

Competenza sui rischi genotossici del vaccino COVID-19 di Pfizer

Michael Palmer, MD, Sucharit Bhakdi, MD e Wolfgang Wodarg, MD 27

giugno 2022

Astratto

All'inizio del 2021, la Commissione europea ha autorizzato l'uso del vaccino COVID-19 di Pfizer, sulla base di un rapporto di valutazione dell'EMA. Tale relazione escludeva il rischio intrinseco di genotossicità del vaccino. Nel frattempo, sono emerse nuove prove che dimostrano inequivocabilmente che il rischio genotossico è reale e urgente. L'uso del vaccino deve quindi essere interrotto immediatamente.

1 L'EMA ha respinto i rischi di genotossicità del vaccino COVID-19 di Pfizer basandosi su dati scientifici superati

Nel rapporto di valutazione dell'EMA sul vaccino COVID-19 di Pfizer, troviamo la seguente dichiarazione sintetica [1, pag. 50]:

Non sono stati forniti studi di genotossicità. Ciò è accettabile in quanto i componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non dovrebbero avere un potenziale genotossico.

A quanto pare, gli esperti dell'EMA partivano dal presupposto che l'RNA in generale non influisce sull'integrità del genoma della cellula ospite. La prima eccezione a questa regola è nota dal 1970, quando si scoprì che i retrovirus oncogeni erano dotati di un'attività di trascrittasi inversa in grado di copiare il genoma dell'RNA virale nel DNA, che poteva poi inserirsi nel genoma dell'ospite [2, 3]. La consapevolezza che le stesse cellule eucariotiche possiedono attività di trascrittasi inversa simili è arrivata un decennio e mezzo dopo [4], ma difficilmente poteva essere considerata una novità nel 2020.

1.1 Inserimento genomico di virus a RNA attraverso attività di trascrittasi inversa cellulare.

I primi studi che hanno dimostrato l'esistenza di sequenze di DNA di mammifero (topo) derivate da un virus a RNA che *non* era un retrovirus sono stati riportati da Klenerman et al. [5] nel 1997. Il virus in questione era il virus della coriomeningite linfocitica. Poiché questo virus non codifica un enzima di trascrittasi inversa, ne consegue che le copie parziali di DNA osservate del genoma dell'RNA virale dovevano essere state create attraverso la trascrizione inversa da parte di enzimi cellulari. Il meccanismo molecolare è stato successivamente chiarito in dettaglio da scienziati dello stesso laboratorio [6]. Si scoprì che un *retrotrasposone* aveva effettuato sia la trascrizione inversa dell'RNA virale sia l'inserimento della copia di DNA nel genoma cellulare.

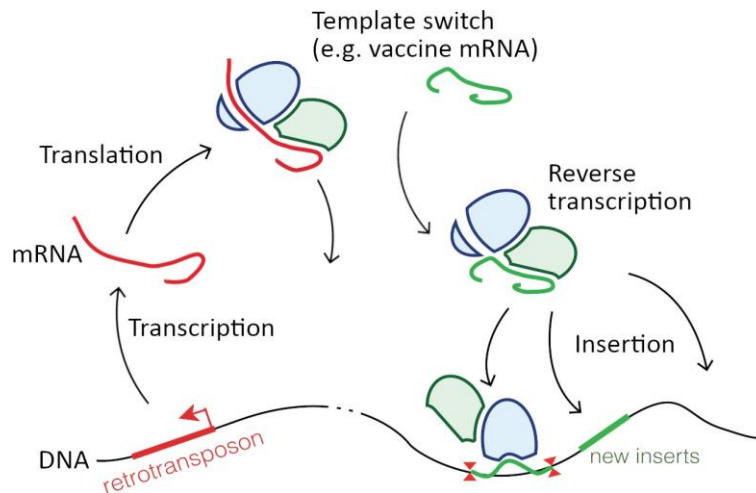


Figura 1 Trascrizione inversa e inserimento genomico di una molecola di mRNA da parte di un retrotrasposone (grafico adattato da Wikipedia). Un retrotrasposone, che fa parte del DNA cellulare, viene inizialmente trascritto e tradotto dal macchinario cellulare. Codifica due proteine che di solito mediano la trascrizione inversa dell'mRNA del trasposone nel DNA e il successivo inserimento di questa copia nel DNA cellulare. Tuttavia, occasionalmente il modello di mRNA può essere sostituito da un'altra molecola di RNA, ad esempio un vaccino mRNA, che finirà poi come copia di DNA nel genoma.

1.2 Il ruolo biologico dei retrotrasposoni cellulari. I retrotrasposoni sono elementi genetici mobili del genoma cellulare che codificano l'apparato proteico per generare copie aggiuntive di se stessi. Nella maggior parte dei casi, è l'mRNA del retrotrasposone stesso che finisce per essere copiato nel DNA e inserito. Tuttavia, le proteine del retrotrasposone possono occasionalmente "perdere" il proprio modello di mRNA e raccogliere invece un'altra molecola di RNA, che sarà poi sottoposta a trascrizione inversa nel DNA e all'inserimento nel genoma cellulare (Figura 1). Esistono diverse famiglie omologhe di retrotrasposoni, di cui nell'uomo la più attiva e importante è la famiglia LINE-1 [7-9]. Poiché la posizione delle nuove inserzioni all'interno del genoma è in gran parte casuale [10], i risultati biologici sono molto vari. Se l'inserzione avviene all'interno di un gene funzionale, questo può essere interrotto; se l'inserzione avviene in prossimità di un gene funzionale, l'attività di quest'ultimo può essere regolata verso l'alto o verso il basso. A seconda del ruolo specifico del gene interessato, il comportamento della cellula può essere modificato, e possono insorgere cancro o altre malattie [11, 12].

Sebbene l'attività dei retrotrasposoni differisca tra i tipi e gli stati funzionali delle nostre cellule corporee, è degno di nota il fatto che i retrotrasposoni siano attivi sia nelle cellule in divisione che in quelle non in divisione. [13] e anche negli ovociti [14]. Dobbiamo quindi aspettarci che RNA virali o altri RNA estranei possano essere inseriti dai retrotrasposoni non solo nelle cellule somatiche, e quindi potenzialmente causare il cancro, ma anche nelle cellule germinali, e quindi propagarsi all'interno della popolazione umana.

1.3 Sequenze di DNA genomico derivate da virus a RNA non retrovirali. Una moltitudine di virus a RNA diversi dai retrovirus ha dato origine a copie parziali inserite nei genomi di mammiferi e altri vertebrati [15-18]. Risultati simili sono stati ottenuti in altri organismi eucariotici come funghi, piante e protozoi [19-21]. Tutte queste sequenze derivate da virus devono essere nate attraverso un qualche meccanismo di retrotrasposizione, il che dimostra chiaramente che la retrotrasposizione può avvenire nelle cellule germinali di tutte queste specie.

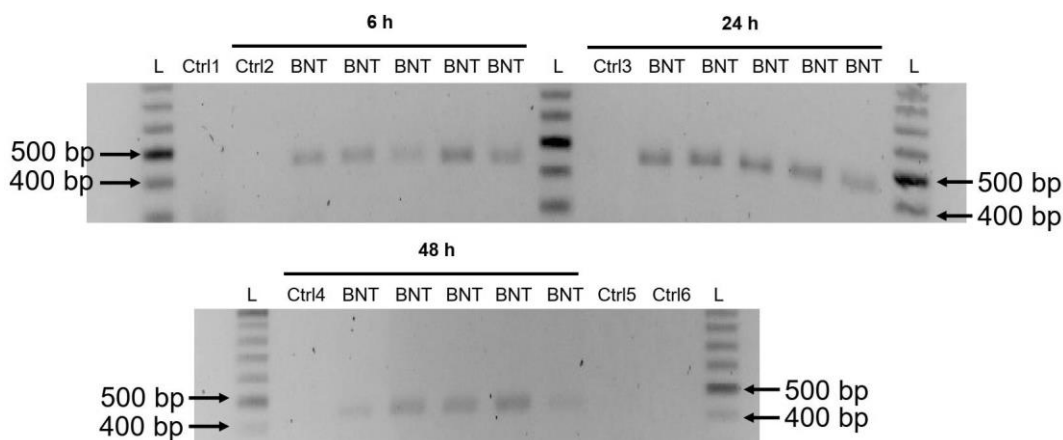


Figura 2 Rilevamento di copie dell'mRNA del vaccino COVID-19 di Pfizer nel DNA cellulare di una linea di cellule epatiche umane (tratto dalla Figura 5 di [23]). Le cellule sono state esposte al vaccino per i periodi di tempo indicati. Il DNA cellulare è stato quindi isolato e le copie di DNA inserite dell'mRNA del vaccino sono state rilevate mediante amplificazione PCR di un frammento lungo 444 coppie di basi (bp). Tutti i campioni etichettati con "BNT" sono stati trattati con il vaccino e mostrano un prodotto PCR della lunghezza prevista, come risulta evidente dal confronto con un frammento di DNA standard ("L"). I campioni etichettati con "Ctrl *n*" erano controlli: Ctrl 1- 4 contenevano DNA da cellule non incubate con il vaccino, Ctrl 5 contenevano RNA (non DNA) da cellule trattate con il vaccino e Ctrl 6 lo stesso ma trattato in aggiunta con RNase, fase eseguita anche nella purificazione dei campioni di DNA. Come previsto, nessuno dei campioni di controllo contiene il prodotto della PCR.

Sebbene tutte le osservazioni qui citate riguardino sequenze derivate da virus a RNA, la retrotrasposizione da parte di LINE-1 non è sequenza-specifica [22] e non c'è motivo di escludere la possibilità che altre sequenze di RNA, come ad esempio quelle dei vaccini a mRNA di Pfizer o Moderna, siano soggette allo stesso meccanismo.

1.4 Sintesi. Anche se ciò non era ancora stato dimostrato sperimentalmente quando l'EMA ha pubblicato il suo rapporto di valutazione [1], esistevano numerosi precedenti che suggerivano la *forte possibilità* che copie di DNA dell'mRNA del vaccino venissero prodotte e inserite nel genoma cellulare. Invece di ignorare questo rischio come ha fatto, l'EMA avrebbe dovuto obbligare Pfizer a condurre gli studi necessari per escludere questo rischio *prima di* dare il via libera all'autorizzazione.

2 Lo stato attuale delle prove

Al momento in cui scriviamo, si sono accumulate nuove prove sostanziali sui rischi genetici posti dal vaccino COVID-19 di Pfizer.

2.1 Copie di DNA dell'mRNA del vaccino COVID-19 di Pfizer sono inserite nel genoma della cellula ospite. Già nel 2021 è stato dimostrato che copie parziali di DNA dell'RNA genomico del virus SARS-CoV-2 possono inserirsi nel DNA cellulare di cellule infette [24]. Anche se questo non riguarda direttamente i vaccini a mRNA, dimostra che le sequenze di RNA derivate dal SARS-CoV-2 non sono esenti dal meccanismo generale. Inoltre, questo studio ha dimostrato che l'inserzione è mediata da retrotrasposoni LINE-1.

Di rilevanza ancora maggiore e più immediata è la recente dimostrazione che l'mRNA contenuto nel vaccino COVID-19 di Pfizer è in grado di integrarsi nelle cellule di un organismo di derivazione umana.

linea cellulare epatica [23]. Anche se in questo studio iniziale la partecipazione di LINE-1 non è stata rigorosamente dimostrata, l'evidenza dell'integrazione dell'mRNA del vaccino nel DNA in quanto tale è solida (vedi Figura 2).

2.2 Espressione a lungo termine della proteina spike. Se inizialmente si pensava che l'espressione della proteina spike dopo la vaccinazione sarebbe stata di breve durata e in gran parte limitata al sito di iniezione, è diventato chiaro che non è né l'una né l'altra cosa. Un recente studio di Röltgen et al.

[25] hanno rilevato sia la proteina spike che l'mRNA che la codifica nei linfonodi di persone vaccinate a 60 giorni dall'ultima iniezione. Bansal et al. [26] hanno rilevato la proteina spike negli esosomi (piccole vescicole di membrana derivate dalle cellule) in circolazione anche quattro mesi dopo l'ultima iniezione.

Questa persistenza sorprendentemente lunga è difficile da conciliare con l'idea che l'espressione sia guidata direttamente dall'mRNA ricombinante iniettato. Da notare che l'mRNA del vaccino COVID-19 di Pfizer è modificato con 1-metilpseudouridina [1]. Talvolta si sostiene che l'RNA contenente 1-metilpseudouridina sia più stabile di quello contenente uridina normale [27]. Tuttavia, mentre la sostituzione aumenta fortemente il livello di espressione proteica dell'mRNA, il suo effetto sulla durata di vita dell'RNA è piuttosto modesto, tanto che l'emivita dell'mRNA modificato e non modificato è dell'ordine di pochi giorni [28, 29]. Dobbiamo quindi prendere molto sul serio la possibilità che il gene che codifica la proteina spike si perpetui e si esprima continuamente in vivo attraverso l'inserimento del DNA.

2.3 Distribuzione del vaccino iniettato agli organi interni attraverso il flusso sanguigno.

Mentre la farmacocinetica del vaccino è stata trattata solo brevemente nel rapporto di valutazione dell'EMA [1, pagg. 46-47], una descrizione più completa e illuminante degli studi condotti da Pfizer sugli animali su questo tema è stata ottenuta e condivisa dalle autorità di regolamentazione giapponesi [30].¹ I dati principali sulla distribuzione del vaccino in vivo sono mostrati nella Figura 3. Gli esperimenti hanno utilizzato un modello di vaccino che è stato utilizzato come modello per il vaccino. Gli esperimenti hanno utilizzato un vaccino modello che aveva la stessa composizione lipidica del vaccino COVID-19 di Pfizer, ma conteneva un mRNA diverso. È probabile che la distribuzione nell'organismo sia controllata principalmente dalla composizione lipidica, anche se non possiamo escludere che l'espressione della proteina spike possa modificare la distribuzione, ad esempio aumentando la dispersione capillare.

Notiamo che il vaccino compare nel plasma sanguigno dopo un tempo molto breve. Il livello plasmatico più alto si raggiunge a due ore dall'iniezione; tuttavia, già a 15 minuti il livello raggiunge quasi la metà del valore massimo. Mentre il livello plasmatico diminuisce, la concentrazione aumenta in diversi altri organi. L'aumento più rapido e più elevato si osserva nel fegato e nella milza. Entrambi questi organi sono ricchi di *fagociti*, cioè di cellule incaricate di eliminare dal flusso sanguigno particelle come microbi o frammenti di cellule corporee decomposte. I fagociti sono numerosi anche nel midollo osseo, dove il vaccino raggiunge livelli leggermente inferiori ma comunque consistenti (non mostrato).

Mentre i fagociti sono probabilmente responsabili della maggior parte dell'assorbimento nella milza, questo potrebbe non essere il caso del fegato. In questo caso, è probabile che il vaccino finisca soprattutto nelle cellule epiteliali specifiche dell'organo, che sono a diretto contatto con il plasma sanguigno e sono molto ricche di recettori per le *lipoproteine*, cioè particelle trasportatrici che mediano il trasporto di lipidi (grassi e molecole simili ai grassi) tra gli organi. Le nanoparticelle lipidiche artificiali (LNPs), come quelle utilizzate nel progetto Pfizer

¹Il testo del documento citato è in giapponese, ma è disponibile una traduzione in inglese [31].

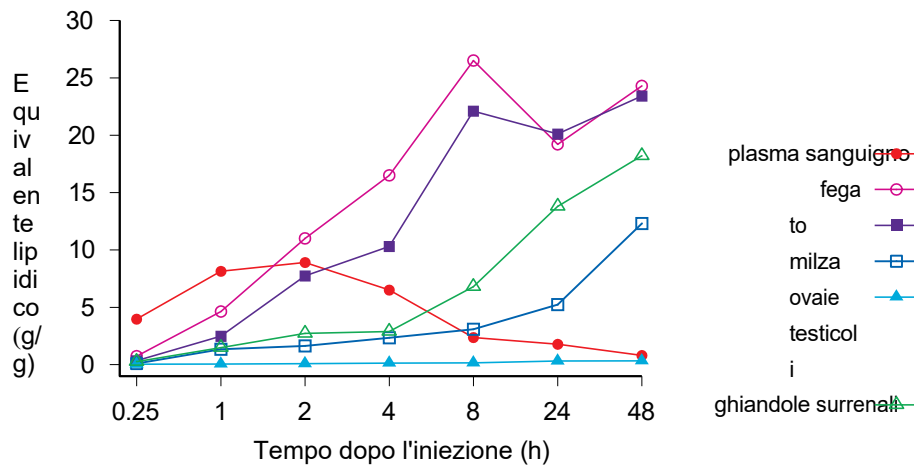


Figura 3 Distribuzione degli organi nei ratti di un modello di vaccino a mRNA con la stessa composizione lipidica del vaccino COVID-19 di Pfizer. Grafico generato dai dati della Tabella 2.6.5.5B di [30]. Il livello ematico sale rapidamente e poi scende man mano che il vaccino si accumula nei vari organi. Il vaccino è stato misurato utilizzando un derivato del colesterolo marcato radioattivamente (il colesterolo non marcato è un normale ingrediente delle nanoparticelle lipidiche del vaccino). I dati rappresentano il contenuto di vaccino in μg di lipide vaccinale per grammo di tessuto o di plasma sanguigno. Si noti l'elevata concentrazione in fegato, milza, ghiandole surrenali e ovaie.

Il vaccino COVID-19 è noto per acquisire un guscio - una "corona" - di molecole *apolipoproteiche*, che normalmente decorano le lipoproteine dell'organismo [32]. È questo effetto che indirizza le LNP sintetiche verso gli stessi tipi di cellule che possono assumere le normali lipoproteine.

Come nel fegato, anche l'assorbimento nelle ovaie e nelle ghiandole surrenali è probabilmente mediato dai recettori per le lipoproteine. Entrambi gli organi assorbono normalmente le lipoproteine per ottenere il colesterolo, che utilizzano come precursore per la produzione di ormoni steroidei: corticosteroidi nelle ghiandole surrenali e ormoni sessuali femminili (estrogeni e progestinici) nelle ovaie. Anche i testicoli producono ormoni sessuali (in particolare il testosterone) a partire dal colesterolo, ma in questo caso l'accumulazione del lipide vaccino è notevolmente inferiore. La letteratura scientifica non offre una spiegazione esauriente e diretta del limitato assorbimento nei testicoli, ma potrebbe essere legata alla cosiddetta *barriera emato-testicolare*. Un altro organo che sintetizza ormoni steroidei (progestine) in grandi quantità è la placenta. Anche in questo caso dobbiamo aspettarci un accumulo sostanziale delle particelle del vaccino, anche se lo studio Pfizer non riporta dati in merito. Nella maggior parte degli altri organi esaminati i livelli erano altrettanto bassi come nei testicoli. Notiamo, tuttavia, che almeno i vasi sanguigni saranno esposti al vaccino circolante in ogni organo.

e in ogni tessuto.

2.4 Sintesi. La trascrizione inversa dell'mRNA del vaccino COVID-19 di Pfizer in DNA e l'integrazione della copia di DNA nel genoma delle cellule ospiti sono state dimostrate direttamente in vitro e la persistenza a lungo termine della proteina spike nel corpo delle persone vaccinate suggerisce che l'integrazione del DNA può avvenire in vivo e perpetuare l'espressione della proteina spike. Inoltre, le ovaie accumulano alti livelli di vaccino, il che implica che gli ovociti possono essere esposti a quantità significative di mRNA ricombinante. L'accumulo nelle ovaie e probabilmente anche nella placenta solleva preoccupazioni riguardo alla fertilità femminile.

3 Rischi noti e plausibili che derivano dall'inserimento genomico del vaccino COVID-19 di Pfizer, recentemente accertato

I risultati riportati da Aldén et al. [23], anche se per certi aspetti preliminari, pongono alcuni interrogativi molto seri che non possono più essere ignorati dall'EMA e da altre autorità regolatorie.

3.1 Probabilità che l'inserimento del DNA avvenga in vivo. Una caratteristica notevole della Figura 2 è che il prodotto PCR che segnala l'inserimento genomico è osservato in ciascuno dei campioni di DNA isolati dalle cellule trattate con il vaccino. Ciò indica che in ogni esperimento si sono verificati uno o più eventi di inserzione. Come già detto, l'mRNA del vaccino COVID-19 di Pfizer è modificato con 1-metilpseudouridina, che protegge l'mRNA da alcune vie di degradazione [27, 33-35], il che potrebbe aumentare la probabilità di trascrizione inversa e di inserimento. A quanto pare, questa questione non è stata chiarita sperimentalmente; il fatto di non aver obbligato Pfizer a condurre tali esperimenti è un'altra clamorosa svista commessa dall'EMA.

Negli esperimenti descritti, la concentrazione di vaccino era superiore a quella che ci si può aspettare si verifichi in vivo. Tuttavia, in assenza di prove contrarie, è ragionevole supporre che la probabilità di inserimento sarà la stessa per ogni singola molecola di mRNA e indipendente dal numero di tali molecole all'interno di una data cellula. Pertanto, il numero di eventi di inserzione in vivo sarebbe limitato semplicemente dalla quantità totale di mRNA iniettato; e tale quantità supera la quantità combinata utilizzata in tutti i campioni mostrati nella Figura 2.

Anche se non sappiamo come l'efficienza dell'inserimento genomico sia comparabile tra la particolare linea cellulare umana utilizzata da Alden et al. e i vari tipi di cellule presenti nel corpo umano, dobbiamo aspettarci, almeno fino a quando non si otterrà una prova positiva del contrario, che alcuni eventi di inserimento si verifichino in molte o addirittura in tutte le persone vaccinate.

La retrotrasposizione è particolarmente comune nelle cellule che si dividono attivamente, perché durante la divisione cellulare la barriera di membrana che separa il nucleo dal citoplasma si rompe transitoriamente; ciò facilita l'ingresso nel nucleo della copia di DNA generata dall'mRNA in questione. Sebbene la maggior parte dei tessuti all'interno del corpo abbia tassi di proliferazione inferiori a quelli delle colture cellulari in vitro, alcuni, come il midollo osseo e le mucose intestinali, proliferano a tassi comparabili. Inoltre, ribadiamo che eventi di retrotrasposizione (cioè di inserimento genomico) possono verificarsi anche in cellule non in divisione [13].

3.2 Conseguenze biologiche dell'inserzione del DNA. Almeno nel caso del retrotrasposone LINE-1, le inserzioni di DNA sono apparentemente distribuite in modo casuale [10], ma si verificheranno preferenzialmente all'interno o in prossimità di geni trascrizionalmente attivi, poiché il DNA dei geni inattivi sarà strettamente impacchettato in complessi con proteine istoniche e quindi scarsamente accessibile. L'effetto genotossico di un'inserzione su un gene attivo può manifestarsi in diversi modi.

3.2.1 Inattivazione genica. L'inserzione può avvenire all'interno di un gene e interromperlo. Questo può portare alla perdita di importanti prodotti genici cellulari (cioè proteine) e quindi, potenzialmente, allo sviluppo di malattie, tra cui il cancro [11, 12]. L'inserzione può essere accompagnata dalla delezione di ampi frammenti di gene [36].

3.2.2 Regolazione genica. I meccanismi di regolazione trascrizionale ed epigenetica possono essere influenzati, modulando così i livelli di espressione delle proteine verso l'alto o verso il basso, con effetti imprevedibili e non prevedibili.

risultati auspicabili. Gli effetti regolatori indiretti possono influenzare anche geni distanti situati su altri cromosomi.

3.2.3 Attivazione di oncogeni. Questo è un caso particolare del punto precedente, ma è abbastanza importante da essere evidenziato separatamente. L'insorgenza di neoplasie attraverso l'integrazione del DNA e l'attivazione di geni promotori del cancro (oncogeni) è stata dimostrata in studi clinici con un vettore retrovirale per il trattamento genetico di bambini affetti da SCID-X1 (immunodeficienza combinata grave) [37]. Queste neoplasie si manifestano in genere solo alcuni anni dopo il completamento del trattamento [38]. Pertanto, per un'analisi valida dei benefici e dei rischi, sono assolutamente necessarie indagini approfondite a lungo termine sui possibili effetti genotossici dell'integrazione cromosomica, sia nella fase preclinica che in quella di sperimentazione clinica. Questo non vale solo per i vettori retrovirali, ma per qualsiasi acido nucleico ricombinante che possa finire per inserirsi nei cromosomi della cellula. Sia per il vaccino COVID-19 basato sull'adenovettore che per quello basato sull'mRNA, il rischio di inserimento nel DNA cromosomico deve essere preso in seria considerazione [39].

3.2.4 Malattia simil-autoimmune. L'integrazione del gene della proteina spike nella cellula ospite potrebbe portare all'espressione permanente di questo antigene e quindi indurre una malattia cronica di tipo autoimmune.

3.2.5 Integrazione della linea germinale. Abbiamo notato che gli esperimenti condotti da Pfizer indicano un alto livello di accumulo del vaccino nelle ovaie. Inoltre, LINE-1 e altri retrotrasposoni sono attivi e causano eventi di inserimento genomico negli ovociti umani [14]. L'insieme di questi risultati indica che la sequenza genica del vaccino COVID-19 di Pfizer può essere integrata nel DNA degli ovociti e quindi nella linea germinale umana. Non si può escludere nemmeno l'inserimento nelle cellule germinali maschili, anche se secondo gli studi sugli animali i livelli tissutali del vaccino Pfizer COVID-19 nei testicoli sono significativamente più bassi rispetto alle ovaie.

Se questo dovesse accadere - se le cellule germinali degli individui vaccinati dovessero essere rese transgeniche - allora il rischio di generare o concepire figli transgenici non sarà limitato solo a questi individui, ma sarà necessariamente condiviso dai loro coniugi attuali o futuri. In effetti, un'intera generazione di futuri genitori sarà esposta a questo rischio.

3.3 Sintesi. L'integrazione delle sequenze di mRNA nelle cellule somatiche è probabile e implica un rischio di cancro e di malattie autoimmuni. Inoltre, non si può negare il rischio di integrazione germinale, con conseguente prole transgenica. Questi rischi devono essere affrontati con urgenza attraverso studi approfonditi sugli animali. Nel frattempo, le autorizzazioni basate sulla valutazione scientifica palesemente inadeguata dell'EMA devono essere urgentemente revocate.

4 Potenziale genotossico delle nanoparticelle lipidiche

Sebbene le conseguenze negative dell'inserimento genomico richiedano un certo tempo per manifestarsi come malattia clinica, molti eventi avversi gravi si sono verificati poco dopo la vaccinazione e devono quindi essere attribuiti ad altri meccanismi patogenetici. La tossicità della proteina spike, così come le conseguenze dell'attacco immunitario alle cellule che la producono, sono già state discusse in dettaglio nella nostra precedente presentazione alla Corte e non verranno quindi riproposte in questa sede. Ci limiteremo a notare che il bilancio delle vittime continua a salire, con le ultime cifre fornite da EudraVigilance che hanno superato i 43.000 morti [40]. Di seguito, discuteremo brevemente la potenziale tossicità del principale lipide sintetico contenuto nel vaccino COVID-19 della Pfizer.

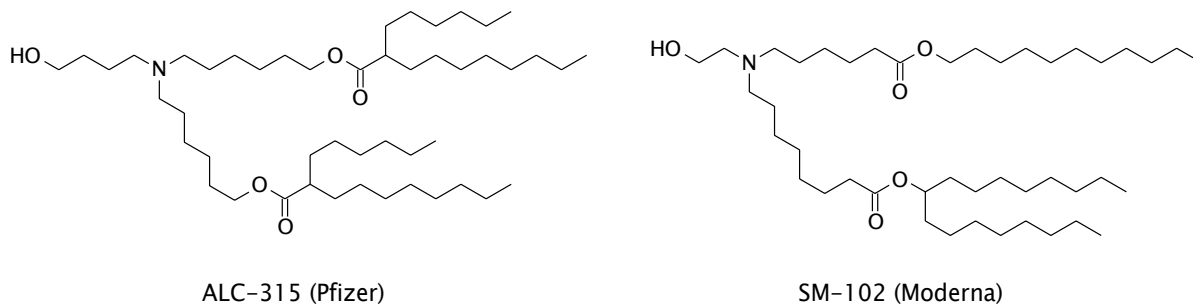


Figura 4 Strutture molecolari dei lipidi cationici proprietari contenuti nei vaccini a base di mRNA prodotti rispettivamente da Pfizer e da Moderna. Gli atomi di azoto (N) saranno parzialmente protonati in condizioni intracellulari, acquisendo così una carica positiva. Gli atomi di ossigeno (O) sono indicati; gli atomi non campionati sono di carbonio, saturi di idrogeno.

La citazione del rapporto di valutazione dell'EMA riportata all'inizio della Sezione 1 esclude non solo l'RNA, ma anche i lipidi come possibili cause di genotossicità. Per quanto riguarda questi ultimi, tale affermazione è piuttosto curiosa, poiché i lipidi sono una classe di composti molto ampia e in qualche modo vagamente definita, il che invalida qualsiasi affermazione generale sulla loro tossicità o sulla loro assenza. Tuttavia, dal momento che conosciamo i lipidi specifici contenuti nelle nanoparticelle lipidiche del vaccino COVID-19 della Pfizer, possiamo valutare se essi rappresentino o meno un rischio di genotossicità. I lipidi sono complessivamente quattro, due dei quali sono presenti in natura (colesterolo e distearoilfosfatidilcolina), mentre gli altri due sono sintetici e non sono stati precedentemente approvati per l'uso nell'uomo. In questa sede ci concentreremo sul più abbondante di questi lipidi sintetici, noto con il nome breve di ALC-315 (vedi Figura 4).

4.1 Effetto citotossico dei lipidi cationici. La prima fase del processo di assorbimento delle particelle di vaccino è l'*endocitosi*: la particella entra nella cellula, ma inizialmente è ancora intrappolata all'interno di una vescicola di membrana che si è staccata dalla membrana cellulare. La fase cruciale del rilascio dell'mRNA da questa vescicola (l'endosoma) nel citosol è mediata da un lipide sintetico cationico (carico positivamente). Nel vaccino Pfizer, questo lipide è ALC-315. Dopo la fuga nel citosol, le molecole di lipidi cationici continueranno a perturbare le membrane intracellulari, comprese quelle dei *mitocondri*. Questi sono piccoli organelli all'interno delle nostre cellule che svolgono la *respirazione cellulare*: generano idrogeno (sotto forma di NADH) e lo fanno reagire con l'ossigeno molecolare per produrre ATP, il più importante metabolita ricco di energia della cellula. L'interruzione del metabolismo mitocondriale provoca la formazione di *specie reattive dell'ossigeno* (ROS). Questi ROS, a loro volta, possono creare ogni sorta di scompiglio all'interno della cellula, compresi i danni al DNA, causando così la genotossicità.

Va notato che con qualsiasi agente che provoca danni genetici - tra cui le radiazioni ionizzanti, ma anche i farmaci antitumorali citotossici - c'è il rischio di cancro e leucemia, e inoltre c'è un limite alla dose complessiva tollerabile per tutta la vita. Pertanto, la prospettiva di ripetere frequentemente le "iniezioni di richiamo" del COVID, e anche quella di estendere la tecnologia dell'mRNA ai vaccini contro altri agenti patogeni o malattie non infettive, evoca un rischio molto grave per la salute pubblica.

4.2 Indicazioni di danni genetici dovuti ai lipidi cationici nel vaccino mRNA di Moderna. 15

Secondo il rapporto di valutazione dell'EMA sul vaccino COVID-19 di Pfizer, questo produttore non ha fornito alcun dato sperimentale sulla potenziale citotossicità della sua miscela di lipidi (e il

L'EMA ha commesso un grave errore lasciandogliela passare liscia). Al contrario, Moderna, nella sua richiesta all'EMA, ha fornito alcuni dati sperimentali. Sebbene Moderna utilizzi un lipide cationico proprietario diverso, denominato SMA-102, i due lipidi sono molto simili nella struttura (vedi Figura 4) e non c'è motivo di aspettarsi una differenza sostanziale nell'attività citotossica.

Negli esperimenti condotti da Moderna sugli animali sono stati contati gli eritrociti *policromatici* (globuli rossi, RBC) e quelli con *micronuclei*. Gli RBC policromatici sono quelli che hanno appena terminato la loro differenziazione all'interno del midollo osseo e si sono liberati dei loro nuclei. In questa fase, conservano ancora l'RNA ribosomiale, che li fa apparire bluastri anziché rossi nella colorazione di Giemsa. Le variazioni della percentuale di RBC con questa caratteristica indicano cambiamenti nella cinetica di maturazione degli eritrociti. Gli agenti genotossici possono causare sia diminuzioni [41] che aumenti [42] di questo parametro. Le differenze tra i sessi dovrebbero essere minime. Utilizzando un mRNA codificante la luciferasi impacchettato in una miscela lipidica contenente SM-102, Moderna ha riscontrato un livello significativamente ridotto di policromia eritrocitaria, ma solo nei ratti maschi. La differenza di genere riportata solleva dubbi sulla potenza statistica di questo studio.

Utilizzando un altro modello di mRNA e ancora una volta una miscela lipidica contenente SM-102, Moderna ha riscontrato "aumenti statisticamente significativi degli eritrociti micronucleati . . in entrambi i sessi". Un cosiddetto micronucleo è un frammento cromosomico prodotto da un danno cromosomico [42, 43] e lasciato nel citoplasma quando il nucleo principale è stato espulso. Il test del micronucleo è ampiamente utilizzato per valutare la genotossicità in vivo [43].

Il rapporto dell'EMA sul vaccino Moderna [44] cita uno studio condotto dall'azienda secondo cui l'aumento dell'abbondanza di RBC micronucleati potrebbe essere dovuto non alla genotossicità, ma piuttosto all'impedita eliminazione di queste cellule dal flusso sanguigno come conseguenza della tossicità del vaccino sulla milza. Tuttavia, non viene fornita alcuna prova di questa tesi e il rapporto dell'EMA afferma inoltre che "è stato osservato un forte aumento dell'evento iniziante molecolare (MIE) 48 ore dopo la somministrazione finale nel gruppo a più alta dose nei ratti maschi". Sebbene non vengano forniti dettagli sull'esatta natura dell'MIE osservato, un "aumento degli eventi iniziatori molecolari" suggerisce chiaramente un effettivo aumento del tasso di formazione di cellule geneticamente danneggiate piuttosto che una semplice diminuzione della loro eliminazione. Di certo, un rapporto così sommario e opaco non fornisce una base solida per escludere il rischio di genotossicità e procedere con l'approvazione.

In conclusione, sebbene i dati forniti da Moderna siano incompleti, essi suggeriscono fortemente che il loro lipide SM-102 è effettivamente genotossico. Ciò concorda con le precedenti osservazioni di genotossicità associate a lipidi cationici simili nei liposomi, recensite ad esempio da Inglut et al. [45]. A meno che non venga fornita una prova positiva del contrario, si deve presumere che lo stesso valga anche per il lipide ALC-315 di Pfizer.

4.3 Sensibilità dei linfociti agli agenti citotossici. Come già detto, le specie reattive dell'ossigeno mediano in larga misura gli effetti citotossici delle radiazioni ionizzanti. Un tipo di cellula particolarmente sensibile alle radiazioni, ma anche ai danni genetici causati dal metabolismo, sono i linfociti.² Poiché i linfociti sono la spina dorsale del sistema immunitario adattativo, dobbiamo aspettarci che la tossicità dei lipidi cationici provochi immunosoppressione.

²Si veda in particolare l'esempio del deficit di adenosina deaminasi, una malattia metabolica che causa uno stress genotossico a tutte le cellule dell'organismo, ma sradica selettivamente i linfociti, causando un'immunodeficienza combinata grave (SCID) [46].

4.4 Sintesi. Oltre all'mRNA, anche il lipide cationico contenuto nella vaccina COVID-19 di Pfizer presenta un rischio di genotossicità. L'EMA ha sbagliato a trascurare questo rischio e a non insistere sulla sua rigorosa valutazione sperimentale da parte del produttore.

5 La valutazione del vaccino COVID-19 di Pfizer da parte dell'EMA non è conforme ai regolamenti dell'UE

Il processo di valutazione dell'EMA, come documentato nel rapporto di valutazione dell'EMA [1], non ha rispettato le regole stabilite in varie direttive e regolamenti dell'UE.

5.1 Mancata imposizione della presentazione di studi di mutagenicità. La direttiva UE più completa sulla valutazione e l'approvazione di nuovi farmaci è la Direttiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 2001 [47]. Sebbene sia stata in parte sostituita da direttive successive, la maggior parte delle sue disposizioni rimane in vigore. Tra queste, in particolare, la Parte 3 sui test tossicologici e farmacologici. Nella sottovoce *II. Esecuzione dei test*, il paragrafo *D. Potenziale mutageno* specifica che gli studi sulla mutagenicità sono obbligatori per qualsiasi nuova sostanza. Questa disposizione è generale e non è limitata a una particolare categoria di farmaci.

Sia i lipidi sintetici che l'mRNA contenuti nel vaccino COVID-19 di Pfizer sono composti nuovi che finora non erano stati approvati per l'uso come parte di altri farmaci. Pertanto, rinunciando all'obbligo di Pfizer di sottoporre tali studi, l'EMA non ha imposto il rispetto di questa normativa vincolante e specifica.

5.2 I vaccini basati sui geni sono una forma di "terapia avanzata". La direttiva sopra citata è stata aggiornata e in parte sostituita dal regolamento CE n. 1394 del 2007 [48]. Questo regolamento introduce il concetto di "terapie avanzate" (enfasi aggiunta):

*(1) I nuovi progressi scientifici nelle **biotecnologie** cellulari e **molecolari** hanno portato allo sviluppo di **terapie avanzate**, come la terapia genica. . .*

*(2) Nella misura in cui i prodotti per terapie avanzate sono presentati come dotati di proprietà per il trattamento o la **prevenzione di malattie** negli esseri umani, o che possono essere utilizzati o somministrati agli esseri umani al fine di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche **esercitando principalmente un'azione farmacologica, immunologica o metabolica***

. . .

La rilevanza di questa definizione di "terapie avanzate" sta nel fatto che, in virtù dei termini indicati nella citazione, include inequivocabilmente i vaccini basati sui geni, anche se la direttiva 2009/120/CE [49], emanata di recente, esclude esplicitamente i "vaccini contro le malattie infettive" dalla definizione di "medicinali per terapia genica".

5.3 Mancata applicazione della valutazione del rischio di integrazione del genoma. Un'altra direttiva della Commissione, la 2009/120/CE, riguarda interamente i "medicinali per terapie avanzate", che, come appena mostrato, comprendono i vaccini basati sui geni. Essa afferma che "può essere applicato un approccio basato sul rischio" per determinare il tipo di studi necessari per l'approvazione. In questo contesto, vengono esplicitamente citati il "livello di integrazione delle sequenze di acido nucleico" nel genoma e il rischio di oncogenicità.

La sezione 4 sui *requisiti specifici relativi al Modulo 4*, sottovoce 4.1 su *tutti i medicinali per terapie avanzate*, stabilisce che con le prove farmacologiche e tossicologiche, i razionali

per la scelta dei modelli e degli esperimenti. Ciò implica probabilmente che devono essere forniti anche i motivi per cui *non sono stati* eseguiti determinati studi, come in effetti ha fatto l'EMA nella sua sterile dichiarazione che "i componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non dovrebbero avere un potenziale genotossico". Naturalmente, come è chiaro sia dalle prove precedenti sia dalla dimostrazione sperimentale dell'integrazione del genoma del vaccino, il ragionamento dell'EMA era errato.

5.4 Sintesi. L'EMA è venuta meno al suo dovere di proteggere la popolazione europea dai rischi genotossici intrinseci del vaccino COVID-19 di Pfizer. Anche senza conoscere la scienza in questione con la profondità che ci si aspetta da essa, l'EMA avrebbe potuto facilmente evitare questo grave errore aderendo alla lettera alle normative UE esistenti sui medicinali in generale e su "terapie avanzate" in particolare.

Firme

FIRMATO A Waterloo, Ontario, Canada, il 27 giugno 2022



Dr. Michael Palmer

FIRMATO A Martinsrade, Schleswig-Holstein, Germania, il 27 giugno 2022



Prof. Dr. Sucharit Bhakdi

FIRMATO A Warder, Schleswig-Holstein, Germania, il 27 giugno 2022



Dr. Wolfgang Wodarg

Brevi biografie degli autori

Sucharit Bhakdi, MD, è professore emerito di microbiologia medica e immunologia ed ex presidente dell'Istituto di microbiologia medica e igiene dell'Università Johannes Gutenberg di Mainz. Il Dr. Bhakdi ha condotto ricerche sperimentali su numerosi argomenti, tra cui il sistema del complemento, le tossine batteriche, la malaria e l'aterosclerosi.

Michael Palmer, MD, è stato fino a marzo 2022 professore associato di biochimica presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Waterloo, Ontario, Canada. Ha ottenuto la certificazione in Microbiologia medica ed Epidemiologia delle malattie infettive dalla provincia tedesca del Renania-Palatinato mentre lavorava con il Dr. Sucharit Bhakdi all'Università di Mainz, Germania. La sua ricerca si è concentrata sulle tossine batteriche e sugli antibiotici lipopeptidici, mentre la sua esperienza didattica comprende microbiologia medica, metabolismo e farmacologia.

Wolfgang Wodarg, medico, è specialista in medicina interna polmonare e bronchiale, medicina igienica e ambientale, epidemiologia e salute pubblica; membro onorario dell'Assemblea parlamentare del Consiglio d'Europa ed ex capo del Comitato per la salute dell'Assemblea parlamentare del Consiglio d'Europa; ex membro del Parlamento federale tedesco (Bundestag); promotore e portavoce della commissione di studio "Etica e legge nella medicina moderna"; autore e docente universitario.

Riferimenti

- [1] Anonimo: *Rapporto di valutazione EMA: Comirnaty*. 2021. url: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [2] D. Baltimore: La DNA polimerasi RNA-dipendente nei virioni dei virus tumorali a RNA. *Nature* 226 (1970), 1209-11. pmid: [4316300](#).
- [3] S. Spiegelman et al: Caratterizzazione dei prodotti delle DNA polimerasi RNA-dirette nei virus a RNA onco-genici. *Nature* 227 (1970), 563-7. pmid: [4317039](#).
- [4] Y. Sakaki et al.: La famiglia LINE-1 dei primati può codificare una proteina simile alla trascrittasi inversa. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1 (1986), 465-9. pmid: [2438081](#).
- [5] P. Klenerman et al.: Un virus a RNA non retrovirale persiste in forma di DNA. *Nature* 390 (1997), 298-301. pmid: [9384383](#).
- [6] M. B. Geuking et al: La ricombinazione tra retrotrasposone e virus a RNA esogeno determina l'integrazione di cDNA non retrovirali. *Science* 323 (2009), 393-6. pmid: [19150848](#).
- [7] C. Esnault et al.: I retrotrasposoni LINE umani generano pseudogeni processati. *Nat. Genet.* 24 (2000), 363-7. pmid: [10742098](#).
- [8] R. Cordaux e M. A. Batzer: L'impatto dei retrotrasposoni sull'evoluzione del genoma umano. *Nature reviews. Genetics* 10 (2009), 691-703. pmid: [19763152](#).
- [9] W. Ding et al: Elementi L1, pseudogeni processati e retrogeni nei genomi dei mammiferi. *IUBMB Life* 58 (2006), 677-85. pmid: [17424906](#).
- [10] I. Ovchinnikov et al: Caratterizzazione genomica di recenti inserzioni di LINE-1 umane: prove a sostegno dell'inserzione casuale. *Genome Res.* 11 (2001), 2050-8. pmid: [11731495](#).
- [11] C. R. Beck et al: Elementi LINE-1 nella variazione strutturale e nella malattia. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12 (2011), 187-215. pmid: [21801021](#).
- [12] J. R. Kemp e M. S. Longworth: Attraversare la linea verso l'instabilità genomica: La retrotrasposizione LINE-1 nel cancro. *Front. Chem.* 3 (2015), 68. pmid: [26734601](#).
- [13] S. Kubo et al.: Retrotrasposizione di L1 in cellule somatiche umane primarie e non in fase di divisione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006), 8036-41. pmid: [16698926](#).
- [14] I. Georgiou et al: Espressione di RNA retrotrasposoni e prove di eventi di retrotrasposizione in ovociti umani. *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009), 1221-8. pmid: [19147684](#).

- [15] V. A. Belyi et al: Eredità inaspettata: integrazioni multiple di antiche sequenze di bornavirus ed ebolavirus/marburgvirus nei genomi dei vertebrati. *PLoS Pathog.* 6 (2010), e1001030. pmid: [20686665](#).
- [16] M. Horie et al.: Elementi endogeni di virus a RNA non retrovirali nei genomi dei mammiferi. *Nature* 463 (2010), 84-7. pmid: [20054395](#).
- [17] M. Horie e K. Tomonaga: Fossili non retrovirali nei genomi dei vertebrati. *Virus* 3 (2011), 1836-48. pmid: [22069518](#).
- [18] A. Katzourakis e R. J. Gifford: Elementi virali endogeni nei genomi animali. *PLoS Genet.* 6 (2010), e1001191. pmid: [21124940](#).
- [19] S. Chiba et al: Diffusa endogenizzazione di sequenze genomiche di virus a RNA non retrovirali nei genomi delle piante. *PLoS Pathog.* 7 (2011), e1002146. pmid: [21779172](#).
- [20] E. V. Koonin: Domare i furbi: nuovi geni eucariotici da virus a RNA. *BMC Biol.* 8 (2010), 2. pmid: [20067611](#).
- [21] H. Liu et al.: Diffuso trasferimento genico orizzontale da virus a RNA a doppio filamento a genomi nucleari eucariotici. *J. Virol.* 84 (2010), 11876-87. pmid: [20810725](#).
- [22] O. Dhellin et al: Differenze funzionali tra il retrotrasposone LINE umano e le trascrittasi inverse retrovirali per la trascrizione inversa di mRNA in vivo. *EMBO J.* 16 (1997), 6590-602. pmid: [9351839](#).
- [23] M. Aldén et al: Trascrizione inversa intracellulare del vaccino BNT162b2 di Pfizer BioNTech COVID-19 in vitro in una linea cellulare epatica umana. *Current issues in molecular biology* 44 (2022), 1115- 1126. doi: [10.3390/cimb44030073](#).
- [24] L. Zhang et al: L'RNA della SARS-CoV-2 trascritto inversamente può integrarsi nel genoma di cellule umane coltivate e può essere espresso in tessuti derivati da pazienti. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021). pmid: [33958444](#).
- [25] K. Röltgen et al: Imprinting immunitario, ampiezza del riconoscimento delle varianti e risposta del centro germinale nell'infezione umana da SARS-CoV-2 e nella vaccinazione. *Cell* (2022). pmid: [35148837](#).
- [26] S. Bansal et al: Cutting Edge: gli esosomi circolanti con la proteina COVID Spike sono indotti dalla vaccinazione BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) prima dello sviluppo di anticorpi: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J. Immunol.* 207 (2021), 2405-2410. pmid: [34654691](#).
- [27] U. Sahin et al.: Terapeutici basati sull'mRNA: lo sviluppo di una nuova classe di farmaci. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014), 759-780. pmid: [25233993](#).
- [28] O. Andries et al: L'mRNA incorporato con N¹-metilpseudouridina supera l'mRNA incorporato con pseudouridina fornendo una maggiore espressione proteica e una ridotta immunogenicità nelle linee cellulari di mammifero e nei topi. *J. Control. Release* 217 (2015), 337-344. doi: [10.1016/j.jconrel.2015.08.051](#).
- [29] N. Pardi et al: Vaccini a mRNA modificati con nucleosidi inducono potenti risposte delle cellule T helper follicolari e del centro germinale B. *J. Exp. Med.* 215 (2018), 1571-1588. pmid: [29739835](#).
- [30] Anonimo: *Vaccino SARS-CoV-2 mRNA (BNT162, PF-07302048) 2.6.4 [Dichiarazione riassuntiva dello studio farmacocinetico] (giapponese)*. 2020. url: https://www.pmda.go.jp/drugs/2021/P20210212001/672212000_30300AMX00231_I100_1.pdf.

- [31] Anonimo: *Vaccino SARS-CoV-2 mRNA (BNT162, PF-07302048) 2.6.4 Dichiarazione riassuntiva dello studio farmacocinetico [traduzione in inglese]*. 2020. url: <https://archive.org/details/pfizer-confidential-translated>.
- [32] V. Francia et al: La corona biomolecolare delle nanoparticelle lipidiche per la terapia genica. *Bioconjug. Chem.* 31 (2020), 2046-2059. pmid: [32786370](#).
- [33] B. R. Anderson et al: L'incorporazione di pseudouridina nell'mRNA migliora la traduzione diminuendo l'attivazione della PKR. *Nucleic Acids Res.* 38 (2010), 5884-92. pmid: [20457754](#).
- [34] B. R. Anderson et al: Modifiche nucleosidiche nell'RNA limitano l'attivazione della 2'-5'-oligoadenilato sintasi e aumentano la resistenza al clivaggio da parte della RNasi L. *Nucleic Acids Res.* 39 (2011), 9329-9338. doi: [10.1093/nar/gkr586](https://doi.org/10.1093/nar/gkr586).
- [35] K. Karikó et al: L'incorporazione di pseudouridina nell'mRNA produce un vettore superiore non immunogeno con una maggiore capacità traslazionale e stabilità biologica. *Mol. Ther.* 16 (2008), 1833-40. pmid: [18797453](#).
- [36] N. Van de Water et al: Una delezione di 20,7 kb all'interno del gene del fattore VIII associata all'inserzione dell'elemento LINE-1. *Thromb. Haemost.* 79 (1998), 938-42. pmid: [9609225](#).
- [37] F. J. T. Staal e altri: Sola dosis facit venenum. Leucemia negli studi di terapia genica: una questione di vettori, inserti e dosaggio? *Leukemia* 22 (2008), 1849-1852. pmid: [18769449](#).
- [38] S. Hacein-Bey-Abina et al.: Oncogenesi inserzionale in 4 pazienti dopo terapia genica mediata da retrovirus della SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118 (2008), 3132-42. pmid: [18688285](#).
- [39] W. Doerfler: Vaccini Covid-19 basati sul DNA di vettori adenovirali e sull'mRNA del SARS-CoV-2: Possibile integrazione nel genoma umano: i geni adenovirali sono espressi nei vaccini basati su vettori? *Virus Res.* 302 (2021), 198466. pmid: [34087261](#).
- [40] B. Shilhavy: *43.898 morti, 4.190.493 feriti a seguito di vaccini COVID nel database europeo delle reazioni avverse*. 2022. url: <https://healthimpactnews.com/2022/43898-morti-4190493-feriti-in-seguito-a-vaccini-covid-nel-database-europeo-delle-reazioni-avverse/>.
- [41] Y. Suzuki et al: Il test del micronucleo e l'eritropoiesi. Effetti dell'eritropoietina e di un mutageno sul rapporto tra eritrociti policromatici e normocromatici (rapporto P/N). *Mutagenesi* 4 (1989), 420-4. pmid: [2516221](#).
- [42] J. A. Heddle et al: L'induzione di micronuclei come misura della genotossicità. Un rapporto del Programma Gene-Tox dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti. *Mutat. Res.* 123 (1983), 61-118. pmid: [6888413](#).
- [43] S. Sommer et al: Saggio del micronucleo: Lo stato dell'arte e le direzioni future. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). pmid: [32102335](#).
- [44] Anonimo: *Rapporto di valutazione dell'EMA: COVID-19 Vaccino Moderna*. 2021. url: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-precedentemente-covid-19-vaccino-moderno-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [45] C. T. Inglut et al: Considerazioni immunologiche e tossicologiche per la progettazione di liposomi. *Nanomateriali* 10 (2020). pmid: [31978968](#).
- [46] W. L. Nyhan: Disturbi del metabolismo di purine e pirimidine. *Mol. Genet. Metab.* 86 (2005), 25-33. pmid: [16176880](#).

- [47] Anonimo: *Direttiva 2001/83/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 6 novembre 2001 recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano*. 2001. url: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&from=EN>.
- [48] Anonimo: *Regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 13 novembre 2007, sui medicinali per terapie avanzate e che modifica la direttiva 2001/83/CE e il regolamento (CE) n. 726/2004*. 2007. url: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1394&from=EN>.
- [49] Anonimo: *Direttiva 2009/120/CE della Commissione, del 14 settembre 2009, che modifica la direttiva 2001/83/CE del Parlamento europeo e del Consiglio recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano per quanto riguarda i medicinali per terapie avanzate*. 2009. url: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0120>.