Gebärmutter, der Dezidualisierung und der Plazentation zusammenhängen [30].

Klinische Studien lieferten Hinweise darauf, dass die Injektion von COVID-19-mRNA-Impfstoffen mit der Produktion von Autoantikörpern, d. h. Nicht-Anti-Spike-Antikörpern, die Selbstantigene erkennen, als mögliche Folge einer allgemeinen Immundysregulation verbunden sein kann. So fanden Xu und Kollegen [31] neutralisierende Anti-Typ-I-Interferon-Antikörper bei 10 % der Patienten.

von gesunden geimpften Personen, allerdings mit einem begrenzten Stichprobenumfang. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass 18 % der Patienten, die an PCVS erkrankt sind, Autoantikörper gegen Neurofilament-Untereinheiten bilden [32]. Auch wenn Autoantikörper in einigen Fällen unschuldige Zuschauer sein können, ist noch unklar, ob die Impfung eine latente, bereits bestehende Autoimmunität reaktiviert oder die "de novo"-Generierung von Autoantikörpern auslöst.

Die molekulare Mimikry ist auch die Grundlage für die Wirkung von Anti-Idiotyp-Antikörpern (Abbildung 2).

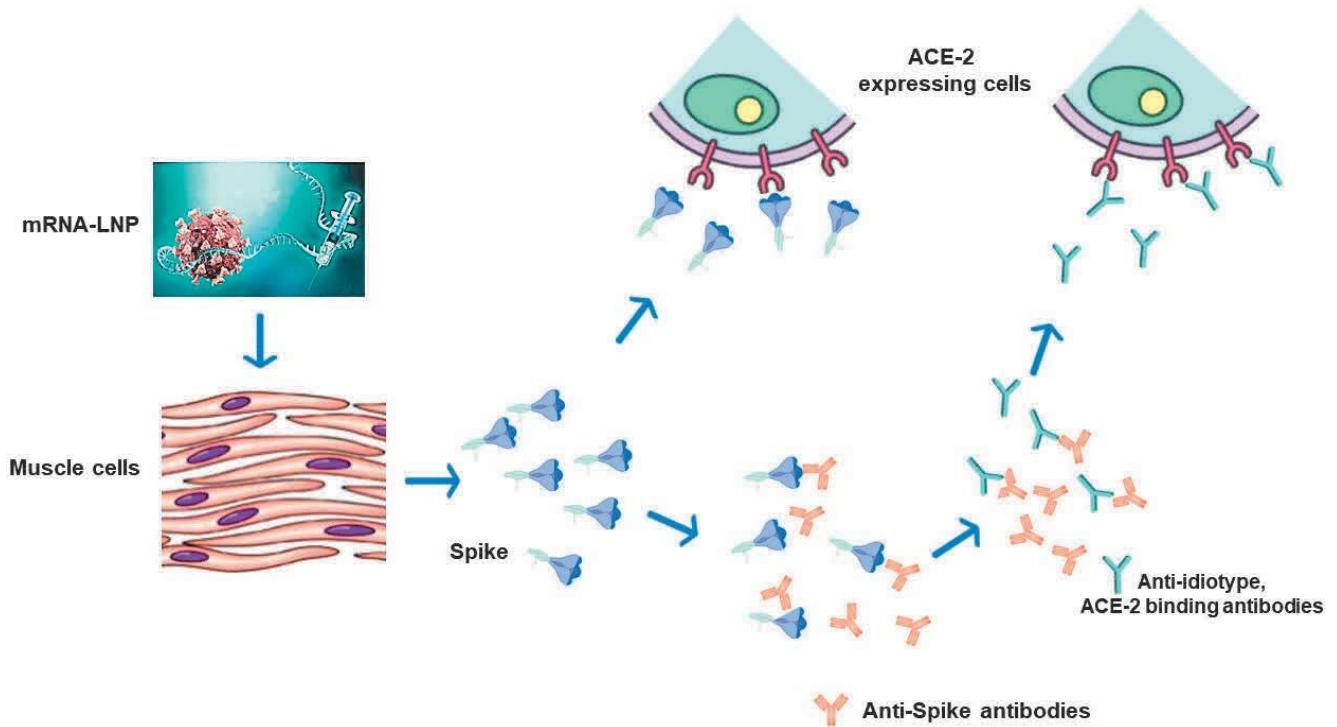


Abbildung 2. Bildung von Anti-Idiotyp-Antikörpern nach COVID-19-Impfung. Das Immunsystem kann Antikörper gegen die Sequenzen der Anti-Spike-Antikörper bilden, die die Spike-Domäne erkennen, die den ACE-2-Rezeptor bindet (rezeptorbindende Domäne, RBD). Durch einen Mechanismus der molekularen Mimikry können diese Antikörper (Anti-Idiotyp-Antikörper) ACE-2 genauso binden wie der immunogene Spike.

Handelt es sich bei dem Immunogen um ein Antigen, das an einen molekularen Partner bindet, kann das Immunsystem gegen die Sequenzen in den induzierten Anti-Antigen-Antikörpern reagieren, die den Bereich des Antigens erkennen, der seinen Partner bindet, z. B. im Fall von Spike die rezeptorbindende Domäne (RBD). Unter physiologischen Bedingungen trägt dieser Mechanismus zur Kontrolle der Produktion von antigenspezifischen Antikörpern bei. Bei Vorhandensein übermäßiger Mengen antigenspezifischer Antikörper, wie im Fall der mRNA-basierten Anti-COVID-19-Impfung, kann die daraus resultierende Hyperproduktion von Anti-Idiotyp-Antikörpern jedoch zu Effekten führen, die denen ähneln, die durch die Bindung von Spike an ACE-2 induziert werden [33]. Bellucci und Kollegen haben kürzlich die mit der Produktion von ACE-2-bindenden Anti-Idiotyp-Antikörpern verbundenen Nebenwirkungen nachgewiesen. Insbesondere berichteten sie über neurologische klinische Komplikationen wie Radikulitis, Myelitis und Guillain-Barré-Syndrom sowohl bei SARS- und CoV-2-infizierten als auch bei nicht infizierten Personen, die mit mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffen geimpft wurden und Anti-ACE-2-Autoantikörper entwickelten [34]. Bedauerlicherweise ist davon auszugehen, dass sowohl Autoantikörper als auch Anti-Idiotyp-Antikörper über die Dauer der Anti-Spike-Immunantwort hinaus bestehen bleiben.

Die jüngste Entdeckung, dass der Einbau von N1-Methyl-Pseudouridin anstelle des natürlichen Uridin-Restes in das Grundgerüst der impfstoffassoziierten mRNA ein +1 ri- bosomales Frameshifting induzieren kann, hat die durch den Impfstoff ausgelöste Immunantwort noch komplexer gemacht. Es wurde geschätzt, dass etwa 8 % der gesamten translatierten Produkte unbekannte Proteine darstellen, die beim Menschen immunogen sind [35]. Die Autoimmunreaktion

Das Potenzial der auf diese Weise erzeugten abweichenden Proteinprodukte ist ein zusätzlicher Punkt, der noch eingehender untersucht werden muss.

6. Schleimhaut-Impfstoffe: Eine Alternative, die möglicherweise frei von systemischen Nebenwirkungen ist

Das COVID-19-Schlachtfeld ist das Atmungssystem, wo der ideale COVID-19-Impfstoff seine wirksamste immunologische und antivirale Kraft entfalten sollte. Klinische Daten, die über aktuelle mRNA-basierte COVID-19-Impfstoffe berichtet wurden, unterstützen die Idee, dass die starke zirkulatorische Immunantwort mit einer zu geringen antiviralen Immunität in den Atemwegen verbunden ist [36].

Ähnlich wie bei natürlichen Infektionen [37] haben Schleimhautimpfstoffe das Potenzial, wirksame Immunantworten im Atemwegsbereich auszulösen, indem sie sowohl neutralisierende dimere/sekretorische IgAs im oronasopharyngealen Bezirk [38] als auch antivirale residente Gedächtnis-CD8⁺ T-Lymphozyten im unteren Atemtrakt induzieren [39]. Auf diese Weise haben wirksame Schleimhautimpfstoffe den unvergleichlichen Vorteil, dass sie die Übertragungskette von SARS-CoV-2 und anderen luftübertragenen Viren blockieren.

Derzeit sind zwei COVID-19-Schleimhautimpfstoffe zugelassen, und weitere befinden sich in der klinischen Erprobung [40]. Es ist zu beachten, dass diese Impfstoffe in keinem Fall robuste systemische Immunantworten hervorrufen, wie sie mit den aktuellen COVID-19-Impfstoffen beobachtet werden. Eine suboptimale/schwache systemische Immunisierung sollte jedoch nicht als funktionell relevanter Nachteil angesehen werden, wenn man die Kompartimentierung des respiratorischen Immunsystems berücksichtigt [41], die den Zugang von neutralisierenden IgGs und antiviralen Immunzellen aus dem zirkulierenden Bereich begrenzt. Umgekehrt stellt sie einen Vorteil dar, da immunologische systemische Effekte, die durch parenteral injizierte mRNA-basierte COVID-19-Impfstoffe induziert werden, stark reduziert werden bzw. ausbleiben, einschließlich der Produktion unerwünschter zirkulärer anti-idiotypischer Antikörper.

7. Schlussfolgerungen

Mehrere experimentelle Belege sprechen dafür, dass das Spike-Protein nach einer mRNA-COVID-19-Impfung reichlich produziert wird und bestehen bleibt. Die derzeitigen mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffe weisen jedoch eine Reihe von Einschränkungen auf, darunter das schnelle Abklingen der Immunantwort, die Unfähigkeit, eine wirksame Immunantwort an der Eintrittspforte des Virus auszulösen, und die geringere Wirksamkeit aktualisierter Formulierungen aufgrund des Phänomens der ursprünglichen Antigensünde [42,43]. Andererseits kann eine starke mRNA-Translation in Verbindung mit einer Spike-Überproduktion zu einer Dysregulation der ACE-2-Signalübertragung und der Zytokinproduktion, zu Antikörper-Kreuzreaktionen gegen unspezifische molekulare Ziele, zum Auftauchen von Auto- und Anti-Idiotyp-Antikörpern und zu Immunreaktionen von ungewisser Bedeutung gegen unbekannte Produkte führen. Darüber hinaus können die nach der Bindung von Spike/ACE-2 produzierten Zytokine das Schicksal von noch "schlafenden" Tumoren und präexistenten Autoimmunpathologien sowie chronischen Entzündungen ungünstig beeinflussen. Aus diesen Gründen sollte die derzeitige Indikation von COVID-19-mRNA-Impfstoffen für die "fragile" Population im Lichte der Typologie jeder spezifischen Fragilität sorgfältig neu bewertet werden.

Trotz der bemerkenswerten Effizienz der Antigenproduktion wurden Versuche unternommen, die Leistung dieser mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffe zu verbessern, indem die Spike-Produktion durch die parenterale Injektion von selbstreplizierenden mRNA-basierten Vektoren verstärkt wurde [44]. Das japanische Gesundheitsministerium hat vor kurzem eine klinische Studie zur Prüfung der Sicherheit und Wirksamkeit eines COVID-19-Impfstoffs auf der Grundlage dieser Technologie genehmigt [45]. In Anbetracht der oben beschriebenen Unzulänglichkeiten, die sich aus der übermäßigen Produktion und Persistenz von zirkulierenden Spikes ergeben, die von den derzeitigen mRNA-basierten COVID-19-Impfstoffen diktiert werden, scheint diese Entscheidung wirklich fragwürdig zu sein. In diesem Szenario ist zu erwarten, dass eine Erhöhung der Mengen und der Persistenz der zirkulierenden Spikes sowohl die zellulären als auch die immunologischen Nebenwirkungen verschlimmert, ohne jedoch auf die wichtigste funktionelle Einschränkung dieser Impfstoffe einzuwirken, nämlich ihre Unfähigkeit, aufgrund der Immunkompartimentierung des Atmungssystems eine neutralisierende Immunität in den Atemwegen zu erzeugen. Darüber hinaus ist eine zu-

Ein potenter und anhaltender immunogener Stimulus induziert bekanntermaßen immunologische Toleranz, wie auch in einigen Arbeiten zu aktuellen COVID-19-Impfstoffen berichtet wurde [46,47].

Ein plausiblerer Weg ist dagegen die Entwicklung wirksamer Schleimhautimpfstoffe [48], da sie an der Eintrittspforte des Virus wirken und die meisten der systemischen Nebenwirkungen vermeiden, die bei intramuskulär injizierten COVID-19-mRNA-Impfstoffen beobachtet werden.

Die mRNA-basierte Technologie stößt derzeit auf das Interesse vieler Wissenschaftler in aller Welt. Im Falle der COVID-19-Impfstoffe scheint es mehr als vernünftig, dass sich ein angemessener Teil der Untersuchungen auf die Identifizierung und Analyse unerwarteter Ereignisse konzentriert, mit der offensichtlichen Absicht, diese prophylaktische Strategie sicherer und für den Einsatz bei einer großen Anzahl gesunder Menschen angemessen zu machen.

Finanzierung: Diese Arbeit wurde durch das RiPrEI-Stipendium, Nr. Rip 001, des Gesundheitsministeriums, Rom, Italien.

Erklärung des Institutional Review Board: Nicht zutreffend.

Erklärung zur Einwilligung nach Aufklärung: Nicht zutreffend.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit: Es wurden keine neuen Daten erstellt.

Danksagungen: Ich danke Rosangela Duranti und Federica Magnani für ihre Unterstützung im Sekretariat.

Interessenkonflikte: Der Autor erklärt, dass es keine Interessenkonflikte gibt.

Referenzen

1. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Würfelspiel mit dem Spike? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10881. [CrossRef] [PubMed]
2. Röltgen, K.; Nielsen, S.C.A.; Silva, O.; Younes, S.F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O.F.; Solis, D.; Hoh, R.A.; et al. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025-1040.e14. [CrossRef] [PubMed]
3. Moghimi, S.M.; Simberg, D. Pro-Inflammatory Concerns with Lipid Nanoparticles. *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 2109-2110. [CrossRef] [PubMed]
4. Lindsay, K.E.; Bhosle, S.M.; Zurla, C.; Beyersdorf, J.; Rogers, K.A.; Vanover, D.; Xiao, P.; Araínga, M.; Shirreff, L.M.; Pitard, B.; et al. Visualization of Early Events in mRNA Vaccine Delivery in Non-Human Primates via PET-CT and near-Infrared Imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *3*, 371-380. [CrossRef] [PubMed]
5. EMA. Bewertungsbericht Comirnaty Gebräuchlicher Name: COVID-19 mRNA-Impfstoff (nukleosidmodifiziert). 2021. Online verfügbar: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (Zugriff am 5. September 2024).
6. Krauson, A.J.; Casimero, F.V.C.; Siddiquee, Z.; Stone, J.R. Duration of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Persistence and Factors Associated with Cardiac Involvement in Recently Vaccinated Patients. *npj Vaccines* **2023**, *8*, 141. [CrossRef]
7. Wong, C.K.; Lam, C.W.K.; Wu, A.K.L.; Ip, W.K.; Lee, N.L.S.; Chan, I.H.S.; Lit, L.C.W.; Hui, D.S.C.; Chan, M.H.M.; Chung, S.S.C.; et al. Plasma-Entzündungszytokine und Chemokine bei schwerem akutem Atemwegssyndrom. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, *136*, 95-103. [CrossRef]
8. Kuba, K.; Yamaguchi, T.; Penninger, J.M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in der Pathogenese von ARDS in COVID-19. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 732690. [CrossRef]
9. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Micke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. *Mol. Syst. Biol.* **2020**, *16*, e9610. [CrossRef]
10. Santos, R.A.S.; Sampaio, W.O.; Alzamora, A.C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M.J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Fokus auf Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 505-553. [CrossRef]
11. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; et al. Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit. Care* **2020**, *24*, 422. [CrossRef]
12. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C.R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* **2021**, *128*, 1323-1326. [CrossRef] [PubMed]
13. Robles, J.P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; de la Escalera, G.M.; Clapp, C. The Spike Protein of SARS-CoV-2 Induces Endothelial Inflammation through Integrin A5β1 and NF-KB Signaling. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 101695. [CrossRef] [PubMed]

14. Barhoumi, T.; Alghanem, B.; Shaibah, H.; Mansour, F.A.; Alamri, H.S.; Akiel, M.A.; Alroqi, F.; Boudjelal, M. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Mögliche Rolle des Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (Perindopril). *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 728896. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Winheim, E.; Rinke, L.; Lutz, K.; Reischer, A.; Leutbecher, A.; Wolfram, L.; Rausch, L.; Kranich, J.; Wratil, P.R.; Huber, J.E.; et al. Impaired Function and Delayed Regeneration of Dendritic Cells in COVID-19. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gracie, N.P.; Lai, L.Y.S.; Newsome, T.P. Cellular Signalling by SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microbiol. Aust.* **2024**, *45*, 13-17. [\[CrossRef\]](#)
17. Ciszewski, W.M.; Wozniak, L.A.; Sobierajska, K. Diverse Roles of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins in EndMT Stimulation through the TGF- β -MRTF Axis Inhibited by Aspirin. *Cell Commun. Signal* **2024**, *22*, 296. [\[CrossRef\]](#)
18. Biering, S.B.; Gomes de Sousa, F.T.; Tjang, L.V.; Pahmeier, F.; Zhu, C.; Ruan, R.; Blanc, S.F.; Patel, T.S.; Worthington, C.M.; Glasner, D.R.; et al. SARS-CoV-2 Spike Triggers Barrier Dysfunction and Vascular Leak via Integrins and TGF- β Signaling. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7630. [\[CrossRef\]](#)
19. Carvacho, I.; Piesche, M. RGD-Binding Integrins and TGF- β in SARS-CoV-2 Infections-Novel Targets to Treat COVID-19 Patients? *Clin. Transl. Immunol.* **2021**, *10*, e1240. [\[CrossRef\]](#)
20. Deng, Z.; Fan, T.; Xiao, C.; Tian, H.; Zheng, Y.; Li, C.; He, J. TGF- β Signaling in Health, Disease, and Therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 61. [\[CrossRef\]](#)
21. Batlle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924-940. [\[CrossRef\]](#)
22. Nandan, D.; Reiner, N.E. TGF-Beta attenuiert den Transaktivator der Klasse II und zeigt einen akzessorischen Wirkungsweg von IFN-Gamma auf. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1095-1101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Geissmann, F.; Revy, P.; Regnault, A.; Lepelletier, Y.; Dy, M.; Brousse, N.; Amigorena, S.; Hermine, O.; Durandy, A. TGF-Beta 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 4567-4575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Takeuchi, M.; Alard, P.; Streilein, J.W. TGF-Beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1589-1597. [\[CrossRef\]](#)
25. Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage Polarization: Tumor-assoziierte Makrophagen als Paradigma für polarisierte mononukleäre Phagozyten M2. *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 549-555. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Angioni, R.; Sánchez-Rodríguez, R.; Viola, A.; Molon, B. TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13*, 401. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Lai, Y.-J.; Chao, C.-H.; Liao, C.-C.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Chou, W.-C.; Wang, J.; Huang, H.-C.; Chang, S.-J.; Lin, Y.-L.; et al. Die durch SARS-CoV-2 induzierte epithelial-mesenchymale Transition erfordert eine transkriptionelle Hochregulierung von Snail. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 2278-2290.
28. Huang, H.-C.; Liao, C.-C.; Wang, S.-H.; Lee, I.-J.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Kuo, C.-T.; Wang, J.; Hsieh, W.-C.; Chang, S.-J.; et al. Hyperglykosylierter Spike der SARS-CoV-2-Gamma-Variante induziert Brustkrebsmetastasen. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 4994-5005.
29. Nunez-Castilla, J.; Stebliankin, V.; Baral, P.; Balbin, C.A.; Sobhan, M.; Cickovski, T.; Mondal, A.M.; Narasimhan, G.; Chapagain, P.; Mathee, K.; et al. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14*, 1415. [\[CrossRef\]](#)
30. Dotan, A.; Kanduc, D.; Muller, S.; Makatsariya, A.; Shoenfeld, Y. Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 and the Female Reproductive System. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2021**, *86*, e13494. [\[CrossRef\]](#)
31. Xu, W.; Wen, X.; Cong, X.; Jiang, W. COVID-19 mRNA Vaccine, but not a Viral Vector-Based Vaccine, Promotes Neutralizing Anti-Type I Interferon Autoantibody Production in a Small Group of Healthy Individuals. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, e29137. [\[CrossRef\]](#)
32. Murphy, W.J.; Longo, D.L. A Possible Role for Anti-Idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 394-396. [\[CrossRef\]](#)
33. Arlt, F.A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; et al. High Serum Prevalence of Autoreactive IgG Antibodies against Peripheral Nerve Structures in Patients with Neurological Post-COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1404800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Bellucci, M.; Bozzano, F.M.; Castellano, C.; Pesce, G.; Beronio, A.; Farshchi, A.H.; Limongelli, A.; Uccelli, A.; Benedetti, L.; De Maria, A. Post-SARS-CoV-2-Infektion und postimpfungsbedingte neurologische Komplikationen weisen die gleichen klinischen Merkmale und die gleiche Positivität für Anti-ACE2-Antikörper auf. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1398028. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. 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.; et al. N1-Methylpseudouridylation of mRNA Causes +1 Ribosomal Frameshifting. *Nature* **2024**, *625*, 189-194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tang, J.; Zeng, C.; Cox, T.M.; Li, C.; Son, Y.M.; Cheon, I.S.; Wu, Y.; Behl, S.; Taylor, J.J.; Chakarabarty, R.; et al. Respiratory Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 after mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eadd4853. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Mitsi, E.; Diniz, M.O.; Reiné, J.; Collins, A.M.; Robinson, R.E.; Hyder-Wright, A.; Farrar, M.; Liatsikos, K.; Hamilton, J.; Onyema, O.; et al. Respiratory Mucosal Immune Memory to SARS-CoV-2 after Infection and Vaccination. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 6815. [\[CrossRef\]](#)
38. Sun, B.; Wang, Q.; Zheng, P.; Niu, X.; Feng, Y.; Guan, W.; Chen, S.; Li, J.; Cui, T.; Deng, Y.; et al. An Intranasally Administered Adenovirus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Mucosal Secretory IgA. *JCI Insight* **2024**, *9*, e180784. [\[CrossRef\]](#)

39. Ma, B.; Tao, M.; Li, Z.; Zheng, Q.; Wu, H.; Chen, P. Mucosal Vaccines for Viral Diseases: Status und Aussichten. *Virologie* **2024**, *593*, 110026. [\[CrossRef\]](#)
40. Rathore, A.P.S.; St. John, A.L. Promises and Challenges of Mucosal COVID-19 Vaccines. *Vaccine* **2023**, *41*, 4042–4049. [\[CrossRef\]](#)
41. Allie, S.R.; Bradley, J.E.; Mudunuru, U.; Schultz, M.D.; Graf, B.A.; Lund, F.E.; Randall, T.D. The Establishment of Resident Memory B Cells in the Lung Requires Local Antigen Encounter. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 97–108. [\[CrossRef\]](#)
42. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M.M.; Bishop, E.; et al. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 917–924. [\[CrossRef\]](#)
43. Tang, Y.; Boribong, B.P.; Swank, Z.N.; Demokritou, M.; Luban, M.A.F.; Fasano, A.; Du, M.; Wolf, R.L.; Griffiths, J.; Shultz, J.; et al. COVID-19 mRNA Vaccines Induce Robust Levels of IgG but Limited Amounts of IgA within the Oronasopharynx of Young Children. *J. Infect. Dis.* **2024**, *jiae450*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; et al. Immunogenicity and Safety of a Booster Dose of a Self-Amplifying RNA COVID-19 Vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: Eine doppelblinde, multizentrische, randomisierte, kontrollierte, nicht unterlegene Phase-3-Studie. *Lancet Infect. Dis.* **2024**, *24*, 351–360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Dolgin, E. Selbstkopierender RNA-Impfstoff erhält erste vollständige Zulassung: Was kommt als Nächstes? *Natur* **2023**, *624*, 236–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Uversky, V.N.; Redwan, E.M.; Makis, W.; Rubio-Casillas, A. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines* **2023**, *11*, 991. [\[CrossRef\]](#)
47. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytopil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; et al. Class Switch towards Noninflammatory, Spike-Specific IgG4 Antibodies after Repeated SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Sci. Immunol.* **2023**, *8*, eade2798. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhu, F.; Huang, S.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhuang, C.; Zhao, H.; Han, J.; Jaen, A.M.; Do, T.H.; Peter, J.G.; et al. Safety and Efficacy of the Intranasal Spray SARS-CoV-2 Vaccine dNS1-RBD: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Respir. Med.* **2023**, *11*, 1075–1088. [\[CrossRef\]](#)

Haftungsausschluss/Hinweis des Herausgebers: Die in allen Veröffentlichungen enthaltenen Aussagen, Meinungen und Daten sind ausschließlich die des/der jeweiligen Autors/Autoren und Mitwirkenden und nicht die von MDPI und/oder dem/den Herausgeber(n). MDPI und/oder der/die Herausgeber lehnen jede Verantwortung für Personen- oder Sachschäden ab, die sich aus Ideen, Methoden, Anweisungen oder Produkten ergeben, auf die im Inhalt Bezug genommen wird.

Gli effetti collaterali associati alla potente attività dei vaccini COVID-19 a mRNA possono essere superati dai vaccini mucosali

Maurizio Federico

National Center for Global Health, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; maurizio.federico@iss.it

Riassunto: L'azione dei vaccini basati su mRNA richiede l'espressione dell'antigene nelle cellule che internalizzano le nanoparticelle lipidiche-mRNA. Quando l'antigene del vaccino non è completamente trattenuto dalle cellule produttrici, la sua diffusione locale e sistemica può avere conseguenze a seconda sia dei livelli di espressione dell'antigene che della sua attività biologica. Una peculiarità dei vaccini COVID-19 basati su mRNA è la quantità straordinariamente elevata dell'antigene Spike espresso dalle cellule bersaglio. Inoltre, lo Spike del vaccino può essere rilasciato e legarsi ai recettori cellulari ACE-2, inducendo così risposte di significato patogenetico, tra cui il rilascio di fattori solubili che, a loro volta, possono deregolare processi immunologici chiave. Le risposte immunitarie circolatorie innescate dalla proteina Spike del vaccino sono molto potenti e possono portare al legame degli anticorpi anti-Spike su bersagli molecolari non specifici, nonché all'emergere sia di autoanticorpi sia che di anticorpi anti-idiotipo. In questo articolo vengono discussi gli svantaggi immunologici dell'elevata efficienza di traduzione dell'mRNA associato ai vaccini anti-COVID-19, insieme alle argomentazioni a sostegno dell'idea che la maggior parte di essi possa essere evitata con l'avvento dei vaccini anti-COVID-19 mucosali di nuova generazione.

Keywords: COVID-19 mRNA vaccines; SARS-CoV-2 Spike; mucosal vaccines; ACE-2; autoimmunity

1. Introduzione

I vaccini COVID-19 basati su mRNA sono stati ampiamente distribuiti sia nella loro versione originale che in quelle aggiornate. La tecnologia a mRNA è anche la base di ulteriori vaccini sperimentali e di immunoterapie antitumorali di ultima generazione. Pertanto, appare necessario identificare, monitorare e analizzare in modo approfondito gli eventi inattesi più rilevanti che questa tecnologia può produrre, anche se raramente, negli esseri umani. Diverse caratteristiche distinguono i vaccini COVID-19 basati su mRNA da quelli "tradizionali" basati su virus attenuati/inattivati, subunità proteiche o proteine ricombinanti, e che sono stati così utili per l'eliminazione/contenimento di diverse malattie infettive. In primo luogo, la formulazione del vaccino comprende nanoparticelle lipidiche (LNP) complessate con molecole di mRNA prodotte tramite il processo della trascrizione "in vitro". In secondo luogo, l'immunogeno non fa parte della formulazione del vaccino, ma si prevede che venga sintetizzato dalle cellule che internalizzano i complessi mRNA/LNP. In proposito, questa evidenza giustifica la definizione più appropriata di profarmaco (inteso come una sostanza farmacologicamente inattiva che viene convertita in un farmaco farmacologicamente attivo una volta somministrato) piuttosto che di vaccino [1]. Terzo, l'immunogeno (cioè la proteina virale Spike) viene sintetizzato dalle cellule bersaglio in quantità molto elevate e persiste nel tempo [2]. Quarto, l'immunogeno riconosce, lega e attiva un recettore cellulare di segnalazione diffuso, cioè l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)-2, ed è stabilizzato nella sua conformazione pre-fusione attraverso due mutazioni consecutive

alla prolina nelle posizioni degli aminoacidi 986 e 987, mutazioni che non hanno un impatto negativo sul legame/attivazione dell'ACE-2. Quindi, abbondanza, diffusione, persistenza, attività biologica e stabilità dell'immunogeno sono punti chiave che distinguono i vaccini COVID-19 basati su mRNA. In questo articolo vengono discusse le conseguenze più rilevanti sia della sovrapproduzione dell'antigene Spike dopo la vaccinazione COVID-19 basata su mRNA, che della potente risposta immunitaria circolatoria evocata. Avere un quadro completo di tutte le possibili criticità sarebbe di grande utilità per lo sviluppo di vaccini più sicuri e mirati contro SARS-CoV-2 e altri agenti infettivi aerogeni. Tra questi, i vaccini mucosali meritano grande considerazione data la loro azione alla porta di ingresso del virus e la mancanza di effetti sistemici indesiderati.

2. Livelli elevati e persistenti di Spike circolante dopo la vaccinazione

I complessi mRNA/LNP possono entrare in qualsiasi tipo di cellula. Seppure l'inoculo nel muscolo deltoide favorisce il loro ingresso nelle cellule muscolari, tuttavia, la moderata infiammazione indotta da alcuni componenti lipidici [3] può attrarre cellule presentanti l'antigene (APC) professionali nel sito di iniezione. Le APC possono ingerire le LNP, subire l'attivazione e migrare verso i linfonodi [4]. Inoltre, quantità non quantificabili di complessi mRNA/LNP iniettati sfuggono all'internalizzazione cellulare nel sito di inoculo, entrando così in circolazione. Consistentemente, studi di biodistribuzione condotti da un produttore di vaccini mRNA COVID-19 hanno evidenziato la potenziale diffusione delle LNP iniettate per via intramuscolare in praticamente tutti i tessuti [5].

Sia l'mRNA che lo Spike del vaccino persistono nel corpo per lungo tempo dopo la vaccinazione. Uno studio condotto su campioni autoptici di pazienti dopo la vaccinazione contro il COVID-19 ha dimostrato la persistenza dell'mRNA del vaccino nei linfonodi ascellari bilaterali fino a 30 giorni dopo la vaccinazione [6]. Inoltre, l'mRNA del vaccino è stato trovato anche in entrambi i ventricoli cardiaci fino a 20 giorni dopo le iniezioni, e la sua presenza era correlata a lesioni miocardiche associate a un numero anormalmente elevato di macrofagi miocardici. In un altro studio, l'mRNA del vaccino è stato trovato fino a 60 giorni dopo la seconda dose in biopsie di linfonodi ascellari isolaterali [2].

Parte della Spike espressa a livello intracellulare rimane esposta sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio nella sua forma trimérica, mentre una frazione consistente di essa può essere rilasciata e circolare. Una quantità media di 47 pg/mL di Spike libera è stata misurata nel plasma dei vaccinati 1-2 giorni dopo l'iniezione, con picchi di 174 pg/mL [2]. Questi livelli di Spike nel plasma appaiono sorprendentemente elevati, essendo, ad esempio, paragonabili alle concentrazioni di citochine infiammatorie rilevate nei soggetti con infiammazione sistemica acuta [7]. Questa evidenza è di particolare rilevanza data l'elevata affinità di Spike per ACE-2, cioè un recettore cellulare diffuso coinvolto in diversi processi fisiologici chiave.

3. ACE-2: funzioni, distribuzione e attivazione cellulare a seguito del legame con Spike

ACE-2 è una proteina transmembranaria di tipo I composta da 805 aminoacidi con una regione N-terminale extracellulare glicosilata contenente il dominio carbossipeptidasi la cui funzione è quella di rimuovere singoli aminoacidi dall'estremità C-terminale dei suoi substrati. ACE-2 è un regolatore chiave del sistema renina-angiotensina-aldosterone che controlla la pressione sanguigna. Catalizza la conversione dell'angiotensina I, un decapeptide, in angiotensina 1-9, che può essere convertita in peptidi di angiotensina vasodilatatori più piccoli (ad esempio, angiotensina 1-7) dall'ACE nei polmoni. ACE-2 lega anche l'angiotensina II, ovvero un octapeptide generato dalla scissione dell'angiotensina I catalizzata dall'ACE, per produrre l'angiotensina vasodilatatrice 1-7.

L'ACE-2 è anche coinvolto nella produzione di bradichinine, ovvero un gruppo di peptidi con potenti effetti vasodilatatori [8].

L'ACE-2 è espresso da un'ampia varietà di cellule, tra cui enterociti, cardiomiociti, tubuli renali, vasi e cellule duttali. Al contrario, l'espressione dell'ACE-2 nei tessuti respiratori è limitata a un piccolo numero di tipi di cellule specializzate, ovvero cellule alveolari di tipo II e macrofagi alveolari [9].

L'interazione tra ACE-2 e angiotensina II induce vari segnali di attivazione che portano al rilascio di diverse citochine, tra cui IL-6, TNF- α e TGF- β [10]. In questo quadro, va segnalato che gli effetti dell'interazione di ACE-2 con Spike ricapitolano quelli descritti per il legame con i suoi ligandi naturali [11]. In particolare, nelle cellule endoteliali vascolari, la Spike naturale genera un blocco delle funzioni mitocondriali [12] stimolando la attivazione cellulare dipendente dall'integrina $\alpha 5 \beta 1$ che porta alla traslocazione nucleare di NF- κ B. Questi eventi inducono infine l'espressione di VCAM-1, ICAM-1, di fattori di coagulazione e il rilascio di citochine infiammatorie TNF α , IL-1 β e IL-6 [13]. Meccanismi di attivazione simili sono stati segnalati sia per i macrofagi che per le cellule dendritiche [14,15]. È importante notare che la Spike naturale induce sia nelle cellule epiteliali che in quelle endoteliali il rilascio della citochina multifunzionale TGF- β [16].

4. L'asse SARS-CoV-2 Spike/ACE-2/TGF- β nella sorveglianza immunitaria antitumorale e nella transizione epiteliale-mesenchimale

Il legame di Spike con ACE-2 produce profonde alterazioni nella segnalazione intracellulare con l'attivazione di fattori di trascrizione e il rilascio di diversi fattori solubili. In particolare, è stato scoperto che le cellule endoteliali vascolari umane trattate con Spike rilasciano sia TGF- $\beta 1$ che TGF- $\beta 2$ [17], in linea con precedenti prove "in vivo" che suggeriscono un ruolo chiave di TGF- β nella patogenesi del COVID-19 [18, 19].

TGF- β , con le sue tre isoforme, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, è un regolatore chiave della risposta immunitaria adattativa [20], agendo, ad esempio, come inibitore dell'attività di presentazione dell'antigene nelle cellule dendritiche (DC) attraverso la internalizzazione e degradazione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [21, 22] (Fig. 1). TGF- β riduce anche l'espressione di IL-12 e di molecole co-stimolatorie come CD40 nei macrofagi e CD80, CD83 e CD86 nelle DC, come parte dei meccanismi regolatori dell'attivazione delle cellule immunitarie mediata da APC [23, 24].

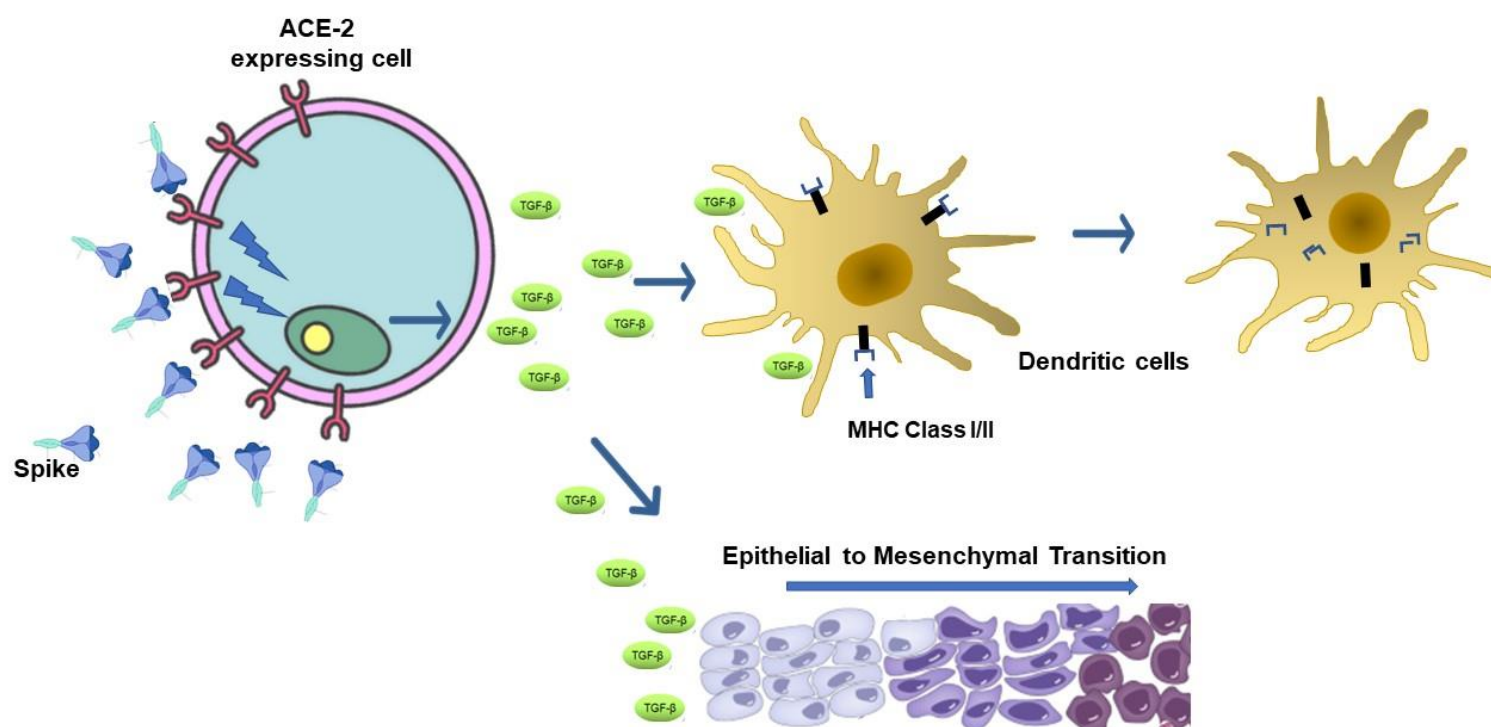


Figura 1. Effetti “bystander” del legame Spike/ACE-2. La proteina Spike di SARS-CoV-2 lega le cellule che esprimono ACE-2, inducendo così la segnalazione intracellulare che porta al rilascio di fattori solubili. Tra questi, è noto che il TGF- β riduce l'attività di presentazione dell'antigene nelle APC tramite la riduzione della MHC di classe I/II. Il TGF- β è anche un importante motore della transizione epitelio-mesenchimale che è alla base dello sviluppo sia di tumori solidi che di metastasi.

Il TGF- β può anche interferire con i meccanismi di sorveglianza immunitaria che controllano la crescita delle cellule tumorali. Ad esempio, il TGF- β può indurre la polarizzazione dei macrofagi da M1 (forma caratterizzata dal rilascio di citochine infiammatorie come IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-18) a macrofagi M2, cellule che secernono citochine antinfiammatorie come IL-1ra e IL-10 e caratterizzate da molteplici proprietà immunosoppressive nel microambiente tumorale [25]. D'altra parte, il TGF- β è un importante motore della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) [26] che è la base dello sviluppo sia di tumori solidi che di metastasi. In questo scenario, risultati coerenti dal lavoro sperimentale di due gruppi di ricerca hanno sollevato l'ipotesi che la Spike naturale possa contribuire all'EMT (Fig. 1). In dettaglio, Lai e coll. hanno fornito prove che la attivazione cellulare correlata a TGF- β è parte del meccanismo alla base dell'acquisizione di un fenotipo mesenchimale delle cellule di cancro al seno umano che esprimono Spike. Ancora più importante, hanno dimostrato che il numero di metastasi polmonari nei topi inoculati con cellule di cancro al seno 4T1 che esprimono Spike è aumentato rispetto a quello indotto dalle cellule parentali [27, 28]. Ciszewski e coll. hanno osservato che il trattamento con Spike ricombinante sia di HUVEC che di cellule endoteliali umane HMEC-1 induce il rilascio di TGF- β associato alla trans-differenziazione (EMT) cellulare. Indagandone il meccanismo d'azione, hanno dimostrato il coinvolgimento dell'asse ACE-

2/TGF- β /MRTF (fattore di trascrizione correlato alla miocardina)- β nell'EMT osservato. Infine, il contributo del TGF- β nell'EMT correlato a Spike è stato ulteriormente corroborato dalla dimostrazione che le cellule endoteliali umane trattate con Spike non sono riuscite a transdifferenziarsi, e quindi a divenire tumorali, in presenza di anticorpi anti-TGF- β [17].

I risultati di questi studi sollevano la questione se Spike possa contribuire all'EMT negli esseri umani. Anche se finora non sono disponibili dati clinici che descrivano eventi associati a queste risposte immunitarie patologiche, le potenziali implicazioni in termini di sicurezza dei vaccini COVID-19 sembrano evidenti anche considerando il fatto che gli mRNA/LNP possono entrare in qualsiasi tipo di cellula. Ad esempio, l'ingresso indesiderato di complessi mRNA/LNP in cellule tumorali già formate può riprodurre le condizioni descritte da Lai e coll., rappresentando quindi un pericolo in termini di formazione di metastasi. D'altro canto, gli effetti patogenetici bystander possono essere indotti attraverso la produzione locale di alte concentrazioni di Spike da parte di cellule normali che internalizzano gli mRNA/LNP e situate nelle vicinanze delle cellule tumorali, come descritto da Ciszewski e coll. Per queste ragioni, l'estensione degli studi ad altri sistemi cellulari nonché ad appropriati modelli "in vivo" sembra necessaria considerando la possibilità che i complessi mRNA/LNP circolino nel corpo dopo la vaccinazione.

5. Immunità aspecifica indotta dal vaccino mRNA COVID-19: legame non specifico degli anticorpi anti-Spike, induzione di autoanticorpi, di anticorpi anti-idiotipo e produzione di proteine non identificate

Gli alti livelli di proteina Spike prodotti dopo l'inoculo dei vaccini COVID-19 a mRNA sono associati a una risposta immunitaria circolatoria straordinariamente potente, con la produzione di alti titoli di anticorpi anti-Spike. Da un lato, questo risultato può essere considerato un vantaggio in termini di protezione antivirale; dall'altro, tuttavia, una così potente immunogenicità può essere associata a rilevanti effetti indesiderati che in genere emergono in presenza di stimoli antigenici elevati e persistenti. Tra gli effetti indesiderati va considerato il legame aspecifico degli anticorpi anti-Spike che possono reagire con molecole fisiologicamente espresse dall'organismo inducendo processi patologici. Inoltre, va considerato l'emergere di autoanticorpi e la generazione di anticorpi anti-idiotipo. Questi eventi sono stati correlati con la manifestazione nei vaccinati di patologie come trombocitopenia, miocardite, vari disturbi del ciclo mestruale, ricomparsa di infezioni latenti e sindrome post-vaccino COVID (PCVS).

Gli anticorpi anti-Spike che reagiscono in modo aspecifico legano bersagli eterologhi attraverso il meccanismo del mimetismo molecolare. Gli effetti patogenetici possono essere prodotti quando quantità sufficienti di essi si legano a target molecolari aspecifici che sono parte di processi biologici rilevanti. Attraverso l'analisi computazionale studiata del mimetismo molecolare tra Spike ed epitopi di proteine umane, è stato riportato che Spike condivide motivi lineari immunogenici con, tra gli altri, la trombopoietina (TQPLL) e la tropomiosina alfa-3 (ELDKY) [29]. Questi risultati sembrano rilevanti poiché il primo è un fattore di crescita chiave necessario per la differenziazione megacariocitaria e la produzione piastrinica, e il secondo è un componente strutturale dei cardiomiociti. In un altro studio, è stato riportato che Spike condivide 41 determinanti immunitari con 27 proteine umane specifiche per il sistema riproduttivo femminile relative all'oogenesi, alla ricettività uterina, alla decidualizzazione e alla placentazione [30]. Studi clinici hanno fornito prove che l'inoculo di vaccini mRNA COVID-19 può essere associato alla produzione di autoanticorpi, ovvero anticorpi non anti-Spike che riconoscono autoantigeni (proteine normalmente espresse dal corpo umano), come possibile conseguenza di uno squilibrio

immunitario generale. Ad esempio, Xu e coll. [31] hanno trovato anticorpi neutralizzanti anti-interferone di tipo I nel 10% degli individui sani vaccinati, sebbene gli studi siano stati completati con una dimensione del campione limitata. In un altro studio, è stato riscontrato che il 18% dei pazienti che sviluppano PCVS produce autoanticorpi contro le subunità dei neurofilamenti [32]. Anche se in alcuni casi gli autoanticorpi possono essere non reattivi, non è ancora chiaro se la vaccinazione riattivi un'autoimmunità latente preesistente o induca una generazione "de novo" di autoanticorpi. Il mimetismo molecolare è anche alla base degli effetti degli anticorpi anti-idiotipo (Fig. 2)

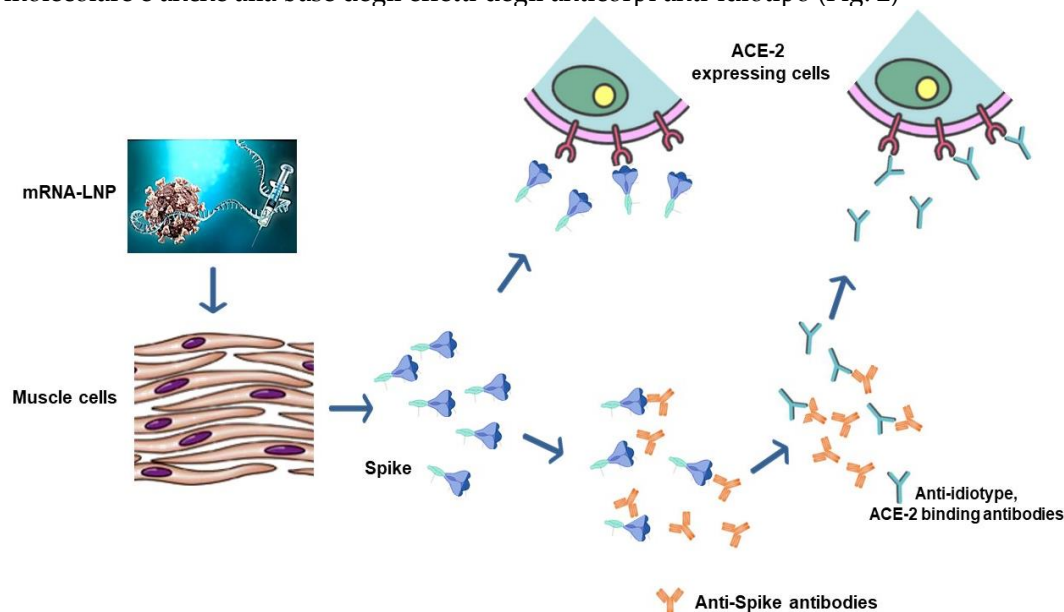


Figura 2. Generazione di anticorpi anti-idiotipo dopo la vaccinazione COVID-19. Il sistema immunitario può generare anticorpi contro le sequenze di anticorpi anti-Spike che riconoscono il dominio Spike che lega il recettore ACE-2 (receptor-binding domain, RBD). Attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare, questi anticorpi (anticorpi anti-idiotipo) possono legare ACE-2 proprio come la Spike immunogenico.

Nel caso in cui l'immunogeno sia un antigene che si lega a un partner molecolare, il sistema immunitario può reagire contro le sequenze all'interno degli anticorpi anti-antigene indotti che riconoscono la regione dell'antigene che lega il suo partner, ad esempio, nel caso di Spike, il dominio di legame del recettore (RBD). In generale, in condizioni fisiologiche, questo meccanismo contribuisce al controllo della produzione di anticorpi antigene-specifici. Tuttavia, in presenza di quantità eccessive di anticorpi antigene-specifici, come nel caso della vaccinazione anti-COVID-19 basata su mRNA, la conseguente iper-produzione di anticorpi anti-idiotipo può portare a effetti che imitano quelli indotti dal legame di Spike con ACE-2 [33]. Per esempio, Bellucci e coll. hanno recentemente dimostrato effetti collaterali associati alla produzione di anticorpi anti-idiotipo leganti ACE-2. In particolare, questi ricercatori hanno segnalato complicazioni cliniche neurologiche tra cui radicolite, mielite e sindrome di Guillain-Barré in soggetti infetti e non infetti da SARS-CoV-2 iniettati con vaccini COVID-19 basati su mRNA e che sviluppano autoanticorpi anti-ACE-2 [34]. Purtroppo, sia gli autoanticorpi che gli anticorpi anti-idiotipo possono persistere ben oltre la durata della risposta immunitaria anti-Spike.

La recente scoperta che l'incorporazione di N1-metil-pseudouridina in luogo del residuo di uridina naturale nella struttura portante dell'mRNA associato al vaccino può indurre uno spostamento di lettura ribosomiale +1, producendo così prodotti proteici ignoti, ha aggiunto un altro livello di complessità in termini di risposta immunitaria indotta dal vaccino. È stato stimato che circa l'8% dei prodotti tradotti totali dall'mRNA sintetico che incorpora N1-metil-pseudouridina rappresenti proteine sconosciute che,

cosa di fondamentale importanza, sono immunogeniche negli esseri umani [35]. Il potenziale autoimmune dei prodotti proteici aberranti generati in questo modo rappresenta un altro punto che deve essere ulteriormente approfondito.

6. Vaccini mucosali: un'alternativa potenzialmente priva di effetti collaterali sistemici

Il campo di battaglia dell'infezione da SARS-CoV-2 è il sistema respiratorio, dove il vaccino COVID-19 ideale dovrebbe sviluppare la sua forza immunologica e antivirale più efficace. I dati clinici riportati con gli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA supportano l'idea che la forte risposta immunitaria circolatoria indotta sia associata a un'immunità antivirale troppo limitata nei distretti respiratori [36].

Analogamente a quanto dimostrato con l'infezione naturale [37], i vaccini mucosali hanno la capacità di indurre risposte immunitarie efficaci nel compartimento respiratorio attraverso la produzione sia di IgA dimeriche/secretorie neutralizzanti nel distretto oronasofaringeo [38], sia di linfociti antivirali CD8+ T di memoria nel tratto respiratorio inferiore [39]. In questo modo, i vaccini mucosali possono avere l'incomparabile vantaggio di bloccare la catena di trasmissione del SARS-COV-2 e di altri virus trasmessi per via aerea.

Attualmente, sono stati approvati due vaccini mucosali COVID-19 e altri sono in sperimentazione clinica [40]. Da notare che, in nessun caso, ci si aspetta che questi vaccini inducano risposte immunitarie sistemiche robuste come quelle osservate con gli attuali vaccini COVID-19. Tuttavia, un'immunizzazione sistemica subottimale/debole non dovrebbe essere considerata uno svantaggio funzionalmente rilevante considerando la compartimentazione del sistema immunitario respiratorio [41] che limita l'accesso di anticorpi IgG neutralizzanti e cellule immunitarie antivirali dal distretto circolatorio. Al contrario, può rappresentare un vantaggio in termini di forte riduzione degli effetti sistemici immunologici indotti dai vaccini COVID-19 basati su mRNA inoculati intramuscolarmente.

7. Conclusioni

Diverse evidenze sperimentali supportano l'idea che la proteina Spike venga prodotta in abbondanza e persista in circolo e nei linfonodi dopo la vaccinazione mRNA COVID-19. Gli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA riconoscono una serie di limitazioni rilevanti, tra cui il rapido declino della risposta immunitaria, l'incapacità di montare una risposta immunitaria efficace al punto di ingresso del virus, e la ridotta efficacia delle formulazioni aggiornate a causa del fenomeno del "peccato antigenico originale" [42, 43]. D'altro canto, la potente traduzione di mRNA associata alla sovrapproduzione di Spike può portare a una deregolazione della segnalazione intracellulare ACE-2-dipendente e della produzione di citochine, al legame aspecifico di anticorpi contro bersagli molecolari fisiologici, all'emersione di anticorpi anti-idiotipo e autoanticorpi e a risposte immunitarie contro prodotti proteici sconosciuti. Inoltre, le citochine prodotte dopo il legame Spike/ACE-2 possono influenzare sfavorevolmente il destino di tumori ancora "dormienti", di patologie autoimmuni preesistenti e infiammazioni croniche. Per queste ragioni, l'attuale indicazione dei vaccini mRNA COVID-19 per la popolazione "fragile" dovrebbe essere attentamente rivalutata alla luce della tipologia di ogni specifica fragilità. Nonostante la notevole efficienza della produzione di Spike a seguito della vaccinazione con mRNA/LNP, sorprendentemente sono stati sviluppati tentativi di migliorare le prestazioni di questi vaccini COVID-19 basati su mRNA nella direzione di rafforzare ancora la produzione di Spike attraverso l'inoculo di vettori basati su mRNA autoreplicanti [44]. In particolare, il Ministero della Salute giapponese ha recentemente approvato una sperimentazione clinica per testare la sicurezza e l'efficacia di un vaccino COVID-19 basato su questa tecnologia [45]. Questa scelta sembra essere veramente discutibile date le criticità sopra descritte indotte dalla

produzione eccessiva e dalla persistenza di Spike circolatorio dettate dagli attuali vaccini COVID-19 basati su mRNA. In questo scenario, si prevede che l'aumento delle quantità e della persistenza di Spike circolante esacerberà gli effetti collaterali sia cellulari che immunologici, tuttavia senza agire sul limite funzionale più rilevante di questi vaccini, ovvero la loro incapacità di suscitare un'immunità neutralizzante nelle vie respiratorie a causa della compartimentazione immunitaria del sistema respiratorio. Inoltre, è noto che uno stimolo immunogenico troppo potente e persistente induce tolleranza immunologica, come riportato in un paio di articoli per gli attuali vaccini COVID-19 [46, 47].

Al contrario, una strada più plausibile da percorrere è rappresentata dallo sviluppo di vaccini mucosali [48] data la loro capacità di agire alla porta di ingresso del virus e di evitare la maggior parte degli effetti collaterali sistemici osservati nei vaccini mRNA COVID-19 iniettati per via intramuscolare.

La tecnologia basata su mRNA attualmente attira l'interesse di molti scienziati in tutto il mondo. Nel caso dei vaccini anti-COVID-19, sembra più che ragionevole che una adeguata quantità di indagini debba essere focalizzata sull'identificazione e l'analisi di eventi inattesi, con l'intento di rendere questa strategia profilattica più sicura e commisurata all'uso su un gran numero di persone sane.

Funding: This work was supported by the RiPrEI grant, n. Rip1, from Ministry of Health, Rome, Italy.

Institutional Review Board Statement: not applicable.

Informed Consent Statement: not applicable.

Data Availability Statement: no new data are created.

Acknowledgments: I thank Rosangela Duranti and Federica Magnani for their secretarial assistance.

Conflicts of Interest: The author declares no conflict of interest.

References

1. Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (18), 10881. <https://doi.org/10.3390/ijms231810881>.
2. Röltgen, K.; Nielsen, S. C. A.; Silva, O.; Younes, S. F.; Zaslavsky, M.; Costales, C.; Yang, F.; Wirz, O. F.; Solis, D.; Hoh, R. A.; Wang, A.; Arunachalam, P. S.; Colburg, D.; Zhao, S.; Haraguchi, E.; Lee, A. S.; Shah, M. M.; Manohar, M.; Chang, I.; Gao, F.; Mallajosyula, V.; Li, C.; Liu, J.; Shoura, M. J.; Sindher, S. B.; Parsons, E.; Dashdorj, N. J.; Dashdorj, N. D.; Monroe, R.; Serrano, G. E.; Beach, T. G.; Chinthrajah, R. S.; Charville, G. W.; Wilbur, J. L.; Wohlstadter, J. N.; Davis, M. M.; Pulendran, B.; Troxell, M. L.; Sigal, G. B.; Natkunam, Y.; Pinsky, B. A.; Nadeau, K. C.; Boyd, S. D. Immune Imprinting, Breadth of Variant Recognition, and Germinal Center Response in Human SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *Cell* **2022**, *185* (6), 1025–1040.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018>.
3. Moghimi, S. M.; Simberg, D. Pro-Inflammatory Concerns with Lipid Nanoparticles. *Mol Ther* **2022**, *30* (6), 2109–2110. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.04.011>.
4. Lindsay, K. E.; Bhosle, S. M.; Zurla, C.; Beyersdorf, J.; Rogers, K. A.; Vanover, D.; Xiao, P.; Araínga, M.; Shirreff, L. M.; Pitard, B.; Baumhof, P.; Villinger, F.; Santangelo, P. J. Visualization of Early Events in mRNA Vaccine Delivery in Non-Human Primates via PET-CT and near-Infrared Imaging. *Nat Biomed Eng* **2019**, *3* (5), 371–380. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0378-3>.
5. 2021. EMA. 2020a. Assessment report Comirnaty Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside modified). https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
6. Krauson, A. J.; Casimero, F. V. C.; Siddiquee, Z.; Stone, J. R. Duration of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Persistence and Factors Associated with Cardiac Involvement in Recently Vaccinated Patients. *NPJ Vaccines* **2023**, *8* (1), 141. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00742-7>.
7. Wong, C. K.; Lam, C. W. K.; Wu, A. K. L.; Ip, W. K.; Lee, N. L. S.; Chan, I. H. S.; Lit, L. C. W.; Hui, D. S. C.; Chan, M. H. M.; Chung, S. S. C.; Sung, J. J. Y. Plasma Inflammatory Cytokines and Chemokines in Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin Exp Immunol* **2004**, *136* (1), 95–103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>.

8. Kuba, K.; Yamaguchi, T.; Penninger, J. M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Pathogenesis of ARDS in COVID-19. *Front Immunol* **2021**, *12*, 732690. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732690>.
9. Hikmet, F.; Méar, L.; Edvinsson, Å.; Mücke, P.; Uhlén, M.; Lindskog, C. The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. *Mol Syst Biol* **2020**, *16* (7), e9610. <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>.
10. Santos, R. A. S.; Sampaio, W. O.; Alzamora, A. C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M. J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* **2018**, *98* (1), 505–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>.
11. Ni, W.; Yang, X.; Yang, D.; Bao, J.; Li, R.; Xiao, Y.; Hou, C.; Wang, H.; Liu, J.; Yang, D.; Xu, Y.; Cao, Z.; Gao, Z. Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care* **2020**, *24* (1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>.
12. Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C. R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; Shadel, G. S.; Hepokoski, M.; Lei, T.; Wang, H.; Zhang, J.; Yuan, J. X.-J.; Malhotra, A.; Manor, U.; Wang, S.; Yuan, Z.-Y.; Shyy, J. Y.-J. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circulation Research* **2021**, *128* (9), 1323–1326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318902>.
13. Robles, J. P.; Zamora, M.; Adan-Castro, E.; Siqueiros-Marquez, L.; Escalera, G. M. de la; Clapp, C. The Spike Protein of SARS-CoV-2 Induces Endothelial Inflammation through Integrin A5β1 and NF-KB Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, *298* (3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101695>.
14. Barhoumi, T.; Alghanem, B.; Shaibah, H.; Mansour, F. A.; Alamri, H. S.; Akiel, M. A.; Alroqi, F.; Boudjelal, M. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). *Front Immunol* **2021**, *12*, 728896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728896>.
15. Winheim, E.; Rinke, L.; Lutz, K.; Reischer, A.; Leutbecher, A.; Wolfram, L.; Rausch, L.; Kranich, J.; Wratil, P. R.; Huber, J. E.; Baumjohann, D.; Rothenfusser, S.; Schubert, B.; Hilgendorff, A.; Hellmuth, J. C.; Scherer, C.; Muenchhoff, M.; von Bergwelt-Baildon, M.; Stark, K.; Straub, T.; Bocker, T.; Keppler, O. T.; Subklewe, M.; Krug, A. B. Impaired Function and Delayed Regeneration of Dendritic Cells in COVID-19. *PLoS Pathog* **2021**, *17* (10), e1009742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009742>.
16. Gracie, N. P.; Lai, L. Y. S.; Newsome, T. P. Cellular Signalling by SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microbiol. Aust.* **2024**, *45* (1), 13–17. <https://doi.org/10.1071/MA24005>.
17. Ciszewski, W. M.; Woźniak, L. A.; Sobierajska, K. Diverse Roles of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins in EndMT Stimulation through the TGF-β-MRTF Axis Inhibited by Aspirin. *Cell Commun Signal* **2024**, *22* (1), 296. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01665-z>.
18. Biering, S. B.; Gomes de Sousa, F. T.; Tjang, L. V.; Pahmeier, F.; Zhu, C.; Ruan, R.; Blanc, S. F.; Patel, T. S.; Worthington, C. M.; Glasner, D. R.; Castillo-Rojas, B.; Servellita, V.; Lo, N. T. N.; Wong, M. P.; Warnes, C. M.; Sandoval, D. R.; Clausen, T. M.; Santos, Y. A.; Fox, D. M.; Ortega, V.; Näär, A. M.; Baric, R. S.; Stanley, S. A.; Aguilar, H. C.; Esko, J. D.; Chiu, C. Y.; Pak, J. E.; Beatty, P. R.; Harris, E. SARS-CoV-2 Spike Triggers Barrier Dysfunction and Vascular Leak via Integrins and TGF-β Signaling. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 7630. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34910-5>.
19. Carvacho, I.; Piesche, M. RGD-Binding Integrins and TGF-β in SARS-CoV-2 Infections - Novel Targets to Treat COVID-19 Patients? *Clin Transl Immunology* **2021**, *10* (3), e1240. <https://doi.org/10.1002/cti2.1240>.
20. Deng, Z.; Fan, T.; Xiao, C.; Tian, H.; Zheng, Y.; Li, C.; He, J. TGF-β Signaling in Health, Disease, and Therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* **2024**, *9* (1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>.
21. Battle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50* (4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.
22. Nandan, D.; Reiner, N. E. TGF-Beta Attenuates the Class II Transactivator and Reveals an Accessory Pathway of IFN-Gamma Action. *J Immunol* **1997**, *158* (3), 1095–1101.
23. Geissmann, F.; Revy, P.; Regnault, A.; Lepelletier, Y.; Dy, M.; Brousse, N.; Amigorena, S.; Hermine, O.; Durandy, A. TGF-Beta 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J Immunol* **1999**, *162* (8), 4567–4575.
24. Takeuchi, M.; Alard, P.; Streilein, J. W. TGF-Beta Promotes Immune Deviation by Altering Accessory Signals of Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* **1998**, *160* (4), 1589–1597.
25. Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends Immunol* **2002**, *23* (11), 549–555. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02302-5).
26. Angioni, R.; Sánchez-Rodríguez, R.; Viola, A.; Molon, B. TGF-β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13* (3), 401. <https://doi.org/10.3390/cancers13030401>.
27. Lai, Y.-J.; Chao, C.-H.; Liao, C.-C.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Chou, W.-C.; Wang, J.; Huang, H.-C.; Chang, S.-J.; Lin, Y.-L.; Li, C.-W. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by SARS-CoV-2 Required Transcriptional Upregulation of Snail. *Am J Cancer Res* **2021**, *11* (5), 2278–2290.
28. Huang, H.-C.; Liao, C.-C.; Wang, S.-H.; Lee, I.-J.; Lee, T.-A.; Hsu, J.-M.; Kuo, C.-T.; Wang, J.; Hsieh, W.-C.; Chang, S.-J.; Chen, S.-Y.; Tao, M.-H.; Lin, Y.-L.; Lai, Y.-J.; Li, C.-W. Hyperglycosylated Spike of SARS-CoV-2 Gamma Variant Induces Breast Cancer Metastasis. *Am J Cancer Res* **2021**, *11* (10), 4994–5005.
29. Nunez-Castilla, J.; Stebliankin, V.; Baral, P.; Balbin, C. A.; Sobhan, M.; Cickovski, T.; Mondal, A. M.; Narasimhan, G.; Chapagain, P.; Mathee, K.; Silberg-Liberles, J. Potential Autoimmunity Resulting from Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 Spike and Human Proteins. *Viruses* **2022**, *14* (7), 1415. <https://doi.org/10.3390/v14071415>.

30. Dotan, A.; Kanduc, D.; Muller, S.; Makatsariya, A.; Shoenfeld, Y. Molecular Mimicry between SARS-CoV-2 and the Female Reproductive System. *Am J Reprod Immunol* **2021**, *86* (6), e13494. <https://doi.org/10.1111/aji.13494>.
31. Xu, W.; Wen, X.; Cong, X.; Jiang, W. COVID-19 mRNA Vaccine, but Not a Viral Vector-Based Vaccine, Promotes Neutralizing Anti-Type I Interferon Autoantibody Production in a Small Group of Healthy Individuals. *J Med Virol* **2023**, *95* (10), e29137. <https://doi.org/10.1002/jmv.29137>.
32. Murphy, W. J.; Longo, D. L. A Possible Role for Anti-Idiotypic Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. *N Engl J Med* **2022**, *386* (4), 394–396. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr2113694>.
33. Arlt, F. A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; Endres, M.; Prüss, H.; Franke, C. High Serum Prevalence of Autoreactive IgG Antibodies against Peripheral Nerve Structures in Patients with Neurological Post-COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1404800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1404800>.
34. Bellucci, M.; Bozzano, F. M.; Castellano, C.; Pesce, G.; Beronio, A.; Farshchi, A. H.; Limongelli, A.; Uccelli, A.; Benedetti, L.; De Maria, A. Post-SARS-CoV-2 Infection and Post-Vaccine-Related Neurological Complications Share Clinical Features and the Same Positivity to Anti-ACE2 Antibodies. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1398028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1398028>.
35. Mulroney, 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-Methylpseudouridylation of mRNA Causes +1 Ribosomal Frameshifting. *Nature* **2024**, *625* (7993), 189–194. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>.
36. Tang, J.; Zeng, C.; Cox, T. M.; Li, C.; Son, Y. M.; Cheon, I. S.; Wu, Y.; Behl, S.; Taylor, J. J.; Chakaraborty, R.; Johnson, A. J.; Shiavo, D. N.; Utz, J. P.; Reisenauer, J. S.; Midthun, D. E.; Mullon, J. J.; Edell, E. S.; Alameh, M. G.; Borish, L.; Teague, W. G.; Kaplan, M. H.; Weissman, D.; Kern, R.; Hu, H.; Vassallo, R.; Liu, S.-L.; Sun, J. Respiratory Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 after mRNA Vaccination. *Sci Immunol* **2022**, *7* (76), eadd4853. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4853>.
37. Mitsi, E.; Diniz, M. O.; Reiné, J.; Collins, A. M.; Robinson, R. E.; Hyder-Wright, A.; Farrar, M.; Liatsikos, K.; Hamilton, J.; Onyema, O.; Urban, B. C.; Solórzano, C.; Belij-Rammerstorfer, S.; Sheehan, E.; Lambe, T.; Draper, S. J.; Weiskopf, D.; Sette, A.; Maini, M. K.; Ferreira, D. M. Respiratory Mucosal Immune Memory to SARS-CoV-2 after Infection and Vaccination. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 6815. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42433-w>.
38. Sun, B.; Wang, Q.; Zheng, P.; Niu, X.; Feng, Y.; Guan, W.; Chen, S.; Li, J.; Cui, T.; Deng, Y.; Cheng, Z. J.; Li, Y.; Zhou, X.; Fang, Y.; Wang, W.; Wang, Z.; Chen, L.; Zhong, N. An Intranasally Administered Adenovirus-Vectored SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Mucosal Secretory IgA. *JCI Insight* **2024**, *9* (18), e180784. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.180784>.
39. Ma, B.; Tao, M.; Li, Z.; Zheng, Q.; Wu, H.; Chen, P. Mucosal Vaccines for Viral Diseases: Status and Prospects. *Virology* **2024**, *593*, 110026. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110026>.
40. Rathore, A. P. S.; St. John, A. L. Promises and Challenges of Mucosal COVID-19 Vaccines. *Vaccine* **2023**, *41* (27), 4042–4049. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.013>.
41. Allie, S. R.; Bradley, J. E.; Mudunuru, U.; Schultz, M. D.; Graf, B. A.; Lund, F. E.; Randall, T. D. The Establishment of Resident Memory B Cells in the Lung Requires Local Antigen Encounter. *Nat Immunol* **2019**, *20* (1), 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>.
42. Planas, D.; Bruel, T.; Grzelak, L.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Porrot, F.; Planchais, C.; Buchrieser, J.; Rajah, M. M.; Bishop, E.; Albert, M.; Donati, F.; Prot, M.; Behillil, S.; Enouf, V.; Maquart, M.; Smati-Lafarge, M.; Varon, E.; Schortgen, F.; Yahyaoui, L.; Gonzalez, M.; De Sèze, J.; Péré, H.; Veyer, D.; Sève, A.; Simon-Lorière, E.; Fafi-Kremer, S.; Stefic, K.; Mouquet, H.; Hocqueloux, L.; van der Werf, S.; Prazuck, T.; Schwartz, O. Sensitivity of Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 Variants to Neutralizing Antibodies. *Nat Med* **2021**, *27* (5), 917–924. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>.
43. Tang, Y.; Boribong, B. P.; Swank, Z. N.; Demokritou, M.; Luban, M. A. F.; Fasano, A.; Du, M.; Wolf, R. L.; Griffiths, J.; Shultz, J.; Borberg, E.; Chalise, S.; Gonzalez, W. I.; Walt, D. R.; Yonker, L. M.; Horwitz, B. H. COVID-19 mRNA Vaccines Induce Robust Levels of IgG but Limited Amounts of IgA within the Oronasopharynx of Young Children. *J Infect Dis* **2024**, *jiae450*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae450>.
44. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; Walson, J. L. Immunogenicity and Safety of a Booster Dose of a Self-Amplifying RNA COVID-19 Vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: A Double-Blind, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3, Non-Inferiority Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2024**, *24* (4), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00650-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00650-3).
45. Dolgin, E. Self-Copying RNA Vaccine Wins First Full Approval: What's next? *Nature* **2023**, *624* (7991), 236–237. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-03859-w>.
46. Uversky, V. N.; Redwan, E. M.; Makis, W.; Rubio-Casillas, A. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines* **2023**, *11* (5), 991. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050991>.
47. Irrgang, P.; Gerling, J.; Kocher, K.; Lapuente, D.; Steininger, P.; Habenicht, K.; Wytöpil, M.; Beileke, S.; Schäfer, S.; Zhong, J.; Ssebyatika, G.; Krey, T.; Falcone, V.; Schüle, C.; Peter, A. S.; Nganou-Makamdop, K.; Hengel, H.; Held, J.; Bogdan, C.; Überla, K.; Schober, K.; Winkler, T. H.; Tenbusch, M. Class Switch toward Noninflammatory, Spike-Specific IgG4 Antibodies after Repeated SARS-CoV-2 mRNA Vaccination. *Sci Immunol* **2023**, *8* (79), eade2798. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade2798>.
48. Zhu, F.; Huang, S.; Liu, X.; Chen, Q.; Zhuang, C.; Zhao, H.; Han, J.; Jaen, A. M.; Do, T. H.; Peter, J. G.; Dorado, A. G.; Tirador, L. S.; Zabat, G. M. A.; Villalobos, R. E. M.; Gueco, G. P.; Botha, L. L. G.; Pertuz, S. P. I.; Tan, J.; Zhu, K.; Quan, J.; Lin, H.; Huang, Y.; Jia, J.; Chu, X.; Chen, J.; Chen, Y.; Zhang, T.; Su, Y.; Li, C.; Ye, X.; Wu, T.; Zhang, J.; Xia, N. Safety and Efficacy of the Intranasal

Spray SARS-CoV-2 Vaccine dNS1-RBD: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **2023**, *11* (12), 1075–1088. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00349-1).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Perspective

The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines

Maurizio Federico

Special Issue

Efficacy, Immunogenicity and Safety of COVID-19 Vaccines and COVID-19 Vaccination Strategies

Edited by

Dr. Pedro Plans-Rubió



<https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>



Cell Host & Microbe

Perspective

Rethinking next-generation vaccines for coronaviruses, influenzaviruses, and other respiratory viruses

David M. Morens,¹ Jeffery K. Taubenberger,^{2,*} and Anthony S. Fauci¹

¹Office of the Director, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

²Viral Pathogenesis and Evolution Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

*Correspondence: taubenbergerj@niaid.nih.gov

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.11.016>



Cell Host & Microbe

Perspective

Table 1. Epidemiologic and immunologic parameters of selected human respiratory viruses and vaccines used to control them

Virus	Incubation period ^a	Marked viremia	Infection elicits long-term protective immunity	Re-infections are rare	Vaccines elicit long-term protective immunity	Vaccine type
Measles (to prodrome)	≈ 10 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Mumps	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Rubella	≈ 16 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Smallpox ^b	≈ 12 days	yes	yes	yes	yes	replicating
VZV ^c	≈ 14 days	yes	yes	yes	yes	replicating
Endemic coronaviruses	≈ 5 days	no	no	no	no	none
Influenza virus	≈ 2 days	no	no	no	no	replicating, other
Parainfluenzaviruses	≈ 4 days	no	no	no	no	none
RSV	≈ 5 days	no	no	no	no	none
SARS-CoV-2	≈ 4 days	no ^d	no	no	no	non-replicating



Cell Host & Microbe

Perspective

respiratory, lower respiratory tract, and systemic vaccination^{144,145,146,147}; or optimized combinations of these. Attempting to control mucosal respiratory viruses with systemically administered non-replicating vaccines has thus far been largely unsuccessful, indicating that new approaches are needed. For example,

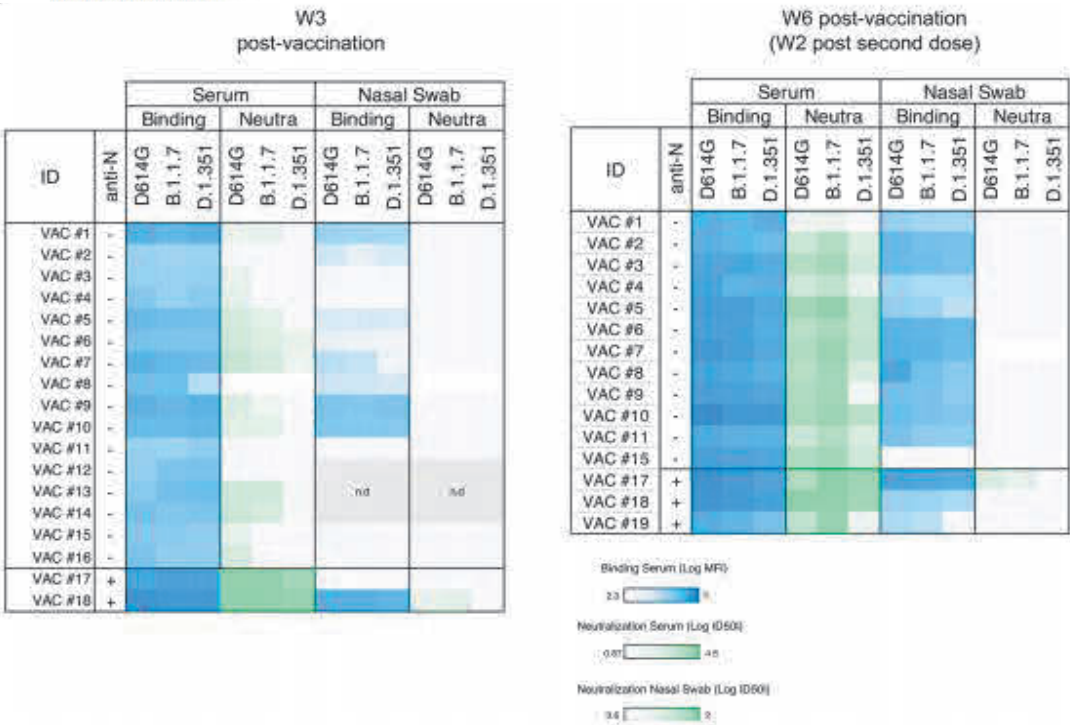
respiratory disease often reflects host genetic susceptibility factors.^{16,51,146,147}

PUBLIC HEALTH CONSIDERATIONS RELATING TO NEXT-GENERATION RESPIRATORY VACCINES MUST

Lack of neutralizing immunity in nasal swabs from COVID-19 mRNA vaccinees

Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies

Delphine Planas^{1,2,3,22}, Timothée Bruel^{1,2,3,22}, Ludvine Grzelak^{1,2,3,4}, Florence Guivel-Benhassine^{1,2,3}, Isabelle Staropoli^{1,2,3}, Françoise Porrot^{1,2,3}, Cyril Planchais⁵, Julian Buchrieser^{1,2,3}, Maaran Michael Rajah^{1,2,3,4}, Elodie Bishop^{1,2,3,4}, Mélanie Albert^{6,7}, Flora Donati^{6,7}, Matthieu Prot⁸, Sylvie Behillil^{6,7}, Vincent Enouf^{6,7}, Marianne Maquart⁹, Mounira Smati-Lafarge¹⁰, Emmanuelle Varon¹⁰, Frédérique Schortgen¹¹, Layla Yahyaoui¹², Maria Gonzalez¹³, Jérôme De Sèze^{14,15}, Hélène Péré¹⁶, David Veyer^{16,17}, Aymeric Sève¹⁸, Etienne Simon-Lorière¹⁸, Samira Fafi-Kremer^{19,20}, Karl Stefic^{9,21}, Hugo Mouquet⁵, Laurent Hocqueloux¹⁸, Sylvie van der Werf^{6,7,23}, Thierry Prazuck^{18,23} and Olivier Schwartz^{1,2,3,23}✉



Either low or absent anti-Spike immunity in lungs of vaccinees

July 19, 2022

Science Immunology

Current Issue First release papers Archive About

HOME > SCIENCE IMMUNOLOGY > FIRST RELEASE > RESPIRATORY MUCOSAL IMMUNITY AGAINST SARS-COV-2 FOLLOWING MRNA VACCINATION

REPORTS | CORONAVIRUS

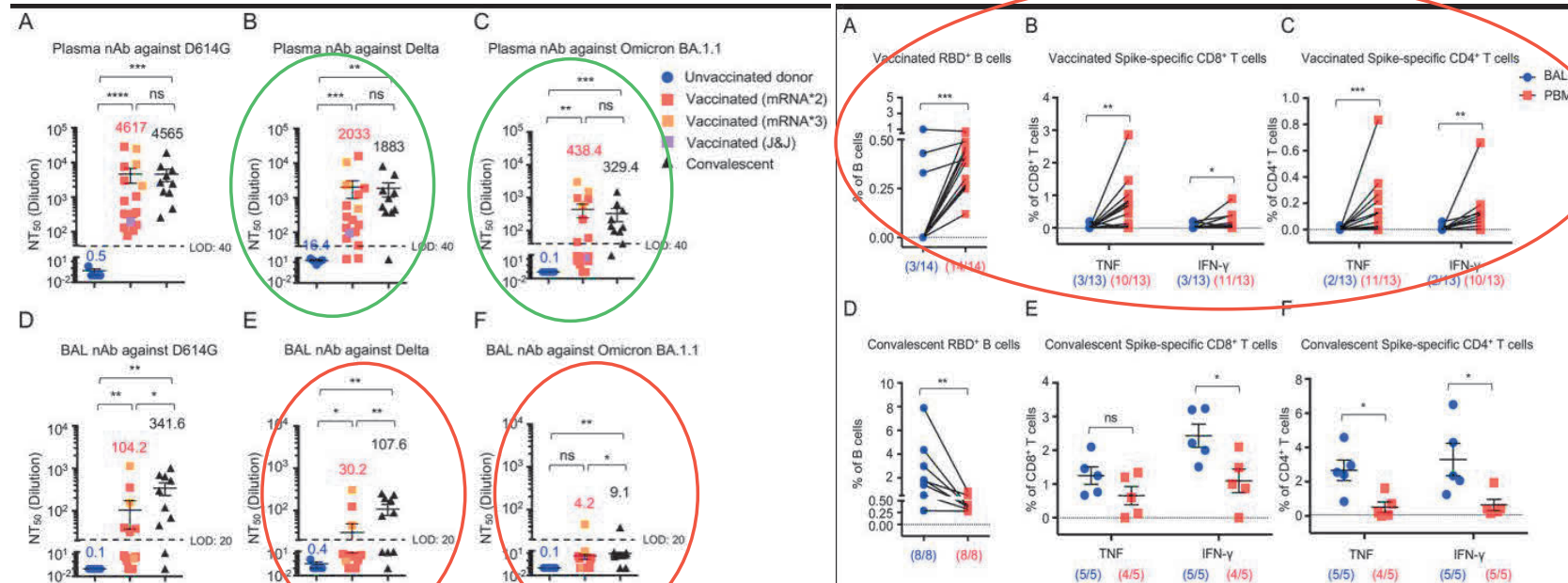


Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 following mRNA vaccination

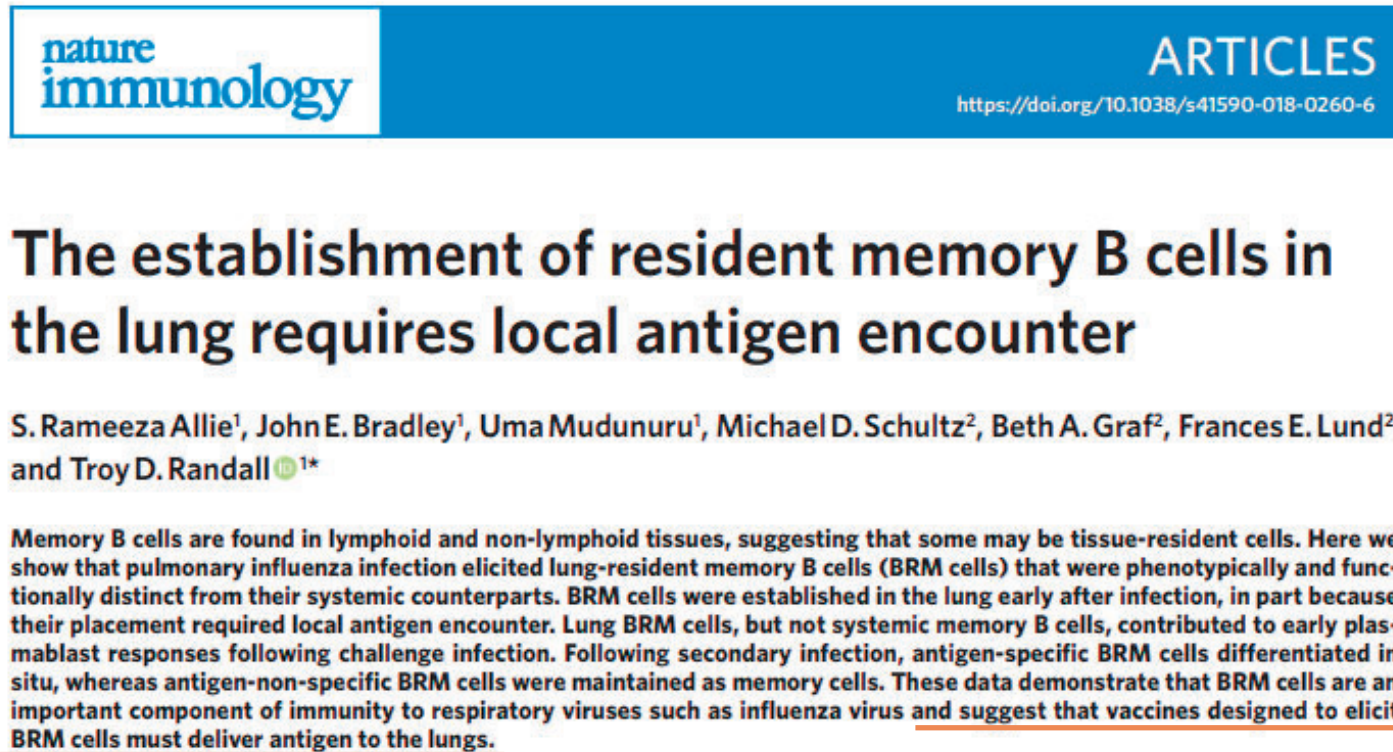
JINYI TANG, CONG ZENG, THOMAS M. COX, CHAOFAN LI, YOUNG MIN SON, IN SU CHEON, YUE WU, SUPRIYA BEHL, JUSTIN J. TAYLOR, JIE SUN

+18 authors Authors Info & Affiliations

SCIENCE IMMUNOLOGY • 19 Jul 2022 • First Release • DOI: 10.1126/sciimmunol.add4853

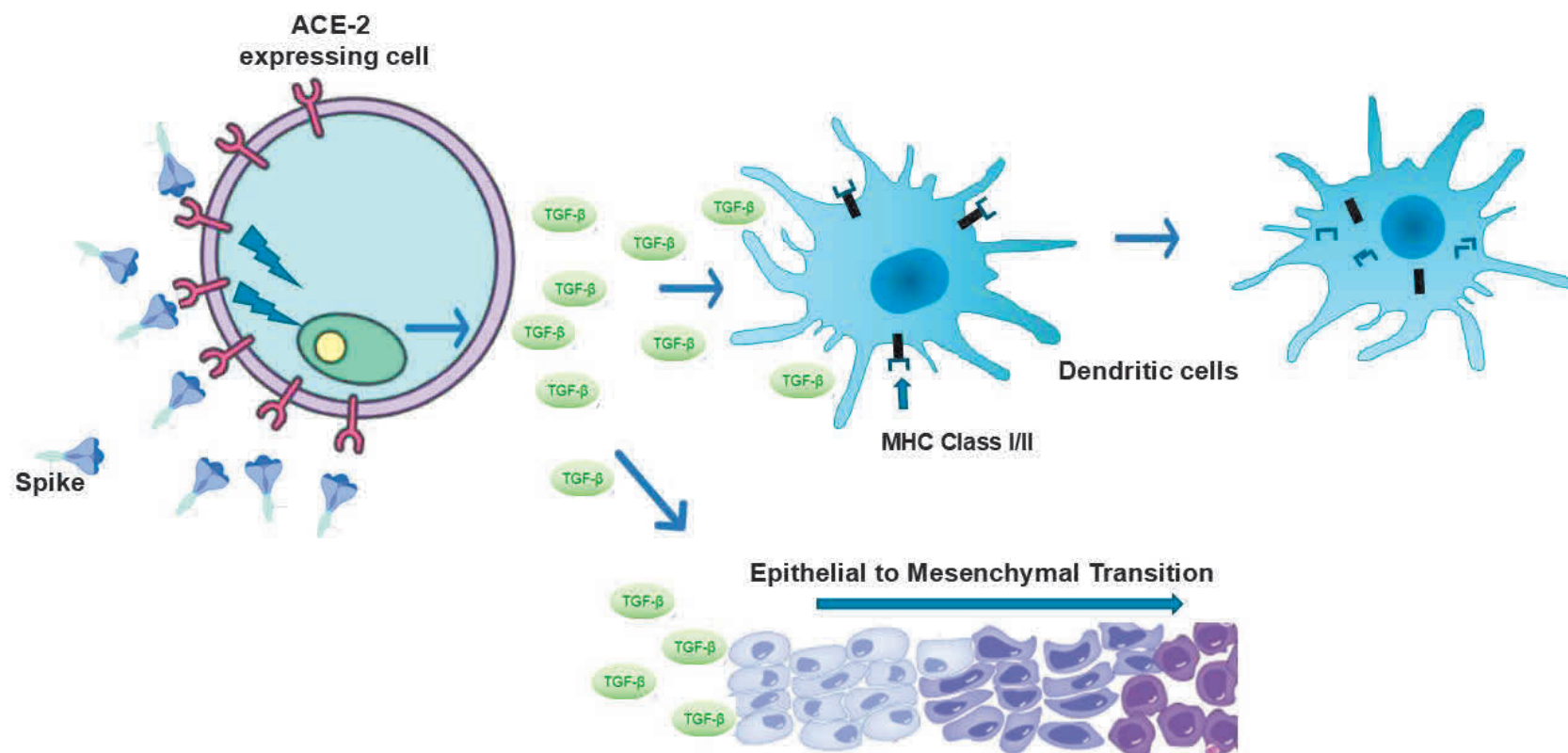


Vaccines designed to elicit respiratory immunity must deliver antigen to the lungs



- The development of lung immune memory is largely not influenced by events occurring in both peripheral circulation and lymphoid organs;
- Lymphocytes in lungs are maintained independently of the pool of circulating lymphocytes, and their continuous loss through intraepithelial migration towards airways is constantly replenished by homeostatic proliferation

Bystander effects of the Spike/ACE-2 binding



COVID-19 vaccine-induced autoimmunity: auto-antibodies

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Brief Research Report
PUBLISHED 02 August 2024
DOI 10.3389/fimmu.2024.1404800

Check for updates

ACCESS

OPEN ACCESS
EDITED BY
Dimitrov Pashov,
German Academy of Sciences (BAS),
Bulgaria

REVIEWED BY
Abu Rached,
University Bochum, Germany
Kohler,
University of California, United States

*CORRESPONDENCE
Christiana Franke
christiana.franke@charite.de
SPECIALTY EDITOR
The authors have contributed equally to
this work.

RECEIVED 21 March 2024
ACCEPTED 11 July 2024
PUBLISHED 02 August 2024

Prot. Typ | tipo prot. Eingang - entrata

High serum prevalence of autoreactive IgG antibodies against peripheral nerve structures in patients with neurological post-COVID-19 vaccination syndrome

Friederike A. Arlt^{1,2†}, Ameli Breuer^{1†}, Elli Trampenau^{1,2}, Fabian Boesl¹, Marieluise Kirchner³, Philipp Mertins³, Elisa Sánchez-Sendin^{1,2}, Mahoor Nasouti^{1,2}, Marie Mayrhofer⁴, Martin Blüthner⁴, Matthias Endres^{1,2,5,6,7}, Harald Prüss^{1,2†} and Christiana Franke^{1*†}

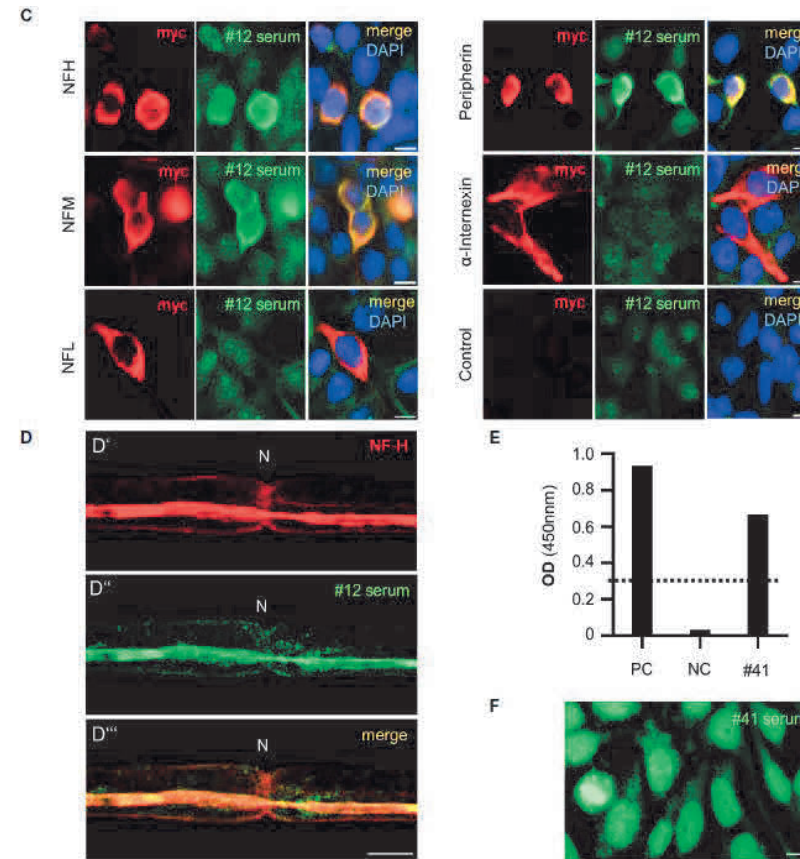


FIGURE 2

Antibody target identification and confirmation in PCVS sera. Volcano plot representing significantly enriched proteins (labeled in red) in patient #12 IgG IP (A) and patient #41 IgG IP (B) compared to a negative control; in A-B: the x-axis displays the log₂-transformed fold change, and the y-axis represents the -log₁₀-transformed p value. (C) Cell-based assays with patient #12 serum testing IgG reactivity against neurofilament subunits and control HEK293 cells. (D) Costaining of sciatic nerve teased fibers with a commercial NF-H antibody (D') and patient #12 serum (D'') showing clear signal overlap (D'''). (E) ELISA analysis of DFS-70 and patient #41 serum. PC: positive control serum. NC: negative control serum. The standard reference serum OD was 0.278 (dotted line). OD: optical density. (F) Hep2 staining of patient #41 serum resembling fine speckled nuclear staining typical of DFS-70 IgGs.

Istituto Superiore di Sanità



National Center for the Global Health

Un grazie e un saluto a tutti

Table 73. List of Important Risks and Missing Information

Important identified risks	Myocarditis and Pericarditis
Important potential risks	None
Missing information	Use in pregnancy and while breast feeding
	Use in immunocompromised patients
	Use in frail patients with co-morbidities (e.g., chronic obstructive pulmonary disease [COPD], diabetes, chronic neurological disease, cardiovascular disorders)
	Use in patients with autoimmune or inflammatory disorders
	Long term safety data

II.B Summary of Important Risks

The safety information in the Product Information is aligned to the reference.

Table 74. Important Identified Risk: Myocarditis and Pericarditis

Evidence for linking the risk to the medicine	Events of Myocarditis and Pericarditis have been reported.
Risk factors and risk groups	Post-authorization reports have been reported more frequently in adolescent and young adult male patients following the second dose of vaccine; however, reports have been received for adult males and females of broader age range and following the first vaccination also.
Risk minimisation measures	<u>Routine risk minimisation measures:</u> SmPC sections 4.4. and 4.8. <u>Additional risk minimisation measures:</u> DHCP letter and communication plan
Additional pharmacovigilance activities	C4591009 C4591021 (former ACCESS/VAC4EU) C4591038 (former C4591021 sub-study) C4591036 (former Pediatric Heart Network study) C4591051 C4591052 See Section II.C this summary for an overview of the post-authorisation development plan.

Allgemeine Empfehlungen

Überempfindlichkeit und Anaphylaxie

Es wurden Fälle von Anaphylaxie berichtet. Für den Fall einer anaphylaktischen Reaktion nach der Verabreichung des Impfstoffs sollte immer eine angemessene medizinische Versorgung und Überwachung bereitstehen.

Nach der Impfung wird eine engmaschige Beobachtung von mindestens 15 Minuten empfohlen. Keine weitere Dosis des Impfstoffs sollte an Personen verabreicht werden, bei denen eine Anaphylaxie nach einer früheren Dosis von Comirnaty aufgetreten ist.

Myokarditis und Perikarditis

Nach der Impfung mit Comirnaty besteht ein erhöhtes Risiko für Myokarditis und Perikarditis. Diese Erkrankungen können sich innerhalb weniger Tage nach der Impfung entwickeln und traten hauptsächlich innerhalb von 14 Tagen auf. Sie wurden häufiger nach der zweiten Impfung und häufiger bei jüngeren Männern beobachtet (siehe Abschnitt 4.8). Die verfügbaren Daten zeigen, dass sich die meisten Fälle erholen. In einigen Fällen war eine intensivmedizinische Versorgung erforderlich, und es wurden Fälle mit Todesfolge beobachtet.

Angehörige der Heilberufe sollten auf Anzeichen und Symptome einer Myokarditis oder Perikarditis achten. Die Geimpften (einschließlich Eltern und Betreuer) sollten angewiesen werden, sofort einen Arzt aufzusuchen, wenn sich bei ihnen Symptome zeigen, die auf eine Myokarditis oder Perikarditis hinweisen, wie (akute und anhaltende) Schmerzen in der Brust, Kurzatmigkeit oder Herzklopfen nach der Impfung.

Angehörige der Gesundheitsberufe sollten Leitlinien und/oder Spezialisten für die Diagnose und Behandlung dieser Erkrankung konsultieren.

Angstbedingte-Reaktionen

Angstbedingte Reaktionen, einschließlich vasovagale Reaktionen (Synkope), Hyperventilation oder stressbedingte Reaktionen (z. B. Schwindelgefühl, Herzklopfen, Anstieg der Herzfrequenz, Blutdruckveränderungen, Parästhesie, Hypoästhesie und Schwitzen) können im Zusammenhang mit dem Impfvorgang selbst auftreten. Stressbedingte Reaktionen sind vorübergehend und klingen von selbst wieder ab. Die Betroffenen sollten darauf hingewiesen werden, die Symptome dem Impfarzt mitzuteilen, damit dieser sie beurteilen kann. Es ist wichtig, dass Vorkehrungen getroffen werden, um Verletzungen durch Ohnmachtsanfälle zu vermeiden.

Gleichzeitige Erkrankung

Die Impfung sollte bei Personen mit akuter, schwerer, fieberhafter Erkrankung oder akuter Infektion verschoben werden. Das Vorliegen einer geringfügigen Infektion und/oder leichtem Fieber sollte die Impfung nicht verzögern.

Thrombozytopenie und Gerinnungsstörungen

Wie bei anderen intramuskulären Injektionen sollte der Impfstoff bei Personen, die eine Antikoagulationstherapie erhalten, oder bei Personen mit Thrombozytopenie oder einer Gerinnungsstörung (wie Hämophilie) mit Vorsicht verabreicht werden, da bei diesen Personen nach einer intramuskulären Verabreichung Blutungen oder Blutergüsse auftreten können.

Immungeschwächte Personen

Die Sicherheit und Immunogenität wurden bei einer begrenzten Anzahl an immungeschwächten Personen, einschließlich Personen unter einer Therapie mit Immunsuppressiva, bewertet (siehe Abschnitte 4.8 und 5.1). Die Wirksamkeit von Comirnaty Omicron XBB.1.5 könnte bei immungeschwächten Personen geringer sein.

Dauer des Impfschutzes

Die Dauer der Schutzwirkung des Impfstoffs ist nicht bekannt, da sie noch in laufenden klinischen Studien ermittelt wird.

Raccomandazioni generali

Ipersensibilità e anafilassi

Sono stati segnalati casi di anafilassi. Devono essere sempre immediatamente disponibili trattamento e assistenza medici adeguati nel caso di comparsa di una reazione anafilattica in seguito alla somministrazione del vaccino.

Dopo la vaccinazione si raccomanda un attento monitoraggio per almeno 15 minuti. Non somministrare ulteriori dosi del vaccino a soggetti che abbiano manifestato anafilassi dopo una precedente dose di Comirnaty.

Miocardite e pericardite

Dopo la vaccinazione con Comirnaty è presente un aumento del rischio di sviluppare miocardite e pericardite. Queste condizioni possono svilupparsi entro pochi giorni dalla vaccinazione e si sono verificate principalmente entro 14 giorni. Sono state osservate più spesso dopo la seconda dose di vaccino e nei maschi più giovani (vedere paragrafo 4.8). I dati disponibili indicano che la maggior parte dei casi si risolve. Alcuni casi hanno richiesto il supporto in terapia intensiva e sono stati osservati casi fatali.

Gli operatori sanitari devono prestare attenzione ai segni e ai sintomi di miocardite e pericardite. Le persone vaccinate (inclusi genitori o coloro che prestano assistenza) devono essere istruite a rivolgersi immediatamente al medico qualora dopo la vaccinazione sviluppino sintomi indicativi di miocardite o pericardite, quali dolore toracico (acuto e persistente), respiro affannoso o palpitazioni.

Gli operatori sanitari devono consultare le linee guida e/o specialisti per diagnosticare e trattare tale affezione.

Reazioni correlate all'ansia

In associazione alla procedura di vaccinazione stessa possono verificarsi reazioni correlate all'ansia, incluse reazioni vasovagali (sincope), iperventilazione o reazioni correlate allo stress (ad es. capogiro, palpitazioni, aumenti della frequenza cardiaca, alterazioni della pressione arteriosa, parestesia, ipoestesia, sudorazione). Le reazioni correlate allo stress sono temporanee e si risolvono spontaneamente. Ai soggetti deve essere raccomandato di segnalare eventuali sintomi all'operatore addetto alla vaccinazione, perché possa valutarli. È importante che vengano adottate precauzioni per evitare lesioni da svenimento.

Malattia concomitante

La vaccinazione deve essere rimandata nei soggetti affetti da uno stato febbrile acuto severo o da un'infezione acuta. La presenza di un'infezione lieve e/o di febbre di lieve entità non deve comportare il rinvio della vaccinazione.

Trombocitopenia e disturbi della coagulazione

Come per tutte le iniezioni intramuscolari, il vaccino deve essere somministrato con cautela nei soggetti sottoposti a terapia anticoagulante oppure affetti da trombocitopenia o qualsiasi disturbo della coagulazione (ad es. emofilia), poiché in questi soggetti possono verificarsi sanguinamenti o lividi a seguito di una somministrazione intramuscolare.

Soggetti immunocompromessi

La sicurezza e l'immunogenicità sono state valutate in un numero limitato di soggetti immunocompromessi, compresi quelli in terapia immunosoppressiva (vedere paragrafi 4.8 e 5.1). L'efficacia di Comirnaty Omicron XBB.1.5 potrebbe essere inferiore nei soggetti immunocompromessi.

Durata della protezione

La durata della protezione offerta dal vaccino non è nota; sono tuttora in corso studi clinici volti a stabilirla.

A. HERSTELLER DER WIRKSTOFFE BIOLOGISCHEN URSPRUNGS UND HERSTELLER, DIE FÜR DIE CHARGENFREIGABE VERANTWORTLICH SIND

Name und Anschrift der Hersteller der Wirkstoffe biologischen Ursprungs

BioNTech Manufacturing Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg
Deutschland

Pfizer Ireland Pharmaceuticals Unlimited Company
Grange Castle Business Park
Nangor Road
Dublin 22
D22 V8F8
Irland

Wyeth Pharmaceuticals LLC
1 Burt Road
Andover, MA 01810
USA

Name und Anschrift der Hersteller, die für die Chargenfreigabe verantwortlich sind

BioNTech Manufacturing GmbH
Kupferbergterrasse 17 - 19
55116 Mainz
Deutschland

Pfizer Manufacturing Belgium NV
Rijksweg 12
Puurs-Sint-Amands, 2870
Belgien

In der Druckversion der Packungsbeilage des Arzneimittels müssen Name und Anschrift des Herstellers, der für die Freigabe der betreffenden Charge verantwortlich ist, angegeben werden.

B. BEDINGUNGEN ODER EINSCHRÄNKUNGEN FÜR DIE ABGABE UND DEN GEBRAUCH

Arzneimittel, das der Verschreibungspflicht unterliegt.

- **Amtliche Chargenfreigabe**

Gemäß Artikel 114 der Richtlinie 2001/83/EG, wird die amtliche Chargenfreigabe von einem amtlichen Arzneimittelkontrolllabor oder einem zu diesem Zweck benannten Labor vorgenommen.

C. SONSTIGE BEDINGUNGEN UND AUFLAGEN DER GENEHMIGUNG FÜR DAS INVERKEHRBRINGEN

- **Regelmäßig aktualisierte Unbedenklichkeitsberichte [Periodic Safety Update Reports (PSURs)]**

Die Anforderungen an die Einreichung von PSURs für dieses Arzneimittel sind in der nach Artikel 107 c Absatz 7 der Richtlinie 2001/83/EG vorgesehenen und im europäischen Internetportal

A. PRODUTTORI DEI PRINCIPI ATTIVI BIOLOGICI E PRODUTTORI RESPONSABILI DEL RILASCIO DEI LOTTI

Nome e indirizzo dei produttori del(dei) principio(i) attivo(i) biologico(i)

BioNTech Manufacturing Marburg GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg
Germania

Pfizer Ireland Pharmaceuticals Unlimited Company
Grange Castle Business Park
Nangor Road
Dublin 22
D22 V8F8
Irlanda

Wyeth Pharmaceuticals LLC
1 Burt Road
Andover, MA 01810
Stati Uniti

Nome e indirizzo dei produttori responsabili del rilascio dei lotti

BioNTech Manufacturing GmbH
Kupferbergterrasse 17 - 19
55116 Mainz
Germania

Pfizer Manufacturing Belgium NV
Rijksweg 12
Puurs-Sint-Amands, 2870
Belgio

Il foglio illustrativo del medicinale deve riportare il nome e l'indirizzo del produttore responsabile del rilascio dei lotti in questione.

B. CONDIZIONI O LIMITAZIONI DI FORNITURA E UTILIZZO

Medicinale soggetto a prescrizione medica.

- **Rilascio ufficiale dei lotti**

In conformità all'articolo 114 della direttiva 2001/83/CE, il rilascio ufficiale dei lotti di fabbricazione deve essere effettuato da un laboratorio di Stato o da un laboratorio appositamente designato.

C. ALTRE CONDIZIONI E REQUISITI DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO

- **Rapporti periodici di aggiornamento sulla sicurezza (PSUR)**

I requisiti per la presentazione degli PSUR per questo medicinale sono definiti nell'elenco delle date di riferimento per l'Unione europea (elenco EURD) di cui all'articolo 107 *quater*, paragrafo 7, della direttiva 2001/83/CE e successive modifiche, pubblicato sul sito web dell'Agenzia europea per i medicinali.