

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie

Direktor: Prof. Dr. Michael Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
Standort Marburg

**Die Rolle der Basophilen- oder Komplementaktivierung bei der Induktion
von Überempfindlichkeitsreaktionen auf COVID-19 Impfstoffe**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lioba Annalena Holzwarth
aus Filderstadt
Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 19.12.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan/in: Frau Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent/in: Herr Prof. Dr. Wolfgang Pfützner

1. Korreferent/in: Herr Prof. Dr. Oliver Pfaar

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 ALLERGIE	1
1.1.1 <i>Definition</i>	1
1.1.2 <i>Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion</i>	1
1.1.3 <i>Anaphylaxie</i>	2
1.1.4 <i>Therapie</i>	2
1.1.5 <i>Nicht-IgE-vermittelte Pseudoallergie</i>	3
1.2 COVID-19.....	4
1.2.1 <i>SARS-CoV-2 Virus</i>	5
1.2.2 <i>Übertragung</i>	5
1.2.3 <i>Klinische Präsentation</i>	6
1.3 COVID-19 IMPFSTOFFE	6
1.3.1 <i>mRNA-Impfstoffe</i>	7
1.3.2 <i>Polyethylenglykol</i>	7
1.3.3 <i>Vektorbasierte Impfstoffe</i>	8
1.3.4 <i>Polysorbat</i>	8
1.3.5 <i>Potentiell allergene Inhaltsstoffe der COVID-19 Impfstoffe</i>	8
1.3.6 <i>COVID-19 Impfungen bei Allergikern</i>	9
1.4 ZIEL DER STUDIE	10
2 MATERIAL	11
2.1 PATIENTENMATERIAL	11
2.2 ANTIGENE	11
2.3 CHEMIKALIEN	11
2.4 KOMMERZIELLE TESTS FÜR DIE ZELLULÄRE ANALYSE	13
2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	13
2.6 ANTIKÖRPER.....	13
2.7 VERBRAUCHSARTIKEL.....	13
2.8 GERÄTE	14
2.9 SOFTWARE	15
3 METHODEN	16
3.1 STUDIENDESIGN	16
3.2 KLINISCHE EVALUATION	17
3.2.1 <i>Hauttests</i>	17
3.3 ZELLULÄRE ANALYTIK	19
3.3.1 <i>Durchflusszytometrie</i>	19
3.4 SEROLOGISCHE ANALYTIK.....	22
3.4.1 <i>Sandwich ELISA</i>	22
3.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	25
4 ERGEBNISSE	26
4.1 STUDIENTEILNEHMER UND KLINISCHE ERGEBNISSE	26
4.2 HAUTTESTERGEBNISSE	27
4.3 BASOPHILEN-AKTIVIERUNGSTEST (BAT).....	29
4.4 KOMPLEMENT ANALYSE	31
4.4.1 <i>Komplementaktivierung durch Zymosan</i>	33
4.4.2 <i>Komplementaktivierung durch PEG</i>	34

4.4.3 Komplementaktivierung durch COVID-19 Impfstoffe.....	36
4.5 KORRELATION ZWISCHEN HAUTTESTS, BASOPHILEN-AKTIVIERUNGSTEST UND KOMPLEMENTANALYSE	38
5 DISKUSSION	41
5.1 IGE-VERMITTELTEN MECHANISMUS MÖGLICHER ALLERGISCHER REAKTIONEN AUF PEG UND DIE COVID-19 IMPFSTOFFE	41
5.1.1 Hauttestergebnisse.....	41
5.1.2 BAT Ergebnisse.....	42
5.1.3 Mögliche IgE-vermittelte Hypersensitivität gegenüber PEG und den COVID-19 Impfstoffen	43
5.1.4 Bedeutung der in vitro- und Hauttestdiagnostik von COVID-19 Impfstoffen sowie den Impfstoffhilfsstoffen.....	45
5.2 CARPA ALS MÖGLICHE URSACHE ALLERGISCHER REAKTIONEN AUF PEG UND COVID-19 IMPFSTOFFE	47
5.2.1 Bedeutung allergischer Reaktionen in der Anamnese.....	47
5.2.2 Komplementaktivierung durch PEG und die COVID-19 Impfstoffe.....	48
5.3 WEIBLICHES GESCHLECHT	50
5.4 LIMITATIONEN	51
5.5 SCHLUSSFOLGERUNG	51
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	53
8 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/-INNEN.....	61
9 DANKSAGUNG.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	engl.: angiotensin converting enzyme (Angiotensinkonvertierendes Enzym)
arb.unit	engl.: arbitrary unit (willkürliche Einheit)
Az.	Aktenzeichen
BAT	Basophilen-Aktivierungstest
bzw.	beziehungsweise
CARPA	engl.: complement activation related pseudoallergy (Komplementaktivierungs-bedingte Pseudoallergie)
d.h.	das heißt
DMG	Dimyristoylglycerin
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
e.g.	lat.: exempli gratia (zum Beispiel)
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
E-Protein	Envelope-Protein
EUA	engl.: emergency use authorization (Notfallzulassung)
et al.	lat.: et alii (und andere)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl- phenylalanine
FSC	engl.: forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
HCL	Salzsäure

H ₂ O	Wasser
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KU	Kilo-Units
L	Liter
LNP	Lipidnanopartikel
M	Molare Masse
M	Meter
m	milli (x10 ⁻³)
M-Protein	Membran-Protein
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	engl.: molecular weight (Molekulargewicht)
n	nano (x10 ⁻⁹)
NAC	engl.: non allergic control (nicht- allergische Kontrolle)
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)
N-Protein	Nucleocapsid-Protein
OD	Optische Dichte
P	Proband
PBS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rmp	engl.: runs/rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R-Wert	Reproduktionszahl
S-Protein	Spike-Protein
SPT	engl.: skin prick test (Pricktest)
SSC	engl.: side scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
IDT	engl.: intradermal test (Intrakutantest)
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
vgl.	Vergleich
WHO	engl.: world health organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
%	Prozent

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Probandenflussdiagramm

Abb. 2: Reaktionen im Basophilen-Aktivierungstest (BAT)

Abb. 3: Probanden mit allergischen Hautreaktionen auf COVID-19 Impfstoffe zeigten ähnliche systemische C5a-Spiegel wie nichtreaktive Kontrollgruppen

Abb. 4: Induktion der Bildung von Anaphylatoxin C5a in allen Serumproben durch Zymosan

Abb. 5: Induktion der Bildung von Anaphylatoxin C5a in Serumproben durch PEG 6000

Abb. 6: Durch COVID-19 Impfstoffe induzierte Komplementaktivierung in einzelnen Serumproben

Abb. 7: Die durch COVID-19 Impfstoffe induzierte C5a-Bildung korreliert nicht mit der aktivierenden Wirkung von PEG 6000 auf das Komplementsystem

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Probandencharakteristika

Tab. 2: Positive Ergebnisse der Hauttests (SPT und IDT)

Tab. 3: Probanden mit positivem Hauttest und BAT/Komplementtest

Zusammenfassung

Nach der Einführung der mRNA-basierten COVID-19 Impfstoffe BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) und mRNA-1273 (Moderna), bei denen Polyethylenglykol (PEG)-konjugierte Lipidnanopartikel zur Verkapselung der mRNA verwendet werden, wurden Fälle von postvazinaler Anaphylaxie berichtet. Dies führte zu Bedenken hinsichtlich der Sicherheit der Impfstoffe. Da allergische Reaktionen auf die in den Impfstoffen enthaltene mRNA selbst unwahrscheinlich sind, wurde das konjugierte PEG als der wahrscheinlichste Zusatzstoff in den Impfstoffen mit allergischem Potenzial angesehen.

Im Gegensatz zu den mRNA-basierten Impfstoffen enthalten die vektorbasierten COVID-19 Impfstoffe ChAdOx1 (AstraZeneca) und Ad.26.COV2.S (Johnson&Johnson/Janssen) kein PEG. Allerdings wurde bereits über allergische Reaktionen berichtet, die auf den zu PEG strukturell verwandten Zusatzstoff dieser Impfstoffe, Polysorbat 80, zurückzuführen sind.

Die Mechanismen, die Hypersensitivitätsreaktionen gegenüber den verschiedenen COVID-19 Impfstoffen auslösen, sind bis heute unklar. Diskutiert werden sowohl IgE-vermittelte als auch nicht-IgE-vermittelte Reaktionen, einschließlich einer Aktivierung des Komplementsystems, die als „*complement activation related pseudoallergy*“ (CARPA) bezeichnet wird. Ziel dieser Studie war es, a) das allergene Potential sowohl der COVID-19 Impfstoffe selbst als auch ihrer Zusatzstoffe zu analysieren und b) die Rolle individueller Faktoren (z.B. Anaphylaxie oder allergische Rhinitis/Asthma in der Anamnese) für die Wahrscheinlichkeit impfstoffinduzierter allergischer Reaktionen zu evaluieren.

Insgesamt wurden 67 Probanden rekrutiert und Hauttests mit den vier COVID-19 Impfstoffen sowie mit PEG und Polysorbat 80 durchgeführt. Zusätzlich wurde die Basophilen- und/oder Komplementaktivierung analysiert und zwischen positiven (n=15) und negativen (n=52) Hauttestpersonen verglichen. Es konnten vier Personen mit positiven Hauttestergebnissen und Basophilenaktivierung identifiziert werden, was auf eine IgE-abhängige Reaktion gegenüber PEG und PEG-haltigen Produkten hindeuten könnte. Darüber hinaus zeigten 24 % der getesteten Proben (8/34) eine Aktivierung des Komplementsystems nach

Inkubation mit mindestens einem der COVID-19 Impfstoffe, wobei in vier Fällen positive Hauttestergebnisse vorlagen.

Zusammenfassend beleuchten die Ergebnisse dieser Studie einen wichtigen Aspekt der COVID-19 Impfung: Trotz einiger Probanden mit allergischen Reaktionen in der Anamnese und positiven Hauttests zeigte die überwiegende Mehrheit nach Exposition mit COVID-19 Impfstoffen *in vitro* keine erhöhte Komplement- oder Basophilenaktivität. Diese Ergebnisse unterstreichen die allgemeine Sicherheit der Impfstoffe und deuten darauf hin, dass das Risiko schwerer Überempfindlichkeitsreaktionen relativ gering ist. Gleichzeitig ebnen sie den Weg für zukünftige Forschung zur weiteren Optimierung der Sicherheit und Verträglichkeit von Impfstoffen.

Summary

Following the introduction of mRNA-based COVID19 vaccines BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) and mRNA-1273 (Moderna), which utilize polyethylene glycol (PEG)-conjugated lipid nanoparticles to encapsulate mRNA, incidents of post-vaccination anaphylaxis were reported, leading to concerns over the vaccines' safety. As allergic reactions to the mRNA are unlikely, conjugated PEG was considered the most likely excipient with allergenic potential. In contrast, the vector-based COVID-19 vaccines ChAdOx1 (AstraZeneca) and Ad.26.COV2.S (Johnson&Johnson/Janssen) do not contain PEG. However, allergic reactions were reported as well, likely due to the structurally related excipient polysorbate 80.

The mechanisms triggering these hypersensitivities to the different COVID-19 vaccines are still unclear. Both IgE-mediated and non-IgE-mediated reactions, including activation of the complement system, referred to as complement activation-related pseudoallergy (CARPA), have been considered. This research project aimed to: a) analyse the allergenic potential of both the COVID-19 vaccines and their excipients, and b) assess the role of individual factors (e.g. history of anaphylaxis or allergic rhinitis/asthma) on the likelihood of developing vaccine-induced allergic reactions.

The study enrolled 67 subjects and skin tests were conducted using the four COVID-19 vaccines, as well as PEG and polysorbate 80. Furthermore, basophil and/or complement activation was analysed and compared between skin test-positive (n=15) and -negative (n=52) patients. Only four individuals with positive skin test results and basophil activation were identified, suggesting an IgE-dependent response to PEG and PEG-containing products. In addition, 24 % of the samples tested (8/34) showed an activation of the complement system activation post incubation with at least one of the COVID-19 vaccines, with four cases revealing positive skin test results.

In conclusion, the findings of this study illuminate a crucial aspect of COVID-19 vaccination: despite some subjects having a history of allergic reactions and positive skin tests, the vast majority did not exhibit increased complement or basophil activity *in vitro* after exposure to COVID-19 vaccines. These findings highlight the overall safety of the vaccines and suggests that the risk of severe

hypersensitivity reactions is relatively low. The results could pave the way for future research to further optimize vaccine safety and tolerability.

1 Einleitung

1.1 Allergie

1.1.1 Definition

Unter einer Allergie wird eine unangemessene und krankhaft überschießende Immunreaktion gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen Substanzen verstanden, welche als Allergene erkannt und bezeichnet werden. (Pschyrembel et al., 2007). Allergien werden nach Coombs und Gell in vier Gruppen klassifiziert (Gell and Coombs, 1963). Dabei werden die Typen I, II und III als Frühreaktionen bezeichnet, da diese im Regelfall bis zu 24 Stunden nach Exposition gegenüber einem Allergen auftreten. Diese drei Gruppen von allergischen Reaktionen werden durch Antikörper wie IgE, IgM und IgG vermittelt (Justiz Vaillant et al., 2023). Im Vergleich dazu wird eine Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell durch zelluläre Mechanismen herbeigeführt. Symptome treten bei der Typ-IV-Reaktion nach Allergenkontakt im Regelfall erst nach 24-48 Stunden auf, weswegen die Reaktion auch als allergische Reaktion vom Spättyp bezeichnet wird (Hof et al., 2019).

1.1.2 Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion

Bei der Typ-I-Reaktion nach Coombs und Gell wird bei Erstkontakt mit einem entsprechenden Allergen eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Bildung spezifischer IgE-Antikörper durch B-Lymphozyten stimuliert. Dieser Prozess wird als Sensibilisierung bezeichnet (Jimenez-Rodriguez et al., 2018). Bei erneutem Allergenkontakt wird das Allergen von den spezifischen IgE-Antikörpern erkannt, welche an hochaffine Fc epsilon Rezeptoren (FcεR) auf Mastzellen und/oder Basophilen binden. Die Quervernetzung der IgE-Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus, die zur Degranulation der Zellen und zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Prostaglandinen, Leukotrienen und Tryptase führt. Die Reaktion wird durch die Rekrutierung weiterer Immunzellen, vor allem eosinophiler Granulozyten, aufrechterhalten, welche

ihrerseits weitere Entzündungsmediatoren freisetzen (Reber et al., 2017, Cabanillas and Novak, 2021).

Die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt zu den klassischen Symptomen einer allergischen Reaktion wie Erythem, Pruritus, Hautausschlag, Hypotonie, Angioödem, Dyspnoe und Husten sowie zu gastrointestinalen Symptomen (Schnyder and Pichler, 2009). Eine gefürchtete und lebensbedrohliche Komplikation stellt eine systemische Reaktion dar, die auch als Anaphylaxie bezeichnet wird.

1.1.3 Anaphylaxie

Die Maximalform einer allergischen Reaktion vom Typ I nach Coombs und Gell wird als Anaphylaxie bezeichnet. Sie unterscheidet sich von einer einfachen allergischen Reaktion durch das gleichzeitige Auftreten von Symptomen in mehreren Organsystemen (Rüggeberg et al., 2007). Eine Anaphylaxie ist somit als systemische Reaktion auf bestimmte Allergene zu verstehen. Die Anaphylaxie wird nach Ring und Messmer in vier Schweregrade eingeteilt. Bei Grad I treten primär Symptome an der Haut auf, zu denen z.B. ein generalisiertes Erythem und/oder eine Urtikaria zählen. Weiterhin kann leichtes Fieber auftreten. Grad II ist durch eine mäßige kardiovaskuläre Reaktion mit Tachykardie und Hypotonie charakterisiert. Zusätzlich kann es zu gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit oder Durchfall kommen. Grad III zeichnet sich durch eine lebensbedrohende Schockreaktion aus. Zudem können Spasmen der glatten Muskulatur wie z.B. Bronchospasmen auftreten. Unter Grad IV wird die maximale Ausprägung einer Anaphylaxie mit Herz- und/oder Atemstillstand verstanden (Ring and Messmer, 1977).

1.1.4 Therapie

Aus therapeutischer Sicht hat vor allem das Erkennen einer allergischen Reaktion sowie das Meiden des ursächlichen Allergens einen hohen Stellenwert, um weitere allergische Reaktionen zu verhindern. Weiterhin ist die sofortige medikamentöse Notfalltherapie von großer Bedeutung.

Symptomatisch stehen für die Grad I Reaktion primär Antihistaminika zur Blockade des von Mastzellen ausgeschütteten Botenstoffes Histamin zur

Verfügung. Weiterhin kann die antientzündliche Wirkung der Therapie mit Glukokortikoiden genutzt werden (Hof et al., 2019).

Zur Therapie einer Anaphylaxie höherer Schweregrade wird in erster Linie Adrenalin i.v. oder i.m. verabreicht. Zusätzlich wird eine forcierte Volumensubstitution empfohlen. Je nach betroffenem Organsystem kommen weiterhin z.B. Bronchodilatoren sowie eine Sauerstoffgabe zum Einsatz. Darüber hinaus können auch bei einer Anaphylaxie Glukokortikoide und Antihistaminika therapeutisch eingesetzt werden (Garvey et al., 2019, Justiz Vaillant et al., 2023, Kim et al., 2021).

Als kausale Therapie einer Typ-I-Reaktion kommt die sogenannte Hyposensibilisierung in Frage, bei der das entsprechende Allergen über einen Zeitraum von mehreren Jahren verabreicht wird. Ziel ist hierbei, eine immunologische Toleranz gegenüber dem Allergen zu erreichen (Hof et al., 2019).

1.1.5 Nicht-IgE-vermittelte Pseudoallergie

Neben der klassischen, durch Quervernetzung von IgE Antikörpern vermittelten allergischen Reaktion existieren weitere, nicht-IgE-vermittelte Mechanismen, die zum klinischen Bild einer allergischen Reaktion mit entsprechenden Symptomen (z.B. Hypotonie, Dyspnoe, Pruritus) bis hin zur Anaphylaxie führen können. Beschriebene Mechanismen umfassen hierbei Mastzell-unabhängige Formen (z.B. Stimulation der Bradykininproduktion), IgG-vermittelte Aktivierung von Immunzellen sowie eine direkte Aktivierung von Mastzellen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder eine Komplementsystemaktivierung (Risma et al., 2021)

1.1.5.1 Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt einen Teil des angeborenen Immunsystems dar. Es besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die bei einer Aktivierung miteinander in Wechselwirkung treten. Dabei entsteht eine Aktivierungskaskade, bei der eine enzymatisch aktive Komponente eine Vorstufe der weiteren Komplementkaskade in eine enzymatisch aktive Form überführt, die dann wiederum eine weitere Vorstufe aktivieren kann. So erfolgt beispielsweise eine

Aktivierung der Komplementfaktoren C3 und C5 zu den Anaphylatoxinen C3a und C5a, welche die Chemotaxis und damit die Migration weiterer Immunzellen fördern. Darüber hinaus können durch die Aktivierung des Komplementsystems Moleküle zur Infektabwehr generiert werden, die zur Opsonisierung sowie zur Lyse körperfremder Pathogene beitragen können (Hof et al., 2019).

1.1.5.2 Komplementsystem vermittelte Pseudoallergie

Neben IgE-vermittelten Mechanismen kann auch die Aktivierung des Komplementsystems zu klinischen Symptomen führen, die an solche einer IgE vermittelten allergischen Reaktion erinnern. In diesem Fall wird von einer durch die Aktivierung des Komplementsystems bedingten Pseudoallergie (*complement activation-related pseudoallergy* = CARPA) gesprochen. Bei Kontakt mit einem potentiellen Triggerfaktor (z.B. PEGylierte Arzneimittel; vgl. Kapitel 1.3.2) kommt es hierbei zu einer Komplementaktivierung, die zur Freisetzung von C3a- und C5a-Aktivierungsfragmenten führt (Mohamed et al., 2019, Chanan-Khan et al., 2003). Diese Anaphylatoxine können an spezifische Rezeptoren binden und so die Degranulation von z.B. Basophilen und Mastzellen auslösen. Die Degranulation von Immunzellen führt zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie z.B. Tryptase, Histamin, plättchenaktivierendem Faktor und Leukotrienen. Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren kann zu einem klinischen Bild ähnlich einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion mit den typischen Symptomen wie Hypotonie, Luftnot, Angioödem, Pruritus und Husten führen (Szebeni et al., 2011, Mohamed et al., 2019). Die klinische Unterscheidung zwischen CARPA und IgE-vermittelter Allergie ist dabei schwierig und nicht eindeutig. Im Gegensatz zur IgE-vermittelten Allergie erfordert die CARPA jedoch keine vorherige Sensibilisierung und kann bereits nach der ersten Allergenexposition auftreten (Szebeni et al., 2011, Nicaise-Roland et al., 2022).

1.2 COVID-19

Die durch das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ausgelöste globale COVID-19 Pandemie hat Menschen auf der ganzen Welt vor beispiellose Herausforderungen gestellt und deren tägliches Leben

nachhaltig verändert. Die erste COVID-19-assoziierte Infektion wurde im Dezember 2019 in Wuhan, China nachgewiesen. Es folgte eine massive Ausbreitung der Infektionen in mehr als 216 Ländern weltweit mit mehreren Millionen nachgewiesenen Infektionen und Todesfällen. Die Einstufung als globale Pandemie durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgte im März 2020 (Rahman et al., 2021, Chilamakuri and Agarwal, 2021).

1.2.1 SARS-CoV-2 Virus

Das SARS-CoV-2 Virus ist ein RNA Virus, welches der Familie der *Coronaviridae* angehört. Coronaviren bestehen aus vier Hauptstrukturproteinen, dem *spike* (S)-, *envelope* (E)-, *membrane* (M)- und *nucleocapsid* (N)-Protein (Kim et al., 2020). Dabei spielt das S-Protein die wichtigste Rolle bei der Bindung, Fusion und dem Eindringen in eine Wirtszelle (Duan et al., 2020). Das S-Protein interagiert mit dem *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2)-Rezeptor, der in vielen verschiedenen menschlichen Geweben exprimiert wird (Mahmoud et al., 2020, Xu et al., 2020). Das E-Protein wird für die Freisetzung neu synthetisierter Viruspartikel aus der Wirtszelle benötigt (Chen et al., 2020). Das M-Protein ist für den Transport von Nährstoffen über die Zellmembran sowie für die Formgebung des Virus verantwortlich (Schoeman and Fielding, 2019). Das N-Protein dient der Stabilisierung des viralen RNA-Genoms (Kim et al., 2020, Chilamakuri and Agarwal, 2021).

1.2.2 Übertragung

Das SARS-CoV-2 Virus befällt primär den oberen und unteren Respirationstrakt. Daher erfolgt die Übertragung hauptsächlich durch Tröpfcheninfektion, Atemwegssekrete oder direkten Kontakt zu einer infizierten Person (Li et al., 2020). Neben dem Respirationstrakt konnten jedoch auch Viruspartikel aus weiterem biologischen Material wie z.B. Stuhlproben isoliert werden. Alternative Übertragungswege könnten somit auch möglich sein (Zhang et al., 2020). Bei SARS-CoV-2 handelt es sich um ein hochinfektiöses Virus, dessen Reproduktionszahl (R-Wert), also die Anzahl der Personen, die von einer

infizierten Person angesteckt werden, auf bis zu 6,6 geschätzt wird (Sanche et al., 2020).

1.2.3 Klinische Präsentation

Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit dem SARS-CoV-2 Virus beträgt in der Regel 3-14 Tage (Acter et al., 2020). Bei den Hauptsymptomen handelt es sich um Fieber, Schüttelfrost, trockenen Husten sowie Dyspnoe, Müdigkeit Cephalgien und Myalgien. Weiterhin können Geschmacksverlust, Durchfall, Übelkeit und Erbrechen sowie Rhinorrhoe auftreten (Huang et al., 2020, Chilamakuri and Agarwal, 2021). Die Symptome können von milden bis hin zu sehr schweren Verläufen reichen, die eine intensivmedizinische Betreuung erfordern. Obwohl bei der Mehrzahl der Infizierten milde Verläufe beobachtet werden, können auch schwere Verläufe mit Anstieg der Nieren- und/oder Leberenzyme, Hypoxie und respiratorischer Insuffizienz bis hin zum Multiorganversagen auftreten (Salian et al., 2021, Adil et al., 2021).

1.3 COVID-19 Impfstoffe

Um die Ausbreitung des SARS-CoV-2 Virus zu bekämpfen, erteilte die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) im Dezember 2020 eine Notfallzulassung (EUA) für die von Pfizer/BioNTech (BNT162b2) und Moderna (mRNA-1273) entwickelten mRNA-basierten Impfstoffe (Oliver et al., 2020, Oliver et al., 2021).

Kurz nach Beginn der Massenimpfung häuften sich jedoch Berichte über Anaphylaxien nach Verabreichung der neu zugelassenen Impfstoffe (Turner et al., 2021). Diese Berichte führten zu Bedenken hinsichtlich der Sicherheit der neu entwickelten Impfstoffe. Nach ersten Schätzungen lag die Rate allergischer Reaktionen auf mRNA-Impfstoffe bei 11,1 Fällen pro eine Million Impfdosen und damit etwa zehnmal höher als die für Impfstoffe im Allgemeinen bekannte Anaphylaxie-Rate (1,31 Fälle pro Million Dosen) (Shimabukuro and Nair, 2021, McNeil et al., 2016). Neuere Berichte weisen jedoch auf eine deutlich niedrigere

Inzidenz von 2,5 bis 7,91 Fällen pro Million Dosen verabreichten Impfstoffes hin (Shimabukuro et al., 2021, Greenhawt et al., 2021).

1.3.1 mRNA-Impfstoffe

Die seit 2020 zugelassenen mRNA-Impfstoffe BNT162b2 (Pfizer/BioNTech, Comirnaty®) und mRNA-1273 (Moderna, Spikevax®) basieren auf dem Botenstoff eines mRNA-Moleküls, welches für das virale *spike* (S)-Glykoprotein des SARS-CoV-2 Virus kodiert. Da die mRNA selbst einen instabilen Charakter besitzt und schnell enzymatisch abgebaut würde, wird diese in den Impfstoffen von Lipidnanopartikeln (LNP) umgeben, um eine höhere Stabilität für das mRNA-Molekül zu gewährleisten (Cabanillas and Novak, 2021, Pardi et al., 2018). Zusätzlich wird Polyethylenglykol (PEG) chemisch an die Oberfläche der LNPs konjugiert. Dieser als PEGylierung bezeichneter Prozess erhöht die Stabilität der LNPs und verbessert dadurch den Transport der mRNA-Moleküle zu den entsprechenden Zielorganellen (Suk et al., 2016).

Obwohl die mRNA-Technologie schon seit einiger Zeit bekannt ist, stellen die Impfstoffe BNT162b2 und mRNA-1237 die ersten jemals zugelassenen Vakzine dar, die ein kodierendes mRNA-Molekül als Botenstoff enthalten. Weiterhin handelt es sich um die erste Zulassung von Impfstoffen, die PEG als Hilfsstoff enthalten (Castells and Phillips, 2020).

1.3.2 Polyethylenglykol

Polyethylenglykole (PEGs), auch Makrogole genannt, sind hydrophile Polymere mit einem Molekulargewicht (MW) zwischen 200 und 35.000 g/mol. PEGs werden häufig in Alltagsprodukten wie Kosmetika, Medikamenten und Lebensmitteln verwendet (Erdeljic Turk, 2021).

Die PEGylierung, ein Verfahren, bei dem PEG mit bestimmten Arzneimitteln kombiniert wird, dient dazu, das Molekulargewicht dieser Arzneimittel zu erhöhen, sie vor einem verfrühten Abbau zu schützen sowie ihre Zirkulation und den Transport an das Zielkompartiment des Körpers zu verbessern (Veronese and Pasut, 2005, Turecek et al., 2016).

1.3.3 Vektorbasierte Impfstoffe

Neben den auf dem mRNA-Mechanismus basierenden Impfstoffen, existieren die vektorbasierten Impfstoffe ChAdOx1 (Oxford-AstraZeneca, Vaxzevria®) und Ad26.COV2.S (Johnson&Johnson/Janssen, Jcovden®). Diese Impfstoffe enthalten ebenfalls die Informationen des S-Glykoproteins des SARS-CoV-2 Virus, jedoch in Form eines replikationsinkompetenten Adenovirus, das die entsprechende DNA-Information als Vektor trägt (Cabanillas and Novak, 2021, Sadoff et al., 2021). Für die vektorbasierten Impfstoffe sind weder LNP noch PEG als Hilfsstoffe bekannt. Allerdings enthalten die Impfstoffe ChAdOx1 und Ad26.COV2.S den Zusatzstoff Polysorbat, der strukturelle Ähnlichkeiten mit PEG aufweist (Cabanillas and Novak, 2021, Kim et al., 2021).

1.3.4 Polysorbat

Das dem PEG strukturell verwandte Polysorbat wird ebenfalls häufig in medizinischen Produkten und in der Lebensmittelindustrie verwendet. Polysorbate sind durch die Anzahl der Ethylenoxidgruppen (-OCH₂CH₂) im Molekül gekennzeichnet und werden folglich als Polysorbat 40, 60 oder 80 bezeichnet. Sowohl der Vektorimpfstoff ChAdOx1- als auch der Ad.26.COV2.S-Impfstoff enthalten Polysorbat 80, welches bereits in anderen Impfstoffen verwendet wird, z.B. gegen Hepatitis B, Influenza oder das humane Papillomavirus (Cabanillas and Novak, 2021).

1.3.5 Potentiell allergene Inhaltsstoffe der COVID-19 Impfstoffe

Der Mechanismus, der den durch die verschiedenen COVID-19 Impfstoffe ausgelösten Überempfindlichkeitsreaktionen zugrunde liegt, ist derzeit noch nicht vollständig verstanden. Auslöser einer Hypersensitivitätsreaktion auf Impfstoffe sind in der Regel nicht die Wirkstoffkomponenten eines Impfstoffs. Vielmehr können die in den Impfstoffen enthaltenen Hilfsstoffe potentielle Allergene darstellen (Stone et al., 2019b). Als wahrscheinlichster Hilfsstoff der COVID-19 Impfstoffe mit allergenem Potential wird derzeit das in den mRNA-Impfstoffen enthaltene PEG angesehen (Garvey and Nasser, 2021).

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Fälle von vermutlich IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen auf PEG unterschiedlicher MW beschrieben. Dabei scheint ein höheres MW mit einer größeren Wahrscheinlichkeit für die Auslösung einer allergischen Reaktion einherzugehen (Erdeljic Turk, 2021, Shah et al., 2013, Krantz et al., 2020).

Neben einer IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion existieren jedoch ebenfalls Berichte über eine Aktivierung des Komplementsystems durch PEGylierte Arzneistoffe, die sich in einer vermehrten Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a manifestierten (Mohamed et al., 2019, Chanan-Khan et al., 2003). Der Mechanismus einer nicht-IgE-vermittelten Komplementaktivierung als Auslöser von Hypersensitivitätsreaktionen auf PEG-haltige Impfstoffe wird daher ebenfalls diskutiert.

Die vektorbasierten Impfstoffe selbst enthalten zwar kein PEG, allerdings Polysorbat, für das aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu PEG bereits eine Kreuzreaktivität beschrieben wurde (Wenande and Garvey, 2016).

1.3.6 COVID-19 Impfungen bei Allergikern

Probanden mit einer bekannten Allergie oder Anaphylaxie gegen einen Bestandteil der COVID-19 Impfstoffe oder einer generell bekannten Allergie gegenüber einem anderen Impfstoff wurden von den klinischen Zulassungsstudien für die beiden mRNA-basierten Impfstoffe ausgeschlossen.

Darüber hinaus stellten in der klinischen Zulassungsstudie für den BNT162b2-Impfstoff Probanden mit jeglicher bekannter Allergie generell ein Ausschlusskriterium dar (Polack et al., 2020, Jackson et al., 2020).

Interessanterweise berichtete jedoch die Mehrheit der Personen, die nach Verabreichung der COVID-19 Impfstoffe Überempfindlichkeitsreaktionen zeigten, über allergische Reaktionen und/oder eine Anaphylaxie in der Vorgeschichte (Shimabukuro and Nair, 2021, Blumenthal et al., 2021, Moghimi, 2021).

1.4 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen von PEG-haltigen Impfstoffen auf die Aktivierung von Basophilen und das Serumkomplementsystem bei Probanden mit vorbekannten Allergien zu untersuchen. Um ein besseres Verständnis des Potenzials von PEG als Auslöser von allergischen Reaktionen/Anaphylaxien zu erlangen, wurden Hauttests, Komplementanalysen (mittels *Anti-C5a-enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA) und Basophilen-Aktivierungstests (BAT; zur Detektion eines IgE-vermittelten Mechanismus) mit verschiedenen COVID-19 Impfstoffen und PEG mit unterschiedlichem MW sowie Polysorbat durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten sowohl bei Probanden mit einer Allergie in der Vorgeschichte als auch bei nicht-allergischen Kontrollen.

2 Material

2.1 Patientenmaterial

Serum- und Vollblutproben

Patienten der Universitätsklinik für
Dermatologie und Allergologie
Marburg

2.2 Antigene

Ad.26.COV2.S, Jcovden®

Janssen, Beerse, Belgien

BNT162b2, Comirnaty®

BioNTech, Mainz, Deutschland

ChAdOx1, Vaxzevria®

Astra Zeneca, Cambridge,
Großbritannien

mRNA-1273, Spikevax®

Moderna Biotech, Cambridge,
USA

PEG 400

SmartPractice Europe, Barsbüttel,
Deutschland

PEG 2000

Bühlmann, Schönebuch, Schweiz

PEG 2000 DMG

Bühlmann, Schönebuch, Schweiz

PEG 2000

Sigma Aldrich, St. Louis, USA

PEG 6000

Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Polysorbat 80

Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.3 Chemikalien

Dulbecco's PBS 1x (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

PAA Laboratories GmbH, Cölbe,
Deutschland

Ethylendinitrilotetraessigsäure-

Merck KGaA, Darmstadt,

Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex® III)

Deutschland

FACSClean

Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg, Deutschland

FACSFlow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACSRinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Flow CAST® Färbereagenz (anti-CD63-FITC und anti-CCR3-PE mAb)	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Flow CAST® Lysereagenz	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Flow CAST® Stimulationskontrolle (anti-FcεRI mAb)	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Flow CAST® Stimulationskontrolle (N-formyl-methionyl-leucyl- phenylalanine (fMLP))	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Flow CAST® Stimulationspuffer	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Flow CAST® Waschpuffer	Bühlmann, Schönebuch, Schweiz
Histamindiyhydrochlorid	ALK Abelló, Hørsholm, Dänemark
Physiologische Kochsalzlösung	ALK Abelló, Hørsholm, Dänemark
Magermilchpulver	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Nafamostat Mesylate	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokio, Japan
Salzsäure (HCl)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin Peroxidase	Jackson ImmunoResearch, Ely, Großbritannien
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zymosan	Complement Technologies, Tyler, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Seramun Diagnostica, Heidesee, Deutschland

2.4 Kommerzielle Tests für die zelluläre Analyse

Flow Cast® Basophil Activation Test

Bühlmann, Schönebuch, Schweiz

2.5 Puffer und Lösungen

EDTA-Lösung 0,5 M

186,1 g

Ethylendinitrilotetraessigsäure-

Dinatriumsalz-Dihydrat

+ 1 L Destilliertes H₂O

pH-Wert auf 8,0 einstellen

FE-Puffer

10 g PBS 1x

+ 10 mM EDTA Lösung

+ 0,1 mg/ml Nafamostat Mesylate

Lagerung bei 4-8°C

PBS/T (ELISA Waschlösung)

100 ml PBS 10x

+ 1 ml Tween 20

+ 900 ml Destilliertes H₂O

2.6 Antikörper

Anti-human C5a/C5a des-Arg Antikörper,
#518202

BioLegend, San Diego, USA

Biotinylierter anti-human C5a/C5a des-Arg
Antikörper, #518306

BioLegend, San Diego, USA

2.7 Verbrauchsartikel

Eppendorf Tubes® 5,0 ml

Eppendorf Deutschland,

Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Omnifix® Feindosierungsspritzen	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Polystyrolröhrchen (FACS-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® K-EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Serum-Gel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Mikrotiterplatten	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.8 Geräte

Accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
FLUOstar® Optima Photometer	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
GFL 1083 Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mBh, Burgwedel, Deutschland
KERN® Präzisionswaage PCB	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland

Rotina 420 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™ 2 Vortexmischer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Transferpette® S Einkanal-Mikroliterpipette 0,5-10 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® S Einkanal-Mikroliterpipette 20-200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® S Einkanal-Mikroliterpipette 100-1000 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Transferpette® S Mehrkanal- Mikroliterpipette 20-200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Universalscharank UN30	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

2.9 Software

BD CellQuest Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FlowJo™	BD Biosciences, San Jose, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft, Washington, USA
Optima MARS	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

3 Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie umfasst insgesamt 67 Probanden, die alle in der Sektion Allergologie der Klinik für Dermatologie und Allergologie des UKGM Marburg rekrutiert und untersucht wurden (Abb. 1). Bei allen Probanden wurde eine Anamnese erhoben und die Studienteilnehmer entsprechend ihrer Krankengeschichte in verschiedene Gruppen eingeteilt: Allergische Rhinitis und/oder Asthma (z.B. gegen Pollen, Hausstaubmilben, Haustiere; n=30), Anaphylaxie (z.B. gegen Insektengift, Medikamente; n=20), oder keine bekannte Allergie (NAC = *non-allergic control*; n=17; Tab. 1). Weiterhin wurden bei allen Probanden Hauttests (sowohl ein Prick- als auch ein Intrakutantest) durchgeführt. Für die Untersuchung des Komplementsystems mittels ELISA wurde von allen Probanden eine Serumprobe entnommen und bei -30 °C gelagert.

Bei allen Probanden mit positivem Hauttest-Ergebnis (n=15) wurde ein Folgetermin zur Entnahme einer Vollblutprobe vereinbart und ein BAT durchgeführt. Zusätzlich konnten sechs Probanden mit negativem Hauttest-Ergebnis für einen BAT rekrutiert werden.

Von allen Probanden wurde vor Einschluss in die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Az. 21/21).

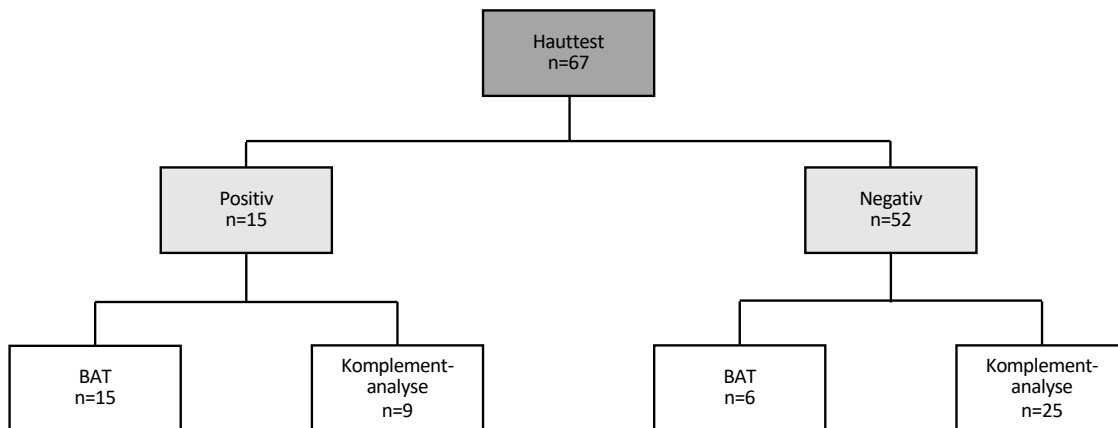


Abb. 1: Probandenflussdiagramm.

Insgesamt wurde bei 67 Probanden ein Hauttest durchgeführt. Ein positiver Hauttest wurde bei 15 (22,4 %) Probanden beobachtet, während 52 (77,6 %) ein negatives Hauttestergebnis aufwiesen. Der Basophilen-Aktivierungstest (BAT) wurde bei 21 (31,3 %) Probanden durchgeführt. Bei 15 (22,4 %) dieser Probanden wurde ein positiver Hauttest und bei sechs (9 %) ein negativer Hauttest beobachtet. Eine Komplementanalyse wurde bei 34 (50,7 %) Probanden durchgeführt, 25 (37,3 %) dieser Probanden wiesen ein negatives und neun (13,4 %) ein positives Hauttestergebnis auf.

3.2 Klinische Evaluation

Die im Folgenden beschriebenen Verfahren wurden in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie des UKGM am Standort Marburg durchgeführt. Die an der Studie teilnehmenden Probanden wurden anhand von ärztlich geführten Anamnesegesprächen den verschiedenen Subgruppen zugeteilt. Des Weiteren wurde der COVID-19 Impfstatus (1x, 2x oder nicht geimpft) erhoben sowie das Gesamt-IgE und ein Tryptasewert bestimmt (Tab. 1).

3.2.1 Hauttests

Bei den Hauttests handelte es sich um den Prick- und Intrakutantest, die an beiden volaren Unterarmen durchgeführt wurden. Bestimmte Medikamente wie Antihistaminika oder Glukokortikosteroide können die Ergebnisse der Hauttests verfälschen. Aus diesem Grund wurden die Probanden bereits im Vorfeld gebeten, bei etwaiger Einnahme entsprechender Medikamente diese mindestens eine Woche vor der Testung abzusetzen.

3.2.1.1 Pricktest

Bei allen Probanden wurde ein Pricktest (SPT = *skin prick test*) mit PEG unterschiedlicher MW durchgeführt. Es wurden PEG 400 (1,1 g/ml) sowie PEG 2000 und 6000 (jeweils 1; 10; 50 mg/ml; verdünnt in NaCl) verwendet. Weiterhin wurden Polysorbat 80 (1; 10 mg/ml; verdünnt in NaCl) sowie die COVID-19 Impfstoffe (BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1 und Ad26.COV2.S, unverdünnt (1:1) und 1:10 verdünnt in NaCl) getestet (Tab. 2). Dabei erfolgte die Untersuchung der einzelnen Substanzen in jeweils aufsteigender Konzentration. Gleichzeitig wurde, beginnend mit der jeweils niedrigsten Konzentration der einzelnen Testsubstanzen, eine Positivkontrolle (Histamin, 10 mg/ml) und eine Negativkontrolle (NaCl) in Form eines Tropfens auf die Haut aufgebracht. Mittels einer Prick-Lanzette wurde vorsichtig durch den Tropfen hindurch in die Epidermis eingestochen. Die Größe einer dabei entstehenden Quaddel wurde 20 Minuten nach dem Test gemessen. Gemessen wurde hierbei der Mittelwert aus maximalen und des senkrecht dazu stehenden Quaddeldurchmessers in mm. Eine positive Reaktion wurde durch einen mittleren Quaddeldurchmesser von ≥ 3 mm definiert. Bei positiver Reaktion wurde der Pricktest für die entsprechende Substanz beendet, spätestens jedoch bei der jeweils höchsten Konzentration der einzelnen Substanzen.

3.2.1.2 Intrakutantest

Ein zusätzlicher Intrakutantest (IDT = *intradermal test*) wurde nur bei den Substanzen durchgeführt, die auch in der jeweils höchsten Konzentration der Einzelsubstanzen ein negatives SPT-Ergebnis zeigten, da positive SPT-Ergebnisse bereits als positive Hauttestergebnisse gewertet wurden. Untersucht wurden PEG 2000 und PEG 6000 (jeweils 1; 10 mg/ml; verdünnt in NaCl) sowie Polysorbat 80 (0,1; 1 mg/ml; verdünnt in NaCl). Zusätzlich erfolgte die Begutachtung der COVID-19 Impfstoffe (BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1 und Ad26.COV2.S; 1:100 verdünnt in NaCl) (Tab. 2). Die Untersuchung erfolgte nach durchgeführtem SPT durch streng intradermale Injektion der entsprechenden Substanzen mit Hilfe einer Feindosierungsspritze und Spritzenkanüle in den Unterarm, wobei ein intradermales Depot mit einer tastbaren Vorwölbung von 3 mm Durchmesser gebildet wurde. Auch hier begann die Testung mit der jeweils niedrigsten Konzentration der Einzelsubstanzen. Als Negativkontrolle wurde,

gleichzeitig mit der Injektion der jeweils niedrigsten Konzentration der Testsubstanzen, physiologische Kochsalzlösung injiziert. Der IDT wurde ebenfalls nach 20 Minuten ausgewertet, und die Größe der Quaddel als Mittelwert zweier senkrecht zueinanderstehender Durchmesser bestimmt (siehe oben), wobei eine positive Hautreaktion als eine mittlere Quaddelgröße von ≥ 2 -fachem Durchmesser der durch Injektion entstandenen Vorwölbung (= 6 mm) definiert war. Bei Vorliegen eines positiven Testergebnisses wurde der Test für die jeweilige Substanz beendet, andernfalls wurde der Test nach der Injektion der jeweils höchsten Konzentrationen der Testsubstanzen beendet.

3.3 Zelluläre Analytik

Bei positivem Hauttest im Rahmen der klinischen Evaluation (n=15) wurde eine zelluläre Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zusätzlich konnten sechs Probanden mit negativem Hauttest für die Zellanalytik rekrutiert werden (Abb. 1). Entsprechend wurde bei insgesamt 21 Probanden ein Folgetermin zur Entnahme einer Vollblutprobe vereinbart. Dabei wurde darauf geachtet, dass am Tag der Vollblutentnahme keine weitere allergologische Diagnostik durchgeführt wurde, die die zelluläre Analyse verfälschen könnte (z.B. Hauttest). Darüber hinaus wurden die Probanden darauf hingewiesen, eine eventuelle systemische antiallergische Therapie (z.B. Kortikosteroide, Antihistaminika) mindestens 24 Stunden vor der Blutentnahme zu pausieren.

3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung bestimmter Zelleigenschaften wie unter anderem Oberflächenbeschaffenheit, Größe oder Granularität. Dabei werden die Zellen in einer Waschlösung einem Laserstrahl ausgesetzt. Beim Auftreffen des Laserstrahles auf eine Zelle entsteht eine Streuung des Lichtes. Dabei handelt es sich zum einen um Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches sich proportional zu Zellgröße und -volumen verhält, und zum anderen um Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), das von der Granularität und der Komplexität der Zellen abhängt.

Darüber hinaus können mit Hilfe der Durchflusszytometrie spezifische Oberflächenbeschaffenheiten einzelner Zellen dargestellt werden. Die hierfür verwendeten Fluoreszenzmoleküle sind mit entsprechenden Antikörpern konjugiert. Durch einen Laser wird fluoreszierendes Licht ermittelt, das von dem Gerät in einem Fluoreszenzkanal detektiert werden kann (Sack, 2016, Luttmann et al., 2014).

3.3.1.1 Basophilen-Aktivierungstest

Der BAT ist eine auf der Durchflusszytometrie basierende Labormethode zum Nachweis einer *in vitro* Degranulation basophiler Granulozyten nach Stimulation mit einem entsprechenden Allergen. Die Aktivierung basophiler Granulozyten kann durch die vermehrte Expression einzelner Oberflächenproteine nachgewiesen werden, von welchen CD63 als Aktivitätsmarker am häufigsten bestimmt wird. Die Expression von CD63 korreliert dabei mit der durch Stimulation der am IgE-bindenden Rezeptor (FcεRI) fixierten IgE-Antikörper induzierten Histaminausschüttung basophiler Granulozyten (Knol et al., 1991). In der vorliegenden Studie wurde der BAT daher als Surrogatstest einer möglichen IgE-vermittelten allergischen Reaktion vom Soforttyp herangezogen.

Der BAT wurde innerhalb von vier Stunden nach Entnahme einer Vollblutprobe in einem EDTA-Röhrchen gemäß den Herstellerangaben des "*Flow Cast® Basophil Activation Test*" durchgeführt. Bei der Blutentnahme wurde darauf geachtet, das Röhrchen vollständig zu füllen, um eine erhöhte EDTA-Konzentration bei nicht ausreichend gefülltem Röhrchen zu vermeiden. Die Blutproben wurden mit verschiedenen Allergenen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert: PEG in verschiedenem MW von 2000 (Bühlmann: 0,4; 4 mg/ml, Sigma Aldrich: 0,5; 5 mg/ml; verdünnt in PBS), 6000 (0,5; 5 mg/ml; verdünnt in PBS) sowie PEG 2000 Dimyristoylglycerin (DMG), das zur Aufbereitung von LNP in den mRNA-Impfstoffen verwendet wird (0,8; 8 µg/ml; verdünnt in PBS). Zusätzlich wurden Polysorbat 80 (0,1; 1 mg/ml; verdünnt in PBS) sowie die COVID-19 Impfstoffe (ChAdOx1, BNT162b2, mRNA-1273, und Ad26.COV2.S, jeweils unverdünnt (1:1) sowie in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung; verdünnt in PBS) untersucht.

Als Positivkontrollen wurden zum einen ein spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der den IgE-bindenden Rezeptor (FcεRI) bindet und aktiviert (anti-FcεRI), und zum anderen N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) als unspezifischer Zellaktivator eingesetzt. Die Vollblutprobe eines jeden Patienten ohne Allergenzusatz diente als Negativkontrolle.

Zur Versuchsdurchführung wurden zunächst 25 durchflusszytometerkompatible Polystyrolröhrchen mit dem entsprechenden Allergen und der Konzentration sowie der Positiv- und Negativkontrolle beschriftet. Die Vollblutprobe wurde durch vorsichtiges Invertieren durchmischt. Anschließend wurden jeweils 50 µl der jeweiligen Testsubstanz in der entsprechenden Konzentration in das zuvor beschriftete Polystyrolröhrchen pipettiert. Das gleiche Verfahren wurde für die spezifische und die unspezifische Positivkontrolle durchgeführt. Nachfolgend wurden je 100 µl des Flow CAST® Stimulationspuffers in die Polystyrolröhrchen pipettiert. Zusätzlich wurden in jedes Röhrchen 50 µl der Vollblutprobe pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, Blutkontaminationen an den Seitenwänden und am Rand des Röhrchens zu vermeiden. Nach vorsichtigem Mischen der Flüssigkeiten in den Polystyrolröhrchen erfolgte die Zugabe von jeweils 15 µl der Flow CAST® Färbereagenz (bestehend aus Antikörpern, die mit fluoreszierenden Molekülen wie Fluorescein Isothiocyanate (FITC; anti-CD63-FITC) oder Phycoerythrin (PE; anti-CCR3-PE) konjugiert sind). Anschließend wurden die Röhrchen vorsichtig gemischt und 15 Minuten im Wasserbad (37 °C) inkubiert.

In der Durchflusszytometrie ist die Streulichtintensität der Erythrozyten ähnlich der von Lymphozyten, sodass die in einer Patientenprobe enthaltenen Erythrozyten das Streulicht der Lymphozyten überlagern würden. Um die Erythrozyten aus der Patientenprobe zu entfernen, wurden je 2 ml des vorgewärmten (18-28 °C) Flow CAST® Lyseagenz in jedes Polystyrolröhrchen gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 7,5 Minuten bei Raumtemperatur (20-25 °C). Anschließend wurden die Röhrchen bei 1600 rpm (4 °C, 5 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das in den Röhrchen verbliebene Zellpellet mit je 100 µl Flow CAST® Waschpuffer suspendiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometer.

Basophile wurden als CCR3⁺SSC^{low}-Zellen detektiert und deren Aktivierung anhand der Expression von CD63⁺-Basophilen bestimmt. Mit dem BAT analysierte Proben, die einen Anteil von CD63⁺ exprimierenden Basophilen von ≥ 5 Prozent aufwiesen, wurden als positiv eingestuft.

3.4 Serologische Analytik

Im Rahmen der klinischen Untersuchung wurde von jedem Probanden eine Serumprobe entnommen. Dazu wurde das Vollblut zentrifugiert (3.000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und das Serum vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurde das Serum in 50 μ l Proben aliquotiert und bei -30 °C eingefroren. Nach Abschluss der klinischen Evaluation erfolgte die Verwendung der Serumproben für die Analyse des Komplementsystems. Ein Auftauen und erneutes Einfrieren der Proben wurde vermieden.

3.4.1 Sandwich ELISA

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise basiert auf dem Verfahren des sogenannten „*Sandwich*“-ELISA. Hierbei handelt es sich um ein serologisches Analyseverfahren, bei dem Antigene durch die Bindung an spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. An die spezifischen Antikörper sind Enzyme gekoppelt, die den Farbumschlag einer Substratlösung in ein farbiges Produkt katalysieren. Beim *Sandwich*-ELISA binden zwei Antikörper an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens. Der erste Antikörper (*capture antibody*) ist an eine Festphase gebunden. Bei Zugabe der Serumprobe bindet das nachzuweisende Antigen an diesen Antikörper. Der zweite Antikörper (*detection antibody*), der an ein Enzym gekoppelt ist, bindet ebenfalls an das entsprechende Antigen und bildet einen Antikörper-Antigen-Komplex. Das gekoppelte Enzym katalysiert nach Zugabe der Substratlösung den Farbumschlag der zuvor farblosen Lösung. Die Reaktion wird durch eine Stopplösung beendet. Die Farbintensität der einzelnen Proben kann photometrisch gemessen werden. Die Konzentrationen der nachzuweisenden Antigene werden anhand einer mitgeführten Standardkurve mit bekannten Konzentrationswerten ermittelt. Die

optische Dichte (OD) der Standardkurve wird photometrisch bestimmt und gegen die bekannten Konzentrationen auf einer Kalibriergeraden aufgetragen. Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden können die unbekanntes Antigenkonzentrationen der Serumprobe ermittelt werden (Gan and Patel, 2013, Luttmann et al., 2014).

3.4.1.1 C5a ELISA

Die Komplementaktivierung wurde mittels Anti-C5a-ELISA analysiert. Bei einer Aktivierung des Komplementsystems wird durch Spaltung des Komplementfaktors C5 das Anaphylatoxin C5a freigesetzt (Szebeni et al., 2011). C5a kann durch Bindung an spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Diese spezifischen Antikörper binden sowohl C5a als auch C5a des-Arg (C5a Desarginin; entsteht durch Abspaltung von Arginin aus dem C5a-Protein), da C5a ein instabiles Molekül ist, welches rasch enzymatisch zu C5a des-Arg gespalten wird. Die zusätzliche Bindung des entsprechenden Antikörpers an die gespaltene und stabilere Form des Anaphylatoxins erlaubt somit eine zuverlässigere Aussage über die Aktivität des Komplementsystems in den Serumproben.

Maxisorp Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl/Well anti-human C5a/C5a des-Arg-Antikörper (5 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach allen Inkubationsschritten wurden die Platten mit 0,1 % Tween 20 in PBS (PBS/T) gewaschen. Hierbei wurden nach Entleerung der Wells diese drei Mal mit je 200 µl der Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte das Entleeren der Wells durch vorsichtiges Ausklopfen auf saugfähigem Zellstoff. Um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden, wurden die Platten mit 2 % Magermilch in PBS/T blockiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20-25 °C).

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Serumproben auf Eis in FE-Puffer verdünnt. Durch die Verwendung des FE-Puffers konnte eine weitere Komplementreaktion während des Versuchsablaufes inhibiert werden. Beim vorliegenden Versuchsaufbau wurden je 50 µl der zu untersuchenden Proben pro Well pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- Nicht aktivierte Serumproben wurden in FE-Puffer 1:50 und 1:100 (Patientenserum:FE-Puffer) verdünnt. Die durchgeführte Bestimmung von C5a

diente als Ausgangswert für das Anaphylatoxin in den unstimulierten Seren und wurde bei jeder Messung mit den einzelnen Zusätzen als Kontrollwert mitgeführt.

- Als Positivkontrolle für die Komplementaktivierung dienten in Zymosan (10 mg/ml) voraktivierte Seren. Dazu wurden die Serumproben im Verhältnis von 1:10 (Zymosan:Serumprobe) vorverdünnt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung von 1:100 und 1:1000 in FE-Puffer (Serum-Zymosan-Gemisch:FE-Puffer).

- Zur Bestimmung des C5a-Bildungspotentials der COVID-19 Impfstoffe (BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1, Ad26.COV2.S) wurden diese zunächst in PBS verdünnt (50 % Impfstoff:50 % PBS). Anschließend wurden die Serumproben im Verhältnis 1:10 (vorverdünnter Impfstoff:Serum) mit dem Impfstoff versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Verdünnung in FE-Puffer im Verhältnis von 1:100 (Serum-Impfstoff-Gemisch:FE-Puffer).

- Zur Bestimmung der Komplementaktivierung durch PEG 6000 (500 mg/ml) wurde dieses mit der jeweiligen Serumprobe im Verhältnis 1:10 (PEG 6000:Serum) gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Verdünnung in FE-Puffer im Verhältnis 1:100 (Serum-PEG 6000-Gemisch:FE-Puffer).

Zur Detektion wurden 50 µl biotinylierter anti-human C5a/C5a-des-Arg-Antikörper (0,25 µg/ml) in jedes Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 50 µl/Well Streptavidin-Peroxidase (0,2 µg/ml) in jedes Well pipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl/Well des Peroxidasesubstrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) erfolgte ein Farbumschlag. Die Farbintensität korrelierte dabei mit der Konzentration der Anaphylatoxine in den jeweiligen Serumproben. Die Reaktion wurde nach ca. acht Minuten durch die Zugabe von 100 µl/Well 1 M HCl gestoppt. Die OD wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

Die Validierung des C5a-ELISA ergab eine Intraassay-Standardabweichung von 10 %. Daher wurden alle Proben, die nach Stimulation mit einem Stimulans einen Anstieg der C5a-Konzentration von mehr als 10 % gegenüber dem unstimulierten Wert aufwiesen, als reaktiv eingestuft.

3.5 Statistische Auswertung

Die BAT-Messungen wurden mit Hilfe des Programmes FlowJo™ ausgewertet. Für die Komplementanalyse wurden Standardkurven mit GraphPad Prism Version 9 für Macintosh erstellt und die Ergebnisse aus den Absorptionswerten mittels nichtlinearer Regression berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Proben auf die Standardkurve normiert und als „arbitrary unit“ (arb. unit) ausgedrückt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Version 9 für Macintosh.

Bei parametrischer Verteilung der Daten wurden statistische Vergleiche zwischen den verschiedenen Subgruppen mittels „one-way ANOVA“ (Tukey's multipler Vergleichstest) durchgeführt.

Die Auswertung des Komplementaktivierungspotential erfolgte bei parametrisch verteilten Daten mit einem gepaarten T-Test und bei nicht parametrisch verteilten Daten mittels „Wilcoxon matched-pairs“ Test.

Die Korrelation zwischen Lagerungsdauer und C5a Spiegel der Serumproben wurde mittels einfacher linearer Regression ermittelt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Somit ergaben sich signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p<0,05$.

Die ermittelten Daten wurden zur grafischen Veranschaulichung in Punktdiagrammen dargestellt. Der Median wurde in den Punktdiagrammen als schwarzer Balken dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Studienteilnehmer und klinische Ergebnisse

Die Studie wurde zwischen Januar 2021 und April 2022 durchgeführt. Insgesamt erfolgte der Einschluss von 67 Probanden in die vorliegende Studie.

Das Durchschnittsalter der Studienpopulation betrug 51 Jahre (21-73 Jahre), die Mehrheit war weiblich (80,6 %; Tab. 1). Von den 67 Probanden hatten 55,2 % (n=37) vor der Studienteilnahme keine COVID-19 Impfung erhalten, während 29,9 % (n=20) eine Dosis und 14,9 % (n=10) zwei Dosen des COVID-19 Impfstoffs erhalten hatten. Der mediane Gesamt-IgE-Spiegel aller Probanden betrug 44,9 kU/l (2-988 kU/l) und der mediane Tryptasespiegel 4,8 µg/l (1-67,3 µg/l). 44,8 % (n=30) der Probanden berichteten über eine allergische Rhinitis und/oder Asthma in der Anamnese und 29,9 % (n=20) über eine Anaphylaxie. Sieben Probanden (10,4 %) gaben sowohl eine bekannte allergische Rhinitis/Asthma als auch eine Anaphylaxie in der Anamnese an, davon fünf (7,5 %) mit positivem und zwei (3 %) mit negativem Hauttest. 25,5 % (n=17) der Probanden wurden als NAC ohne bekannte Allergie in der Anamnese eingestuft. 10,4 % (n=7) der Probanden berichteten in der Anamnese über verschiedene Allergien (z.B. Nahrungsmittel-und/oder Arzneimittelallergien), die nicht in die in dieser Studie verwendete Subgruppenklassifikation eingeordnet werden konnten. Diese Probanden wurden daher als „Sonstige“ bezeichnet und keine weitere Analyse dieser Probanden durchgeführt.

Tab.1: Probandencharakteristika

Probandencharakteristika	Alle n=67 (100 %)	Hauttest positiv n=15 (22.4 %)	Hauttest negativ n=52 (77.6 %)
Alter, Jahre			
Median (Spannweite)	51 (21-73)	51 (22-65)	51 (21-73)
Geschlecht, n (%)			
Weiblich	54 (80.6)	15 (100)	39 (75)
Männlich	13 (19.4)	0	13 (25)
COVID-19 Impfung erhalten, n (%)			
Keine	37 (55.2)	11 (73.3)	26 (50)
1 Impfung	20 (29.9)	3 (20)	17 (32.7)
2 Impfungen	10 (14.9)	1 (6.7)	9 (17.3)
Gesamt IgE, kU/l			
Median (Spannweite)	44.9 (2-988)	40.8 (2-988)	45 (2-521)
Tryptase, µg/l			
Median (Spannweite)	4.8 (1-67.3)	4.2 (1.9-11.3)	4.9 (1-67.3)
Medizinische Vorgeschichte, n (%)			
Allergische Rhinitis/ Asthma	30 (44.8)	7 (46.7)	23 (44.2)
Anaphylaxie	20 (29.9)	8 (53.3)	12 (23.1)
NAC	17 (25.4)	0	17 (32.7)
Sonstige	7 (10.4)	5 (33.3)	2 (3.8)

4.2 Hauttestergebnisse

Bei allen Studienteilnehmern wurden SPT und IDT mit Impf- und Hilfsstoffen durchgeführt, um eine Sensibilisierung als möglichen Hinweis auf eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I festzustellen (Tab. 1, Tab. 2). Der IDT wurde nur durchgeführt, wenn der SPT für die jeweilige Substanz negativ war. Fünfzehn (22,4 %) Probanden zeigten mindestens ein positives Hauttestergebnis. Sieben (47,7 %; P1, P4, P6, P8, P9, P12, P15; Tab. 1, Tab. 2) dieser Probanden berichteten über eine allergische Rhinitis und/oder Asthma und acht (53,3 %; P4, P6-8, P11, P12, P14, P15; Tab. 1, Tab. 2) über eine Anaphylaxie in der Anamnese. Die 52 (77,6 %) Probanden mit negativem Hauttest unterteilten sich in 44,2 % (n=23) Probanden mit allergischer Rhinitis und/oder Asthma, 23,1 % (n=12) Probanden mit Anaphylaxie und 32,7 % (n=17) NAC ohne bekannte Allergien.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den IgE-Werten und Tryptase-Werten zwischen Hauttest-positiven und -negativen Probanden beobachtet.

Sieben (46,7 %) der fünfzehn Probanden mit positivem Hauttest zeigten sowohl im SPT als auch im IDT ein positives Ergebnis auf jeweils unterschiedliche Substanzen (Tab. 2). Bei zwei (13,3 %) Probanden wurde nur ein positives Ergebnis im SPT beobachtet, während sechs (40 %) Probanden nur im IDT ein positives Ergebnis aufwiesen.

Zwei Probanden (13,3 %; P9, P10) zeigten eine positive SPT-Reaktion auf den mRNA-1273 Impfstoff und jeweils ein Proband (6,7 %) reagierte auf die anderen getesteten Impfstoffe (BNT162b2 (P9), ChAdOx1 (P7), Ad26.COVS.2.S (P8)). Interessanterweise zeigte sich bei vier der fünf Fälle mit positivem SPT-Ergebnis nur beim unverdünnten Impfstoff ein positives Hauttestergebnis, während bei den niedrigeren Impfstoffkonzentrationen kein positives Ergebnis nachgewiesen werden konnte. Von den im SPT getesteten Hilfsstoffen reagierte ein Proband (6,7 %; P2) auf PEG 400, fünf (33,3 %; P1, P3, P8, P11, P13) auf PEG 6000 und zwei (13,3 %; P1, P10) auf Polysorbat 80 (Tab. 2).

Im IDT reagierten drei Probanden (20 %; P5, P9, P15) positiv auf PEG 2000 (Tab. 2). Jeweils ein Proband (6,7 %) reagierte auf PEG 6000 (P9) und Polysorbat 80 (P11). Positive IDT-Ergebnisse für den BNT162b2 Impfstoff

wurden bei sechs Probanden (40 %; P1, P4, P7, P10, P13, P14) beobachtet, gefolgt von vier Probanden (26,7 %; P4, P6, P12, P13) mit positiven IDT-Ergebnissen für den mRNA-1273 Impfstoff. Jeweils zwei Probanden (13,3 %) zeigten eine Reaktion auf die Impfstoffe ChAdOx1 (P1, P3) und Ad26.COV2.S (P1, P7).

Insgesamt wurden bei neun Probanden (60 %; P1-3, P5, P8, P9, P11, P13, P15) positive Hauttestergebnisse für PEG unterschiedlicher Molekulargewichte beobachtet. Für Polysorbat wiesen drei Probanden (20 %; P1, P10, P11) ein positives Hauttestergebnis auf. Von den getesteten Impfstoffen zeigten sieben Probanden (46,7 %; P1, P4, P7, P9, P10, P13, P14) ein positives Hauttestergebnis für den BNT162b2-Impfstoff, sechs (40 %; P4, P6, P9, P10, P12, P13) für den mRNA-1273-Impfstoff, drei (20 %; P1, P3, P7) für den ChAdOx1-Impfstoff und drei (20 %; P1, P7, P8) für den Ad26.COV2.S-Impfstoff.

Bei sechs Probanden (40 %; P1, P3, P8-10, P13) wurde eine positive Hautreaktion sowohl auf die getesteten Impfstoffe als auch auf die Hilfsstoffe nachgewiesen. Dabei handelte es sich bei zwei Probanden (13,3 %; P1, P9) um positive Hautreaktionen auf Impfstoffe und darin enthaltene Hilfsstoffe, während bei drei Probanden (20 %; P3, P8, P10) positive Hautreaktionen auf Hilfsstoffe beobachtet wurden, die nicht in den positiv getesteten Impfstoffen enthalten waren. Ein Proband (6,7 %; P13) zeigte eine positive Hautreaktion sowohl auf BNT162b2, mRNA-1273 als auch auf PEG 6000, während für das in den Impfstoffen enthaltene PEG 2000 kein positives Hauttestergebnis nachgewiesen wurde.

Vier Probanden (26,7 %; P2, P5, P11, P15) zeigten eine positive Hauttestreaktion (SPT oder IDT) auf die Impfstoffhilfsstoffe nicht jedoch für die getesteten Impfstoffe selbst (Tab. 2). Eine positive Hauttestreaktion auf einen der getesteten Impfstoffe (BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1, Ad26.COV2.S), nicht jedoch die Hilfsstoffe wurde bei fünf Probanden (33,3 %; P4, P6, P7, P12, P14) beobachtet.

Insgesamt zeigten somit 22 % der Studienteilnehmer ein positives Ergebnis im Hauttest. Alle diese Probanden (100 %) waren weiblichen Geschlechts. Positive Reaktionen auf die Impfstoffe wurden bei 73,3 % dieser Probanden beobachtet,

am häufigsten auf BNT162b2 und mRNA-1273. 26,7 % der Probanden reagierten nur auf die Impfstoffhilfsstoffe und nicht auf die Impfstoffe selbst.

Tab. 2: Positive Ergebnisse der Hauttests (SPT und IDT)

SPT																		
PEG 400	1.1 g/ml	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEG 2000	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEG 2000	10 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEG 2000	50 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PEG 6000	1 mg/ml	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-		
PEG 6000	10 mg/ml	■	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-		
PEG 6000	50 mg/ml	■	-	■	-	-	-	-	■	-	-	■	-	■	-	-		
Polysorbat 80	1 mg/ml	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Polysorbat 80	10 mg/ml	■	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-		
BNT162b2	1:10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BNT162b2	1:1	-	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-		
mRNA-1273	1:10	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x		
mRNA-1273	1:1	x	x	x	-	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	x	x	
ChAdOx1	1:10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	
ChAdOx1	1:1	-	-	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	x	
Ad26.COVS.S	1:10	-	x	x	-	-	-	-	-	■	-	-	x	-	x	-	x	
Ad26.COVS.S	1:1	-	x	x	-	x	-	-	-	■	-	-	x	-	x	-	x	
IDT																		
PEG 2000	1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	
PEG 2000	10 mg/ml	-	-	-	-	■	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	
PEG 6000	1 mg/ml	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	
PEG 6000	10 mg/ml	x	-	x	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	x	-	-	
Polysorbat 80	0.1 mg/ml	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	
Polysorbat 80	1 mg/ml	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	■	-	-	-	-	-	
BNT162b2	1:100	■	-	-	■	-	-	■	-	x	■	-	-	■	■	-	-	
mRNA-1273	1:100	x	x	x	■	-	■	-	-	x	x	-	■	■	x	x	-	
ChAdOx1	1:100	■	-	■	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	
Ad26.COVS.S	1:100	■	x	x	x	x	-	■	x	-	-	x	-	x	-	x	-	x
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
							★	★	★	★	★	★	★	★	★			
		Patient																

■ = positives Hauttestergebnis; - = negatives Ergebnis im Hauttest; x = nicht getestet; ★ = Proben, die auf Komplementaktivität getestet wurden.

4.3 Basophilen-Aktivierungstest (BAT)

Um die Mechanismen einer IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion zu untersuchen, wurde der BAT bei Probanden mit positiven Hauttestergebnissen durchgeführt (n=15; 22,4 %). Weitere sechs (9 %) Probanden mit negativen Hauttestergebnissen konnten für den BAT rekrutiert werden. Somit wurde bei insgesamt 21 (31,3 %) der Probanden eine Untersuchung mittels BAT durchgeführt. Eine der untersuchten Blutproben musste aufgrund einer Basopenie von der BAT-Analyse ausgeschlossen werden.

Insgesamt wiesen vier Probanden (19 %) eine erhöhte Anzahl CD63⁺ Basophiler von mehr als fünf Prozent für mindestens eine der getesteten Substanzen auf. Alle vier Probanden zeigten dabei auch ein positives Ergebnis im Hauttest. Bei keiner der Probanden mit negativem Hauttestergebnis wurde ein auffälliger BAT mit einer Anzahl CD63⁺ Basophiler von ≥ 5 % beobachtet.

Für Proband 1 konnte ein positives Ergebnis von 14,5 % CD63⁺ Basophilen nach Stimulation mit PEG 2000 in einer Konzentration von 0,4 mg/ml (Bühlmann) nachgewiesen werden (Abb. 2A). PEG 2000 DMG und PEG mit höherem Molekulargewicht zeigten keine erhöhten Werte an CD63⁺ Basophilen. Darüber hinaus stellten sich bei Proband 1 nach Stimulation mit dem reinen BNT162b2-Impfstoff 7,13 % CD63⁺ Basophile dar, während niedrigere Verdünnungen zu keiner Erhöhung aktivierter Basophiler führten (Abb. 2F).

Proband 3 präsentierte einen erhöhten Prozentsatz von CD63⁺ Basophilen (26,6 %) nach Stimulation mit PEG DMG in einer Verdünnung von 0,8 µg/ml (Abb. 2A). Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression von CD63⁺ Basophilen in allen getesteten Verdünnungen des BNT162b2-Impfstoffs beobachtet: 1:100 (60,7 %), 1:10 (67 %) und 1:1 (52,1 %), was der höchsten Konzentration von CD63⁺ Basophilen im gesamten Experiment entsprach (Abb. 2F). Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von CD63 für den ChAdOx1-Impfstoff in der Verdünnung 1:10 (14,8 %) sowie für den reinen Impfstoff (15,8 %) ermittelt (Abb. 2E), während für den im ChAdOx1-Impfstoff enthaltenen Hilfsstoff Polysorbat 80 kein positives Ergebnis erzielt wurde.

Bei Proband 4 wurde nach Stimulation mit dem mRNA-1273-Impfstoff in der Verdünnung 1:10 eine erhöhte Expression von CD63 (5,4 %) bestimmt (Abb. 2G).

Proband 14 präsentierte nach Stimulation mit der 1:10 Verdünnung (7,2 %) und dem reinen ChAdOx1-Impfstoff (7,1 %) eine erhöhte Expression von CD63⁺-Basophilen (Abb. 2E).

Für PEG 6000, Polysorbat 80 sowie den Impfstoff Ad26.COVS.2 wurde in keiner der im BAT untersuchten Proben ein positives Ergebnis festgestellt (Abb. 2C, D, H).

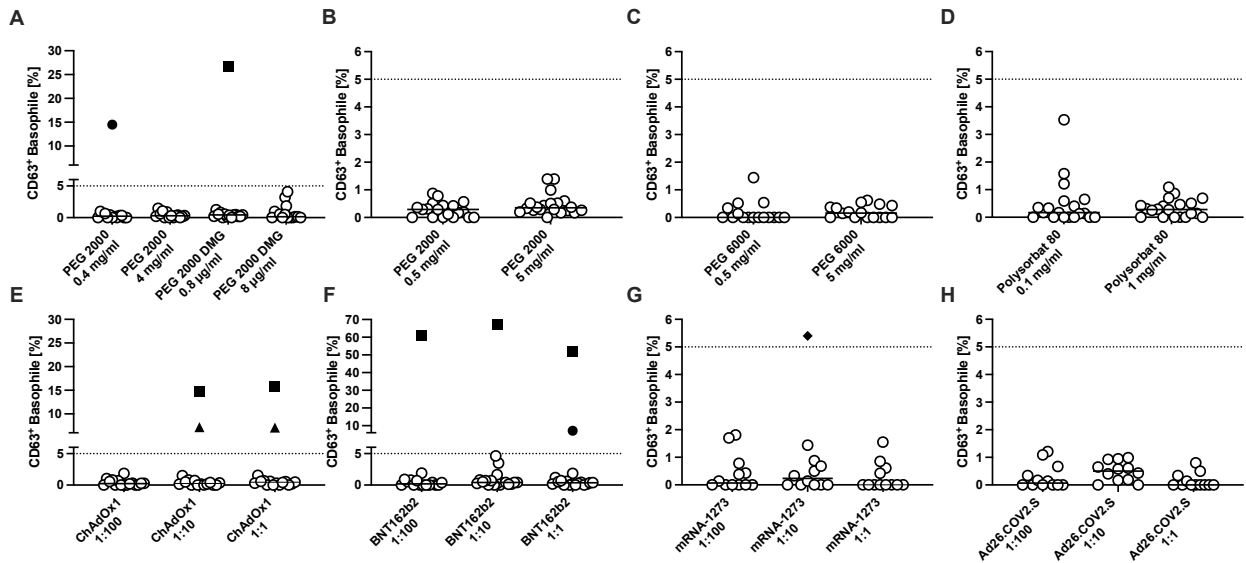


Abb. 2: Reaktionen im Basophilen-Aktivierungstest (BAT)

Der Anteil an CD63⁺ Basophilen wurde nach Stimulation mit den Substanzen (A) PEG 2000/ PEG 2000 DMG (Bühlmann), (B) PEG 2000 (Sigma Aldrich), (C) PEG 6000 und (D) Polysorbat 80 sowie mit den COVID-19 Impfstoffen (E) ChAdOx1, (F) BNT162b2, (G) mRNA-1273 und (H) Ad26.COV2.S gemessen. Proben mit mehr als 5% CD63⁺ Basophilen wurden als positiv gewertet und hervorgehoben: ●= Proband 1; ■= Proband 3; ◆= Proband 4; ▲= Proband 14. Der Median ist als schwarze Linie angegeben. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Schwellenwert von 5 %.

4.4 Komplement Analyse

Neben einem IgE-vermittelten Mechanismus kommt auch eine Aktivierung des Komplementsystems als mögliche Ursache für unerwünschte Ereignisse nach einer COVID-19 Impfung in Betracht. Die Aktivierung des Komplementsystems, kann sich klinisch ähnlich wie eine IgE-vermittelte Allergie mit möglichen Symptomen wie Hypotonie, Luftnot, Angioödem, Pruritus und Husten präsentieren. Zur Untersuchung einer CARPA wurden in der vorliegenden Studie 34 Probandenproben (50,7 %) auf eine Komplementaktivierung durch einen Impfstoff- oder Hilfsstoff untersucht (Abb. 1, Tab. 2, Abb. 3-7). Dabei wurden folgende Untergruppen von Probanden unterschieden: Neun Proben stammten von Hauttest-positiven Probanden (26,5 %) und 25 von Hauttest-negativen Probanden (73,5 %). Eine weitere Unterteilung erfolgte anhand der Anamnese in Probanden mit allergischer Rhinitis und/oder Asthma (n=16, 47,1 %), mit einer

Anaphylaxie in der Vorgeschichte (n=11, 32,4 %) und NAC ohne bekannte Allergien (n=7, 20,6 %; Tab. 1).

Zunächst wurden die Ausgangswerte gemessen. In allen Proben wurden ähnliche Serumspiegel des Komplement-Anaphylatoxins C5a bestimmt (Abb. 3A). Da sich die Komplement-Anaphylatoxin-Konzentrationen während der Lagerung verändern können, wurden die C5a-Konzentrationen mit den Tagen der Lagerung bei -30 °C korreliert (Abb. 3B). Obwohl ein leichter Anstieg der C5a-Konzentration nach längerer Lagerung beobachtet wurde, konnte keine signifikante Korrelation zwischen der C5a-Konzentration im Serum und der Lagerungsdauer festgestellt werden.

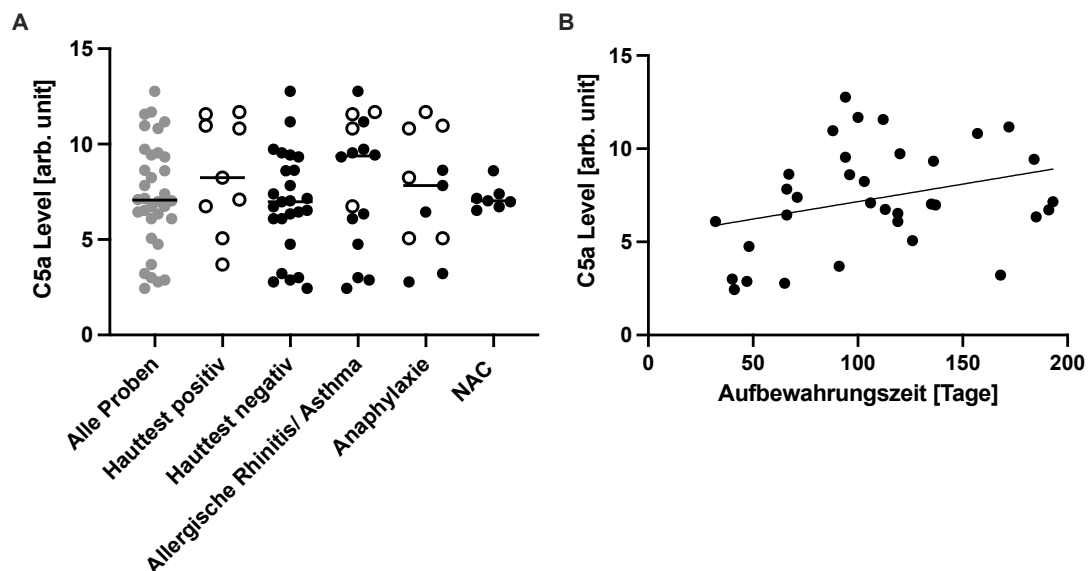


Abb. 3: Probanden mit positiven Hautreaktionen auf COVID-19 Impfstoffe/Impfstoffzusatzstoffe zeigten ähnliche C5a-Spiegel wie nichtreaktive Kontrollgruppen.

(A) Die Anaphylatoxin C5a-Konzentrationen wurden in 34 Probandenserumproben mittels ELISA bestimmt. Es wurden keine Unterschiede zwischen den C5a-Spiegeln von Hauttest-positiven (n=9) und -negativen Probandenproben (n=25) beobachtet. Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede zwischen den C5a-Spiegeln von Probanden mit unterschiedlicher Krankheitsgeschichte (One-way ANOVA, Tukey's multipler Vergleichstest); ○ = Hauttest positiv, ● = Hauttest negativ, schwarze Linie = Median

(B) Die Lagerungszeit bei -30 °C (in Tagen) hatte keinen Einfluss auf die gemessenen C5a-Spiegel in den Probandenseren (einfache lineare Regression, slope=0,01875, R²=0,09547, p=0,0754).

4.4.1 Komplementaktivierung durch Zymosan

Die Bestimmung der Anaphylatoxinkonzentration im Serum spiegelte den *in vivo* Aktivierungszustand der Komplementkaskade wieder (Abb. 3). Das verbleibende reaktive Potential des Komplementsystems wurde durch Stimulation der Seren mit Zymosan quantifiziert. Proben, die nach Stimulation mit einem Stimulans einen Anstieg der C5a-Konzentration von mehr als 10 % gegenüber dem unstimulierten Wert aufwiesen, wurden als reaktiv bewertet. Eine Stimulation mit Zymosan erfolgte bei insgesamt 34 Probandenproben (Abb. 4). In allen mit Zymosan stimulierten Proben wurde ein signifikanter Anstieg der C5a-Konzentration beobachtet ($p < 0,0001$, Abb. 4). Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungspotential zwischen Hauttest-positiven und -negativen Proben oder zwischen Proben mit unterschiedlicher Anamnese beobachtet. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass das Komplementsystem in allen Serumproben voll funktionsfähig und eine weitere Aktivierung *in vitro* möglich war.

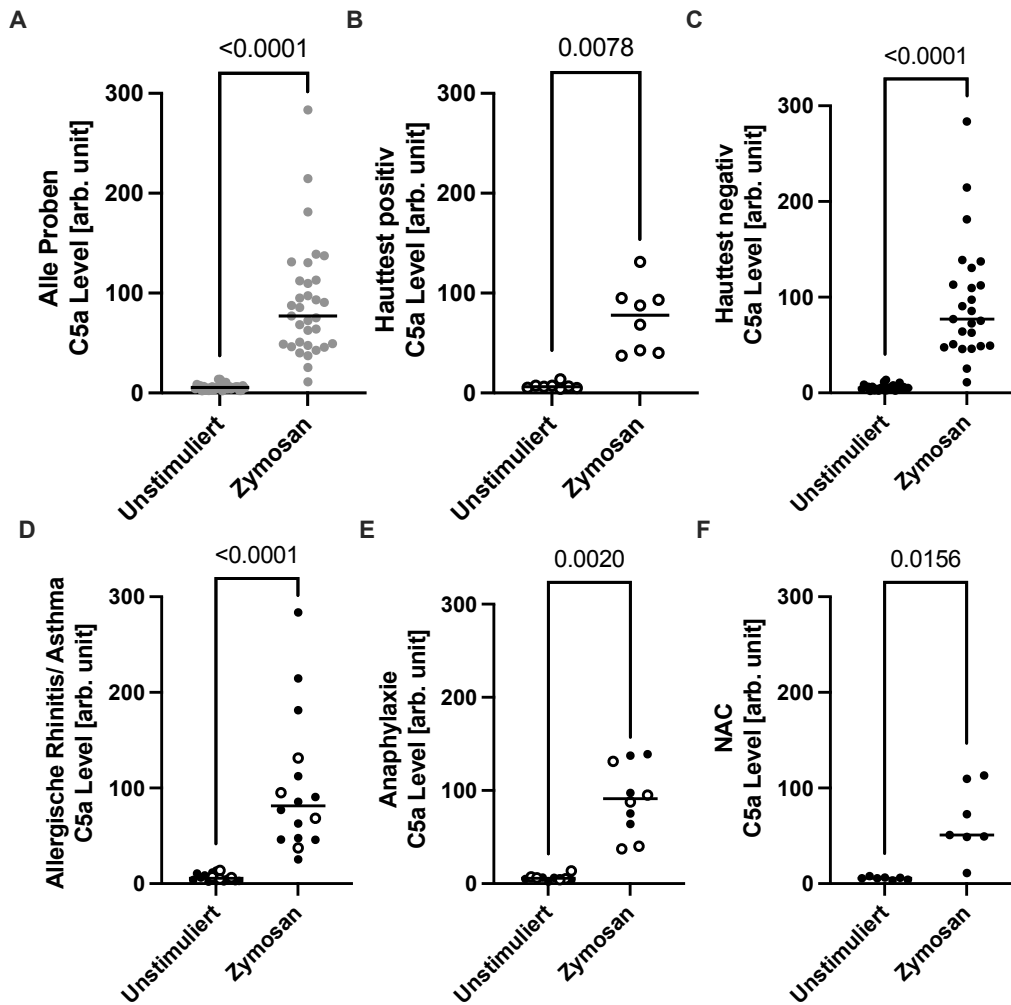


Abb. 4: Induktion der Bildung von Anaphylatoxin C5a in Serumproben durch Zy mosan.

Die C5a-Konzentrationen in den Serumproben (n=34) ohne und mit Zy mosanzusatz wurde mittels ELISA verglichen. Alle Proben zeigten eine signifikante C5a-Bildung durch Zy mosan (Wilcoxon Matched-Pairs Test); ○ = Hauttest positiv, ● = Hauttest negativ, schwarze Linie = Median.

4.4.2 Komplementaktivierung durch PEG

Um die Wirkung von PEG auf die Bildung von C5a in Probandenserum zu untersuchen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die C5a-Konzentration vor und nach Zugabe von PEG zu den Serumproben mittels ELISA gemessen wurde. Unter der Annahme einer höheren Wahrscheinlichkeit der Komplementaktivierung bei höherem Molekulargewicht, wurde dabei PEG mit einem Molekulargewicht von 6000 verwendet (Abb. 5). Eine signifikante Erhöhung der C5a-Konzentration ($p < 0,0001$) wurde in allen Serumproben nach Zugabe von PEG 6000 beobachtet (Abb. 5A). Insgesamt war die Reaktivität

jedoch geringer als nach der Zugabe von Zymosan (Abb. 4). Weitere Analysen zeigten, dass die C5a-Konzentration bei Hauttest-negativen Probanden nach Stimulation mit PEG 6000 signifikant anstieg (Abb. 5C-F), jedoch nicht bei Hauttest-positiven Probanden (Abb. 5B).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungspotential zwischen positiven und negativen Hauttestproben oder zwischen Proben mit unterschiedlicher Anamnese festgestellt.

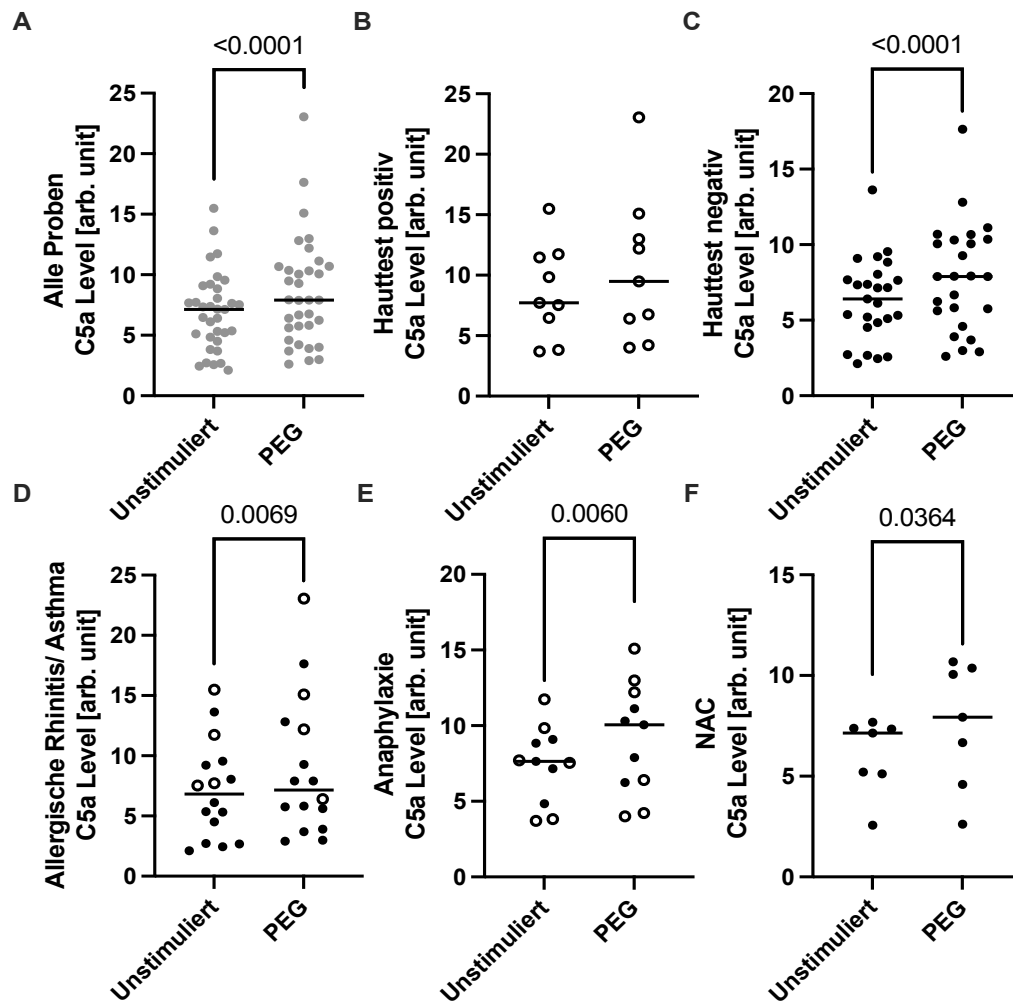


Abb. 5: Induktion der Bildung von Anaphylatoxin C5a in Serumproben durch PEG 6000.

Die Komplementaktivierung durch PEG 6000 in Lösung wurde durch Quantifizierung der C5a-Konzentrationen im ELISA bestimmt. Die C5a-Konzentrationen in Serumproben, mit und ohne Zugabe von PEG 6000, wurden verglichen. (A) Alle Proben (n=34), (C) Proben von Probanden mit negativem Hauttest (n=25), (D) Proben von Probanden mit allergischer Rhinitis/Asthma in der Anamnese (n=16), (E) Proben von Probanden mit Anaphylaxie in der Anamnese (n=11) und (F) von NAC (n=7) zeigten einen signifikanten Anstieg der C5a-Konzentration nach Inkubation mit PEG 6000. Zwischen unstimulierten und mit PEG 6000 stimulierten Proben (B) mit positivem Hauttest (n=9) konnte kein signifikanter Unterschied in der C5a-Konzentration festgestellt werden (gepaarter T-Test) ○ = Hauttest positiv, ● = Hauttest negativ, schwarze Linie = Median.

4.4.3 Komplementaktivierung durch COVID-19 Impfstoffe

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Komplementanalysen wurden dieselben Serumproben auf Veränderungen des C5a-Spiegels im Serum nach Stimulation mit den COVID-19 Impfstoffen BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1 und Ad26.COV2.S untersucht. Von den 34 untersuchten Proben zeigten acht Probanden (23,5 %) einen Anstieg des C5a-Spiegels nach Stimulation mit mindestens einem der Impfstoffe (Abb. 6). Dieser Anstieg wurde bei einem gleichen Anteil von Probanden mit positivem (Abb. 6B) oder negativem Hauttest (Abb. 6C) beobachtet.

Insgesamt zeigten fünf (14,7 %) Proben eine Aktivierung durch den BNT162b2-Impfstoff, vier (11,7 %) durch mRNA-1273, drei (8,8 %) Proben durch den ChAdOx1-Impfstoff und in insgesamt drei (8,8 %) Proben wurde das Komplementsystem durch Ad26.COV2.S aktiviert. Während bei acht Proben eine Impfstoffaktivierung festgestellt wurde, konnte interessanterweise nur bei vier (11,7 %) dieser Proben eine zusätzliche Aktivierung von mehr als 10 % durch die Stimulation mit PEG nachgewiesen werden (Abb. 6).

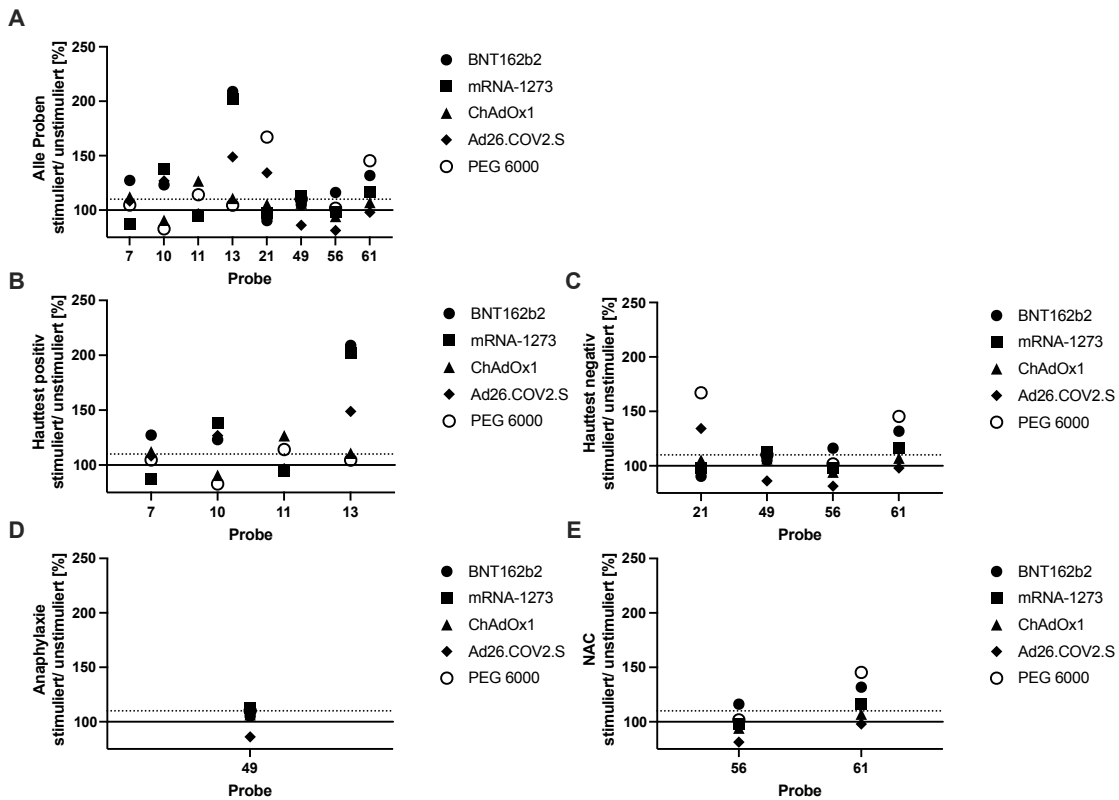


Abb. 6: Durch COVID-19 Impfstoffe induzierte Komplementaktivierung in einzelnen Serumproben.

Proben, die einen Anstieg von mindestens 10 % (ELISA-Intraassay-Standardabweichung, gestrichelte Linien) gegenüber dem C5a Wert der unstimulierten Kontrolle (100 %, schwarze Linie) aufwiesen, wurden als reaktive Seren gewertet.

(A) Insgesamt wiesen acht (23,5 %) der 34 Proben eine Aktivierung über dem Schwellenwert von 10 % auf, darunter (B) vier (11,8 %) der Probanden mit positivem Hauttest, (C) vier Probanden (11,8 %) mit negativem Hauttest, (D) ein Proband (2,9 %) mit Anaphylaxie in der Anamnese und (E) zwei Probanden (5,9 %) ohne bekannte Allergie (NAC).

Darüber hinaus konnte beim Vergleich der durch die verschiedenen Impfstoffe stimulierten C5a-Spiegel mit dem PEG 6000-Aktivierungspotential keine Korrelation festgestellt werden (Abb. 7A-D).

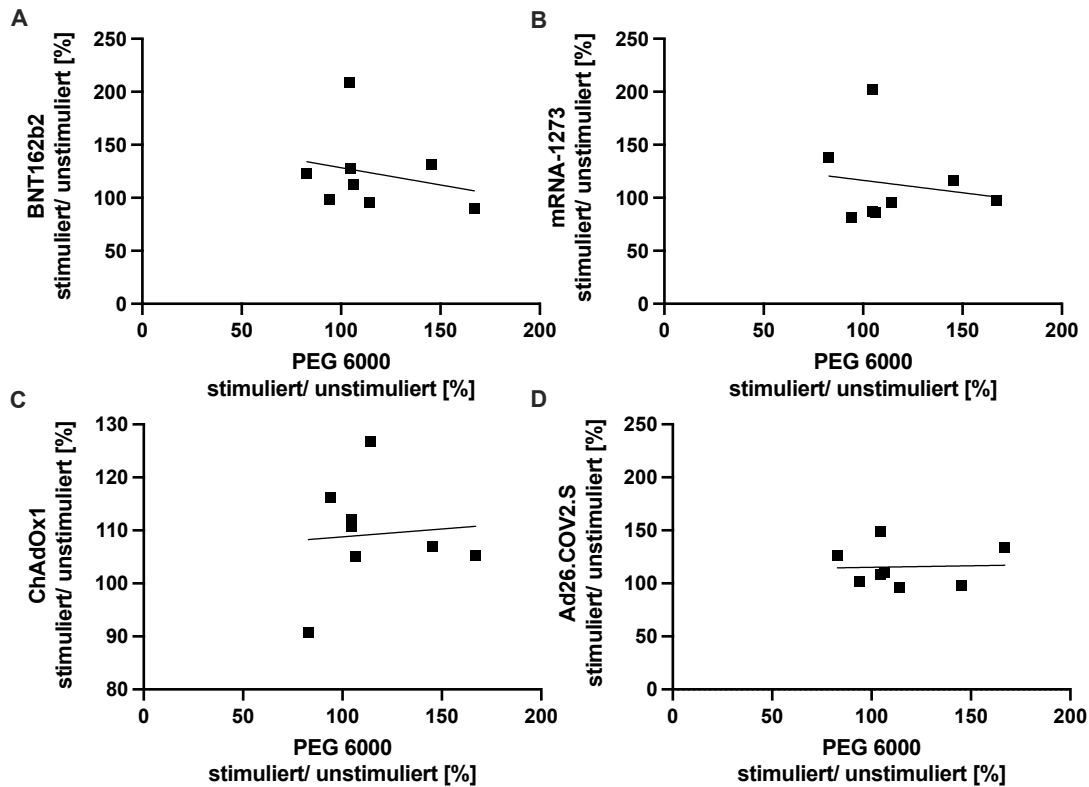


Abb. 7: Zusammenhang der durch COVID-19 Impfstoffe induzierten C5a-Bildung mit der aktivierenden Wirkung von PEG 6000 auf das Komplementsystem.

Das Komplement-Aktivierungspotential von BNT162b2-, mRNA-1273-, ChAdOx1- und Ad26.COVS.S wurde mit dem Aktivierungspotential von PEG 6000 verglichen. Eine signifikante Korrelation konnte nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende *in vitro* Studie, dass das Komplementsystem bei einer kleinen Anzahl von Probanden durch COVID-19 Impfstoffe aktiviert wurde. Diese Aktivierung war jedoch nicht konsistent mit der Aktivierung durch PEG.

4.5 Korrelation zwischen Hauttests, Basophilen-Aktivierungstest und Komplementanalyse

Der Mechanismus einer allergischen bzw. hypersensitiven Reaktion gegenüber den COVID-19 Impfstoffen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In dieser Studie konnten wir feststellen, dass eine positive Reaktion im BAT auf Impfstoff- oder deren Hilfsstoffe nicht gleichbedeutend war mit einer positiven Reaktion des Komplementsystems und umgekehrt (Tab. 3). Es zeigten sich jedoch einige

Überschneidungen zwischen Substanzen, die sowohl im BAT als auch in der Komplementanalyse positive Reaktionen hervorriefen, und Substanzen, für die im Hauttest positive Reaktionen beobachtet wurden.

Proband 1 zeigte eine positive Hauttestreaktion auf PEG und den Impfstoff BNT162b2, die beide zu einer erhöhten Expression von CD63⁺-Basophilen führten.

Proband 3 präsentierte ein positives Hauttestergebnis für PEG und den Impfstoff ChAdOx1. Beide führten nach Stimulation zu einer positiven Reaktion im BAT.

Für Proband 4 konnte eine positive Hauttestreaktion auf BNT162b2 und den mRNA-1273-Impfstoff nachgewiesen werden, wobei der mRNA-1273-Impfstoff zu einer erhöhten Aktivierung von CD63⁺-Basophilen im BAT führte.

Proband 7 wies ein positives Hauttestergebnis für den BNT162b2-Impfstoff und den ChAdOx1-Impfstoff auf, die beide zu einem Anstieg der nachgewiesenen C5a-Spiegel führten.

Bei Proband 10 stellte sich ein positives Hauttestergebnis für den BNT162b2-Impfstoff und den mRNA-1273-Impfstoff dar, welches mit der Komplementaktivierung durch die entsprechenden Impfstoffe übereinstimmte.

Für Proband 11 wurde ein positives Hauttestergebnis für PEG und Polysorbat nachgewiesen, wobei PEG zu einer Erhöhung des C5a-Spiegels führte, ebenso wie der Polysorbat-haltige Impfstoff ChAdOx1.

Bei Proband 13 wurde eine positive IDT-Reaktion für BNT162b2 und mRNA-1273 beobachtet, was mit einer Aktivierung des Komplementsystems nach Stimulation beider Impfstoffe korrespondierte.

Insgesamt wurde bei drei Probanden eine Übereinstimmung zwischen positiver Hauttestreaktion und positivem BAT festgestellt, was auf einen möglichen IgE-vermittelten Mechanismus bei der Auslösung von Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber der COVID-19 Impfung hinweisen könnte. Eine Anzahl von vier Proben zeigte jedoch eine Übereinstimmung zwischen der Hauttestreaktion und einer Komplementaktivierung, was die Hypothese eines ausschließlich IgE-vermittelten Immunmechanismus nicht unterstützt.

Tab. 3: Probanden mit positivem Hauttest sowie positivem Basophilen-Aktivierungstest (BAT) und/oder Komplementtest

Proband	Hauttest	BAT	Komplement Trigger
1	PEG Polysorbat BNT162b2 ChAdOx1 Ad26.COVS2.S	PEG BNT162b2	-
3	PEG ChAdOx1	PEG BNT162b2 ChAdOx1	-
4	BNT162b2 mRNA-1273	mRNA-1273	-
14	BNT162b2	ChAdOx1	-
7	BNT162b2 ChAdOx1 Ad26.COVS2.S	-	BNT162b2 ChAdOx1
10	Polysorbat BNT162b2 mRNA-1273	-	BNT162b2 mRNA-1273 Ad26.COVS2.S
11	PEG Polysorbat	-	PEG ChAdOx1
13	PEG BNT162b2 mRNA-1273	-	BNT162b2 mRNA-1273 Ad26.COVS2.S

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit Probanden mit bekannten Allergien ein erhöhtes Risiko für eine IgE- und/oder Komplement-vermittelte Hypersensitivität gegenüber PEG/Polysorbat-haltigen Impfstoffen aufweisen. Dabei können sowohl humorale, zelluläre als auch vom Komplementsystem abhängige Mechanismen eine Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass COVID-19 Impfstoffe und deren Hilfsstoffe sowohl die Aktivierung basophiler Granulozyten als auch die Komplementaktivierung in einigen Blutproben von Probanden mit bekannten Allergien oder Anaphylaxien stimulieren können. Eine Komplementaktivierung wurde jedoch auch bei Probanden der Kontrollgruppe beobachtet. Eine Verallgemeinerung dieser Einzelbeobachtungen war daher nicht möglich. Bei der Mehrzahl der untersuchten Probanden wirkten die COVID-19 Impfstoffe nicht als Immunogene für Basophile oder das Komplementsystem, unabhängig von einer möglichen Allergie/Anaphylaxie in der Vorgeschichte.

5.1 IgE-vermittelter Mechanismus möglicher allergischer Reaktionen auf PEG und die COVID-19 Impfstoffe

In der Literatur wurden bereits eine Reihe von IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber PEG beschrieben (Stone et al., 2019a, Zhou et al., 2021). Eines der Ziele dieser Studie bestand folglich darin, einen möglichen IgE-vermittelten Mechanismus für das Auftreten von unerwünschten Ereignissen nach einer COVID-19 Impfung eingehender zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Hauttests als auch BATs mit den Impfstoffen sowie den Impfstoffhilfsstoffen durchgeführt.

5.1.1 Hauttestergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde bei insgesamt fünfzehn Patienten (22,4 %) ein positives Ergebnis im Hauttest (SPT oder IDT) nachgewiesen. Bei den Impfstoffhilfsstoffen konnten positive SPT-Ergebnisse nur für PEG mit dem

höchsten eingesetzten Molekulargewicht (PEG 6000) beobachtet werden, was der Hypothese einer Zunahme des allergischen Potentials mit steigendem PEG-Molekulargewicht entspricht (Sellaturay et al., 2021). Diese Hypothese konnte jedoch für den IDT nicht bestätigt werden, da auch für PEG mit einem niedrigeren Molekulargewicht von 2000 positive Reaktion auftraten. Allerdings könnten diese Beobachtungen auch auf die höhere Sensitivität des IDT hinweisen (Risma, 2021). Dies könnte auch die höhere Anzahl positiver Testergebnisse im IDT im Vergleich zum SPT für die verschiedenen Impfstoffe erklären. Es gilt jedoch auch zu beachten, dass beim IDT vermehrt unspezifische Hautreizungen auftreten können, die fälschlicherweise als positive Ergebnisse interpretiert werden können. Daher wurde in dieser Studie versucht, unspezifische, irritative Hautreaktionen zu vermeiden, indem eine Verdünnung von mindestens 1:100 für die Impfstoffe im IDT verwendet wurde (Kelso et al., 2012).

5.1.2 BAT Ergebnisse

In unserer Studie zeigte die überwiegende Mehrheit der Proben nicht mehr als 5 % CD63⁺-Basophile nach Stimulation mit einem der untersuchten COVID-19 Impfstoffe oder Hilfsstoffe. Nur bei vier Probanden konnte eine erhöhte Anzahl von CD63⁺-Basophilen nachgewiesen werden. Der Anteil der ermittelten CD63⁺ Basophilen lag dabei überwiegend zwischen 5 und 30 %. Lediglich eine Probe (P3) wies nach der Stimulation mit BNT162b2 deutlich höhere Anteile an CD63⁺ Basophilen (52-67 %) auf. Die relativ große Spanne in der Anzahl der CD63⁺ Basophilen nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen im BAT korreliert dabei mit der bestehenden Literatur, die eine Variation in der Anzahl der CD63⁺ Basophilen in den durchgeführten BATs beschreibt (Brockow et al., 2022, Warren et al., 2021, Jiang et al., 2021). Dies erschwert die Interpretation der Testergebnisse. Ein negatives Testergebnis wird jedoch bei der Mehrzahl der bestehenden Berichte mit einer CD63⁺ Basophilenzahl von <5 % angegeben, so dass auch die in der vorliegenden Studie untersuchten Proben mit einer Anzahl von CD63⁺ Basophilen <5 % als negativ interpretiert werden können (Eberlein et al., 2022). Die Toleranz gegenüber einer COVID-19 Impfung bei Probanden, die im BAT als negativ eingestuft wurden, konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden (Labella et al., 2022).

Insgesamt wurden in der vorliegenden Studie positive BAT Ergebnisse durch die Stimulation mit den Impfstoffhilfsstoffen PEG 2000 und PEG DMG 2000 beobachtet. Dabei stimmten die in unserer Studie verwendeten Konzentrationen für PEG und PEG DMG mit den in früheren Studien verwendeten Konzentrationen überein. Für Polysorbat wurde keine Basophilen Aktivierung beobachtet. Dies spiegelt die bestehende Literatur wider, in welcher bisher keine positiven BAT Reaktionen nach Stimulation mit Polysorbat beschrieben wurden (Eberlein et al., 2022).

Bezüglich der Impfstoffe zeigten sich in der vorliegenden Studie positive BAT Ergebnisse nach Stimulation mit beiden mRNA Impfstoffen sowie dem ChAdOx1 Impfstoff. In der Literatur wird von höheren Basophilen Aktivierungen sowie häufigeren positiven Ergebnissen nach Stimualtion mit den mRNA Impfstoffen im Vergleich zu anderen PEG Komponenten berichtet (Eberlein et al., 2022). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen unserer Studie überein, in welcher die höchste Anzahl an CD63⁺ Basophilen nach Stimulation mit dem mRNA-Impfstoff BNT162b2 nachgewiesen wurde.

5.1.3 Mögliche IgE-vermittelte Hypersensitivität gegenüber PEG und den COVID-19 Impfstoffen

Wenande et al. stellten einen möglichen IgE-vermittelten Mechanismus zur Erklärung von PEG-Hypersensitivitätsreaktionen vor. Sie berichteten über eine Probandin mit Symptomen einer Anaphylaxie gegenüber PEG haltigen Arzneimitteln. Die passive Sensibilisierung von IgE gestrippten Spenderbasophilen und die anschließende Provokation mit PEG 6000 und PEG 3350 führten zu einer erhöhten Histaminfreisetzung. Bei Serum, welches vor den passiven Histaminfreisetzungstests mit Omalizumab (IgE-blockierender Antikörper) inkubiert wurde, konnte die PEG-vermittelte Histaminfreisetzung unterdrückt werden (Wenande et al., 2013).

Darüber hinaus beschrieben Restivo et al. eine signifikante Aktivierung von Basophilen unter Verwendung von CD203c als Oberflächenaktivitätsmarker für verschiedene Konzentrationen von PEG 4000 in einer EDTA-Vollblutprobe eines Probanden. Dieser Proband wies klinische Anzeichen einer möglichen allergischen Reaktion nach der ersten Verabreichung des BNT162b2 Impfstoffs

auf. Ein zusätzlicher Hauttest konnte bei besagtem Probanden leider nicht durchgeführt werden, da der Proband an einer Urticaria factitia litt (Restivo et al., 2021). Es gilt jedoch zu beachten, dass in den Studien von Wenande et al. und Restivo et al. weder PEG mit einem MW von 2000, wie in den mRNA-Impfstoffen verwendet, noch einzelne COVID Impfstoffe oder PEGylierte LPN untersucht wurden. Die Bedeutung der Ergebnisse in Bezug auf Reaktionen gegenüber COVID-19 Impfstoffen kann daher hinterfragt werden.

Zhou et al. gelang der Nachweis von Anti-PEG IgE Antikörpern in sechs Probandenproben, die alle anamnestisch über eine PEG assoziierte Anaphylaxie berichteten, während in den Kontrollproben keine Anti-PEG IgE Antikörper nachgewiesen werden konnten (Zhou et al., 2021). Diese Beobachtungen könnten eine klassische IgE vermittelte Hypersensitivität gegenüber PEG erklären.

Troelnikov et al. berichteten über eine dosisabhängige Zunahme der aktivierten CD63⁺ Basophilen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des BNT162b2 Impfstoffes bei drei Probanden mit klinischen Anzeichen einer möglichen PEG-Allergie in der Anamnese. Alle drei Patienten zeigten positive Hauttestergebnisse für BNT162b2. Diese Beobachtungen könnten auf eine IgE-Quervernetzung auf der Oberfläche von Basophilen nach Stimulation mit PEGylierten LNP hindeuten. Interessanterweise zeigte der Hauttest bei zwei der drei Probanden kein positives Ergebnis für PEG selbst. Zusätzlich konnte im BAT keine erhöhte Anzahl CD63⁺ Basophiler nach Stimulation mit PEG als Reinsubstanz beobachtet werden. Ein BAT mit PEGyliertem liposomalem Doxorubicin, das PEGylierte LPN ähnlich dem BNT162b2 Impfstoff enthält, zeigte dagegen bei allen drei Probanden aktivierte CD63⁺ Basophile. Diese Ergebnisse könnten auf die unterschiedliche Konformation bzw. Anordnung von PEG auf der Oberfläche von LPN zurückzuführen sein. Dies könnte im Vergleich zu PEG als Reinsubstanz die IgE-Quervernetzung auf der Oberfläche von Basophilen verstärken und somit zu einer vermehrten Aktivierung der Basophilen im Vergleich zur Reinsubstanz führen (Troelnikov et al., 2021).

5.1.4 Bedeutung der *in vitro*- und Hauttestdiagnostik von COVID-19 Impfstoffen sowie den Impfstoffhilfsstoffen

Insgesamt stimmten die in der vorliegenden Studie im BAT beobachteten Ergebnisse überwiegend nicht mit den durchgeführten Hauttests überein und Auffälligkeiten in den Hauttests konnten nur in Einzelfällen durch den BAT bestätigt werden. Diese Beobachtungen stellen die Gültigkeit und klinische Bedeutung der positiven Hauttestergebnisse in Frage.

Wolfson et al. beschrieben symptomfreie Auffrischimpfungen bei Patienten, die nach der ersten Dosis eines COVID-19 Impfstoffs über unerwünschte Reaktionen und Symptome einer Überempfindlichkeitsreaktion berichteten. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass eine zweite Impfdosis ohne Anzeichen einer Überempfindlichkeitsreaktion verabreicht werden konnte, unabhängig vom Ergebnis des Hauttests, aber auch bei Patienten mit positivem Hauttest auf die Impfstoffhilfsstoffe. Interessanterweise wurde berichtet, dass bei einigen wenigen Patienten nach der zweiten Dosis Symptome einer allergischen Reaktion wie Juckreiz, Schwellung und Rötungen bis hin zu Luftnot auftraten, obwohl der Hauttest zuvor negativ ausgefallen war (Wolfson et al., 2021). Darüber hinaus wurde in einigen weiteren Berichten eine sichere Impfung bei Patienten mit bekannter PEG-Allergie dargestellt, bei welchen trotz positiver Hauttestergebnisse unerwünschte Ereignisse nach Verabreichung der Impfung ausblieben (Li et al., 2022, Faihs et al., 2022). Die Validität von Hauttests, die mit COVID-19 Impfstoffzusatzstoffen und/oder den Impfstoffen selbst durchgeführt werden, ist für die Erkennung einer potentiellen Anaphylaxie somit aktuell noch nicht abschließend geklärt

Andererseits ist die Bedeutung positiver Ergebnisse diagnostischer *in vitro* oder *ex vivo* Methoden wie dem BAT unter Verwendung von PEG, strukturell verwandten Verbindungen und den COVID-19 Impfstoffen bisher unklar.

So berichteten Labella et al. über positive BAT Reaktionen bei Probanden, die alle eine frühere COVID-19 Infektion aufwiesen, jedoch der Kontrollgruppe angehörten. Eine mögliche Beeinflussung der BAT Ergebnisse durch eine frühere COVID-19 Infektion könnte daher möglich sein. Im Gegensatz dazu zeigte nur ein kleiner Teil (11,7 %) der Probanden, die über Symptomen einer

möglichen allergischen Reaktion nach der COVID-19 Impfung berichteten, ein positives Ergebnis im durchgeführten BAT. Interessanterweise konnten Labella et al. zeigen, dass der COVID-19 Impfstatus keinen Einfluss auf die Reaktivität der Basophilen im BAT hatte. (Labella et al., 2022). Eine bereits durchgemachte COVID-19 Infektion wurde in unserer Studie nicht erfasst. Die Ergebnisse in Bezug auf den Impfstatus korrelieren allerdings mit unseren Beobachtungen bei Probanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung ein positives BAT Ergebnis aufwiesen und alle ungeimpft waren. Ein Einfluss der Impfung auf eine erhöhte Anzahl aktivierter Basophiler im BAT erscheint daher unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von Oberflächenmolekülen auf Basophilen besteht durch die Eigenschaft der PEGylierten Moleküle als Lösungsvermittler beim Übertritt der Partikel in das Zytosol. Eine unspezifische Erkennung und Hochregulation von Oberflächenmolekülen und damit ein auffälliges BAT Ergebnis wäre folglich denkbar (Eberlein et al., 2022, Yang et al., 2021)

Hennighausen et al. beschrieben weiterhin eine Probandin, die sowohl einen positiven Hauttest als auch eine positive *in vitro*-Diagnostik (BAT) für Impfstoffzusatzstoffe und COVID-19 Impfstoffe aufwies. Trotz der positiven Testergebnisse konnte eine Impfung mit dem Ad26.COVS.2 Impfstoff durchgeführt werden, die gut vertragen wurde (Hennighausen et al., 2022).

Obwohl ein IgE-abhängiger Mechanismus die Ursache für den *in vitro* beobachteten Anstieg der CD63⁺ Basophilen in unseren Probandenproben nach Stimulation mit den Impfstoffhilfsstoffen oder den Impfstoffen selbst sein könnte, bleibt die *in vivo* Bioverfügbarkeit von PEGylierten Nanopartikeln in Impfstoffen für basophile Granulozyten und Mastzellen nach der Impfung unklar (Picard et al., 2022a). Dies könnte die Impfung ohne das Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen bei Patienten mit bekannter PEG-Allergie erklären (Li et al., 2022). Weiterhin sind IgE-vermittelte allergische Reaktionen in der Regel durch reproduzierbare allergische Ereignisse gekennzeichnet. Dies steht nicht im Einklang mit Berichten über Patienten, bei denen nach der ersten Dosis Überempfindlichkeitsreaktionen auftraten, die zweite Dosis des COVID-19 Impfstoffs jedoch toleriert wurde (Krantz et al., 2021).

Unsere Ergebnisse unterstützen daher die derzeitige Einschätzung, dass eine Impfung trotz des Auftretens von Symptomen einer möglichen allergischen Reaktion nach der ersten Impfdosis möglich ist. Auch bei Patienten mit bekannter oder bestätigter PEG Allergie kann eine Impfung erwogen werden. Generell ist es dabei wichtig, die Befunde aus Anamnese, Hauttestergebnissen und weiterer allergologischer Diagnostik wie z.B. dem BAT in ihrer Gesamtheit zu betrachten und unter Berücksichtigung dieser Aspekte Nutzen und mögliche Risiken einer Impfung gegeneinander abzuwägen (Picard et al., 2022b, Brockow et al., 2022). Bei entsprechenden Risikokonstellationen kann eine Impfung auch unter erhöhten Vorsichtsmaßnahmen und/oder in fraktionierten Dosen durchgeführt werden (Hennighausen et al., 2022).

5.2 CARPA als mögliche Ursache allergischer Reaktionen auf PEG und COVID-19 Impfstoffe

5.2.1 Bedeutung allergischer Reaktionen in der Anamnese

Ein weiteres Ziel unserer Studie bestand darin, herauszufinden, ob eine Komplementaktivierung durch COVID-19 Impfstoffe oder deren Hilfsstoffe möglich ist und inwiefern Patienten mit allergischen Reaktionen in der Anamnese eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Komplementaktivierung nach Exposition mit COVID-19 Impfstoffen oder damit in Verbindung stehenden Hilfsstoffen aufweisen. In mehreren Berichten wurde das Auftreten einer Anaphylaxie nach der COVID-19 Impfung insbesondere bei Personen mit allergischen Reaktionen in der Anamnese beschrieben (CDC COVID-19 Response Team and Food and Drug Administration, 2021, Blumenthal et al., 2021, Moghimi, 2021). In unserer Studie konnte jedoch keine Reaktivität des Komplementsystems nach *in vitro* Stimulation mit den verschiedenen COVID-19 Impfstoffen bei Probanden mit allergischer Rhinitis und/oder Asthma in der Anamnese beobachtet werden. Lediglich ein Proband (P49) mit einer Anaphylaxie in der Anamnese präsentierte einen Anstieg der C5a-Spiegel über die definierte normale Standardabweichung hinaus. Die Bedeutung dieser Beobachtung bleibt jedoch unklar, da zwei

Probanden (P56 und P61) ohne bekannte Allergie ebenfalls einen Anstieg der C5a-Spiegel nach *in vitro* Stimulation mit den Impfstoffen zeigten.

5.2.2 Komplementaktivierung durch PEG und die COVID-19 Impfstoffe

Insgesamt wiesen acht der Proben (11,9 %) in dieser Studie erhöhte C5a-Werte nach Stimulation mit den verschiedenen COVID-19 Impfstoffen auf. Die meisten dieser erhöhten C5a-Werte wurden nach Stimulation mit den PEG-haltigen mRNA-Impfstoffen BNT162b2 (62,5 %) und mRNA-1273 (50 %) beobachtet. Die Hälfte der Proben stammte von Probanden mit positiven Hauttestergebnissen, bei welchen eine Übereinstimmung zwischen den Hauttestergebnissen und den Wirkstoffen, die einen Anstieg der C5a-Werte verursachten, auffiel. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass COVID-19 Impfstoffe das Komplementsystem über CARPA aktivieren könnten, was wiederum eine Ursache für allergische Nebenwirkungen nach einer Impfung darstellen könnte.

Das Potential PEGylierter Nanopartikel zur Aktivierung des Komplementsystems wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Mohamed et al., 2019, Chanan-Khan et al., 2003, Moghimi et al., 2010). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die meisten Serumproben in der vorliegenden Studie einen Anstieg der Anaphylatoxin-C5a-Spiegel nach PEG-Stimulation, was auf eine *in vitro* Aktivierung des Komplementsystems hindeutet. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass PEG-haltige Impfstoffe oder Impfstoffe, die das strukturell verwandte Polysorbat enthalten, beim Menschen zu CARPA-bedingten unerwünschten Ereignissen nach der Impfung führen könnten.

Lim et al. berichteten über drei Fälle von Patienten mit Symptomen einer Anaphylaxie nach Verabreichung des Impfstoffs BNT162b2. Bei keinem dieser Patienten wurden erhöhte Tryptasewerte oder IgE-Antikörper gegen den BNT162b2-Impfstoff nachgewiesen, was auf einen möglichen Mechanismus unabhängig von Mastzellen und einer Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion hindeuten könnte. Allerdings präsentierten alle drei Patienten erhöhte C3a-Werte, was auf eine CARPA als mögliche Immunreaktion hinweist (Lim et al., 2021). Im Gegensatz dazu konnten wir bei Patienten mit positiver Reaktion im Hauttest keine höheren C5a-Werte detektieren als bei Patienten ohne Reaktion im

Hauttest. Interessanterweise wiesen zwei Patienten der Studie von Lim et al. hohe IgG-Spiegel sowohl gegenüber PEG als auch gegenüber dem BNT162b2 Impfstoff auf. Eine IgG-vermittelte Komplementaktivierung könnte in diesen Fällen einen möglichen Erklärungsansatz zur Auslösung einer CARPA darstellen (Lim et al., 2021).

Weiterhin berichteten Warren et al. über elf Fälle einer Anaphylaxie nach Verabreichung der ersten Dosis eines mRNA-Impfstoffs. Im Gegensatz zu einer IgE vermittelten Reaktion bedarf es bei einer CARPA keiner vorherigen Sensibilisierung. Daher wäre eine Reaktion nach Verabreichung der ersten Impfdosis ohne vorherigen Allergenkontakt erklärbar. Für keinen dieser Patienten wurde eine positive Hautreaktion gegenüber PEG oder nachweisbare anti-PEG IgE Antikörper beobachtet. Im BAT reagierten jedoch 91% der Patienten positiv auf PEG sowie alle Patienten positiv auf den verabreichten Impfstoff. Zusätzlich konnten Warren et al. hohe Konzentrationen von anti-PEG IgG im Serum der Patienten nachweisen und suggerierten eine durch IgG-Antikörper induzierte CARPA als Auslöser der allergischen Reaktionen nach der Impfung (Warren et al., 2021). In der vorliegenden Studie wurde kein IgG gegen PEG oder die Impfstoffe selbst analysiert, es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Komplementaktivierung und den BAT-Ergebnissen für die Triggermoleküle PEG, Polysorbat und die Impfstoffe festgestellt werden. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den von Warren et al. berichteten Ergebnissen.

Von den Proben, die eine Komplementaktivierung durch die Impfstoffe aufwiesen, zeigte nur die Hälfte eine konsistente Aktivierung durch PEG. Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass PEG die einzige Ursache für eine unerwünschte Komplementaktivierung durch COVID-19 Impfstoffe ist (Garvey and Nasser, 2021). Andere Impfstoffkomponenten, die bisher nicht als mögliche Auslöser von Immunreaktionen in Betracht gezogen wurden, sollten ebenso bedacht und genauer untersucht werden (Radice et al., 2021, Cabanillas and Novak, 2021).

5.3 Weibliches Geschlecht

Von den 67 Personen, bei denen ein Hauttest durchgeführt wurde, war die überwiegende Mehrheit weiblich (81 %). Darüber hinaus waren alle Patienten mit positivem Hauttest von weiblichem Geschlecht, was darauf hindeuten könnte, dass Frauen ein höheres Risiko haben, nach der Verabreichung des COVID-19 Impfstoffs eine Überempfindlichkeitsreaktion zu entwickeln. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Berichten über einen höheren Anteil weiblicher Patienten mit anaphylaktischer Reaktion auf COVID-19 Impfstoffe (Shimabukuro and Nair, 2021, CDC COVID-19 Response Team and Food and Drug Administration, 2021). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die vermehrte Verwendung von PEG-haltigen Haushaltsprodukten und Kosmetika durch Frauen sein. Diese könnten zur Entwicklung von anti-PEG IgE-Antikörpern und damit zu einer allergischen Reaktion auf PEG und PEG-haltige Impfstoffe führen (Freire Haddad et al., 2022). Berichte über das Vorhandensein von anti-PEG Antikörpern bei bis zu 72 % der gesunden Allgemeinbevölkerung lassen jedoch Zweifel an dieser Hypothese aufkommen, vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass inzwischen weltweit Millionen von Menschen sicher geimpft wurden (Hong et al., 2020).

Risma et al. diskutierten eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung eines höheren Anteils von Frauen mit unerwünschten Ereignissen nach der Impfung mit den COVID-19 Impfstoffen. Dabei wurde die Rolle von Sexualhormonen beim Mechanismus von Allergien und Anaphylaxien in Betracht gezogen (Risma et al., 2021). Östrogen kann eine T_H2 -Reaktion verstärken, während für Testosteron und Progesteron bekannt ist, dass diese eine T_H2 -Reaktion abschwächen können (Trigunaite et al., 2015, Fan et al., 2019). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, wie Sexualhormone die Degranulation von Mastzellen beeinflussen können. Mastzellen exprimieren Östrogenrezeptoren, wobei Östradiol die Sekretion steigern kann, während Progesteron diese inhibieren kann (Vasiadi et al., 2006, Fan et al., 2019). Im Tierversuch konnte zudem beobachtet werden, wie Östrogen den Schweregrad einer Anaphylaxie erhöhen kann (Hox et al., 2015).

Die Rolle des weiblichen Geschlechts bei Überempfindlichkeitsreaktionen auf COVID-19 Impfstoffe sowie bei allergischen Reaktionen im Allgemeinen stellt somit einen wichtigen, bis heute noch nicht vollständig verstandenen Einflussfaktor dar, welcher auch beim zukünftigen Einsatz von COVID-19 Impfstoffen berücksichtigt werden sollte.

5.4 Limitationen

Unsere Ergebnisse unterliegen einigen Einschränkungen. Erstens wurde die Allergieanamnese von den Patienten selbst angegeben, was zu Verzerrungen durch individuelle Interpretationen führen kann.

Zweitens war die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten, insbesondere die Anzahl der Patienten, die auf Komplementaktivierung getestet wurden, gering.

Weiterhin wurden keine Daten zur Verträglichkeit der COVID-19 Impfstoffe im Anschluss an die durchgeführte Studie erhoben, so dass keine vollständige Aussage zur *in vivo* Verträglichkeit der COVID-19 Impfstoffe getroffen werden kann.

Eine weitere Einschränkung bestand in der Lagerung der Serumproben für die Komplementanalyse. Normalerweise werden Serumproben bei -80 °C gelagert, um eine vorzeitige Komplementaktivierung während der Lagerung zu verhindern und genaue Messungen zu gewährleisten. Unsere Proben wurden bei -30 °C gelagert. Eine signifikante Korrelation zwischen der Lagerungszeit und der gemessenen Anaphylatoxinkonzentration konnte jedoch ausgeschlossen werden.

5.5 Schlussfolgerung

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen einer Sensibilisierung gegenüber PEG und allergischen Reaktionen auf COVID-19-Impfstoffe und deren Hilfsstoffe bestehen

könnte. In der vorliegenden Studie wurden mögliche immunologische Signalwege identifiziert, die daran beteiligt sein könnten.

Insgesamt wurden fünfzehn Patienten mit positivem Hauttest untersucht. Bei einem Viertel dieser Patienten korrelierte die Reaktion mit einer Aktivierung von Basophilen im BAT, was auf einen IgE-abhängigen Mechanismus für das Auftreten allergischer Reaktionen hindeutet. Bei einem weiteren Viertel der Patienten konnte eine Aktivierung des Komplementsystems durch COVID-19 Impfstoffe/Additive nachgewiesen werden, was auf eine CARPA als immunreaktiven Signalweg hindeutet.

Angesichts des Gesamtnutzens der COVID-19 Impfung kann jedoch die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Vorteile der Impfung das Risiko einer unerwünschten Überempfindlichkeitsreaktion bei Weitem überwiegen. Dies gilt insbesondere für Personen mit allergischen Reaktionen oder Anaphylaxien in der Anamnese, die nicht mit PEG selbst oder PEG-haltigen Produkten in Zusammenhang stehen. Zurückhaltung bei der Impfung dieser Personen sollte vermieden werden. Angesichts der anhaltenden Bedrohung durch wiederkehrende Pandemien und tödliche Virusinfektionen stellen mRNA-Impfstoffe, die in PEGylierte LNP eingekapselt sind, eine wichtige Ressource zur Bewältigung zukünftiger globaler Gesundheitsprobleme dar. Weitere Forschungsarbeiten sind jedoch notwendig, um die Mechanismen einer Hypersensibilität vollständig zu verstehen und Strategien zur Prävention und Behandlung allergischer Reaktionen auf COVID-19 und andere künftige Impfstoffe zu ermitteln.

6 Literaturverzeichnis

- Acter, T., Uddin, N., Das, J., Akhter, A., Choudhury, T.R., Kim, S., 2020. Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. *Sci Total Environ* 730, 138996. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138996>
- Adil, M.T., Rahman, R., Whitelaw, D., Jain, V., Al-Ta'an, O., Rashid, F., Munasinghe, A., Jambulingam, P., 2021. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgrad Med J* 97, 110–116. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138386>
- Blumenthal, K.G., Robinson, L.B., Camargo, C.A., Shenoy, E.S., Banerji, A., Landman, A.B., Wickner, P., 2021. Acute Allergic Reactions to mRNA COVID-19 Vaccines. *JAMA* 325, 1562–1565. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3976>
- Brockow, K., Mathes, S., Fischer, J., Volc, S., Darsow, U., Eberlein, B., Biedermann, T., 2022. Experience with polyethylene glycol allergy-guided risk management for COVID-19 vaccine anaphylaxis. *Allergy* 77, 2200–2210. <https://doi.org/10.1111/all.15183>
- Cabanillas, B., Novak, N., 2021. Allergy to COVID-19 vaccines: A current update. *Allergol Int* 70, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.04.003>
- Castells, M.C., Phillips, E.J., 2020. Maintaining Safety with SARS-CoV-2 Vaccines. *N Engl J Med NEJMra2035343*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2035343>
- CDC COVID-19 Response Team, Food and Drug Administration, 2021. Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Moderna COVID-19 Vaccine - United States, December 21, 2020-January 10, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70, 125–129. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7004e1>
- Chanan-Khan, A., Szebeni, J., Savay, S., Liebes, L., Rafique, N.M., Alving, C.R., Muggia, F.M., 2003. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol* 14, 1430–1437. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg374>
- Chen, Y., Liu, Q., Guo, D., 2020. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 92, 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Chilamakuri, R., Agarwal, S., 2021. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells* 10, 206. <https://doi.org/10.3390/cells10020206>
- Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y., Wang, H., 2020. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Front Immunol* 11, 576622. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576622>
- Eberlein, B., Mathes, S., Fischer, J., Darsow, U., Biedermann, T., Brockow, K., 2022. Do basophil activation tests help elucidate allergic reactions to the ingredients in COVID-19 vaccines? *Allergy* 77, 2924–2936. <https://doi.org/10.1111/all.15278>

- Erdeljic Turk, V., 2021. Anaphylaxis associated with the mRNA COVID-19 vaccines: Approach to allergy investigation. *Clin Immunol* 227, 108748. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108748>
- Faihs, V., Bent, R., Darsow, U., Biedermann, T., Brockow, K., 2022. Tolerance to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in a patient with challenge-confirmed PEG 2000 allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 0. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0829>
- Fan, Z., Che, H., Yang, S., Chen, C., 2019. Estrogen and estrogen receptor signaling promotes allergic immune responses: Effects on immune cells, cytokines, and inflammatory factors involved in allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 47, 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2019.03.001>
- Freire Haddad, H., Burke, J.A., Scott, E.A., Ameer, G.A., 2022. Clinical Relevance of Pre-Existing and Treatment-Induced Anti-Poly(Ethylene Glycol) Antibodies. *Regen Eng Transl Med* 8, 32–42. <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00198-y>
- Gan, S.D., Patel, K.R., 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Garvey, L.H., Dewachter, P., Hepner, D.L., Mertes, P.M., Voltolini, S., Clarke, R., Cooke, P., Garcez, T., Guttormsen, A.B., Ebo, D.G., Hopkins, P.M., Khan, D.A., Kopac, P., Krøigaard, M., Laguna, J.J., Marshall, S., Platt, P., Rose, M., Sabato, V., Sadleir, P., Savic, L., Savic, S., Scherer, K., Takazawa, T., Volcheck, G.W., Kolawole, H., 2019. Management of suspected immediate perioperative allergic reactions: an international overview and consensus recommendations. *British Journal of Anaesthesia* 123, e50–e64. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.04.044>
- Garvey, L.H., Nasser, S., 2021. Anaphylaxis to the first COVID-19 vaccine: is polyethylene glycol (PEG) the culprit? *Br J Anaesth* 126, e106–e108. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.12.020>
- Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., 1963. *Clinical Aspects of Immunology. Clinical Aspects of Immunology.*
- Greenhawt, M., Abrams, E.M., Shaker, M., Chu, D.K., Khan, D., Akin, C., Alqurashi, W., Arkwright, P., Baldwin, J.L., Ben-Shoshan, M., Bernstein, J., Bingemann, T., Blumchen, K., Byrne, A., Bognanni, A., Campbell, D., Campbell, R., Chagla, Z., Chan, E.S., Chan, J., Comberiat, P., Dribin, T.E., Ellis, A.K., Fleischer, D.M., Fox, A., Frischmeyer-Guerrero, P.A., Gagnon, R., Grayson, M.H., Horner, C.C., Hourihane, J., Katelaris, C.H., Kim, H., Kelso, J.M., Lang, D., Ledford, D., Levin, M., Lieberman, J., Loh, R., Mack, D., Mazer, B., Mosnaim, G., Munblit, D., Mustafa, S.S., Nanda, A., Oppenheimer, J., Perrett, K.P., Ramsey, A., Rank, M., Robertson, K., Sheikh, J., Spergel, J.M., Stukus, D., Tang, M.L.K., Tracy, J.M., Turner, P.J., Whalen-Browne, A., Wallace, D., Wang, J., Wasserman, S., Witry, J.K., Worm, M., Vander Leek, T.K., Golden, D.B.K., 2021. The Risk of Allergic Reaction to SARS-CoV-2 Vaccines and Recommended Evaluation and Management: A Systematic Review, Meta-Analysis, GRADE Assessment, and International Consensus Approach. *J Allergy Clin Immunol Pract* 9, 3546–3567. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.06.006>
- Hennighausen, I., Pickert, J., Mühlenbein, S., Möbs, C., Pfützner, W., 2022. Successful COVID-19 Vaccination of a Patient With Hypersensitivity to

- Polyethylene Glycol and Polysorbate. *J Investig Allergol Clin Immunol* 32, 322–323. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0801>
- Hof, H., Schlüter, D., Bruder, D., Cornely, O.A., Dörries, R., Geginat, G., Reischl, U., 2019. *Medizinische Mikrobiologie: 560 Abbildungen*, 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. ed, Duale Reihe. Thieme, Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-006-163249>
- Hong, L., Wang, Z., Wei, X., Shi, J., Li, C., 2020. Antibodies against polyethylene glycol in human blood: A literature review. *J Pharmacol Toxicol Methods* 102, 106678. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106678>
- Hox, V., Desai, A., Bandara, G., Gilfillan, A.M., Metcalfe, D.D., Olivera, A., 2015. Estrogen increases the severity of anaphylaxis in female mice through enhanced endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production. *J Allergy Clin Immunol* 135, 729–736.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.003>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., Cao, B., 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Jackson, L.A., Anderson, E.J., Roupael, N.G., Roberts, P.C., Makhene, M., Coler, R.N., McCullough, M.P., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., McDermott, A., Flach, B., Doria-Rose, N.A., Corbett, K.S., Morabito, K.M., O'Dell, S., Schmidt, S.D., Swanson, P.A., Padilla, M., Mascola, J.R., Neuzil, K.M., Bennett, H., Sun, W., Peters, E., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Buchanan, W., Pikaart-Tautges, R., Ledgerwood, J.E., Graham, B.S., Beigel, J.H., mRNA-1273 Study Group, 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med* 383, 1920–1931. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
- Jiang, S.Y., Smith, E.M., Vo, V., Akdis, C., Nadeau, K.C., 2021. Non-immunoglobulin E-mediated allergy associated with Pfizer-BioNTech coronavirus disease 2019 vaccine excipient polyethylene glycol. *Ann Allergy Asthma Immunol* 127, 694–696. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2021.09.012>
- Jimenez-Rodriguez, T.W., Garcia-Neuer, M., Alenazy, L.A., Castells, M., 2018. Anaphylaxis in the 21st century: phenotypes, endotypes, and biomarkers. *J Asthma Allergy* 11, 121–142. <https://doi.org/10.2147/JAA.S159411>
- Justiz Vaillant, A.A., Vashisht, R., Zito, P.M., 2023. Immediate Hypersensitivity Reactions, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kelso, J.M., Greenhawt, M.J., Li, J.T., Nicklas, R.A., Bernstein, D.I., Blessing-Moore, J., Cox, L., Khan, D., Lang, D.M., Oppenheimer, J., Portnoy, J.M., Randolph, C.R., Schuller, D.E., Spector, S.L., Tilles, S.A., Wallace, D., 2012. Adverse reactions to vaccines practice parameter 2012 update. *J Allergy Clin Immunol* 130, 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.04.003>
- Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J.W., Kim, V.N., Chang, H., 2020. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 181, 914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>

- Kim, M.-A., Lee, Y.W., Kim, S.R., Kim, J.-H., Min, T. ki, Park, H.-S., Shin, M., Ye, Y.-M., Lee, S., Lee, J., Choi, J.-H., Jang, G.C., Chang, Y.-S., 2021. COVID-19 Vaccine-associated Anaphylaxis and Allergic Reactions: Consensus Statements of the KAAACI Urticaria/Angioedema/Anaphylaxis Working Group. *Allergy Asthma Immunol Res* 13, 526–544. <https://doi.org/10.4168/aair.2021.13.4.526>
- Knol, E.F., Mul, F.P., Jansen, H., Calafat, J., Roos, D., 1991. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 88, 328–338. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90094-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90094-5)
- Krantz, M.S., Bruusgaard-Mouritsen, M.A., Koo, G., Phillips, E.J., Stone, C.A., Garvey, L.H., 2021. Anaphylaxis to the first dose of mRNA SARS-CoV-2 vaccines: Don't give up on the second dose! *Allergy* 10.1111/all.14958. <https://doi.org/10.1111/all.14958>
- Krantz, M.S., Liu, Y., Phillips, E.J., Stone, C.A., 2020. Anaphylaxis to PEGylated Liposomal Echocardiogram Contrast in a Patient with IgE-Mediated Macrogol Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 8, 1416-1419.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.12.041>
- Labella, M., Céspedes, J.A., Doña, I., Shamji, M.H., Agache, I., Mayorga, C., Torres, M.J., 2022. The value of the basophil activation test in the evaluation of patients reporting allergic reactions to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Allergy* 77, 2067–2079. <https://doi.org/10.1111/all.15148>
- Li, D.H., Lee, E., Song, C., 2022. Successful mRNA COVID-19 vaccination in a patient with a history of severe polyethylene glycol anaphylaxis. *Allergy Asthma Clin Immunol* 18, 57. <https://doi.org/10.1186/s13223-022-00698-8>
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K.S.M., Lau, E.H.Y., Wong, J.Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., Chen, C., Jin, L., Yang, R., Wang, Q., Zhou, S., Wang, R., Liu, H., Luo, Y., Liu, Y., Shao, G., Li, H., Tao, Z., Yang, Y., Deng, Z., Liu, B., Ma, Z., Zhang, Y., Shi, G., Lam, T.T.Y., Wu, J.T., Gao, G.F., Cowling, B.J., Yang, B., Leung, G.M., Feng, Z., 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med* 382, 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Lim, X.R., Leung, B.P., Ng, C.Y.L., Tan, J.W.L., Chan, G.Y.L., Loh, C.M., Tan, G.L.X., Goh, V.H.H., Wong, L.T., Chua, C.R., Tan, S.C., Lee, S.S.M., Howe, H.S., Thong, B.Y.H., Leong, K.P., 2021. Pseudo-Anaphylactic Reactions to Pfizer BNT162b2 Vaccine: Report of 3 Cases of Anaphylaxis Post Pfizer BNT162b2 Vaccination. *Vaccines (Basel)* 9, 974. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090974>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D., 2014. *Der Experimentator: Immunologie, 4., vollständig überarbeitete und korrigierte Auflage.* ed, Der Experimentator. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Mahmoud, I.S., Jarrar, Y.B., Alshaer, W., Ismail, S., 2020. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. *Biochimie* 175, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.012>
- McNeil, M.M., Weintraub, E.S., Duffy, J., Sukumaran, L., Jacobsen, S.J., Klein, N.P., Hambidge, S.J., Lee, G.M., Jackson, L.A., Irving, S.A., King, J.P., Kharbanda, E.O., Bednarczyk, R.A., DeStefano, F., 2016. Risk of

- anaphylaxis after vaccination in children and adults. *J Allergy Clin Immunol* 137, 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.048>
- Moghimi, S.M., 2021. Allergic Reactions and Anaphylaxis to LNP-Based COVID-19 Vaccines. *Mol Ther* 29, 898–900. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.030>
- Moghimi, S.M., Andersen, A.J., Hashemi, S.H., Lettiero, B., Ahmadvand, D., Hunter, A.C., Andresen, T.L., Hamad, I., Szebeni, J., 2010. Complement activation cascade triggered by PEG–PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: The challenges ahead. *Journal of Controlled Release, Nanomedicine and Drug Delivery (NanoDDS'09)* 146, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.003>
- Mohamed, M., Abu Lila, A.S., Shimizu, T., Alaaeldin, E., Hussein, A., Sarhan, H.A., Szebeni, J., Ishida, T., 2019. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater* 20, 710–724. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>
- Nicaise-Roland, P., Granger, V., Soria, A., Barbaud, A., Pallardy, M., Chollet-Martin, S., de Chaisemartin, L., 2022. Immediate hypersensitivity to COVID-19 vaccines: Focus on biological diagnosis. *Front Allergy* 3, 1007602. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.1007602>
- Oliver, S.E., Gargano, J.W., Marin, M., Wallace, M., Curran, K.G., Chamberland, M., McClung, N., Campos-Outcalt, D., Morgan, R.L., Mbaeyi, S., Romero, J.R., Talbot, H.K., Lee, G.M., Bell, B.P., Dooling, K., 2021. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Moderna COVID-19 Vaccine - United States, December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69, 1653–1656. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm695152e1>
- Oliver, S.E., Gargano, J.W., Marin, M., Wallace, M., Curran, K.G., Chamberland, M., McClung, N., Campos-Outcalt, D., Morgan, R.L., Mbaeyi, S., Romero, J.R., Talbot, H.K., Lee, G.M., Bell, B.P., Dooling, K., 2020. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine - United States, December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69, 1922–1924. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6950e2>
- Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W., Weissman, D., 2018. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 17, 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Picard, M., Drolet, J.-P., Masse, M.-S., Filion, C.A., ALMuhizi, F., Fein, M., Copaescu, A., Isabwe, G.A.C., Blaquière, M., Primeau, M.-N., 2022a. Safety of COVID-19 vaccination in patients with polyethylene glycol allergy: A case series. *J Allergy Clin Immunol Pract* 10, 620-625.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.11.021>
- Picard, M., Stone, C.A., Greenhawt, M., 2022b. Management of patients with immediate reactions to COVID-19 vaccines. *J Allergy Clin Immunol* S0091-6749(22)01183–6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.09.003>
- Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Perez, J.L., Pérez Marc, G., Moreira, E.D., Zerbini, C., Bailey, R., Swanson, K.A., Roychoudhury, S., Koury, K., Li, P., Kalina, W.V., Cooper, D., Frenck, R.W., Hammitt, L.L., Türeci, Ö., Nell, H., Schaefer, A., Ünal, S., Tresnan, D.B., Mather, S., Dormitzer, P.R., Şahin, U., Jansen, K.U., Gruber, W.C., C4591001 Clinical Trial Group, 2020. Safety

- and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 383, 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
- Pschyrembel, W., Witzel, S., Dornblüth, O. (Eds.), 2007. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 261., neu bearb. und erw. Aufl. ed. de Gruyter, Berlin.
- Radice, A., Fassio, F., Meucci, E., Iorno, M.C.L., Macchia, D., 2021. Potential culprits for immediate hypersensitivity reactions to BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: not just PEG. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 53, 240–242. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.214>
- Rahman, S., Montero, M.T.V., Rowe, K., Kirton, R., Kunik, F., 2021. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol* 14, 601–621. <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1902303>
- Reber, L.L., Hernandez, J.D., Galli, S.J., 2017. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 140, 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.003>
- Restivo, V., Candore, G., Barrale, M., Caravello, E., Graziano, G., Onida, R., Raineri, M., Tiralongo, S., Brusca, I., 2021. Allergy to Polyethylenglicole of Anti-SARS CoV2 Vaccine Recipient: A Case Report of Young Adult Recipient and the Management of Future Exposure to SARS-CoV2. *Vaccines (Basel)* 9, 412. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050412>
- Ring, J., Messmer, K., 1977. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* 1, 466–469. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91953-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91953-5)
- Risma, K.A., 2021. COVID-19 mRNA vaccine allergy. *Current Opinion in Pediatrics* 33, 610–617. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000001077>
- Risma, K.A., Edwards, K.M., Hummell, D.S., Little, F.F., Norton, A.E., Stallings, A., Wood, R.A., Milner, J.D., 2021. Potential mechanisms of anaphylaxis to COVID-19 mRNA vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 147, 2075–2082.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.04.002>
- Rüggeberg, J.U., Gold, M.S., Bayas, J.-M., Blum, M.D., Bonhoeffer, J., Friedlander, S., de Souza Brito, G., Heininger, U., Imoukhuede, B., Khamesipour, A., Erlewyn-Lajeunesse, M., Martin, S., Mäkelä, M., Nell, P., Pool, V., Simpson, N., Brighton Collaboration Anaphylaxis Working Group, 2007. Anaphylaxis: case definition and guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 25, 5675–5684. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.064>
- Sack, U. (Ed.), 2016. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. De Gruyter, Berlin.
- Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwegh, D., Truyers, C., de Groot, A.M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P.-J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K.E., De Rosa, S.C., Cohen, K.W., McElrath, M.J., Cormier, E., Scheper, G., Barouch, D.H., Hendriks, J., Struyf, F., Douoguih, M., Van Hoof, J., Schuitemaker, H., 2021. Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 384, 1824–1835. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034201>
- Salian, V.S., Wright, J.A., Vedell, P.T., Nair, S., Li, C., Kandimalla, M., Tang, X., Carmona Porquera, E.M., Kalari, K.R., Kandimalla, K.K., 2021. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies.

- Mol Pharm 18, 754–771.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608>
- Sanche, S., Lin, Y.T., Xu, C., Romero-Severson, E., Hengartner, N., Ke, R., 2020. The Novel Coronavirus, 2019-nCoV, is Highly Contagious and More Infectious Than Initially Estimated.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.07.20021154>
- Schnyder, B., Pichler, W.J., 2009. Mechanisms of drug-induced allergy. *Mayo Clin Proc* 84, 268–272. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)61145-2](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)61145-2)
- Schoeman, D., Fielding, B.C., 2019. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology* 16, 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Sellaturay, P., Nasser, S., Ewan, P., 2021. Polyethylene Glycol-Induced Systemic Allergic Reactions (Anaphylaxis). *J Allergy Clin Immunol Pract* 9, 670–675. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.09.029>
- Shah, S., Prematta, T., Adkinson, N.F., Ishmael, F.T., 2013. Hypersensitivity to Polyethylene Glycols. *The Journal of Clinical Pharmacology* 53, 352–355. <https://doi.org/10.1177/0091270012447122>
- Shimabukuro, T., Nair, N., 2021. Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. *JAMA* 325, 780–781. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0600>
- Shimabukuro, T.T., Cole, M., Su, J.R., 2021. Reports of Anaphylaxis After Receipt of mRNA COVID-19 Vaccines in the US—December 14, 2020–January 18, 2021. *JAMA* 325, 1101–1102.
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.1967>
- Stone, C.A., Liu, Y., Relling, M.V., Krantz, M.S., Pratt, A.L., Abreo, A., Hemler, J.A., Phillips, E.J., 2019a. Immediate Hypersensitivity to Polyethylene Glycols and Polysorbates: More Common Than We Have Recognized. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 7, 1533–1540.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.12.003>
- Stone, C.A., Rukasin, C.R.F., Beachkofsky, T.M., Phillips, E.J., 2019b. Immune-mediated adverse reactions to vaccines. *Br J Clin Pharmacol* 85, 2694–2706. <https://doi.org/10.1111/bcp.14112>
- Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M., 2016. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 99, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Szebeni, J., Muggia, F., Gabizon, A., Barenholz, Y., 2011. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 1020–1030. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.017>
- Trigunaite, A., Dimo, J., Jørgensen, T.N., 2015. Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell Immunol* 294, 87–94.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.004>
- Troelnikov, A., Perkins, G., Yuson, C., Ahamdie, A., Balouch, S., Hurtado, P.R., Hissaria, P., 2021. Basophil reactivity to BNT162b2 is mediated by PEGylated lipid nanoparticles in patients with PEG allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 148, 91–95.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.04.032>
- Turecek, P.L., Bossard, M.J., Schoetens, F., Ivens, I.A., 2016. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *J Pharm Sci* 105, 460–475.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.015>

- Turner, P.J., Ansotegui, I.J., Campbell, D.E., Cardona, V., Ebisawa, M., El-Gamal, Y., Fineman, S., Geller, M., Gonzalez-Estrada, A., Greenberger, P.A., Leung, A.S.Y., Levin, M.E., Muraro, A., Sánchez Borges, M., Senna, G., Tanno, L.K., Yu-Hor Thong, B., Worm, M., WAO Anaphylaxis Committee, 2021. COVID-19 vaccine-associated anaphylaxis: A statement of the World Allergy Organization Anaphylaxis Committee. *World Allergy Organ J* 14, 100517. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100517>
- Vasiadi, M., Kempuraj, D., Boucher, W., Kalogeromitros, D., Theoharides, T.C., 2006. Progesterone inhibits mast cell secretion. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19, 787–794. <https://doi.org/10.1177/039463200601900408>
- Veronese, F.M., Pasut, G., 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10, 1451–1458. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03575-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03575-0)
- Warren, C.M., Snow, T.T., Lee, A.S., Shah, M.M., Heider, A., Blomkalns, A., Betts, B., Buzzanco, A.S., Gonzalez, J., Chinthrajah, R.S., Do, E., Chang, I., Dunham, D., Lee, G., O'Hara, R., Park, H., Shamji, M.H., Schilling, L., Sindher, S.B., Sisodiya, D., Smith, E., Tsai, M., Galli, S.J., Akdis, C., Nadeau, K.C., 2021. Assessment of Allergic and Anaphylactic Reactions to mRNA COVID-19 Vaccines With Confirmatory Testing in a US Regional Health System. *JAMA Netw Open* 4, e2125524. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.25524>
- Wenande, E., Garvey, L.H., 2016. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical & Experimental Allergy* 46, 907–922. <https://doi.org/10.1111/cea.12760>
- Wenande, E.C., Skov, P.S., Mosbech, H., Poulsen, L.K., Garvey, L.H., 2013. Inhibition of polyethylene glycol-induced histamine release by monomeric ethylene and diethylene glycol: A case of probable polyethylene glycol allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 1425–1427. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.09.037>
- Wolfson, A.R., Robinson, L.B., Li, L., McMahon, A.E., Cogan, A.S., Fu, X., Wickner, P., Samarakoon, U., Saff, R.R., Blumenthal, K.G., Banerji, A., 2021. First-Dose mRNA COVID-19 Vaccine Allergic Reactions: Limited Role for Excipient Skin Testing. *J Allergy Clin Immunol Pract* 9, 3308–3320.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.06.010>
- Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., Chen, Q., 2020. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 12, 8. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
- Yang, J., Xu, L., Di, L., Su, Y., Zhu, X., 2021. Journey of Poly(ethylene Glycol) in Living Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 13, 40267–40277. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c09366>
- Zhang, Y., Chen, C., Zhu, S., Shu, C., Wang, D., Song, J., Song, Y., Zhen, W., Feng, Z., Wu, G., Xu, J., Xu, W., 2020. Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *China CDC Wkly* 2, 123–124.
- Zhou, Z.-H., Stone, C.A., Jakubovic, B., Phillips, E.J., Sussman, G., Park, J., Hoang, U., Kirshner, S.L., Levin, R., Kozlowski, S., 2021. Anti-PEG IgE in anaphylaxis associated with polyethylene glycol. *J Allergy Clin Immunol Pract* 9, 1731–1733.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.11.011>

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Albers, Baranovski, Bartsch, Bauer (Stefan), Bauer (Uta-Maria), Becker (Annette), Becker (Katja), Bertoune, Besgen, Bette, Bien, Bliemel, Bogdan, Bonaterra, Bösner, Cabanel, Carl, Cetin, Cordes, Czubayko, Damm, de Cruppé, Decher, del Ray, Denkert, Denzer, Donner-Banzhoff, Eberhart, Falkenberg, Felgentreff, Feuser, Frink, Fuest, Geisel, Geks, Geraedts, Gesche, Göbel, Görg, Gremke, Gress, Grgic, Grote, Günther, Haberhausen, Häuser, Hertl, Hildebrandt, Hoch, Hoffmann, Holzer, Hoyer, Jansen (Andreas), Jansen (Malin), Josephs, Kalder, Kann, Kanngießner, Karatolios, Keber, Keil, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kleinholdermann, Kluge, Knorrenschild, Köhler, Kruse, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier (Rolf), Markus, Meissner, Michielis-Corsten, Milani, Mirow, Moll, Muigai, Müller (Hans-Helge), Nenadić, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Paul, Pedrosa, Peterlein, Pfützner, Plant, Pöttgen, Preisig-Müller, Rastan, Reese, Renigunta, Renke, Renz, Rinné, Rost, Ruchholtz, Rust, Sahmland, Saß, Schäfer, Schieffer, Schu, Schulze, Schütz, Schwabe, Seitz, Sekundo, Sevinc, Simon, Sommer, Stahl, Stathopoulos, Steiniger, Straube, Stuck, Swaid, Tackenberg, Thieme, Timmermann, Tsalouchidou, Vahdad, Visser, Vogelmaier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Weber, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wilhelmi, Wrocklage, Wulf, Ziller.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Wolfgang Pfützner für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die gute Betreuung während der Datenerhebung und -auswertung sowie die hilfreichen Kommentare und Anregungen bei der Korrektur und Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Diana Pauly und der gesamten AG Pauly für die geduldige Einführung in die Welt der Komplementdiagnostik. Die kontinuierliche Unterstützung von der Datenerhebung bis hin zur Korrektur dieser Arbeit hat mir in vielen Situationen sehr geholfen und mich nie das Ziel aus den Augen verlieren lassen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Christian Möbs der mich in die Theorie und Praxis der Durchflusszytometrie eingeführt hat und für jegliche Fragen und Probleme stets eine Lösung parat hatte. Bedanken möchte ich mich außerdem bei dem gesamten Team der experimentellen Dermatologie in Marburg für die gute Einarbeitung in den BAT.

Dem gesamten Team des Allergiezentrum Hessen möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Hauttests und der Erhebung der klinischen Daten danken. Ein großer Dank geht auch an alle Probanden, die sich bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie sowie meinem Freund Jacob für die stetige und bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Ihr habt mir in schwierigen und für mich aussichtslosen Situationen immer wieder Mut zugesprochen und nie an mir gezweifelt. Ohne Euch wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.