

Attività Adiuvante e Rischi Tossicologici delle Nanoparticelle Lipidiche Contenute nei "Vaccini a mRNA" COVID19

TRADUZIONE
NON UFFICIALE
Versione 01

Gabriele Segalla, PhD · ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5969-3732>

Pure Chemistry (Organic Biological Chemistry), specialist in chemistry of micro-emulsions and colloidal systems, CEO & Chief Scientist of Multichem R&D Italy, email: gabriele.segalla@gmail.com

Sommario

Secondo quanto riferito, le nanoparticelle lipidiche (LNP), utilizzate come piattaforma da Pfizer/BioNTech per i suoi "vaccini a mRNA" SARS-CoV-2, sarebbero costituiti da una miscela di fosfolipidi, colesterolo, lipidi PEGhilati e un lipide cationico ionizzabile. Questo studio esamina alcuni dei principali rischi tossicologici e delle proprietà immuno-stimolatorie di tali nanomateriali, con particolare attenzione alle LNP ionizzabili e alle loro proprietà adiuvanti, alle risposte infiammatorie, alla stimolazione delle cellule immunitarie e alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno delle cellule trasfettate. La decisione di non effettuare test di farmacologia di sicurezza, cancerogenicità e genotossicità su questi nanomateriali appare ingiustificabile e in contraddizione con le politiche internazionali previste per i cosiddetti *novel adjuvant* (nuovi adiuvanti). Sono evidenziate importanti lacune riguardanti le attività di controllo degli organismi di regolamentazione competenti, relative alla valutazione scientifica, alla gestione del rischio e alla farmacovigilanza per i nuovi medicinali nell'UE. Alla luce dei risultati qui discussi, si raccomanda vivamente che i "vaccini" a base di mRNA-LNP e i loro richiami siano urgentemente rimossi dal mercato mondiale a causa di rischi per la sicurezza inaccettabili e potenzialmente fatali.

Parole chiave: *COVID-19 mRNA vaccine, LNP, lipid nanoparticle, nanotechnology, ROS, adjuvant, novel adjuvant*

Introduzione

Le nanoparticelle lipidiche ionizzabili (LNP) nei due vaccini COVID-19 a base di mRNA-LNP (Comirnaty di Pfizer/BioNTech e Spikevax di Moderna) sono presumibilmente, secondo la documentazione dei produttori, formate da quattro diversi tipi di lipidi: un lipide cationico ionizzabile la cui carica positiva si lega alla struttura caricata negativamente del modRNA¹, un lipide legato al polietilenglicole (PEG) che dovrebbe aiutare a prolungare l'emivita della composizione, un

¹ Un RNA messaggero con nucleosidi *modificati* (modRNA) è un RNA messaggero sintetico, in cui alcuni nucleosidi sono sostituiti da altri nucleosidi modificati sinteticamente o analoghi, per indurre le cellule a produrre proteine che

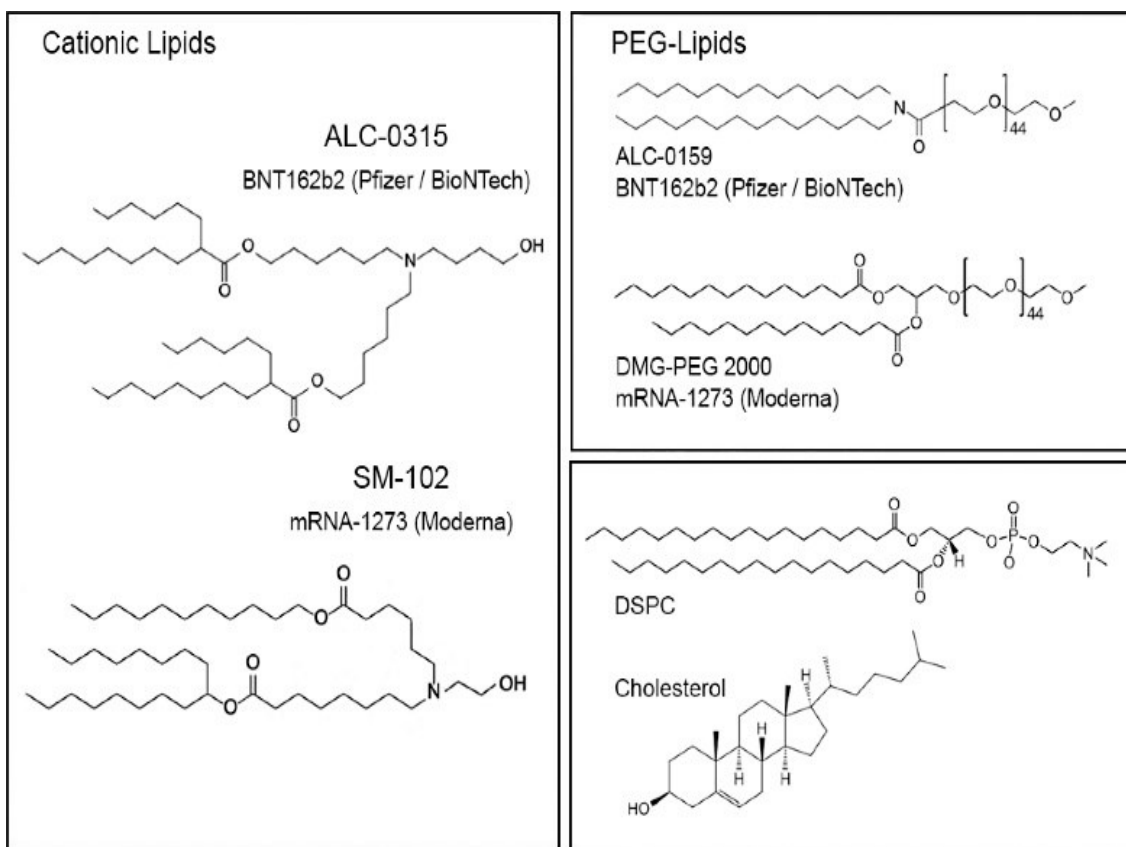


Figura 1. “Strutture dei costituenti lipidici delle LNP dei vaccini a mRNA COVID-19” ristampato dalla Figura 8, pagina 16989 dall'articolo di Tenchov, R., Bird, R., Curtze, A. E., & Zhou, Q., intitolato “Lipid nanoparticles — from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement” pubblicato in *ACS Nano* 2021, 15, 11, 16982–17015, 15(11), 16982–17015, <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.1c04996>. Copyright © by the authors 2021 and licensed under CC-BY 4.0.

fosfolipide (DSPC) per facilitare la formazione di una struttura a due strati, e infine colesterolo, destinato a funzionare come modulatore/stabilizzatore della fluidità della membrana (Figura 1).

Si suppone che queste nanoparticelle abbiano la funzione primaria di incapsulare il modRNA "sperimentale", proteggendolo dalla degradazione enzimatica e favorendo la sua penetrazione nelle cellule dell'organismo ospite, dopo l'iniezione intramuscolare (Nance & Meier, 2021).

È probabile che le modificazioni di questi RNA siano in parte, forse interamente, responsabili dei coaguli innaturali trovati in soggetti, vivi e morti, cui erano stati somministrati questi prodotti iniettabili sperimentali, e che tali prodotti stiano aumentando la mortalità-per-tutte-le-cause in tutto il mondo (Santiago, 2022a, 2022b; Santiago & Oller, 2023).

Nel caso del medicinale Comirnaty di Pfizer/BioNTech, immesso in commercio in Europa, con autorizzazione all'immissione in commercio condizionata, datata 21 dicembre 2020, l'RNA

normalmente non producono. In altre parole, è una sorta di codice per fabbricare proteine estranee "contrabbandate" nelle cellule.

modificato (mRNA BNT162b2), che dovrebbe codificare la proteina virale Spike all'interno della cellula ospite, è incapsulato in nanoparticelle lipidiche formate dai due lipidi funzionali ALC-0315² e ALC-0159³, e i due lipidi strutturali DSPC⁴ e colesterolo.

Alcune importanti non-conformità normative e l'assenza di studi tossicologici riguardanti i nuovi componenti LNP dei "vaccini" a mRNA sono già state discusse in studi recenti (Segalla, 2023a; Banoun, 2023).

In questa revisione, l'attenzione si concentra su alcuni dei principali problemi tossicologici e immunologici presentati da questi nanomateriali lipidici, con particolare attenzione agli LNP ionizzabili utilizzati da Pfizer/BioNTech. Tali preoccupazioni riguardano evidenti lacune e contraddizioni che emergono da un'analisi comparativa dettagliata della documentazione ufficiale di sicurezza presentata sia dal fabbricante che dall'organismo regolatorio responsabile della valutazione scientifica, della supervisione, dell'approvazione del piano di gestione dei rischi e della farmacovigilanza dei medicinali nella Comunità europea.

Specie reattive dell'ossigeno e tossicità delle nanoparticelle

Numerosi studi hanno confermato che gli effetti tossici prodotti dalle nanoparticelle nei sistemi biologici sono principalmente e sostanzialmente dovuti alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno delle cellule. I ROS sono particelle che contengono ossigeno, tra le quali le più rilevanti sono il *perossido di idrogeno* (H₂O₂), il *radicale anione superossido* (O₂⁻) e i *radicali ossidrilici* (•OH). Vedi la discussione in Segalla 2023a.

Negli studi scientifici sull'argomento, si nota generalmente che, nonostante i benefici e i progressi compiuti nell'uso dei nanomateriali in campo biomedico, permangono preoccupazioni circa i potenziali effetti tossicologici delle nanoparticelle, soprattutto in relazione alla loro tendenza a generare ROS. A causa del loro forte potenziale di ossidazione, l'eccesso di ROS indotto dalle nanoparticelle può causare danni alle biomolecole e alle strutture degli organelli cellulari. Possono produrre carbonilazione ossidativa delle proteine, perossidazione lipidica, rottura del DNA/RNA e distruzione delle membrane cellulari, fattori che possono indurre un complesso di effetti fisiopatologici, come genotossicità, necrosi, apoptosi, infiammazione citochinica, fibrosi, metaplasia, ipertrofia, cancerogenicità o persino mutagenesi che ha un impatto sulle generazioni future. L'estrema penetrazione e mobilità delle nanoparticelle all'interno dell'organismo spiega il loro facile ingresso nella circolazione sistemica e l'accumulo in organi come reni, fegato, cuore, cervello, tratto intestinale e polmoni, causando disfunzioni e anomalie (Yu et al., 2020).

Ci sono prove schiaccianti che la sovrapproduzione di ROS è la causa principale della biotossicità delle nanoparticelle. Concentrandosi principalmente nei lisosomi, nei mitocondri e nel nucleo della cellula e generando ROS in quei siti, le nanoparticelle possono causare conseguenze devastanti. Numerosi studi confermano in modo inconfutabile che i componenti nucleotidici del DNA e dell'RNA cellulare costituiscono un bersaglio significativamente vulnerabile all'aggressione dei ROS generati dai nanomateriali (Imlay et al., 1988; Maki et al., 1992; Demple et al., 1994).

² ALC-0315: ((4-idrossibutil (azanediil)bis(esano-6,1-dii)bis(2-esildecanoato)

³ ALC-0159: 2-[(polietilenglicole)-2000]-N,N-ditetradecilacetammide

⁴ DSPC: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

Le conseguenze di cui sopra possono provocare danni genetici irreparabili, con conseguente sviluppo di *genotossicità* (Kang et al., 2008; Singh et al., 2009; Chompoosor et al., 2010; Di Bucchianico et al., 2014; Proquin et al., 2017), *mutagenicità* (Kirsch-Volders et al., 2002; Mateuca et al., 2006; Dufour et al., 2006; Levine et al., 2017; Jena, 2012), e *cancerogenicità* (Rusyn et al., 2004; Nel et al., 2006; Liou et al., 2010; Tretyakova et al., 2015). La logica alla base di questo ordine sequenziale di eventi tossicologici è che uno dei meccanismi fondamentali che possono portare alla cancerogenesi è il danno al DNA (Poirier, 2004).

L'accumulo di nanoparticelle nel corpo può indurre ulteriormente *infiammazione e risposte immunitarie*, che a loro volta possono causare lesioni cellulari o apoptosi (morte cellulare), disfunzioni degli organi vitali e, infine, stimolare l'insorgenza di numerose malattie, come l'Alzheimer, il Parkinson, l'infiammazione del fegato e la disembrionia (Yu et al., 2020).

Inoltre, come riportato anche dai ricercatori di Moderna (Packer et al., 2021), una nuova classe di impurezze (addotti lipidi-mRNA), formate attraverso reazioni lipide-mRNA, sono state identificate solo attraverso nuove sofisticate tecniche HPLC e Spettrometria di Massa, in quanto tali reazioni non sono tipicamente rilevabili dalle tradizionali tecniche analitiche per la determinazione della purezza dell'mRNA. Tali modifiche, solo recentemente identificate, possono rendere l'mRNA cellulare intraducibile, portando alla perdita di espressione proteica, e possono anche provocare la formazione di composti reattivi o metaboliti elettrofili (genotossici) attraverso un meccanismo di sostituzione nucleofila (Martella et al., 2023).

Il valore del pKa intrinseco (9.6) del lipide ionizzabile ALC-0315 è troppo alto, il che lo rende una base più forte dell'ammoniaca stessa (pKa 9.25) in soluzione acquosa, facendolo diventare completamente protonato una volta rilasciato nel citosol della cellula ospite, a pH fisiologico. Tale elevata carica cationica, acquisita da ALC-0315 dopo la sua fuga endosomiale, può stimolare la formazione di citochine pro-infiammatorie e ROS, che possono distruggere la membrana mitocondriale e rilasciare il suo contenuto, causare errori di traduzione dell'RNA, polimerizzazione delle proteine e del DNA, mutazioni del DNA, distruzione della membrana nucleare e conseguente rilascio del suo contenuto (Yu et al., 2020; Segalla, 2023b).

Indubbiamente, tra i maggiori rischi per la salute umana causati dall'eccezionale penetrabilità, mobilità, reattività chimica e accumulo sistemico di nanoparticelle lipidiche cationiche incontrollabili all'interno dei sistemi biologici, vanno sempre individuati e valutati quelli legati alla *genotossicità* e alla *cancerogenicità*. I saggi in vitro sono considerati uno strumento estremamente importante, se non indispensabile, per una comprensione approfondita dei meccanismi di tossicità e un'adeguata valutazione dei rischi per la salute causati dai nanomateriali cationici, soprattutto nel medio-lungo periodo (Barone et al., 2017).

La valutazione della tossicità genetica di nuove sostanze chimiche è una priorità assoluta nella gestione del rischio e le valutazioni di sicurezza incentrate sul fatto che una nuova sostanza chimica possa indurre mutagenicità e/o cancerogenicità sono necessarie nell'ambito dell'identificazione e della caratterizzazione del rischio (Cimino, 2006; Petkov et al., 2015; Thybaud et al., 2017).

Test per valutare l'eventuale formazione di tumori dopo la somministrazione chimica ad animali in vivo possono essere utilizzati per valutarne anche la cancerogenicità, tuttavia si devono prevedere costi elevati, tempi di analisi lunghi e problemi relativi alla protezione degli animali (Bourcier et al., 2015; Petkov et al., 2015). I metodi in vitro per valutare la genotossicità nelle prime fasi dello sviluppo di un prodotto chimico includono saggi come il test di Ames, il test del micronucleo e il

test di aberrazione cromosomica, che nel loro insieme possono essere utilizzati per prevedere il potenziale cancerogeno di una sostanza chimica (Kirkland et al., 2005; Hayashi et al., 2013). Si cercano perciò metodi di test in vitro migliorati che possano includere la valutazione del danno al DNA per prevedere la mutagenicità e la cancerogenicità dei composti chimici con precisione e a costi sufficientemente bassi nelle prime fasi dello sviluppo chimico (MacGregor et al., 2015; Petkov et al., 2015; Dertinger et al., 2019). Anche le moderne tecniche basate su recenti studi di adduttomica del DNA/RNA consentono di ottenere buoni risultati analitici in tempi relativamente brevi (Takeshita & Kanaly, 2019).

Tutti i test richiesti per la valutazione degli effetti tossicologici ed ecotossicologici dei nanomateriali sono indicati e descritti dall'OCSE⁵ nel suo *Manuale di orientamento per le prove sui nanomateriali fabbricati* (ENV/JM/MONO(2009)20/REV), compresi gli endpoint come lo stress ossidativo causato da ROS, la risposta infiammatoria, la cancerogenicità, la tossicità riproduttiva, la genotossicità e la mutagenicità.

Genotossicità e cancerogenicità: policies e linee guida normative rilevanti

I due componenti del Comirnaty, ALC-0315 e ALC-0159, sono classificati dall'EMA, nella sua relazione di valutazione del 19 febbraio 2021, come *nuovi eccipienti*, in quanto non sono mai stati precedentemente utilizzati in un medicinale in Europa (EMA/707383).

Un "nuovo eccipiente" è definito dall'EMA (Doc. Ref. EMEA/CHMP/QWP/396951/2006, pagina 8) come segue (con corsivi aggiunti qui e in tutte le restanti voci citate in questo documento):

Un *nuovo eccipiente* è un eccipiente che viene *utilizzato per la prima volta* in un prodotto farmaceutico o per una nuova via di somministrazione. Può trattarsi di un'entità chimica nuova o di un'entità ben consolidata che non è ancora stata utilizzata per la somministrazione umana e/o per un particolare percorso di somministrazione umana nell'UE e/o al di fuori dell'UE [Figura 2].

Assessment report
Comirnaty
Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000
19 February 2021
EMA/707383/2020 Corr.1
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Control of excipients

ALC-0315 and ALC-0159 are novel excipients, not previously used in an approved finished product within EU. Additional information is provided separately in Section A.3 of the dossier.

Assessment report
EMA/707383/2020

Page 28/140

Novel excipient: A novel excipient is an excipient which is being used for the first time in a drug product, or by a new route of administration (ICH). It may be a new chemical entity or a well established one which has not yet been used for human administration and /or for a particular human administration pathway in the EU and/or outside the EU. (GUIDELINE ON EXCIPIENTS IN THE DOSSIER FOR APPLICATION FOR MARKETING AUTHORISATION OF A MEDICINAL PRODUCT – EMEA - London, 19 June 2007 - Doc. Ref. EMEA/CHMP/QWP/396951/2006 – page 8)

Figura 2. ALC-0315 e ALC-159 classificati da EMA come *novel excipients*.

⁵ OCSE: Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico

L'assenza di studi di genotossicità e cancerogenicità nella fase preclinica dello sviluppo del vaccino Comirnaty è giustificata dall'EMA nella sua relazione di valutazione (EMA/707383, 2021), come segue:

Non sono stati forniti studi di genotossicità o cancerogenicità. I componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non dovrebbero avere un potenziale genotossico [p. 55].

Secondo le linee guida, non sono stati eseguiti studi di genotossicità o cancerogenicità. Non si prevede che i componenti del vaccino (lipidi e mRNA) abbiano un potenziale genotossico. Questo è accettabile per il CHMP⁶ [p. 56].

Inoltre, il Piano di Gestione del Rischio⁷ di Pfizer/BioNTech del 25 novembre 2021 (Figura 3), e tutti i suoi successivi **aggiornamenti**, riportano le seguenti parole

Non sono stati condotti studi di sicurezza farmacologica, genotossicità e cancerogenicità, in conformità con le linee guida sui vaccini dell'OMS del 2005, in quanto generalmente non sono considerati necessari per sostenere lo sviluppo e l'autorizzazione di vaccini per le malattie infettive. Inoltre, i componenti del costrutto vaccinale sono lipidi e RNA e non si prevede che abbiano un potenziale cancerogeno o genotossico.

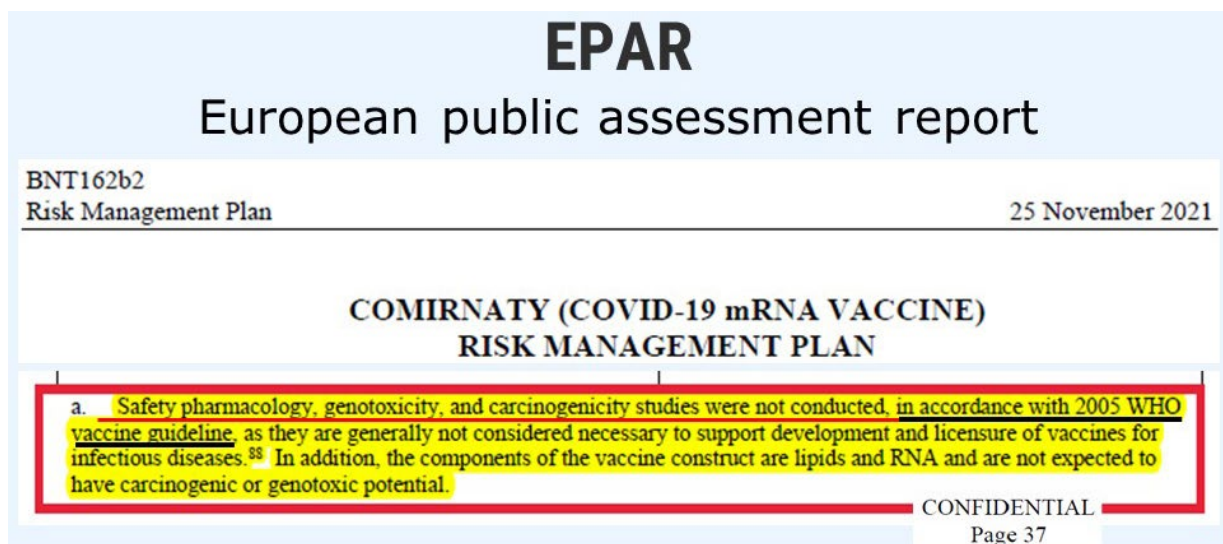


Figura 3. Comirnaty RPM, 25 novembre 2021, afferma che non sono necessari studi di sicurezza farmacologica, genotossicità e cancerogenicità, in conformità con le linee guida sui vaccini dell'OMS del 2005.

L'EMA, la più importante istituzione in Europa responsabile della valutazione scientifica, della supervisione e del monitoraggio della sicurezza dei medicinali sviluppati dalle aziende farmaceutiche, e il suo Comitato per i medicinali per uso umano (CHMP), che svolge un ruolo fondamentale nell'autorizzazione dei medicinali nell'Unione Europea, hanno quindi autorizzato Pfizer/BioNTech a non condurre test di sicurezza farmacologica, genotossicità e cancerogenicità *in conformità con* l'allegato – *Linee guida dell'OMS sulla valutazione non clinica dei vaccini*, serie di relazioni tecniche, **No**.

⁶ CHMP: European Committee for Medicinal Products for Human Use (Comitato per i medicinali per uso umano).

⁷ Le aziende dell'UE sono tenute a presentare un piano di gestione del rischio (**RMP**) all'Agenzia europea per i medicinali (EMA) al momento della richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio. Gli RMP includono informazioni su: profilo di sicurezza di un medicinale; come i suoi rischi saranno prevenuti o ridotti al minimo nei pazienti; piani di studi e altre attività per acquisire maggiori conoscenze sulla sicurezza e l'efficacia del medicinale; misurare l'efficacia delle misure di minimizzazione del rischio.

La sezione 4.2.3. (Figura 4) del citato documento dell'OMS recita:

Di norma non sono necessari *studi di genotossicità* per la formulazione finale del vaccino. Tuttavia, *possono essere richiesti per particolari componenti del vaccino, come nuovi adiuvanti e additivi*. Se necessario, i test in vitro per le mutazioni e il danno cromosomico devono essere eseguiti *prima della prima esposizione umana*. L'intera serie di test per la genotossicità può essere eseguita in parallelo con le sperimentazioni cliniche. *Gli studi di cancerogenicità non sono necessari per gli antigeni dei vaccini. Tuttavia, possono essere richiesti per particolari componenti del vaccino, come nuovi adiuvanti e additivi.*

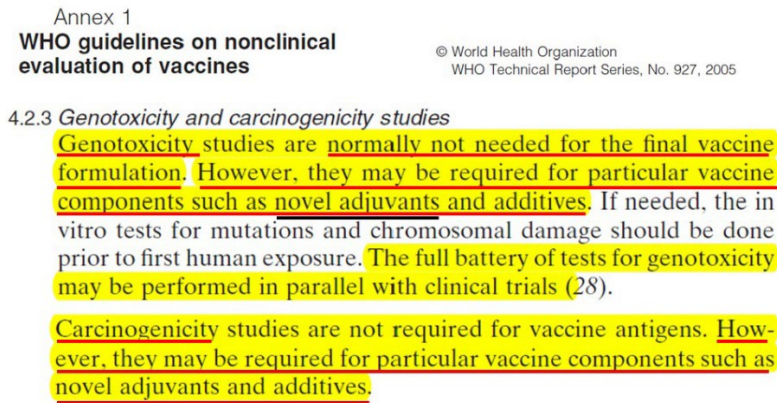


Figura 4. WHO Guidelines on non clinical evaluation of vaccines, Technical Report Series, No. 927, 2005, section 4.2.3.

Questo documento dell'OMS del 2005 specifica in modo chiaro e inequivocabile che, sebbene i test di genotossicità e cancerogenicità non siano comunemente richiesti per la formulazione finale di un vaccino, possono comunque essere richiesti se nella formulazione sono presenti *nuovi adiuvanti*.

Questo stesso documento dell'OMS fornisce la definizione di "adiuvante":

Adiuvanti: sostanze che hanno lo scopo di migliorare la risposta immunitaria in modo rilevante e la conseguente efficacia clinica del vaccino.

Una definizione analoga è contenuta nelle Linee guida Europee sugli Eccipienti, del 19 giugno 2007:

Un *adiuvante* è una sostanza che aiuta e potenzia l'effetto farmacologico di un farmaco o aumenta la capacità di un antigene di stimolare il sistema immunitario [p. 9]

La sezione 5 delle Linee Guida dell'OMS del 2005 fornisce una chiara spiegazione del motivo per cui gli adiuvanti sono inclusi nelle formulazioni dei vaccini:

Gli adiuvanti possono essere inclusi nelle formulazioni dei vaccini o co-somministrati con i vaccini per migliorare le risposte immunitarie a particolari antigeni o per mirare ad una particolare risposta immunitaria. *È importante che gli adiuvanti utilizzati siano conformi ai requisiti della farmacopea, ove esistenti, e che non causino tossicità inaccettabile.* L'attività adiuvante è il risultato di molti fattori e la risposta immunitaria ottenuta con una particolare formulazione antigenica/adiuvante non può, di regola, essere estrapolata ad un altro antigene. I singoli antigeni variano nelle loro proprietà fisiche e biologiche e gli antigeni possono interagire in modo diverso con un adiuvante. Gli adiuvanti devono essere scelti in base al tipo di risposta immunitaria desiderata e *devono essere formulati con l'antigene in modo tale che la distribuzione di entrambi sia ottimizzata per garantire la disponibilità ai tessuti linfatici rilevanti* [p. 51]. *L'effetto dell'adiuvante deve essere dimostrato in studi preclinici di immunogenicità. Se non esistono dati tossicologici per un nuovo adiuvante, devono essere prima effettuati studi di tossicità del solo adiuvante.* In generale, la *valutazione di adiuvanti nuovi o "novel" dovrebbe essere effettuata come richiesto per una nuova entità chimica* [p. 52].

La definizione di "nuovo" adiuvante è data in un altro documento dell'OMS (WHO Expert Committee on Biological Standardization – Sixty-fourth report [WHO TRS N°987: 2013](#) – Technical Report Series 987 – Annex 2 – *Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines* [*Linee guida sulla valutazione non clinica degli adiuvanti vaccinali e dei vaccini adiuvati*]):

Il successo della valutazione preclinica dei vaccini adiuvati, compresa la caratterizzazione fisico-chimica, i test proof-of-concept sugli animali e i test di tossicità, è un passo importante verso il loro sviluppo clinico. Inoltre, gli studi sugli animali sono strumenti preziosi per consentire di elaborare un dosaggio sicuro, un programma e una via di somministrazione sicuri e per *identificare effetti avversi inattesi o potenziali* per un monitoraggio specifico negli studi clinici. I problemi di sicurezza includono *potenziali tossicità intrinseche dell'antigene e/ o dell'adiuvante del vaccino*, potenziali tossicità di eventuali impurità e contaminanti e *potenziali tossicità dovute alle interazioni dei componenti presenti nella formulazione finale*. Le considerazioni normative per il vaccino adiuvato sono simili a quelle per i vaccini in generale, con ulteriori questioni che sono *uniche per i nuovi adiuvanti*. Ai fini delle presenti linee guida dell'OMS, *un nuovo adiuvante è definito come un adiuvante che non è stato incluso in un vaccino autorizzato* [p. 64].

Vaccino adiuvato: la formulazione completa che comprende uno o più antigeni, *uno o più adiuvanti* e qualsiasi additivo (che può includere, ad esempio, eccipienti o conservanti), la cui somministrazione ha lo scopo di *stimolare il sistema immunitario a provocare una risposta immunitaria che porti alla prevenzione o al trattamento di un'infezione o di una malattia infettiva* [p. 65].

Nuovo adiuvante: un nuovo adiuvante è un adiuvante che non è *stato mai contenuto in un vaccino autorizzato* [p. 66].

Adiuvanti vaccinali: sostanze o combinazioni di sostanze utilizzate in combinazione con un antigene vaccinale per potenziare (ad esempio aumentare, accelerare, prolungare e/o eventualmente avere come target) o modulare verso un tipo diverso (ad esempio commutare una risposta immunitaria Th1 in una risposta Th2 o una risposta umorale a una risposta citotossica delle cellule T) la risposta immunitaria specifica all'antigene vaccinale al fine di migliorare l'efficacia clinica del vaccino. [...] Il termine "adiuvante" utilizzato in tutto questo documento *include adiuvanti che esistono come una singola sostanza, nonché adiuvanti combinati che consistono in più adiuvanti e talvolta altri additivi* [p. 67].

E, per quanto riguarda gli studi di genotossicità, lo stesso documento dice:

Di norma non sono necessari studi di genotossicità per la formulazione finale del vaccino. Tuttavia, una batteria standard di studi di genotossicità è generalmente raccomandata per la maggior parte dei nuovi adiuvanti che consistono di (o contengono) nuove entità chimiche.

Studi di tossicità del solo adiuvante: [...] La valutazione completa della tossicità del solo adiuvante negli animali può essere inclusa come parte del disegno dello studio con il vaccino adiuvato. Tuttavia, *la valutazione del solo adiuvante può essere importante per nuovi adiuvanti che non sono stati studiati in precedenza o che saranno utilizzati in più formulazioni vaccinali diverse*. Nel caso di un *nuovo adiuvante* o di un *adiuvante di combinazione*, può essere consigliabile includere dosi aggiuntive (inferiori e superiori) dei componenti adiuvanti al fine di identificare una dose sicura che potrebbe essere utilizzata in una prima sperimentazione clinica sull'uomo, nonché segnali di sicurezza che dovrebbero essere monitorati nella sperimentazione clinica proposta.

Sebbene di solito non siano necessari, *in alcuni casi possono essere raccomandati studi di sicurezza farmacologica per dimostrare che un nuovo adiuvante non ha effetti avversi sulle funzioni fisiologiche* (ad esempio sul sistema nervoso centrale, sul sistema respiratorio o cardiovascolare, sulla funzione renale e sulla temperatura corporea). Se necessario, tali valutazioni potrebbero anche essere incluse come set specifico di test con il solo adiuvante nello studio di tossicità a dosi ripetute della formulazione finale del vaccino prevista. Si prevede che *questi studi siano condotti prima di iniziare i primi studi clinici sull'uomo* [p. 85].

Per quanto riguarda i normali studi di farmacocinetica, la sezione 4.2.6 delle linee guida dell'OMS [del 2005](#) afferma:

Di norma non sono necessari studi di farmacocinetica (ad esempio per determinare le concentrazioni sieriche o tissutali dei componenti del vaccino). *La necessità di studi specifici deve essere presa in considerazione caso per caso*

(ad esempio quando si utilizzano nuovi adiuvanti o vie di somministrazione alternative) e può includere studi di deposizione locale che valutino la ritenzione del componente vaccinale nel sito di iniezione e la sua ulteriore distribuzione (ad esempio ai linfonodi drenanti). *Gli studi di distribuzione devono essere presi in considerazione nel caso di nuove formulazioni, nuovi adiuvanti o quando si prevede di utilizzare vie di somministrazione alternative (ad esempio orale o intranasale) [p. 51].*

Ciononostante, il rapporto di valutazione dell'EMA su Comirnaty del 19 febbraio 2021, a pagina 55, afferma (imprudentemente, come vedremo in seguito) che non esistono *dati tossicologici sui soli LNP* o sui suoi nuovi eccipienti (ALC-0315 e ALC-0159), che in ogni caso non sono da considerarsi "sostanze adiuvanti" di per sé (Figura 5).

EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

Assessment report
Comirnaty
Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000
19 February 2021
EMA/707383/2020 Corr.1
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Toxicology Page 55/140

With regards to the vaccine components, only the whole formulation (modified RNA in LNPs) were used, so there is no toxicological data on the LNP alone or its specific novel excipients. The novel LNP components, these are not considered primarily as adjuvant substances.

No genotoxicity nor carcinogenicity studies have been provided. The components of the vaccine formulation are lipids and RNA that are not expected to have genotoxic potential.

Adjuvants: Substances that are intended to enhance relevant immune response and subsequent clinical efficacy of the vaccine (WHO 2005)

Figura 5. Rapporto di valutazione dell'EMA su Comirnaty, datato 19 febbraio 2021, pagina 55, in cui si afferma che le LNP da sole o i loro *novel* componenti specifici non sono da considerarsi primariamente come sostanze adiuvanti.

In netta contraddizione con quanto sopra, solo poche pagine prima, il documento dichiara che *non si può escludere* [in ingl. *it cannot be excluded*] che *la composizione delle LNP contribuisca all'immunogenicità complessiva* (Figura 6). In altre parole, per l'EMA, a pagina 55, sezione Tossicologia, della sua Valutazione, le LNP NON sono da considerarsi adiuvanti, ma a pagina 42, sezione Farmacologia, si presume che la loro *adiuvantività* non possa essere esclusa.

Pharmacology

Page 42/140

The potency of the RNA vaccine is further optimised by encapsulation of the RNA into lipid nano particles (LNPs), which protects the RNA from degradation by RNAses and enable transfection of host cells after intramuscular (i.m.) delivery. The functional and ionizable lipid, ALC-0315, is identified as the primary driver of delivery as it allows the LNPs to have a neutral charge in a physiological environment to facilitate internalization; the endosomal environment exhibits a positive charge and therefore triggers the translocation of RNA into the cytosol (Midoux & Pichon, 2015; Hassett et al, 2019; Patel et al, 2019); ALC-0159 is included in the formulation to provide a steric barrier to: 1) facilitate the control of particle size and homogeneity during manufacturing and product storage, and 2) regulate the association of plasma and proteins with the LNP surface. **The composition of the LNPs may also affect the distribution of injected BNT162b2. In addition, it cannot be excluded the LNP composition contributes to the overall immunogenicity.**

Adjuvants: Substances that are intended to enhance relevant immune response and subsequent clinical efficacy of the vaccine (WHO 2005)

Figura 6. Rapporto di valutazione di EMA su Comirnaty, datato 19 febbraio 2021, pagina 42, in cui si afferma che le LNP potrebbero teoricamente esprimere adiuvanticit  immunogenica.

LNP: Il Sillogismo Adiuvente

La sezione *Rischi identificati e potenziali* del Piano di Gestione del Rischio relativo al vaccino Comirnaty di Pfizer/BioNTech recita perentoriamente: "Il vaccino non contiene un adiuvente" (Figura 7)

BNT162b2 + BNT162b2 BA.1 + BNT162b2 BA.4-5 + BNT162b2 XBB.1.5
Risk Management Plan October 2023

**COMIRNATY, COMIRNATY ORIGINAL/OMICRON BA.1,
COMIRNATY ORIGINAL/OMICRON BA.4-5, COMIRNATY OMICRON
XBB.1.5
(COVID-19 mRNA VACCINE)
RISK MANAGEMENT PLAN**

Module SVII. Identified and Potential Risks

- **The vaccine construct and the formulation.** The COVID-19 mRNA vaccine consists of non-infectious, non-replicating RNA in a lipid-based formulation, which delivers the RNA to cells in the immunised person. Protein expression from the RNA is transient, and as is RNA itself. There is no systemic toxicity associated with the LNP or its metabolism (Study reports 38166 and 20GR142). Vacuolation of hepatocytes was observed in rat toxicity studies and believed to be associated with the uptake of the LNP and was without evidence of any effect on liver function. The liver vacuolation was reversed approximately 3-weeks after the last administration.
- **The degradation of the active substance / antigen and potential impact on safety related to this; (e.g., for mRNA-based vaccines).** Like endogenous mRNA in the cytosol, vaccine RNA in cytosol is degraded. The COVID-19 mRNA contains no known toxic products of the degradation of the RNA or the lipids in the formulation.
- **The vaccine does not contain an adjuvant.** Page 112

Figura 7. Piano di Gestione del Rischio - Comirnaty di Pfizer/BioNTech, versione 11.0, pagina 112, ottobre 2023: "Il vaccino non contiene un adiuvente".

E' evidente che tale affermazione rappresenta la motivazione e la giustificazione di fondo per non aver attuato test di genotossicità e cancerogenicità, in accordo con la policy indicata dalle Linee Guida dell'OMS del 2005 . In altre parole, affermando, in un documento ufficiale, avallato dalla massima autorità regolatoria europea sui medicinali, che il vaccino Comirnaty di Pfizer/BioNTech non contiene *alcun* adiuvante, il sillogismo tossicologico di base appare evidente e incontestabile in tutte le sue parti:

(1) dato che le Linee Guida dell'OMS del 2005 richiedono studi di genotossicità e cancerogenicità *solo* se il vaccino contiene *nuovi* adiuvanti tra i suoi componenti, e (2) dato che il vaccino a mRNA Comirnaty *non contiene* adiuvanti, ne consegue che (3) tali studi non devono essere considerati necessari per il vaccino a mRNA Comirnaty.

L'intera struttura sillogistica, tuttavia, crolla una volta che l'inaffidabilità e l'infondatezza scientifiche della premessa (2) di cui sopra vengono attentamente valutate e dimostrate in una indagine dedicata ad appurare che cosa sono gli adiuvanti e come funzionano.

Adiuvanti a base di Nanoparticelle - Meccanismi Immunologici

Un ampio numero di studi ha accertato il ruolo delle nanoparticelle (NP) come adiuvanti. In molti di questi studi, le nanoparticelle hanno indotto risposte immunitarie simili o superiori rispetto agli adiuvanti contenenti alluminio come Alum (idrossido di alluminio). Si suggerisce che le NP possano favorire l'assorbimento dell'antigene e/o stimolare le cellule presentanti l'antigene (APC), come le cellule dendritiche (DC). Grazie alle loro peculiari proprietà fisico-chimiche, come la dimensione delle particelle, le NP di piccole dimensioni possono viaggiare più facilmente attraverso i vasi linfatici e accumularsi nelle DC residenti dei linfonodi. Intrinsecamente, le NP utilizzate nelle formulazioni dei vaccini tendono ad essere di dimensioni paragonabili agli agenti patogeni riconosciuti dal sistema immunitario. Anche la carica superficiale svolge un ruolo significativo nell'induzione della risposta immunitaria. L'assorbimento di NP cationiche da parte dell'APC è maggiore a causa delle interazioni elettrostatiche con le membrane cellulari anioniche. Per aumentare la persistenza delle NP nel corpo, la superficie delle NP può essere modificata mediante l'inclusione di polimeri idrofili come il PEG. È stato riportato che il beneficio principale nella preparazione di particelle funzionalizzate con PEG è quello di migliorare la biodisponibilità sistemica a lungo termine delle NP (Zaman et al., 2013).

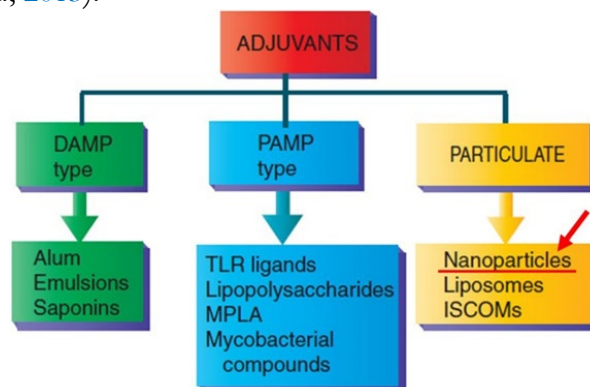


Figura 8. Classificazione dei diversi tipi di adiuvanti. DAMPs, pattern molecolari associati al danno; PAMPs, pattern molecolari associati ai patogeni; TLR, recettore Toll-like; MPLA, lipide monofosforico A;

Una classificazione dei diversi tipi di adiuvanti è riportata in Figura 8. Ciascuno dei tre tipi principali si basa sulla stimolazione dell'immunità innata e sulla conseguente attivazione della fase di processamento dell'antigene nell'immunità adattiva. La terza categoria comprende tutti i tipi di adiuvanti particellari derivati dalla Nanotecnologia, che utilizza particelle con un intervallo di dimensioni complessive da 1 a 1000 nanometri. Queste nanoparticelle, nanoemulsioni o nanofibre possono essere utilizzate come adiuvanti per promuovere le risposte ai vaccini. Imitano virus e batteri in termini di dimensioni e struttura. Possono anche incapsulare e quindi proteggere gli antigeni dalla degradazione prematura. Le particelle di diametro inferiore a 1 μm vengono ingerite per pinocitosi; le particelle inferiori a 120 nm vengono ingerite per endocitosi. Le nanoparticelle di dimensioni inferiori a 500 nm si spostano rapidamente verso i linfonodi drenanti, mentre le particelle più grandi vengono trattenute nel sito di iniezione e vengono fagocitate e trasportate ai linfonodi dalle cellule presentanti l'antigene (APC). Anche la chimica e la carica superficiale delle particelle influenzano le risposte. Le nanoparticelle hanno proprietà immunologiche uniche che possono essere manipolate alterandone le dimensioni, la forma, la carica e l'idrofobicità. Possono essere ingegnerizzate per presentare una miscela di antigeni e molecole co-stimolanti sulla loro superficie in modo da ottimizzare la risposta immunitaria (Tizard, 2020; e vedasi Figura 9).

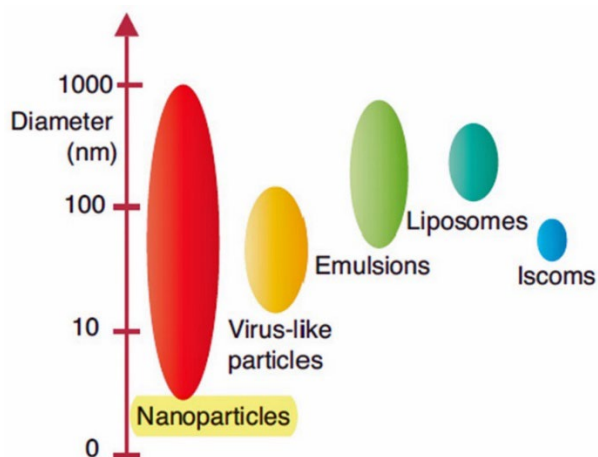


Figura 9. Gli adiuvanti a nanoparticelle sono disponibili in diverse dimensioni e questo influenza profondamente la natura della risposta immunitaria che inducono. Ristampato da *Vaccini per veterinari*, 75-86, Tizard, 2020, Capitolo 7 - *Adjuvanti e adjuvantività*, pagina 84. Copyright © 2021 Elsevier Inc.

Un articolo pubblicato su *Nature* il 22 ottobre 2020 da 42 autori, 26 dei quali di BioNTech (tra cui Katalin Karikó, premio Nobel per la medicina 2023) e 9 di Pfizer (Figura 10) afferma quanto segue: "La tecnologia dei vaccini a mRNA formulati con nanoparticelle lipidiche (LNP) consente la fornitura di informazioni genetiche precise, insieme a un effetto adiuvante, alle cellule presentanti l'antigene" (Sahin et al., 2020).

Nel loro studio *Innate immune mechanisms of mRNA vaccines [Meccanismi immunitari innati dei vaccini a mRNA]*, Rein Verbeke et al. considerano il contributo di entrambi i componenti

dell'mRNA e dell'LNP all'immunogenicità dei vaccini a mRNA. Il carrier costituito dalle LNP ionizzabili (iLNP) è ritenuto il principale motore dell' *adjuvantività* e della reattogenicità dei vaccini mRNA-LNP. Pertanto, la tecnologia iLNP non solo consente la somministrazione efficiente di mRNA nelle cellule immunitarie innate dopo la somministrazione del vaccino, ma sembra anche svolgere un secondo ruolo chiave nel fornire una *potente attività adjuvante* a questa piattaforma vaccinale. Ciò è dimostrato dal fatto che l'assorbimento di LNP vuote (cioè nanoparticelle lipidiche *non* contenenti alcun antigene o mRNA) da parte delle cellule immunitarie innate e di altri tipi cellulari è sufficiente per indurre un'inflammatione locale e sistemica, caratterizzata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-1b e IL-6 (Verbeke et al., 2022).

Le iLNP vuote sono state utilizzate con successo come adiuvanti per vaccini contenenti antigeni proteici del virus dell'epatite B o del virus della dengue. Sorprendentemente, la riduzione del contenuto lipidico cationico della nanoparticella riduce drasticamente la sua capacità di potenziare la risposta immunitaria specifica del virus della dengue (Swaminathan et al., 2016a, 2016b).

In un altro studio di Siri Tahtinen e altri 19 autori, tra cui Ugur Sahin di BioNTech, sulla risposta infiammatoria ai vaccini a mRNA, leggiamo che i vaccini a RNA inducono la produzione di citochine IL-1, prevalentemente IL-1 β , che dipende sia dall'RNA che dalla formulazione *lipidica*. I vaccini a RNA contro il COVID-19 (mRNA-1273 di Moderna e BNT162b2 di BioNTech/Pfizer), che utilizzano modRNA avente un'attività immunostimolante innata notevolmente ridotta, sono tuttavia ancora in grado di indurre eventi avversi sistemici nei pazienti subito dopo la somministrazione intramuscolare iniziale. Questi vaccini sono formulati in LNP che contengono lipidi ionizzabili per fornire stabilità strutturale e presumibilmente consentire la fuga endosomiale. Mentre è stato osservato che le LNP hanno un'*attività adjuvante intrinseca*, dimostrata dalle impressionanti risposte anticorpali e produzione di cellule T dopo la vaccinazione, l'esatto meccanismo con cui tali vaccini attivano l'immunità innata non è stato ancora caratterizzato (Tahtinen et al., 2022).

Article

COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T_H1 T cell responses

594 | Nature | Vol 586 | 22 October 2020

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>

Received: 16 July 2020

Accepted: 22 September 2020

Published online: 30 September 2020

Ugur Sahin^{1,2,3,4}, Alexander Muik¹, Evelyn Derhovanessian¹, Isabel Vogler¹, Lena M. Kranz¹, Mathias Vormehr¹, Alina Baum¹, Kristen Pascal¹, Jasmin Quandt¹, Daniel Maurus¹, Sebastian Brachtendorf¹, Verena Lörks¹, Julian Sikorski¹, Rolf Hilker¹, Dirk Becker¹, Ann-Kathrin Eller¹, Jan Grützner¹, Carsten Boesler¹, Corinna Rosenbaum¹, Marie-Cristine Kühnle¹, Ulrich Luxemburger¹, Alexandra Kemmer-Brück¹, David Langer¹, Martin Bexon⁴, Stefanie Bolte¹, Katalin Karikó¹, Tania Palancho¹, Boris Fischer¹, Armin Schultz⁵, Pei-Yong Shi⁶, Camilla Fontes-Garfias⁶, John L. Perez⁷, Kena A. Swanson⁷, Jakob Loschko⁷, Ingrid L. Scully⁷, Mark Cutler⁷, Warren Kalina⁷, Christos A. Kyratsous⁷, David Cooper⁷, Philip R. Dormitzer⁷, Kathrin U. Jansen⁷ & Özlem Türeci¹

¹BioNTech, Mainz, Germany; ²TRON gGmbH—Translational Oncology at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg, Mainz, Germany; ³Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY, USA; ⁴Bexon Clinical Consulting, Upper Montclair, NJ, USA; ⁵CRS Clinical Research Services Mannheim GmbH, Mannheim, Germany; ⁶University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA; ⁷Pfizer, Pearl River, NY, USA. ✉e-mail: ugur.sahin@biontech.de

Lipid nanoparticle (LNP)-formulated mRNA vaccine technology allows the delivery of precise genetic information together with an adjuvant effect to antigen-presenting cells⁴. The prophylactic effectiveness of this technology against multiple viral targets has been proven in preclinical models^{5–7}. LNP- and liposome-formulated RNA

Figura 10. Articolo pubblicato su Nature, pagina 594, il 22 ottobre 2020, da 42 autori, di cui 26 di BioNTech

(tra cui Katalin Karikó, Premio Nobel per la Medicina 2023) e 9 di Pfizer.

È stato dimostrato che le iLNP vuote o le iLNP contenenti un RNA non-codificante stimolano una robusta produzione dello stesso set di mediatori immunitari nella pelle di topi vaccinati per via intradermica, nonché un vigoroso infiltrato di cellule immunitarie nei tessuti iniettati; la rimozione della componente lipidica ionizzabile dalle LNP ha abolito l'infiammazione cutanea visibile, il che dimostra chiaramente che le LNP promuovono robuste risposte infiammatorie nel sito di iniezione e che tale attività adiuvante dipende principalmente dal lipide cationico ionizzabile, cioè, nel caso del prodotto di Pfizer/BioNTech, l'ALC-0315. Questo potrebbe spiegare la potente attività adiuvante delle LNP e la loro superiorità, rispetto ad altri adiuvanti, nel supportare l'induzione di risposte immunitarie adattative (Ndeupen, 2021).

Alameh e altri 33 autori, tra cui Katalin Karikó di BioNTech e il Prof. Drew Weissman, entrambi vincitori del premio Nobel per la medicina, nel loro studio, *Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses*, [Le nanoparticelle lipidiche aumentano l'efficacia dei vaccini a mRNA e a subunità proteica inducendo robuste risposte dei linfociti T helper follicolari e dell'immunità umorale], descrivono come l'attività adiuvante delle LNP si basa sulla loro componente lipidica ionizzabile. Questo studio ha identificato le LNP come un *adiuvante versatile* che migliora l'efficacia delle piattaforme vaccinali tradizionali e di nuova generazione; le LNP possiedono *una forte attività adiuvante* e migliorano l'efficacia dei vaccini a subunità proteica; gli esperimenti hanno fornito la prova del concetto che la formulazione di LNP utilizzata in questo studio ha *proprietà adiuvanti intrinseche* ed è almeno parzialmente responsabile della potenza dei vaccini mRNA-LNP modificati con nucleosidi; il lipide ionizzabile (come, ad esempio, l'ALC-0315 di Comirnaty) è responsabile dell'attività adiuvante della formulazione di LNP e la sua presenza costituisce *un parametro critico per il conferimento di attività adiuvante* alle LNP (Alameh et al., 2021).

Conclusioni e Prospettive

Gli adiuvanti nelle iniezioni di COVID-19 sono probabili cause di disturbi cardiovascolari (Kanuri e Sirkay, 2024) e altre patologie.

Il presente studio mostra che il vaccino a mRNA BNT162b2 COVID-19 di Comirnaty è stato valutato, autorizzato, distribuito, accettato in tutto il mondo e iniettato in centinaia di milioni di riceventi sulla base della palese falsità che *non contiene nuovi adiuvanti* (Figure 5, 7). Questa falsità ha permesso ai produttori di evitare lunghi e dispendiosi test di sicurezza farmacologica, genotossicità e cancerogenicità (Figura 4). Ha anche portato direttamente alla falsa conclusione che i componenti del prodotto sono sicuri ed efficaci (Figure 3).

Tutta questa operazione auto-referenziale equivale in pratica a un sofisticato inganno. È stato perpetrato con l'ausilio di un linguaggio giuridico, un gergo tecnico-scientifico, dichiarazioni abilmente omissive che nascondevano informazioni presumibilmente rivolte a proteggere interessi commerciali. Tutto ciò si è basato sul ricorso all'autorità piuttosto che su fatti sperimentali accertati. Ci si chiede: avrebbe potuto avere uno scopo diverso da quello di convincere la gente comune a credere in un prodotto senza alcuna base scientifica realmente dimostrabile? Non c'è stato alcuno sforzo per impegnarsi nell'identificazione, nella valutazione e nell'elencazione delle priorità dei rischi

connessi alla distribuzione mondiale di questo prodotto sperimentale. Il fatto che contenesse nuovi adiuvanti pericolosi (LNP) è stato artatamente camuffato.

Tutto quanto sopra è avvenuto in violazione di norme che prescrivono studi farmacologici atti a dimostrare che il *nuovo adiuvante* in esame non ha effetti avversi sulle funzioni fisiologiche (ad esempio, sul sistema nervoso centrale, o sul sistema respiratorio, o cardiovascolare, sulle funzioni renali, sull'omeostasi della temperatura corporea, ecc.). Studi che avrebbero dovuto essere condotti *prima* di iniziare gli studi clinici sull'uomo (WHO, 2013).

Paradossalmente, sussistono quindi interpretazioni diverse, e tra di loro incompatibili, di ciò che sono intrinsecamente le LNP e più specificamente del fatto che contengano o meno – o in effetti siano esse stesse – adiuvanti potenzialmente pericolosi e non testati:

(1) Secondo i veri esperti del settore, le LNP sono note da tempo per la loro attività adiuvante significativa, intrinseca e robusta e, pertanto, avrebbero dovuto essere sottoposte ad appropriati studi tossicologici *prima* di avviare le prime sperimentazioni cliniche sull'uomo, come richiesto per i *nuovi adiuvanti*.

(2) Per i gestori del rischio e le autorità regolatorie coinvolte nella compilazione, nella valutazione e nell'approvazione dei piani di gestione dei rischi, le LNP contenute nel prodotto a mRNA di Pfizer/BioNTech *non* dovevano invece essere considerate *adiuvanti* e pertanto non sono stati ritenuti necessari i relativi studi tossicologici.

E purtroppo, l'inevitabile risultato prodotto da tutto ciò è sotto gli occhi di tutti: il peggior inganno medico della storia.

Finanziamenti e conflitti di interesse

L'autore dichiara di non aver ricevuto alcun finanziamento per influenzare quanto qui affermato e che la ricerca è stata condotta in assenza di qualsiasi relazione commerciale o finanziaria che possa essere interpretata come un potenziale conflitto di interessi.

Riferimenti

- Alameh, M. G., Tombácz, I., Bettini, E., Lederer, K., Ndeupen, S., Sittplangkoon, C., Wilmore, J.R., Gaudette, B.T., Soliman, O.Y., Pine, M., Hicks, P., Manzoni, T.B., Knox, J.J., Johnson, J.L., Laczkó, D., Muramatsu, H., Davis, B., Meng, W., Rosenfeld, A.M., Strohmeier, S., Lin, P., J.C., Mui, L.B., Tam, Y.K., Karikó, K., Jacquet, A., Krammer, F., Bates, P., Cancro, M.P., Weissman, D., Prak, E.T.L., Allman, D., Igyártó, B.Z., Locci, M., Pardi, N. (2021). *Immunity* 54(12), 2877–2892 ©2021 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.001>
- Banoun, H. (2022). Current state of knowledge on the excretion of mRNA and spike produced by anti-COVID-19 mRNA vaccines; possibility of contamination of the entourage of those vaccinated by these products. *Infectious Diseases Research*, 2022;3(4):22. <https://doi.org/10.53388/IDR20221125022>
- Barone, F., De Angelis, I., Andreoli, C., Battistelli, C.L., Arcangeli, C., & Leter, G. (2017). Metodi in vitro e in silico per la valutazione del potenziale tossicologico dei nanomateriali [In vitro and in silico methods for evaluating the toxicological potential of nanomaterials]. ENEA – Focus 3/2017 Energia, ambiente e innovazione. DOI [10.12910/EAI2017-045](https://doi.org/10.12910/EAI2017-045)
- Bourcier, T., McGovern, T., Stavitskaya, L., Kruhlik, N., and Jacobson-Kram, D. (2015). Improving prediction of carcinogenicity to reduce, refine, and replace the use of experimental animals. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 163–169. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25836962/>

- Chompoosor A., Saha K., Ghosh P.S., Macarthy DJ., Miranda O.R., Zhu Z.J., Arcaro K.F., & Rotello V.M. (2010). The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*, 6(20):2246-9. <https://doi.org/10.1002/sml.201000463>
- Cimino, M. C. (2006). Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 362–390. doi: 10.1002/em.20216
- Demple, B., Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.* 63:915-48. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004411>
- Dertinger, S. D., Totsuka, Y., Bielas, J. H., Doherty, A. T., Kleinjans, J., Honma, M., et al. (2019). High information content assays for genetic toxicology testing: A report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.003>
- Di Bucchianico, S., Fabbri, M.R., Cirillo, S., Uboldi, C., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., & Migliore, L. (2014). Aneuploidogenic effects and DNA oxidation induced in vitro by differently sized gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 9(1):2191-2204. <https://doi.org/10.2147/IJN.S58397>
- Dufour, E.K., Kumaravel, T., Nohynek, G.J., Kirkland, D., & Toutain, H. (2006). Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, 607(2):215-224. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.015>
- Hayashi, M., Honma, M., Takahashi, M., Horibe, A., Tanaka, J., Tsuchiya, M., et al. (2013). Identification and evaluation of potentially genotoxic agricultural and food-related chemicals. *Food Safety* 1, 2013003–2013003. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2013003>
- Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857):1302-9. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3287616>
- Jena, N.R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci.* 37(3):503-17. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9218-2>
- Levine, A.S., Sun, L., Tan, R., Gao, Y., Yang, L., Chen, H., Teng, Y., & Lan, L. (2017). The oxidative DNA damage response: A review of research undertaken with Tsinghua and Xiangya students at the University of Pittsburgh. *Sci. China Life Sci.* 60, 1077–1080 <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9184-6>
- Liou, G.Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 44(5):479-96. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Kang, S.J., Kim B.M., Lee Y.J., & Chung H.W. (2008). Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 49(5):399-405. <https://doi.org/10.1002/em.20399>
- Kanuri SH, Sirkay PJ. (2024). Adjuvants in COVID-19 vaccines: innocent bystanders or culpable abettors for stirring up COVID-heart syndrome. *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*, 2024;12. <https://doi.org/10.1177/25151355241228439>
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., and Müller, L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 584, 1–256. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004>
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., & Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res.* 504(1-2):137-48. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00087-8)
- MacGregor, J. T., Frötschl, R., White, P. A., Crump, K. S., Eastmond, D.A., Fukushima, S., et al. (2015). IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 783, 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.10.008>

- Maki, H., Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273–275. <https://doi.org/10.1038/355273a0>
- Martella, G., Motwani, N.H., Khan, Z., Sousa, P. F. M., Gorokhova, E., Motwani, H.V. (2023) *Chemical Research in Toxicology* 36(9), 1471-1482 <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00041>
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., & Kirsch-Volders M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 88(11):1515-31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>
- Nance, K. D., & Meier, J. L. (2021). Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. *ACS Central Science*, 7(5), 748–756. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197>
- Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., and Igyàrtò , B.Z. (2021). The mRNA-LNP platform’s lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *Science* 24, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311(5761):622-7. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1114397>
- Packer, M., Gyawali, D., Yerabolu, R. et al. (2021). A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. *Nat Commun* 12, 6777. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26926-0>
- Petkov, P. I., Patlewicz, G., Schultz, T. W., Honma, M., Todorov, M., Kotov, S., et al. (2015). A feasibility study: can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.003>
- Poirier, M. C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat. Rev. Cancer* 4, 630–637. <https://doi.org/10.1038/nrc1410>
- Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C.G., Urrutia Ortega, I.M., Briedé, J.J., de Kok, T.M., van Loveren, H., & Chirino, Y.I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1):139-149. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew051>
- Rusyn, I., Asakura, S., Pachkowski, B., Bradford ,B.U., Denissenko, M.F., Peters. J.M., Holland, S.M., Reddy, J.K., Cunningham, M.L., & Swenberg, J.A. (2004). Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for in vivo detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators. *Cancer Res* 64(3):1050–1057. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3027>
- Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E. et al. (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 586, 594–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
- Santiago, D. (2022a). A partial answer to the question posed by David A. Hughes, PhD, in the article: “What is in the so-called COVID-19 ‘vaccines’? Part 1: evidence of a global crime against humanity.” *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 2(2), 587–594. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v2i2.56>
- Santiago, D. (2022b). Playing Russian Roulette with every COVID-19 injection: The deadly global game. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 2(2), 619–650. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v2i2.36>
- Santiago, D., & Oller, J. W. (2023). Abnormal clots and all-cause mortality during the pandemic experiment: Five doses of COVID-19 vaccine are evidently lethal to nearly all medicare participants. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(1), 847–890. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.73>
- Segalla, G. (2023a). Chemical-physical criticality and toxicological potential of lipid nanomaterials contained in a COVID- 19 mRNA vaccine. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(1), 787–817. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.68>
- Segalla, G. (2023b). Apparent Cytotoxicity and Intrinsic Cytotoxicity of Lipid Nanomaterials Contained in a COVID-19 mRNA Vaccine. (2023). *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(1), 957-972. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.84>

- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G., Wright, C.J., & Doak, S.H. (2009, August). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30 (23-24):3891-914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>
- Swaminathan, G., Thoryk, E.A., Cox, K.S., Meschino, S., Dubey, S.A., Vora, K.A., Celano, R., Gindy, M., Casimiro, D.R., and Bett, A.J. (2016a). A novel lipid nanoparticle adjuvant significantly enhances B cell and T cell responses to sub-unit vaccine antigens. *Vaccine* 34, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.132>
- Swaminathan, G., Thoryk, E.A., Cox, K.S., Smith, J.S., Wolf, J.J., Gindy, M.E., Casimiro, D.R., and Bett, A.J. (2016b). A tetravalent sub-unit dengue vaccine formulated with ionizable cationic lipid nanoparticle induces significant immune responses in rodents and non-human primates. *Sci. Rep.* 6, 34215. <https://doi.org/10.1038/srep34215>
- Tahtinen, S., Tong, A.J., Himmels, P. et al. (2022) IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. *Nat Immunol* 23, 532–542. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01160-y>
- Takeshita, T., and Kanaly, R.A. (2019). In vitro DNA/RNA Adductomics to Confirm DNA Damage Caused by Benzo[a]pyrene in the Hep G2 Cell Line. *Front. Chem.* 7:491. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00491>
- Tizard, I. R. (2020). Vaccines for Veterinarians. Chapter 7, Adjuvants and adjuvanticity, 75-86, ISBN 978-0-323-68299-2, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/C2018-0-01755-7>
- Tretyakova, N.Y., Groehler, A. 4th, & Ji, S. (2015). DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Acc. Chem. Res.* 48(6), 1631-1644. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00056>
- Thybaud, V., Lorge, E., Levy, D. D., van Benthem, J., Douglas, G. R., Marchetti, F., et al. (2017). Main issues addressed in the 2014–2015 revisions to the OECD genetic toxicology test guidelines. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 284–295. <https://doi.org/10.1002/em.22079>
- Verbeke, R., Hogan, M. J., Lore, K., Pardi, N. (2022). Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. Cell Press, Review. *Immunity* 55, 1993-2005. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.014>
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q. (2020). Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field – Nanoscale. *Res Lett* 15, 115 <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
- Zaman, M., Good, M.F., Toth, I. (2013). Nanovaccines and their mode of action. *Methods*, 60(3), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.014>

Esonero da responsabilità legali

Le informazioni sul sito web e nell' **IJVTPR** non sono intese come diagnosi, trattamento raccomandato, prevenzione o cura per qualsiasi condizione umana o procedura medica a cui si possa fare riferimento in qualsiasi modo. Gli utenti e i lettori che possono essere genitori, tutori, caregiver, medici o parenti di persone colpite da una qualsiasi delle condizioni morbose, procedure o protocolli a cui si può fare riferimento, devono utilizzare il proprio giudizio in merito ad applicazioni specifiche. Gli autori che contribuiscono, gli editori e le persone associate a qualsiasi titolo al sito web e/o alla rivista declinano ogni responsabilità nei confronti di qualsiasi persona o entità per qualsiasi danno, perdita finanziaria, lesione fisica o altra sanzione che possa derivare da qualsiasi uso o applicazione in qualsiasi contesto di informazioni, conclusioni, risultati di ricerca, opinioni, errori, o qualsiasi dichiarazione trovata sul sito web o nell' **IJVTPR**. Il materiale presentato è offerto gratuitamente a tutti gli utenti che potrebbero essere interessati ad esaminarlo, ma il modo in cui possono scegliere di applicare qualsiasi parte di esso, è di esclusiva responsabilità dello spettatore/utente. Se il materiale viene citato o ristampato, gli utenti sono pregati di citare la fonte/autore e di conformarsi ai requisiti non-commerciali, non-derivati del [Creative Commons License 4.0 NC D](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)