

Vaccinegate:

Sequenziamento del genoma completo di MRC-5 contenuto in Priorix Tetra



Sequenziamento del genoma completo di MRC-5 contenuto in Priorix Tetra

Introduzione

I sequenziatori di nuova generazione sono diventati strumenti d'elezione per analisi approfondite nel campo della biologia e della medicina, soprattutto quella di precisione. Questi strumenti consentono di approcciarsi in maniera nuova e più globale ad una serie di applicazioni come sequenziamento de novo, studi di metagenomica, di epigenomica, sequenziamento del trascrittoma e ri-sequenziamento di genomi.

Quest'ultima applicazione (ri-sequenziamento) è molto diffusa in campo umano sia a scopo di ricerca che diagnostico e consiste nel **sequenziamento con tecnologia NGS** (Next Generation Sequencing) **di un intero genoma individuale allo scopo di mappare mutazioni** di singolo nucleotide (SNP, pronuncia 'snip'), inserzioni e delezioni di sequenze più o meno lunghe avvenute in determinate posizioni del genoma e variazioni nel numero di copie di porzioni di genoma/geni (CNV, Copy Number Variants).

Questa procedura è utile per comprendere i meccanismi di sviluppo di alcune patologie in modo da individuare le direzioni per un futuro trattamento clinico, come ad esempio nel caso del cancro. Con questa metodica infatti il patrimonio genetico di un individuo malato di cancro può essere completamente decodificato nel tessuto normale e in quello tumorale, permettendo di capire cos'è cambiato nel genoma e, se possibile, di intervenire con protocolli mirati.

La procedura di ri-sequenziamento prevede che il DNA di un individuo venga spezzato meccanicamente in frammenti di piccole dimensioni (400-500 paia di basi) e che ai frammenti vengano legati dei tratti di DNA artificiale chiamati adattatori, che permettono di legare i frammenti di DNA umano ad una superficie di vetro sulla quale si esegue poi la lettura delle basi (A, C, G, T). La lettura delle basi del DNA avviene mediante reazioni chimiche di incorporazione di nucleotidi marcati con molecole fluorescenti. I milioni di sequenze (reads) che si ottengono dal sequenziamento avvenuto sulla superficie di vetro, vengono poi mappate sul genoma di riferimento umano con opportuni software e quindi vengono identificate tutte le varianti presenti nel genoma analizzato, rispetto al riferimento.

Questa stessa procedura è stata eseguita sul genoma umano presente in Priorix Tetra lot. n. A71CB256A, genoma appartenente alla linea cellulare MRC-5 (di origine fetale); il lavoro è stato svolto presso un'azienda localizzata negli USA, che routinariamente si occupa di analisi di genomi umani mediante ri-sequenziamento. *

** Il nome del laboratorio che ha eseguito questa analisi verrà inserito nel prossimo esposto che depositeremo presso la Procura della Repubblica di Roma nonché agli enti controllori italiani ed europei. Le realtà che stanno depositando i risultati delle analisi finanziate da Corvelva verranno immediatamente aggiornate anche di questi sconcertanti risultati. Non neghiamo di essere, come genitori in primis, angosciati dai risultati che riportiamo di seguito - se già non bastasse quanto scoperto sinora.*

Risultati

Il genoma umano di riferimento è risultato essere coperto da reads originate dal DNA vaccinale per il 99.76%, quindi per quasi tutta la sua interezza. **Il DNA umano fetale rappresentato in questo vaccino è quindi un genoma individuale completo** ovvero è presente nel vaccino DNA genomico di tutti i cromosomi di un individuo di sesso maschile (e infatti il feto da cui deriva la linea cellulare MRC-5 è maschile).

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi dei vari tipi di varianti rispetto al genoma di riferimento umano.

Varianti a singolo nucleotide (SNP) e corte inserzioni/delezioni (InDels)

Le varianti di singole basi del DNA (SNP, pronuncia 'snip') sono polimorfismi, cioè variazioni del materiale genetico, a carico di un unico nucleotide. Le 'InDels' sono invece piccole inserzioni e delezioni di meno di 50 pb di lunghezza e costituiscono un'altra classe di varianti genomiche nel genoma umano.

Sono stati identificati nel genoma umano vaccinale un totale di circa 3.6 milioni di SNP (di cui il 98.31% già riportati nel database pubblico dbSNP e 61.805 nuovi, ovvero originali di questo DNA) e circa 804 mila InDels (di cui l'89.42% già riportate in dbSNP e 85.106 nuove).

La quantità di SNP è in linea con quanto riportato in letteratura in un "genoma umano tipico" mentre le indels risultano in quantità superiore rispetto a quanto riportato dal "The 1000 Genomes Project Consortium" ¹ ovvero 800 mila rispetto a 600 mila.

¹ A global reference for human genetic variation - Nature, vol. 526, 10 Ott. 2015 - <https://www.nature.com/articles/nature15393>

CNV (Copy Number Variants) e SV (Structural Variants)

Le varianti in numero di copie (CNV) sono varianti genomiche dovute a variazioni nel numero di copie di frammenti relativamente grandi (più lunghi di 50 bp) tra genomi individuali. Esistono due tipi di CNV: tipo "gain" (guadagno di copie) e tipo "loss" (perdita di copie). Sono state rilevate nel genoma umano vaccinale 218 CNVs di cui 82 di tipo "gain" (che coprono una porzione di genoma complessivamente pari a circa 6.9 milioni di paia di basi) e 136 CNVs di tipo "loss" (che coprono una porzione di genoma di circa 70 milioni di basi).

Come descritto dal The 1000 Genomes Project Consortium in "A global reference for human genetic variation (Nature, vol. 526, 10 Ott. 2015)" un tipico genoma umano contiene da 2.100 a 2.500 varianti di grandi dimensioni tra le quali:

- 1.000 grandi delezioni
- 160 varianti in numero di copie (CNVs)
- 10 inversioni

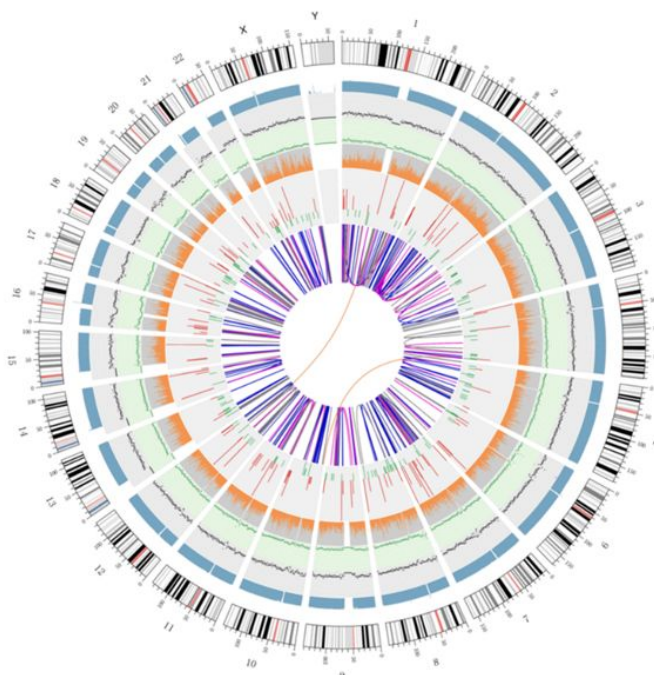
che influiscono complessivamente, considerando anche le inserzioni, su 20 milioni di basi di sequenza.

Così come constatato per le INDELs corte, anche nel caso delle inserzioni e delezioni di grandi dimensioni il genoma vaccinale risulta quindi essere **non in linea con un genoma umano 'normale'**, essendo molto più "riarrangiato" rispetto ad un genoma di un comune individuo.

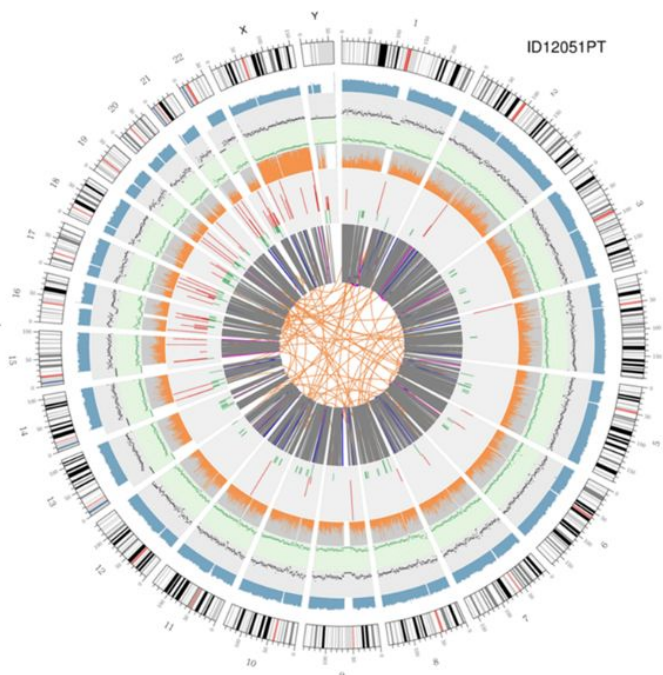
Visualizzazione circolare del genoma (circos plot)

Una rappresentazione grafica del genoma vaccinale chiamata "circos plot" (che si utilizza comunemente per rappresentare un genoma ri-sequenziato), è riportata di seguito, a fianco di un'altra che rappresenta un genoma ri-sequenziato a partire da DNA estratto da sangue di un individuo sano - genoma "normale":

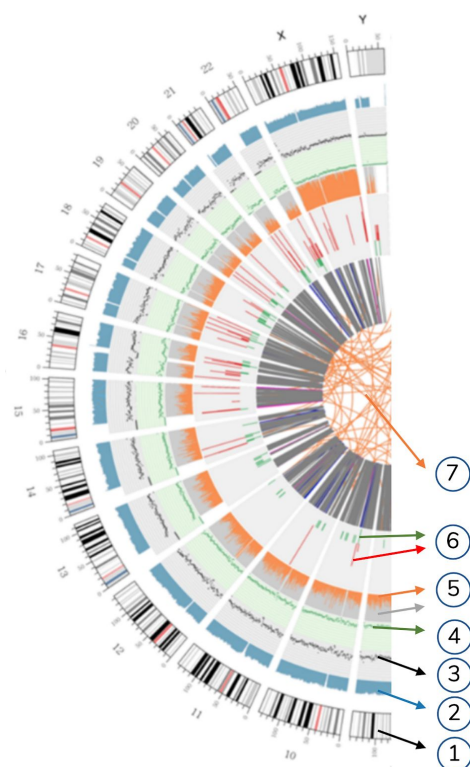
ESEMPIO DI GENOMA 'NORMALE'
(da sangue umano)



Priorix Tetra lot. A71CB256A, genoma umano MRC-5



Significato dei vari cerchi concentrici

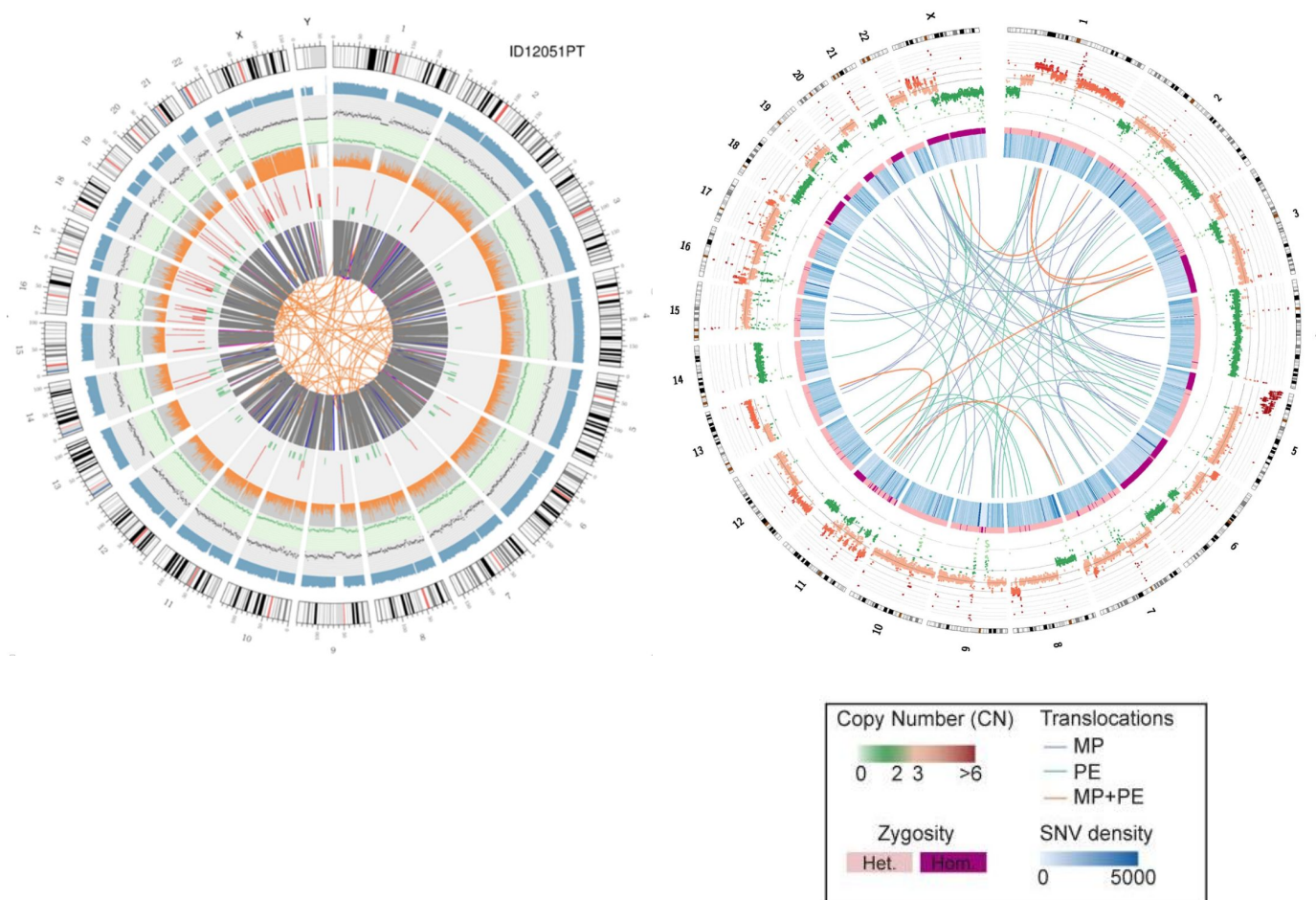


- 7) L'anello più centrale rappresenta l'inferenza di SV (Varianti Strutturali) nelle regioni esoniche e di splicing. TRA (**arancione**, traslocazioni), INS (**verde**, inserzioni), DEL (delezioni, **grigio**), DUP (duplicazioni, **rosa**) e INV (inversioni, **blu**).
- 6) Il sesto anello rappresenta l'inferenza di CNV (Varianti in numero di copie). Il **rosso** significa guadagno di pezzi di DNA e il **verde** significa perdita.
- 5) Il quinto anello rappresenta la proporzione di SNP in omozigosi (**arancione**) e in eterozigosi (**grigio**) in stile istogramma.
- 4) Il quarto anello (**verde**) rappresenta la densità snp in stile "grafico di dispersione".
- 3) Il terzo anello (**nero**) rappresenta la densità delle INDELs in stile "grafico di dispersione".
- 2) Il secondo anello (**azzurro**) rappresenta la copertura di reads in stile istogramma.
- 1) Il cerchio esterno (il primo cerchio) è il numero del cromosoma.



Una comparazione approssimativa può essere fatta anche tra il DNA fetale e il DNA delle cellule HeLa², la linea cellulare immortalizzata utilizzata anche nella produzione del vaccino contro la poliomielite.

Priorix Tetra lot. A71CB256A, genoma umano MRC-5



Da sottolineare che le traslocazioni delle cellule HeLa rappresentate nel circos plot dalle linee del nucleo, sono riferite all'intero genoma (quindi parte codificante e non codificante), mentre nel caso delle cellule fetali vaccinali sono riferite solo ai geni codificanti.

Non occorre essere degli scienziati per capire dai circos, semplicemente a colpo d'occhio, che il genoma vaccinale non è un genoma che si può definire "normale". Le linee arancio intrecciate al centro del circos, non presenti così numerose nell'anello corrispondente del genoma "normale", fanno già da sole intuire l'anomalia di questo genoma.

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737162/pdf/1213.pdf>
G3 (Bethesda). 2013 Aug 7;3(8):1213-24. doi: 10.1534/g3.113.005777.

The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line.

Landry JJ¹, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aivar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458465/pdf/nihms695162.pdf>
J Health Care Poor Underserved. 2012 Nov; 23(4 0): 5-10.

Development of the Polio Vaccine: A Historical Perspective of Tuskegee University's Role in Mass Production and Distribution of HeLa Cells
Timothy Turner



Analisi di varianti in geni del cancro

L'analisi di varianti SNP, InDels, CNV, SV, su 560 geni scelti perché coinvolti in diverse forme di cancro umano, ha evidenziato la presenza di numerose varianti "originali" ovvero nemmeno presenti in database pubblici, quindi non note in letteratura. In altre parole, sono state individuate modificazioni importanti di geni notoriamente associati a varie forme tumorali, per tutti i 560 geni verificati; inoltre vi sono varianti di cui non sono note le conseguenze, ma che riguardano comunque geni coinvolti nell'induzione del cancro umano.

Conclusioni

Il DNA genomico umano contenuto nel vaccino Prorix lot. n. A71CB256A è evidentemente anomalo, presentando importanti incongruenze rispetto a un genoma umano tipico, cioè a quello di un individuo sano. **Numerose sono le varianti sconosciute** (non annotate in database pubblici) e **diverse di esse sono localizzate in geni coinvolti nel cancro**. Quello che è anche evidentemente anomalo, è l'eccesso di genoma che mostra cambiamenti del numero di copie (CNV) e varianti strutturali (SV), quali traslocazioni, inserzioni, delezioni, duplicazioni e inversioni, molte delle quali coinvolgenti geni.

Il potenziale contributo delle moltissime varianti (non presenti nella letteratura scientifica e nei database pubblici) al fenotipo delle cellule utilizzate per la crescita dei virus vaccinali, non è conosciuto.

Discussione e implicazioni per la salute

Per completezza si riporta quanto già divulgato riguardo il primo approfondimento sul DNA umano contenuto in Priorix Tetra

L'evidenza diretta è che dentro questo prodotto ci sia un **genoma umano completo (cioè con geni e sequenze non codificanti)**, **ad alto peso molecolare (vedi PFGE) e/o frammentato**, ed è data dal risultato dell'allineamento delle reads di derivazione umana (il 70-80% del dataset nei tre lotti testati, di cui il primo lotto è stato sequenziato nel 2017, ma non sono stati presentati i dati in questo report) sul riferimento umano UCSC hg19, effettuato con un software standard (BWA) utilizzato dalla comunità scientifica per allineare sequenze NGS su genomi di riferimento (Bioinformatics, Volume 25, Issue 14, 15 July 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform).

Nella seguente tabella, evidenziato in arancione, è riportato il risultato espresso in "Av_cov = copertura media" dell'allineamento delle sequenze umane dei 3 lotti di Priorix tetra testati (1st-2nd e 3rd lot) sui cromosomi umani. Nella colonna 1, chM è il DNA mitocondriale, mentre Ch1 fino a ChY sono i cromosomi umani, inclusi i cromosomi sessuali X e Y. Nella colonna 2 è riportata la lunghezza dei cromosomi umani assemblati espressa in paia di basi.

		1st lot	2nd lot	3rd lot	BS (10M)	CE (10M)	G10A (10M)	PM (10M)	RM313 (10M)	
Chromosome	Seq_length	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	Avg_Cov	
chrM	16571	40,1184	23,58222	32,13506	20,9446	59,89711	39,25919	61,1423	87,49194	
chr1	249250621	0,81201	0,24186	0,41086	0,46169	0,45822	0,4554	0,4678	0,45614	
chr2	243199373	0,83347	0,22501	0,4223	0,49022	0,48612	0,48535	0,49661	0,48405	
chr3	198022430	0,80242	0,20776	0,40803	0,4844	0,48386	0,47962	0,49129	0,48178	
chr4	191154276	0,7654	0,17642	0,38695	0,5033	0,49459	0,49555	0,50295	0,49525	
chr5	180915260	0,79244	0,20331	0,40246	0,48103	0,47858	0,47473	0,4874	0,47499	
chr6	171115067	0,83064	0,20288	0,41623	0,49379	0,4895	0,48903	0,49976	0,49119	
chr7	159138663	0,83164	0,23375	0,42305	0,48337	0,4854	0,47833	0,49012	0,48432	
chr8	146364022	0,81973	0,21866	0,41321	0,49326	0,48588	0,4897	0,49762	0,48886	
chr9	141213431	0,70806	0,2057	0,35761	0,39299	0,39643	0,39269	0,40348	0,39228	
chr10	135534747	0,89197	0,26017	0,44729	0,51634	0,52864	0,52964	0,54055	0,52381	
chr11	135006516	0,83492	0,24654	0,42453	0,47968	0,47948	0,47167	0,49087	0,47533	
chr12	133851895	0,84722	0,2398	0,42918	0,47405	0,47687	0,47172	0,48268	0,47762	
chr13	115169878	0,6818	0,16314	0,34137	0,41366	0,40891	0,40357	0,41406	0,4055	
chr14	107349540	0,73104	0,20494	0,36788	0,39801	0,40228	0,39989	0,4103	0,40084	
chr15	102531392	0,75714	0,22622	0,37697	0,37623	0,38238	0,37569	0,39433	0,37908	
chr16	90354753	0,83691	0,29683	0,43056	0,46182	0,47042	0,4559	0,46135	0,47302	
chr17	81195210	0,99561	0,36168	0,50436	0,45489	0,4692	0,46487	0,47822	0,47487	
chr18	78077248	0,82858	0,21594	0,41601	0,49041	0,49321	0,48505	0,5018	0,48076	
chr19	59128983	0,96649	0,40967	0,50464	0,44628	0,47007	0,4585	0,47399	0,48635	
chr20	63025520	0,92351	0,31226	0,47041	0,45225	0,46378	0,45925	0,47233	0,46192	
chr21	48129895	0,6867	0,19264	0,3426	0,38309	0,387	0,38069	0,39009	0,38467	
chr22	51304566	0,71927	0,29316	0,37037	0,30212	0,32245	0,30939	0,32671	0,32092	
chrX	155270560	0,36431	0,08803	0,18499	0,46744	0,46305	0,46235	0,23612	0,45686	
chrY	59373566	0,11235	0,03024	0,0606	0,02776	0,03256	0,03447	0,10811	0,02722	
		3,242635	2,911045	3,05264	16,83862	14,22144	13,41311	2,184072	16,78398237	X/Y ratio

La copertura è bassa (Avg_cov in media lungo ogni cromosoma < di 1x) ma l'omogeneità di distribuzione delle reads che si allineano in modo univoco, lungo tutti i cromosomi umani e la presenza anche di reads che si allineano a più alta copertura sul genoma mitocondriale, permette di riconoscere indiscutibilmente una situazione simile ad un low-pass genome sequencing di un genoma umano individuale. Per una più facile comprensione di quanto affermato, nella parte indicata in verde sono riportati dei low pass whole genome sequencing (5 campioni, 4 femmine e 1 maschio) umani a circa 10 milioni di reads, cioè una profondità analoga a quella prodotta per i 3 lotti vaccinali di Priorix Tetra.

Dal rapporto tra la copertura media per il cromosoma X e Y (indicati in rosso nell'ultima riga della tabella) emerge anche l'indicazione del sesso dell'individuo (maschile).

Il DNA umano contenuto nei lotti di Priorix ad ora sequenziati, è stato anche qualificato come appartenente alla linea fetale MRC-5 cioè la linea cellulare continua derivata da tessuto polmonare di feto abortivo maschile degli anni '60, in cui vengono fatti crescere il virus della varicella e della rosolia. L'analisi delle varianti del DNA mitocondriale presente nel vaccino rispetto al DNA mitocondriale della linea MRC-5 (il DNA della linea cellulare è stato acquistato presso ATCC) ha evidenziato che si tratta dello stesso 'individuo', poiché non è presente alcuna variante genetica.

Si riporta di seguito un **estratto della risposta data dall'EMA** al nostro quesito riguardo la sicurezza dei residui di MRC-5 nel vaccino Priorix tetra (EMA request reference ASK-43967 3 August 2018)

In base al capitolo 5.2.3 deve essere stabilito un limite accettabile per il DNA residuo della cellula ospite (che è specifico del prodotto e dipende da diversi fattori tra cui la natura del substrato cellulare/le caratteristiche del processo di produzione/il tipo di prodotto, ecc.) solo quando il processo di produzione utilizza determinate linee cellulari con la capacità di moltiplicarsi indefinitamente in vitro (cioè linee cellulari continue). Come indicato nello stesso capitolo, "Per i vaccini prodotti in linee cellulari continue, sia tumorigeniche sia non tumorigeniche, occorre eseguire la valutazione del rischio e la mitigazione del rischio per valutare l'idoneità del substrato cellulare, per definire i criteri accettabili per il DNA residuo di cellule ospite nel prodotto finale e per valutare la consistenza delle proteine delle cellule ospite."

Sulla base delle informazioni pubblicate, Priorix-Tetra contiene ceppi virali prodotti separatamente in cellule di embrioni di pollo (parotite e morbillo) o in cellule diploidi umane MRC-5 (rosolia e varicella). Le linee cellulari utilizzate per Priorix Tetra includono linee di cellule diploidi umane che non possono dividersi continuamente. Si noti che, secondo la Farmacopea Europea, le linee di cellule diploidi MRC-5 non sono tumorigeniche, come dimostrato da decenni di uso e controllo, e pertanto non si applica un limite massimo per il DNA di cellule MRC-5. Le consigliamo di consultare anche il documento dell'OMS "Raccomandazioni per la valutazione delle colture di cellule animali come substrati per la produzione di farmaci biologici e per la caratterizzazione di banche cellulari (2013)" che fornisce ampi chiarimenti sui rischi associati ai vari tipi di cellule utilizzate nella produzione di vaccini e conferma ancora una volta che "Le linee di cellule diploidi sono state usate con successo per molti anni per la produzione di vaccini virali e il DNA cellulare residuo derivante da queste cellule non è stato (e non è) considerato di porre alcun rischio significativo." Per maggiori informazioni al riguardo, le consigliamo di consultare il seguente link:

http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf?ua=1

Di particolare interesse è quanto riportano le **linee guida internazionali**:

<https://www.fda.gov/media/78428/download>

Guidance for Industry

Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research [February 2010]

1. Testing for Genetic Stability

You should demonstrate the genetic stability of your cell substrate from the establishment of the MCB through and perhaps beyond the end of production. For an engineered cell line, the inserted gene of interest should remain intact and at the same copy number, and be expressed at comparable levels throughout production. Also, **a diploid cell strain should remain diploid throughout. If such characteristics are not stable, then you should demonstrate that the instability does not adversely impact manufacturing or product consistency.** For methods to assess a cell substrate's genetic stability, reference is made to the ICH Q5B and Q5D documents (Refs. 30 and 3, respectively).

C. OTHER TESTS

1. Testing for the Presence of Residual Cells

You should assure that your final vaccine product does not contain residual cells. Processes, such as filtration, should be implemented and validated to ensure that intact cells are not present in the final product. Validation that residual cell removal processes are robust is important for immortalized cells. Determining the extent to which intact cells (or other materials known to be smaller than intact cells) are cleared by these processes is an important part of this validation. 36 Contains Nonbinding Recommendations

2. Testing for Residual Cellular DNA

Residual DNA might be a risk to your final product because of oncogenic and/or infectivity potential. There are several potential mechanisms by which residual DNA could be oncogenic, including the integration and expression of encoded oncogenes or insertional mutagenesis following DNA integration. Residual DNA also might be capable of transmitting viral infections if retroviral proviruses, integrated copies of DNA viruses, or



extrachromosomal genomes are present. The risks of oncogenicity and infectivity of your cell-substrate DNA can be lessened by decreasing its biological activity. This can be accomplished by decreasing the amount of residual DNA and reducing the size of the DNA (e.g., by DNase treatment or other methods) to below the size of a functional gene (based on current evidence, approximately 200 base pairs). Chemical inactivation can decrease both the size and biological activity of DNA. If DNA removal, digestion, or inactivation is undertaken, you should validate your methods. You should measure the amount and size distribution of residual DNA in your final product. **For widely used human diploid cell strains, such as MRC-5 and WI-38 cells, measurement of residual DNA might be unnecessary because we do not consider residual DNA from these human diploid cells to be a safety issue.** We might require limitation of the amount of residual DNA, depending on the potential risks associated with that DNA, for human diploid or primary cell types for which there is less experience. You should limit residual DNA for continuous non-tumorigenic cells, such as low-passage Vero cells, to **less than 10 ng/dose for parenteral inoculation** as recommended by WHO (Ref. 31). Because orally administered DNA is taken up approximately 10,000-fold less efficiently than parenterally administered DNA, we recommend limiting DNA to less than 100 µg/dose for oral vaccines (Ref. 32). If you are using cells with tumorigenic phenotypes or other characteristics that give rise to special concerns, more stringent limitation of residual DNA quantities might be needed to assure product safety

Guida per l'industria

Caratterizzazione e qualificazione dei substrati cellulari e di altri materiali biologici utilizzati nella produzione di vaccini virali per indicazioni sulle malattie infettive

Dipartimento di salute e servizi umani Dipartimento di amministrazione alimentare e farmaceutica per la valutazione e la ricerca biologiche [febbraio 2010]

1. Test per la stabilità genetica

Dovresti dimostrare la stabilità genetica del tuo substrato cellulare dall'istituzione dell'MCB fino e forse oltre la fine della produzione. Per una linea cellulare ingegnerizzata, il gene di interesse inserito deve rimanere intatto e con lo stesso numero di copie ed essere espresso a livelli comparabili durante la produzione. Inoltre, **un ceppo di cellule diploidi dovrebbe rimanere diploide sempre. Se tali caratteristiche non sono stabili, è necessario dimostrare che l'instabilità non influisce negativamente sulla produzione o sulla conformità del prodotto.** Per i metodi per valutare la stabilità genetica di un substrato cellulare, si fa riferimento ai documenti ICH Q5B e Q5D (rispettivamente Rif. 30 e 3).

C. ALTRE PROVE

1. Test per la presenza di cellule residue

È necessario assicurarsi che il prodotto vaccinale finale non contenga cellule residue. I processi, come la filtrazione, dovrebbero essere implementati e validati per garantire che le cellule intatte non siano presenti nel prodotto finale. La convalida che i processi di rimozione delle cellule residue sono robusti è importante per le cellule immortalizzate. Determinare fino a che punto le cellule intatte (o altri materiali noti per essere più piccoli delle cellule intatte) vengono eliminate da questi processi è una parte importante di questa convalida. 36 Contiene raccomandazioni non vincolanti

2. Test per il DNA cellulare residuo

Il DNA residuo potrebbe essere un rischio per il tuo prodotto finale a causa del potenziale oncogenico e / o infettivo. Esistono diversi potenziali meccanismi con cui il DNA residuo potrebbe essere oncogenico, compresa l'integrazione e l'espressione di oncogeni codificati o mutagenesi inserzionale dopo l'integrazione del DNA. Il DNA residuo potrebbe anche essere in grado di trasmettere infezioni virali se sono presenti provirus retrovirali, copie integrate di virus a DNA o genomi extracromosomici. I rischi di oncogenicità e infettività del DNA del substrato cellulare possono essere ridotti diminuendo la sua attività biologica. Ciò può essere ottenuto diminuendo la quantità di DNA residuo e riducendo le dimensioni del DNA (ad es. mediante il trattamento con DNase o altri metodi) al di sotto delle dimensioni di un gene funzionale (sulla base delle prove attuali, circa 200 coppie di basi). L'inattivazione chimica può ridurre sia le dimensioni che l'attività biologica del DNA. Se viene intrapresa la rimozione, la digestione o l'inattivazione del DNA, è necessario convalidare i metodi. Dovresti misurare la quantità e la distribuzione delle dimensioni del DNA residuo nel tuo prodotto finale. **Per i ceppi di cellule diploidi umane ampiamente utilizzati, come le cellule MRC-5 e WI-38, la misurazione del DNA residuo potrebbe non essere necessaria perché non consideriamo il DNA residuo di queste cellule diploidi umane un problema di sicurezza.** Potremmo richiedere una limitazione della quantità di DNA residuo, a seconda dei potenziali rischi associati a quel DNA, per i tipi di cellule diploidi o primarie umane per le quali c'è meno esperienza. Dovresti limitare il DNA residuo per le cellule continue non tumorigeniche, come le cellule Vero a basso numero di passaggi, a **meno di 10 ng / dose per l'inoculazione parenterale** come raccomandato dall'OMS (Rif. 31). Poiché il DNA somministrato per via orale viene assorbito circa 10.000 volte in modo meno efficiente rispetto al DNA somministrato per via parenterale, si consiglia di limitare il DNA a meno di 100 µg / dose per i vaccini orali (Rif. 32). Se si utilizzano cellule con fenotipi tumorigenici o altre caratteristiche che destano particolari preoccupazioni, potrebbe essere necessaria una limitazione più rigorosa delle quantità residue di DNA per garantire la sicurezza del prodotto

https://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf?ua=1

Annex 3 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878

5.1.2 Diploid cell lines (DCLs)

The practicality of using human DCLs for the production of viral vaccines was demonstrated in the 1960s. Experience gained with oral poliomyelitis and other viral vaccines in successfully immunizing billions of children in many countries **has shown clearly that such substrates can be used in the production of safe and effective vaccines** (3). The essential features of DCLs of human (e.g. WI-38, MRC-5) and monkey (i.e. FRhL-2) origin are:



- they are cells passaged from primary cultures that have become established as cell lines with apparently stable characteristics over numerous PDLs (population doubling level);
- they have a finite capacity for serial propagation which ends in senescence, a state in which the culture ceases to replicate; the cells remain alive and metabolically active but may show morphological and biochemical changes, some of which begin to appear before replication ceases;
- they are non-tumorigenic;
- **they display diploid cytogenetic characteristics with a low frequency of chromosomal abnormalities of number and structure until they enter senescence.**

Substantial experience has been accumulated on the cytogenetics of WI-38 and MRC-5 since the 1960s, and ranges of expected frequencies of chromosomal abnormalities have been published (19, 20). Similar data are available for FRhL-2 (21). More sophisticated cytogenetic techniques (e.g. high-resolution banding, comparative genome hybridization) (22, 23) have demonstrated the presence of subtle chromosomal abnormalities that were previously undetectable. Recent studies have shown that subpopulations of human DCLs with such abnormalities may appear and disappear over time, that they are non-tumorigenic and that they undergo senescence in the same manner as the dominant population. Thus, possessing a stable karyotype might not be such an important characteristic as was previously thought.

19. Jacobs JP. Updated results on the karyology of the WI-38, MRC-5 and MRC-9 cell strains. *Developments in Biological Standardization*, **1976**, 37:155–156.

20. Jacobs JP et al. Guidelines for the acceptability, management and testing of serially propagated human diploid cells for the production of live virus vaccines for use in man. *Journal of Biological Standardization*, **1981**, 9:331–342.

21. Petricciani JC et al. Karyology standards for rhesus diploid cell line DBS-FRHL-2. *Journal of Biological Standardization*, **1976**, 4:43–49.

22. Schollmayer E et al. High resolution analysis and differential condensation in RBA-banded human chromosomes. *Human Genetics*, **1981**, 59:187–193.

23. Rønne M. Chromosome preparation and high resolution banding techniques: a review. *Journal of Dairy Science*, **1989**, 72:1363–1377.

Allegato 3 Raccomandazioni per la valutazione delle colture cellulari animali come substrati per la fabbricazione di medicinali biologici e per la caratterizzazione delle banche cellulari. Sostituzione dell'allegato 1 della serie di relazioni tecniche dell'OMS, n. 878

5.1.2 Linee cellulari diploidi (DCL)

La praticità dell'uso di DCL umane per la produzione di vaccini virali è stata dimostrata negli anni '60. L'esperienza acquisita con la poliomielite orale e altri vaccini virali nell'immunizzare con successo miliardi di bambini in molti paesi ha dimostrato chiaramente che tali substrati possono essere utilizzati nella produzione di vaccini sicuri ed efficaci (3). Le caratteristiche essenziali delle DCL di origine umana (ad es. WI-38, MRC-5) e scimmia (cioè FRhL-2) sono:

- si tratta di cellule propagate da colture primarie che si sono affermate come linee cellulari con caratteristiche apparentemente stabili su numerosi PDL (livello di raddoppio della popolazione);
- hanno una capacità finita di propagazione seriale che termina in senescenza, uno stato in cui la coltura cessa di replicarsi; le cellule rimangono vive e metabolicamente attive ma possono mostrare cambiamenti morfologici e biochimici, alcuni dei quali iniziano ad apparire prima che la replicazione cessi;
- non sono tumorigeniche;
- mostrano caratteristiche citogenetiche diploidi con una bassa frequenza di anomalie cromosomiche di numero e struttura fino a quando entrano in senescenza.

Un'esperienza notevole è stata accumulata sulla citogenetica di WI-38 e MRC-5 dagli anni '60, e sono state pubblicate gamme di frequenze attese di anomalie cromosomiche (19, 20). Dati simili sono disponibili per FRhL-2 (21). Tecniche citogenetiche più sofisticate (ad es. bande ad alta risoluzione, ibridazione comparativa del genoma) (22, 23) hanno dimostrato la presenza di sottili anomalie cromosomiche che in precedenza non erano rilevabili. Studi recenti hanno dimostrato che sottopopolazioni di DCL umane con tali anomalie possono apparire e scomparire nel tempo, che non sono tumorigeniche e che sono sottoposte a senescenza allo stesso modo della popolazione dominante. Pertanto, possedere un cariotipo stabile potrebbe non essere una caratteristica così importante come si pensava in precedenza.

Da quanto previsto dalle linee guida sopra riportate, la presenza di DNA fetale proveniente dalla linea cellulare MRC-5 e WI-38, in quanto diploidi, non prevede dei limiti superiori. La motivazione risiede nel fatto che tali linee non sono considerate tumorali perché con un ciclo replicativo finito.

Va fatto notare che **la letteratura di riferimento**, per sostenere che le cellule diploidi impiegate per la produzione di vaccini sono sicure dal punto di vista della stabilità genetica, è **obsoleta**. Già **40 anni fa erano state riscontrate le prime anomalie genetiche**, ritenute trascurabili per la sicurezza dei vaccini, e da quanto riportato nella linea guida WHO **da allora non sono più stati fatti aggiornamenti** con le nuove tecnologie di sequenziamento, in particolare in NGS, peraltro economica e rapida, con la conseguenza che nei vaccini somministrati **da decenni è stata permessa la presenza di DNA progressivamente sempre più modificato geneticamente e in quantità non controllata**.

La dr.ssa Theresa Deisher, esperta mondiale sull'uso di cellule fetali e staminali e sui rischi sulla salute connessi alla presenza di DNA fetale residuo nei vaccini ha risposto con una lettera ai governanti, pubblicata anche nel sito Corvelva.³

Si riporta un estratto della traduzione in italiano:

- Recentemente, duplicazioni e delezioni "de novo" sono state riconosciute fino al 10% nei disturbi semplici dello spettro autistico supportando i fattori scatenanti ambientali sulla genetica dei disturbi dello spettro autistico.
- La porzione di rosolia del vaccino MMR contiene contaminazioni di DNA fetale di origine umana di circa 175 ng, più di 10 volte oltre la soglia raccomandata dall'OMS di 10 ng per dose di vaccino.
- Nessun altro farmaco sul mercato potrebbe ottenere l'approvazione della FDA senza un'accurata analisi della tossicità (l' FDA segue le linee guida internazionali ICH) -> questo non è mai stato condotto dall'industria farmaceutica per la contaminazione di DNA nel vaccino MMR.
- I vaccini prodotti con linee cellulari fetali umane contengono detriti cellulari e contaminazioni di DNA umano residuale, che non può essere completamente eliminato durante il processo a valle di purificazione del virus. Inoltre, il DNA non è solo caratterizzato dalla sua sequenza (ATCG), ma anche dalla sua modificazione epigenetica (per esempio dal pattern di metilazione del DNA, ecc.). Questo accessorio è altamente specie-specifico, motivo per cui il DNA non umano verrà eliminato, mentre questo non è necessariamente il caso del DNA umano fetale.

Iniettare i nostri bambini con contaminazioni di DNA fetale umano comporta il rischio di causare due patologie consolidate:

1. **Mutagenesi inserzionale:** il DNA fetale umano si incorpora nel DNA del bambino causando mutazioni. La terapia genica che utilizza la ricombinazione omologa di piccoli frammenti ha dimostrato che quantità tanto piccole quanto 1,9 ng / ml di frammenti di DNA risultano nell'inserzione nel genoma di cellule staminali nel 100% dei topi iniettati. I livelli di frammenti di DNA fetale umano nei nostri bambini dopo la vaccinazione con vaccini MMR, Varivax (varicella) o epatite A raggiungono livelli superiori a 1,9 ng / ml.
2. **Malattia autoimmune:** il DNA umano fetale stimola la reazione del sistema immunitario ad attaccare il corpo del bambino/della bambina

I nostri risultati ottenuti in questa prima parte di sequenziamento del genoma completo di MRC-5 presente nel vaccino (la seconda parte è il sequenziamento dell'intero genoma della linea cellulare MRC-5 utilizzata per coltivare i virus vaccinale e l'analisi comparativa con il DNA fetale vaccinale) rafforzano notevolmente le osservazioni sperimentali della dr.ssa Deisher e soprattutto il fatto che il DNA fetale contaminante presente in tutti i campioni analizzati in quantità variabile (quindi non controllata) è fino a 300 volte superiore al limite imposto dall'EMA per il DNA cancerogeno (10 ng/dose, corrispondente al DNA contenuto in circa 1000 cellule tumorali, ricavato sulla base di un calcolo statistico, mentre il limite di precauzione è di 100 pg/dose) limite che va necessariamente applicato anche al DNA fetale che inevitabilmente contamina il Priorix tetra.

Ne segue che tale vaccino va considerato difettoso e potenzialmente pericoloso per la salute umana, in particolare della popolazione pediatrica molto più vulnerabile al danno genetico e autoimmune per l'immaturità nei sistemi di riparo.

³ <https://www.corvelva.it/it/approfondimenti/notizie/mondo/lettera-aperta-ai-legislatori-sul-dna-fetale-nei-vaccini-theresa-deisher.html>