

Dipl.-Ing. Helmut REINER  
Lebensmittel- und Biotechnologe  
Grünentorgasse 19/12  
1090 Wien

helmut.reiner@teleweb.at

29.06.2022

**Übersetzung und Kommentar zum Fachartikel von Franz X. Heinz und Karin Stiasny (2021): Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and mode of action.**

IN: Nature npj

<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

npj Vaccines (2021)6:104; <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>

## **Vorwort:**

In meiner Stellungnahme zum Impfpflicht-Gesetz (siehe Nachtrag Seite 62) habe ich angeführt, dass es auch vom naturwissenschaftlichen Standpunkt gute Gründe für eine kritische Haltung zur Impfung und auch für eine Ablehnung der Impfung und damit der Impfpflicht geben kann. Alle Überlegungen und Bedenken wurden von einer Wissenschaft mit absolutistischem Anspruch in den letzten Monaten bei Seite geschoben nach dem Motto: Augen zu und durch. Alle Argumente und Meinungen gegen eine Impfung oder Impfpflicht wurden als absurd dargestellt und wurden teilweise beinahe kriminalisiert.

Ich habe mich daher als Lebensmittel- und Biotechnologe mit der Übersichtsarbeit von Franz X. Heinz und Karin Stiasny (2021) von der Virologie der Universität Wien eingehender beschäftigt. Hier wurde sehr wohl auch Unbekanntes und Kritisches thematisiert. Ich muss daraus schließen, dass auch vom naturwissenschaftlichen Standpunkt nach wie vor eine kritische Haltung gerechtfertigt ist. Vor allem ist dieses Gebiet nicht allein die Domäne der Medizin, sondern reicht weit hinein in große Fragen der Qualitätssicherung in

Biotechnologie und Gentechnik, die bei der Herstellung der Impfstoffe zur Anwendung kommen. Hinzu kommt der Schutz der körperlichen Unversehrtheit des Menschen, wozu heute auch die genetische Unversehrtheit gerechnet werden muss.

Fast alle Punkte die auch von Gegnern der Impfung und speziell der Impfpflicht immer wieder angeführt werden, sind auch im vorliegenden Fachartikel angesprochen und ausführlich diskutiert.

Ich möchte daher den vorliegenden Artikel vom Englischen ins Deutsche übertragen und mit einzelnen Erklärungen und Kommentaren versehen, um ihn für den naturwissenschaftlich gebildeten Leser auch mittels Wiederholung einzelner Grundlagen verständlicher zu machen. Es wird auf zahlreiche Links zu YouTube Videos im jeweiligen Zusammenhang hingewiesen.

**Der Artikel von Franz X. Heinz und Karin Stiasny wurde am 1. Juni 2021 eingereicht und am 30. Juli 2021 vom Journal angenommen und ist am 16. August 2021 online erschienen. Er ist somit mit Datum vom Juni 2022 ein Jahr alt.**

<https://www.nature.com/npjvaccines/journal-information>

Das Journal npj vaccines ist Online-only und open access, *npj Vaccines*: “It is dedicated to highlighting the most important scientific advances in vaccine research and development.”

Die komplexe Biotechnologie, die den Impfstoffen zu Grunde liegt, ist ein gewagtes Unternehmen. Im vorliegenden Artikel von Franz X. Heinz und Karin Stiasny ist der Stand des Wissens vom **Juni 2021** dargestellt, zu einer **Zeit als eine Entscheidung über die Impfung** zu treffen war. Mit dem zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Wissen fällt diese Entscheidung nicht so eindeutig aus, wie uns dies von der Politik andauernd vermittelt wurde.

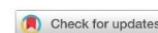
Nach Abschaffung der Impfpflicht im **Juni 2022** muss es offen gesagt werden: Viele Bedenken gegen die Impfung haben sich als begründet erwiesen und die Politik müsste sich eigentlich bei jenen Menschen entschuldigen, die über Monate drangsaliert und beschimpft wurden und denen sogar ungemütliche Weihnachten 2021 gewünscht wurde.

## Inhaltsverzeichnis

VORWORT: .....	1
ABSTRACT (ÜBERSETZT) .....	5
EINLEITUNG UND ÜBERSICHT ÜBER DIE IMPFSTOFFE .....	6
BIOSYNTHESE UND SCHLÜSSEL-EIGENSCHAFTEN DES SPIKE PROTEINS (SEITE 2) .....	9
EINSCHUB ZUM BEGRIFF: SUBGENOMISCHE MRNA .....	12
DAS SPIKE PROTEIN .....	14
ALLGEMEINE GRUNDLAGEN ZUM AUFBAU EINES PROTEINS .....	15
STRUKTUR-EIGENSCHAFTEN DES SPIKE-PROTEINS (SEITE 2) .....	17
ANTIGEN STRUKTUR DES SPIKE-PROTEINS (SEITE 3) .....	19
GENETISCHE IMPFSTOFFE – ALLGEMEIN (SEITE 4) .....	20
M-RNA IMPFSTOFFE (SEITE 4) .....	21
ADENOVIRUS-VEKTOR-IMPFSTOFFE (SEITE 5) .....	28
PROTEIN BASIERENDE IMPFSTOFFE (SEITE 7) .....	39
PROTEIN-UNTEREINHEIT IMPFSTOFFE (SEITE 8) .....	42
WIRKSAMKEIT DER IMPFSTOFFE GEGEN VIRUS-VARIANTEN .....	44
BESONDERE EIGENSCHAFTEN DER IMPFSTOFFE UNABHÄNGIG VON DER IMMUNOGEN- STRUKTUR (SEITE 8) .....	46
VERUNREINIGUNGEN DURCH RESTE DER ZELLKULTUREN .....	48
REAKTIONEN, DIE SICH NICHT AUF DAS IMMUNOGEN DIREKT BEZIEHEN (SEITE 9) .....	50
IMMUNITÄT GEGEN DEN VEKTOR (SEITE 9) .....	52

IMPfstoff-Spezifische Unterschiede der angeborenen Immunantwort (Seite 9) ..	54
Schlussfolgerungen (Seite 10) .....	58
Anmerkungen zu Omikron .....	60
Literatur .....	61
Nachtrag: Meine Stellungnahme .....	62

## REVIEW ARTICLE OPEN



# Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action

Franz X. Heinz<sup>1</sup> and Karin Stiasny<sup>1</sup>

COVID-19 vaccines were developed with an unprecedented pace since the beginning of the pandemic. Several of them have reached market authorization and mass production, leading to their global application on a large scale. This enormous progress was achieved with fundamentally different vaccine technologies used in parallel. mRNA, adenoviral vector as well as inactivated whole-virus vaccines are now in widespread use, and a subunit vaccine is in a final stage of authorization. They all rely on the native viral spike protein (S) of SARS-CoV-2 for inducing potentially neutralizing antibodies, but the presentation of this key antigen to the immune system differs substantially between the different categories of vaccines. In this article, we review the relevance of structural modifications of S in different vaccines and the different modes of antigen expression after vaccination with genetic adenovirus-vector and mRNA vaccines. Distinguishing characteristics and unknown features are highlighted in the context of protective antibody responses and reactogenicity of vaccines.

*npj Vaccines* (2021)6:104; <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>

## Abstract (übersetzt)

Die COVID-19 Impfstoffe wurden seit dem Beginn der Pandemie in einem beispiellosen Tempo entwickelt. Einige haben Marktzulassung und Massenproduktion erreicht, was zu ihrer weltweiten Anwendung im großen Stil geführt hat. Dieser enorme Fortschritt wurde mit parallel entwickelten grundlegend verschiedenen Impfstoff-Techniken erreicht. mRNA, AdenoVirus-Vektor und inaktivierte Ganz-Virus Impfstoffe sind heute in weiter Verwendung und ein Impfstoff, der auf einer Protein-Untereinheit basiert, ist in der Endphase der Entwicklung. Sie alle beruhen auf dem natürlichen Spike-Protein (S) von SARS-CoV-2 mit dem Ziel stark neutralisierende Antikörper hervorzurufen. In der Art wie dieses Antigen dem Immunsystem präsentiert wird, darin unterscheiden sich die verschiedenen Kategorien von Impfstoffen wesentlich. In diesem Artikel bieten wir einen Überblick über die Veränderungen der Struktur des Spike-Proteins S in verschiedenen Impfstoffen und die verschiedenen Möglichkeiten der Antigen-Expression nach der Impfung mit den genetischen AdenoVirus-Vektor- und mRNA-Impfstoffen. Unterscheidende Merkmale und unbekannte Aspekte im Zusammenhang mit einer schützenden Antikörper-Antwort und mögliche Reaktionen auf die Impfstoffe werden hervorgehoben.

# Einleitung und Übersicht über die Impfstoffe

## INTRODUCTION

The development of COVID-19 vaccines was extremely fast and successful, with several manufacturers having obtained market authorization for their products within the first year from the identification of the virus (SARS-CoV-2). These vaccines are now used worldwide for mass immunization programs, and data on vaccine efficacies justify the hope that vaccination can indeed be the main instrument for preventing serious disease and death, and more generally for combating the pandemic<sup>1-4</sup>. Despite incompletely resolved questions (e.g. duration of immunity, prevention of transmission, and protection against emerging virus variants) the availability of effective COVID-19 vaccines is an enormous relief and certainly a great success story already now.

All current vaccines that are authorized for general use and for which clinical efficacy data have been published rely on the viral spike protein (S) as an immunogen, either alone or—in the case of inactivated virus vaccines—together with other viral proteins present in the viral particle (see sections below). Because of its essential functions during viral entry (receptor binding and membrane fusion), the S protein is the major target of antibodies that can potentially neutralize the virus. Increasing evidence indicates that neutralizing antibodies are indeed a reliable correlate of protection<sup>5-9</sup>. The potency of these antibodies depends on high-affinity interactions with specific parts of the complex three-dimensional structure of the spike in a native conformation<sup>10,11</sup>. Efficient formation of such antibodies by B cells requires helper functions of CD4 T cells that are specifically stimulated by peptides derived from the same antigen in complex with MHCII molecules. Other components of cellular immunity, such as CD8 T cells, also contribute to immune responses after SARS-CoV-2 infection or vaccination, although their role in COVID-19 infections and protection from disease is still incompletely resolved<sup>12,13</sup>.

Current COVID-19 vaccines present the spike protein in very different ways to the immune system, and two main categories

have to be discerned. The first category consists of mRNA and adenoviral vector vaccines (herein referred to as genetic vaccines, sections: “Genetic vaccines—general”, “mRNA vaccines”, “Adenovirus-vector vaccines”), both of which do not contain the spike protein but provide genetic information for its biosynthesis in body cells of the vaccinee. With this kind of vaccines, the specific design of genetic sequences for the correct formation and presentation of properly folded spike proteins to B cells are in the foreground of interest. The second category encompasses protein-based approaches, i.e. classical inactivated whole-virus and innovative subunit vaccines, which contain S in different forms and combinations with adjuvants (Sections: “Protein-based vaccines—general”, “Inactivated vaccines”, “Subunit vaccines”). Irrespective of these categories, all vaccines have to cope with the intrinsic problem of conformational instability of the spike protein, whether it is synthesized in the vaccinee after genetic vaccination or in cell culture systems for production of conventional vaccines.

In this review, we discuss the biosynthesis and relevant structural features of the viral spike as a basis for understanding differences of its presentation in current COVID-19 vaccines. Our major focus is on variations of the constructs for S biosynthesis in genetic vaccines and on possible conformational differences of S in conventional vaccines. We also address the ‘grey matter’ of additional variables, such as ill-defined downstream production processes and purity of vaccines as well as differences in triggering sensors of innate immunity. All of these distinguishing features might provide clues to yet unresolved vaccine-specific determinants of immune responses, efficacy, and potentially adverse reactions. Our review is limited to those vaccines in current use for which phase 3 clinical efficacy data have been reported, and for which published information on the nature and manufacturing process exists. However, we would like to emphasize that there is an enormous pipeline of further developments (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>), including subunit

vaccines that contain only parts of the S protein, in some instances combined with components of other viral proteins. Therefore, the landscape of vaccines becoming available for general use may expand in the near future. Key features of the vaccines discussed in this review are summarized in Table 1.

## Einleitung

Die Entwicklung der COVID-19 Impfstoffe war extrem schnell und erfolgreich, mit mehreren Herstellern, die die Marktzulassung für ihr Produkt noch im Jahr der Identifizierung des Virus SARS-CoV-2 erreicht haben. Diese Impfstoffe werden heute weltweit verwendet für Immunisierungs-Programme, und die Daten über die Impfstoff-Wirksamkeit rechtfertigen die Hoffnung, dass die Impfung wirklich das wichtigste Instrument sein wird, schwere Krankheit und Tod zu verhindern und ganz allgemein die Pandemie zu bekämpfen. Trotz ungelöster Fragen (z.B. Dauer der Immunität, Verhinderung der Übertragung, und Schutz vor neu auftretenden Virus Varianten) ist die Verfügbarkeit von wirksamen COVID-19 Impfstoffen eine enorme Erleichterung und sicherlich schon jetzt eine große Erfolgsgeschichte.

Alle derzeit verwendeten Impfstoffe, die zugelassen sind für allgemeine Verwendung und für die klinische Daten zur Wirksamkeit veröffentlicht sind, beruhen auf dem Spike-Protein (S) als Immunogen, entweder auf dem Spike-

Protein allein oder – im Fall von inaktivierten Virus-Impfstoffen – auf dem Spike-Protein im Verbund mit anderen Proteinen des Virus-Partikels (siehe Abschnitt unten). Wegen seiner speziellen Funktionen beim Eindringen des Virus (Bindung an den Rezeptor und Fusion mit der Zellmembran) ist das Spike-Protein das Hauptziel für Antikörper, die das Virus wirksam neutralisieren können. Es gibt immer mehr Hinweise, dass neutralisierende Antikörper wirklich ein verlässliches Korrelat für den Schutz sind. Die Stärke dieser Antikörper beruht auf gut passenden Wechselwirkungen mit spezifischen Teilen der komplexen dreidimensionalen Struktur des Spike-Proteins in seiner natürlichen Konformation. Ausreichende Bildung solcher Antikörper durch B-Zellen braucht Helfer-Funktion durch CD4-T-Zellen, die spezifisch stimuliert werden durch Peptide, die vom selben Antigen im Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen kommen. Andere Komponenten der zellulären Immunität, wie z.B. CD8-T-Zellen, tragen ebenso zur Immun-Antwort nach SARS-CoV-2 Infektion oder Impfung bei, obwohl ihre Rolle bei COVID-19 Infektionen und beim Schutz vor der Krankheit noch unzureichend aufgeklärt ist.

Gegenwärtige COVID-19 Impfstoffe präsentieren dem Immunsystem das Spike-Protein auf ganz verschiedene Art und zwei wesentliche Kategorien müssen unterschieden werden. Die erste Kategorie das sind die mRNA und AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe (hier bezeichnet als genetische Impfstoffe, Abschnitte: „Genetische Impfstoffe – allgemein“, „mRNA Impfstoffe“, AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe), beide enthalten das Spike-Protein nicht, sondern stellen genetische Informationen für seine Biosynthese in den Zellen der geimpften Person zur Verfügung. Bei dieser Art von Impfstoffen steht der spezifische Bauplan der genetischen Sequenzen zur Bildung eines richtig gefalteten Spike-Proteins und wie es den B-Zellen präsentiert wird im Mittelpunkt des Interesses. Die zweite Kategorie umfasst Impfstoffe auf Protein-Basis, das sind klassische Ganz-Virus und innovative Untereinheit-Impfstoffe, die das Spike-Protein in verschiedenen Formen und in Kombination mit Adjuvantien enthalten (Abschnitte: „Protein basierende Impfstoffe – allgemein“, „Inaktivierte Impfstoffe“, „Untereinheit-Impfstoffe“). Unabhängig von diesen Kategorien müssen alle Impfstoffe mit dem Problem der Instabilität der Konformation des Spike-Proteins fertig werden, gleich ob das Spike-Protein gebildet wird in den Zellen der geimpften Person nach genetischer Impfung oder ob das Spike-Protein in Zellkultur-Systemen mit der klassischen Methode produziert wird.

In diesem Review diskutieren wir die Biosynthese und relevante strukturelle Eigenschaften des viralen Spike-Proteins als Basis für das Verständnis der Unterschiede der Art der Präsentation in den COVID-19 Impfstoffen. Unser besonderer Focus liegt bei Variationen des Konstruktes bei der Biosynthese des Spike-Proteins in genetischen Impfstoffen und möglichen Unterschieden der Konformation des Spike-Proteins in konventionellen Impfstoffen. Wir sprechen auch die „Grauzonen“ neu hinzukommender Variablen an, wie nicht erwartete nachgelagerte Vorgänge und das Problem der Reinheit von Impfstoffen sowie mögliche unterschiedliche Anregungen des angeborenen Immunsystems. Alle diese unterschiedlichen Eigenschaften könnten Schlüssel zur Lösung Impfstoff-spezifischer noch ungelöster Fragen der Immun-Antwort, der Wirksamkeit und möglicher Nebenwirkungen sein. Unser Review beschränkt sich auf jene derzeit verwendete Impfstoffe, für die Wirksamkeitsdaten aus der klinischen Phase 3 vorliegen, und für die veröffentlichte Informationen über die Natur des Impfstoffes und seine Herstellung existieren. Jedoch möchten wir hier auch betonen, dass eine große Zahl weiterer Entwicklungen noch in der Pipeline sind (<https://www.who.int/publications/m/itemdraftlandscape-of-covid-19-candidate-vaccines>), darunter auch Untereinheit-Impfstoffe, die nur Teile des Spike-Proteins enthalten, in einigen Fällen auch kombiniert mit Teilen anderer Proteine des Virus. Deshalb könnte die Zahl und Vielfalt der verfügbaren Impfstoffe zur allgemeinen Verwendung in naher Zukunft noch weiter anwachsen. Die wichtigsten Eigenschaften der Impfstoffe sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Type	Manufacturer	Name	Stabilizing mutations	Virus strain	Eukaryotic pro cell line
mRNA	BioNTech-Pfizer (Germany, USA)	BNT162b2, Comirnaty	Yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable
mRNA	Moderna-NIAID (USA)	mRNA-1273, COVID-19 Vaccine Moderna	yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable
mRNA	CureVac (Germany)	CVnCoV	yes (prolines)	Wuhan-Hu-1	not applicable
Adenovector	University of Oxford-AstraZeneca (UK, Sweden)	COVID-19 vaccine AstraZeneca, AZD1222, ChAdOx1-S, Vaxzeria; Covishield	no	Wuhan-Hu-1	HEK293
Adenovector	CanSino Biological Inc., Beijing Institute of Biotechnology (China)	Ad5 nCoV, Convidecia	no	Wuhan-Hu-1	HEK293
Adenovector	Gamaleya Research Institute (Russia)	rAd26-S + rAd5-S, Gam-COVID-Vac, Sputnik V	no	Wuhan-Hu-1 (probably)	HEK293
Adenovector	Janssen-Johnson & Johnson (NL/ USA)	Ad26.COV2.S, COVID-19 Vaccine Janssen	yes (prolines, furin cleavage site)	Wuhan-Hu-1	PER.C6
Inactivated whole virus	Sinopharm, Beijing Institute of Biological Products Co (China)	BBIBP-CoV, Sinopharm COVID-19 vaccine	not applicable	Wuhan-Hu-1-like HB02 strain	Vero
Inactivated whole virus	Sinovac (China)	CoronaVac	not applicable	Wuhan-Hu-1-like CN2 strain	Vero
Inactivated whole virus	Bharat Biotech (India)	Covaxin, BBV152	not applicable	NIV2020-770 (D614G)	Vero
Subunit	Novavax (USA)	NVX-CoV2373	yes (prolines, furin cleavage site)	Wuhan-Hu-1	Sf9

**Die Tabelle 1 (Seite 2 aus Heinz u. Stiasny) zeigt die in diesem Review besprochenen Impfstoffe (ein Ausschnitt)**



## Biosynthese und Schlüssel-Eigenschaften des Spike Proteins (Seite 2)

### BIOSYNTHESIS AND KEY PROPERTIES OF THE SPIKE PROTEIN

#### Biosynthesis of S

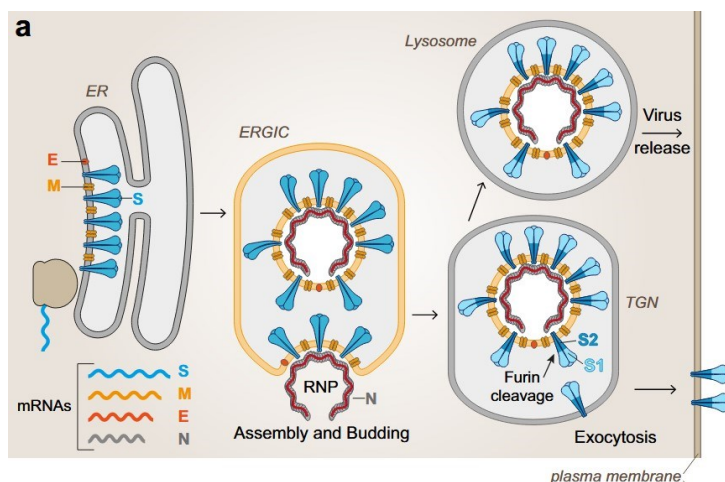
In the course of cellular SARS-CoV-2 infection (Fig. 1a), the S protein is synthesized from one of the viral subgenomic mRNAs and co-translationally transported into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by the use of a signal sequence at its N-terminus, comprising residues 1 to 13 of its total 1273 amino acids<sup>14</sup>. The signal sequence is cleaved off by signal peptidase attached to the inner ER membrane, generating the final N-terminus of the viral spike protein (14-QCVNL...). After completion of translation, the protein remains attached to the ER membrane through a C-terminal membrane anchor, trimerizes and moves to the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) where virus assembly occurs by budding into the ERGIC lumen (Fig. 1a)<sup>15</sup>. During exocytosis, virus particles encounter the protease furin in the trans-Golgi network (TGN), which cleaves the S protein into its membrane-associated S2 subunit and the distal S1 subunit at a characteristic polybasic cleavage site<sup>16</sup>. These subunits remain associated in the trimer through non-covalent interactions, and the virus is probably secreted via exocytic lysosomes with disrupted lysosomal functions<sup>17</sup>. Extensive modifications by N- and O-glycosylation occur in the compartments encountered by S during its intracellular transport<sup>18</sup>.

When S is synthesized as an isolated protein (Fig. 1b) (as in mRNA and adenovirus vector vaccines as well as for production of recombinant subunit vaccines), the pathway of biosynthesis is very similar. However, the absence of interactions with other viral components for particle assembly may modulate glycosylation patterns and stability of the S trimers. Furthermore, S1 may dissociate from recombinantly produced spikes after furin cleavage in the TGN (shedding) and allow S2 to convert into its post-fusion conformation in the absence of mutations that remove the cleavage site<sup>18</sup>. Manipulations of the authentic viral signal sequence may cause inhomogeneities of the N-terminus and impair native folding of S<sup>19</sup> (see also section "Adenovirus-vector vaccines" and Fig. 5).

Im Verlauf der SARS-CoV-2 Infektion von Zellen (Fig. 1a) wird von einer der subgenomischen RNAs des Virus das Spike-Protein synthetisiert und dann im Laufe der Translation in den Innenraum des **Endoplasmatischen Reticulums (ER)** transportiert. Dies geschieht mit Hilfe einer Signal-Sequenz am N-Ende, das die Aminosäuren 1 bis 13 von den insgesamt 1273 Aminosäuren des Spike Proteins umfasst. Die Signal-Sequenz wird durch eine Signal-Peptidase abgespalten, die an der inneren Membran des ER hängt und als Abschluss das

N-Ende des viralen Spike-Proteins bildet (mit den Aminosäuren beginnend bei Position 14: Q C V N L = Glutamin Cystein Valin Asparagin Leucin)

Nach Abschluss der Translation bleibt das synthetisierte Spike Protein noch durch einen C-terminalen Anker angeheftet an die Membran des **Endoplasmatischen Reticulums (ER)**, bildet dann in der Folge die trimere Struktur aus und wandert schließlich in den Bereich zwischen Endoplasmatischem-Reticulum und Golgi-Apparat ein. (**ER Golgi intermediate compartment ERGIC**), wo letztlich der Zusammenbau und die Abgabe der neu gebildeten Virus-Partikel erfolgt – (**Assembly and Budding in Fig 1a**). Die Virus-Partikel treffen beim Verlassen der Zellen (**Exocytose**) in einem Zwischenbereich (**TGN Trans Golgi Network**) auf die Protease **Furin**, die das Spike-Protein in einem ganz bestimmten Spaltungsbereich in eine membran-assoziierte **S2-Untereinheit** und in die **S1-Untereinheit** spaltet. Die beiden Untereinheiten bleiben in nichtkovalenten Bindungen untereinander verbunden in einem **Trimer** und das Virus wird wahrscheinlich ausgeschieden über exocytische **Lysosomen** mit gestörter Funktion. Beim Transport innerhalb der Zelle kommt es zu weitreichenden Glycosylierungen des Spike-Proteins durch Anhängen von Zuckerresten an N und O.



**Fig. 1a aus Heinz u. Stiasny: Biosynthese und intrazellulärer Transport des Spike-Proteins in infizierten Zellen (infected cells), Abkürzungen in der Abbildung**

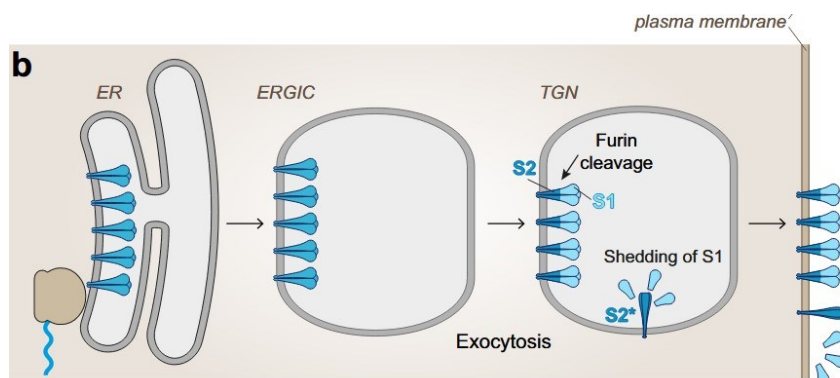
ER – Endoplasmatisches Reticulum, ERGIC = ER Golgi Intermediate Compartment  
 mRNA codiert für folgende Proteine: **S** Spike, **M** Membrane, **E** Envelope, **N** Nucleoprotein  
 RNP = RiboNucleoProtein  
 TGN = Trans Golgi Network

**Anmerkung:** Sehr gut passende Videos dazu zum besseren Verständnis:

Shomu's Biology: Endoplasmatic Reticulum and Function

<https://www.youtube.com/watch?v=QO4WwyVt3cU>

Wenn das Spike-Protein als isoliertes Protein synthetisiert wird ohne die anderen Bestandteile des Virus (Fig. 1 b), wie dies in mRNA und AdenoVirus-Vektor Impfstoffen wie auch bei der Herstellung von rekombinanten Untereinheit-Impfstoffen geschieht, dann ist der Biosyntheseweg sehr ähnlich. Durch das Nichtvorhandensein der Interaktionen aber mit den anderen Virusbausteinen, die für den Zusammenbau vorgesehen wären, könnten sich Änderungen bei der Glycosylierung und negative Folgen für die Stabilität des Spike-Proteins mit seinen 3 Untereinheiten (also des Trimers) ergeben. Weiters könnte die Spike-Protein Untereinheit 1 dissoziieren vom rekombinant hergestellten Spike-Protein nach der Abspaltung durch die **Protease Furin** im Trans Golgi Network (TGN). Dadurch würde die Umwandlung von Spike-Untereinheit 2 in die Post-Fusions-Konformation möglich, sofern keine Vorkehrungen zur Verhinderung der enzymatischen Spaltung vorgesehen sind. Die Änderungen der ursprünglichen Virus Signal-Sequenzen könnten Unregelmäßigkeiten des N-Endes verursachen und die natürliche Faltung des Spike-Proteins schädigen. (siehe auch Abschnitt AdenoVektor-Impfstoffe und Fig. 5)



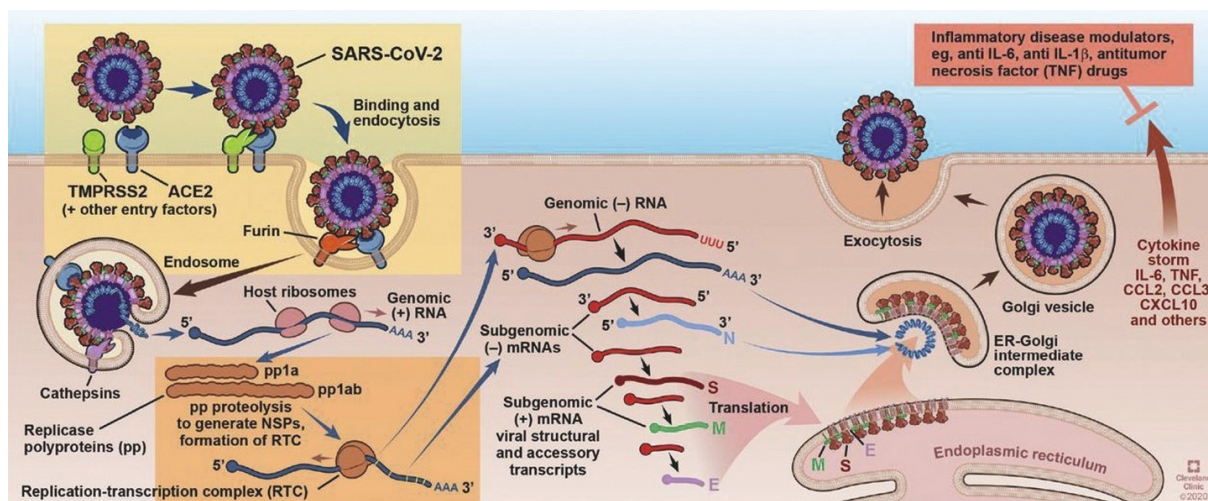
**Fig. 1b aus Heinz u. Stiasny: Biosynthese und intrazellulärer Transport des Spike-Proteins in Transfected Cells (Transfizierten Zellen)**

**Transfected Cells (Transfizierte Zellen):** Die Biosynthese des Spike-Proteins geschieht hier ohne Interaktionen mit anderen viralen Proteinen. Proteolytische Spaltung in S1 und S2 passiert im **Trans-Golgi-Network (TGN)** ähnlich wie in infizierten Zellen, aber einzelne S1-Untereinheiten könnten abgespalten werden und S2-Untereinheiten könnten in die S2\*-Post-Fusions-Struktur umgewandelt werden, sofern keine stabilisierenden Änderungen vorhanden sind.

**Anmerkung:** transfected cells (dt. transfizierte Zellen) werden Zellen genannt, die nicht wie „infected cells“ vom Virus selbst befallen sind und Viren abgeben, sondern die durch eine gentechnische Veränderung dazu gebracht werden ein Virus-Protein oder einen inaktiven Virus zu bilden.

## Einschub zum Begriff: Subgenomische mRNA

**Einschub zur Erklärung der Subgenomischen mRNA:** Die Proteine zum Zusammenbau des fertigen Virus werden durch Translation von mRNA durchgeführt. Jedoch nicht direkt vom Virus, der in die Zelle eingedrungen ist, sondern es wird zunächst zur Vervielfältigung ein Negativ-Strang der mRNA transkribiert (also aus der +mRNA wird eine -mRNA gebildet.) Von dieser werden dann für die Bildung der einzelnen Bausteine für N, S, M und E wiederum +mRNAs transkribiert, wovon dann durch Translation die entsprechenden Proteine synthetisiert werden können. Darunter eben auch das Spike-Protein. Dies ist in der folgenden Abbildung gut dargestellt (aus Burkhardt viruszyklus subgenomisch Arztpraxis 2020 ausschn):



**Abbildung:** Der Lebenszyklus von SARS-CoV-2:

Das Virion wird via Endozytose aufgenommen und schleust so seine RNA in die Wirtszelle ein. Die Ribosomen des Wirtes translatieren die beiden größten Polyproteine pp1a und pp1ab, die ihrerseits nach Proteolyse den **Replikations-Transkriptions-Komplex (RTC)** bilden. Dieser wiederum ist fähig, einerseits via Replikation **genomische RNA** und andererseits via Transkription **subgenomische mRNA** für die Translation in strukturelle (N, S, M und E) und nichtstrukturelle Proteine (NSP) zu bilden. Das Endresultat sind neue Virionen, deren Hülle aus der «gestohlenen» Doppellipidmembran des Wirtes besteht. Die Virionen verlassen anschließend als Golgi-Vesikel die Zelle via Exozytose, um andere Zellen und andere Individuen zu infizieren.

Aus: Den Viruszyklus besser verstehen: «SARS-CoV-2: Angewandte Virologie in der

Arztpraxis» DOI: <https://doi.org/10.4414/smf.2020.08668>

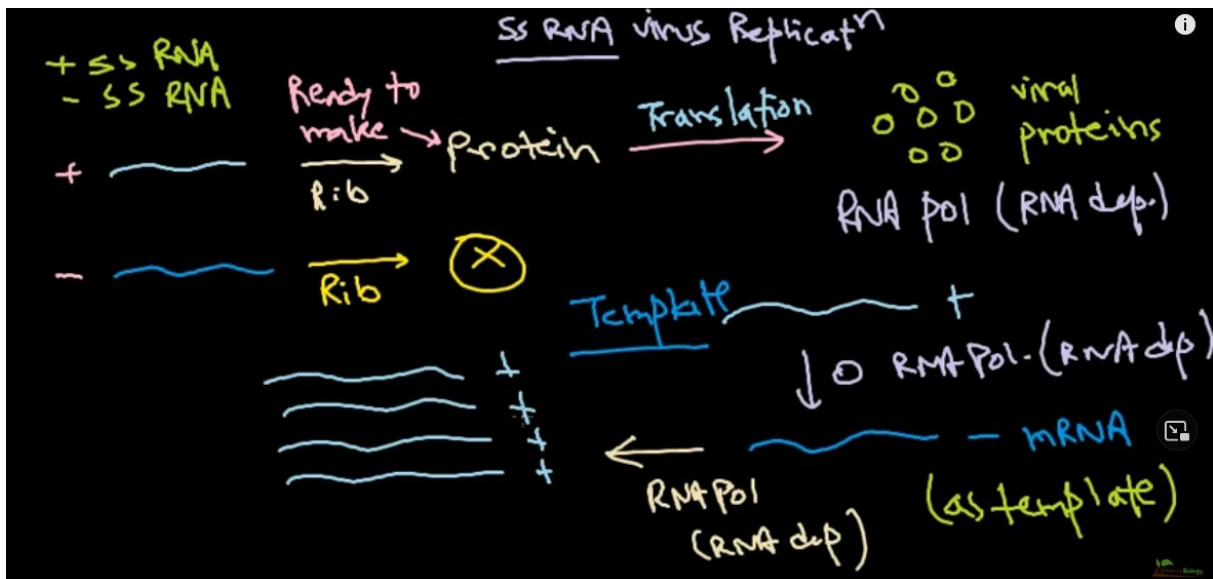
Swiss Med Forum. 2020;20(4950):731-736, Autoren Burkhardt Tobias, Müller Nicolas

Heruntergeladen vom Swiss Medical Forum am 5.5.2022

<https://medicalforum.ch/de/detail/doi/smf.2020.08668>

Siehe dazu auch Shomus Biology:

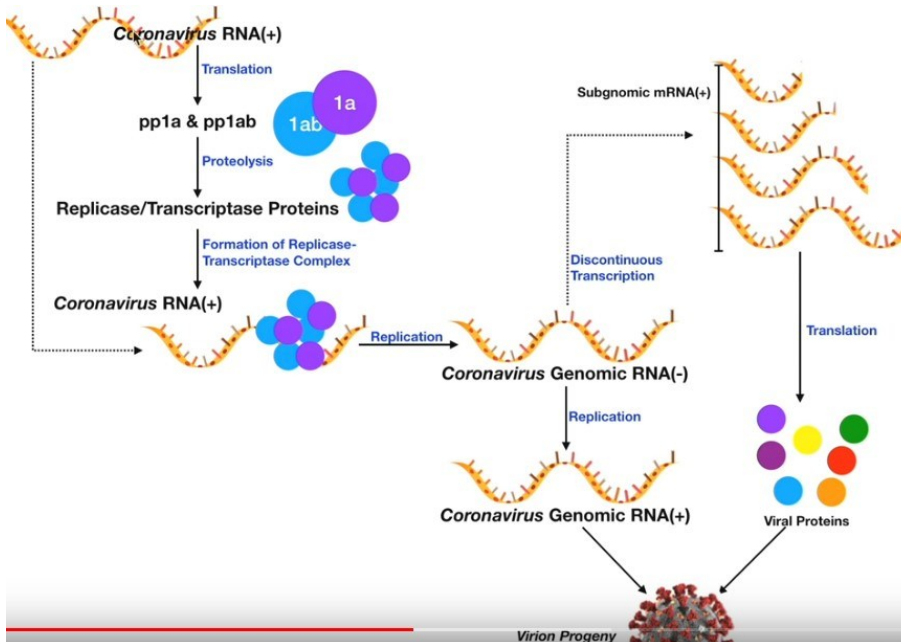
<https://www.youtube.com/watch?v=THw34p66xIk>



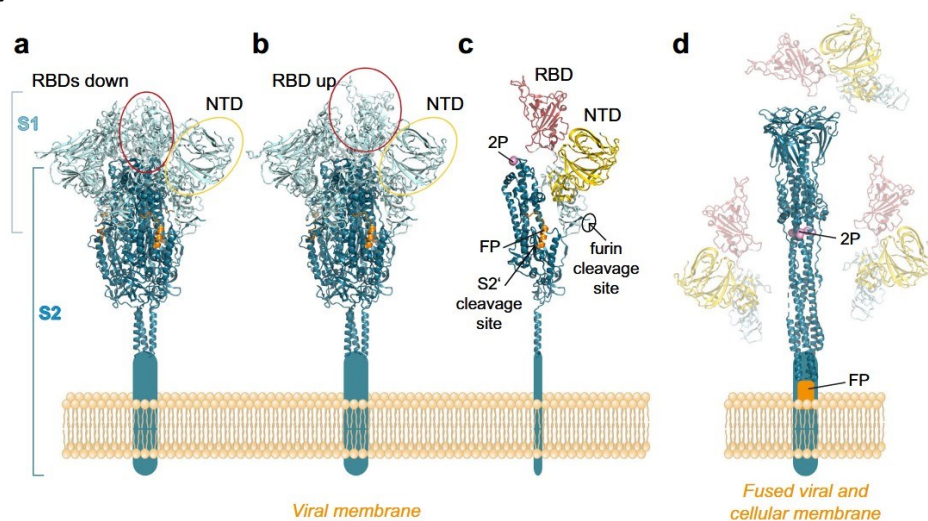
Siehe dazu auch ein Video von Catalyst University:

The Corona Virus Replication Cycle by Kevin Tokoph

<https://www.youtube.com/watch?v=zvuYJTL90J8>



## Das Spike Protein



**Fig. 2 Structures of the spike protein in pre- and post-fusion conformations.** **a** Trimeric pre-fusion spike with all RBDs in 'down' position. **b** Trimeric pre-fusion spike with one RBD in 'up' position. **c** Monomeric S protein of the pre-fusion spike with the RBD in red and NTD in gold, as well as the following structural details: The two stabilizing prolines (2P) are shown in pink, the FP in orange. The two protease cleavage sites are indicated by arrows. **d** Trimeric post-fusion structure of S2, with the three dissociated S1 subunits, shaded in light colors. RBD—receptor binding domain; NTD—N-terminal domain; FP—fusion peptide. The structures were generated with PyMol, using protein data bank (PDB) files 7KRR and 7KRS<sup>96</sup> for the pre-fusion forms, 6XRA for the post-fusion form<sup>25</sup>. The domains were colored according to reference.<sup>20</sup>.

### Die Abbildung Fig. 2 aus Heinz u. Stiasny zeigt

Struktur des Spike-Proteins in Prä- und Post-Fusions-Konformation

**a)** Das Trimere Prä-Fusions Spike-Protein mit allen Receptor Binding Domains (RBDs) in Position nach unten („down“) gerichtet.

**b)** Das Trimere Prä-Fusions Spike-Protein mit einer Receptor Binding Domain (RBD) in Position nach oben („up“) gerichtet.

**c)** Das Monomeres Spike-Protein der Prä-Fusions-Konformation mit der

- Receptor Binding Domain (RBD in rot) und  
- der -N-Terminal Domain (NTD in gold)

weitere Details der Struktur:

- die **zwei stabilisierenden Proline** (2 mal die Aminosäure Prolin = **2P** in rosa)

- das Fusions-Peptid (**FP** in orange) und

- die zwei Stellen, wo die beiden Proteasen **S2'** und **Furin** spalten (siehe Pfeile)

**d)** Die Trimere Post-Fusions-Struktur von S2 mit den drei dissoziierten S1-Untereinheiten in hellen Farben gezeichnet.

# Allgemeine Grundlagen zum Aufbau eines Proteins

An dieser Stelle **sollen in einem Einschub einige Grundlagen zum Aufbau von Proteinen** vergegenwärtigt werden, um den Austausch von Aminosäuren zu erklären, der notwendig ist zur **Stabilisierung nach Übergang von der Prä-Fusions-Konformation** in die **Post-Fusions-Konformation**. Die Primärstruktur ist definiert durch die Aminosäuresequenz, wobei jeweils drei Nucleotidbasen eine bestimmte Aminosäure codieren. Mutationen werden folgendermaßen gelesen: K986P bedeutet: bei Aminosäure Nr. 986 im Protein ist ein Lysin, dieses wird ersetzt (substituiert) durch ein Prolin.

Nucleotidbase					
Erste	Zweite				Dritte
	Uracil (U)	Cytosin (C)	Adenin (A)	Guanin (G)	
Uracil (U)	F Phenylalanin (Phe)	S Serin (Ser)	Y Tyrosin (Tyr)	C Cystein (Cys)	U
	F Phenylalanin (Phe)	S Serin (Ser)	Y Tyrosin (Tyr)	C Cystein (Cys)	C
	L Leucin (Leu)	S Serin (Ser)	Stop-Codon	Stop-Codon	A
	L Leucin (Leu)	S Serin (Ser)	Stop-Codon	W Tryptophan (Trp)	G
Cytosin (C)	L Leucin (Leu)	P Prolin (Pro)	H Histidin (His)	R Arginin (Arg)	U
	L Leucin (Leu)	P Prolin (Pro)	H Histidin (His)	R Arginin (Arg)	C
	L Leucin (Leu)	P Prolin (Pro)	Q Glutamin (Gln)	R Arginin (Arg)	A
	L Leucin (Leu)	P Prolin (Pro)	Q Glutamin (Gln)	R Arginin (Arg)	G
Adenin (A)	I Isoleucin (Ile)	T Threonin (Thr)	N Asparagin (Asn)	S Serin (Ser)	U
	I Isoleucin (Ile)	T Threonin (Thr)	N Asparagin (Asn)	S Serin (Ser)	C
	I Isoleucin (Ile)	T Threonin (Thr)	K Lysin (Lys)	R Arginin (Arg)	A
	Start (Methionin)	T Threonin (Thr)	K Lysin (Lys)	R Arginin (Arg)	G
Guanin (G)	V Valin (Val)	A Alanin (Ala)	D Asparaginsäure (Asp)	G Glycin (Gly)	U
	V Valin (Val)	A Alanin (Ala)	D Asparaginsäure (Asp)	G Glycin (Gly)	C
	V Valin (Val)	A Alanin (Ala)	E Glutaminsäure (Glu)	G Glycin (Gly)	A
	V Valin (Val)	A Alanin (Ala)	E Glutaminsäure (Glu)	G Glycin (Gly)	G

Abb. aus Passarge Eberhard: Taschenatlas der Genetik, Seite 49

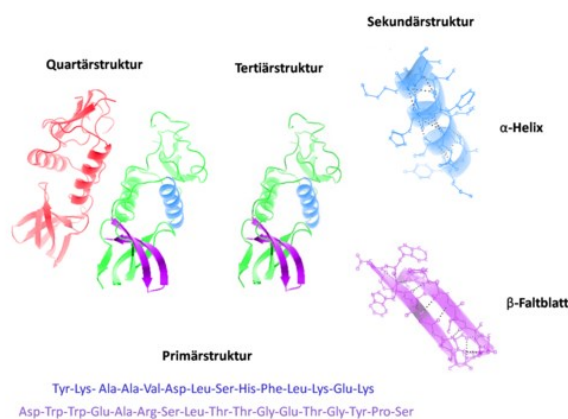
Start	AUG	F (Phe)	UUU	L (Leu)	CUU	R (Arg)	CGU	V (Val)	GUU		
Stop	UAA		UUC		CUC		CGC		GUC		
	UAG				CUG		CGG		GUG		
A (Ala)	GCU	G (Gly)	GGU		CUA		CAA		GUA		
			GGC		UUG		AGG				
	GCC		UUA		AGA		W (Trp)	UGG			
	GCG			M (Met)	AUG		S (Ser)	UCU			
C (Cys)	UGU	H (His)	CAU				UCC		Y (Tyr)	UAU	
			CAC		N (Asn)	AAU		UCG		UAC	
D (Asp)	GAU	I (Ile)	AUU		P (Pro)	CCU		UCA		B (Asx)	Asn oder Asp
			AUC			CCC		AGU			
E (Glu)	GAG	K (Lys)	AAG			CCG		AGC		Z (Glx)	Gln oder Glu
			AAA		Q (Gln)	CAG		ACA			
	GAA				CAA						

**B. Alphabetischer Code**

Abb. aus Passarge Eberhard: Taschenatlas der Genetik, Seite 49

Die **Konformation** ist die räumliche Struktur eines Proteins. Um die Frage der Konformation von Proteinen besser zu verstehen, muss man sich den stufenweisen Aufbau von Proteinen vergegenwärtigen. Mit der Primärstruktur (das ist die Aminosäuresequenz, die mit der DNA und über die mRNA determiniert ist) sind zwar schon weitgehend die höheren Strukturebenen und damit die räumliche Struktur vorgegeben, da alle Aminosäuren in der Kette charakteristische funktionelle Gruppen haben, die bindend oder auch abstoßend zu anderen Aminosäuren in ihrer Nähe sind. Mutationen in der Primärstruktur können sich aber sehr stark auf die höheren Strukturebenen auswirken, sodass ein Antigen dann nicht mehr als solches erkannt wird. Es werden aber auch immer mehr Mechanismen entdeckt die noch auf dem Weg der Proteinbiosynthese steuernd einwirken können, siehe Artikel in:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Proteinstruktur>



(Anmerkung hinzugefügt am 8.4.2022)

**Anmerkung: Furin** ist eine Endoprotease der Proprotein-Convertase-Familie (PC), die die proteolytische Reifung von Präkursor-Proteinen im eukaryotischen Proteinsekretionsweg katalysiert. Sie ist eine überall im Organismus von Wirbeltieren und vielen Wirbellosen exprimiertes Typ-I-Transmembranprotein. Zu den Substraten gehören Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, extrazelluläre Matrixproteine und auch andere Protease-Systeme, die bestimmte Krankheiten kontrollieren. Neben der Aktivierung von Krankheitserregern spielt sie außerdem eine essentielle Rolle in der Embryogenese und der Homöostase...

Am 26.2.2022 aus Wikipedia: <https://de.wikipedia.org/wiki/Furin>

**Anmerkung: Fusions-Peptid** Das folgende Video (2012) von Stephen Harrison zeigt das Prinzip und die Funktion von Fusions-Peptiden bei anderen Virus-Familien (Influenza, HIV und Ebola) zum Vergleich.

<https://www.youtube.com/watch?v=qcepGvFUM38>



## Struktur-Eigenschaften des Spike-Proteins (Seite 2)

### Structural properties of S

Each monomer of S is composed of several structural elements, including the N-terminal domain (NTD) and receptor-binding domain (RBD) in S1, which occlude the S2 moiety in the native S trimer (Fig. 2a–c)<sup>20,21</sup>. The RBD oscillates between an ‘up’ and ‘down’ position, and interaction with the cellular receptor (ACE2) is only possible with the transiently exposed RBD in the up position<sup>20,21</sup>. In its mature form, the S trimer is metastable and ready to undergo triggered conformational changes that allow S2 to drive fusion of the viral and cellular membranes upon virus entry<sup>22</sup>. The trigger comprises binding of RBD to ACE2 and a further proteolytic cleavage by cellular proteases (in addition to the furin cleavage between S1 and S2) at the so-called S2’ site, resulting in the removal of a small sequence element and the exposure of the fusion peptide at the N-terminus of S2 (Fig. 2c)<sup>22–24</sup>. As a consequence of these changes, the S1 subunits dissociate from the trimer, releasing S2 from its constraints in the pre-fusion conformation to allow an irreversible conversion into a characteristic elongated post-fusion structure (Fig. 2d)<sup>24–26</sup>. The energy gained by the formation of this hairpin-like structure, in which the fusion peptide is juxtaposed to the C-terminal membrane anchor, is the driving force for viral membrane fusion during entry<sup>22</sup>.

Jedes Monomer des Spike-Proteins (S) ist zusammengesetzt aus der **N-Terminalen Domäne (NTD)** und der **Receptor Binding Domäne (RBD)** in der Untereinheit S1, die die Untereinheit S2-Teil im nativen Spike-Protein verdeckt (Fig. 2a-c). Die RBD schwingt zwischen der Position **Oben** und **Unten** und Interaktion mit dem **Zell-Rezeptor ACE2** ist nur möglich mit der gerade in Oben-Position befindlichen RBD. In seiner reifen Form ist das Spike-Protein-Trimer nicht sehr stabil und leicht bereit für die Auslösung einer Änderung in der räumlichen Struktur, die der S2-Untereinheit die Fusion der Virus Membran mit der Zellmembran und damit den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Die Auslösung braucht nur die Bindung der RBD mit dem ACE2 und eine weitere proteolytische Spaltung durch **Zell-Proteasen** (zusätzlich zur **Furin-Spaltung** zwischen S1 und S2) bei der sogenannten S2’-Stelle, was die Entfernung einer kleinen Sequenz und die Offenlegung des **Fusions-Peptids (FP)** am N-Ende von S2 zur Folge hat. Als Folge dieser Änderungen lösen sich die S1-Untereinheiten vom Trimer, befreien so die S2 Untereinheit von den Einschränkungen der **Prä-Fusions-Konformation** und erlauben eine irreversible Strukturänderung hin zu der charakteristisch verlängerten **Post-Fusions-Konformation** (Fig. 2d). Die Energie die bei der Bildung dieser Haarnadel-ähnlichen Struktur frei wird, in dem das Fusions-Peptid der C-terminalen Anker-Membran gegenübergestellt wird, ist die treibenden Kraft der Membran Fusion beim Eintritt des Virus in die Zelle.

weiter Seite 3 in Heinz u. Stiasny

The potential of the S trimer to adopt different conformations may pose a problem for its use in vaccines, because the native structure—required to induce potently neutralizing antibodies—may be disrupted during manufacturing of conventional vaccines or when the protein is expressed in cells of the vaccinee after genetic vaccination. Some manufacturers have therefore introduced stabilizing mutations that are intended to prevent inadvertent structural conversion of the labile S protein. These modifications (indicated in Table 1 and in the discussion of individual vaccines below) include two proline mutations in S2 (K986P and V987P) at the junction between two alpha helices in the pre-fusion form to avert their fusogenic conformational switch into a long alpha helix in the post-fusion form, and mutations that abolish furin cleavage between S1 and S2 to maintain the pre-fusion trimer and to prevent shedding of S1<sup>18</sup> (Fig. 2c, d).

Das Potenzial des Spike-Protein-Trimers ganz verschiedene Konformationen anzunehmen, könnte ein Problem darstellen für die Verwendung als Impfstoff, weil die natürliche Struktur des Proteins – notwendig um die Bildung neutralisierender Antikörper anzuregen – gestört werden könnte bei der Herstellung konventioneller Impfstoffe oder bei genetischen Impfstoffen, bei denen das Protein in Zellen der geimpften Person exprimiert wird. Einige Hersteller haben deshalb gezielte stabilisierende gentechnische Veränderungen eingeführt, mit dem Zweck die Ausbildung ungewollter Strukturen des labilen Spike-Proteins zu verhindern. Diese Modifikationen (gezeigt in Tabelle 1 und in der Besprechung der einzelnen Impfstoffe im Folgenden) **sind zweimal die Aminosäure Prolin** in der Spike-Protein-Untereinheit S2 (**K986P und V987P**) genau an der Verbindungsstelle der beiden alpha-Helices in der Prä-Fusions Form, um ein Umschalten der Konformation in eine lange alpha-Helix in der Post-Fusions-Form zu vermeiden. **Weitere gentechnische Veränderungen** machen die Spaltung zwischen S1 und S2 durch die Protease Furin unmöglich, um so das Prä-Fusions-Trimer zu erhalten und eine Loslösung von S1 zu verhindern (Fig 2c, d)

## Antigen Struktur des Spike-Proteins (Seite 3)

### Antigenic structure of S

A number of monoclonal antibodies were isolated from COVID-19 patients and used for antigenic characterization of the S trimer, including 3D structure determinations of complexes between S (or parts thereof) and antibody Fab fragments. Collectively, these data showed that the most potently neutralizing antibodies were

specific for the RBD<sup>27-34</sup>, but several strongly neutralizing antibodies also recognized the NTD<sup>27,34-37</sup>, and some were dependent on the quaternary assembly of the trimer<sup>27,38</sup>. Neutralizing activity was also observed for antibodies against S2, but the potency was lower than of those against S1<sup>27</sup>. Importantly, the human neutralizing antibody response in SARS-CoV-2 infection appears to be dominated by RBD-specific antibodies, which—on average—were shown to contribute 90% of the total neutralizing activity of human post-infection sera<sup>39</sup>. It is therefore a major goal of all COVID-19 vaccines to present the spike and its RBD in a most native conformation for inducing a high proportion of potently neutralizing antibodies after vaccination.

Es wurden mehrere Monoklonale Antikörper von COVID-19 Patienten isoliert zur Charakterisierung der Antigeneigenschaften des Spike-Protein-Trimers. Auch Bestimmungen der dreidimensionalen Strukturen von Komplexen zwischen dem Spike-Protein (oder Teilen davon) und Antikörpern, die nur an Fragmente binden (Fab = Fragment Antigen Binding) wurden durchgeführt. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die stärksten neutralisierenden Antikörper spezifisch waren für die Receptor-Binding-Domäne (RBD), aber einige stark neutralisierende Antikörper erkannten auch die N-End Domäne. (Nitrogen-Terminal Domain NTD), einige waren auch abhängig vom quaternären Zusammenbau des Trimers. (quaternär: wie der ganze Proteinkomplex zusammengebaut ist!) Neutralisierende Aktivität wurde auch gegen Antikörper der Untereinheit S2 beobachtet, aber die Wirkung war niedriger als gegen die Untereinheit S1. Wichtig ist festzustellen, dass die neutralisierende Antikörper-Antwort des Menschen bei SARS-CoV-2 Infektion anscheinend **dominiert wird durch Antikörper gegen die Receptor-Binding-Domäne (RBD)**, die im Durchschnitt 90% der neutralisierenden Aktivität in Seren von Patienten bereitstellen, die die Infektion durchgemacht haben. Es ist deshalb ein vorrangiges Ziel aller Impfstoffe gegen COVID-19, das Spike-Protein und seine Receptor-Binding-Domäne (RBD) in seiner möglichst natürlichen Konformation dem Immunsystem zu präsentieren, um ein hohes Maß an stark neutralisierenden Antikörpern nach der Impfung zu erreichen.

## Genetische Impfstoffe – allgemein (Seite 4)

### Genetic vaccines—general

The unifying feature of current genetic COVID-19 vaccines is the provision of mRNAs for the whole, membrane-anchored spike protein (Figs. 1, 2) in tissues after intramuscular application. RNA vaccines contain fully functional mRNAs that can be translated directly into the S protein, whereas additional biosynthetic steps are required with adenovirus vector vaccines, including intranuclear transcription of the vector DNA into RNA and processing to generate functional mRNAs. It is believed (but not systematically studied and formally shown) that muscle cells, fibroblasts, endothelial cells, and/or immune cells such as dendritic cells contribute to the expression of S after intramuscular vaccination<sup>40–42</sup>. Production of potently neutralizing antibodies requires the interaction of B cells with the native protein, most likely by recognition of the spike anchored in the plasma membrane of S-expressing cells (Fig.1b). In contrast, CD8 and CD4 T cells are stimulated by complexes of peptides (derived from intracellular S after its proteolytic processing) with MHC I and MHCII, respectively<sup>43</sup>.

Die gemeinsame Eigenschaft der heutigen COVID-19 Impfstoffe ist die Einbringung von mRNAs für das ganze, membran-gebundene Spike-Protein (Figs. 1 und 2) in Gewebe nach intramuskulärer Anwendung. RNA Impfstoffe enthalten voll funktionsfähige mRNAs, die direkt übersetzt werden können in das Spike Protein, wogegen für die AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe zusätzliche biosynthetische Schritte notwendig sind, einschließlich der zunächst im Zellkern durchgeführten Transkription der Vektor-DNA in die RNA und weitere RNA-Prozessierung bis hin zur funktionsfähigen mRNA. Man vermutet (konnte es aber bisher nicht systematisch erforschen und beweisen), dass Muskel-Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen und/oder Immunzellen wie dendritische Zellen beteiligt sind an der Expression des Spike-Proteins nach intramuskulärer Impfung. Die Bildung stark neutralisierender Antikörper hat als Voraussetzung die Interaktion von B-Zellen mit dem nativen Protein, höchst wahrscheinlich durch erkennen des Spike-Proteins, das noch verankert ist in der Plasma-Membran der Spike-Protein exprimierenden Zellen (Fig. 1 b). Im Gegensatz dazu werden CD8- und CD4-T-Zellen durch Peptid-Komplexe mit MHC I und MHC II stimuliert (die von intrazellulären Spike-Proteinen direkt nach dem proteolytischen Processing stammen)

## m-RNA Impfstoffe (Seite 4)

### mRNA vaccines

The two mRNA vaccines in current widespread application (BioNTech-Pfizer and Moderna) (Table 1) are technologically very similar. They contain codon-optimized sequences for efficient expression of the full-length S protein and use the authentic signal sequence for its biosynthesis<sup>44-47</sup> (Fig. 1b). Both constructs include the two stabilizing mutations in S2 (K986P and V987P) that were shown to prevent the conformational change of the pre-fusion into the post-fusion structure of S (section "Introduction" and Fig. 2c)<sup>20,21</sup>.

The production process of vaccine mRNAs involves the cloning of the corresponding sequence into a plasmid DNA containing a DNA-dependent RNA-polymerase promoter. After amplification in bacterial cells, the plasmid DNA is linearized and impurities are removed before in vitro transcription into RNA. The addition of a 5' cap structure is a critical part of this production step that has been improved by new technology suitable for large-scale

Die beiden mRNA Impfstoffe in derzeit weit verbreiteter Verwendung (BioNTech-Pfizer und Moderna) (Tabelle 1) sind technisch sehr ähnlich aufgebaut. Sie enthalten Sequenzen, die optimiert sind für eine effiziente Exprimierung des Spike-Proteins in voller Länge und verwenden die authentische Signal-Sequenz für die Biosynthese (Fig. 1 b). Beide Konstrukte beinhalten **zwei stabilisierende Mutationen** im Spike-Protein (K986P und K987P = Lysin ersetzt durch ein Prolin), die die Konformations-Änderung von der Prä-Fusions-Struktur hin zur Post-Fusions-Struktur des Spike-Proteins verhindern können. (siehe Abschnitt Einleitung und Fig. 2 c)

Der Herstellungsprozess der Impfstoff-RNAs setzt das Klonen der entsprechenden Sequenzen in eine Plasmid-DNA voraus, die den DNA-abhängigen RNA-Polymerase-Promotor enthält. Nach Amplifikation in Bakterienzellen, wird die Plasmid-DNA linearisiert und Verunreinigungen werden entfernt vor der **In Vitro Transkription** in RNA. Das Hinzufügen einer 5'-cap-Struktur ist ein kritischer Teil bei diesem Herstellungsschritt, der durch eine neue Technologie im großen Maßstab möglich geworden ist. (Literatur 48 und 49)

**Anmerkung:** Bei der Herstellung der **Plasmid-DNA (pDNA)**, deren Linearisierung und der Transkription in RNA sind bedeutende biotechnologische Schritte notwendig. Das Verfahren wird **In Vitro Transkription (IVT)** genannt. Das folgende Herstellungsschema auf der Website der Firma Sartorius liefert nur ein Beispiel dafür.



### From Gene of Interest to mRNA

The DNA sequence coding for the gene of interest is first inserted into a plasmid. The plasmid DNA (pDNA) is amplified in host bacteria, typically E. coli, before it is purified and linearized. mRNA is synthesized from the pDNA template, which is incubated with enzymes and nucleotides to produce the mRNA. This method is called in vitro transcription (IVT) and is a cell-free process. Further steps are required to add the mRNA cap and stabilize the molecule.

The new mRNA molecule is then isolated by removing impurities such as enzymes, remaining nucleotides, and nucleic acids. Finally, mRNA is concentrated and subject to sterile filtration before it is ready for encapsulating into LNPs.

### mRNA Process Flow



### Quelle:

<https://www.sartorius.com/en/applications/biopharmaceutical-manufacturing/mrna-production#id-757422>

aufgerufen am 8.6.2021

weiter Seite 4 rechte Spalte in Heinz u. Stiasny

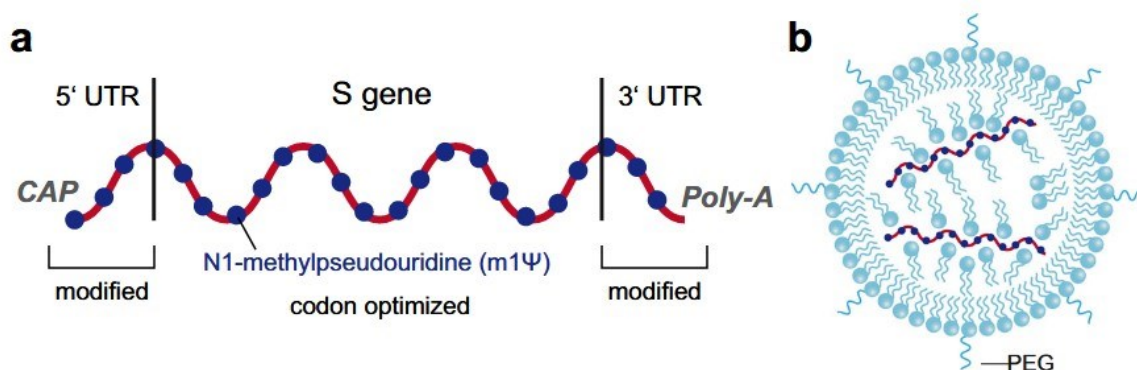
## Fortsetzung: mRNA Impfstoffe

production<sup>48,49</sup>. In vitro transcription is followed by several steps of mRNA purification, including the removal of dsRNA, which could lead to an excessive innate immune response and concomitant reactogenicity<sup>48,50</sup>. Both mRNA vaccines have modulated 5' and 3' untranslated sequences to optimize mRNA stability and translation efficiency<sup>44,45</sup>, and all uridines are replaced by N1-methylpseudouridine (m1Ψ) to further increase RNA stability and to reduce innate immune responses (Fig. 3a; see section "Vaccine-specific differences of innate responses")<sup>51,52</sup>. Details of manufacturing processes may differ between the companies, and subtle product-specific variations of RNA sequences were recently confirmed by comparative analyses of RNA extracted from original vials of the two vaccines (<https://github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273/blob/main/Assemblies%20of%20putative%20SARS-CoV2-spike-encoding%20mRNA%20sequences%20for%20vaccines%20BNT-162b2%20and%20mRNA-1273.docx.pdf>).

Auf die in vitro Transkription folgen mehrere Schritte der Reinigung der mRNA, unter anderem auch die Entfernung von doppelsträngiger RNA (dsRNA), die zu einer überschießenden Antwort des angeborenen Immunsystems mit einhergehenden Reaktionen führen könnte. Beide mRNA-Impfstoffe haben modulierte 5' und 3' nicht in Protein übersetzte Sequenzen (untranslated regions UTRs), um die Stabilität und die Effektivität der Übersetzung in Protein, die Translation zu optimieren. Alle Uridine wurden ausgetauscht gegen methylierte Uridin-Derivate (N1-methylpseudouridine = m1Ψ, Ψ Zeichen für den griechischen Buchstaben Psi) - mit dem Zweck die Stabilität der RNA zu erhöhen und Reaktionen des angeborenen Immunsystems zu reduzieren. (Fig. 3 a; siehe Abschnitt „Impfstoff-spezifische Unterschiede des angeborenen Immunsystems)

Details der Herstellungsprozesse könnten sich unterscheiden bei den beiden Herstellerfirmen, und feine Produkt-spezifische Unterschiede bei RNA-Sequenzen wurden jüngst bestätigt durch vergleichende Analysen der RNA, die aus den Original-Fläschchen der Impfstoffe als Proben gezogen wurden.

<https://github.com/NAalytics/Assemblies-of-putative-SARS-CoV2-spike-encoding-mRNA-sequences-for-vaccines-BNT-162b2-and-mRNA-1273/blob/main/Assemblies%20of%20putative%20SARS-CoV2-spike-encoding%20mRNA%20sequences%20for%20vaccines%20BNT-162b2%20and%20mRNA-1273.docx.pdf>



**Fig 3 auf Seite 5 in Heinz u. Stiasny: Konfiguration der mRNA Impfstoffe:**  
**a Schema der Impfstoff mRNA in BioTech-Pfizer und Moderna Impfstoffen.**  
**b Schema der Lipidnanopartikel (Abkürzungen im Text)**

Seite 4 rechte Spalte unten in Heinz u. Stiasny

For delivery, the RNA vaccines are formulated as complexes with specific lipids in the form of lipid nanoparticles (LNP), which not only provide protection from RNA degradation in tissues but also facilitate cellular uptake and release into the cytoplasm for RNA translation (Fig. 3b)<sup>53,54</sup>. The components used for LNP formulation include phospholipids, cholesterol, special cationic (ionizable) lipids and polyethylene glycol (PEGylated) lipids that are mixed in a sophisticated and critical production step (parts of which are not documented in the published literature) to yield the final vaccine<sup>53</sup>. Specifically developed and improved ionizable lipids are used in the Moderna and Biontech-Pfizer vaccines (designated Lipid H, SM-102 and ALC-0315, respectively), which together with the molar ratios of the lipid components in LNPs play a critical role for RNA delivery<sup>54</sup>. The precise mechanisms of how the RNA is taken up by different cells after vaccination and escapes from LNPs and intracellular vesicles is incompletely resolved<sup>53,55</sup>. Collectively, there are subtle differences between the two vaccines, both with respect to the RNA and the LNP carriers, and a higher amount of RNA per dose is used in the

Für die Bereitstellung werden die mRNA-Impfstoffe als Komplexe mit speziellen Lipiden in der Form von **Lipid-Nano-Partikeln (LNP)** formuliert, die nicht nur Schutz bieten vor dem RNA-Abbau in den Geweben, sondern auch die Aufnahme in die Zellen und die Abgabe in das Cytoplasma erleichtern, um dort die Translation der RNA zum Protein zu ermöglichen (Fig. 3b). Die Komponenten, die zur Formulierung der LNPs verwendet werden, enthalten **Phospholipide, Cholesterol, spezielle (ionisierbare) kationische Lipide und PolyEthylen-Glycol (PEGylated) Lipide**, die zur Herstellung des fertigen Impfstoffes in einem schwierigen und kritischen Produktionsschritt gemischt werden müssen (teilweise nicht dokumentiert in publizierter Literatur). Speziell



entwickelte und verbesserte ionisierbare Lipide werden in Moderna- und in Biontech-Pfizer-Impfstoffen verwendet (sogenanntes Lipid H, SM-102 bzw. ALC-0315), die zusammen mit den Konzentrations-Verhältnissen der Lipid-Komponenten in den LNPs eine entscheidende Rolle spielen bei der Bereitstellung der RNA. Der genaue Mechanismus, wie die RNA nach der Impfung aufgenommen wird in die verschiedenen Zellen und aus den LNPs freigesetzt wird ist noch unvollständig gelöst. Zusammenfassend gibt es feine Unterschiede zwischen den beiden Impfstoffen, sowohl was die RNA betrifft als auch was die Verpackung in den LNPs betrifft und in den Moderna Impfstoffen wird eine höhere Dosis verwendet (100 µg) als im BioNTech-Pfizer Impfstoff (30 µg).

weiter Seite 5 in Heinz u. Stiasny

Moderna vaccine (100 µg) than in the BioNTech-Pfizer vaccine (30 µg)<sup>46,47</sup>.

Another mRNA vaccine, manufactured by the company CureVac (current name CVnCoV; Table 1) is in an advanced stage of development<sup>56</sup>. The RNA in this vaccine is also codon-optimized and contains modifications to improve its performance, but—different from the BioNTech-Pfizer and Moderna mRNA vaccines described above—it does not contain the m1Ψ nucleoside modifications<sup>57,58</sup>. Recently, data from a phase 3 clinical trial became available, showing a relatively low efficacy of 47% at preventing disease (<https://www.curevac.com/en/2021/06/16/curevac-provides-update-on-phase-2b-3-trial-of-first-generation-covid-19-vaccine-cvncov/>), well below the efficacies reported for the BioNTech-Pfizer and Moderna vaccines<sup>46,47</sup> and below the requirement of at least 50% efficacy proposed by WHO (<https://www.who.int/publications/m/item/considerations-for-the-assessment-of-covid-19-vaccines-for-listing-by-who>). The low performance may be attributed in part to the high proportion of variants that have caused infections in the study population. The major problem, however, appears to reside in the relatively low dose of 12 µg RNA that had to be chosen to avoid intolerably strong side reactions in the absence of RNA modifications such as the m1Ψ nucleoside modifications used in the two authorized mRNA vaccines<sup>59</sup>. Results from a phase 1 clinical trial with the Curevac vaccine had indeed already shown relatively low titers of neutralizing antibodies induced by the dose used in the phase 3 clinical trial<sup>56,59</sup>.

Head-to-head comparisons of current mRNA vaccines with respect to possible differences in the efficiency of protein translation, stability or the stimulation of innate responses are not available in the literature. Persistence of RNA and its expression after different routes of application (including intramuscular) appears to be short (at least in mice), with a maximum of 10 days<sup>60</sup>.

Ein anderer RNA-Impfstoff, hergestellt durch die Firma CureVac (gegenwärtiger Name CVnCoV; Tabelle 1) ist in einem fortgeschrittenen Stadium der Entwicklung. Die RNA in diesem Impfstoff ist ebenfalls im Code optimiert und enthält Modifikationen, um die Wirkung zu verbessern, jedoch - im Unterschied zu den oben beschriebenen BioNTech-Pfizer- und Moderna-mRNA-Impfstoffen, enthält dieser Impfstoff kein N1-methylpseudouridine (= m<sup>1</sup>Ψ)-Nucleosid statt dem normalen Uridin-Nucleosid. Jüngst wurden Daten aus einer Phase 3 Studie bekannt, die eine relativ niedrige Wirksamkeit von 47% zur Verhinderung der Krankheit zeigten, weit unter den Wirksamkeiten für die Impfstoffe von BioNTech Pfizer und Moderna.

(<https://www.curevac.com/en/2021/06/16/curevac-provides-update-on-phase-2b-3-trial-of-first-generation-covid-19-vaccine-candidate-cvncov/>)

Und unter den Anforderungen von mindestens 50% Wirksamkeit, die von der WHO vorgeschlagen wird.

(<https://www.who.int/publications/m/item/considerations-for-the-assessment-of-covid-19-vaccines-for-listing-by-who>)

Die niedrige Wirksamkeit könnte teilweise begründet sein in der hohen Zahl an Varianten, die in der Population für diese Studie verbreitet waren. Das Hauptproblem jedoch scheint bei der relativ niedrigen Dosis von 12 µg RNA zu liegen, die gewählt wurde, um nicht tolerierbare Nebenwirkungen zu vermeiden. Diese können bei Fehlen von RNA-Modifikationen, wie z.B. der Verwendung von N1-methylpseudouridine, auftreten. Bei den beiden anderen zugelassenen mRNA Impfstoffen kam dies zur Anwendung. Schon bei der Klinischen Phase 1 Studie hat der Curevac-Impfstoff genau wie bei der Phase 3 Studie bei der verwendeten Dosis relativ niedrige Gehalte von neutralisierenden Antikörpern induziert.

Vergleiche von Impfstoff zu Impfstoff bei den mRNA-Impfstoffen bezüglich möglicher Unterschiede in der Effizienz der Protein-Translation, Stabilität des Proteins oder der Stimulation des angeborenen Immunsystems sind in der Literatur nicht verfügbar. Die Beständigkeit der RNA nach verschiedenen Verabreichungen (einschließlich der intramuskulären) scheint nur kurz zu sein (zumindest bei Mäusen), mit einem Maximum von 10 Tagen.

### **Anmerkung:**

Notabene: Text von Heinz u. Stiasny wurde am **1. Juni 2021 eingereicht**

**Anmerkung:** Im Kapitel mRNA-Impfstoffe wird eine große Unbekannte aller genetischen Impfstoffe und besonders der mRNA Impfstoffe angesprochen, nämlich die große Frage, **wo die Spike-Proteine genau exprimiert werden**. Im Artikel werden Muskel-Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen, und/oder Immunzellen wie dendritische Zellen genannt. Deutlich wird drauf hingewiesen, dass dies nicht geklärt ist: „**it is believed, but not systematically studied and formally shown**“. Auch Vanessa-Schmidt Krüger greift in ihrem Video 2 diese Unsicherheit auf und erklärt die Problematik dazu sehr anschaulich. **Dr. Vanessa Schmidt-Krüger** arbeitet an einem renommierten Molekularbiologie-Institut in Berlin: <https://www.mdc-berlin.de/>  
Ihre Visitenkarte und weiter auch ihre Publikationen <https://www.mdc-berlin.de/de/person/dr-vanessa-schmidt-krueger>

### Video 2:

Gefahren und Risiken der Biontech Nano-Lipide

<https://www.youtube.com/watch?v=XbHCdF-W6e4>

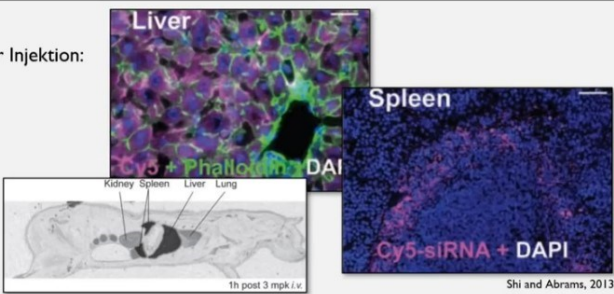
## WO GEHEN DIE LIPIDNANOPARTIKEL HIN ?

**Versuche an Mäusen und Ratten**

Nachweis von LNP innerhalb 1 Stunde nach der Injektion:

1. Ort der Einstichstelle
2. Im Blut
3. Transport über das Blut in andere Organe:
  - Knochenmark
  - **Leber**
  - **Lunge**
  - **Milz**
  - Niere

Dauer des Nachweises: 10 Tage



Shi and Abrams, 2013

**Versuche am Menschen (Prälinik):** LNP in sämtlichen Geweben vorgefunden; besonders in der Milz und Leber

**BioNTech/Pfizer Public Assessment Report (Studie R-20-0072 und PF-07302048):**

Versuche an Ratten mit LNP (gleiche Zusammensetzung wie im Impfstoff) + Luciferase mRNA

Nach 2 Wochen und nach nur einer Spritze konnten sie die Luciferase-Aktivität immer noch im Blut und in der Leber nachweisen, sowie auch an der Injektionsstelle (andere Organe werden nicht erwähnt)

Nach der intramuskulären Injektion wurde die Luciferase-Aktivität bereits 6 Std später im Gewebe an der Einstichstelle und in der Leber detektiert (=> gleichzeitige Produktion der Luciferase)

Abb. Aus dem Video 2 von Dr. Vanessa Schmidt-Krüger

## Adenovirus-Vektor-Impfstoffe (Seite 5)

Original Text in Englisch aus Heinz u. Stiasny:

### **Adenovirus-vector vaccines**

Compared to mRNA vaccines, adenovirus-vector vaccines comprise several additional layers of complexity (including production in mammalian cell cultures) that can lead to heterogeneities of immune reactions and adverse effects. Variations include (but are not limited to) the type of adenovirus used as a vector, genetic modifications of the vector, the cell lines used for vaccine production, procedures for purification, and the specific design of the gene for expressing S (Table 1).

Currently, four adenovirus-vector vaccines are in widespread use. These are the products (in alphabetical order) of CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology, Janssen-Johnson&Johnson, Oxford-AstraZeneca and The Gamaleya Institute Moscow (Table 1). They use derivatives of different adenoviruses as vectors for reasons more specifically discussed in section "Distinguishing features of vaccines independent of immunogen", as follows: CanSino—human adenovirus 5<sup>61</sup>, Janssen-Johnson&Johnson—human adenovirus 26<sup>19,62,63</sup>, Oxford-AstraZeneca—

chimpanzee adenovirus Y25<sup>64–66</sup>; Gamaleya Institute—human adenovirus 26 for the first vaccination and human adenovirus 5 for the second<sup>67,68</sup>.

Verglichen mit den mRNA Impfstoffen benötigen die AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe einige zusätzliche Komplexitäts-Ebenen (u.a. Herstellung in Säugetier-Zellkulturen), die zu verschiedenen Immunreaktionen und Nebenwirkungen führen können. Die Unterschiede beruhen unter anderem auf folgenden Einflussfaktoren: dem als Vektor verwendeten AdenoVirus Typ, der gentechnischen Veränderung dieses Vektors, der zur Herstellung des Vektors verwendeten Zelllinie, dem Aufreinigung-Prozess und schließlich dem speziellen Design des Gens für die Expression des Spike-Proteins.

Gegenwärtig sind 4 AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe in breiter Verwendung. Das sind die Produkte (in alphabetischer Reihenfolge) von CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology, Janssen-Johnson&Johnson, Oxford-AstraZeneca und das Gamaleya Institut Moskau (Tabelle 1). Sie verwenden Derivate verschiedener AdenoViren als Vektoren aus Gründen, die noch

genauer besprochen werden sollen im Abschnitt „Unterscheidungsmerkmale der Impfstoffe ohne Bezug zum Immunogen“, das sind wie folgt:

CanSino: Humanes AdenoVirus 5

Janssen-Johnson&Johnson: Humanes AdenoVirus 26

Oxford-AstraZeneca: Schimpansen AdenoVirus Y25

Gamaleya Institute: AdenoVirus 5 für die erste Impfung und AdenoVirus 26 für die 2. Impfung.

weiter Seite 5 rechts in Heinz u. Stiasny

The unifying feature of all current adenovirus-vaccine vectors is the replacement of one of the early adenoviral genes (E1) for the full-length SARS-Cov-2 S gene in the adenoviral DNA (Fig. 4a) and the additional deletion of E3<sup>19,61,62,64,65,69</sup>. The loss of the E1 gene abolishes replication competence of the vector. Therefore, for production of the engineered particles as a vaccine, immortalized helper cell lines are used that contain the E1 gene in their chromosomal DNA and provide the missing function, allowing the biosynthesis of structural proteins, replication of modified genomic DNA, and finally assembly of replication-incompetent virus particles in the cells (Fig. 4b)<sup>70</sup>. Production cell lines for the Oxford-AstraZeneca, Gamaleya and CanSino vaccines are derived from primary human embryonic kidney cells (HEK293), and for the Janssen vaccine from human embryonic retinal cells (PER.C6) (Table 1). Quantitative recovery of adenoviral vector particles involves lysis of the cells by detergents (Fig. 4B, right) and further downstream processes for the removal of cellular components and free viral DNA<sup>71</sup>. Details of these processes, affecting the purity and quality of the final vaccines (containing at least  $5 \times 10^{10}$  particles per dose), are not accessible in the published literature (see section “Contaminations from cell substrates”).

Das gemeinsame Merkmal der gegenwärtigen AdenoVirus-Vektoren ist der Austausch eines von zwei AdenoVirus-Genen (E1) gegen das SARS-Cov-2 S-Gen in voller Länge in der AdenoVirus-DNA und eine zusätzliche Deletion (Lücke) des Gens E3 in der AdenoVirus-DNA. Der Verlust des E1-Gens beendet die Replikations-Fähigkeit des Vektors. Deshalb müssen zur Produktion der gentechnisch veränderten Viruspartikel als Impfstoff (unsterbliche) Helfer-Zellen verwendet werden, die das E1-Gen in der chromosomalen DNA der Helferzelle haben und so die fehlende Funktion bereitstellen. Die Biosynthese von Strukturproteinen und die Replikation der genomischen DNA und letztlich der Zusammenbau der Replikations-inkompetenten Virus-Partikel in den Zellen kann so ermöglicht werden (Fig 4 b).

**Anmerkung:** Diese ersten Schritte der Herstellung der Impfstoffe sind komplizierte gentechnische Arbeitsschritte in einem **Forschungslabor**, die wohl durch mehrmalige Versuche erarbeitet wurden und letztlich durch einen endgültig geglückten Versuch das gewünschte vorliegende Ergebnis gebracht haben. Das SARS-Cov-2 S-Gen wurde also erfolgreich zunächst in seiner vollen Länge im Labor in die AdenoVirus-DNA eingebaut. Die gentechnisch veränderte AdenoVirus-DNA wird dann in eine menschliche Zelle eingebaut. Bis hierher ist die Entwicklung ein einmaliger Vorgang (in der Fachsprache der Biotechnologie eher ein „Event“, das nicht im Sinne des Postulates der Naturwissenschaften und Technik jederzeit reproduzierbar ist.

Das in menschliche Zellen eingebaute gentechnisch veränderte AdenoVirus wird dann mit Hilfe dieser menschlichen Zellkulturen in Fermentern vermehrt. Dieser Schritt ist ein Herstellungsschritt mit einem Prozess, der in einer **Produktionsanlage** erfolgt und einer herausfordernden Qualitätskontrolle unterliegt, da ab jetzt für jeden Schritt eine 100%ige Reproduzierbarkeit gefordert sein muss.

Zelllinien für die Herstellung der Oxford-Astra-Zeneca, Gamaleya und CanSino Impfstoffe sind menschliche **embryonale Nierenzellen (HEK293)** und für den Janssen-Impfstoff menschliche **embryonale Netzhautzellen (PER.C6)** – siehe Tabelle 1 in Heinz u. Stiasny (dort auf Seite 2)

**Anmerkung:** Diese Zelllinien sind für Zellkulturen schon lange in Verwendung. Ihre Anwendung ist u.a. für unterschiedliche Religionskonfessionen ein Grund, die mit solchen Zellkulturen hergestellten Impfstoffe prinzipiell abzulehnen (Orthodoxe Christen, Orthodoxe Juden, Katholiken mit Marienverehrung usw). Obwohl diese Zelllinien heute auf der ganzen Welt in Forschung und Pharmaindustrie in breiter Verwendung sind, ist auch dieser Einwand ernst zu nehmen. Einblicke vom 21.2.2022:

<https://www.theguardian.com/society/2020/aug/26/why-are-australian-church-leaders-opposing-the-oxford-coronavirus-vaccine>

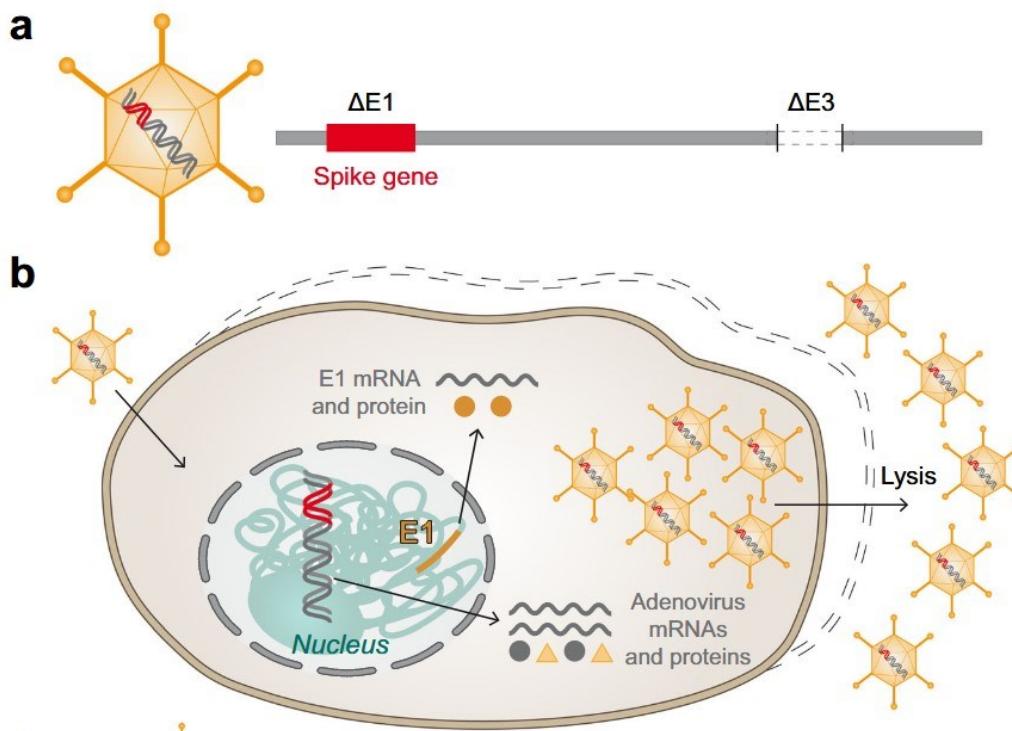
<https://balkaninsight.com/2021/01/19/religious-strain-of-anti-vax-grows-in-cee/>

[https://www.chabad.org/library/article\\_cdo/aid/2870103/jewish/What-Does-Jewish-Law-Say-About-Vaccination.htm](https://www.chabad.org/library/article_cdo/aid/2870103/jewish/What-Does-Jewish-Law-Say-About-Vaccination.htm)

Einen Einblick in die Arbeitswelt der Herstellung von Impfstoffen mit Zellkulturen kann man sich auf der Website der Firma CreativeBiolabs machen (ob die Zelllinien konkret von dieser Firma stammen oder aus anderen Quellen, ist damit nicht gesagt und ist mir auch nicht bekannt):

[https://www.gmp-creativebiolabs.com/hek293-cell-lines\\_71.htm](https://www.gmp-creativebiolabs.com/hek293-cell-lines_71.htm)

[https://www.gmp-creativebiolabs.com/per-c6-cell-lines\\_74.htm](https://www.gmp-creativebiolabs.com/per-c6-cell-lines_74.htm)



### Die Abbildung aus Heinz u. Stiasny (Fig 4 a and b) Seite 6 zeigt

**a)** Schema des Replikations-inkompetenten AdenoVirus-Vektor-Partikels und seiner DNA.  $\Delta E1$  und  $\Delta E3$  sind die „Leerstellen“ der Gene E1 und E2 (für Early AdenoVirus Genes). In die Lücke  $\Delta E1$  wurde das Gen für das Spike-Protein eingesetzt.

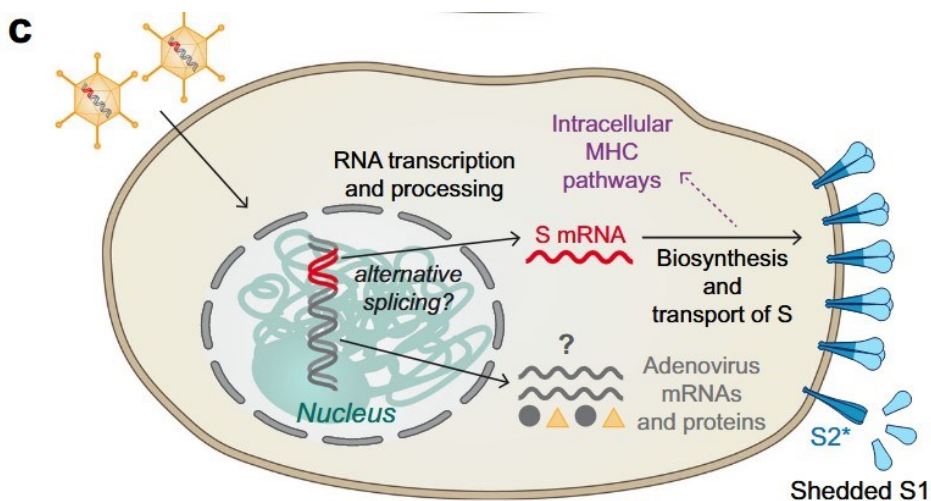
**b)** Bildung der Impfstoffpartikel **in den produzierenden Zelllinien** Nieren- bzw. Netzhautzellen, indem das fehlende Gen E1 in die Chromosomen mit hineingenommen wird.

**Anmerkung:** Das Gen E1 ist notwendig, damit das AdenoVirus Partikel wieder zusammengebaut werden kann. Da das Gen E1 aber nun nicht mehr Bestandteil des Adeno-Virus-Genoms ist, muss es an anderer Stelle der produzierenden Nieren- bzw. Netzhautzellen vorhanden sein. In den Nieren- bzw. Netzhautzellen werden nun die gentechnisch veränderte AdenoVirus Partikel in großen Mengen produziert.

Die quantitative Gewinnung von AdenoVirus-Partikeln setzt nun die Auflösung der Zellen mit Detergentien voraus (Fig 4b rechts). Details dieses Prozesses, die entscheidend sind für die Reinheit und Qualität des Impfstoffes, der mindestens  $5 \times 10^{10}$  (10 Milliarden) Partikel pro Dosis enthält sind nicht zugänglich in der veröffentlichten Literatur. (siehe Abschnitt „Kontamination von Zell-Substraten“)

weiter auf Seite 5 rechts, Mitte in Heinz u. Stiasny

Similar to mRNA vaccines, adenovirus vector vaccines are intended to result in the production of native S proteins from a specific mRNA in cells of the vaccinee (Figs. 1b, 4c). The pathway to this mRNA however is substantially more complex than with mRNA vaccines because it takes a detour of the adenoviral DNA through the nucleus (where it remains extrachromosomal) and requires a number of additional cellular processes, including RNA transcription and processing (Fig. 4c). Although in vitro model studies with one of the current adenovirus vector vaccines (ChAdOx1 nCoV-19; Table 1) have shown that S-coding transcripts dominate the transcription patterns, rare aberrant splicing or polyadenylation site usage were observed<sup>72</sup>. Recent work by Kowarz et al.<sup>73</sup> provides further evidence for alternative splice events that might lead to the formation of C-terminally truncated and therefore soluble S protein. The authors speculate that such secreted forms may bind to ACE2-expressing endothelial cells and could contribute to thrombotic events via antibody-mediated mechanism as observed after vaccination with adenovirus vector COVID-19 vaccines<sup>74,75</sup> (see also section “Reactions due to vaccine constituents other than the immunogen”).



**Die Abbildung aus Heinz u. Stiasny (Fig 4c), Seite 6 zeigt:**

Expression bzw. Bildung des Spike-Proteins **in Zellen der geimpften Person**. Mehr oder weniger starke Ausschüttung des S1 und Umwandlung von S2 in die Post-Fusions-Struktur (S2\*) kann vorkommen, wenn keine stabilisierende Mutation vorgenommen wurde.

weiter auf Seite 5 rechts, Mitte in Heinz u. Stiasny:

Genau wie die mRNA Impfstoffe, so sind auch die AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe dazu bestimmt, das native S-Protein (Spike-Protein) von einer speziellen mRNA abzulesen und in den Zellen der geimpften Person zu produzieren (Figs 1b und 4c). Der Weg bis hin zu dieser mRNA ist hier aber



wesentlich komplexer als bei mRNA Impfstoffen, weil es einen Umweg der AdenoVirus-DNA über den Zellkern braucht (wo diese DNA extrachromosomal vorliegt) und es braucht eine Anzahl von weiteren zellulären Prozessen, inklusiv Transkription von DNA auf RNA und das weitere RNA-Processing (Fig 4c). Obwohl in Vitro Modell-Studien mit einem der derzeit verwendeten AdenoVirus Impfstoffe (ChAdOx1 nCoV-19) gezeigt haben, dass Spike-Protein codierende Transkripte das Transkriptions-Muster dominieren, so wurde doch selten vorkommendes abweichendes Splicing und abweichende Ablese der Endsequenzen (polyadenylation site usage) beobachtet. Jüngste Arbeiten von Kowarz et al. geben weitere Hinweise für abweichende Splice-Events, die zur Bildung von am C-terminalen Ende abgeschnittenen und daher löslichen Spike-Proteinen führen könnten. Die Autoren vermuten, dass solche gebildeten Proteine anbinden könnten an ACE2-exprimierende Endothelzellen und damit beitragen zu thrombotischen Ereignissen über einen Antikörper-vermittelten Mechanismus, wie das auch beobachtet wurde nach Impfungen mit den AdenoVirus-Vektor COVID-19 Impfstoffen. (siehe auch Kapitel „Reaktionen durch nicht immunogene Impfstoff-Bestandteile“).

weiter Seite 5 rechts, unten in Heinz u. Stiasny

In addition, background expression of remaining adenoviral genes has been demonstrated in this as well as in other studies with human adenovirus-based vectors<sup>72,76</sup>. It is part of the unknowns of current COVID-19 adenovirus vector vaccines, how the patterns of background-vector DNA and protein expression look like after vaccination and whether immune reactions to such proteins are induced.

Weiters wurde die Expression von noch vorhandenen AdenoVirus-Genen im Hintergrund festgestellt in dieser als auch in anderen Studien mit menschlichem AdenoVirus. Es gehört zu den Unbekannten der derzeit verwendeten AdenoVirus-Vektor Impfstoffe, wie das Muster der Hintergrund-Vektor DNA und Protein-Expression aussieht nach einer Impfung und ob Immunreaktionen auf solche Proteine hervorgerufen werden.

**Anmerkung:** **Alternative polyadenylation (APA)** is emerging as a widespread mechanism used to control gene expression. Like alternative splicing, usage of alternative poly(A) sites allows a single gene to encode multiple mRNA transcripts. In some cases, this changes the mRNA coding potential; in other cases, the code remains unchanged but the 3' UTR length is altered, influencing the fate of mRNAs in several ways, for example, by altering the availability of RNA binding protein sites and microRNA binding sites. The mechanisms governing both global and gene-specific APA are only starting to be deciphered. Here we review what is known about these mechanisms and the functional consequences of alternative polyadenylation.

(siehe: DiGiammartino alternative polyadenylation Mol Cell 2011.pdf)

Although the constructs for all four adenovirus-vector vaccines contain the full-length spike protein, there are some differences in

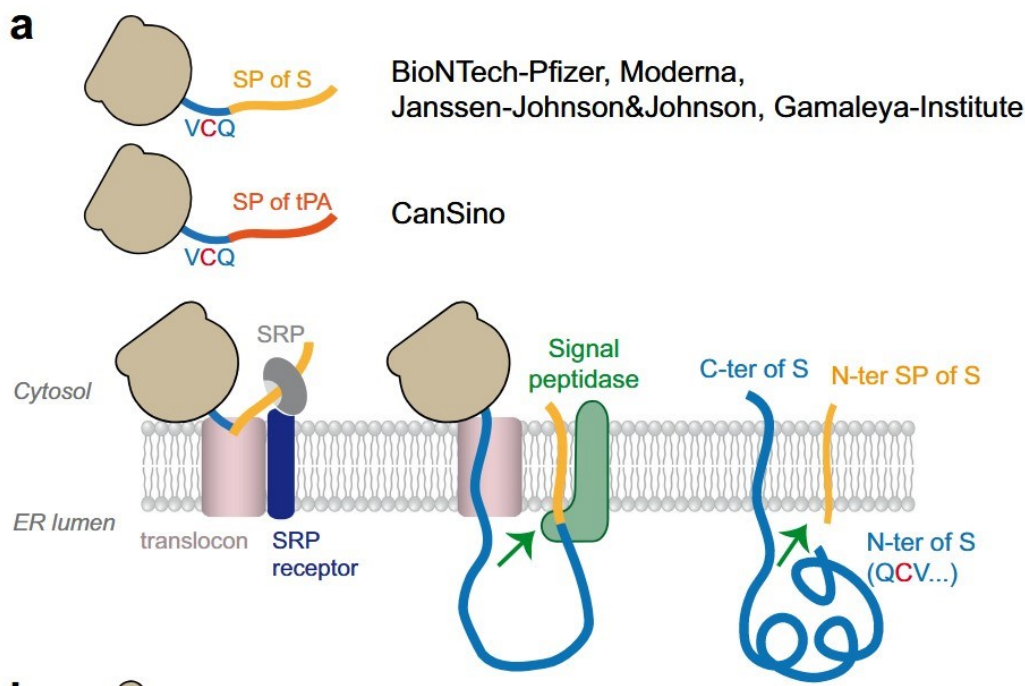
weiter Seite 6 in Heinz u. Stiasny

construct design with respect to mutations for stabilizing S as well as to the signal peptide at the N-terminus of S that require attention. Only the Janssen vaccine contains S-stabilizing mutations (Table 1), comprising not only the two prolines in S2 but also the S1/S2 furin cleavage site, which is mutated from 682-RRAS-685 to SRAG<sup>19,62</sup>. Both modifications are intended to avoid conversion of S into the post-fusion structure (Fig. 2d)<sup>19</sup>.

Correct processing of the signal peptide by signal peptidase to generate the final N-terminus of S (Fig. 5a) may be especially critical for obtaining natively folded S, because there is a cysteine immediately downstream of the cleavage site (amino acid 2) that has to form an S-S bond with the cysteine at position 136. Janssen-Johnson&Johnson and Gamaleya-Institute use the authentic SARS-CoV-2 S protein signal sequence<sup>19,67</sup>, whereas CanSino replaced it with that of human tissue plasminogen activator (tPA) (Fig. 5a) (<https://patents.google.com/patent/CN111218459B/en>). In the Oxford-AstraZeneca vaccine, an extended form of the tPA signal sequence (containing the tPA propeptide) was engineered in front of the authentic S protein signal sequence<sup>65,77,78</sup> (Fig. 5b), based on a previous study with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV<sup>79</sup> (Fig. 5b). Details of the engineered 'leader sequence' in the ChAdOX1-S vaccine are difficult to track, but likely comprise 32 to 34 amino acids of tPA (according to a document of the European

Obwohl der Aufbau aller vier AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe das Spike-Protein in voller Länge enthält, gibt es doch einige Unterschiede sowohl im Bezug auf die Mutationen zur Stabilisierung des Spike-Proteins als auch im Bezug auf das Signal-Peptid am N-Ende des Spike Proteins, die Aufmerksam verdienen. Nur der **Janssen-Impfstoff** enthält Spike-Protein stabilisierende Mutationen (siehe Tabelle 1), nicht nur 2 mal die Aminosäure Prolin in der Spike-Protein Untereinheit S2, sondern auch die Bruchstelle S1/S2 für das spaltende Enzym Furin, die gentechnisch verändert wurde von 682-RRAS-685 zu SRAG. Beide Veränderungen haben den Zweck, eine Umfaltung des Spike-Proteins in seine Post-Fusions-Struktur zu vermeiden (Fig 2 d).

**Anmerkung:** Die Gentechnische Veränderung: von 682-RRAS-685 zu SRAG bedeutet, dass in Position 682 Arginin gegen Serin ausgetauscht wurde und in Position 685 Serin gegen Glycin ausgetauscht wurde. Die Positionen 683 und 684 bleiben mit Arginin bzw. Alanin gleich. Ob diese Veränderungen gegenüber neuen Virus-Varianten weiterhin die gewünschte Funktion erfüllen, ist sicher fraglich.



**Die Abbildung (Fig. 5 a, Seite 7) aus Heinz u. Stiasny zeigt:** den Transport des Spike-Proteins in den Innenraum des Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelt durch eine Signal-Sequenz. Im **CanSino** Impfstoff ist das Signal-Peptid des Spike-Proteins ersetzt durch das menschliche tPA (human tissue Plasminogen Activator)

weiter Seite 6 linke Spalte:

Die korrekte Umsetzung des Signal-Peptids durch eine Signal-Peptid-Peptidase zur Ausbildung des richtigen N-Endes des Spike-Proteins ist besonders wichtig, um ein natürlich gefaltetes Spike-Protein zu erhalten, weil es auch eine Aminosäure Cystein direkt nach der Bruchstelle gibt (Aminosäure in Position 2) die beteiligt ist an der Ausbildung einer Disulfid-Brücke (S-S Bindung ) mit dem Cystein der Position 136. **Janssen-Johnson&Johnson** und **Gamaleya-Institute** verwenden die echte SARS-CoV-2 Spike-Protein Signal Frequenz, wogegen CanSino diese austauscht durch den menschlichen Plasminogen Aktivator (tPA = human tissue Plasminogen Activator, siehe Fig. 5 a).

(<http://patents.google.com/patent/CN111218459/B/en>)

**Anmerkung:** Das N-Ende des Spike-Proteins trägt die Aminosäuren:

Q = Gln = Glutamin

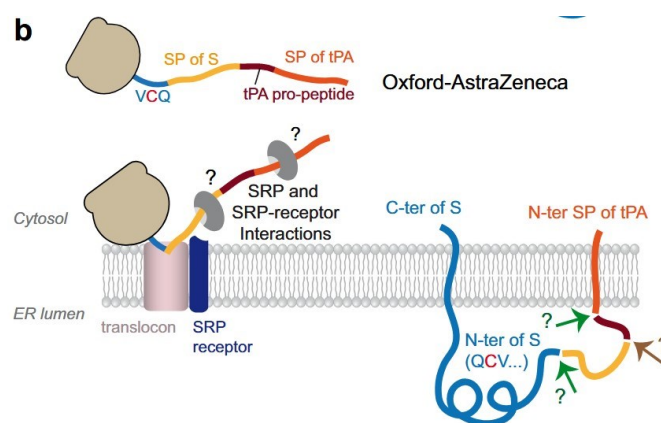
C = Cys = Cystein (in Position 2 im Spike Protein)

V = Val = Valin

in Position 136 im Spike-Protein ist ebenfalls ein Cystein (Cys oder C) und von Position 2 zu Position 136 bildet sich damit eine Disulfidbrücke aus. Die Ausbildung der tertiären Struktur, das ist die räumliche Struktur eines Proteins, ist ausschlaggebend für dessen Wirkung. Der Austausch auch nur einer Aminosäure kann die Wirkung eines Proteins vollkommen verändern.

weiter Seite 6 in Heinz u. Stiasny linke Spalte

Im **Oxford-AstraZeneca Impfstoff** wurde eine gentechnisch hergestellte erweiterte Form der Plasminogen-Aktivator (tPA-Peptid) Signal-Sequenz vor die echte Spike-Protein-Signal-Sequenz eingebaut. (Fig. 5 b), basierend auf einer früheren Studie mit dem Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus MERS-CoV (Fig. 5 b). Details über diese gentechnisch hergestellte „Leader Sequenz“ im ChAdOX1-Impfstoff können nur schwer zurückverfolgt werden, sie enthalten jedoch 32 bis 34 Aminosäuren des Plasminogen Aktivators (tPA = human tissue Plasminogen Activator). Gemäß einem Dokument der Europäischen Medizin Agentur (EMA) zur Beurteilung von thrombotischen Ereignissen nach einer Impfung: EMA/205598/2021)) ...



**Die Abbildung (Fig. 5 b, Seite 7) aus Heinz u. Stiasny zeigt:** Prozess-Schema einer zusätzlichen N-terminalen „Leader Sequenz“, bestehend aus einem Signal Peptid und einem Vorläufer-Peptid des Plasminogen-Aktivators.

weiter in Heinz u. Stiasny auf Seite 6, rechte Spalte und Seite 7 Fortsetzung:

Medicines Agency assessing thrombotic post-vaccination events, EMA/205598/2021) and may contain a P to A mutation at position 22 to improve processing by signal peptidase<sup>80</sup>. The extended N-terminal 'leader sequence' results in two consecutive signal peptides separated by an intervening stretch of tPA propeptide (Fig. 5b). This complex artificial sequence element may lead to some inhomogeneity in proteolytic processing and impairment of correct formation of the S N-terminus during biosynthesis, as recently shown in comparative model studies with similar constructs<sup>19</sup>.

Despite the absence of S2-stabilizing mutations, structural studies of the S protein expressed in HeLa cells from the Oxford-AstraZeneca ChAdOx1 nCoV-19 vaccine provided evidence for proper folding and presentation of the trimeric pre-fusion conformation at the cellular plasma membrane<sup>78</sup>. However, the authors discuss evidence of shedding of the cleaved S1 portion<sup>78</sup>, which has also been observed in model studies with unmodified S proteins compared to mutationally stabilized proteins<sup>18</sup> (Fig. 2c). The effect of dissociation of soluble S1 from the trimer complex on the quality of immune responses is incompletely understood, but some data suggest it may contribute to a higher proportion of non-neutralizing relative to neutralizing antibodies<sup>19,81</sup>.

Animal experiments have shown that adenovirus-vector DNA can remain detectable for months after inoculation in

transcriptionally active form<sup>82</sup> in contrast to rapidly degraded RNA<sup>55,83</sup>. Persistence of antigen expression may be a distinctive feature of adenovirus vector vaccines, and has been proposed to contribute to induction of sustained immune responses and long-lasting immunity (reviewed in<sup>41</sup>).

weiter Seite 6 rechte Spalte und Seite 7 Fortsetzung:

... Die „Leader-Sequenz“ enthält auch eine P zu A Mutation (von Prolin zu Alanin) in der Position 22, um das Processing der Signal-Peptidase zu verbessern. Die erweiterte N-terminale „Leader-Sequenz“ resultiert in zwei aufeinander folgenden Signal-Peptiden, getrennt durch einen dazwischenliegenden Abschnitt des tPA Pro-Peptids (Fig 5 b). Diese komplexe künstliche Sequenz kann zur Inhomogenität im proteolytischen Prozess und zur Beeinträchtigung der korrekten Ausbildung des N-Endes des Spike-Proteins bei der Biosynthese führen, wie dies neulich gezeigt werden konnte in vergleichenden Modell-Studien mit ähnlichen Konstrukten.

weiter Seite 6 rechts unten:

Trotz der Abwesenheit von S2-stabilisierenden Mutationen, haben Untersuchungen der Struktur des in HeLa-Zellen exprimierten Spike-Proteins des Oxford-AstraZeneca ChAdx1 nCoV-19 Impfstoffes Hinweise für richtige Faltung und Ausbildung der trimeren Prä-Fusions-Konformation an der zellulären Plasma-Membran gegeben. Die Autoren diskutieren jedoch Hinweise über die Ablösung des abgespaltenen S1-Teiles, was auch in Modell-Studien mit nicht veränderten Spike-Proteinen im Vergleich zu veränderten stabilisierten Spike-Proteinen beobachtet wurde (Fig. 2c). Die Wirkung dieser Dissoziation der löslichen Untereinheit S1 vom trimeren Komplex auf die Qualität der Immunantwort wird nur unvollständig verstanden, aber einige Daten weisen darauf hin, dass dies der Grund ist für die Ausbildung eines größeren Anteils an nicht-neutralisierenden im Vergleich zu neutralisierenden Antikörpern. Tierexperimente haben gezeigt, dass AdenoVirus-Vektor DNA noch nachweisbar sein kann über Monate nach einer Inokulation

Seite 7 linke Spalte Anfang:

und zwar in einer Form, die noch immer aktiv in mRNA transkribiert werden kann, ganz im Gegensatz zu rasch abbaubarer RNA. Die Fortdauer der Antigen-Expression könnte eine charakteristische Eigenschaft von AdenoVirus-Vektor Impfstoffen sein und es wurde auch vermutet dass diese beiträgt zu einer nachhaltigen Immunantwort und länger andauernden Immunität.

## Protein basierende Impfstoffe (Seite 7)

### Protein-based vaccines—general

In parallel to genetic vaccines, more conventional approaches of vaccine development were pursued with similar intensity and led to the authorization of inactivated whole-virus vaccines and a subunit vaccine that is in a stage of pre-authorization (Table 1). Both of these technologies have already been applied successfully to the production of vaccines against other viral diseases<sup>84</sup>. With these vaccines—and in contrast to genetic vaccines—a predefined amount of the S immunogen/antigen is applied to the vaccinee, but—as discussed in the following sections—its

conformational integrity may vary depending on the conditions used for vaccine preparation.

### Inactivated vaccines

Published information about the production process is available for two inactivated whole-virus vaccines manufactured by the Chinese companies Sinopharm and Sinovac (Table 1). In both instances, the virus is grown in Vero cells and inactivated by beta-propiolactone (BPL), which is used as an inactivating agent for other viral vaccines, including rabies vaccines<sup>85</sup>. Literature data indicate that production of the Sinovac vaccine includes several steps of virus purification, leading to a product that contains primarily the viral proteins and consists of essentially pure viral particles<sup>86,87</sup>. The degree of purity of the Sinopharm vaccine (referred to as BBIBP-CorV; Table 1) is less clear. Two pertinent references do not indicate specific steps of purification after inactivation and removal of cell debris<sup>88,89</sup>, but one figure in a

publication by Wang et al.<sup>90</sup> suggests a step of chromatography, albeit without providing details of this process and the purity of the vaccine. Both vaccines use aluminum hydroxide as an adjuvant. Another inactivated whole-virus vaccine using similar technology is produced by the Indian company Bharat and has received emergency use authorization in India even before completion of phase III clinical trials<sup>91</sup> (Table 1). Details of purification processes used for the manufacturing of this vaccine are not available in published literature.

There are open questions concerning the structure of S in the inactivated vaccines. Electron microscopical pictures of the viral spikes in the Sinovac vaccine have been interpreted differently, either as displaying the pre-fusion structure<sup>86</sup> or the post-fusion structure<sup>25,92</sup>. Several lines of evidence suggest that BPL-inactivation in combination with purification processes can indeed lead to the formation of the post-fusion spike and the concomitant dissociation of S1<sup>25,92</sup>. Preservation of the native trimeric pre-fusion conformation, in contrast, was observed in structural studies with formalin-inactivated virus<sup>93</sup>, suggesting that inactivation and/or purification procedures can influence the ratios of pre- and post-fusion conformations of S and thus the qualities of killed whole-virus vaccines. Such factors may contribute to variations in the efficacies reported in clinical trials with current inactivated whole-virus vaccines<sup>94</sup>. There is indirect evidence that virus strains having emerged later in the pandemic (e.g. containing the mutation D614G in S) may be more stable<sup>95,96</sup> and therefore could serve as an improved substrate for the production of inactivated vaccines. The vaccine produced by Bharat is indeed based on a seed virus containing this mutation<sup>97</sup> (Table 1).

## Protein basierende Impfstoffe (übersetzt)

Parallel zu genetischen Impfstoffen, wurden mit gleicher Intensität, mehrere konventionelle Ansätze in der Impfstoffentwicklung vorangetrieben, was zur Zulassung von **Inaktivierten Ganz-Virus Impfstoffen** und eines vor der Zulassung stehenden **Protein-Untereinheit-Impfstoffes** führte (Tabelle 1). Beide Techniken waren schon erfolgreich für die Herstellung von Impfstoffen gegen andere Viruserkrankungen angewendet worden. Mit diesen Impfstoffen – und das ganz im Gegensatz zu den genetischen Impfstoffen – wird der zu impfenden Person eine vorher genau definierte Dosis des Immunogens bzw. Spike-Protein-Antigens verabreicht, jedoch – wie im folgenden Abschnitt besprochen – kann die Konformation des Proteins hier variieren abhängig von den Herstellungs-Bedingungen des Impfstoffes.

**Anmerkung:** Schon in der Einleitung wird hier auf den wichtigen Punkt hingewiesen, dass bei diesen Impfstoffen eine vorher genau definierte Dosis des Immunogens verabreicht werden kann, was bei den genetischen Impfstoffen nicht der Fall ist. Welche Dosis an Antigen nämlich letztlich durch die genetischen Impfstoffe gebildet wird, das kann nicht quantifiziert werden.

## Inaktivierte Ganz-Virus Impfstoffe (übersetzt)

Veröffentlichte Informationen über den Herstellungsprozess sind verfügbar über zwei inaktivierte Ganz-Virus-Impfstoffe, hergestellt durch die chinesischen Firmen **Sinopharm** und **Sinovac** (Tabelle 1). In beiden Fällen wird das Virus hergestellt in Vero-Zellen und dann durch **Beta-Propiolacton (BPL)** inaktiviert, eine Substanz, die auch zur Inaktivierung andere Impfstoffe, wie z.B. dem Tollwut-Impfstoff verwendet wird. Literaturdaten zeigen, dass die Herstellung von **Sinovac-Impfstoff** mehre Reinigungsschritte umfasst, die letztlich zu einem Produkt führen, das vor allem Virus-Proteine enthält und aus reinen Virus-Partikeln besteht. Der Grad der Reinheit des **Sinopharm-Impfstoffes** (siehe BBIBP-CorV; Tabelle 1) ist weniger klar. Zwei relevante Literatur-Referenzen erwähnen keine speziellen Reinigung-Schritte nach der Inaktivierung und Entfernung von Zell-Rückständen, nur eine Abbildung in einer

*nächste Seite 8 linke Spalte:*

Publikation von Wang et al. lässt auf einen Chromatographie-Schritt schließen, jedoch ohne auf Details über den Prozess und die Reinheit des Impfstoffes einzugehen. Beide Impfstoffe verwenden Aluminium-Hydroxid als Adjuvans. Ein anderer inaktivierter Ganz-Virus Impfstoff verwendet eine ähnliche Technik. Er



wird hergestellt durch die indische **Firma Bharat** und hat in Indien bereits eine Notzulassung erhalten noch vor Abschluss einer klinischen Phase 3 Studie (siehe Tabelle 1). Details über den Reinigungsprozess bei der Herstellung dieses Impfstoffes sind nicht verfügbar in veröffentlichter Literatur.

Es gibt offene Fragen bezüglich der Struktur des Spike-Proteins in den inaktivierten Viren. Elektronen-Mikroskopische Bilder der viralen Spike-Proteine im Sinovac-Impfstoff wurden unterschiedlich interpretiert, einerseits als Prä-Fusions-Struktur und andererseits auch als Post-Fusions-Struktur. Es gibt mehrere Hinweise, die nahe legen, dass die Inaktivierung durch Beta-Propiolacton (BPL) in Kombination mit Reinigungsschritten zur Bildung der Post-Fusions-Struktur des Spike-Proteins mit einhergehender Dissoziation der Untereinheit S1 des Spike-Proteins führen kann. Im Gegensatz dazu wurde bei Formalin-Inaktivierung die Erhaltung der trimeren nativen Prä-Fusions-Struktur in Struktur-Studien beobachtet, was nahe legt, dass die Inaktivierung und/oder Reinigung das Verhältnis von Prä-Fusions- zu Post-Fusions-Struktur des Spike-Proteins und damit auch die Qualität der abgetöteten Ganz-Virus-Impfstoffe beeinflussen kann. Diese Faktoren könnten zu unterschiedlichen Wirksamkeiten beitragen, über die in klinischen Studien mit den gegenwärtigen Ganz-Virus-Impfstoffen berichtet wurden. Es gibt indirekte Hinweise, dass Virus-Varianten, die später in der Pandemie auftraten (z.B. solche, die die Mutation D614G enthalten = Asparaginsäure ausgetauscht gegen Glycin im Spike-Protein), stabiler sind und deshalb als bessere Basis für inaktivierte Impfstoffe dienen könnten. Der Impfstoff von Bharat basiert auf einer Zucht-Variante, die diese Mutation enthält (Tabelle 1).

## Protein-Untereinheit Impfstoffe (Seite 8)

### Subunit vaccines

So far, results of phase III clinical efficacy trials were reported and published for a single subunit vaccine only<sup>98</sup>, which is manufactured by the company Novavax (NVX-CoV2373) (Table 1)<sup>98,99</sup> and is still in a stage before regulatory approval<sup>100</sup>. It consists of the trimeric full-length spike that is produced as a recombinant protein in insect Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) cells using a baculovirus expression system and contains mutations to stabilize S2 (K986P and V987P) as well as to delete the furin cleavage site (682-RRAS-685 changed to QQAQ)<sup>99</sup> (Table 1 and Fig. 2). The protein has its authentic membrane anchor and remains associated with the membranes of the Sf9 production cells. Therefore, isolation of the final product includes detergent solubilization of the cells and several steps of purification<sup>101</sup>. The company formulates the S trimer as a nanoparticle in polysorbate 80 (PS80) detergent and uses a special proprietary saponin-based adjuvant (Matrix-M™) that comprises 40 nm particles composed of Quillaja saponins, cholesterol and phospholipids<sup>102,103</sup>. High-resolution structural analysis revealed that the purified protein is stably locked in the preferred pre-fusion conformation, in part as free trimers and in part as multimer complexes<sup>103</sup>. The vaccine thus presents the correctly folded immunogen in essentially pure form and in combination with a potent adjuvant.

## Protein-Untereinheit Impfstoffe (übersetzt)

Bisher wurden Ergebnisse einer Phase 3 klinischen Studie nur für einen einzigen Protein-Untereinheit-Impfstoff veröffentlicht, der hergestellt wird von der Firma **Novavax** (NVX-CoV2373 – siehe Tabelle 1) und der aber noch vor seiner Zulassung steht. (**Anmerkung:** Notabene mit Stand der Einreichung des Artikels 1. Juni 2021) Er besteht aus dem trimeren Spike-Protein in voller Länge, das als rekombinantes Protein in Zellkulturen des Insekts *Spodoptera frugiperda* (SF9 – **Anmerkung:** einem Eulenfalter aus der Familie der Noctuidae) hergestellt wird. Es wird ein Expressions-System aus einem Baculovirus verwendet mit stabilisierenden Mutationen in der S2 Untereinheit des Spike-Proteins (K986P und V987P – zwei Aminosäuren ersetzt durch die Aminosäure Prolin) und mit einer Deletion an der Spaltungsstelle für die Protease Furin (3 Aminosäuren ausgetauscht: 682-RRAS-685 verändert zu 682-QQAQ-685 – siehe Tabelle 1 und Fig. 2). Das Protein hat damit seine ursprüngliche Verankerung in der Membran und bleibt verbunden mit den Membranen der produzierenden Zellkultur. Deshalb muss zur Isolierung des Endproduktes eine Auflösung der Zellen mit

Detergentien erfolgen und es müssen mehrere Reinigungsschritte erfolgen. Die Firma hat das Spike-Trimer als Nanopartikel formuliert, bestehend aus Polysorbat 80 (PS80) Detergens und verwendet ein spezielles eigens entwickeltes Adjuvans auf Saponin-Basis (Matrix-M™), das aus 40 nm Partikeln besteht, zusammengesetzt aus Quillaja-Saponinen, Cholesterol und Phospholipiden. Hochauflösende Struktur-Analyse hat gezeigt, dass das gereinigt Protein fest eingeschlossen ist in der gewünschten Prä-Fusions-Konformation, teilweise als freies Trimer und teilweise als Multi-Trimer-Komplex. Der Impfstoff ist daher ein korrekt gefaltetes Immunogen in reiner Form in Kombination mit einem wirksamen Adjuvans.

# Wirksamkeit der Impfstoffe gegen Virus-Varianten

weiter in Heinz u. Stiasny auf Seite 8, linke Spalte unten und Fortsetzung rechte Spalte oben

## **Effectiveness of vaccines against viral variants**

A plethora of viral mutants arose and spread since the emergence of SARS-CoV-2<sup>104,105</sup>. Some of these mutants are considered 'Variants of Concern' (VOCs) because of their highly efficient transmission, the concomitant replacement of previously circulating strains, and the presence of mutations in the spike protein that can lead to immune escape (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>). In principle, all current vaccines are affected similarly by VOCs, because they are all based on original wild-type strains from the early phase of the pandemic (see Table 1) and therefore their S protein sequences differ from those of VOCs to the same degrees. Indeed, substantially reduced

neutralization titers against some VOCs were observed with sera after immunization with mRNA and adenovirus vector vaccines<sup>106–109</sup>, pointing to the importance of the problem. On the positive side, results of efficacy as well as field effectiveness studies in various countries using different vaccines indicated a high degree of protection also against circulating VOCs, in particular against the Alpha variant<sup>2,98,110,111</sup>. Prevention of infection with the Beta, Gamma and Delta variants might be lower, although evidence indicates substantial protection from severe disease after two vaccinations<sup>110,112,113</sup>. So far, no data are available that would allow a direct comparison of the various vaccines and their effectiveness against the different VOCs. Given the same antigenic difference of all vaccines relative to VOCs, the most important parameter determining cross-protection may be the quantity of neutralizing antibodies and relevant cellular immune reactivity at the time of infection. This quantitative aspect is important for future analyses of the impact of waning immunity on protection and decisions about optimal timings of booster immunizations. Efforts are also underway to replace existing vaccine strains and corresponding sequences for those of the most relevant circulating strains<sup>114</sup>.

## Wirksamkeit der Impfstoffe gegen Virus-Varianten (Übersetzung)

weiter in Heinz u. Stiasny auf Seite 8, linke Spalte unten und Fortsetzung rechte Spalte oben

Seit dem Auftauchen von SARS-CoV-2 entstand und verbreitete sich eine Fülle neuer Virus-Mutanten. Einige dieser Mutanten werden als „Variants of Concern“ (VOC) betrachtet, wegen ihrer hoch effektiven Übertragung, der einhergehenden Verdrängung von bestehenden Varianten und auf Grund von Mutationen im Spike-Protein, die zu Immun-Flucht-Varianten führen.

(<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>)

Vom Prinzip her sind alle gegenwärtigen Impfstoffe gleichermaßen betroffen von der Bildung neuer Varianten, weil alle Impfstoffe auf dem originalen Wildtyp-Stamm aus einer sehr frühen Phase der Pandemie basieren (siehe Tabelle 1) und daher ihre Spike-Protein-Sequenz von jener in einem bestimmten Grad abweicht. Es wurden in den Seren nach Immunisierung mit mRNA-Impfstoffen und AdenoVirus-Vektor-Impfstoffen auch schon wesentlich reduzierte Neutralisation-Titer gegen einige Varianten beobachtet, was auf dieses wichtige Problem hinweist. Auf der positiven Seite haben Ergebnisse über die Wirksamkeit und Effektivitäts-Studien in der Praxis in verschiedenen Ländern mit unterschiedlichen Impfstoffen einen hohen Grad an Schutz gezeigt auch gegen die kursierenden Varianten, speziell gegen die Alpha-Variante. Der Schutz vor Infektion mit der Beta-, Gamma- und Delta-Variante könnte geringer ausfallen, obwohl es Hinweise gibt, dass erheblicher Schutz vor schwerer Krankheit nach zwei Impfungen besteht. Bisher sind keine Daten verfügbar, die einen direkten Vergleich der verschiedenen Impfstoffe und deren Effektivität gegen verschiedene VOCs erlauben. Bei gegebenem Unterschied der Antigene aller Impfstoffe gegen die VOCs ist der wichtigste Parameter für einen kreuzweisen Schutz die Menge an neutralisierenden Antikörpern und die relative zelluläre Immun-Antwort zum Zeitpunkt der Infektion. Der quantitative Aspekt ist wichtig für die zukünftige Analyse des Einflusses der schwindenden Immunität auf den Immunschutz und die Entscheidungen über den optimalen Zeitpunkt einer Booster-Immunisierung. Es gibt auch weitere Anstrengungen, bestehende Impflinien und die entsprechenden Sequenzen anzupassen an die wichtigsten zirkulierenden Linien.

## Besondere Eigenschaften der Impfstoffe unabhängig von der Immunogen-Struktur (Seite 8)

### **DISTINGUISHING FEATURES OF VACCINES INDEPENDENT OF IMMUNOGEN STRUCTURE**

As outlined in the preceding sections, substantial differences appear to exist among current vaccines that can affect the conformation of S and its presentation to the immune system. Independent of such antigenic effects, the fundamentally different mechanisms of action and ways of production are likely to introduce additional variation to the characteristics of immune responses and possible adverse reactions. Adenovirus-vector and mRNA vaccines promote substantially different innate responses that will certainly influence the nature of adaptive immune responses<sup>43</sup>. There is evidence that the Oxford-AstraZeneca vaccine might induce higher levels of specific T cells, whereas mRNA vaccines might induce higher antibody titers<sup>115–117</sup>. The relevance of these differences for protection are not yet clear. Similarly, immune responses to protein-based vaccines are shaped by the adjuvant used, for example by shifting CD4 T cells towards either Th1 or Th2<sup>118,119</sup>. For meaningful conclusions, studies on these topics will require head-to-head comparisons of vaccines, and corresponding publications are expected to expand rapidly in the near future. Here, we briefly discuss existing data and describe distinguishing features that can contribute to differences among vaccine responses independent of the structure and presentation of the S immunogen.

## Besondere Eigenschaften der Impfstoffe unabhängig von der Immunogen-Struktur (Übersetzung)

Wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt scheint es erhebliche Unterschiede zwischen den Impfstoffen zu geben, was die Konformation des Spike-Proteins betrifft und wie dieses dem Immunsystem präsentiert wird. Unabhängig von den Antigenen Wirkungen verursachen die grundsätzlich unterschiedlichen Wirkmechanismen und Produktionswege eine breite Variation von Immunantworten und mögliche Nebenwirkungen. AdenoVirus-Vektor und mRNA-Vaccine rufen unterschiedliche Antworten des angeborenen Immunsystems hervor, die sicherlich auch die Natur des adaptiven Immunabwehr beeinflussen. Es gibt Hinweise, dass der Oxford-

AstraZeneca Impfstoff die Bildung von mehr spezifischen T-Zellen bewirkt, wogegen die mRNA-Impfstoffe höhere Antikörper-Titer hervorrufen. Die Bedeutung dieser Unterschiede für den Immunschutz ist noch nicht klar. In gleicher Weise werden die Immunantworten bei Protein-basierenden Impfstoffen durch das verwendete Adjuvans geformt, z.B. ob die CD4-T-Zellen entweder zu Th1 oder zu TH2 umgewandelt werden. Für aussagekräftige Schlüsse müssen vergleichende Studien zwischen den Impfstoffen gemacht werden und immer mehr entsprechende Publikationen werden für die nahe Zukunft erwartet. Hier besprechen wir kurz bereits vorhandene Daten und beschreiben besondere Eigenschaften, die zu Unterschieden in den Immunantworten auf die jeweiligen Impfstoffe beitragen können, unabhängig von der Struktur des Impfstoffes und unabhängig davon, wie das Spike-Protein-Immunoogen präsentiert wird.

## Verunreinigungen durch Reste der Zellkulturen

weiter in Heinz u. Stiasny auf Seite 8, rechte Spalte unten

### Contaminations from cell substrates

Contaminating cellular proteins can be present in all vaccines involving production in cell culture. This pertains to many well-used licensed vaccines such as those against influenza, measles and rabies<sup>120</sup>. The amount of impurities depends on the purification steps applied in the manufacturing process. Except for mRNA vaccines, different eukaryotic cell cultures are used in the production of current COVID-19 vaccines (see sections "Biosynthesis and key properties of the spike protein" and "Vaccine-specific differences of S-antigen structure and presentation" and Table 1). Constituents in the Oxford-AstraZeneca vaccine were recently analyzed in the context of a search for potential causes of *venous sinus thrombosis* as a rare post-vaccinal complication<sup>121</sup>. The study revealed that the vaccine contains vast numbers and amounts of cellular proteins from the human HEK293 production cell line, in addition to adenoviral proteins and the S protein, which is apparently also synthesized already during the manufacturing process. The total amount of protein per dose was found to be 35 to 40 µg, most of which can be assumed to be

cellular protein, because the protein of  $5 \times 10^{10}$  adenovirus particles per dose would account for only about 8 µg (for calculation see<sup>122</sup>). Although corresponding data do not yet exist in the public domain for the other adenoviral vector vaccines, the problem of cellular impurities may be similar, because they all depend on the lysis of production cells for releasing the engineered vector particles (section "Adenovirus-vector vaccines"). Details of purification procedures during manufacturing of the current adenovirus vector vaccines may differ but are not published.

Cell cultures are also used for production of the inactivated whole-virus vaccines (Vero cells) of Sinopharm<sup>88</sup>, Sinovac<sup>86</sup> and Bharat<sup>97</sup> as well as for the Novavax subunit vaccine (insect Sf9 cells)<sup>99,101</sup> (sections "Inactivated vaccines" and "Subunit vaccines" and Table 1). According to published literature, manufacturing of the Sinovac and Novavax vaccines involves extensive purification procedures<sup>86,101</sup>, suggesting that the antigenic contents of these products consists primarily of the proteins of the virus particle or the isolated spike trimer, respectively. Details of purification procedures of the Bharat vaccine and the degree of cellular contaminants in the Sinopharm vaccine (which is less purified than that of Sinovac according to ref. <sup>88</sup>) could not be found in the literature.



## Verunreinigungen durch Reste der Zellkulturen (Übersetzung)

weiter in Heinz u. Stiasny auf Seite 8, rechte Spalte unten

Verunreinigungen durch Zell-Proteine können in allen Impfstoffen vorhanden sein, die mittels Zellkulturen hergestellt werden. Dies trifft auf sehr viele zugelassene Impfstoffe zu, wie etwa Impfstoffe gegen Grippe, Masern oder Tollwut. Die Restmenge an Verunreinigungen hängt von den Reinigungsschritten ab, die im Herstellungsprozess zur Anwendung kommen. Mit Ausnahme der mRNA-Impfstoffe werden bei der Herstellung der derzeit verwendeten COVID-19 Impfstoffe verschiedene eukaryotische Zellkulturen verwendet. (siehe Abschnitte: „Biosynthese und Schlüssel-Eigenschaften des Spike Proteins“ und „Impfstoff-spezifische Unterschiede der Spike-Protein Antigen Struktur und Präsentation“ und Tabelle 1). Die Zusammensetzung des Oxford AstraZeneca Impfstoffes wurde jüngst analysiert im Zusammenhang mit der Ursachenforschung für eine Sinusvenenthrombose als mögliche Komplikation nach einer Impfung. Diese Studie hat gezeigt, dass der Impfstoff zusätzlich zu den Adeno-Virus Proteinen und dem Spike-Protein eine große Anzahl von Zell-Proteinen der produzierenden humanen HEK293 Zelllinie enthält, die schon während dem Herstellungsprozess gebildet werden. Als Gesamtmenge an Protein per Dosis wurde 35 bis 40 µg Protein gefunden, wovon der Großteil Zell-Protein ist, da die Menge von  $5 \times 10^{10}$  Adeno-Virus Partikel per Dosis nur etwa 8 µg Protein ergeben würde (siehe Rechnung in Literatur 122). Obwohl entsprechende Daten für die anderen Adeno-Virus-Vektor-Impfstoffe bisher noch nicht existieren in der veröffentlichten Literatur, ist das Problem der Verunreinigungen wohl ähnlich, weil alle zum Zweck der Freisetzung der rekombinanten Vektor-Partikel auf der Lyse von produzierenden Zellen beruhen. (siehe Abschnitt Adeno-Virus-Vektor-Impfstoffe). Details zu den Reinigungs-Prozessen bei der Herstellung der gängigen Adeno-Virus-Vektor Impfstoffe könnten sich unterscheiden, sind aber nicht publiziert.

Zellkulturen werden auch verwendet bei der Herstellung inaktivierter Ganz-Virus-Impfstoffe (mit Vero-Zellen) von Sinopharm, Sinovac und Bharat - als auch für die Herstellung des Novavax Untereinheit Impfstoffes (SF9 Insekten-Zellen von *Spodoptera frugiperda* - siehe Abschnitte: „Inaktivierte Ganz-Virus Impfstoffe“ und „Protein-Untereinheit Impfstoffe“ und Tabelle1). Entsprechend der publizierten Literatur braucht die Herstellung von Sinovac- und Novavax-

Impfstoffen umfangreiche Reinigungsschritte, was nahe legt, dass die antigenen Inhaltsstoffe dieser Impfstoffe hauptsächlich aus den Proteinen der Virus-Partikel bzw. dem isolierten Spike-Protein-Trimer besteht. Details zu den Reinigungsschritten des Bharat-Impfstoffes und dem Grad der Zell-Verunreinigungen im Sinopharm-Impfstoff (der im Vergleich zum Sinovac-Impfstoff weniger gut gereinigt ist gemäß Literatur 88) konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

## Reaktionen, die sich nicht auf das Immunogen direkt beziehen (Seite 9)

### **Reactions due to vaccine constituents other than the immunogen**

Vaccination of millions or even billions of people within a short time window allows identification of rare adverse reactions that would otherwise be difficult to be linked causally to vaccination. Currently, a slightly but significantly increased risk of thrombotic events (including cerebral venous sinus thrombosis) was reported after vaccination with Oxford-AstraZeneca and Janssen adenovirus vector vaccines and has raised considerable concern<sup>74,75</sup>. Collectively, this kind of adverse event is designated 'vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia' (VITT). Sophisticated analyses of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine to elucidate underlying pathogenic mechanisms suggest that constituents such as viral DNA and/or cellular proteins can favor the formation of antibodies against platelet factor 4 (PF4), thus promoting VITT<sup>74,121</sup>. Information on cellular impurities are so far restricted to ChAdOx1 and comparative analyses of all adenovector vaccines are not yet available.

After vaccination with mRNA vaccines, rare events of anaphylactic shock above the average incidence in the population have been reported, largely in individuals with a history of allergy<sup>123,124</sup>. Most of the allergens are proteins, which are not contained in these chemically defined vaccines (section "mRNA vaccines"). One of the constituents discussed as being causally linked to anaphylaxis is polyethylene glycol (PEG), which is used in the formulation of LNPs that protect the RNA and facilitate its transfer into cells (section "mRNA vaccines"). It has been speculated that pre-existing PEG antibodies might be involved in these allergic events<sup>124</sup>. Corresponding scientific investigations into the mechanisms of vaccine-induced anaphylactic reactions are ongoing<sup>125</sup>.

## Reaktionen auf den Impfstoff, die sich nicht auf das Immunogen direkt beziehen (Übersetzung)

Die Impfung von Millionen, ja Milliarden Menschen innerhalb eines kurzen Zeitfensters erlaubt die Identifikation von seltenen Nebenwirkungen, die sonst nur schwer kausal mit der Impfung in Verbindung gebracht werden könnten. Jüngst wurde über ein leichtes aber doch signifikant gestiegenes Risiko von Thrombose-Ereignissen (inklusive der Gehirn Sinusvenenthrombose) berichtet nach Impfungen mit Oxford-AstraZeneca und Janssen AdenoVirus-Vektor-Impfstoffen und die Besorgnis darüber ist gestiegen. Zusammengefasst werden diese Nebenwirkungen als „**Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT)**“ bezeichnet. Genauere Analyse des ChAdOx1 nCoV-19 Impfstoffes zur Aufklärung des zu Grunde liegenden pathogenen Mechanismus legen nahe, dass Bestandteile wie die Virus-DNA und/oder zelluläre Proteine die Bildung von Antikörpern gegen den Platelet Factor (PF4) begünstigen können und so VITT hervorrufen können. Informationen über Zell-Verunreinigungen sind bisher beschränkt auf ChAdOx1 und vergleichende Analysen über alle AdenoVirus-Vektor-Impfstoffe sind noch nicht verfügbar.

Nach Impfung mit mRNA Impfstoffen wurde über seltene Ereignisse von Anaphylaktischem Schock über der durchschnittlichen Inzidenz berichtet, vor allem bei Personen mit einer Allergie-Krankengeschichte. Die meisten Allergene sind Proteine, die nicht in der chemischen Formulierung dieser Impfstoffe enthalten sind. (Abschnitt „mRNA Impfstoffe“). Einer dieser Inhaltsstoffe, der ursächlich in Zusammenhang mit dem Anaphylaktischen Schock gebracht wurde, ist das Polyethylen-Glycol (PEG), der verwendet wird in den LNPs (LipidNanoParticles), um die RNA zu schützen und den Transfer in die Zellen zu erleichtern. (siehe Abschnitt „mRNA Impfstoffe“). Es wurde vermutet, dass bereits vorhandene Antikörper gegen PEG bei diesen allergischen Ereignissen eine Rolle spielen könnten. Entsprechende wissenschaftliche Untersuchungen über den Mechanismus durch Impfstoff ausgelösten Anaphylaktischen Schock sind im Gange.

## Immunität gegen den Vektor (Seite 9)

### Vector immunity

Effects of pre-existing and vaccination-induced immunity against the vector are a special feature of adenovirus vector vaccines. High rates of seropositivity against adenovirus 5 (the pioneer of adenovirus vector development) have been reported in the population<sup>126,127</sup>, and a number of studies have shown that pre-existing vector immunity can impair the response to the vaccine antigen<sup>128–130</sup>. Adenovirus 5 is used in the CanSino vaccine and the second dose of Gamaleya vaccines (section “Adenovirus-vector vaccines” and Table 1). For reducing potential negative effects of pre-existing immunity, alternative adenoviruses were developed as vectors, one of them adenovirus 26, which has lower rates of seropositivity in the population<sup>127</sup> and is now used in the

Janssen-Johnson&Johnson vaccine<sup>19,62</sup> as well as in the first shot of the Gamaleya-Institute vaccine<sup>67,68</sup>. These considerations of vector immunity also prompted the development of non-human adenovirus vectors such as ChAdOx1 derived from chimpanzee adenovirus Y25<sup>64</sup>, now used in the Oxford-AstraZeneca vaccine<sup>77</sup>. In this case, seropositivity is negligible in Europe (zero in the UK,<sup>64</sup>) and low in Africa (9% in Gambian adults,<sup>64,131</sup>).

Irrespective of pre-existing immunity, all adenovirus vector vaccines are prone to induce immune responses against the vector particles<sup>129</sup>. Each dose contains  $5 \times 10^{10}$  or  $10 \times 10^{10}$  adenoviral particles (Table 1), which corresponds to 8 or 16  $\mu\text{g}$  of adenoviral protein (for calculation see ref. <sup>122</sup>). It is unclear, at present, which influences anti-vector responses will have on necessary COVID-19 booster vaccinations in the future. Possible remedies are prime-boost regimens as already used for vaccination with the Gamaleya-Institute vaccine (Ad26 followed by Ad5) or combinations with other classes of vaccines such as mRNA vaccines. Corresponding studies are in progress (Com-Cov study: Oxford-AstraZeneca and BionTech-Pfizer, launched in February<sup>132</sup>).

## Immunität gegen den Vektor

Effekte von schon bestehender und Impf-induzierter Immunität gegen den Vektor selbst sind eine spezielle Eigenschaft von AdenoVirus-Vektor-Impfstoffen. Über hohe Prozentsätze von gegen AdenoVirus 5 positive Seren (der Pionier bei den AdenoVirus-Vektor Entwicklung) in der Bevölkerung wurde berichtet, und eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass schon bestehende Immunität gegen den Vektor die Immunantwort gegen das Impfstoff-Antigen beeinträchtigen kann. AdenoVirus 5 wird im CanSino Impfstoff und in der zweiten Dosis des Gamaleya Impfstoffes verwendet (siehe Abschnitt „AdenoVirus-Vektor Impfstoffe“) und Tabelle 1. Um potentielle negative Effekte von schon bestehender Immunität zu mindern, wurden alternative AdenoViren als Vektoren entwickelt, einer von ihnen ist der AdenoVirus 26, der kleinere Prozentsätze positiver Seren in der Bevölkerung aufweist und der nun im Janssen-Johnson&Johnson-Impfstoff verwendet wird, als auch in der ersten Dosis des Gamaleya-Institut-Impfstoffes. Diese Bedenken wegen der Vektor-Immunität waren auch Anlass für die Entwicklung von nicht humanen AdenoVirus-Vektoren wie etwa ChAdOx1 vom Schimpansen-AdenoVirus Y25, der nun im Oxford-AstraZeneca Impfstoff verwendet wird. In diesem Fall sind die positiven Seren zu vernachlässigen (null im Vereinigten Königreich UK) und niedrig in Afrika (9% bei Erwachsenen im Gambia).

Unabhängig von schon bestehender Immunität, neigen alle AdenoVirus-Vektor Impfstoffe dazu, Immunantworten gegen Vektor-Partikel hervorzurufen. Jede Dosis enthält  $5 \times 10^{10}$  oder  $10 \times 10^{10}$  Adeno-Virus Partikel (Tabelle 1), was 8 bzw. 16  $\mu\text{g}$  von AdenoVirus-Protein entspricht (siehe Rechnung bei Literatur 122). Es ist gegenwärtig unklar, welchen Einfluss Anti-Vektor Immunantworten auf notwendige COVID-19 Booster-Impfungen in Zukunft haben werden. Mögliche Abhilfe sind erste Boost-Impfungen wie sie bei der Impfung mit dem Gamaleya-Institut Impfstoff (Ad26 gefolgt von Ad5) oder Kombinationen mit anderen Klassen von Impfstoffen wie mRNA Impfstoffen angewendet wurden. Entsprechende Studien sind in Arbeit (Com-Cov Studie: Oxford-AstraZeneca und BionTech-Pfizer, erschienen im Februar 2021)

## Impfstoff-spezifische Unterschiede der angeborenen Immunantwort (Seite 9)

### **Vaccine-specific differences of innate responses**

Specific features of adaptive immune responses are strongly influenced and shaped by innate responses that are triggered by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and their sensing by pattern recognition receptors (PRRs) (reviewed in ref. <sup>133</sup>). Current COVID-19 vaccines are very different with respect to their compositions and modes of action, and therefore vaccine-induced innate responses will vary considerably. Adenoviral vectors contain PAMPs that can be sensed by TLRs at the plasma membrane (TLR2 and TLR4) and the endosomally located TLR9 (reviewed in ref. <sup>41</sup>). In addition, the viral DNA itself can be sensed after endosomal rupture by cytosolic DNA sensors such as cGAS and the inflammasome, resulting in downstream signaling cascades for producing antiviral factors such as type I interferons<sup>41</sup>.

Innate responses to RNA that enters cells from the outside (such as in RNA virus infections or mRNA vaccination) differ from those stimulated by adenoviruses, because RNA is sensed by other PRRs, including TLR3, TLR7 and TLR8, all located in endosomes<sup>134,135</sup>. Sensors in the cytoplasm, such as retinoic-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated antigen 5 (MDA-5) recognize preferentially dsRNA, also leading to stimulation of type I IFN secretion<sup>134,135</sup>. Excessive innate responses can not only result in strong reactogenicity of vaccination but also restrict antigen translation from the vaccine RNA, thus impairing adaptive immune responses. In the BionTech-Pfizer and Moderna vaccines this problem was taken into account by modifications of the RNA sequence and the inclusion of m1 $\Psi$  (section "mRNA vaccines"), which is not contained in CureVac's mRNA vaccine<sup>56</sup>. In addition to direct triggers of innate immunity by RNA, other constituents of LNPs can contribute to vaccine-induced inflammatory reactions and provide adjuvant activity for adaptive immune responses. Such effects have been specifically shown for the ionizable lipid component in LNPs<sup>124</sup>. Head-to-head comparisons of mRNA vaccines will be informative to identify and evaluate differences of innate and adaptive responses as well as reactogenicity between representatives of this class of COVID-19 vaccines.

## Impfstoff-spezifische Unterschiede der angeborenen Immunantwort (Übersetzung)

Die spezifischen Eigenschaften der erworbenen Immun-Antwort sind stark beeinflusst und geformt durch das angeborene Immunsystem, ausgelöst durch sogenannte **Pathogen Assoziierte Molekulare Muster** (pathogen-associated molecular patterns = **PAMPs**) und ihre Erkennung durch **Muster Erkennungs Rezeptoren** (pattern recognition receptors = **PRRs**) – zusammengefasst in Literatur 133. Die gegenwärtigen COVID-19 Impfstoffe sind sehr unterschiedlich in ihrer Zusammensetzung und in ihrer Wirkungsweise und deshalb variieren die ausgelösten Antworten des angeborenen Immunsystems stark. AdenoVirus-Vektoren enthalten PAMPs, die durch **Toll-like Rezeptoren** (TLRs) an der Plasmamembran (TLR2 und TLR4) und endosomal durch TLR9 erkannt werden (Literatur 41). Weiters kann die Virus-DNA selbst erkannt werden nach endosomaler Auflösung durch DNA-Sensoren im Cytosol, wie etwa durch das cGAS und das Inflammasom, was zu einer Signal-Kaskade für die Bildung antiviraler Faktoren des Typ 1 Interferons führt.

### Anmerkungen:

**cGAS** = cyclic GMP-AMP Synthase = cyclic Guanosine monophosphate–Adenosine monophosphate Synthase ist ein DNA-Sensor im Cytosol, der die Typ 1 Interferon-Antwort auslöst.

**Inflammasom** = Als Inflammasom wird ein eukaryotischer Proteinkomplex bezeichnet, der sich innerhalb des Zytoplasmas nach inflammatorischen Signalen bildet. Er ist Teil der angeborenen Immunreaktion und führt zur Aktivierung von entzündungsspezifischen Interleukinen.

siehe Wikipedia cyclic GMP-AMP Synthase und Inflammasom

Angeborene Immunantworten auf RNA, die von außen in die Zelle kommen (wie in einer RNA Virus-Infektion oder durch mRNA Impfung) unterscheiden sich von denen, die durch ein AdenoVirus ausgelöst werden, weil RNA durch andere PRRs erkannt werden, darunter TLR3, TLR7 und TLR8, die alle in Endosomen lokalisiert sind. Sensoren im Cytoplasma, wie etwa das **Retinoic-Inducible Gene I (RIG-I)** und **Melanoma Differentiation-associated antigen 5 (MDA-5)** erkennen vor allem doppelsträngige **RNA (dsRNA)**, was ebenfalls zur Ausschüttung von **Typ I Interferon** führt.

**Anmerkungen:**

**RIG-I** (retinoic acid inducible gene I) ist ein zu den Helikasen gehörender intrazellulärer Rezeptor des angeborenen Immunsystems von Säugetieren, der bei der Erkennung von mehreren RNA-Viren (unter anderem Hepatitis C, Influenza) eine zentrale Rolle spielt. Der natürliche Ligand von RIG-I wurde erst 2006 identifiziert.

**MDA5** (englisch melanoma differentiation-associated protein 5, Melanom-Differenzierungsantigen 5') ist ein Resistenzfaktor in Säugetieren gegen RNA-Viren mit doppelsträngigem Genom aus der Familie der RIG-I-like Receptors (RLR). **Typ-I-Interferone** (IFNs) sind wichtige Botenstoffe des Immunsystems und spielen bei viralen Infektionen eine entscheidende Rolle: Bei einer Infektion wird eine erste kleine Welle von frühen Typ-I-IFNs, insbesondere  $-\alpha$ , gebildet, die an den Typ-I-IFN-Rezeptor (IFNAR) auf Zellen binden

siehe Wikipedia RIG I und MDA5

Starke angeborene Immunantworten können nicht nur starke Reaktionen auf die Impfung zur Folge haben, sondern schwächen auch die Antigen-Bildung bei der Translation aus der Impfstoff RNA, wodurch das adaptive Immunsystem geschwächt wird. In den Impfstoffen von BionTech-Pfizer und Moderna wurde mit diesem Problem gerechnet durch gentechnische Veränderung der RNA-Sequenzen und durch Einführung eines methylierten Uridin-Derivates (N1-methylpseudouridine = m1 $\Psi$ ,  $\Psi$  Zeichen für den griechischen Buchstaben Psi). (siehe Abschnitt „mRNA Impfstoffe“). Dieses methylierte Uridin-Derivat ist im CureVac mRNA Impfstoff nicht enthalten. Zusätzlich zur direkten Auslösung angeborener Immunantworten durch die RNA selbst, können auch andere Bestandteile der **LipidNanoPartikel (LNPs)** mitwirken an der Entstehung von entzündlichen Reaktionen, ausgelöst durch den Impfstoff. Die Bestandteile können auch als aktive Adjuvantien für eine adaptive Immunantwort dienen. Solche Wirkungen haben sich vor allem gezeigt bei ionisierbaren Lipid-Komponenten der LipidNanoPartikel. Ein Vergleich von mRNA Impfstoffen wird Informationen liefern zur Identifizierung und Einschätzung der Unterschiede zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort und über die Reaktionen, die bei den Vertretern dieser Gruppe von COVID-19 Impfstoffen auftreten können.



Due to their capacity to stimulate innate responses, the genetic vaccines are referred to as being 'self-adjuvanted'<sup>55,136</sup>. Protein-based vaccines such as inactivated whole-virus vaccines or subunit vaccines are usually not sufficiently immunogenic on their own and require the addition of adjuvants. Alum is the most frequently used adjuvant in human vaccines and is used in the Sinopharm and Sinovac vaccines<sup>137,138</sup>. This adjuvant results in polarization towards a Th2 response, which has been regarded as unfavorable in the case of coronavirus and other viral infections and vaccinations<sup>118,139,140</sup>. Therefore, other adjuvants or combinations thereof with Alum have been developed for use in COVID-19 vaccines<sup>138</sup>. The inactivated whole virus vaccine produced by Bharat (Covaxin, Table 1) is adjuvanted with an imidazoquinoline class molecule (IMDG, a TLR 7/8 agonist) adsorbed on aluminum hydroxide gel (Algel-IMDG) that shifts the response towards Th1<sup>97,141,142</sup>. Another BPL-inactivated whole-virus vaccine in development (by the European company Valneva) makes use of Alum in combination with CpG to induce preferentially a desired Th1 response<sup>138</sup>, and a similar effect has been attributed to the Matrix-MTM adjuvant used in the Novavax subunit vaccine<sup>99,101,102</sup>.

Wegen ihrer Fähigkeit die angeborene Immunantwort zu stimulieren, werden die genetischen Impfstoffe als „Eigen-Adjuvantien“ („self-adjuvanted“) bezeichnet. Impfstoffe auf Protein-Basis, wie inaktivierte Ganz-Virus Impfstoffe oder Protein-Untereinheit-Impfstoffe sind gewöhnlich allein nicht ausreichend immunogen und brauchen zusätzlich ein Adjuvans. **Alum** (Anmerkung: dt. Alaun = Kalium-Aluminium-Sulfat) ist das häufigste Adjuvans bei Impfstoffen für den Menschen und wird in den Impfstoffen von Sinopharm und Sinovac verwendet. Dieses Adjuvans resultiert in einer Polarisierung hin zu **T-Helferzelle 2 (Th2)**, was als ungünstig angesehen wird im Fall einer Coronavirus Infektion oder anderer viraler Infektionen und den Impfungen dagegen. Deshalb wurden andere Adjuvantien und Kombinationen dieser mit Alum entwickelt für die Verwendung in COVID-19 Impfstoffen. Der inaktivierte Ganz-Virus-Impfstoff hergestellt von Bharat (Covaxin, siehe Tabelle 1) wird mit einem Molekül der Substanzklasse Imidazochinolin verstärkt (IMDG, ein Toll Like Receptor 7/8 Antagonist), absorbiert auf Aluminium-Hydroxid-Gel (Algel-IMDG), was die Immunantwort hin zur **T-Helferzelle 1 (TH1)** verschiebt. Ein anderer BPL-inaktivierter Ganz-Virus Impfstoff, derzeit in Entwicklung (durch die Europäische Firma Valneva) verwendet Alum in Verbindung mit CpG um eine vorzugsweise gewünschte **T-Helferzellen 1 (TH1)** Antwort zu induzieren, und ein ähnlicher Effekt wird dem Matrix-MTM Adjuvans zugeschrieben der im Protein-Untereinheit-Impfstoff Novavax verwendet wird.

## Schlussfolgerungen (Seite 10)

### CONCLUSIONS

The severe consequences of the COVID-19 pandemic have created a pressing need for vaccines that not only prevent serious disease but preferentially also transmission. Several of the 291 candidates listed in the COVID-19 vaccine pipeline by WHO (184 pre-clinical and 107 in clinical development) (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, accessed on July 9, 2021), have already reached the market and are used for mass immunization. They all proved to exceed initial hopes and maximal expectations of 50 % protection<sup>143,144</sup>, displaying efficacies in preventing clinical disease of more than 90% in certain instances. Although all current vaccines for which phase 3 efficacy data are available rely on the whole viral spike protein as an antigen, its presentation to the immune system is strikingly different not only between genetic vaccines and protein-based vaccines, but also between vaccines within these categories. In addition, approaches to cope with the problem of the lability of the viral S protein cause variation across all current vaccines. These also differ with respect to their degree of purity (presence of extraneous proteins from the production process) and other vaccine constituents that can affect immune responses and cause adverse events. We have reviewed the most apparent and significant differences among the vaccines as far as they can be recognized from published literature, which unfortunately is still incomplete. Hopefully, more details will become available in the near future. Comparative analyses of antibody and T cell responses and their fine specificities will allow indirect but important conclusions to be drawn. Studies are emerging that address antibody formation to the different domains of S and analyze the ratio of neutralizing and non-neutralizing antibodies as an important parameter of vaccine performance<sup>145,146</sup>. These data can serve as an indirect measure for the structural integrity of S in the vaccines and the quality of B cell immune responses. Head-to-head comparisons of vaccinated cohorts will be especially insightful, considering the profound differences of antigen presentation and principles of action of current COVID-19 vaccines.

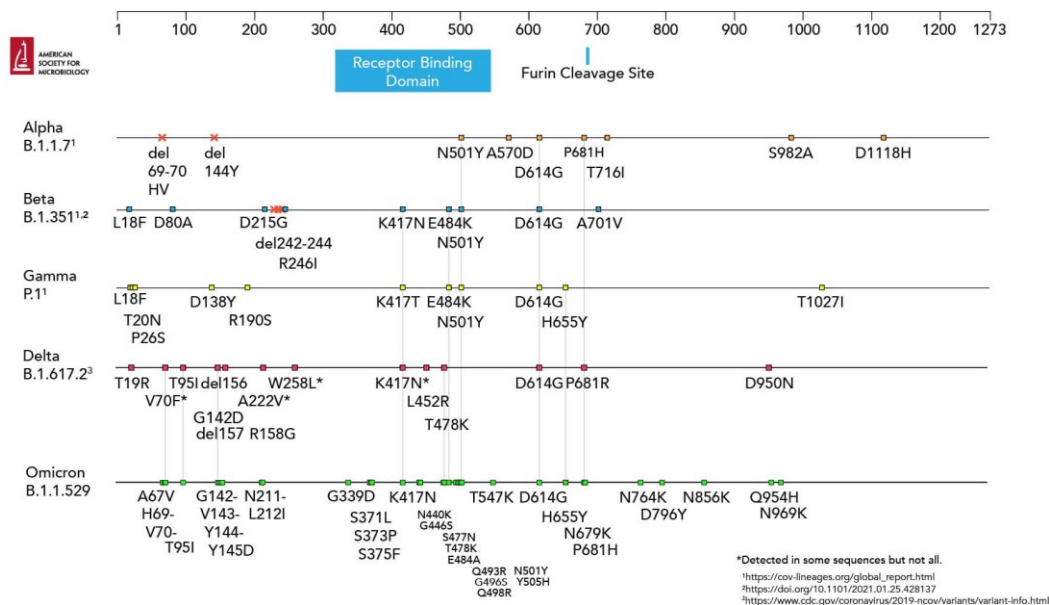
## Schlussfolgerungen (Übersetzung)

Die harten Konsequenzen der COVID-19 Pandemie haben eine dringende Nachfrage nach Impfstoffen geschaffen, die nicht nur schwere Krankheit sondern auch die Ausbreitung verhindern können. Mehrere der 291 Kandidatinnen, die in der COVID-19 Impfstoff Pipeline der WHO gelistet sind, haben schon den Markt erreicht und werden für Massenimmunisierungen verwendet (184 präklinische und 107 in der klinischen Entwicklung, Zugriff erfolgt am 9. Juli 2021: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> ) Sie haben alle anfängliche Hoffnungen und maximale Erwartungen eines 50%-igen Schutzes übertroffen, indem sie in manchen Fällen Wirksamkeiten von über 90% zur Vermeidung klinischer Erkrankungen erreicht haben. Obwohl alle gängigen Impfstoffe, für die Phase 3 Wirksamkeitsdaten verfügbar sind auf dem gesamten viralen Spike-Protein als Antigen beruhen, ist die Präsentation gegenüber dem Immunsystem auffallend verschieden, nicht nur zwischen genetischen Impfstoffen und Protein-basierenden Impfstoffen, sondern auch zwischen Impfstoffen innerhalb dieser Gruppen. Zusätzlich verursacht die Frage, wie man mit dem Problem der Labilität des viralen Spike-Proteins umgehen soll, vielfache Ansätze über alle derzeitigen Impfstoffe hinweg. Diese unterscheiden sich auch was die Reinheit betrifft (Reste von Zell-Proteinen aus dem Herstellungsprozess) und anderen Bestandteilen des Impfstoffes, die eine Immunantwort auslösen und Nebenwirkungen verursachen können. Wir haben die wichtigsten offenkundigen und bedeutenden Unterschiede zwischen den Impfstoffen zusammengefasst, soweit dies aus publizierter Literatur entnehmbar ist, die aber leider noch unvollständig ist. Hoffentlich werden in naher Zukunft mehr Details verfügbar sein. Vergleichende Analysen von Antikörpern und T-Zell Immunantworten und ihre Besonderheiten werden indirekt wichtige Schlussfolgerungen zulassen. Studien sind in Vorbereitung, die die Antikörperbildung gegen verschiedene Domänen des Spike-Proteins zum Gegenstand haben und die das Verhältnis von neutralisierenden und nicht neutralisierenden Antikörpern als wichtigen Parameter des Erfolges eines Impfstoffs analysieren. Diese Daten sind ein indirektes Maß für die Struktur-Integrität des Spike-Proteins in den Impfstoffen und die Qualität der Immunantwort der B-Zellen. Vergleichende Studien von geimpften Kohorten werden besonderen Einblick geben, wenn man die großen Unterschiede der Antigenpräsentation und die verschiedenen Wirkungsprinzipien der gegenwärtigen COVID-19 Impfstoffe bedenkt.

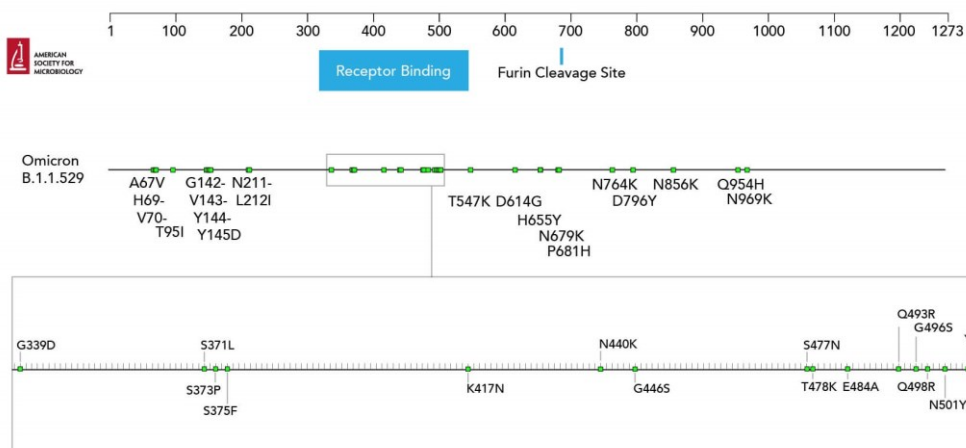
## Anmerkungen zu Omikron

Mutationen der Omikron-Variante aus dem Artikel: von Ashley Hagan:  
How Ominous is the Omicron Variant B-1-1-529 vom 16. Dez. 2021

<https://asm.org/Articles/2021/December/How-Ominous-is-the-Omicron-Variant-B-1-1-529>



Aminosäuren Änderungen im Spike-Protein (S) in SARS-CoV-2 in  
Variants Of Concern (VOCs). -Quelle: American Society for Microbiology



Aminosäuren Änderungen im Spike-Protein (S) in der Omikron Variante, herausgezoomt ist  
die Region zwischen G339D (in Position 339 Glycin gegen Asparaginsäure getauscht und  
Y505H (in Position 505 Tyrosin gegen Histidin getauscht)  
Quelle: American Society for Microbiology

## Literatur

Die Original-Arbeit von Heinz u. Stiasny (2021) mit Stand der Einreichung des Artikels am 1. Juni 2021 enthält ausführliche Literatur mit 146 Zitaten:

**Franz X. Heinz u. Karin Stiasny (2021): Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and mode of action.**

IN: Nature npj

<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

npj Vaccines (2021)6:104; <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>

Weiters wurden einige ältere Lehrbücher herangezogen, um Grundlagen zu erläutern, u.a.:

Taschenbuch der Genetik von Eberhard Passarge, Thieme Verlag 1994

Taschenlehrbuch: Medizinische Mikrobiologie von Kayser, Böttger, Zinkernagel, Haller, Eckert und Deplazes 12. Aufl. 2010 mit den Kapiteln:

3 Grundlagen der Immunologie von Rolf M. Zinkernagel Seiten 75 ff

8 Allgemeine Virologie von O. Haller, Seiten 390 ff

9 Viren als Krankheitserreger von O. Haller, Seiten 449 ff

## Nachtrag: meine Stellungnahme

Dipl. Ing. Helmut REINER  
Lebensmittel- und Biotechnologe  
Grünentorgasse 19/12  
1090 Wien  
[helmut.reiner@teleweb.at](mailto:helmut.reiner@teleweb.at)

30.12.2021

### **Stellungnahme zum Entwurf des COVID-19-IG: Ablehnung oder Abänderung des § 3 Ausnahmen**

Ich halte die Existenz eines solchen Gesetzes aus wesentlichen Gründen für falsch und für die Zukunft unseres Landes schädlich. Die Unsicherheit der derzeitigen Ausgangslage und die vollkommene Unmöglichkeit auch nur im Geringsten wenige Monate in die Zukunft zu schauen berechtigen nicht, ein Gesetz zu beschließen, dessen Auswirkungen bis 2024 völlig im Dunkeln liegen und katastrophale Folgen für Österreich haben werden. Die Existenz einer Impfpflicht und das steigende Chaos bei den G-Regeln wird einen Teil unserer Bevölkerung zur Verzweiflung bringen und deshalb darf es dieses Gesetz nicht geben.

**Falls das Gesetz jedoch beschlossen wird, müssen jedenfalls im Paragraph § 3 weitere Ausnahmen, mindestens aber eine Ausnahme für persönliche Gründe und Gewissens-Entscheidungen eingeführt werden in Analogie zur Regelung des Zivildienstes bei der Allgemeinen Wehrpflicht.**

**Ausnahme 4: Personen, die aus Überzeugung eine Impfung ablehnen und ihre Gründe dafür mit einem Arzt oder einem Psychologen besprechen und der zuständigen Behörde dies in einem Schreiben mitteilen, müssen von der Impfpflicht ausgenommen werden.** Zum Monitoring des epidemiologischen Geschehens können diese Personen in Abhängigkeit von der epidemiologischen Lage (Ampel), einen PCR-Test oder einen bis dahin für neue Varianten aussagekräftigen Test beibringen. Auf diese Weise leisten diese Personen in Analogie zum Zivildienst als Ausnahme zur Allgemeinen Wehrpflicht einen

wichtigen Beitrag zur Bekämpfung der Pandemie. Der Test wird aber nicht für Eintrittsberechtigungen „missbraucht“, wie das derzeit praktiziert wird.

Der vorliegende Entwurf ist in seiner Härte aus mehreren Gründen überschießend, **dafür einige Gründe:**

1. Zwei der im Gesetz **genannten Impfstoffe** (Vaccine Astra Zeneca, Vaccine Janssen) **sind nicht mehr in Verwendung oder werden bald nicht mehr in Verwendung sein.** Obwohl sie noch als wirksam und sicher bezeichnet werden, werden sie zurückgezogen, was einen großen Vertrauensverlust bewirkt. Die mRNA Impfstoffe stammen in ihrer Entstehung aus dem Bereich der onkologischen Forschung und eine Skepsis gegenüber diesen Impfstoffen kann wohl begründet sein. Laufende Mutationen werden die Ausgangssituation immer weiter verändern und man muss den Herstellern alles glauben, weil den heimischen Behörden die Infrastruktur fehlt und vor allem auch keine Zeit mehr bleibt für eine objektive Prüfung der Wirksamkeit und Sicherheit. Die Arbeit der österreichischen Virologen Franz X. Heinz und Karin Stiasny (2021) zeigt die „knowns and unknowns“ dieses Gebietes auf, das so in Umwälzung ist. Die Art und Weise wie in diesem Gesetz Impfstoffe neu vorgeschrieben werden, gibt ihnen von vorne herein einen negativen Beigeschmack. Ziel müsste es doch sein, die neuen Protein- und Totimpfstoffe positiv zu kommunizieren und nicht durch Verlautbarung in einem Impfpflichtgesetz der Öffentlichkeit vorzustellen.
2. Es werden in einer **Detailliertheit Impfserien vorgeschlagen, die auf keiner wissenschaftlichen Grundlage beruhen können.** Anfang 2021 wurden die Impfungen erst eingeführt, im März und April 2021 waren erste große Impfkampagnen und im Herbst mussten bereits Auffrischungen von 9 auf 6 auf 4 Monate herabgesetzt werden. Es werden Stichtage genannt, die alle in wenigen Monaten nicht mehr gültig sein werden und nicht für alle Impfstoffe gleichermaßen gültig sein können. Aus vielen Ländern der Erde kommen laufend Meldungen, dass sich die Wirksamkeiten geändert haben. Neue Varianten eines ständig mutierenden Einzelstrang-RNA-Virus können nicht der Grund für ständige Gesetzesänderungen sein. Man müsste ständig neue Verordnungen erlassen, um hier auf dem Laufenden zu bleiben. Selbst Juristen werden sich nicht mehr auskennen und die Bevölkerung wird durch eine solche unausgegorene Verordnungsflut ihr Vertrauen in die

Gesetzgebung des Landes vollkommen verlieren.

3. Ein vernichtender Punkt in diesem Gesetz ist **die Rolle, die hier den Ärztinnen und Ärzten Österreichs zugeschrieben wird**. Sie haben nicht mehr die Freiheit, für Menschen eine Ausnahme von der Impfflicht zu attestieren, sondern müssen sich in ihrer fachlichen Entscheidung einschränken lassen. In Paragraph § 7 Abs. 5 wird einem Arzt, der eine Bestätigung ausstellt, die nicht dem „Stand der medizinischen Wissenschaft“ entspricht eine Verwaltungsübertretung und horrendes Strafe verordnet. Wer soll bestimmen was der Stand der medizinischen Wissenschaft ist? Dieser ändert sich derzeit fast täglich! Weder die Ärztekammer noch die Politik kann den Stand der medizinischen Wissenschaft festlegen, ganz speziell nicht bei einem Thema, das so stark in Public Health und Allgemeinmedizin hineinreicht. Dieses Gesetz untergräbt und schädigt Ansehen und Autorität aller ärztlichen Berufe und untergräbt das Vertrauen in die Medizin überhaupt!
4. Die Politik beteuert stets, **keine Spaltung der Gesellschaft in der Frage der Impfung zu wollen**. Dieser Gesetzesentwurf aber ist ein extremer Schritt in diese Richtung. Schon durch die G-Regeln und die laufende Diskriminierung ungeimpfter Personen ohne nachvollziehbare Gründe beginnt zunehmend eine gewollte Ausgrenzung und Einschüchterung von Personen. Die Ausgrenzungen nehmen für heutige Vorstellungen ganz extreme Formen an und historische Vergleiche drängen sich unweigerlich auf. Die Betroffenen werden zunehmend verzweifelt und stehen vor dem Dilemma, entweder ihrem Gefühl und Willen zu folgen, oder sich dieser Pflicht gegen ihr besseres Wissen zu beugen. Denn Entscheidungen über Handlungen und Unterlassungen im Gesundheitsbereich fallen überwiegend auf Grund von Erfahrungen, Gefühl und Ratschlägen. Das Vertrauen zu den Ärztinnen und Ärzten wäre dafür eine ganz wichtige Basis. Aber gerade dieses wird durch den Gesetzesentwurf vollkommen untergraben!
5. Da der Ausgangspunkt für dieses Gesetz letztlich die **Mortalität und die Überlastung der Intensivstationen** ist und nicht die Spitalsaufenthalte und Inzidenzen (mit teils leichten Verläufen) kann für ein solches Gesetz auch nicht eine Gültigkeit (bis 2024) vorher festgelegt werden. Es könnte sich sehr bald herausstellen, dass milde Verläufe der Krankheit



vergleichbar mit einer Erkältungskrankheit überwiegen. Dadurch hätte in naher Zukunft das Gesetz keinerlei Berechtigung mehr. Inzwischen ist es auch klar geworden, dass eine vollkommene Eradikation des Virus nicht mehr möglich ist und auch in unseren Nachbarländern keine gänzliche Durchimpfung der Bevölkerung erreicht werden kann. Global gesehen sind hohe Durchimpfungsraten der Weltbevölkerung mit mehreren Serien für immer neue Varianten ohnehin vollkommen undenkbar und würden zu weltweitem Chaos führen. Es steht Österreich nicht gut an, in dieser Front der Engstirnigkeit ganz vorne mitzumachen und als eines der ersten Länder der Welt eine rigorose Impfpflicht für alle Teile der Bevölkerung und fast alle Altersgruppen einzuführen.

**FACIT:**

**In Analogie zur Regelung des Zivildienstes als Ausnahme zur Wehrpflicht muss es für Menschen, die keine Impfung wollen, einen Weg geben, aus persönlichen Gründen und auf Grund einer Gewissens-Entscheidung eine Ausnahme von der Impfpflicht zu erwirken. Diese Ausnahme muss als Ausnahme 4 im Paragraph § 3 des Covid19-IG aufgenommen werden!**

**Klüger aber wäre es, auf dieses geplante und schädliche Gesetz überhaupt zu verzichten und endlich die Diskriminierung von ungeimpften Personen zu beenden!**

PS: Auch vom wissenschaftlichen Standpunkt aus sind Gründe für eine kritische Haltung in der Arbeit der Virologen der MedUni Wien zu finden: **Franz X. Heinz, Karin Stiasny (2021): Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and mode of action.**

IN: Nature npj

<https://www.nature.com/articles/s41541-021-00369-6>

npj Vaccines (2021)6:104; <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00369-6>