

Sequenzierung von bivalenten Moderna- und Pfizer-mRNA-Impfstoffen zeigt Nanogramm- bis Mikrogramm-Mengen an dsDNA des Expressionsvektors pro Dosis

Kevin McKernan, Yvonne Helbert, Liam T. Kane, Stephen McLaughlin
Medicinal Genomics, 100 Cummings Center, Suite 406-L, Beverly Mass, 01915

Zur Bewertung der Nukleinsäurezusammensetzung von vier abgelaufenen Fläschchen der bivalenten mRNA-Impfstoffe von Moderna und Pfizer wurden mehrere Methoden angewandt. Zwei Fläschchen jedes Herstellers wurden mit Illumina-Sequenzierung, qPCR, RT-qPCR, Qubit™ 3 Fluorometrie und Agilent Tape Station™ Elektrophorese untersucht. Mehrere Assays belegen eine DNA-Kontamination, die die Anforderungen der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) von 330ng/mg und der FDA von 10ng/Dosis übersteigt. Diese Daten können sich auf die Überwachung von Impfstoff-mRNA in Muttermilch oder Plasma auswirken, da RT-qPCR-Assays, die auf die Impfstoff-mRNA abzielen, ohne RNase- oder DNase-Nuklease-Behandlung DNA nicht von RNA unterscheiden können. Ebenso müssen Studien zur Bewertung der Reverse-Transkriptase-Aktivität von LINE-1 und Impfstoff-mRNA die hohe DNA-Kontamination der Impfstoffe berücksichtigen. Das genaue Verhältnis von linearer fragmentierter DNA zu intakter zirkulärer Plasmid-DNA wird noch untersucht.

Es werden quantitative PCR-Tests beschrieben, die zum Nachweis der DNA-Kontamination verwendet werden.

Einführung

In mehreren Studien wurde ein längeres Vorhandensein von Impfstoff-mRNA in Muttermilch und Plasma festgestellt (Bansal et al. 2021; Hanna et al. 2022; Castruita et al. 2023). Dies könnte auf die Stabilität von N1-Methylpseudouridin (m1Ψ) in der mRNA des Impfstoffs zurückzuführen sein. Nance *et al.* beschreiben eine Methode zur Synthese von Impfstoff-mRNA, bei der ein dsDNA-Plasmid verwendet wird, das zunächst in *E. coli* amplifiziert wird, bevor die Impfstoff-mRNA mit der T7-Polymerase *in vitro* synthetisiert wird (Nance und Meier 2021). Wird diese DNA nicht entfernt, könnte dies zur Injektion von spike-kodierten Nukleinsäuren führen, die stabiler sind als die modifizierte RNA. Die EMA hat Grenzwerte von 330ng/mg DNA zu RNA festgelegt (Josephson 2020-11-19). Die FDA hat Leitlinien für weniger als 10ng/Dosis in Impfstoffen herausgegeben (Sheng-Fowler et al. 2009).

Reste der injizierten DNA können zu Interferon-Reaktionen vom Typ I führen und das Potenzial für die DNA-Integration erhöhen (Ulrich-Lewis et al. 2022).

Ergebnisse

Um die Nukleinsäurezusammensetzung der Impfstoffe zu bewerten, wurde die Impfstoff-DNA mit zwei verschiedenen Methoden sequenziert. Bei der ersten Methode wurde eine handelsübliche RNA-seq-Methode von New England Biolabs verwendet, die die Sequenzierung der RNA begünstigte, aber dennoch eine über 500-fache Abdeckung für die unerwarteten DNA-Vektoren bot (Abbildung 1 und 2). Die RNA-seq-Assemblies wiesen im Vergleich zu den von Nance *et al.* beschriebenen Konstrukten verkürzte Poly-A-Trakte auf. Bei der zweiten Methode wurde die RNA mit einer RNase-A-Behandlung eliminiert und nur die DNA mit einem Fragmentbibliothek-Kit von Watchmaker Genomics sequenziert. Die auf die DNA fokussierten Assemblierungen lieferten Vektorassemblierungen mit mehr intakten Poly-A-Trakten (Abbildung 3).

Diese Assemblies wurden verwendet, um Multiplex-qPCR- und RT-qPCR-Assays zu entwickeln, die auf die Spike-Sequenz abzielen, die sowohl in der Impfstoff-mRNA als auch im DNA-Vektor vorhanden ist, und die auch auf die Sequenz des Replikationsursprungs abzielen, die nur im DNA-Vektor vorhanden ist (Abbildung 3). Das Assembly von Pfizer Fläschchen 1 enthält eine 72bp-Insertion, die im Assembly von Pfizer Fläschchen 2 nicht vorhanden ist. Dieses Indel ist bekannt als

wegen seiner Verstärkung des SV40-Promotors und seines Kernlokalisierungssignals (Dean et al. 1999) (Moreau et al. 1981).

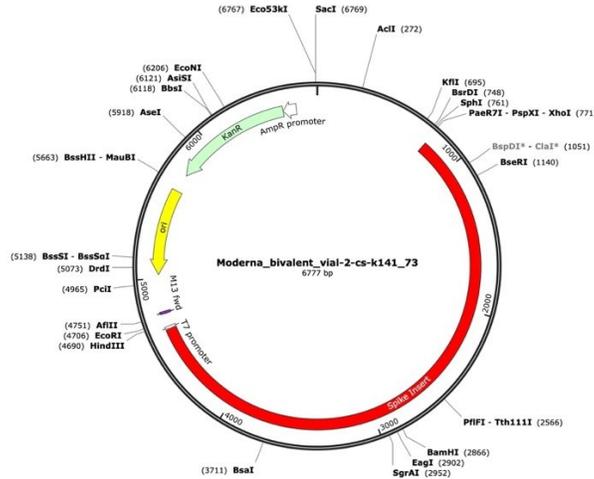


Abbildung 1. Moderna-Vektor-Assembly einer RNA-seq-Bibliothek mit einem Spike-Insert (rot), einem Kanamycin-Resistenzgen (grün), das von einem AmpR-Promotor angetrieben wird, und einem bakteriellen Replikationsursprung mit hoher Kopienzahl (gelb).

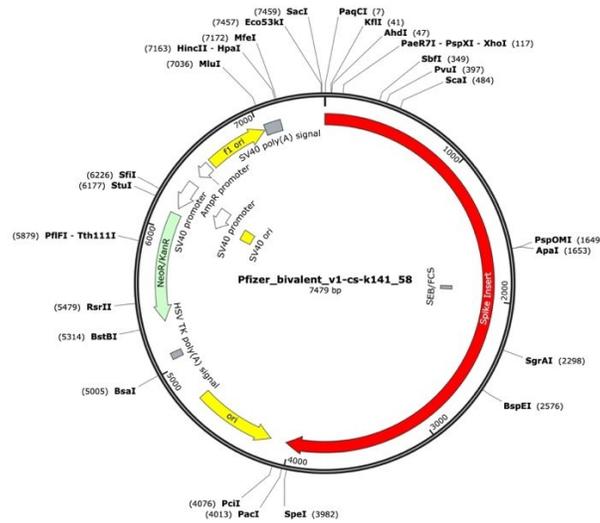


Abbildung 2. Pfizer bivalenter Impfstoff, Zusammenstellung der RNA-seq-Bibliothek. Kommentiert mit SEB/FCS, Spike-Insert (rot), bakteriellem Replikationsursprung (gelb), Neo/Kan-Resistenzgen (grün), F1-Ursprung (gelb) und einem SV40-Promotor (gelb und weiß).

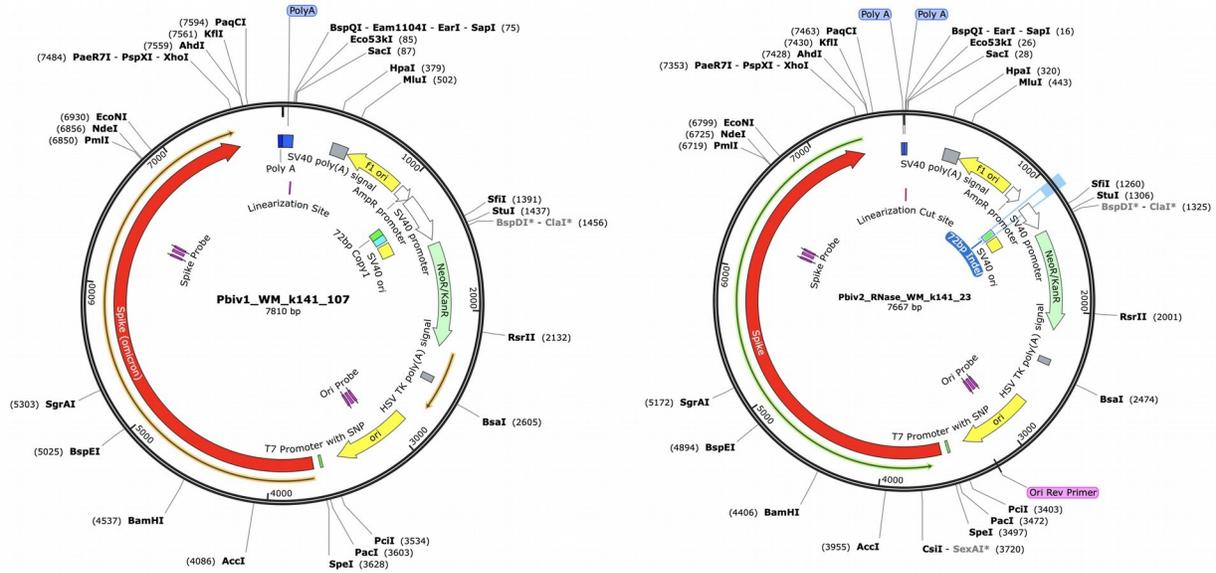


Abbildung 3. Mit RNase behandelte Impfstoffe wurden mit Illumina sequenziert (RNase-Seq, nicht RNA-Seq). Die Pfizer-Vektoren aus Fläschchen 1 (links) und Fläschchen 2 (rechts) enthalten einen Unterschied von 72bp im SV40-Promotor (grüne und hellblaue Annotation). qPCR-Assays sind in rosa als Spike-Sonde und Ori-Sonde dargestellt. Die RNase-Sequenzierung ermöglichte eine bessere Auflösung der Linearisierungsstelle von Eam1104i und der Poly-Adenylierungssequenz. Die Vektoren unterscheiden sich in der Länge des PolyA-Schwanzes (wahrscheinlich ein Sequenzierungsartefakt) und dem 72-bp-Indel.

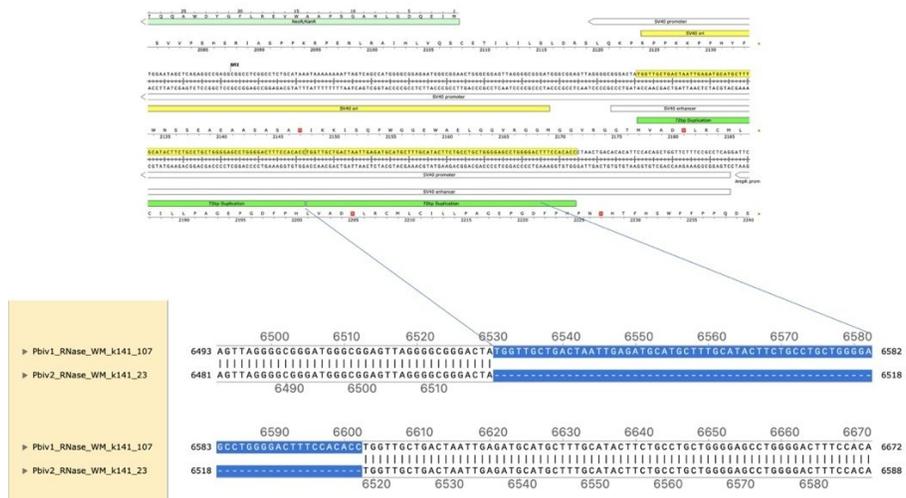


Abbildung 4. Lokales Alignment der Vektoren von Pfizer Vial 1 und Pfizer Vial 2 hebt die 72bp-Tandemduplikation in Blau hervor.

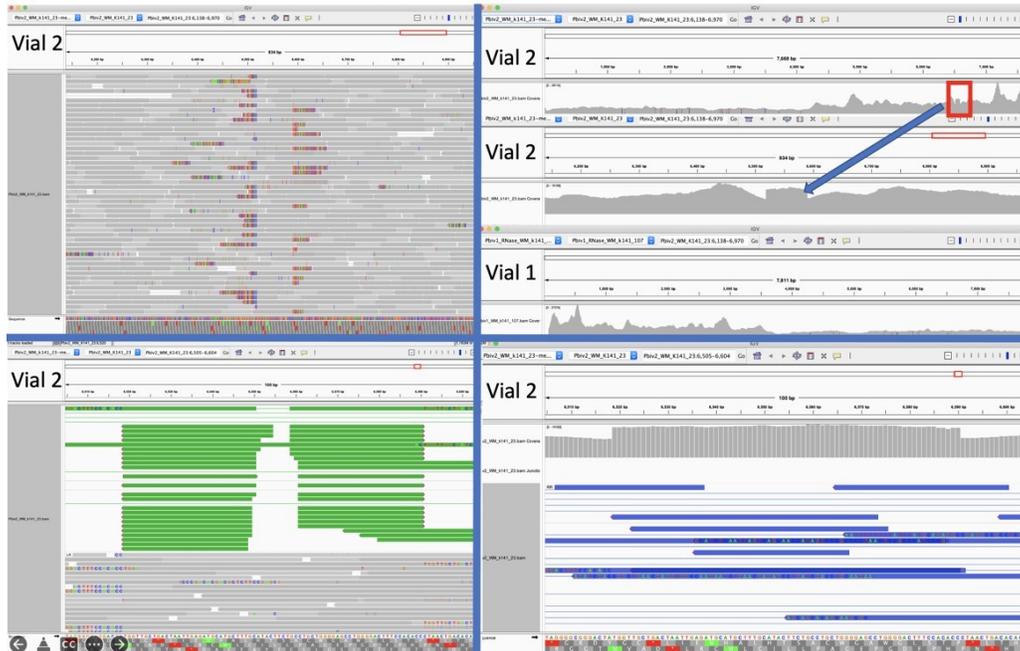


Abbildung 5A. Ein genauer Blick auf den Integrative Genome Viewer (IGV) zeigt, dass die Auftreten einer 72bp-Insertion, die in Pfizer Fläschchen 2 heteroplasmatisch ist. Die obere linke IGV-Ansicht ist eine vergrößerte Ansicht, in der die farbigen Markierungen die Indel darstellen. Die untere linke IGV-Ansicht zeigt invertierte gepaarte Reads, da die 72bp-Insertion ein Tandem-Repeat ist und gepaarte Reads, die kürzer als 72bp sind, auf zwei verschiedene Arten gemappt werden können. Die obere rechte IGV-Ansicht zeigt einen Read-Coverage-Pile-up oder ein Plateau". Dies tritt auf, wenn die Referenz eine Kopie des 72bp-Repeats hat und die Probe 2 Kopien. Hinweis: In der IGV-Darstellung oben rechts ist die Sequenz in Fläschchen 1 in IGV umgekehrt ausgerichtet wie in Fläschchen 2. Die untere rechte IGV-Ansicht ist eine vergrößerte Ansicht des oberen rechten IGV-Bildschirms.

Da die beiden Pfizer-Fläschchen dieselbe Chargennummer haben, ist die Feststellung einer heterozygoten Kopienzahländerung zwischen den beiden Fläschchen unerwartet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Auftreten einer heteroplasmatischen Kopienzahländerung stattdessen das Ergebnis des Megahit-Assemblers ist, der die eigentlich zwei Kopien der 72bp-Sequenz zu einer einzigen Kopie zusammenfasst, da die Insertgrößen in den Sequenzierbibliotheken zu kurz sind (105bp). Es ist bemerkenswert, dass die längeren Paired-End-Reads in der Bibliothek die 72bp-Tandemwiederholung auflösen.

Wenn die Referenzen eine einzige Kopie der 72bp-Wiederholung aufweisen und die Probe zwei Kopien der Wiederholung hat, sollten sich die Reads bis zur doppelten Abdeckung über den 72bp-Loci der einzigen Kopie anhäufen, wie in Abbildung 5A zu sehen. Um diese Hypothese zu testen, fügten wir dem kürzeren Plasmidaufbau eine zweite 72bp-Sequenz hinzu und beobachteten, dass die Reads ohne Artefakte und ohne Anzeichen von Heteroplasmie kartiert wurden (Abbildung 5B).

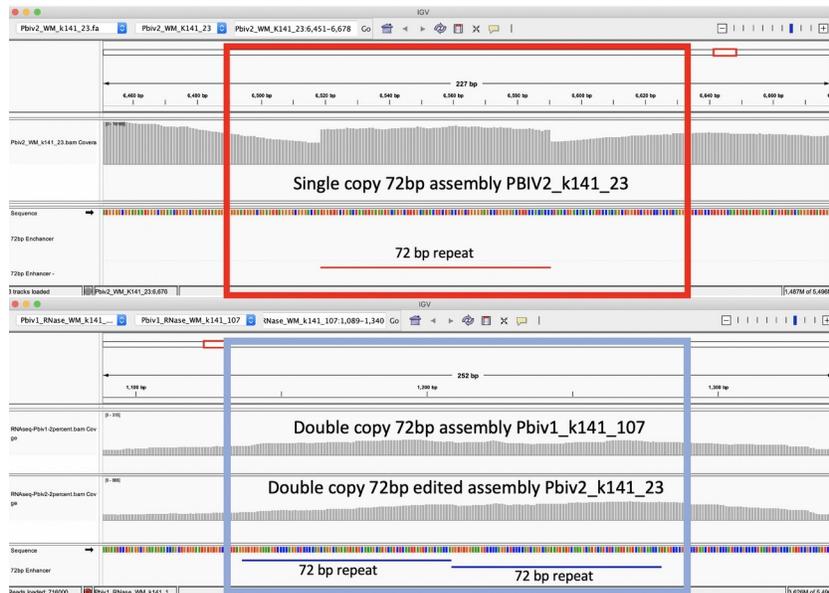


Abbildung 5B. Die IGV-Ansicht der Leseabdeckung über Pbv2_k141_23 zeigt ein diskretes 72bp-Plateau in der Abdeckung (rotes Rechteck). Die Bearbeitung der Pbv2_k141_23-Referenz, um zwei Kopien der 72bp-Sequenz einzuschließen, und die Neuordnung der Sequenzdaten zu dieser korrigierten Sequenz zeigt, dass die Abdeckung über beide Vektoren normaler ist und kein Abdeckungsplateau in Pfizer Vial 2 aufweist.

Diese Daten lassen den Schluss zu, dass alle Pfizer-Vektoren einen homoplastischen 72bp SV40 Enhancer mit 2 Kopien enthalten, der mit einer robusteren Expression und nuklearen Lokalisierung verbunden ist. Das anfängliche heteroplastische Indel war ein Artefakt des Megahit-Assemblers und der kurzen Insert-Bibliotheken.

Um die Größe der DNA abzuschätzen, wurden die gereinigten Impfstoffe auf einer Agilent Tape Station™ unter Verwendung von DNA- (genomische DNA-Screen-Tapes) und RNA-basierten (hochempfindliche RNA-Tapes) Elektrophorese-Tapes untersucht.

Die Agilent Tape Station™ Elektrophorese ergab 7,5 - 11,3 ng/μl dsDNA im Vergleich zu den 23,7 - 55,9ng/μl mRNA in jeder 300-μl-Probe nachgewiesen. Die Qubit™ 3-Fluorometrie schätzte 1-2,8ng/μl DNA und 21,8ng - 52,8ng/μl RNA. Bei der DNA-Elektrophorese ist eine stärkere Fragmentierung festzustellen. Die Gesamt-RNA-Konzentrationen liegen unter den erwarteten Dosen von 30 ug (100ng/μl) und 100 ug (200ng/μl), was auf einen Ausbeuteverlust bei der DNA- und RNA-Isolierung, Produktionsschwankungen oder einen RNA-Zerfall bei abgelaufenen Chargen schließen lässt.

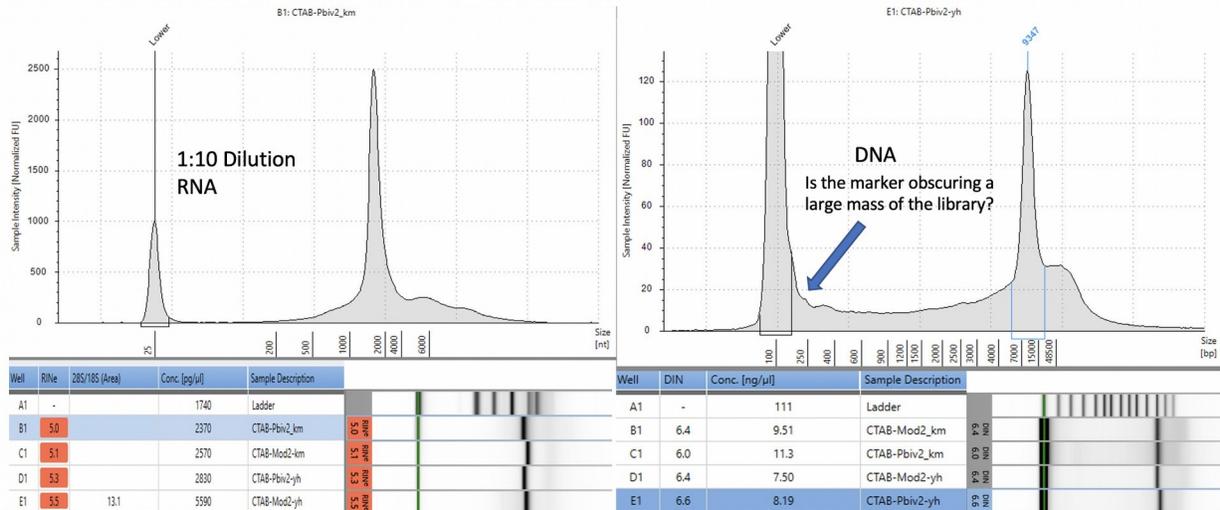
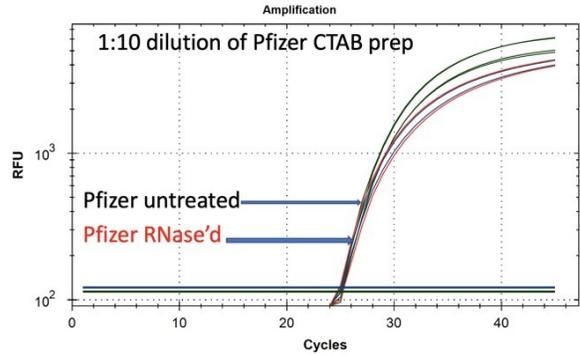
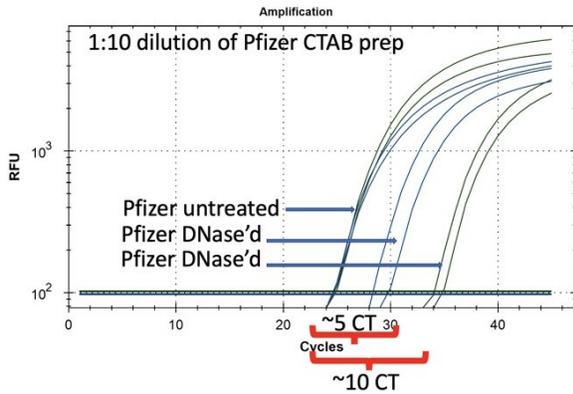


Abbildung 6. Die Agilent Tape Station™ Elektrophorese zeigt 23,7ng/μl - 55,9ng/μl RNA (links). 7,5ng-11,3ng/μl werden auf der DNA-basierten Tape Station™ beobachtet. Während das DNA-Elektropherogramm einen Peak zeigt, der auf ein Plasmid in voller Länge hindeutet, ist bekannt, dass diese Probe große Mengen an N1-Methylpseudouridin-RNA enthält. DNA-Hybride mit N1-Methylpseudouridin-mRNA können genügend interkalierenden Farbstoff-Cross-Talk liefern, um einen Peak zu erzeugen. Die Größe des Peaks auf dem RNA-Band auf der linken Seite ist kürzer als erwartet. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass N1-Methylpseudouridin die Sekundärstruktur oder das Masse-Ladungs-Verhältnis der DNA verändert.

Quantitative PCR-Assays wurden mit der Primer Quest-Software von IDT entwickelt und zielten auf eine Region im Spike-Protein ab, die zwischen den Spike-Sequenzen von Moderna und Pfizer identisch war, sowie auf eine gemeinsame Sequenz im Replikationsursprung der Vektoren. Dies ermöglichte die qPCR- und RT-qPCR-Bewertung der Impfstoffe. qPCR amplifiziert nur DNA, während RT-qPCR sowohl DNA als auch RNA amplifiziert. Die Gradienten-qPCR wurde eingesetzt, um Bedingungen zu erforschen, unter denen beide Targets unter denselben Zyklusbedingungen für RT-qPCR und PCR funktionieren würden (Gradienten-PCR-Daten nicht gezeigt).

Multiplex qPCR targeting Spike (Blue) and Vector Origin (Green)

qPCR Amplifies **ONLY** DNA



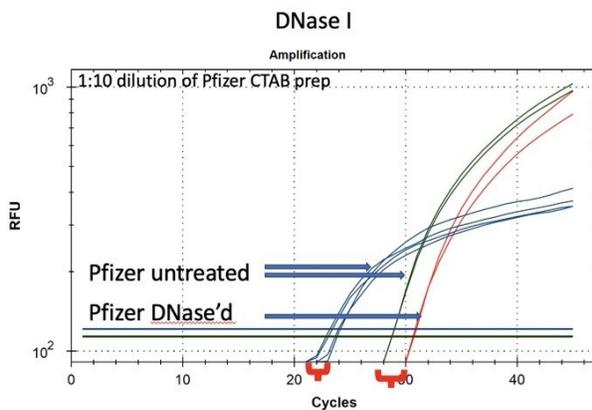
No Change in DNA signal with RNase A

5 CT shift on Spike = 32 fold reduction in DNA with DNase I.
 10CT shift on Vector = 1000 fold reduction in DNA with DNase I
 qPCR does not amplify RNA

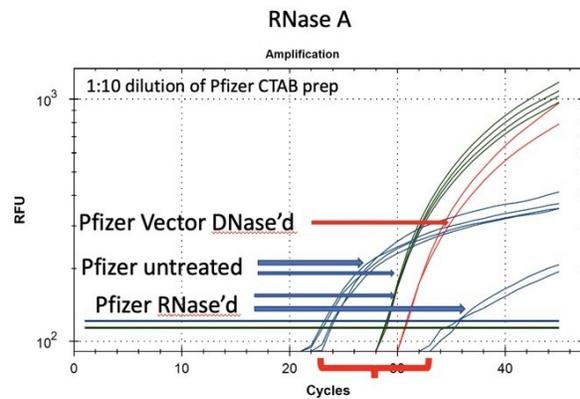
Abbildung 7: qPCR des bivalenten Impfstoffs von Pfizer mit und ohne DNase I (links) und RNase A (rechts). Unbehandelte mRNA zeigt wie erwartet gleiche CTs für Spike- und Vector-Assays. Vector ist empfindlicher gegenüber DNase I als Spike, was darauf hindeutet, dass die modRNA die Nukleaseaktivität von DNase I gegen komplementäre DNA-Ziele hemmen könnte. Die Behandlung mit RNase A verändert das qPCR-Signal nicht.

Multiplex RT-qPCR targeting Spike (Blue) and Vector Origin (Green)

RT qPCR Amplifies **BOTH** RNA and DNA



Spike shifts ~1 CT with DNase
 Vector shifts 2 CT with DNase



Spike shifts ~10CT with RNase
 Vector doesn't shift with RNase

Abbildung 8. RT-qPCR amplifiziert sowohl DNA als auch RNA. Die unbehandelten Proben zeigen einen großen CT-Offset mit Pfizer Spike- und Vektor-Assays (links blau gegenüber grün). Dies ist zu erwarten, da die T7-Polymerisation mehr mRNA über Spike als über den Vektor erzeugen sollte. Kleine 1-2 CT-Verschiebungen werden bei der DNase I-Behandlung beobachtet. Dies ist zu erwarten, wenn die DNA weniger als die gleiche Konzentration an

Nukleinsäure in der RT-PCR. Die RNase-Behandlung (rechts) zeigt eine Verschiebung um 10 CT, verändert aber nicht die CT des DNA-Vektors.

Pfizer qPCR Results

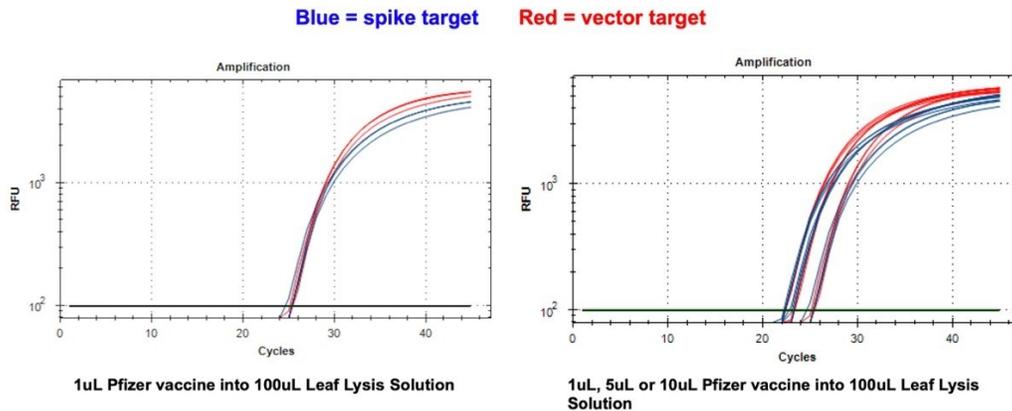


Abbildung 9. 1µl des bivalenten Impfstoffs von Pfizer in 100µl Leaf-Lysis-Puffer für einen 8-minütigen Kochschritt liefert einen CT von 24 sowohl für Vector- als auch für Spike-Targets in qPCR (links). Der Assay reagiert auf 1, 5 und 10 µl Input (rechts).

Pfizer RT-qPCR Results

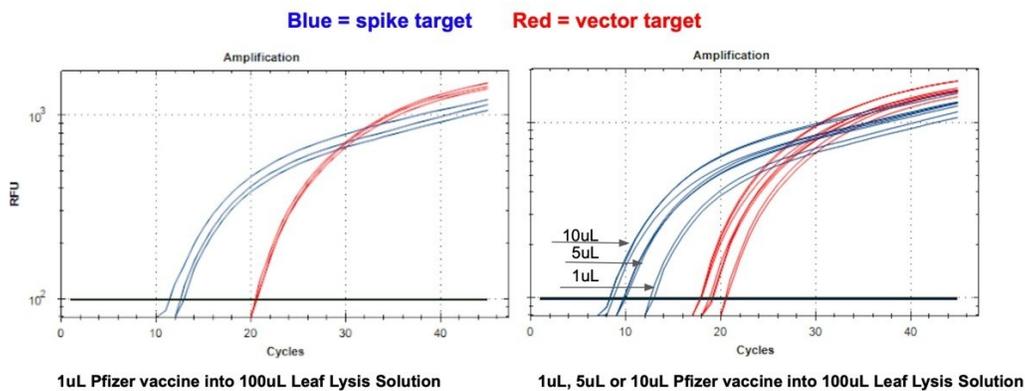


Abbildung 10. 1µl des bivalenten Impfstoffs von Pfizer in 100µl Leaf-Lysis-Puffer für einen 8-minütigen Kochschritt liefert einen CT von 20 und 12 für Vector- und Spike-Targets in RT-qPCR (links). Der Assay reagiert auf 1, 5 und 10 µl Input (rechts).

Moderna qPCR Results

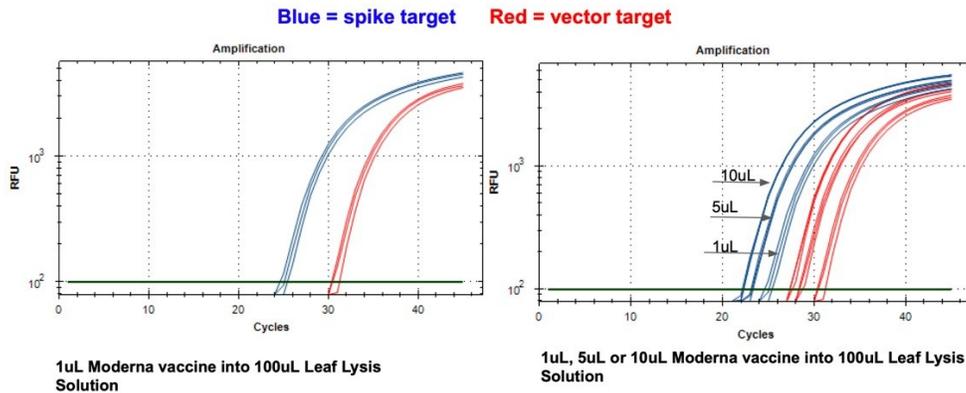


Abbildung 11. 1µl des bivalenten Moderna-Impfstoffs zeigt bei der qPCR unterschiedliche CT-Werte für den Spike und die Vektor-Targets (links). Dies muss weiter untersucht werden, da die Assays gleiche CT-Werte für die Impfstoffe von Pfizers liefern und die Sequenz des Amplikons bei den beiden Vektorherkünften identisch ist. In den Spike-Amplikons von Moderna und Pfizer gibt es 2 Fehlpaarungen, aber keine dieser Fehlpaarungen befindet sich unter einem Primer oder einer Sonde. Der Assay reagiert auf 1, 5 und 10 µl direkt gekochter mRNA (rechts).

Moderna RT-qPCR Results

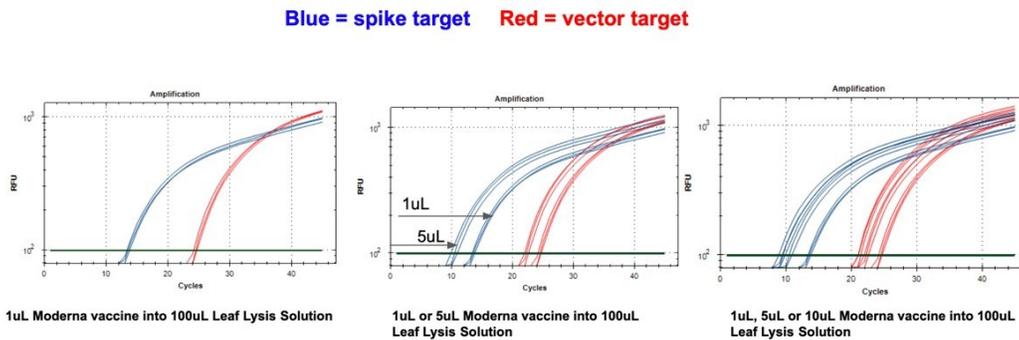


Abbildung 12. 1µl des bivalenten Moderna-Impfstoffs zeigt unterschiedliche CT-Werte für die Spike- und die Vektor-Targets (links) mit RT-qPCR. Bei der großen Verschiebung von 10 CT zwischen Spike und Vektor muss berücksichtigt werden, dass die qPCR-Kontrolle einen Offset von 5 CT aufweist. Die Boil-Preps können 1-10µl Impfstoff vertragen (Mitte und rechts).

	Qubit DNA ng/µl	Qubit RNA ng/µl
Pbiv1	2.81	30.0
Pbiv2	1.47	52.8
Mod1	2.67	21.8
Mod2	1.04	49.0

Tabelle 1. Qubit™ 3 Fluorometrie schätzt 1,04-2,8 ng/μl dsDNA in den Impfstoffen und 21,8ng-52,8ng/μl RNA.

Synthetische Templates wurden mit IDT synthetisiert, um RT-qPCR-Standardkurven zu erstellen und die CTs mit der Masse der DNA in der Reaktion zu vergleichen. Bei dieser Methode werden ideale Templates verwendet und DNA-Moleküle, die kleiner als die Amplikongröße sind, werden nicht quantifiziert. Wie erwartet, liefert diese Methode niedrigere DNA-Konzentrations-schätzungen als die Qubit™ 3 Fluorometrie oder die Agilent Tape Station™. Sie stellt auch eine ideale Umgebung dar, die die Inhibition oder Primerabreicherung nicht erfasst, die auftreten kann, wenn große Mengen an mRNA mit identischer Sequenz wie Ihr DNA-Ziel in einem qPCR-Assay gemeinsam vorhanden sind.

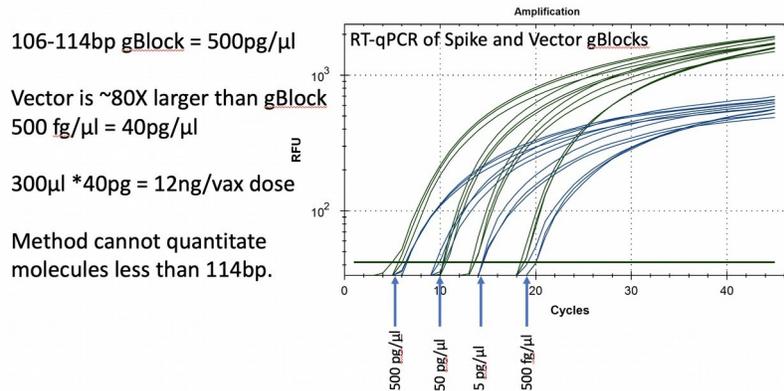


Abbildung 13. Zwei gBlocks wurden bei IDT für Spike- und Ori-Positivkontrollvorlagen synthetisiert, die in einem RT-qPCR-Assay verwendet wurden. 10-fache Verdünnungsreihen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, um die CT-Werte mit Pikogramm DNA zu korrelieren. Der Schwellenwert wurde von 10^2 zur Überprüfung des Hintergrunds herabgesetzt. CT von

$\sim 20 = 500 \text{ fg/RT-qPCR-Reaktion}$. Da 100bp-Zielmoleküle nur $1/80^{\text{th}}$ der Vektor-DNA ausmachen, die als potenzielle Verunreinigung vorhanden ist, entsprechen 500 fg/μl 40pg/μl Vektor-DNA. DNA, die mit DNase I behandelt wurde und kleiner als die Amplikongröße ist, kann mit dieser Methode weder amplifiziert noch quantifiziert werden. Diese Methode quantifiziert DNase I behandelte Proben im Vergleich zu Qubit™ 3 oder Agilent Tape Station™ unterdurchschnittlich.

Diese Arbeit wurde weiter validiert, indem 8 ungeöffnete monovalente Impfstoffe von Pfizer sowohl mit qPCR als auch mit RT-qPCR getestet wurden.

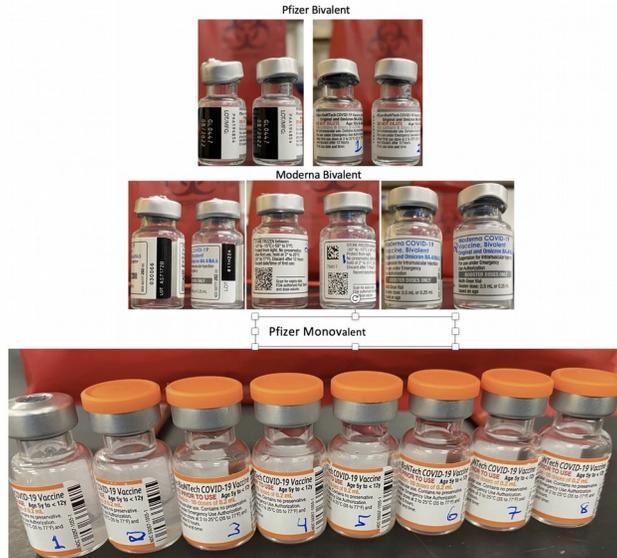


Abbildung 14. Bivalente Impfstoffe von Moderna und Pfizer (oben). 8 Monovalente mRNA-Impfstoffe von Pfizer. Diese waren ungeöffnet, aber nach Ablauf des Verfallsdatums (Unten).

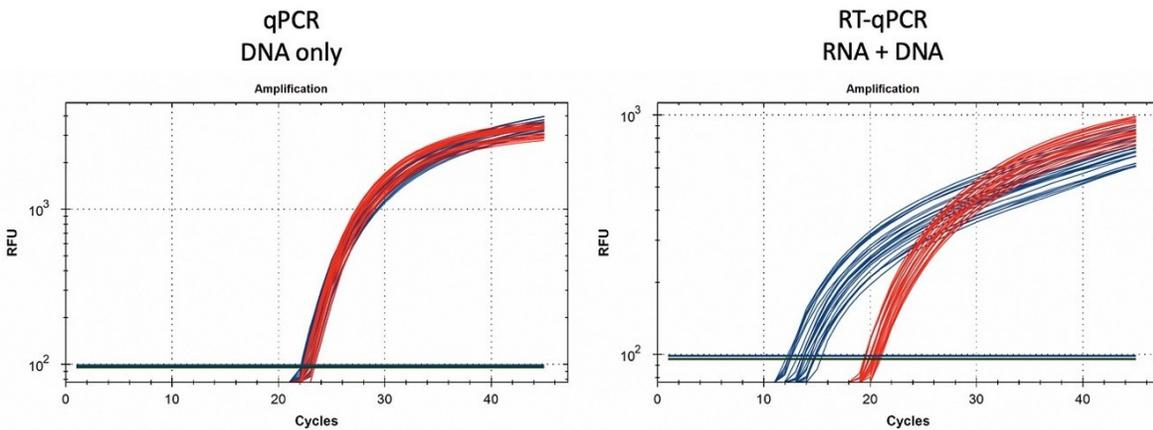


Abbildung 15. 1µl Impfstoff, gekocht in 100µl Leaf-Lysis-Puffer, wurde einer qPCR (links) und RT-qPCR (rechts) für Vector (rot) und Spike (blau) unterzogen. 8 Proben wurden in dreifacher Ausführung getestet.

qPCR-Spike	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	23.12	22.98	22.58	22.33	22.36	22.08	22.20	22.06	0.401
Replicate 2	23.16	22.90	22.70	22.36	22.20	22.16	22.29	22.22	0.373
Replicate 3	23.22	22.84	22.59	22.29	22.44	22.26	22.29	22.11	0.366
STDEV	0.05	0.07	0.07	0.03	0.12	0.09	0.05	0.08	

qPCR: (Vector-Spike)	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	0.20	0.08	0.27	(0.00)	0.18	0.18	0.10	0.24	0.090
Replicate 2	0.16	0.22	0.29	0.11	0.18	0.12	0.03	0.13	0.079
Replicate 3	0.14	0.31	0.20	0.17	0.31	0.19	0.20	0.13	0.069
STDEV	0.03	0.11	0.05	0.09	0.08	0.04	0.08	0.06	

qPCR-Vector	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	23.33	23.06	22.85	22.32	22.54	22.26	22.30	22.30	0.411
Replicate 2	23.32	23.12	23.00	22.47	22.38	22.28	22.32	22.35	0.419
Replicate 3	23.36	23.15	22.79	22.46	22.75	22.46	22.49	22.23	0.383
STDEV	0.02	0.04	0.11	0.08	0.19	0.11	0.11	0.06	

RATIO RNA/DNA	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.068
Replicate 2	1	1	1	1	1	1	1	1	0.062
Replicate 3	1	1	1	1	1	1	1	1	0.056
STDEV	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	

Tabelle 2. CT-Werte für Spike und Vektor während der qPCR (nur DNA). Die Standardabweichung für die dreifachen Messungen ist horizontal in schwarzer Schrift dargestellt. Die Standardabweichung von Fläschchen zu Fläschchen ist vertikal in roter Schrift dargestellt. Delta CT oder (Vector CT minus Spike CT) stellt das Verhältnis von Spike zu Vektor-DNA dar und sollte = 1 sein.

RT-Spike	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	14.05	14.77	13.18	13.77	13.79	12.52	12.62	13.53	0.749
Replicate 2	14.29	14.74	14.38	14.82	13.78	13.82	12.57	12.38	0.925
Replicate 3	14.49	14.91	15.43	13.84	13.74	13.55	12.36	12.19	1.141
STDEV	0.22	0.09	1.12	0.59	0.02	0.69	0.14	0.72	

RT: (Vector-Spike)	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	6.74	5.93	7.20	6.40	6.51	7.31	7.33	5.97	0.570
Replicate 2	6.33	6.06	5.92	5.67	6.34	6.13	6.92	7.06	0.478
Replicate 3	6.33	6.07	5.43	6.39	6.13	6.38	7.09	7.18	0.562
STDEV	0.24	0.07	0.91	0.42	0.19	0.62	0.21	0.67	

RT-Vector	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	20.80	20.71	20.39	20.16	20.30	19.83	19.95	19.50	0.439
Replicate 2	20.62	20.80	20.30	20.49	20.12	19.96	19.49	19.45	0.499
Replicate 3	20.81	20.98	20.86	20.23	19.88	19.93	19.45	19.37	0.638
STDEV	0.11	0.14	0.30	0.17	0.21	0.07	0.28	0.07	

RATIO RNA/DNA	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	STDEV
Replicate 1	107	61	147	84	91	159	161	63	41.54
Replicate 2	80	67	61	51	81	70	121	134	29.25
Replicate 3	80	67	43	84	70	83	136	145	34.79
STDEV	15.5	3.3	55.8	19.2	10.4	47.9	20.3	44.6	

Tabelle 3. CT-Werte für Spike und Vektor bei RT-qPCR (RNA+DNA). Das Verhältnis von RNA:DNA reicht von 43:1 bis 161:1. Der zulässige Grenzwert der EMA liegt bei 3030:1. Dies liegt 18-70 Mal über dem EMA-Grenzwert.

Diskussion

Mehrere Methoden zeigen ein hohes Maß an DNA-Kontamination sowohl in den monovalenten als auch in den bivalenten Impfstoffen. Der Qubit™ 3 und die Agilent Tape Station™ unterscheiden sich zwar in ihrer absoluten Quantifizierung, aber beide Methoden zeigen, dass die Kontamination um Größenordnungen über dem EMA-Grenzwert von 330ng DNA/1mg RNA liegt. qPCR und RT-qPCR bestätigen das relative Verhältnis von RNA zu DNA. Zwischen den RT-qPCR-Signalen von Spike und Vector sollte ein Offset von 11-12 CT zu sehen sein, um eine Kontaminationsgrenze von 1:3030 zu erreichen ($2^{11,6} = 3100$). Stattdessen beobachten wir viel kleinere CT-Offsets (5-7 CTs), wenn wir qPCR- und RT-qPCR-Daten mit diesen Impfstoffen betrachten. Es ist zu beachten, dass die Qubit™ 3 und Agilent-Methoden die gesamte DNA in Lösung färben, während die qPCR nur amplifizierbare Moleküle ohne DNase I-Schnittstellen zwischen den Primern misst. Je größer der Abstand zwischen den qPCR-Primern ist, desto weniger mit Qubit™ 3 und Agilent nachweisbare Moleküle werden amplifiziert. Die in dieser Studie verwendeten Primer haben einen Abstand von 106bp und 114bp, so dass alle Moleküle mit DNase I-Schnitten unterhalb dieser Länge mit den qPCR-Methoden im Vergleich zu allgemeineren dsDNA-Messungen mit Qubit™ 3 oder Agilent Tape Station™ unterschätzt werden.

Dies bedeutet auch, dass qPCR-Standardkurven, die 100% intakte synthetische DNA-Standards verwenden, effizienter amplifizieren und somit die gesamte verdaute DNA-Kontamination unterbewerten. Beispielsweise liefern Standardkurven mit synthetischen 106-114bp-Vorlagen CTs unter 20 im Pikogramm-Bereich (nicht im niedrigen Nanogramm-Bereich), was darauf hindeutet, dass große Teile der Bibliothek kleiner sind als die minimale amplifizierbare Größe. Reine Standards enthalten auch keine hohen Konzentrationen modifizierter mRNA mit identischer Sequenz, die als kompetitive Primersenke oder Inhibitor für qPCR-Methoden dienen könnte.

Alternativ könnten der Qubit™ 3 und die Agilent Tape Station™ die DNA-Quantifizierung aufgrund des Übersprechens des interkalierenden Farbstoffs mit N1-Methylpseudouridin-RNA aufblähen. Aus diesem Grund sind wir der Meinung, dass das Verhältnis, das wir beobachtet haben, wenn diese Moleküle mit Polymerasen, die für jeden Template-Typ spezifisch sind, in qPCR und RT-qPCR genauer abgefragt werden, eine relevantere Metrik ist. Die EMA-Metrik wird ebenfalls als ein solches Verhältnis angegeben.

Dies wirft auch die Frage auf, ob diese EMA-Grenzwerte die Art der DNA-Kontaminanten berücksichtigen. Replikationskompetente DNA sollte wohl einen strengeren Grenzwert haben. DNA mit Säugetierpromotoren oder Antibiotikaresistenzgenen kann ebenfalls von größerer Bedeutung sein als zufällige genomische *E.coli*-Hintergrund-DNA aus einer Plasmidpräparation

(Sheng-Fowler et al. 2009). Die *Hintergrund-E.coli*-DNA wurde mit qPCR gemessen und hatte einen CT über 35.

Es hat eine lebhafte Debatte über die Fähigkeit von SARs-CoV-2 zur Integration in das menschliche Genom gegeben (Zhang et al. 2021). Diese Arbeit hat die Frage aufgeworfen, ob die mRNA-Impfstoffe auch in das Genom integriert werden können. Ein solches Ereignis würde eine LINE-1-getriebene reverse Transkription der mRNA in DNA erfordern, wie von Alden *et al.* beschrieben (Alden et al. 2022). Eine dsDNA-Kontamination der Sequenz, die für das Spike-Protein kodiert, würde keine LINE-1 für die reverse Transkription erfordern, und das Vorhandensein eines SV40-Kernlokalisierungssignals im Impfstoffvektor von Pfizer würde die Chancen für eine Integration weiter erhöhen. Diese Arbeit liefert keine Beweise für eine Genomintegration, unterstreicht aber, dass die LINE-1-Aktivität angesichts der dsDNA-Mengen in diesen Impfstoffen nicht erforderlich ist. Die Kernlokalisierung dieser Vektoren sollte ebenfalls überprüft werden.

Bei früheren Sequenzierungen der monovalenten Impfstoffe von Jeong *et al.* wurde nur die Konsensussequenz veröffentlicht (Dae-Eun Jeong 2021). Die Rohsequenzen für dieses Projekt sind nicht verfügbar und sollten auf das Vorhandensein von Vektorsequenzen untersucht werden.

Da diese Impfstoffe die EMA-Grenzwerte (330ng/mg DNA/RNA) mit den Qubit™ 3 und Agilent-Daten überschreiten und diese Daten auch den FDA-Grenzwert (10ng/Dosis) mit den konservativeren qPCR-Standardkurven überschreiten, sollten wir die Lipopolysaccharid (LPS)-Werte erneut überprüfen. Plasmidkontaminationen aus *E.coli*-Preps sind häufig mit LPS kontaminiert. Eine Kontamination mit Endotoxinen kann bei der Injektion zu Anaphylaxie führen (Zheng et al. 2021).

Eine Einschränkung dieser Studie besteht darin, dass die Herkunft der untersuchten Impfstoffampullen unbekannt ist. Diese Fläschchen wurden uns anonym und ohne Kühlpacks per Post zugesandt. Es ist bekannt, dass sich RNA schneller abbaut als DNA, und es ist möglich, dass eine schlechte Lagerung zu einem schnelleren Abbau der RNA als der DNA führen könnte. RNA als Molekül ist sehr stabil, aber in Gegenwart von Metallen und Hitze oder im Hintergrund allgegenwärtigen RNasen kann sie sehr schnell abgebaut werden. Alle in dieser Studie untersuchten Impfstoffe haben das auf dem Fläschchen angegebene Verfallsdatum überschritten, was darauf hindeutet, dass weitere Arbeiten erforderlich sind, um das Verhältnis von DNA zu RNA in frischen Chargen zu verstehen. Die Veröffentlichung dieser qPCR-Primer könnte bei der Untersuchung weiterer Chargen mit besser kontrollierten Lieferketten hilfreich sein. Studien, die die Langlebigkeit des Impfstoffs in Muttermilch oder Plasma untersuchen, könnten von der Überwachung der Vektor-DNA profitieren, da diese Sequenz einzigartig für den Impfstoff ist und möglicherweise länger als die mRNA überdauert.

Während die Sequenzierung eine vollständige Abdeckung der Plasmidrückgrate lieferte, ist es üblich, Plasmide aus DNase-I-fragmentierten Bibliotheken zu assemblieren. Mit diesen Methoden konnte das Verhältnis zwischen linearer und zirkulärer DNA in den Fläschchen nicht bestimmt werden. Während Plasmid-DNA kompetenter und stabiler ist, kann lineare DNA ein höheres Genomintegrationsrisiko aufweisen.

Die in den Systemen Qubit™ 3 und Agilent verwendeten interkalierenden Farbstoffe sind dafür bekannt, dass sie eine geringe Fluoreszenzübersprechung mit DNA und RNA aufweisen, aber es ist nicht bekannt, in welchem Maße N1-Methylpseudouridin die Spezifität dieser interkalierenden Farbstoffe verändert. Infolgedessen haben wir uns auf die CT-Offsets

zwischen RT-qPCR und qPCR mit der Vektor- und Spike-Sequenz als beste relative Bewertung der EMA-Verhältnismetrik verlassen. Diese qPCR- und RT-qPCR-Reagenzien könnten sich in Zukunft als nützlich erweisen, um diese Verunreinigungen in Impfstoffen, Blutbanken oder Patientengewebe nachzuweisen.

Methoden

Aufreinigung der mRNA aus den LNPs

LiDs/SPRI-Reinigung

Von jedem Fläschchen wurden 100 µl entnommen (1/3 bis 1/5 einer Dosis)

- 5µl 2% LiDs wurden zu 100µl Impfstoff hinzugefügt, um die LNPs aufzulösen
- 100µl 100% Isopropanol
- 233µl Ampure (Beckman Genomics)
- 25µl 25mM MgCl₂ (New England Biolabs)

Die Proben wurden mit der Spitze 10-fach gemischt und 5 Minuten lang für die Bindung der Magnetbeads inkubiert. Die Magnetic Beads wurden auf einer 96-Well-Magnetplatte 10 Minuten lang getrennt und zweimal mit 200 µl 80 % EtOH gewaschen. Die Beads wurden 3 Minuten lang an der Luft getrocknet und in 100 µl ddH₂O eluiert. 2 µl der eluierten Probe wurden auf einer Agilent Tape Station™ ausgeführt.

CTAB/Chloroform/SPRI-Reinigung von Impfstoffen

Bei unserer LiDs/SPRI-Reinigungsmethode der Impfstoffe wurde eine gewisse Variabilität der qPCR-Leistung festgestellt. Dies führte dazu, dass einige Proben undurchsichtig blieben, was möglicherweise auf restliche LNPs in der Aufreinigung zurückzuführen ist. Um dies zu beheben, wurde eine CTAB/Chloroform/SPRI-Isolierung optimiert und für weitere qPCR und Agilent-Elektrophorese verwendet. Kurz gesagt wurden 300 µl des Impfstoffs zu 500 µl CTAB (MGC-Lösung A im SenSATIVax MIP-Reinigungskit #420004) hinzugefügt. Die Probe wurde dann geschüttelt und 5 Minuten lang bei 37°C erhitzt. 800 µl Chloroform wurden hinzugefügt, geschüttelt und 3 Minuten lang bei 19.000 Umdrehungen pro Minute geschleudert. Die oberen 250 µl der wässrigen Phase wurden aufgefangen und zu 250 µl Lösung B und 1 ml magnetischem Bindungspuffer hinzugefügt. Die Proben wurden geschüttelt, 5 Minuten lang inkubiert und dann magnetisch getrennt. Der Überstand wurde entfernt und die Beads wurden zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden schließlich in 300 µl MGC-Elutionspuffer eluiert.

Einfache Kesselvorbereitung für die Auswertung von Impfstoff qPCR.

Bei diesem Kochvorbereitungsverfahren werden einfach 1-10µl des Impfstoffs in einen PCR-kompatiblen Blattlysierpuffer verdünnt und erhitzt (Medicinal Genomics Teilenummer 420208).

- 65°C für 6 Minuten

- 95°C für 2 Minuten

Bibliotheksaufbau für die Sequenzierung

50µl jeder 100µl-Probe wurden mit dem NEB NEBNext UltraII Directional RNA library Kit for Illumina (NEB#E7760S) in RNA-Seq-Bibliotheken für die Illumina-Sequenzierung umgewandelt.

Um längere Insert-Bibliotheken anzureichern, wurde die Fragmentierungszeit von 15 Minuten auf 10 Minuten verkürzt und die Zeit für die Erststrang-Synthese bei 42°C auf 50 Minuten verlängert, wie im Protokoll für lange Inserts empfohlen.

Es wurde keine Ribo-Abreicherung oder PolyA-Anreicherung durchgeführt, um eine möglichst unverfälschte Bewertung aller Fragmente in der Bibliothek zu ermöglichen. Die Bibliothek wurde für 16 Zyklen gemäß dem Herstellerprotokoll amplifiziert. Um die Einzelstrangigkeit der mRNA zu bewerten, wurde eine direktionale Bibliotheksbaumethode verwendet. Dies ist ein wichtiger Qualitätsmaßstab in den Offenlegungsdokumenten der EMA und der TGA, da dsRNA (>0,5 %) eine angeborene Immunreaktion auslösen kann. Der dsRNA-Gehalt wird häufig mithilfe eines ELISA geschätzt. Die direktionale DNA-Sequenzierung bietet eine umfassendere Methode für die Schätzung dieses Gehalts und wurde zuvor von Jeong et al. zu 99,99 % gemessen.

RNase A-Behandlung der Impfstoffe

RNase A spaltet sowohl Uracil als auch Cytosin. N1-Methylpseudouridin ist bekanntlich resistent gegen RNase-L, aber RNase A spaltet auch Cytosine, die noch in den mRNAs vorhanden sind. Dadurch bleibt überwiegend DNA für die Sequenzierung übrig. Impfstoff-mRNA, die zuvor sequenziert wurde und hier diskutiert, wurde bei 37°C für 30 Minuten mit 10µl 20 Einheiten/µl Monarch RNase A von NEB behandelt. Die RNase-Reaktion wurde mit 1,5X SenSATIVax (Medicinal Genomics #420001) gereinigt. Die Proben wurden nach der DNA-Reinigung in 20 µl ddH₂O eluiert. 15 µl wurden für die DNA-Sequenzierung verwendet.

DNase-Behandlung der Impfstoffe

50 µl des mit CTAB gereinigten Impfstoffs wurden bei 37 °C 30 Minuten lang mit 2 µl DNase I und 6 µl DNase I-Puffer (Grim reefer MGC#420143) behandelt. 2,5 µl LiDs Lysis-Puffer wurden hinzugefügt, um die

DNase-Reaktion. Die Reaktionen wurden mit 60µl 100% Isopropanol, 140µl Ampure, 15µl MgCl₂ gereinigt. Die Magnetbeads wurden 10-mal mit der Spitze gemischt, 5 Minuten inkubiert, magnetisch getrennt und dann zweimal mit 80 % EtOH gewaschen.

Whole genome shotgun of RNase'd Vaccines.

15 µl der DNA wurden mit dem Watchmakers Genomics WGS Library Construction Kit in sequenzfertige Bibliotheken umgewandelt. Mit diesem Kit wird die DNA weiter fragmentiert, so dass die Fragmentlänge in den Impfstoffen nur schwer vorhergesagt werden kann.

Qubit™ 3 Fluorimetrie

Die Qubit™ 3-Fluorometrie wurde mit dem Biotum AccuBlue RNA Broad Range Kit (#31073) und dem Biotum AccuGreen High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (#31066) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

E.coli qPCR

Der PathoSEEK™ E.coli Detection Assay von Medicinal Genomics (Nr. 420102) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

qPCR- und RT-qPCR-Spike-Assay

- MedGen-Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Vorwärts
- >AGATGGCCTACCGTTCA
- MedGen-Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Reverse
- >TCAGGCTGTCCTGGATCTT
- MedGen-Moderna_Pfizer_Janssen_Vax-Spike_Probe
- >/56-FAM/CGAGAACCA/ZEN/GAAGCTGATCGCCAA/3IABkFQ/

qPCR und RT-qPCR Vektor-Ursprung-Assay

- MedGen_Vax-Vektor_Ori_Forward
- >CTACATACCTCGCTCTGCTAATC
- MedGen_Vax-Vektor_Ori_Reverse
- GCGCCTTATCCGGTAACTATC

- MedGen_Vax-Vektor_Ori_Probe
- /5HEX/AAGACACGA/ZEN/CTTATCGCCACTGGC/3IABkFQ/

Eluieren Sie den Primer auf 100uM gemäß den Anweisungen von IDT.

50X Primer-Sonden-Mischung herstellen.

1. 25µl 100uM Vorwärtsprimer
2. 25µl 100uM Umkehrprimer
3. 12,5µl 100uM Sonde
4. 37,5µl nukleasefreies ddH₂O.

Verwenden Sie 15 µl dieses Gemischs in der unten dargestellten **qPCR-Mastermischung**. (0,5 µl Primer/Sonde pro Reaktion)

Verwenden Sie 10 µl dieser Mischung im RT-qPCR-Mastermix-Setup (siehe unten).

Verwendete Master-Mix-Kits für die medizinische Genomik

1. <https://store.medicinalgenomics.com/qPCR-Master-Kit-v3-200-rxns>
2. <https://store.medicinalgenomics.com/pathoseek-rt-qpcr-master-kit>

Reaktionsaufbau für 30 qPCR-Reaktionen

- 114µl Enzymmischung (grünes Röhrchen)
- 24µl Reaktionspuffer (blaues Röhrchen)
- 246µl nukleasefreies ddH₂O
- 15µl Primer-Probe Set Spike
- 15µl des Primer-Probe-Sets Ori

Verwenden Sie 13,8 µl des obigen MasterMix und 5 µl der gereinigten Probe (1 µl Vax-DNA/RNA + 4 µl ddH₂O bei CT

<15)

Reaktionsaufbau für 34 Reaktionen der RT-qPCR

- 200µl Enzymmischung
- 96µl nukleasefreies ddH₂O

- 20µl RNase-Inhibitor (lila Röhrchen)
- 4µl DTT (grünes Röhrchen)
- 10µl Primer-Sonden-Set Spike
- 10µl Primer-Sonden-Set Ori

10µl MasterMix und 1µl Vax DNA/RNA

Medicinal Genomics MIP-DNA-Reinigungskit verwendet

1. https://store.medicinalgenomics.com/SenSATIVax-DNA-Extraction-Kit-200-reactions_2

ie CTAB/Chloroform/SPRI-basierten DNA/RNA-Isolierungsmethoden sind oben beschrieben.

Bedingungen für den Radsport

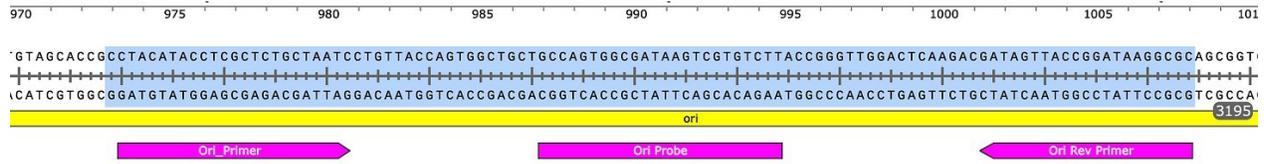
Diese Bedingungen gelten sowohl für qPCR als auch für RT-qPCR. Hinweis: Der 50°C-RT-Schritt kann bei qPCR übersprungen werden. Die verwendeten MGC qPCR MasterMix-Kits enthalten ein Hot-Start-Enzym, das von diesem 50°C-Schritt nicht betroffen ist. Zur Kontrolle der RNA-DNA-Vergleiche haben wir qPCR- und RT-qPCR-Assays auf dieselbe Platte gesetzt und das unten stehende Programm mit dem RT-Schritt für alle Proben ausgeführt.

Zyklusbedingungen für qPCR und RT-qPCR

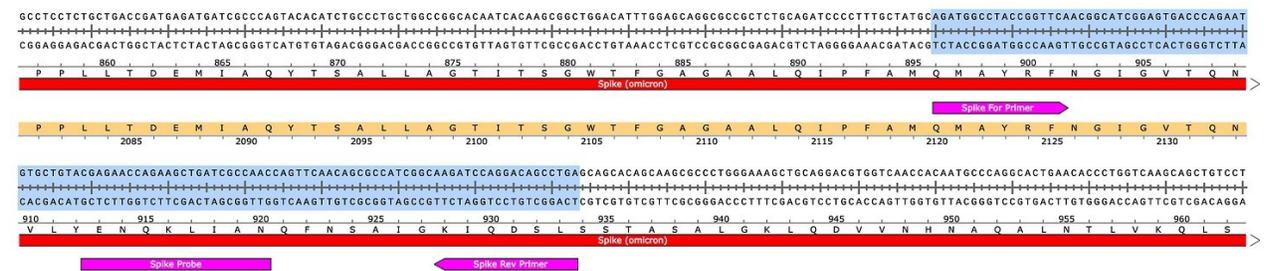


Sequenzen der Amplikons für gBlock Positive Controls. Ori = 106bp, Spike = 114bp.

Ori-Ziel



Spike-Ziel



Daten zur Sequenzierung

Illumina-Rohdaten RNA-seq

- [Pfizer Bivalentes Fläschchen 1 Vorwärts liest](#)
- [Pfizer Bivalentes Fläschchen 1 Umgekehrt liest](#)
- [Pfizer Bivalentes Fläschchen 2 Vorwärts liest](#)
- [Pfizer Bivalent Vial 2 Umgekehrt liest](#)
- [Moderna Vial 1 Vorwärts liest](#)
- [Moderna Vial 1 Rückwärts gelesen](#)
- [Moderna Vial 2 Vorwärts liest](#)
- [Moderna Vial 2 Rückwärts gelesen](#)

Gelesene Dateien werden durch sha256 (Hash und Stash) geleitet und in die DASH-Blockchain geätzt. Der sha256-Hash der gelesenen Datei wird in den OP_RETURN eines unveränderlichen Ledgers ausgegeben. Wenn der Hash der Datei nicht mit dem Hash in diesen Transaktionen übereinstimmt, ist die Datei manipuliert worden.

- [Pfizer Vial 1 Vorwärtshash](#)
- [Pfizer Vial 1 Umgekehrte Raute](#)
- [Pfizer Vial 2 Vorwärtshash](#)
- [Pfizer Vial 2 Umgekehrte Raute](#)

- [Moderna Vial 1 Vorwärtshash](#)
 - [Moderna Vial 1 Umgekehrte Raute](#)
 - [Moderna Vial 2 Vorwärtshash](#)
 - [Moderna Vial 2 Umgekehrte Raute](#)
-

Megahit-Versammlungen

- [Pfizer Fläschchen 1](#)
- [Pfizer Fläschchen 2](#)
- [Moderna Fläschchen 1](#)
- [Moderna Fläschchen 2](#)

Illumina Reads werden auf Megahit Assemblies zurückgeführt

- [Pfizer Vial 1 BAM-Datei. Index-Datei](#)
- [Pfizer Vial 2 BAM-Datei. Index-Datei](#)
- [Moderna Vial 1 BAM-Datei. Index-Datei](#)
- [Moderna Vial 2 BAM File. Index-Datei](#)

Q30 gefilterte Illumina Reads (verwenden Sie diese für Schätzungen der Transkriptionsfehlerrate)

[FastQ-Filter herunterladen](#): usage> fastq-filter -e 0.001 -o output.fastq input.fastq

- [Pfizer bivalent Vial 1 Forward Reads](#)
- [Pfizer bivalent Fläschchen 1 Reverse Reads](#)
- [Pfizer bivalent Vial 2 Forward Reads](#)
- [Pfizer bivalent Vial 2 Reverse Reads](#)
- [Moderna bivalent Fläschchen 1 Forward Reads](#)
- [Moderna bivalent Fläschchen 1 Reverse Reads](#)
- [Moderna bivalent Vial 2 Vorwärtslesungen](#)
- [Moderna bivalent Fläschchen 2 Reverse Reads](#)

Q30 BAM-Dateien. Q30 Reads gegen Megahit-Assemblies gemappt

- [Pfizer Vial 1 q30-BAM Datei. Index-Datei](#)
 - [Pfizer Vial 2 q30-BAM Datei. Index-Datei](#)
 - [Moderna Vial 1 q30-BAM-Datei. Index-Datei](#)
 - [Moderna Vial 2 q30-BAM-Datei. Index-Datei](#)
-

IGVtools-Fehler nach Basen bei q30-Reads

Felder = Position im Kontig, Positiver Strang (+)A, +C, +G, +T, +N, +Löschung, +Einfügung,
Negativer Strang -A, -C, -G, -T, -N, -Löschung, -Insertion

- [Moderna Fläschchen 1](#)
- [Moderna Fläschchen 2](#)
- [Pfizer Fläschchen 1](#)
- [Pfizer Fläschchen 2](#)

Analyse-Pipeline

Die Reads wurden demultiplexiert und verarbeitet mit

- [Trimgalore](#) - Entfernt Illumina Sequenzierungsadapter.
 - Megahit_ - setzt Reads zu Contigs zusammen.
 - [Megahit für SARs - CoV-2](#)
 - Samtools- erzeugt BAM-Dateien zur Anzeige in IGV.
 - Samtools-Statistiken, die zur Berechnung von Outie-Reads verwendet werden.
 - BWA-mem- Short Read Mapper, der zum Alignment von Reads an die assemblierten Referenzen verwendet wird.
 - SnapGene-Software - (www.snapgene.com) - zur Visualisierung und Kommentierung von Expressionsvektoren
 - [IGV- Integrated Genome Viewer zur Visualisierung von Illumina-Sequenzierungs-Reads.](#)
-

RNase-behandelte Bibliotheken - BAM-Dateien

Contig-spezifische BAM-Dateien wurden mit Samtools erstellt

```
samtools view -h input.bam contig_name -O BAM > contig.bam; samtools index contig.bam;
```

Samtools-Statistiken werden für jeden Contig in jeder Assembly ausgeführt.

```
for out_prefix in `ls *.sort.bam | perl -pe "s/.sort.bam//"; do mkdir -p ${out_prefix}-samtools-
stats; for contig in `samtools view -H ${out_prefix}.sort.bam | grep "^@SQ" | cut -f 2 | perl -pe
"s/SN\:\/\/"; do echo "Jetzt wird die Statistik für ${contig}/${out_prefix} berechnet..."; samtools
stats $
{out_prefix}.sort.bam $contig > ${out_prefix}-samtools-stats/${contig}-samtools-stats.txt; done;
done
```

- [Pbiv1 RNase WM k141 107.fa](#)
- [Pbiv1 RNase WM k141 107.bam](#)
- [Pbiv1 RNase WM k141 107.bam.bai](#)
- [Pbiv2 RNase WM k141 23.fa](#)
- [Pbiv2 RNase WM k141 23.bam](#)
- [Pbiv2 RNase WM k141 23.bam.bai](#)

Beiträge der Autoren

KJM - erstellte die Sequenzierungsbibliotheken, entwarf die qPCR-Assays, führte Qubit™ 3s und Agilent Tape Station™ durch, führte die Analyse durch und verfasste das Manuskript.

YH-optimierte DNA-Isolierungen, Tape Station™ und qPCR-Ergebnisse.

SM, LTK - Unterstützung beim Demultiplexen und Trimmen der Reads sowie bei der Fehlerbehebung beim Zusammenbau

Interessenkonflikte - Die Autoren dieser Arbeit sind Mitarbeiter von Medicinal Genomics, dem Hersteller einiger der in dieser Studie verwendeten qPCR- und DNA-Isolierungskits.

Danksagung.

Wir danken Lei Zhang für die Organisation des Sequenzierungs-Outsourcings. Wir möchten Jessica Rose, Sabine Hazan, Jikkyleaks, Pathogenetics, Steve Massey, Valentine Bruttel, Lynn Fynn, Sasha Letypova, David Wiseman und Pharmacoconuts für hilfreiche Kommentare zu diesem Thema danken.

Referenzen

Alden M, Olofsson Falla F, Yang D, Barghouth M, Luan C, Rasmussen M, De Marinis Y. 2022.

Intrazelluläre umgekehrte Transkription des Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA-Impfstoffs BNT162b2 in vitro in der menschlichen Leberzelllinie. *Curr Issues Mol Biol* **44**: 1115-1126.

Bansal S, Perincheri S, Fleming T, Poulson C, Tiffany B, Bremner RM, Mohanakumar T. 2021.

Cutting Edge: Zirkulierende Exosomen mit COVID-Spike-Protein werden durch BNT162b2 (Pfizer-BioNTech)-Impfung vor der Entwicklung von Antikörpern induziert: Ein neuer Mechanismus zur Aktivierung des Immunsystems durch mRNA-Impfstoffe. *J Immunol* **207**: 2405-2410.

Castruita JAS, Schneider UV, Mollerup S, Leineweber TD, Weis N, Bukh J, Pedersen MS, Westh H. 2023. SARS-CoV-2-Spike-mRNA-Impfstoffsequenzen zirkulieren im Blut bis zu 28 Tage nach der COVID-19-Impfung. *APMIS* **131**: 128-132.

- Dae-Eun Jeong MM, Karen Artilles, Orkan Ilbay, Andrew Fire*, Kari Nadeau, Helen Park, Brooke Betts, Scott Boyd, Ramona Hoh, und Massa Shoura*. 2021. Zusammenstellung von mutmaßlichen SARS-CoV2-Spike-kodierenden mRNA-Sequenzen für die Impfstoffe BNT-162b2 und mRNA-1273.
GitHub.
- Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. 1999. Sequenzanforderungen für den Kernimport von Plasmiden. *Exp Cell Res* **253**: 713-722.
- Hanna N, Heffes-Doon A, Lin X, Manzano De Mejia C, Botros B, Gurzenda E, Nayak A. 2022. Nachweis von Messenger-RNA COVID-19-Impfstoffen in menschlicher Muttermilch. *JAMA Pediatr* **176**: 1268-1270.
- Josephson F. 2020-11-19. Bericht des Berichterstatters über die Beurteilung im Rahmen der turnusmäßigen Überprüfung. *Ausschuss für Humanarzneimittel EMEA/H/C/005735/RR*.
- Moreau P, Hen R, Wasylyk B, Everett R, Gaub MP, Chambon P. 1981. Die 72-Basen-Reparaturwiederholung von SV40 hat einen auffallenden Effekt auf die Genexpression sowohl in SV40 als auch in anderen chimären Rekombinanten. *Nucleic acids research* **9**: 6047-6068.
- Nance KD, Meier JL. 2021. Modifikationen in einem Notfall: Die Rolle von N1-Methylpseudouridin in COVID-19-Impfstoffen. *ACS Cent Sci* **7**: 748-756.
- Sheng-Fowler L, Lewis AM, Jr., Peden K. 2009. Probleme im Zusammenhang mit Resten von Zell-Substrat-DNA in viralen Impfstoffen. *Biologicals* **37**: 190-195.
- Ulrich-Lewis JT, Draves KE, Roe K, O'Connor MA, Clark EA, Fuller DH. 2022. STING ist in konventionellen dendritischen Zellen für die Induktion von Typ-I-T-Helferzell-abhängigen Antikörperreaktionen durch DNA-Impfstoffe erforderlich. *Front Immunol* **13**: 861710.
- Zhang L, Richards A, Barrasa MI, Hughes SH, Young RA, Jaenisch R. 2021. Umgeschriebene SARS-CoV-2-RNA kann in das Genom kultivierter menschlicher Zellen integriert und in von Patienten stammenden Geweben exprimiert werden. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**.
- Zheng Q, Wang T, Zhu X, Tian X, Zhong C, Chang G, Ran G, Xie Y, Zhao B, Zhu L et al. 2021. Von E. coli-Stämmen abgeleitete Plasmide mit niedrigem Endotoxingehalt reduzieren die durch rAAV-Vektoren vermittelten Immunantworten sowohl in vitro als auch in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev* **22**: 293-303.