

Nachweis von DNA-Verunreinigungen in Chargen des COVID-19-mRNA-Impfstoffs von BioNTech (Comirnaty), die in Deutschland in Verkehr gebracht worden waren:

Die Bedeutung der Risiken von DNA-Verunreinigungen im mRNA-Impfstoff Comirnaty von BioNTech für Geimpfte

Inhaltsverzeichnis

Prolog: Schädigt die mRNA-Impfung die Keimbahn des Menschen?	2
1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	4
3. Grenzwerte für DNA in parenteralen Arzneimitteln	9
4. Bestimmung der Gesamt-DNA-Kontaminationen in Chargen des m-RNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech, die in Deutschland in Verkehr gebracht worden waren	12
5. Bewertung des Risikoprofils der DNA-Kontaminationen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech	16
5.1. Kontamination mit Plasmiden - ein generelles Qualitätsproblem	16
5.2. Das Risiko der Insertionsmutagenese	17
5.3. Das Risiko einer lang andauernden Expression des Spike-Proteins	19
5.4. Das Risiko einer Antibiotika-Resistenz im Körper der Geimpften	20
5.5. Pflicht zur Langzeitbeobachtung als Konsequenz der US-Arzneimittelbehörde	20
Epilog: Haben mRNA-Impfstoffe Vorteile gegenüber klassischen Impfformen?	21

Anlage

Quellenanalyse:

Das Risiko der unbeabsichtigten genetischen Modifikation menschlicher Zellen durch DNA-Kontaminationen in parenteralen Arzneimitteln	23
--	----

Prolog: Schädigt die mRNA-Impfung die Keimbahn des Menschen?

Im April 2023 hat der US-amerikanische Wissenschaftler Kevin McKernan mit seinem Team öffentlich gemacht, dass die mRNA-Impfstoffe massiv mit DNA verunreinigt sind. Wissenschaftlich stellte dies ein Signal von einer Sprengkraft dar, die alle zuvor bereits bekannt gewordenen Ungereimtheiten der mRNA-Technologie in den Schatten stellte. Aus dieser Perspektive wäre zu erwarten gewesen, dass die zuständigen Behörden weltweit überprüfen, was es damit auf sich hat. Aber nichts rührte sich. Weder Behörden, noch die Medien haben das Thema sichtbar bewegt. Es blieb einfach liegen wie Blei.

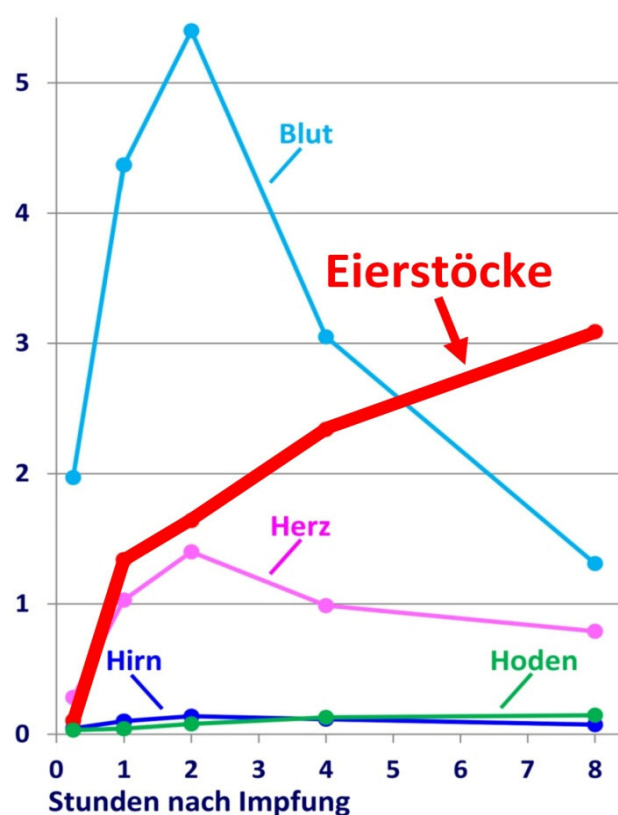
Bereits der Prüfbericht der Europäischen Arzneimittelagentur EMA zur Zulassung des BioNTech-mRNA-Impfstoffs Comirnaty vom Februar 2021 räumte ein, dass dieser Impfstoff mit DNA verunreinigt ist. Allerdings ohne Angaben zur Dimension dieser Verunreinigungen. So stand es dann auch seit Juli 2021 in dem Buch *Corona Gen-Impfstoffe* von David O. Fischer, später auch in dessen Buch *Die mRNA-Maschine*. Seit der Neuauflage dieses Buchs im Juli 2023 sind auch Daten aus Deutschland enthalten, mit Erläuterungen, was diese bedeuten und wie damit umgegangen werden sollte.

Nun liegen neue Daten vor, die im renommierten Labor von Frau Prof. König ermittelt wurden. Untersucht wurden versiegelte Durchstechflaschen von fünf unterschiedlichen Chargen des BioNTech-mRNA-Impfstoffs. Im Ergebnis bestätigten diese Untersuchungen für Deutschland das, was das Team von Kevin McKernan in USA gefunden hatte.

Da die Verpackung von Nukleinsäuren, also DNA oder RNA, in die Lipid-Nanopartikel der mRNA-Impfstoffe nicht selektiv erfolgt, dürften keine Zweifel bestehen, dass die DNA-Kontaminationen genau wie auch die mRNA durch Impfung mit dem BioNTech-mRNA-Impfstoff Comirnaty in die Zellen der Geimpften getragen wird. Still und unbemerkt.

Aber, bereits im Januar 2021 hat die australische Zulassungsbehörde Daten zur Verteilung des BioNTech-Impfstoffs im Körper von Versuchstieren veröffentlicht. Es handelt sich dabei um die Verteilung radioaktiv markierter Lipid-Nanopartikel nach intramuskulärer Impfung. Das nebenstehende Schaubild zeigt mit Daten dieser Veröffentlichung, dass es keine Stunde dauert, bis die Lipid-Nanopartikel des Impfstoffs in Blut, Herz oder Eierstöcken auftauchen. Geht man davon aus, dass die Nanopartikel nicht nur mRNA, sondern auch die DNA-Verunreinigungen enthalten, gilt das auch für letztere.

Konzentration radioaktiver Lipid-Nanopartikel



© David O. Fischer 2023 (Die mRNA-Maschine)

Was aber bedeutet das für die Geimpften? Was insbesondere für vorpubertäre Mädchen oder gebärfähige Frauen? Wie wird sich dieser mögliche Eintrag von Fremd-DNA in die Eierstöcke zahlreicher Mädchen und Frauen in zukünftigen Generationen auswirken? Lässt sich dies überhaupt abschätzen? Was müssen die Verantwortlichen in Anbetracht dieser Zusammenhänge den Comirnaty-geimpften gebärfähigen Frauen nun sagen und was den Eltern der teilweise sehr jung geimpften Mädchen?

1. Übersicht

Nachdem bereits aus dem Prüfbericht der EMA zum Zulassungsverfahren des BioNTech-COVID-19-mRNA-Impfstoff vom Februar 2021 hervor ging, dass dieser mit DNA verunreinigt ist, wurden im April 2023 von Kevin McKernan und Kollegen* Daten veröffentlicht, die enthüllten, dass diese DNA-Kontaminationen quantitativ und qualitativ alle Vorstellungen um Größenordnungen übertrafen.

Die vorliegende Auswertung betrifft nun die Ergebnisse von Analysen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech bezüglich DNA-Kontaminationen von Chargen, die in Deutschland in Verkehr gebracht worden waren. Diese Daten bestätigten, dass die auf USA bezogenen Untersuchungen auch in Deutschland Geltung haben. Im Ergebnis wurden auch hier massive DNA-Kontaminationen gefunden, ebenfalls wie in USA teilweise in Form vollständiger Bakterien-Plasmide. Plasmide sind kleine ringförmige Träger von Erbinformation, die vom weitaus größeren ebenfalls ringförmigen "Bakterien-Chromosom" unabhängig sind und alle Informationen tragen, die für die Expression der darauf befindlichen Gene (Proteinsynthese) erforderlich sind. Ein Befund, der aus der Perspektive der Arzneimittelsicherheit als in höchstem Maße alarmierend zu bezeichnen ist.

Trotz der Tatsache, dass diese Verunreinigungen in ihrem Ausmaß überraschten, lässt sich ihre Herkunft auf den Produktionsprozess zurückführen. Die Tatsache, dass Plasmid-Kontaminationen von McKernan und Kollegen auch im mRNA-COVID-19-Impfstoff von Moderna gefunden wurden, spricht dafür, dass die ungenügende Beseitigung von DNA-Verunreinigungen ein grundsätzliches Problem bei der großtechnischen Herstellung von mRNA-Impfstoffen darstellt.

Bei den auf den nachgewiesenen Plasmiden gefundenen Genen handelt es sich gemäß Sequenzierung insbesondere um das Gen für das Spike-Protein des Virus SARS-CoV2, aber auch um ein Gen für eine Antibiotika-Resistenz, dessen Funktionstüchtigkeit unter Leitung von Kevin McKernan experimentell bestätigt wurde.

Vor diesem Hintergrund ist das Risikoprofil der im mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech gefundenen massiven DNA-Kontamination wie folgt zu benennen:

- I. Das Risiko einer nicht-umkehrbaren Integration von Fremd-DNA aus einem mRNA-Impfstoff ins Genom von Zellen der Geimpften, das mit der Gefahr einer Veränderung menschlicher Gene (Insertionsmutagenese) verbunden ist. Zu nennen ist in diesem Sinne insbesondere das Risiko der Krebsentstehung.
- II. Das Risiko einer lang (möglicherweise sogar lebenslang) anhaltenden Produktion des Spike-Proteins im Körper der Geimpften und darauf beruhenden Autoimmun- beziehungsweise komplementvermittelten Entzündungsreaktionen.
- III. Das Risiko einer Antibiotika-Resistenz im Körper der Geimpften.

Die Risiken der im mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech gefundenen DNA-Kontaminationen sind nach wissenschaftlichen Maßstäben als im hohen Maß bedenklich zu bezeichnen. Es ist deshalb zu fordern, dass der Produktionsprozess des betreffenden Impfstoffs völlig neu und mit dem Ziel überdacht wird, dass die Kontamination des Endprodukts mit DNA vollständig unterbunden wird. Für Plasmide ist der Nullgrenzwert zu etablieren. Solange dies nicht erreicht ist, ist über die wissenschaftliche Einschätzung hinaus auch von einer Bedenklichkeit im juristischen Sinne gemäß § 5 des Arzneimittelgesetzes (AMG) auszugehen. Dies bedeutet, dass Chargen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech, für die kein expliziter Nachweis der Abwesenheit von DNA-Kontaminationen vorliegt, weder verwendet, noch in Verkehr gebracht werden dürfen.

* McKernan et al. 2023: *Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose*
10. April 2023, OSF Preprints, doi:10.31219/osf.io/b9t7m

2. Einleitung

Bereits unmittelbar nach Zulassung des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech hat die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) einen Prüfbericht veröffentlicht, der das Vorhandensein von DNA-Verunreinigungen im vermarkteten Produkt einräumte*. Erwähnt wurden linearisierte DNA, nicht aber zirkuläre Plasmide. Darüber hinaus erfolgte keine nähere Spezifizierung, weder nach Art noch nach Menge dieser DNA-Kontaminationen. Klargestellt wurde jedoch, dass diese DNA-Kontaminationen aus dem Produktionsprozess stammen. Somit kommt dem Produktionsprozess eine Schlüsselstellung für die Bewertung der hier zugrundegelegten Sachverhalte zu. Die nachfolgenden Erläuterungen folgen in diesem Sinne dem Buch *Die mRNA-Maschine* von David O. Fischer**.

Um mRNA als Wirkstoff von Arzneimitteln zu produzieren, wird deren genetischer Bauplan als DNA Matrize gebraucht, von der die mRNA dann enzymatisch immer wieder "abgeschrieben" und damit vermehrt wird. Laut Prüfbericht der EMA wurde für die Zulassungsstudien des COVID-19-mRNA-Impfstoffs von BioNTech ein Impfpräparat verwendet, dessen DNA-Matrizen maschinell im Labor hergestellt wurden (PCR). Diese Methode stellt den aktuellen Stand der Wissenschaft dar. Das gilt auch für die dann folgende Aufreinigung der mRNA des Studien-Impfstoffs mit Hilfe der sogenannten Magnetperlen-Technologie und damit mit hohem Standard. Dieser Herstellungsweg wird von der EMA mit Prozess 1 bezeichnet. Beide genannten Technologien, die maschinelle Erzeugung von DNA-Matrizen mittels PCR und die Aufreinigung unter Verwendung von Magnetperlen, sind jedoch kostenintensiv.

Zur Kosteneinsparung und damit zur Erhöhung der Gewinnmarge, wurde die Herstellmethode für das kommerziell in Verkehr gebrachte Produkt fundamental vereinfacht. Für diesen Kostenvorteil wurde jedoch ein erhöhtes Risiko für bedenkliche Kontaminationen in Kauf genommen, denn das ist der Nachteil des von der EMA Prozess 2 genannten Herstellungswegs. Dieser bringt jedoch das Risiko erheblicher Verunreinigungen unterschiedlichster Art mit sich, welches bei der für die Studienmedikation verwendeten Herstellmethode Prozess 1 wesentlich geringer ist.

Dies wird deutlich, wenn Prozess 1 und Prozess 2 verglichen werden^(→ Abbildung Seite 8). So sind Magnetperlen magnetisierte Partikel, die je nach Ausgestaltung der Oberfläche den aus einer Probe zu gewinnenden Stoff binden, hier also spezifisch die mRNA, und so quasi herausfischen. Diese Magnetperlen werden der Probe zugegeben, wo sich die mRNA an die Oberfläche der Perlen anlagert. Unter Verwendung eines Magnetfelds werden die Perlen dann mit der angelagerten mRNA an der Wandung des Probengefäßes festgehalten, während die Flüssigkeit mit den darin verbleibenden Verunreinigungen abgesaugt wird. Dann wird die Probe mit einer kontaminationsfreien wässrigen Lösung versetzt und das Magnetfeld ausgeschaltet. So können sich die Perlen in der Flüssigkeit verteilen und die mRNA in diese freisetzen. Resultat ist eine weitgehend kontaminationsfreie mRNA-Präparation.

Die weit kostengünstigere Herstellung nach Prozess 2 bedient sich jedoch wesentlich preisgünstigerer Filtrationsverfahren. Diese können jedoch nur größere von kleineren Molekülen trennen und dies noch dazu mit begrenzter Effizienz. Ein "spezifisches Herausfischen" wie es die Verwendung von Magnetperlen erlaubt, ist auf diesem Weg nicht möglich.

* EMA 2021: **Assessment report Comirnaty vom 19. Februar 2021**
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000, EMA/707383/2020 Corr.1
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

** David O. Fischer 2023: **Die mRNA-Maschine - Protokoll einer wahren Tragödie**
Buchveröffentlichung, **Neuaufgabe Juli 2023**, ISBN 9 783752 692426

Das allein bereits durch diesen Einsatz von Filtrationsmethoden statt der Magnetperlen-Technologie entstehende Risiko von Verunreinigungen wird im Prozess 2 noch potenziert, indem statt den beim Prozess 1 im PCR-Verfahren hergestellten synthetischen DNA-Matrizen solche verwendet werden, die aus Plasmiden genetisch manipulierter Coli-Bakterien stammen. Plasmide sind ringförmige DNA-Stränge, die das Gen für das Spike-Protein tragen, aber auch Gene, die für die Produktion nützlich sind. Dazu gehören oft auch Antibiotika-Resistenzgene, so dass durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums in die Kulturlösung unerwünschte Fremd-Bakterien abgetötet, die das Plasmid mit dem Antibiotika-Resistenzgen enthaltenden erwünschten Bakterien jedoch überleben.

Das gemäß dieser Vorgaben gentechnisch erzeugte Mutter-Plasmid wird in ein Bakterium der ersten Generation eingeschleust und dann zusammen mit den damit veränderten Coli-Bakterien in einer Kulturlösung vermehrt. Die so gezüchteten gentechnisch veränderten Bakterien werden dann aufgelöst und die damit freigesetzten Plasmide durch Filtration aufkonzentriert. Dann wird die Ringform der Plasmide aufgebrochen, so dass ein linearer Strang entsteht. Dieser liefert dann die DNA-Matrize für die großtechnische mRNA-Herstellung. Soweit die Theorie.

Die so erzeugten Bakterien werden aufgelöst und die freigesetzten Plasmide aufkonzentriert. Dann wird die Ringform der Plasmide aufgebrochen, so dass ein linearer Strang entsteht. Dieser liefert dann die DNA-Matrize für die großtechnische mRNA-Herstellung.

Man braucht kein Experte sein um zu erkennen, dass die hier zur Kostensenkung eingesetzte bakterielle Erzeugung der DNA-Matrizen zu ganz anderen Verunreinigungsmustern führt, als Matrizen aus der maschinellen Erzeugung mit Hilfe der PCR-Methode. Aufgrund dieser unterschiedlichen Zusammensetzung handelt es sich bei dem vermarkteten Produkt also um ein anderes als das, welches für die klinischen Studien eingesetzt wurde. Dies sieht auch die EMA so, denn sie forderte noch nur vier Wochen vor Erteilung der Zulassung, dass die Gleichwertigkeit beider Produkte belegt wird*:

Demonstration of comparability

A comprehensive plan for demonstration of comparability among clinical supplies and commercial product including an assessment of the process designs and comprehensive characterization of the resulting product quality is planned.

Data for this section is pending and will be updated once the data has been generated, analysed, and verified.

Aufgrund des knappen Zeitplans dürfte es nicht möglich gewesen sein, dies vor Zulassung tatsächlich zu tun. Da Verunreinigungen von Arzneimitteln weder in der Fachinformation noch im Beipackzettel angegeben werden müssen, gibt es diesbezüglich für Comirnaty keine von BioNTech oder den Behörden veröffentlichten Daten. Dies bedeutet letztlich insbesondere, dass die in Comirnaty enthaltene DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit nie oder zumindest nicht im nötigen Umfang hinsichtlich eines Einflusses auf die Arzneimittelsicherheit untersucht worden ist. Insbesondere die Folgen von möglichen Insertionsmutagenesen, also des Einbaus der DNA-Verunreinigungen in die menschliche DNA, stellen deshalb ein Risiko dar, zu dem auch die Auslösung von Krebs gehört ^(→ Anlage).

Da Arzneimittelzulassungen generell den Nachweis der Unbedenklichkeit voraussetzen, ist in Anbetracht der Tatsache zu hinterfragen, dass die Zulassungsstudien für das BioNTech-Produkt mit einem nach Stand der Wissenschaft hergestellten Präparat durchgeführt wurden, das vermarktete Produkt aber qualitativ weitaus minderwertiger hergestellt wird und deshalb ob dies ein gesetzeskonformes Vorgehen war (beziehungsweise ist). Die Beantwortung dieser Frage wird umso dringlicher, je mehr Hinweise bekannt werden, dass Comirnaty nicht die Qualität und Unbedenklichkeit besitzt, die generell für Arzneimittel gesetzlich vorausgesetzt werden.

* EMA 19 November 2020:

**Rapporteur Rolling Review critical assessment report,
Quality aspects COVID-19 mRNA Vaccine BioNTech
EMA/H/C/005735/RR/xxx**

Im April 2023 hat dann der US-amerikanische Wissenschaftler Kevin McKernan mit Kollegen Daten zur DNA-Verunreinigung von Comirnaty veröffentlicht, die er selbst erhoben hat*. Untersucht hat er Proben mit offizieller Chargen-Freigabe. Was dabei herauskam, überstieg alle vorausgegangenen Befürchtungen. Denn gefunden wurden nicht nur erhebliche Kontaminationen mit linearer DNA, sondern auch intakte Plasmide mit Genen für das Spike-Protein und sogar für Antibiotika-Resistenzen.

Mit welchen Risiken die Geimpften deshalb rechnen müssen, wird sich mangels entsprechender Sicherheitsstudien erst nach und nach zeigen.

Auszüge aus dem Assessment Report der EMA zu Comirnaty vom 19 Februar 2021**

Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000
EMA/707383/2020 Corr.1

Originalversion:

The BNT162b2 active substance is manufactured by in vitro transcription using a linear DNA template, produced via plasmid DNA from transformed Escherichia coli cells. The linear DNA template is not part of the final product but defines the sequence of the mRNA product and therefore it is fundamental to ensure the adequate control of the active substance. Changes to the manufacturing process of the linear DNA template (e.g. change to plasmid host cell) may result in a different impurity profile in the active substance. Additional details on the manufacturing process and the control strategy for this starting material, initially only shortly described, have been provided and the dossier will be updated accordingly.

Sinngemäße Übersetzung:

Der Wirkstoff BNT162b2 wird durch In-vitro-Transkription unter Verwendung einer linearen DNA-Matrize hergestellt, die über Plasmid-DNA aus transformierten Escherichia-coli-Zellen hergestellt wird. Die lineare DNA-Matrize ist nicht Teil des Endprodukts, sondern definiert die Sequenz des mRNA-Produkts und ist daher von grundlegender Bedeutung, um eine angemessene Kontrolle des Wirkstoffs sicherzustellen. Änderungen am Herstellungsprozess des linear-DNA-Matrizen (z.B. Wechsel der Plasmid-Wirtszelle) können zu einem anderen Verunreinigungsprofil im Wirkstoff führen. Weitere Details zum Herstellungsprozess und zur Kontrollstrategie für diesen Ausgangsstoff, die zunächst nur kurz beschrieben wurden, wurden bereitgestellt, und das Dossier wird entsprechend aktualisiert.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

* McKernan et al. 2023: *Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose*
10. April 2023, OSF Preprints, doi:10.31219/osf.io/b9t7m

** EMA 2021: *Assessment report Comirnaty vom 19. Februar 2021*
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000, EMA/707383/2020 Corr.1
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

Originalversion:

Process development changes were adequately summarised. Two active substance processes have been used during the development history; Process 1 (clinical trial material) and Process 2 (commercial process). Details about process differences, justification for making changes, and results from a comparability study are provided. The major changes between active substance process versions were described in the dossier.

Sinngemäße Übersetzung:

Prozessentwicklungsänderungen wurden angemessen zusammengefasst. In der Entwicklungsgeschichte wurden zwei Wirkstoffverfahren eingesetzt; Prozess 1 (Material für klinische Studien) und Prozess 2 (kommerzieller Prozess). Details zu Prozessunterschieden, Begründungen für Änderungen und Ergebnisse einer Vergleichbarkeitsstudie werden bereitgestellt. Die wesentlichen Änderungen zwischen den Wirkstoff-verfahrensversionen wurden im Dossier beschrieben.

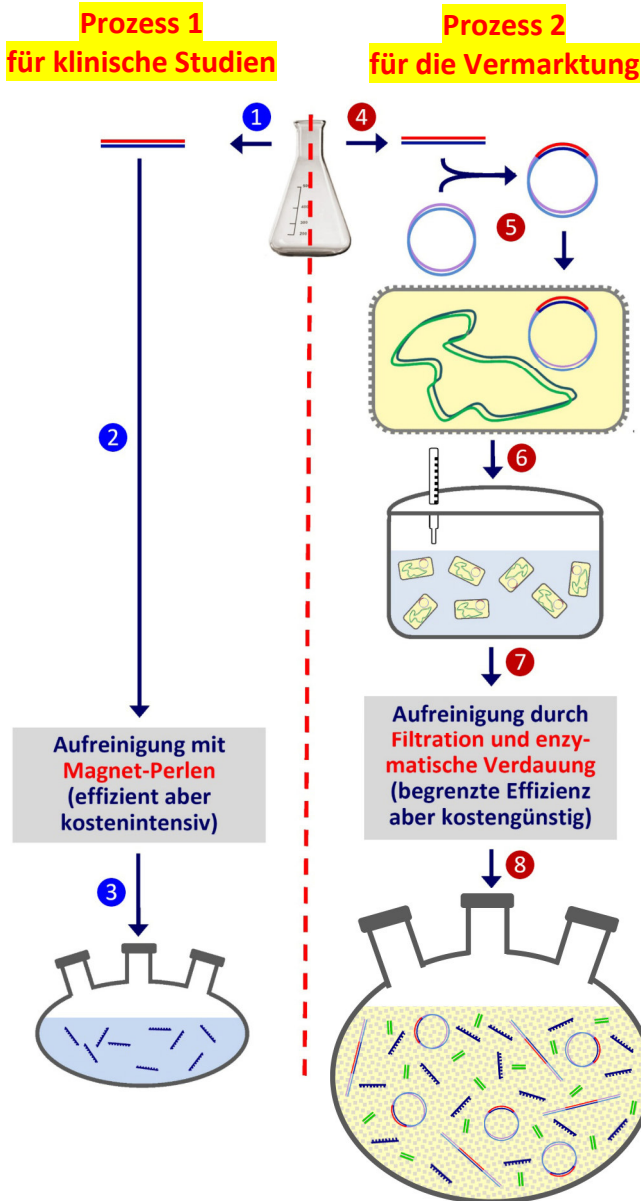
Originalversion:

Overall, the information provided is satisfactory. However, certain information is still pending due to the very short time frame of product development and will either be updated in the dossier imminently or further addressed in specific obligations and other post-approval measures. Information on the manufacturing process and process controls for the manufacturing sites Andover and BNT Mainz & Rentschler have been provided and are considered satisfactory. Two active substance processes have been used during the development; Process 1 and 2. The major changes between AS Process 1 and 2 are: increased process scale, DNA template changed from a PCR template to linearised plasmid DNA, magnetic bead purification replaced with proteinase K digestion and UFDF steps. Based on the differences observed between batches manufactured by active substance Process 1 and 2 for the CQA mRNA integrity and lack of characterisation data, a MO was raised regarding comparability, characterisation and clinical qualification of the one proposed acceptance criteria. Biological characterisation of the active substance was limited, and additional data and discussion were requested to address functionality. Additional characterisation data for the active substance are to be provided.

Sinngemäße Übersetzung:

Insgesamt sind die bereitgestellten Informationen zufriedenstellend. Bestimmte Informationen stehen jedoch aufgrund des sehr kurzen Zeitrahmens der Produktentwicklung noch aus und werden entweder in Kürze im Dossier aktualisiert oder in spezifischen Verpflichtungen und anderen Maßnahmen nach der Zulassung weiter behandelt. Informationen zum Herstellungsprozess und zu den Prozesskontrollen für die Produktionsstandorte Andover und BNT Mainz & Rentschler wurden bereitgestellt und gelten als zufriedenstellend. Bei der Entwicklung kamen zwei Wirkstoffverfahren zum Einsatz; Prozess 1 und 2. Die wichtigsten Änderungen zwischen Aktive-Substanz-Prozess 1 und 2 sind: vergrößerter Prozessmaßstab, Änderung der DNA-Matrize von einer PCR-Matrize zu linearisierter Plasmid-DNA, Magnetperlen-Reinigung ersetzt durch Proteinase-K-Verdau- und UFDF <Ultrafiltration/Diafiltration> Schritte. Basierend auf den beobachteten Unterschieden zwischen den nach Wirkstoffverfahren 1 und 2 hergestellten Chargen in Bezug auf das CQA <Critical Quality Attribute / kritisches Qualitätsmerkmal> mRNA-Integrität und das Fehlen von Charakterisierungsdaten wurde ein MO <Major Objection /große Bedenken> hinsichtlich Vergleichbarkeit, Charakterisierung und klinischer Eignung des einen vorgeschlagenen Akzeptanzkriteriums erhoben. Die biologische Charakterisierung des Wirkstoffs war begrenzt, und es wurden zusätzliche Daten und Diskussionen zur Erörterung der Funktionalität angefordert. Zusätzliche Charakterisierungsdaten für den Wirkstoff sind vorzulegen.

Abbildung: Herstellung des mRNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech



Prozess 1 für Zulassungsstudien

- 1 Laborsynthese der DNA-Matrize des Gens für das Spike-Protein als Vorlage für die mRNA-Sequenz und deren Vervielfältigung
- 2 Laborsynthese der mRNA unter Verwendung der synthetischen DNA-Matrize und anschließende präzise aber kostenintensive Aufreinigung unter Verwendung von Magnet-Perlen
- 3 Bereitstellung der aufgereinigten mRNA (dunkelblau) für die Verpackung in Lipid-Nanopartikel

Prozess 2 für die Vermarktung

- 4 Laborsynthese der Gens für das Spike-Protein als DNA
- 5 Integration des DNA-Gens in ein Bakterien-Plasmid und dessen gentechnische Einbringung in die erste Bakterien-Generation
- 6 Vermehrung des genetisch veränderten Bakteriums (Folgenerationen) in technischen Großanlagen
- 7 Gewinnung des Bakterien-Plasmids und dessen Linearisierung als DNA-Matrize, RNA-Synthese und kostengünstige groß-technische Aufreinigung hauptsächlich durch Filtration
- 8 Bereitstellung der aufgereinigten mRNA (dunkelblau) für die Verpackung in Lipid-Nanopartikel, jedoch mit vielfältigen Verunreinigungen, u.a. DNA einschließlich intakten und linearisierten Plasmid-Matrizen (rot umrandet)

Verwendete Symbole

- Synthetisch hergestellte DNA-Matrize
- mRNA des Impfstoffs
- Bakterien-Plasmid vor der gentechnischen Manipulation
- Bakterien-Plasmid mit gentechnisch eingefügtem Spike-Gen
- Coli-Bakterium mit dem gentechnisch manipulierten Plasmid neben der eigenen DNA (grün)
- linearisiertes Bakterien-Plasmid als DNA-Matrize für die großtechnische Produktion
- Fragmente Bakterien-DNA

3. Grenzwerte für DNA in parenteralen Arzneimitteln

Biologische Produkte können DNA-Reste von Wirtszellsubstraten, aber auch andere residuale DNA aus dem Produktionsprozess enthalten. Diesen Kontext hat Harry Yang 2013* übersichtlich dargestellt. Demnach ist es möglich, dass solche Rest-DNA zu onkogenen oder infektiösen Ereignissen führen. Die Weltgesundheitsorganisation WHO hatte 2006 eine Studiengruppe gegründet, um die WHO-Anforderungen angesichts der bedeutenden Fortschritte bei der Entwicklung von Impfstoffen sowie der vom Center for Biologics Evaluation and Research der FDA (CBER) durchgeführten Studien zu überdenken. Diese Bemühungen führten zur Änderung der DNA-Grenzwerte der WHO von zuvor 100 pg DNA pro Arzneimitteldosis auf 10 ng pro Dosis und dieser Wert wurde von den Zulassungsbehörden weitgehend übernommen. Die WHO-Studiengruppe war sich aber auch darin einig, dass die Verringerung der Rest-DNA-Größe auf unter 200 Basenpaaren (bp) bei einem Grenzwert des DNA-Gesamtgehalts von 10 ng pro Dosis sinnvoll erscheint**. Dies war jedoch zunächst nicht in der WHO-Empfehlung berücksichtigt worden.

Erst die einschlägige WHO-Empfehlung von 2013*** berücksichtigt wichtige Faktoren wie die Größe der DNA-Fragmente und potenziell inaktivierende Schritte im Herstellungsprozess. seither sind nicht nur der Grenzwert von 10 ng pro parenteraler Arzneimitteldosis, sondern auch andere Faktoren zu berücksichtigen, wenn es darum geht, den akzeptablen Gehalt an residualer DNA zu bestimmen. Entsprechend müssen in diesem Sinne nun folgende Aspekte auf den Herstellungsprozess bezogen berücksichtigt werden:

- (I) jede Verringerung der Menge der kontaminierenden DNA
- (II) jede Größenverringerng der kontaminierenden DNA
- (III) jede chemische Inaktivierung der biologischen Aktivität der kontaminierenden DNA

Ein von einer DNA-Kontamination ausgehendes Risiko muss somit von der jeweils zuständigen Zulassungs- beziehungsweise Überwachungsbehörde auf der Grundlage von (I) und/oder (II) und/oder (III) bewertet werden. Dieses Risiko kann aber nur dann als akzeptabel angesehen werden, wenn Daten belegen, dass angemessene Werte erreicht wurden. Was als angemessen gelten kann, ist dabei sorgfältig zu evaluieren und von der zuständigen Behörde zu bestätigen.

* Harry Yang 2013: *Establishing Acceptable Limits of Residual DNA*

PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology March 2013, 67 (2) 155-163; DOI: <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2013.00910>

** WHO 2007: *Meeting Report Studygroup on cell substrates for production of biologicals.*

June 11 and 12, 2007; 1–30.

https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrates/cells.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf?sfvrsn=3db7d37a_3&download=true

*** WHO 2013: *Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*

WHO Technical Report Series No. 978, 2013 (Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878), Annex 3, 22 May 2013

www.who.int/publications/m/item/animal-cell-culture-trs-no-978-annex3

Näheres zur Festlegung von Grenzwerten für Verunreinigungen in biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln durch die zuständigen Behörden regelt die ICH-Guideline ICH-Q6B*:

"Die absolute Reinheit biotechnologischer und biologischer Produkte ist schwer zu bestimmen und die Ergebnisse sind methodenabhängig. Daher wird die Reinheit des Wirkstoffs in der Regel durch eine Kombination von Methoden geschätzt. Bei der Auswahl und Optimierung der Analyseverfahren sollte der Schwerpunkt auf der Trennung des gewünschten Produkts von produktverwandten Substanzen und von Verunreinigungen liegen.

Die in diesen Produkten beobachteten Verunreinigungen werden in prozessbedingte und produktbedingte Verunreinigungen unterteilt:

- *Zu den prozessbedingten Verunreinigungen in der Arzneimittelsubstanz können Zellkulturmedien, Wirtszellproteine, DNA, monoklonale Antikörper oder chromatografische Medien gehören, die bei der Aufreinigung verwendet werden, sowie Lösungsmittel und Pufferkomponenten. Diese Verunreinigungen sollten durch den Einsatz geeigneter, gut kontrollierter Herstellungsverfahren minimiert werden.*
- *Produktbedingte Verunreinigungen in der Arzneimittelsubstanz sind molekulare Varianten mit Eigenschaften, die sich von denen des gewünschten Produkts unterscheiden und während der Herstellung und/oder Lagerung entstehen. Bei diesen Verunreinigungen sollten sich die Auswahl und die Optimierung der analytischen Verfahren auf die Trennung des gewünschten Produkts und der produktverwandten Substanzen von den Verunreinigungen konzentrieren.*

Einzelfall-bezogene und/oder kollektive Akzeptanzkriterien für Verunreinigungen sollten je nach Bedarf festgelegt werden."

Darüber hinaus gelten die Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs**, insbesondere über den Umfang der erforderlichen Spezifizierungen (vgl. gesetzliche Regelungen in § 55 AMG):

- *"Prozessbedingte Verunreinigungen aus dem vorgeschalteten Prozess können Wirtszellproteine, Wirtszell-DNA oder andere Medienbestandteile (z. B. Induktoren, Antibiotika, Serum) enthalten. Sie sind qualitativ und quantitativ zu bewerten."*
- *"Im Allgemeinen ist ein Reinigungsverfahren für parenterale Impfstoffe in der Lage, den Restgehalt an Wirtszell-DNA in den Endprodukten auf weniger als 10 ng pro Dosis zu reduzieren, aber die Akzeptanzgrenzen müssen von der zuständigen Behörde genehmigt werden."*
- *"Restliche Wirtszell-DNA: Der Gehalt an restlicher Wirtszell-DNA wird mit einer geeigneten Methode bestimmt, es sei denn, der Produktionsprozess wurde validiert, um eine geeignete Clearance nachzuweisen. Die quantitative PCR wird aufgrund ihrer Sensitivität und Spezifität empfohlen, es können aber auch andere geeignete Verfahren verwendet werden."*
- *"Verbleibende Plasmide: Wird ein transientes Produktionsverfahren angewandt, muss die Konzentration der restlichen kontaminierenden Plasmide quantifiziert werden."*

* ICH 1999:

ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products - Scientific guideline

<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q6b-specifications-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological-biological-products>

** Council of Europe (2020): ***EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Free access to supportive pharmacopoeial texts in the field of vaccines for human use during the corona virus disease (COVID-19) pandemic.***

Updated package October 2020. Übersetzungen aus dem Englischen.
<https://www.edqm.eu/en/d/99080>

Aus der Zusammenschau der oben aufgeführten Regularien ergibt sich somit für die Bewertung von DNA-Kontaminationen des COVID-19-mRNA-Impfstoffs von BioNTech (Comirnaty) folgendes Bild:

1. Grenzwert

Ein absoluter oberer Grenzwert für Kontaminationen mit Wirts-DNA und deren Abkömmlingen im Endprodukt ist mit 10 ng Gesamt-DNA pro Impfdosis anzugeben. Dabei sind mindestens folgende aus dem Wirts-Bakterium E. Coli stammende DNA-Fractionen zu unterscheiden: DNA-Matrize (Startmaterial*), Plasmide und summativ sonstige (heterogene) DNA-Fragmente.

Dies ergibt sich vor allem aus den einschlägigen Empfehlungen der WHO bzw. von WHO-Einrichtungen sowie aus dem Europäischen Arzneibuch. Eine Koppelung des Grenzwerts an die Wirkstoffmenge statt an das Endprodukt ist in diesen Quellen nicht vorgesehen. So wird die Wirkstoffmenge von Comirnaty zwar beispielsweise mit 30 µg Tozinameran für Erwachsene angegeben, aufgrund der Natur dieses Arzneimittels muss aber davon ausgegangen werden, dass diese Menge nicht präzise dosierbar ist. Der Grenzwert von 10 ng pro Dosis ist deshalb auf die Menge der bei einer Impfung verwendeten Injektionsflüssigkeit zu beziehen, im Fall von Comirnaty also 300 µl. **Entsprechend darf die injektionsfertige Verdünnung von Comirnaty eine maximale Gesamt-DNA-Konzentration von 33 ng/ml enthalten.**

2. Aufgrund der unterschiedlichen Schädigungspotentiale ist jede prozessbedingte Kontamination mit unterschiedlichen DNA-Fractionen aus den vorgeschalteten Prozessen gesondert qualitativ und quantitativ zu charakterisieren, wobei es insbesondere gilt, DNA-Matrize (Startmaterial*), Plasmide und summativ sonstige (heterogene) DNA-Fragmente getrennt zu erfassen. Grenzwerte für einzelne Fractionen bedürfen einer expliziten behördlichen Genehmigung auf Basis einer wissenschaftsbasierten Beurteilung der spezifischen Schadpotentiale, wobei die Gesamtmenge von 10 ng DNA pro Dosis nicht überschritten werden darf und die Länge der DNA-Spezies der von der WHO 2007 veröffentlichte Länge von 200 bp nicht überschreiten sollte.

Insbesondere aus den Bestimmungen des Europäischen Arzneibuchs ergibt sich die Notwendigkeit, die Verunreinigungsmuster der unterschiedlichen DNA-Fractionen im Endprodukt vollständig aufgefächert zu ermitteln, da nur so ein gegebenenfalls tatsächliches Schadpotential des Gesamtbilds beurteilt werden kann. Hinzu kommen die Regelungen der ICH-Guideline Q11 in Bezug auf Verunreinigungen für die DNA-Matrize als Startmaterial* in der Produktion von mRNA, denn aus dieser Quelle, also der Präparation des Startmaterials "DNA-Matrize", stammen alle Verunreinigungen des Endprodukts mit DNA.

3. In der praktischen Durchführung der Kontrolle von DNA-Kontaminationen in mRNA-Impfstoffen ist es somit notwendig, folgende Schritte zu berücksichtigen:

- a) Bestimmung der Gesamt-DNA im Endprodukt, wobei die Grenze von 33 ng/ml nicht überschritten werden darf.
- b) Festlegung von Grenzwerten für die einzelnen DNA-Fractionen, dies sind insbesondere:
 - Wirtszell-DNA und deren Fragmente
 - Plasmide und deren Fragmente
 - DNA-Matrizen und deren Fragmente
- c) Prozessvalidierung und Überprüfung ob die Stabilität der Prozesse erlaubt, die Notwendigkeit der aufgefächerten Bestimmung der DNA-Fractionen einzuschränken. In Abhängigkeit des Validierungsergebnisses sind die Details der Routinetestung behördlich zu genehmigen.

* ICH 2013: ICH Q11 Development and manufacture of drug substances
<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q11-development-manufacture-drug-substances-chemical-entities-biotechnological-biological>

4. Bestimmung der Gesamt-DNA-Kontaminationen in Chargen des m-RNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech, die in Deutschland in Verkehr gebracht worden waren

Nachdem McKernan und Kollegen in USA bei der Untersuchung des mRNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech drastische DNA- und Plasmid-Kontaminationen gefunden hatten, wurden in analoger Weise auch fünf noch versiegelte Chargen dieses Impfstoffs überprüft, die in Deutschland in Verkehr gebracht und zuvor vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) freigegeben worden waren.

Alle diesbezüglichen Untersuchungen wurden von dem renommierten medizinisch-molekularbiologischen Labor MMD in Magdeburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. Brigitte König durchgeführt. Frau Prof. König lehrt als Universitätsprofessorin in Magdeburg und Leipzig und kann über 500 begutachtete wissenschaftliche Veröffentlichungen vorweisen.



Analysenzertifikat 1 von 2

MMD GmbH & Co. KG | Breiter Weg 10 A | 39104 Magdeburg

Dr. Jürgen O. Kirchner
Dipl. Biol., MBA

Analysenergebnisse

21. August 2023

Sehr geehrter Herr Dr. Kirchner,

die Analyse einer Charge des Impfstoff Comirnaty (BNT162b2) von Biontech/Pfizer auf ihren DNA-Gehalt sowie auf die Anwesenheit von BNT162b2 spezifischen Plasmiden ergab folgendes Ergebnis:

BNT162b2		DNA-Gehalt	Plasmide
Chargennummer	Verfallsdatum	ng/µl	
GH9715	06/2023	9,45	nachweisbar

Untersucht wurde eine Durchstechflasche der Charge GH9715 mit der aufgedruckten Haltbarkeit von 06/2023. Die Probe wurden unter Einhaltung der Kühlkette im Labor versiegelt am 1.6.2023 angeliefert und dort bis zur Analyse am 28.06.2023 bei 2 bis 8 C gelagert. In das Mehrdosenbehältnis mit violettem Deckel der Charge GH9715 wurden 1,8 ml einer sterilen Natriumchlorid-Lösung 0,9 Prozent gespritzt. Analysiert wurde jeweils das gebrauchsfertig verdünnte Präparat.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. rer. nat. habil. Brigitte König

Magdeburg Molecular Detections
MMD GmbH & Co. KG

Verwaltung:

Breiter Weg 10 A
39104 Magdeburg
Telefon +49 391 5353797
Telefax +49 391 5353845
E-Mail info@mmd-web.de
Internet www.mmd-web.de

Labor:

Brenneckerstraße 20 (ZENIT II)
39118 Magdeburg
Telefon +49 391 6117209
Telefax +49 391 6117208
E-Mail labor@mmd-web.de

Bankverbindung:

BIC:
DEUT DE33MAG
IBAN:
DE20 8107 0024
0129 3794 00

Geschäftsführer:

Prof. Dr. Brigitte König
Rößlger Berndt

Registergericht:

Amtsgericht Stendal
HRA-Nr. 1950

Analysenzertifikat 2 von 2



MMD GmbH & Co. KG | Breiter Weg 10 A | 39104 Magdeburg

Dr. Jürgen O. Kirchner
Dipl. Biol., MBA

Analyseergebnisse

21. August 2023

Sehr geehrter Herr Dr. Kirchner,

die Analyse mehrerer Chargen des Impfstoff Comirnaty (BNT162b2) von Biontech/Pfizer auf ihren DNA-Gehalt sowie auf die Anwesenheit von BNT162b2 spezifischen Plasmiden ergab nachfolgend aufgeführtes Ergebnis.

Untersucht wurden mehrere Durchstechflaschen des Impfstoffs Comirnaty. Es handelte sich um ungeöffnete Vials. Die Proben wurden unter Einhaltung der Kühlkette ins Labor der MMD GmbH & Co. KG geliefert und dort bis zur Analyse bei 2 bis 8 C gelagert. Die ungeöffneten Impfstoffbehälter wurden mit je 1,8ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt.

BNT162b2		DNA-Gehalt	Plasmide
Chargennummer	Verfallsdatum	ng/µl	
FW1374	09/2022	7,78	Ja
343961B	06/2022	3,38	Ja
ACB5517	02/2022	11,8	Ja
FP1972	04/2022	2,78	Ja

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. rer. nat. habil. Brigitte König

Magdeburg Molecular Detections
MMD GmbH & Co. KG

Verwaltung:
Breiter Weg 10 A
39104 Magdeburg
Telefon +49 391 5353797
Telefax +49 391 5353845
E-Mail info@mmd-web.de
Internet www.mmd-web.de

Labor:
Bismarckstraße 20 (ZENT II)
39118 Magdeburg
Telefon +49 391 6117209
Telefax +49 391 6117208
E-Mail labo@mmmd-web.de

Bankverbindung:
BIC:
DEUT DE DBMAG
IBAN:
DE20 8107 0024
0129 3794 00

Geschäftsführer:
Prof. Dr. Brigitte König
Rüdiger Berndt
Registriergericht:
Amtsgericht Stendal
HRA-Nr. 1950

DNA-Gehalt in fünf versiegelten Chargen des mRNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech

BioNTech Charge	Verfallsdatum	DNA ng/µl	DNA ng/Dosis	Vielfaches des DNA-Grenzwerts von 10 ng	Plasmid-nachweis
GH9715	06/2023	9,45	2835	284-fach	JA
FW1374	09/2022	7,78	2334	233-fach	JA
343961B	10/2022	3,38	1014	101-fach	JA
ACB5517	04/2022	11,80	3540	354-fach	JA
FP1972	04/2022	2,78	834	83-fach	JA

Zunächst ist festzustellen, dass alle fünf untersuchten Chargen Plasmide enthalten. Dies belegt, dass die Herstellung nach dem sogenannten Prozess 2 erfolgt ist, also in Massenproduktion unter Verwendung von DNA-Matrizen, die aus Bakterien-Plasmiden gewonnen wurden. Im alternativen Prozess 1 spielen Plasmide keine Rolle, sie kommen darin schlicht nicht vor. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen von McKernan und Kollegen ist deshalb davon auszugehen, dass nach Prozess 2 hergestellten Chargen des COVID-19 mRNA-Impfstoffs Comirnaty von BioNTech produktionstechnisch bedingt generell hochgradig mit DNA verunreinigt sind und zwar in einer Dimension, die zweifellos nach den Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft über das vertretbare Maß weit hinaus geht.

Was dies wissenschaftlich bedeutet, wird in zahlreichen Veröffentlichungen zu Thema DNA-Verunreinigungen in parenteralen Arzneimitteln nicht nur von Wissenschaftlern, sondern auch von der WHO und europäischen Institutionen umfassend dargestellt. Eine aktuelle ausführliche Literaturanalyse zu diesem Thema findet sich in Anlage zum vorliegenden Dokument.

Um die Bedeutung der DNA-Kontaminationen zu bewerten, ist es unabdingbar, einen Grenzwert nach wissenschaftlichen Maßstäben zu definieren. Dies ist allein deshalb schon wichtig, weil bei Laboruntersuchungen in Proben, die nicht gerade destilliertes Wasser sind, der Wert "Null" praktisch nicht gemessen wird, sondern statt dessen in der Regel mindestens ein "Grundrauschen". Im vorausgegangenen Kapitel wurde diesbezüglich aufgezeigt, dass der Grenzwert für DNA-Kontaminationen in parenteralen Arzneimitteln seit vielen Jahren international mit dem Wert 10 ng pro verabreichter Dosis etabliert ist.

Gerade in Anbetracht des langen Anwendungszeitraums dieses Grenzwerts ist es völlig unverständlich, dass die hier vorliegende Überschreitung um mehr als das mehrere Hundertfache derart konsequent ignoriert werden konnte. Deshalb ist zu fragen:

- Wie war das möglich?
- Wer hat das zu verantworten?
- Und wie kann für die Zukunft Gleiches oder Schlimmeres verhindert werden?

Diese Fragen sind mit besonderem Nachdruck zu stellen, denn es gilt nicht weniger, als einen beispiellosen Betrug zu bewältigen, der nicht nur Gesundheit und Leben von Milliarden Menschen betrifft, sondern unsere genetische Identität in Frage stellt. Wenn es uns jetzt nicht gelingt die Antworten auf diese Fragen zu finden, wird das, was hier seine Fratze zeigt, eine eigene Dynamik entwickeln, die keiner rechtstaatlichen Kontrolle mehr zugänglich ist.

Ist das übertrieben?
Wohl kaum.

In Anbetracht dieser Befunde, die mRNA-Impfstoffchargen in USA und Europa betreffen, ist zu fragen, wieso dies von Herstellern und Behörden nicht zur Kenntnis genommen wurde. Ein Hinweis ergibt sich beispielsweise aus der folgenden Tabelle, die einem einschlägigen EMA-Report entnommen wurde*.

Table S.3.2-1 Residual DNA Template Results for Clinical, Initial Emergency Supply and Process Performance Qualification COVID-19 Vaccine BNT162b2 Drug Substance Batches (Andover)

Batch		20Y513C101	20Y513C201	20Y513C301	20Y513C401	20Y513C501
Sample	Acceptance Criteria	Results				
Drug Substance	≤ 330 ng DNA / mg RNA	17	29	10	23	211

Hier kommen drei wichtige Aspekte zum Ausdruck:

1. Angegeben wird nicht der Gesamt-DNA-Gehalt, sondern nur die im Wirkstoff verbliebenen DNA-Matrizen. Ebenfalls verbliebene Plasmide oder fragmentarische DNA wurden offensichtlich ignoriert, denn sonst würden die Regeln seriöser Wissenschaft dazu führen, dass nicht "Residual DNA Template", sondern "Total DNA Content" angegeben worden wäre.
2. Der zu unterschreitende Grenzwert wird hier nicht mit 10 ng pro Impfdosis, sondern mit 330 ng DNA pro mg RNA angegeben. Dies ist ein wohl wie folgt rechnerisch zustande gekommener Wert: Pro Dosis enthält Comirnaty 30 µg RNA-Wirkstoff Tozinameran, entsprechend wird kalkuliert, dass bei dieser Dosierung 10 ng DNA erlaubt seien. Da 30 µg ganze 33 mal in ein mg passen, wird der dazugehörige Grenzwert für DNA von 10 ng mit 33 multipliziert, was wiederum 330 ng DNA/ mg Tozinameran als Grenzwert ergibt.
3. Die unter 2. aufgezeigte Rechnung offenbart, dass die DNA-Kontaminationen nicht im Endprodukt, sondern nur im Wirkstoff Tozinameran bestimmt wurde, denn dieser wird in mg gewogen. Andere DNA-Verunreinigungen bleiben offenbar entgegen einschlägiger gesetzlicher Regelungen unbeachtet.

Bedeutung der Ergebnisse:

Die gefundene DNA-Kontamination des BioNTech-Impfstoffs mit grundsätzlich funktionsfähiger DNA übersteigt den von der EMA vorgegebene Grenzwert um das mehrere Hundertfache. Dieser DNA-Gehalt wird jedoch weder in der Gebrauchs- noch in der Fachinformation ausgewiesen, da als Verunreinigungen definierte Inhaltsstoffe eines Arzneimittels nicht auszuweisen sind. Diesbezüglich ist jedoch zu hinterfragen, ob es sich hier tatsächlich um eine Verunreinigung mit DNA handelt, oder ob die DNA nicht auch zur pharmakologischen Wirkung dieses Impfstoffs beiträgt, da diese zumindest teilweise Träger des aktivierbaren Gens des Spike-Proteins ist. Somit ist diese DNA grundsätzlich geeignet, Zellen des Geimpften zur Produktion des Spike-Proteins zu zwingen - und zwar zusätzlich zu dem Spike-Protein, das auf Basis der eingebrachten mRNA gebildet wird. Davon ist gemäß der vorliegenden Erkenntnisse zumindest für das Impf-Produkt auszugehen, welches nach dem von der EMA Prozess 2 genannten Verfahren hergestellt wird, also dem kommerziell vermarkteten Impfstoff. Das aber bedeutet wiederum, dass die hier als Verunreinigung bezeichneten DNA-Bestandteile des Impfstoffs als zusätzlicher Wirkstoff auszuweisen wären.

* EMA 2020: *Rapporteur Rolling Review critical assessment report, Quality aspects COVID-19 mRNA Vaccine BioNTech*
EMA/H/C/005735/RR/xxx (19 Nov 2020)

5. Bewertung des Risikoprofils der DNA-Kontaminationen des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech

5.1. Kontamination mit Plasmiden - ein generelles Qualitätsproblem

Laut des Assessment Reports der EMA vom Februar 2021 werden die für die Herstellung des mRNA-COVID-19-Impfstoffs von BioNTech nach Prozess 2 aus Coli-Bakterien gewonnenen Plasmide vor der mRNA-Produktion linearisiert. Dies ist ein für die Transkription und damit für die Produktion der mRNA notwendiger Schritt. Die Präsenz ganzer Plasmide im Endprodukt zeigt jedoch, dass die Linearisierung regelmäßig unvollständig erfolgt. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass dies bei den Qualitätskontrollen im Produktionsprozess nicht aufgefallen ist.

Wenn die Unvollständigkeit der Linearisierung der Plasmide von BioNTech, aber auch den Überwachungsbehörden hingenommen wird, spricht dies dafür, dass diesbezüglich ein grundsätzliches Problem bei der Herstellung vorliegt, das offensichtlich nicht gelöst werden konnte. Wie fundamental die Kontamination der mRNA-Impfstoffe mit Plasmiden ist, wird aus der Tatsache deutlich, dass dieses Problem nicht nur für die von BioNTech vermarkteten mRNA-Impfstoffe gilt, sondern laut der Untersuchungen von McKernan und Kollegen auch für die von Moderna.

Offenbar wurden hieraus aber keine Konsequenzen gezogen und stattdessen vor diesem Problem kapituliert. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die Herstellung von mRNA-Impfstoffen nach Prozess 2 für die Produktion im großtechnischen Maßstab bereits bezüglich der Bereitstellung der DNA-Matrizen nur ungenügend und deshalb regelmäßig mit einem erheblichen Kontaminationsgrad erfolgen kann. Das wiederum stellt in Frage, ob die Vorgaben der "Good Manufacturing Practice" (GMP, gute Herstellpraxis) bezüglich Prozess 2 überhaupt eingehalten werden.

Der nächste Schritt nach Beendigung des Transkriptions-Vorgangs, also der Erzeugung von mRNA, ist der Abbau der nun nicht mehr nötigen linearisierten DNA-Plasmide durch Enzyme (DNasen) in Nukleotide, um die Kontamination des Endprodukts mit DNA bereits an dieser Stelle des Herstellungsprozess Prozess 2 zu beseitigen. Die Abbauprodukte, also die nun vereinzelt Nukleotide der DNA, sollen bei der nachfolgenden Filtration abgetrennt werden. Nur, die sehr hohe Kontamination von freigegebenen Impfstoff-Chargen mit DNA zeigt dass auch der Schritt der DNA-Verdauung in Prozess 2 höchst ungenügend erfolgt. Damit liegt nach der ungenügenden Linearisierung von Plasmiden mit der ungenügenden Verdauung von DNA durch DNasen noch ein zweites schwerwiegendes Produktionsproblem vor, das die Sicherheit des Endprodukts in bedenklicher Weise in Frage stellt.

Bereits in ihrem ersten veröffentlichten Assessment Report bemängelte die EMA die unzureichenden Qualitätskontrollen der enzymatischen Verdauung von DNA-Kontaminationen, hinterfragte aber nicht die möglichen Konsequenzen für die Produktsicherheit und sorgte offensichtlich auch nicht für Abhilfe. Letzteres könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass Prozess 2 für die Massenproduktion ungeeignet ist und dass die EMA die resultierenden DNA-Kontaminationen schweigend hinnahm, um die Verfügbarkeit des Endprodukts zu ermöglichen - auch wenn dies in bedenklicher Weise die Produktsicherheit in Frage stellt. Möglicherweise könnte es aber auch so sein, dass die Herstellung von mRNA-Impfstoffen auf der Basis von Bakterien-Plasmiden nach Prozess 2 für das Upscaling, also die Produktion im großtechnischen Maßstab, generell ungeeignet ist.

Diese Problematik ist offensichtlich so groß, dass man wohl aufgegeben hat, über die Modulation der Produktion den DNA-Gehalt unter den Grenzwert von 10 ng pro Dosis zu bringen. Also wird nicht wie von WHO und europäischen Institutionen festgelegt nicht die Gesamt-DNA mit diesem Grenzwert abgeglichen, sondern nur die noch im Endprodukt befindlichen DNA-Matrizen. DNA, die größer oder kleiner ist, scheint vollständig ignoriert zu werden. Trifft dies zu, dürfte dies von hoher strafrechtlicher Relevanz sein (§§ 5 in Verbindung mit 95 AMG).

5.2. Das Risiko der Insertionsmutagenese

Es ist bekannt, dass die Lipid-Nanopartikel der mRNA-Impfstoffe und somit auch die in diesen enthaltenen DNA-Kontaminationen grundsätzlich in alle menschlichen Zellen eindringen kann, so dass eine dort dann stattfindende Integration der von McKernan und Kollegen, sowie dem deutschen Labor im mRNA-COVID-19-Impfstoff gefundene Plasmid-DNA in die menschliche DNA von vorn herein nicht ausgeschlossen werden kann. Weiter ist seit Jahrzehnten bekannt, dass das Einbringen einer Fremd-DNA in menschliche Zellen dem Organismus die grundsätzliche Möglichkeit bietet, diese Fremd-DNA stabil und nicht umkehrbar in das menschliche Genom einzubauen. Da dies letztendlich immer eine Mutation des menschlichen Genoms darstellt, wird dieser Prozess des Einbaus (Insertion) von Fremd-DNA als Insertionsmutagenese bezeichnet*.

Der Prozess der Insertionsmutagenese und die damit verbundenen Mutationen sind Gegenstand intensiver Forschung. Dabei werden die aus der Insertionsmutagenese resultierenden genotoxischen Wirkungen von Fremd-DNA grundsätzlich in drei Gruppen unterschieden:

a) Genregulation: Transkriptions- und epigenetische Regulationsmechanismen können beeinträchtigt werden, wodurch die Proteinexpression mit unvorhersehbaren und unerwünschten Ergebnissen fehlreguliert wird*.

b) Geninaktivierung: Die Insertion der DNA in das Wirtsgenom kann innerhalb eines Gens erfolgen, so dass die Funktion des Gens dadurch unterbunden wird. Dies kann zum Verlust essentieller Proteine in der Zelle und damit möglicherweise zur Entstehung verschiedenster Erkrankungen einschließlich Krebs führen*.

c) Genaktivierung: Bestimmte regulatorische und andere genomische Sequenzen können aktiviert werden. Dies kann die Synthese bestimmter Proteinen in der Zelle erhöhen, was ebenfalls ein Krebsrisiko darstellt. Da die auf diese Weise neu entstandenen Krebszellen zu klinisch manifesten Tumoren heranreifen können, ist diese Art der Integration inzwischen eine gängige Technik in der Tumorbiologie geworden**.

Das Auftreten bösartiger Erkrankungen durch DNA-Integration und daraus folgender Onkogenaktivierung wurde bereits im Jahr 2000 in einer klinischen Studie mit einem retroviralen Vektor zur Behandlung von Kindern mit SCID-X1 (schwerer kombinierter Immundefekt) nachgewiesen***.

* EMA 2013:

Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis EMA/CAT/190186/2012 (19 April 2013)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-management-clinical-risks-deriving-insertional-mutagenesis_en.pdf

** Bushman, F.D. 2020:

Retroviral insertional mutagenesis in humans: evidence for four genetic mechanisms promoting expansion of cell clone
 Mol. Ther., 28 (2020), pp. 352-356; <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1376>

*** Cavazzana-Calvo et al. 2000:

Gene therapy of human severe combined immunodeficiency M (SCID)-X1 disease Science. 2000;288:669–672.

*** Hacein-Bey-Abina, et al. 2003:

LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 Science 302: 415-419,

Damals wurde festgestellt, dass drei Jahre nach Behandlung 2 von 10 in dieser Weise behandelten Kinder an Leukämie erkrankt waren. Als Grund wurde die Integration von DNA in die Nähe eines Krebsgens identifiziert. Entsprechend haben die Autoren dieser Studie bereits damals angemahnt, dass eine Beobachtungszeit von 6 Monaten nach Behandlung mit DNA-Wirkstoffen nicht ausreicht, um Langzeitnebenwirkungen solcher Art zu erkennen.

Dies macht deutlich, wie essentiell gründliche und langfristige Untersuchungen zu möglichen genotoxischen Effekten auch für die Fremd-DNA sind, die gegebenenfalls mit dem mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech in den menschlichen Organismus eingebracht wird. Diese fehlen aber bisher, und zwar laut Assessment-Report der EMA vom Februar 2021 mit ausdrücklicher Genehmigung von EMA und EU-Kommission. Die nun von McKernan und Kollegen, sowie dem deutschen Labor gefundenen massiven DNA-Verunreinigungen lassen diese Problematik nun aber auf der Ebene der lokalen Aufsichtsbehörden akut werden, die für die Aufsicht der Produktionsanlagen verantwortlich sind, aus denen die DNA-Verunreinigungen stammen. Von diesen ist nun umgehend zu überprüfen, ob die für jeden Standort nötige Herstellerlaubnis Bestand haben kann.

Antwort von BioNTech auf eine Anfrage zu den Besonderheiten des mRNA-Impfstoffs per E-Mail mit der Aussage, dass DNA in Impfstoffen zu Insertionsmutationen führen kann. Dies muss folglich auch für die DNA-Verunreinigungen im BioNTech mRNA-Impfstoff gelten:

#[7488] Presseanfrage

Von: medinfo@BioNTech.de

An: j.o.kirchner@[REDACTED]

Datum: 15.01.2021 10:45:01

Sehr geehrter Herr Dr. Jürgen O. Kirchner,

vielen Dank für Ihre E-Mail und Ihr Interesse an BioNTech COVID-19-Impfstoff.

[Auslassung]

3. Bei mRNA ist das Risiko einer Insertionsmutagenese im Gegensatz zu DNA-basierten Impfstoffen ausgeschlossen.

Aufgrund der Wirkweise von mRNA-Impfstoffen, bei denen die Boten-RNA die genetische Information trägt und ihre Information im Zytoplasma der Zelle exprimiert wird, besteht kein Risiko für eine Insertionsmutagenese. Anders verhält es sich bei DNA-basierten Impfstoffen: Diese können an zufälliger Stelle in das Genom der Empfängerzelle integriert werden und so eine Mutation auslösen.

[Auslassung]

Mit freundlichen Grüßen,

Ihr BioNTech Service-Team

5.3. Das Risiko einer lang andauernden Expression des Spike-Proteins

Dem T7-Promoter, der sich vor dem Gen für das Spike-Protein auf dem von McKernan und Kollegen im mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech gefundenen Plasmid befindet, kommt für die Aktivierung dieses Gens eine wesentliche Rolle zu. Da der T7-Promoter aber wissenschaftlich nicht final charakterisiert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass je nach spezifischen Gegebenheiten das Spike-Protein in einer unbestimmten Menge von der Plasmid-DNA abgelesen und von der menschlichen Zelle synthetisiert wird. Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die bereits mehrfach bei Geimpften festgestellte lang anhaltende Nachweisbarkeit von Spike-Protein im Körper sein.

Das Risiko der Integration von intramuskulär verabreichter Plasmid-DNA in die genomische DNA wurde erstmals 2004 in einem Maus-Modell belegt*. Seither hat sich gezeigt, dass die Integration von Plasmid-DNA in das Wirtsgenom dann möglich wird, wenn die Wirtszelle in eine Zellteilung eintritt. Als sich in diesem Sinne teilende Zellen sind für den Menschen insbesondere die Stammzellen und Progenitorzellen sämtlicher Organe zu nennen. Vor allem Hautzellen, Zellen des Gastrointestinaltrakts, Blutzellen und Zellen des Knochenmarks durchlaufen konstant und schnell Zellteilungen. Jede Zellteilung beinhaltet die Auflösung des Zellkerns und damit die Freilegung der chromosomalen (genomischen) DNA der Zelle, so dass Plasmid-DNA in engen Kontakt mit der chromosomalen DNA des Menschen kommen und durch entsprechende Mechanismen der menschlichen Zelle ins Genom integriert werden kann.

Insgesamt ist der Mechanismus der Insertion von Fremd-DNA in Säugetierzellen auf molekularer Ebene noch nicht in der nötigen Weise verstanden. Entsprechend besteht diesbezüglich weiterhin ein hoher Forschungsbedarf. Insbesondere ist in diesem Kontext auch die Frage nach der Persistenz von einmal in eine teilungskompetente menschliche Zelle eingedrungener Plasmide bedeutsam. Denn, je länger diese überdauern, desto höher wird das Risiko der Insertionsmutagenese, also das Risiko, dass die das Gen für das Spike-Protein tragenden Plasmide in die genomische DNA der Geimpften integriert wird und von dort aus eine unkontrollierte Produktion von Spike-Protein stattfindet.

Obwohl das Risiko der Integration von Plasmid-DNA in die genomische DNA von Mensch oder Tier nun bereits über Jahrzehnte bekannt ist, gibt es noch immer keine hinreichenden Daten für die Häufigkeit dieses Geschehens oder die diesbezüglich wesentlichen Faktoren. Solange dies so bleibt, kann eine Abschätzung dieses Risikos zumindest hilfsweise auf Basis von Daten erfolgen die zur Integrationshäufigkeit von Adenovirus-DNA erhoben wurden. In diesem Sinne kam etwa eine 2022 an Mäusen durchgeführte Studie für eine Integrations-Häufigkeit von bis zu 0.005 pro Zelle (Leberzellen, in die das Adenovirus eingedrungen war). Das bedeutet, dass es bei einer von 200 mit dem Adenovirus infizierten Zellen zur Integration der Virus-DNA in die genomische DNA und damit zur Insertionsmutagenese kam**. Dieser Wert ist mehr als alarmierend, wenn er in Ermangelung spezifischerer Daten für ein in Verkehr befindliches Arzneimittel wie den mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech als denkbar angenommen werden muss.

* Wang, Z. et al. 2004: *Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation*
Gene Ther. 11(8):711-21; doi: 10.1038/sj.gt.3302213

** Wang, Z. et al. 2022: *Characterization of integration frequency and insertion sites of adenovirus DNA into mouse liver genomic DNA following intravenous injection*
Gene Ther; 29(6):322-332; doi: 10.1038/s41434-021-00278-2

Aber genau das ist der Fall in Anbetracht der vorliegenden Daten zur Verunreinigung dieses Impfstoffs mit DNA. Für jedes in Verkehr befindliche Arzneimittel muss aber der Nachweis der Unbedenklichkeit erbracht worden sein, andernfalls ist das in Verkehr bringen, aber auch die Behandlung damit, gemäß Arzneimittelgesetz strafbar (§ 5 AMG i.V.m. § 95 AMG).

Die Schädlichkeit einer langfristigen Expression des Spike-Proteins durch Zellen des menschlichen Körpers ist sicherlich in Autoimmunkomplikationen zu suchen. Nach aktuellen Forschungsergebnissen dürften aber insbesondere auch komplementvermittelte Entzündungsreaktionen eine wesentliche Rolle spielen (→ ausführliche Erläuterungen zu diesem Thema finden sich in der Buchveröffentlichung von David O. Fischer: *Die mRNA-Maschine*).

5.4. Das Risiko einer Antibiotika-Resistenz im Körper der Geimpften

McKernan und Kollegen identifizierten auf dem im mRNA-COVID-19-Impfstoff von BioNTech gefundenen Plasmid nicht nur ein Gen für das Spike-Protein, sondern auch ein Gen für Kanamycin-Resistenz. Dieses Gen kann aber auch in der menschlichen Zelle eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin etablieren, und noch dazu eine Kreuzresistenz gegen andere Antibiotika der Gruppe der Aminoglykoside, wie beispielsweise Gentamycin, Neomycin, Streptomycin und Dibekacin.

Eine solche zelluläre Multiresistenz gegenüber Aminoglykosiden könnte sich auf im Körper eingedrungene schädliche Bakterien durch horizontale Genaustauschprozesse ausbreiten, was wiederum deren Bekämpfung erheblich erschweren kann. Eine solche körpereigene Resistenz des Menschen gegen Antibiotika stellt deshalb ebenfalls ein schwerwiegendes Risiko dar, das nach derzeitigem Erkenntnisstand unabsehbare Folgen haben kann.

5.5. Pflicht zur Langzeitbeobachtung als Konsequenz der US-Arzneimittelbehörde

Im gegebenen Zusammenhang ist von essentieller Bedeutung, dass die geltenden Empfehlungen der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für Arzneimittel, die sich in das Genom integrieren können, eine Langzeitbeobachtungsstudie (LTFU) von bis zu 15 Jahren vorschreiben*. Dabei ist die Einbeziehung der Untersuchung neu aufgetretener bösartigen Erkrankungen, hämatologischer Störungen, Auftreten oder Verschlimmerung neurologischer Störungen, Autoimmunerkrankung oder potenziell produktbezogenen Infektionen notwendig.

Bislang sind diese auf dem Stand der Wissenschaft beruhenden Vorgaben in Bezug auf die mRNA-Impfstoffe nicht umgesetzt worden - offensichtlich in Unkenntnis der massiven Verunreinigung dieser Arzneimittel mit DNA und insbesondere in Form von Plasmiden. Nun aber, nachdem McKernan und Kollegen, sowie ein deutsches Labor für in Deutschland in Verkehr gebrachte Chargen die massive DNA-Kontamination dieser Impfstoffe nachgewiesen haben, muss diesbezüglich dringend ein Umdenken stattfinden. In diesem Sinne sind umgehend auch an mRNA-Impfstoffe die strengen Maßstäbe anzulegen, die bereits für andere Arzneimittel, die potentiell in das menschliche Genom integrierende Nukleinsäuren enthalten, selbstverständlich geworden sind.

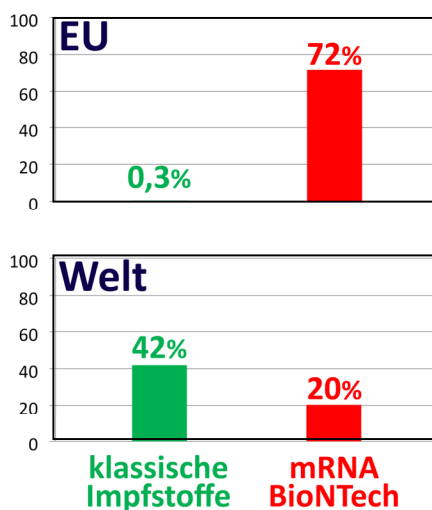
* U.S. Food and Drug Administration 2020: *Long Term Follow-Up After Administration of Gene Therapy Products*

<https://www.fda.gov/media/113768/download>

Epilog: Haben mRNA-Impfstoffe Vorteile gegenüber klassischen Impfplattformen?

Immer wieder wird behauptet, der BioNTech-mRNA-Impfstoff hätte weltweit Millionen Menschenleben gerettet, die ohne diesen verloren gewesen wären. Nur, hierfür gibt es keine validen Studien, die das belegen könnten. Auch die Behauptung, der BioNTech-Impfstoff sei besonders schnell verfügbar gewesen, trifft nicht zu. So hatte China auf die bewährte Technologie der Totimpfstoffe gesetzt und diese genauso schnell verfügbar gemacht, wie der Westen seine Gen-Impfstoffe. Am Ende hatte der BioNTech-Impfstoff gemäß der Absatzzahlen der WHO gerade einmal einen Weltmarktanteil von 20 %, die Vertreter klassischer Tot- oder Proteinimpfstoffe jedoch mehr als das Doppelte:

Marktanteile COVID-19-Impfstoffe



nach David O. Fischer 2023: *Die mRNA-Maschine*
Buchveröffentlichung, Neuauflage Juli 2023
ISBN 9 783752 692426

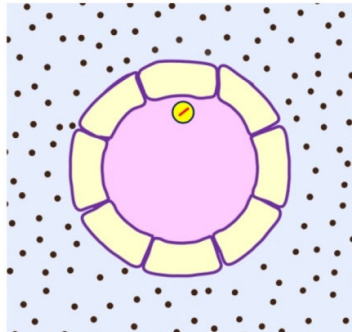
Als man von 30 Jahren mit der Entwicklung der mRNA-Technologie begann, war die biotechnologische Produktion von Proteinen noch sehr viel schwieriger, als es heute der Fall ist. Die Herstellung von mRNA schien eine lohnende Alternative zu sein, insbesondere wenn es um eine individualisierte Impfung ging, die man insbesondere für die Therapie von Krebs für aussichtsreich hielt. Inzwischen hat sich aber nicht nur die mRNA-Technologie, sondern auch die biotechnologische Produktion selbst komplexer Proteine stark weiter entwickelt. Wer ein maßgeschneidertes Protein als Antigen eines Impfstoffs einsetzen möchte, kann dies heute auch für individualisierte Therapieversuche bei spezialisierten Anbietern bestellen. Es genügt die Angabe der Aminosäure-Sequenz des gewünschten Proteins, deren Kenntnis ja auch für die Herstellung eines gleichsinnigen mRNA-Impfstoffs unerlässlich ist. Der Rest ist Routine.

So verhielt es sich auch mit dem Spike-Protein des Virus SARS-CoV2: Bereits kurz nach der Veröffentlichung der Aminosäure-Sequenz dieses Proteins, wurde es biotechnologisch hergestellt und für Forschungszwecke kommerziell angeboten. Hätte man in Anbetracht dessen nicht fragen müssen, warum dieses Protein für seine Verwendung als Impfantigen gegen COVID-19 statt in kultivierten Insektenzellen, wie es beispielsweise für den COVID-19-Proteinimpfstoff von Novavax geschieht, über die mRNA-vermittelte genetische Manipulation von Zellen der Geimpften hergestellt werden soll? Eine klare wissenschaftlich tragfähige Antwort scheint es jedoch nicht zu geben.

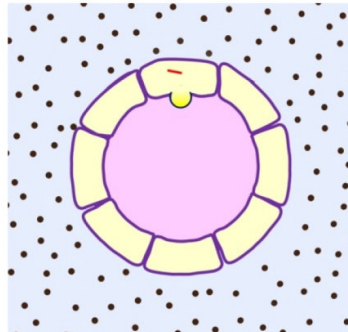
Stattdessen haben sich seit der Zulassung des BioNTech-mRNA-Impfstoffs gegen COVID-19 zahlreiche Hinweise ergeben, dass dieser von offizieller Seite her immer wieder als überaus gut verträglich dargestellte Impfstoff mit erschreckend vielfältigen Risiken behaftet ist. Hierzu gehören insbesondere Entzündungsreaktionen, die von kleinen und kleinsten Gefäßen ausgehen und die bei Obduktionen von Geimpften, die zeitnah zur Impfung verstorben waren, regelmäßig zu finden sind.

Unten ein Schaubild zum möglichen Mechanismus dieser Entzündungen, die praktisch im ganzen Körper vorkommen können und die voraussetzen, dass der Impfstoff in die Blutbahn gelangt*. Dass letzteres praktisch immer der Fall ist, war Ergebnis entsprechender Tierversuche^(→ Seite 2):

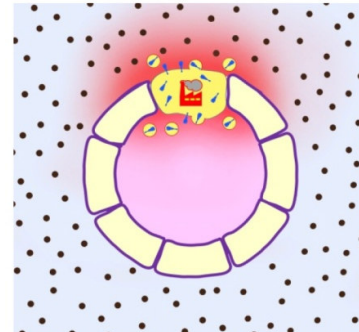
Querschnitt eines sehr kleinen Blutgefäßes: Mechanismus der Entzündung durch Spikeproduktion



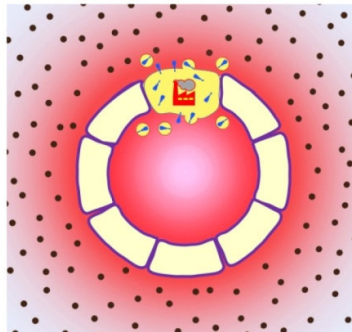
Ein Impfpartikel wird über die Blutbahn in ein sehr kleines Blutgefäß getragen



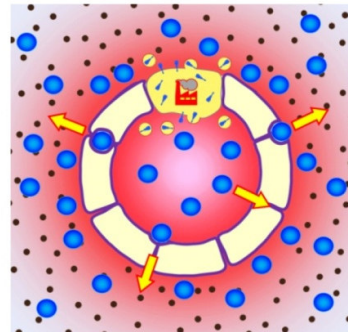
Nach dessen Anlagerung an die Gefäßwand dringt die mRNA mit dem Spike-Gen dort in eine Zelle ein.



Die Zelle wird durch Einwirkung der mRNA in eine Spike-Fabrik umgewandelt, das Spike wird freigesetzt und aktiviert das Komplementsystem.



Das Komplementsystem verursacht dann, dass sich die Umgebung des ganzen Gefäßes entzündet.



Im histologischen Bild ist dies daran zu erkennen, dass Lymphozyten die Gefäßwand durchwandern und im umliegenden Gewebe zur Entzündung beitragen.

Ausgehend von diesen kleinen entzündeten Blutgefäßen kommt es zum Übergriff der Entzündung auf das umliegende Gewebe.

Dass dies so ist, haben die Pathologen Arne Burkhardt, Walter Lang und Michael Mörz nachgewiesen und in mikroskopischer Digitalfotografie eindrucksvoll dokumentiert.*

© David O. Fischer 2023 (Die mRNA-Maschine)

Wie aber kommt es, dass wir solchen Mechanismen erst nach und nach auf die Spur kommen? Hätte das nicht schon vor der Zulassung erforscht werden müssen? Richtig, die anzuwendenden Regularien sagen das. Im Prüfbericht der EMA vom Februar 2021 zum mRNA-Impfstoff von BioNTech - hier BNT 162b2 genannt - steht übersetzt aus dem Englischen jedoch folgendes:

"Mit BNT162b2 wurden keine sekundären pharmakodynamischen, sicherheitspharmakologischen oder Wechselwirkungsstudien durchgeführt." **

Dies bedeutet nicht weniger, als dass auf dem Weg zur Zulassung wesentliche Sicherheitsstudien ausgelassen wurden. Welche Konsequenzen das für Geimpfte hatte und insbesondere langfristig hat, kann sich also erst nach und nach zeigen.

* David O. Fischer 2023: *Die mRNA-Maschine - Protokoll einer wahren Tragödie*
Buchveröffentlichung, **Neuaufgabe Juli 2023**, ISBN 9 783752 692426

** EMA 2021: *Assessment report Comirnaty vom 19. Februar 2021*
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000, EMA/707383/2020 Corr.1
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty®

Brigitte König ^{1,2} and Jürgen O. Kirchner ³

Experiment 1—Qubit® fluorometry: Influence of Triton-X-100 on RNA measurement in Comirnaty®

The detergent Triton-X-100 is suitable for dissolving lipid nanoparticles. This makes it possible to test how the dissolution of lipid nanoparticles affects the DNA content measured in the vaccine¹. Therefore, the influence of such a treatment with Triton-X-100 was tested regarding its influence on the quantification of DNA in Comirnaty® using Qubit® fluorometry.

For testing purposes, the conducting Laboratory Magdeburg Molecular Detections GmbH & Co. KG received various samples of different batches of the mRNA vaccine Comirnaty® (BNT162b2) from BioNTech/Pfizer. All these samples were provided as original sealed vials by official vaccination centres that stated that the samples had been deep-frozen or stored at 2°C–8°C until dispatch to Magdeburg Molecular Detections GmbH & Co. KG. The samples were dispatched in compliance with the cold chain (2 to 8 °C), which was established on arrival. The samples were stored at 2 to 8°C until they were analysed.

The samples were diluted in a ready-for-use state according to the applicable provisions before analysis with Qubit® according to the official instructions for use provided by the manufacturer. According to method documentation published by the Australian Therapeutic Goods Administration, the samples to be tested after the dissolution of lipid nanoparticles* were spiked with Triton-X-100 so that the final concentration was 1 %. Then, the samples were incubated for 15 minutes at room temperature.

RNA quantification was performed by employing fluorometry using the Qubit® RNA HS assay kit (ThermoFisher Scientific, Germany, catalogue number Q32852; batch 2397757) and a Qubit® 3 fluorometer were used according to the manufacturer's instructions.

Result

The treatment of a vaccine with Triton-X-100 led to a significant increase in RNA values. This effect appeared to depend partly on whether the batch had already expired at the time of measurement (batches 1 and 3) or whether it still had a long shelf life of 11 or more months at the time of measurement (batches 5 to 7). This suggests that in expired batches, the lipid nanoparticles were disintegrated even without Triton-X-100, whereas in vaccines with a long shelf life, they are still largely intact, so the RNA is not accessible for measurement due to this compartmentalisation.

Table S1. Qubit® fluorometry: Quantification of total RNA in batches of Comirnaty® (ready-to-use dilution) without and with Triton-x-100 (final concentration 1%). One representative experiment out of three is shown.

¹ Australian Government, Department of Health, Therapeutic Goods Administration, 2021: Quantitation of Total and Percent Encapsulated RNA in PF-07302048 Lipid Nanoparticles by RiboGreen Fluorescence Worksheet, dated 10 Aug 2021 and Pfizer - BNT162b2 - Quantification of Total and Percent Encapsulated RNA in PF-07302048 Lipid Nanoparticles by RiboGreen Fluorescence Assay Data, dated 01 Nov 2021, both together published by the Australian Therapeutic Goods Administration, <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-3390-07.pdf>.

No	Batch Designation	Expiry Date	Without Triton-X-100				With 1% Triton-X-100	
			RNA ng/ μ L	RNA ng/dose (300 μ L)	Remaining Time Until the Expiry Date Will be Reached	Months Exceeding the Expiry Date	RNA ng/ μ L	RNA ng/dose (300 μ L)
1	ACB5317	02/2022	76.8	23040	–	18 months	120	36000
2	FP1972	04/2022	5.12	1536	–	16 months	169	50700
3	34396TB	06/2022	73.6	22080	–	14 months	137	41100
4	FW1374	09/2022	13.1	3930	–	11 months	127	38100
5	HD9869	10/2024	1.5	450	11 months	–	141	42300
6	HH8656	12/2024	4.28	728	12 months	–	136	40800
7	23MH003	01/2025	5.36	1608	13 months	–	179	53700

Experiment 2—Qubit® fluorometry: Influence of Triton-X-100 on DNA measurement in Comirnaty®.

DNA quantification was performed by means of fluorometry using the Qubit 1X dsDNA HS assay kit (ThermoFisher Scientific, Germany, catalogue number Q33230; batch 2339927) and a Qubit 3 fluorometer according to the manufacturer's instructions. The measurement results must be compared with the limit value for the total DNA content of 10 ng of DNA per dose, as applicable to Comirnaty®. One dose consists of 300 μ L of ready-to-use vaccine (for further details, please see Experiment 1).

Result

Dissolving the lipid nanoparticles with Triton-X-100 resulted in a significantly increased DNA value, so it can be assumed that RNA was released from the lipid nanoparticles.

Table S2. Qubit® fluorometry: Quantification of total DNA in batches of Comirnaty® (ready-to-use dilution) without and with Triton-x-100 (final concentration 1%). One representative experiment out of three is shown.

No	Batch Designation	Expiry Date	Without Triton-X-100				With 1% Triton-X-100		Additional DNA released through treatment with Triton-X-100 in % of the total DNA found
			DNA ng/ μ L	DNA ng/dose	Remaining time until the expiry date will be reached	Months exceeding the expiry date	DNA ng/ μ L	DNA ng/dose (300 μ L)	
1	ACB5317	02/2022	11.8	3540	–	18 months	14.1	4230	16
2	FP1972	04/2022	2.78	834	–	16 months	14.6	4380	81
3	34396TB	06/2022	3.38	1014	–	14 months	17.8	5340	81
4	FW1374	09/2022	7.78	2334	–	11 months	17.0	5100	54
5	HD9869	10/2024	1.12	336	11 months	–	15.8	4740	93
6	HH8656	12/2024	0.556	166.8	12 months	–	12.0	3600	95
7	23MH003	01/2025	0.389	115.8	13 months	–	16.0	4800	98

Experiment 3—Qubit® fluorometry: Influence of DNA concentration on DNA measurement in Comirnaty®

To determine the influence of DNA concentration on DNA measurement, different amounts of DNA were added to vaccine samples (ready-to-use dilution).

Result

No relevant influence of the DNA concentration on the accuracy of the DNA measurement could be determined.

Table S3. Qubit® fluorometry: Influence of DNA concentration on DNA quantification. One representative experiment out of three is shown.

Dilution	Added DNA Standard Increasing the DNA Content by Adding the Standard in the Following Amounts	DNA Measured in the Sample (ng/μL)			
		Water		Comirnaty® Batch HD9869	
		Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard	Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard
0 control undiluted	0	0 (“too low”)	0	1.04	1.04
1:2	10 ng/μL	9.72	0	10.7	0.7
1:5	5 ng/μL	4.28	0	4.68	0
1:10	2 ng/μL	1.67	0	2.08	0.08
1:100	1 ng/μL	0.972	0	1.39	0.39
	0.1 ng/μL	0.104	0	0.504	0.404

Experiment 4—Qubit® fluorometry: Influence of Triton-X-100 on DNA measurement in Comirnaty®

The detergent Triton-X-100 is suitable for dissolving lipid nanoparticles. It can therefore be used to test how the dissolution of lipid nanoparticles affects the DNA content measured in the vaccine using fluorometry. To determine whether Triton-X-100 affects these measurements, the total DNA was first quantified with Qubit® fluorometry in aqueous DNA standards of different concentrations with and without 1% Triton X-100 (for further details, see experiment 1). In a parallel test, the same standard concentrations were added to the vaccine, and the total DNA was also quantified without and with 1% Triton X-100.

Result

Triton-X-100 does not influence DNA measurements. If a vaccine is treated with Triton-X-100, this leads to a significant increase in DNA values. This indicates that the otherwise intact lipid nanoparticles remove the DNA impurities from the measurement. If the lipid nanoparticles are disintegrated with Triton-X-100, these DNA impurities are also released and accessible for Qubit® measurement.

Sub-experiment 4a—Qubit® fluorometry: Influence of Triton-X-100 on DNA quantification control.

Sub-result 4a: The accuracy of the DNA measurement in the DNA standard (in the absence of the vaccine) is not affected by Triton-X-100

Table S4. Qubit® fluorometry: Influence of Triton-x-100 on DNA quantification. One representative experiment out of three is shown.

DNA Standard		DNA Measured in the Sample (ng/μL)			
Dilution	DNA Content	Without Triton-X-100		With 1% Triton-X-100	
		Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard	Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard
Control	0	0 ("too low")	0	0.0232	0
undiluted	10 ng/μL	9.48	0	9.56	0
1:2	5 ng/μL	6.00	0,1	6.64	1.64
1:5	2 ng/μL	2.03	0	1.92	0
1:10	1 ng/μL	0.98	0	0.804	0
1:100	0.1 ng/μL	0.112	0	0.124	0

Sub-experiment 4b – Qubit® fluorometry: Influence of adding 1% Triton-X-100 into Comirnaty® (ready-to-use dilution) on DNA quantification

Sub-result 4b: Dissolving the lipid nanoparticles with Triton-X-100 resulted in a significantly increased DNA value, so it can be assumed that DNA was released from the lipid nanoparticles.

Table S5. Qubit® fluorometry: DNA quantification in the mRNA vaccine (ready-to-use dilution) in the presence of 1% Triton-x-100. One representative experiment out of three is shown.

DNA Standard		DNA Measured in the Vaccine Comirnaty® Batch HH8656 (ng/μL)			
Dilution	Increasing the DNA Content by Adding the Standard in the Following Amounts	Without Triton X-100		With 1% Triton X-100	
		Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard	Measured Value	Measured Value Minus Added DNA Standard
Control	0	0.556	0,556	12.0	12.0
undiluted	10 ng/μL	8.32	0	21.2	11.2
1:2	5 ng/μL	4.88	0	15.6	10.6
1:5	2 ng/μL	1.62	0	13.0	11.0
1:10	1 ng/μL	0.884	0	11.6	10.6
1:100	0.1 ng/μL	0.331	0.231	10.0	9.9

Commentary

Methodological Considerations Regarding the Quantification of DNA Impurities in the COVID-19 mRNA Vaccine Comirnaty[®]

Brigitte König^{1,2}  and Jürgen O. Kirchner^{3,*}

¹ Magdeburg Molecular Detections GmbH & Co. KG, 39104 Magdeburg, Germany; brigitte.koenig@medizin.uni-leipzig.de

² Institute of Medical Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

³ Independent Researcher, 22307 Hamburg, Germany

* Correspondence: j.o.kirchner@email.de

Abstract: DNA impurities can impact the safety of genetically engineered pharmaceuticals; thus, a specific limit value must be set for them during marketing authorisation. This particularly applies to mRNA vaccines, as large quantities of DNA templates are used for their production. Furthermore, when quantifying the total DNA content in the final product, we must observe that, in addition to the mRNA active ingredient, DNA impurities are also encased in lipid nanoparticles and are therefore difficult to quantify. In fact, the manufacturer of the mRNA vaccine Comirnaty (BioNTech/Pfizer) only measures DNA impurities in the active substance by means of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR), whose DNA target sequence is less than just 1% of the originally added DNA template. This means that no direct DNA quantification takes place, and compliance with the limit value for DNA contamination is only estimated from the qPCR data using mathematical extrapolation methods. However, it is also possible to dissolve the lipid nanoparticles with a detergent to directly measure DNA contamination in the final product by using fluorescence spectroscopic methods. Experimental testing of this approach confirms that reliable values can be obtained in this way.

Keywords: mRNA vaccines; Comirnaty; DNA impurities; fluorescence spectroscopy; Qubit fluorometry



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

Academic Editor: Philip Hublitz

Received: 12 March 2024

Revised: 6 May 2024

Accepted: 7 May 2024

Published: 8 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. 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. Considerations

Among genetically engineered drugs, those with mRNA active ingredients are a special case, as their cell-free biosynthesis requires high concentrations of DNA templates, which must be removed before the products can be used as drugs. In the case of the COVID-19 mRNA vaccine Comirnaty[®] produced by BioNTech/Pfizer (BNT162b2) (Mainz, Germany), these templates are produced by plasmids obtained from bacterial cultures [1]. Thus, Comirnaty[®] has a special quality: DNA impurities are possible due to the manufacturing process; this may be relevant for all genetically engineered drugs, but it is otherwise rarely a problem [2]. This is due to the fact that genetically engineered active substances are predominantly proteins, which can be easily separated from DNA due to their chemical differences. Accordingly, DNA impurities in genetically engineered medicinal products have so far only been a marginal issue. However, the situation is quite different with mRNA vaccines: contaminating DNA and active ingredient mRNA are both nucleic acids and therefore chemically so similar that separation is far more difficult than separating DNA during the purification of protein active ingredients [3].

The addition of highly concentrated DNA templates, which are, in fact, linearized plasmids, to the reaction mixture that is used to produce an mRNA vaccine therefore poses a particular challenge for COVID-19 mRNA vaccines in terms of quality assurance with regard to contaminating DNA. In addition, the active substance in the form of mRNA only has low stability compared to contaminating DNA. Even exposure to room temperature

can lead to the decay of RNA, whereas DNA remains stable for decades under the same conditions in the absence of degrading enzymes [4]. The lipid nanoparticles used for drug formulation, whose function is to transport the mRNA into the cells of a vaccinated person, appear to be even more sensitive. Their disintegration, which already occurs at room temperature, makes it necessary to store Comirnaty[®] at very low temperatures. In order to achieve a shelf life that meets practical requirements, storage at -60 to -90 °C is therefore prescribed. Storage at 2 to 8 °C is also permissible but considerably shortens the product's shelf life [5].

In order to remove the DNA templates that were added during the production process and the accompanying residues of genomic DNA of the host bacteria after the production of the mRNA active ingredient, DNA digestion with the enzyme DNase I is first carried out in the reaction mixture after the completion of cell-free mRNA synthesis. Subsequent filtration is intended to remove the resulting DNA fragments, while the mRNA is retained [6].

This may sound simple, but it must be borne in mind that the considerable chemical instability of the mRNA used can pose a problem. This is particularly because DNase digestion takes place at temperatures above 35 °C and under stirring—i.e., under conditions that could lead to significant losses of the mRNA active ingredient if the exposure lasts long enough. This means that DNA digestion must be limited in every respect, so that the mRNA yield remains economical while, at the same time, the DNA content is kept below a limit to be set in each case. This limit was set as part of the authorisation of Comirnaty[®], with a limit value of 10 ng DNA per dose [6,7], corresponding exactly to the relevant WHO recommendations for genetically engineered medicinal products [2].

The fact that this limit value was successfully met in the production of Comirnaty[®] was generally accepted as a given after its authorisation. However, this dogma had to be reconsidered after the US scientist Kevin McKernan and his team made it public that they had found large quantities of DNA impurities in Comirnaty[®] [8], most of which were present in quantities that were several hundred times higher than the applicable limit of 10 ng DNA per dose. Other scientists followed with their own results, including the Canadian group led by David Speicher [9] and the US cancer researcher Phillip Buckhaults, who presented his findings to the South Carolina Senate [10].

Is it therefore possible that the DNA quantifications carried out for Comirnaty[®] as part of batch testing were incorrect? In order to verify this, it is first necessary to examine the methodical procedure employed. This question primarily stems from a European Medicines Agency (EMA) document that was created as part of the approval procedure and dates from 19 November 2020 [6]. This source states that DNA quantification takes place in the active substance after DNase digestion and filtration have been carried out. This document also states that the method of choice for this DNA analysis is a quantitative polymerase chain reaction, abbreviated as qPCR, wherein the target sequence is only 69 base pairs of the total 7824-base-pair-long DNA template, whereby the sequence of the T7 promoter is integrated, an important step for the transcription process for the production of the mRNA active substance. Therefore, only the presence of this sequence is checked; the remaining 7755 base pairs, and thus 99% of the template, and any remaining genomic DNA of the host bacterium remain undetermined.

According to further official information from the German government [11], a theoretical DNA content is extrapolated from the measured value, obtained via this qPCR measurement, and compared with the limit value of 10 ng DNA per dose. What this means in detail is explained in the EMA document from 19 November 2020, which has already been cited above [6]. According to this document, a dilution series is produced with the linearized plasmid, which serves as a DNA template for in vitro transcription and which, in turn, is to be measured using qPCR. A standard curve is generated from the data obtained when measuring the dilution series. Finally, the measurement results of the active substance samples are mathematically compared with this standard curve through extrapolation. However, it is not clear from the description of the above-mentioned EMA document that the processes to which the DNA templates, i.e., the linearized plasmids,

are subjected during the manufacturing process are taken into account in any way. This applies in particular to *in vitro* transcription, in addition to DNase and proteinase digestion and filtration, processes that remove small DNA and protein fragments into which the DNA templates and the added enzymes have been degraded. Anything that affects the linearized plasmids during the manufacturing process does not appear to be taken into account when creating the standard curve. However, this would be necessary to allow the standard curve to actually reflect what the qPCR measures. This applies in particular to what actually happens during DNase digestion. With this in mind, the following questions are of the utmost importance:

1. Which DNA fragments are specifically formed during DNase digestion, and is the qPCR target sequence actually degraded proportionally to the entirety of the remaining fragments of the linearized plasmids? Are distinct sequences of the linearized plasmids degraded more frequently or significantly less frequently by DNase than others?
2. What influence do the *in vitro* transcription conditions have on the sequence of the T7 promoter, which is part of the qPCR target sequence? It should be considered that the T7 promoter has a special affinity for the polymerase used, so the target sequence may be at least partially masked by the polymerase or its fragments resulting from proteinase digestion and therefore be potentially unmeasurable using qPCR.
3. Does the target sequence, which is only 69 base pairs long, actually remain in a quantity that is proportional to the other sequences remaining after DNase digestion and the subsequent filtration steps? If the proportionality is not given, any extrapolation is bound to be wrong.

These questions show that when using DNA quantification via qPCR, it is difficult to obtain reproducible values that correspond to the actual ratios for the given question, i.e., whether the limit value of 10 ng DNA per dose of the end product is adhered to.

Against this background, it is no surprise that the European Pharmacopoeia 2.6.35. Quantification And Characterization of Residual Host-Cell DNA [12] states that qPCR is the method of choice for the quantification of specific DNA sequences, while the measurement of total DNA is not assigned to qPCR but to other methods.

A further communication from the German Federal Government [7] also states that batch testing in Europe is carried out according to a protocol [13] published by the European Directorate for Quality in Medicine, EDQM. This document confirms the following: apart from the singular measurement at the active substance level conducted by the manufacturer, no further experimental DNA quantification is carried out for the vaccine, especially not for the final product, not even in the context of official batch testing.

This approach raises the question of how this can be justified. The answer can also be found in an official statement made by the German government [11]. According to this statement, the quantification of DNA impurities should be carried out in the active substance, as a measurement in the ready-to-use vaccine could be disturbed by the lipid nanoparticles that it contains, which could lead to incorrect values. At first glance, this sounds acceptable. However, further examination of the EDQM protocol shows that the mRNA active ingredient—a nucleic acid like DNA—is quantified despite the lipid nanoparticles contained in the final product. But if the quantification of mRNA is not disturbed by lipid nanoparticles, this should, in principle, also apply to the quantification of DNA due to the common properties of nucleic acids. Hence, how is it that the quantification of RNA in the end product is accepted as feasible by state institutions, while the quantification of DNA at the same level of production, i.e., in the ready-to-use vaccine, is not?

Documents published by the Australian Therapeutic Goods Administration (Australian Government, Department of Health) provide important facts for answering this question. Firstly, there is a batch release document for Comirnaty® that has been issued by Sciensano, the National Laboratory of Belgium [14]. This document reveals that RNA is determined in the final vaccine using a fluorescence spectrometric method. Another document published by the Australian Therapeutic Goods Administration [15] reveals what this method is, as it provides validation data concerning this method. According to this

document, the RNA-specific fluorescent dye RiboGreen[®] is used for mRNA quantification in Comirnaty[®] at the level of the finished product. This dye binds highly specifically to RNA, resulting in fluorescence that is proportionally dependent on the amount of RNA that is present and can be measured. RiboGreen[®], in turn, is one of the fluorescent dyes that are part of the fluorometric Quant-iT[®] system produced by ThermoFisher Scientific (Dreieich, Germany) [16].

Since Quant-iT[®] measurements are carried out using the analysers that are regularly available in quality control laboratories, it is necessary to validate a method specifically on the device used. Such a validation was recorded in the aforementioned documentation published by the Australian Government [15]. These validation data also reveal that for RNA quantification, it is necessary to disintegrate the lipid nanoparticles in order to release the mRNA that is bound in them and make it accessible for measurement, wherein this disintegration of the lipid nanoparticles is in turn carried out using the detergent Triton-X-100 (final concentration 1%).

In addition to the RNA-specific RiboGreen[®], the analogue but DNA-specific fluorescent dye PicoGreen[®] is also available as an alternative, so that DNA quantification in the final vaccine can be carried out just as reliably as RNA quantification after the disintegration of the lipid nanoparticles using Triton-X-100 [15]. In addition to the Quant-iT[®] system, ThermoFisher Scientific also offers the Qubit[®] system for specific quantification using fluorescent dyes. While Quant-iT[®] enables a higher sample throughput with standard laboratory equipment (microtitre plate readers), Qubit[®] is the method of choice in laboratories where no equipment for extensive routine tests is available and a comparatively low sample throughput is expected [17]. Qubit[®] uses an automated fluorescence spectrometer that can be combined with standardised Qubit[®] test kits. These Qubit[®] kits are optimised for either RNA or DNA quantification, and standardised kits for protein quantification are also available [18]. Due to this versatility, Qubit[®] is standard equipment in many molecular biology laboratories. The excellent selectivity of Qubit[®] has been extensively validated and documented by the manufacturer, as has the low influence of impurities contained in the samples. In particular, it was proven that high quantities of RNA do not alter Qubit DNA quantification, while the Nanodrop[®] spectrophotometer failed in this regard [19]. Qubit[®] therefore has an advantage over Quant-iT[®]: certain test validations that are required when using Quant-iT[®] on the standard device used can be omitted due to the manufacturer's calibration [18]. The two systems, Quant-iT[®] and Qubit[®], therefore correspond to each other in terms of functionality. This means that both Quant-iT[®] and Qubit[®] can distinguish DNA and RNA with the highest reliability using highly specific binding fluorescent dyes.

It was therefore necessary to investigate the practical suitability of Qubit for the quantification of total DNA in Comirnaty. To this end, a series of experiments were carried out, involving both RNA and DNA quantification (details are given in the Supplementary Materials, including data on possible confounding factors).

Figure 1 shows the results of measuring mRNA with Qubit[®] in seven batches of Comirnaty[®] without and after treatment with Triton-X-100. Four batches were already expired, while three batches had a remaining shelf life of 11 to 13 months. The results clearly show that the treatment of Comirnaty[®] with Triton-X-100 leads to a significant increase in RNA values. In the specific series of tests carried out, this effect appears to depend partly on whether the batch had already expired at the time of measurement or whether it still had a long shelf life. This means that in two of four expired batches, also without Triton-X-100, over 50% of the total RNA was measurable. This suggests that in expired batches, the lipid nanoparticles are disintegrated, even without Triton-X-100, whereas in vaccines with a long shelf life, 97 to 99% of the total RNA was only measurable after the lipid nanoparticles were dissolved with Triton-X-100 (further details are included in the Supplementary Materials).

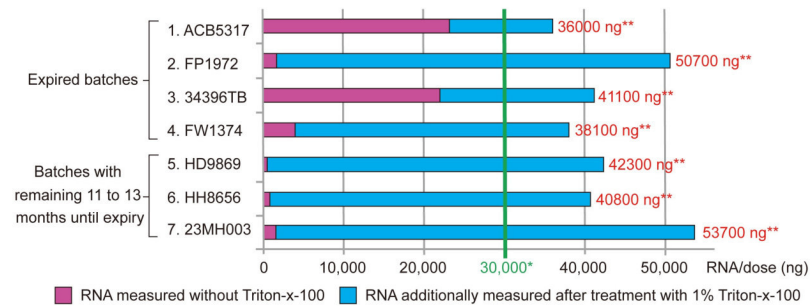


Figure 1. Quantification of total RNA in batches of Comirnaty[®] using Qubit[®] fluorometry without and with the addition of Triton-X-100 as a detergent to disintegrate the lipid nanoparticles contained in the vaccine formulation. The measured values shown as bars in the figure refer to the total RNA content in ng per dose of ready-to-use diluted Comirnaty[®]. In all batches, it was found that the measured RNA value increased considerably after treatment with Triton-X-100. As expected, this could only be a consequence of the dissolution of the lipid nanoparticles and the resulting release of the RNA that was bound in them. In batches 1 to 4, which had all expired, it was found that after treatment with Triton-X-100, between 36 and 97% of the maximum measured RNA value had become accessible for measurement due to the dissolution of the lipid nanoparticles, while in batches 5 to 7, which still had a shelf life of 11 to 13 months, this value was between 97 and 99% of the total RNA. Two of four expired batches may have largely disintegrated even without treatment with a detergent, whereas this was only caused by Triton-X-100 in the batches with a longer shelf life. Irrespective of this, however, very high RNA values were measurable in all batches after Triton-X-100 treatment, significantly exceeding the target value for one dose of 30 µg (30,000 ng). * Target value for one dose: 30,000 ng (30 µg) of RNA (300 µL of ready-to-use Comirnaty). ** Total RNA ng/dose after treatment with 1% Triton-X-100.

However, if the mRNA active substance was quantifiable using fluorescence spectrometry in the final mRNA vaccine after it was treated with Triton-X-100, this should also be possible for the DNA impurities as an integrated part of the batch testing of Comirnaty[®].

In order to verify this assumption, corresponding DNA quantifications in ready-to-use diluted Comirnaty[®] batches with and without Triton-X-100 were conducted. Figure 2 shows the results (further details are included in the Supplementary Materials): if Comirnaty[®] is treated with Triton-X-100, the result is a significant increase in DNA values for some of the batches but not for others. In the specific series of tests carried out, this effect appears to depend on whether the batch had already expired at the time of measurement or whether there was still a long shelf life of 11 or more months at the time of measurement. This suggests, as already found via mRNA testing, that in expired batches, the lipid nanoparticles are at least partly disintegrated even without Triton-X-100, whereas in vaccines with a long shelf life, they are still largely intact and include the DNA impurities, so they are not fully accessible for measurement due to this compartmentalisation.

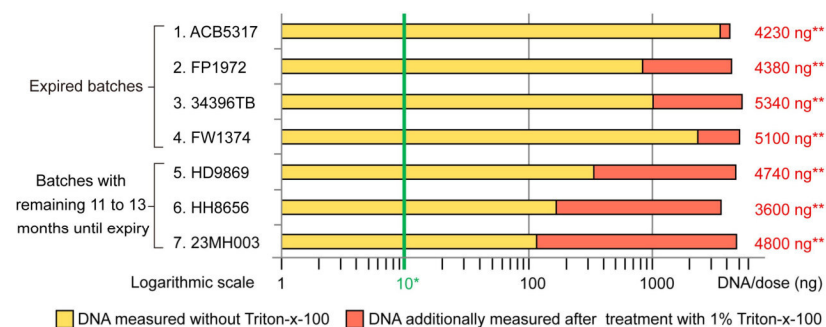


Figure 2. Quantification of total DNA in batches of Comirnaty[®] using Qubit[®] fluorometry without and with the addition of Triton-X-100 as a detergent to disintegrate the lipid nanoparticles contained

in the vaccine formulation. The measured values shown as bars in the figure refer to the total DNA content in ng per dose of ready-to-use diluted Comirnaty®. These measurement results must be compared with the limit value for the total DNA content of 10 ng DNA per dose for Comirnaty®. One dose consists of 300 µL of ready-to-use vaccine. In all batches, it was found that the measured DNA value increased considerably after treatment with Triton-X-100. As expected, this could only be a consequence of the dissolution of the lipid nanoparticles and the resulting release of the DNA that was bound in them. In batches 1 to 4, which had all expired, it was found that after treatment with Triton-X-100, between 16 and 81% of the maximum measured DNA value had become accessible for measurement due to the dissolution of the lipid nanoparticles, while in batches 5 to 7, which still had a shelf life of 11 to 13 months, this was even as high as between 93 and 97% of the total DNA. This indicates that the lipid nanoparticles from expired batches may have largely disintegrated even without treatment with a detergent, whereas this was only caused by Triton-X-100 in the batches with a longer shelf life. Irrespective of this, however, very high DNA values were measurable in all batches after Triton-X-100 treatment, with these values ranging from 360 to 534 times the permissible DNA limit or 3600 to 5340 ng DNA per dose. * Threshold of 10 ng of DNA/dose (300 µL of ready-to-use Comirnaty). ** Total DNA ng/dose after treatment with 1% Triton-X-100.

2. Conclusions

The available information and data indicate that the ready-to-use mRNA vaccine Comirnaty contains DNA impurities that exceed the permitted limit value by several hundred times and, in some cases, even more than 500 times, and that this went unnoticed because the DNA quantification carried out as part of batch testing only at the active substance level appears to be methodologically inadequate when using qPCR, as explained above. Because of the conditions during the production of the mRNA active substance of Comirnaty, the applied qPCR is designed so that a massive under-detection of DNA impurities appears to be the result. Here, we have to remember that qPCR is matchless if specific DNA sequences are being quantified, but this is not the case if the aim is the quantification of the total DNA content. However, DNA contamination in Comirnaty is about total DNA, regardless of the sequences that it contains. Accordingly, it can be assumed that a fluorescence spectrometric measurement of the total DNA in the end product, analogous to the quantification of the mRNA active ingredient, a process that is, in fact, carried out in the end product, is not associated with a risk of under-detecting DNA contaminations but rather provides reliable values and thus satisfies the required level of drug safety.

Against this background, experimental testing of the total DNA contained in the ready-to-use diluted vaccine Comirnaty® via fluorescence spectrometric measurement, which is to be carried out by the authorities as part of the legal mandate for official batch testing, appears to be essential. Why this was systematically omitted by the European control laboratories according to the statements by the German Federal Government cited above should therefore be the subject of extensive expert discussions and reconsiderations.

Further, it should also be taken into account that DNA impurities in Comirnaty® are apparently integrated into the lipid nanoparticles and are thus transported directly into the cells of a vaccinated person, just like the mRNA active ingredient. What this means for the safety risks, particularly the possible integration of this DNA into the human genome, i.e., the risk of insertional mutagenesis, should be a secondary focus of the discussion required, which must go far beyond what could have been considered years before the so unexpected introduction of mRNA pharmaceuticals into the global market.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/mps7030041/s1>: Table S1. Qubit® fluorometry: Quantification of total RNA in batches of Comirnaty® without and with Triton-X-100. Table S2. Qubit® fluorometry: Quantification of total DNA in batches of Comirnaty® without and with Triton-X-100. Table S3. Qubit® fluorometry: Influence of DNA concentration on DNA quantification.

Table S4. Qubit® fluorometry: Influence of Triton-X-100 on DNA quantification. Table S5. Qubit® fluorometry: DNA quantification in the mRNA vaccine in the presence of 1% Triton-X-100.

Author Contributions: Conceptualization, B.K. and J.O.K.; methodology, B.K.; Writing—original draft, J.O.K.; writing—review & editing, B.K. and J.O.K.; project administration, B.K. and J.O.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors wish to thank Irina Kouznetsova for technical and scientific support.

Conflicts of Interest: B.K. is CEO of Magdeburg Molecular Detection GmbH & Co. KG. The company played no role in the design of the study, the collection, analysis, or interpretation of data, the writing of the manuscript, or the decision to publish the article.

References

1. European Medicines Agency EMA. Assessment Report Comirnaty. Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000, EMA/707383/2020 Corr.1. 19 February 2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 26 February 2024).
2. WHO. Meeting Report Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals. 11–12 June 2007. Available online: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/cell-substrates/cells.final.mtgrep.ik.26_sep_07.pdf?sfvrsn=3db7d37a_3&download=true (accessed on 26 February 2024).
3. Tan, S.C.; Yiap, B.C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 574398. [\[CrossRef\]](#)
4. Minchin, S.; Lodge, J. Understanding biochemistry: Structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 433–456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. WHO. Training on Handling, Storing and Transporting Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine COMIRNATY®(Tozinameran). 15 February 2024. Available online: [https://www.who.int/publications/m/item/training-on-handling--storing-and-transporting-pfizer-biontech-covid-19-mrna-vaccine-comirnaty--\(tozinameran\)](https://www.who.int/publications/m/item/training-on-handling--storing-and-transporting-pfizer-biontech-covid-19-mrna-vaccine-comirnaty--(tozinameran)) (accessed on 26 February 2024).
6. European Medicines Agency EMA. Rapporteur Rolling Review Critical Assessment Report, Quality Aspects COVID-19 mRNA Vaccine BioNTech. 19 November 2020. EMEA/H/C/005735/RR/xxx. Available online: <https://factreview.gr/wp-content/uploads/2023/07/Rolling-Review-Report-Quality-COVID-19-mRNA-Vaccine-BioNTech.pdf> (accessed on 26 February 2024).
7. German Government. Antwort auf eine Anfrage von Abgeordneten des Deutschen Bundestages, Deutscher Bundestag Drucksache 20/9697, 20. Wahlperiode. 12 December 2023. Available online: <https://dserver.bundestag.de/btd/20/096/2009697.pdf> (accessed on 26 February 2024).
8. McKernan, K.; Helbert, Y.; Kane, L.T.; McLaughlin, S. Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose. *OSF Prepr.* **2023**. [\[CrossRef\]](#)
9. Speicher, D.J.; Rose, J.; Gutschi, L.M.; McKernan, K. 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*. 19 October 2023. Available online: <https://osf.io/preprints/osf/mjc97> (accessed on 26 February 2024).
10. Buckhaults, P. The Pfizer mRNA Vaccine Is Contaminated with the Plasmid DNA Vector That Was Used as the Template for In Vitro Transcription Reaction. Presentation to the Senate of South Carolina. 12 September 2023. Available online: <https://www.scstatehouse.gov/CommitteeInfo/SenateMedicalAffairsCommittee/PandemicPreparedness/Phillip-Buckhaults-SC-Senate-09122023-final.pdf> (accessed on 26 February 2024).
11. German Government. Schriftliche Fragen von Abgeordneten des Deutschen Bundestages mit den in der Woche vom 11. Dezember 2023 Eingegangenen Antworten der Bundesregierung, Antwort auf Frage Nr. 104, Deutscher Bundestag Drucksache 20/9697, 20. Wahlperiode. 15 December 2023. Available online: <https://dserver.bundestag.de/btd/20/098/2009807.pdf> (accessed on 26 February 2024).
12. Council of Europe. Quantification and Characterisation of Residual Host-Cell DNA, Free access to Supportive Pharmacopoeial Texts in the Field of Vaccines for Human Use during the Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic, Updated Package—October 2020, Published in Accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No. 50). 2020: 2.6.35. Available online: <https://www.edqm.eu/en/d/99080> (accessed on 26 February 2024).
13. Council of Europe. EDQM—OCABR Network Human Biologicals—Official Control Authority Batch Release of Pandemic COVID-19 Vaccine (mRNA). Guideline for Pandemic COVID-19 Vaccine (mRNA). 2021. Available online: https://www.sciensano.be/sites/default/files/guideline_for_pandemic_covid-19_vaccine_mrna.pdf (accessed on 26 February 2024).

14. Sciensano National Control Laboratory Belgium. EU/EEA Official Control Authority Batch Release Certificate—Comirnaty Finished Product, Certificate Number: BE/21/2030, Dated 20 October 2021, Published by the Australian Therapeutic Goods Administration. 2021. Available online: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-3390-11.pdf> (accessed on 26 February 2024).
15. Australian Government, Department of Health, Therapeutic Goods Administration. Quantitation of Total and Percent Encapsulated RNA in PF-07302048 Lipid Nanoparticles by RiboGreen Fluorescence Worksheet, Dated 10 August 2021 and Pfizer—BNT162b2—Quantification of Total and Percent Encapsulated RNA in PF-07302048 Lipid Nanoparticles by RiboGreen Fluorescence Assay Data, Dated 1 November 2021, Both Together Published by the Australian Therapeutic Goods Administration. 2021. Available online: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/foi-3390-07.pdf> (accessed on 26 February 2024).
16. Molecular Probes. Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit, Manual. 2008. Available online: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp11490.pdf> (accessed on 26 February 2024).
17. Invitrogen. Comparison of Quant-iT and Qubit DNA Quantitation Assays for Accuracy and Precision, Application Note. 2016. Available online: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/comparison-quantit-qubit-dna-quantitation-app-note.pdf> (accessed on 26 February 2024).
18. Invitrogen. Qubit 4 Fluorometer, Manual. 2021. Available online: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf (accessed on 26 February 2024).
19. Invitrogen. Comparison of Fluorescence-Based Quantitation with UV Absorbance Measurements, Technical Note. 2018. Available online: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Technical-Notes/fluorescence-UV-quantitation-comparison-tech-note.pdf> (accessed on 26 February 2024).

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.