

# **Vaccinegate:**

## Studio sul profilo di composizione chimica Gardasil 9



## Presentazione in breve dei risultati

Arriviamo con questa analisi al quarto vaccino analizzato con questa metodica, che mira a determinare la composizione chimico-proteica delle fiale analizzate.

In questa occasione ci siamo concentrati su un vaccino che non è obbligatorio in Italia, quello contro il papilloma virus, ma che ha fatto molto discutere nel recente passato per le numerose segnalazioni di sospette reazioni avverse pervenute nel tempo. I vaccini anti-Hpv hanno fatto molto discutere, anche fuori dall'Italia; da qui la decisione di dedicare la nostra attenzione anche a questo prodotto.

**ATTENZIONE: Gardasil 9 è un vaccino anti-Hpv che dovrebbe contenere, da foglietto illustrativo, 9 antigeni, per 9 diversi sottotipi del virus Hpv (sottotipo 6 -11 - 16 - 18 - 31 - 33 - 45 - 52 - 58). Non sono però stati rilevati tutti gli antigeni che vengono dichiarati, ma solo 7 su 9.**

In riferimento alla metodica, alle contestazioni e critiche di tipo tecnico mosse nelle ultime settimane, abbiamo risposto ([link report https://goo.gl/WfRBJB](https://goo.gl/WfRBJB)) con la relazione finale delle analisi. Sugeriamo la lettura e la diffusione di questo documento, insieme al resto, perché le spiegazioni sono piuttosto circostanziate e precise.

In questo campione di Gardasil 9 sono state riscontrate, come per i precedenti vaccini analizzati:

- **Contaminazioni chimiche provenienti dal processo di lavorazione o da contaminazioni crociate con altre linee di produzione**
- **Tossine chimiche**

ANTIGENI: come anticipato, Gardasil 9 è un vaccino anti-Hpv che dovrebbe contenere, da foglietto illustrativo, 9 antigeni, per 9 diversi sottotipi del virus Hpv (sottotipo 6 -11 - 16 - 18 - 31 - 33 - 45 - 52 - 58). Di questi, NON sono stati rilevati:

- **Proteina L1 Tipo 11 di Papillomavirus Umano (uno dei sottotipi che più comunemente vengono associati a lesioni del collo dell'utero)**
- **Proteina L1 Tipo 58 di Papillomavirus Umano (uno dei sottotipi che più di frequente è associato al cancro al collo dell'utero)**

Questi due sottotipi non sono stati rilevati con la metodica in uso (a differenza dei restanti 7).

Anche in questo caso, quindi, ci troviamo di fronte ad un prodotto che NON sembra contenere quanto dovrebbe contenere. Ovvero, di 9 antigeni, ne sono stati rilevati solo 7.

Questo apre una questione importante sulla conformità del prodotto. Questione che non sta a noi dirimere, e che come sempre giriamo a chi di competenza.

Oltre a ciò, sono stati riscontrati **338 segnali di contaminanti chimici di cui il 22% noto**. Anche questo dato è in continuità coi precedenti.

Tra questi segnali sono state identificate anche 10 tossine chimiche, probabilmente provenienti dal processo di lavorazione degli antigeni o da altri processi di produzione presenti nella sede di produzione del vaccino.

In conclusione, anche Gardasil9 - così come gli esavalenti Hexyon ed Infanrix hexa nonché il quadrivalente Priorix Tetra - secondo la metodica da noi commissionata, lascia enormi dubbi sia sull'efficacia che sulla sicurezza.

Questi prodotti, come ogni altro prodotto farmaceutico, presentano effetti indesiderati e possono scatenare reazioni avverse di varia entità, anche gravi. Se l'efficacia viene messa in dubbio dalla mancanza di uno o più antigeni rispetto a quanto dichiarato dal produttore, questo deve essere un dato noto a chi si sottopone alla loro somministrazione (diversamente si configurerebbe una condotta truffaldina da parte di chi lo vende e di chi lo somministra); per questo motivo è di fondamentale importanza proseguire nella ricerca scientifica in merito al contenuto dei vaccini, in considerazione del fatto che la popolazione pediatrica è la maggior destinataria, che i soggetti cui vengono somministrati non soffrono di alcuna patologia manifesta, e che vi è una indicazione di necessità di profilassi preventiva mediante questi prodotti da parte delle istituzioni, le quali sono quindi direttamente coinvolte nella valutazione anche del loro profilo di sicurezza e della loro conformità.



# Studio sul profilo di composizione chimica Gardasil 9

## Introduzione e descrizione del bisogno

L'indagine quali-quantitativa di composti organici riveste molta importanza in campo farmacologico, <sup>1</sup> in quanto esistono potenziali problemi di sicurezza derivanti dai nuovi processi di produzione di farmaci biologici e dalle complesse caratteristiche strutturali e biologiche di tali prodotti.<sup>2</sup> Dall'esame dei dossier di registrazione dei vaccini militari che troviamo nella relazione finale <sup>3</sup> della "Commissione parlamentare di inchiesta sugli effetti dell'utilizzo dell'uranio impoverito" <sup>4</sup> è emersa la presenza di contaminazioni e impurezze di natura chimica e proteica, che ha richiesto un ulteriore approfondimento analitico. La nostra associazione ha deciso di farsene carico, fin dove possibile. Questo progetto fa parte di questi approfondimenti. Si è reso quindi necessario sviluppare una tecnologia in grado di analizzare un ampio spettro di molecole di origine chimica, metabolica e proteica che consentisse di valutare la qualità dei prodotti ottenuti. E' stata dunque messa a punto una metodica, basata sulla tecnologia SANIST <sup>5-6</sup> per l'esecuzione del controllo di purezza di vaccini (approfondimenti in calce).

## Risultati e discussione

### 1. Analisi della composizione dichiarata in bugiardino

Composto	Presenza	Specie ionica
Sodio cloruro	Non rilevabile	-
L-istidina	Sì	[M+H] <sup>+</sup>
Polisorbato 80	Non rilevato	-
Sodio borato	Non rilevabile	-
Proteina L1 Tipo 6 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 11 di Papillomavirus Umano	Non rilevato	-
Proteina L1 Tipo 16 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 18 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 31 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 33 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 45 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 52 di Papillomavirus Umano	Sì	[M+nH] <sup>nt</sup>
Proteina L1 Tipo 58 di Papillomavirus Umano	Non rilevato	-

### 2. Analisi della frazione proteica

Secondo quanto dichiarato dal produttore, il vaccino Gardasil 9 contiene delle proteine. Il campione è stato sottoposto ad analisi per l'identificazione di queste proteine.

<sup>1</sup> Lett Appl Microbiol. 2015 Feb;60(2):174-80. doi: 10.1111/lam.12355 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376111>)

<sup>2</sup> Fuchs F., Biochimie. 2002 Nov;84(11):1173-9 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595146>)

<sup>3</sup> <http://www.camera.it/leg17/491?idLegislatura=17&categoria=022bis&tipologiaDoc=documento&numero=023&doc=pdf>

<sup>4</sup> [http://www.camera.it/leg17/436?shadow\\_organo\\_parlamentare=2588](http://www.camera.it/leg17/436?shadow_organo_parlamentare=2588)

<sup>5</sup> Albini A. et al., Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Apr 5;9:110.doi:10.3389/fendo.2018.00110. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29674995/>)



## 2.1 - 1° analisi: Saggio di Bradford

Inizialmente, per accertare l'effettiva presenza delle proteine, il vaccino Gardasil 9 è stato sottoposto al saggio di Bradford. Sono stati trattati 200 µL di campione tal quale con 300 µL di H<sub>2</sub>O osmotizzata per ottenere volume. A questi sono stati aggiunti 500 µL del reattivo di Bradford. In seguito ad un'analisi visiva, si può confermare la presenza di proteine o di sequenze peptidiche data dalla colorazione blu.

In base alla retta di taratura costruita, si è rilevata una concentrazione proteica di **0.062 mg/mL**.

## 2.2 - 2ª analisi: Digestione tal quale

Il campione è stato sottoposto ad un processo di digestione enzimatica: 10 µL di campione tal quale sono stati trattati con 50 µL di Tripsina lasciati in termoblocco a 37°C overnight. È stato preparato un controllo di emoglobina 1 mg/mL che è stato trattato come il campione.

**Da questa analisi è stata rilevata la presenza di proteine nel campione.**

## 2.3 - 3ª Analisi: Digestione del Precipitato

Il campione è stato quindi sottoposto ad un'ulteriore analisi andando a separare, attraverso centrifugazione, la parte liquida dalla parte solida. È stato prelevato tutto il surnatante. Il precipitato rimasto è stato trattato con 30 µL di Tripsina e lasciato in termoblocco a 37°C overnight. È stato preparato un controllo di emoglobina 1 mg/mL che è stato trattato come il campione. In seguito alla digestione, il campione e il controllo sono stati sottoposti a centrifugazione. È stato prelevato il surnatante e posto in vial per le analisi. Sono stati aggiunti 20 µL di H<sub>2</sub>O osmotizzata per avere abbastanza volume per l'iniezione.

**Da questa analisi è stata rilevata la presenza di proteine nel campione.**

Nome	Peso molecolare (KDa)	Score	Codice
Chain A, High resolution cryo-EM maps of Human Papillomavirus 16 reveal L2 location and heparin-induced conformational changes	54	415/50	5KEP_A
major capsid protein L1 [Human papillomavirus type 33]	56	226/50	ACV84008.1
Chain A, Crystal Structure Of Hpv58 Pentamer In Complex With The Fab Fragment Of Antibody A12a3	55	219/50	5Y9C_A
major capsid protein L1 [Human papillomavirus type 52]	59	175/50	ABU55765.1
L1 capsid protein [Human papillomavirus type 31]	56	139/50	AAA92894.1
major capsid protein L1, partial [Human papillomavirus type 16]	6	123/50	ADB97224.1
L1 protein [Human papillomavirus type 18]	64	94/50	AAP20601.1
L1 [Human papillomavirus type 45]	57	69/50	AAY86494.1
L1 [Human papillomavirus type 6]	56	72/50	AAF00066.1

## Valutazione di tossicità delle sequenze rilevate

Non è stato possibile valutare l'indice di tossicità molecolare sulla base delle sequenze peptidiche rilevate.

## Ricerca di peptidi liberi

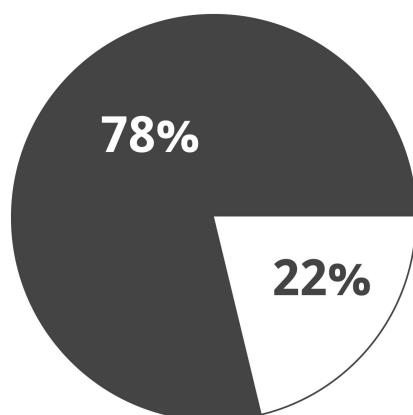
Non sono stati rilevati peptidi liberi.

### 3. Analisi della frazione metabolica

È da segnalare che questo studio di screening fornisce un dato semiquantitativo, che corrisponde ad un intervallo tra i **nanogrammi** e i **microgrammi** come ordine di grandezza indicativo. Per poter avere un dato quantitativo accurato sarà necessario procedere utilizzando standard analitici certificati a titolo noto.

Di seguito riportiamo i risultati di screening identificativo ottenuti nei due lotti sotto esame:

#### Lotto #1 (R013092)



Segnali ignoti



Segnali noti

Nel Lotto #1 abbiamo 338 segnali di cui solo il 22% noto



**NOTE PER LA COMPRESIONE:** questa è una analisi di primo livello cioè di identificazione in base al peso molecolare accurato. Ad un dato di peso molecolare sono associabili composti la cui identità deve essere confermata mediante l'analisi dello standard analitico corrispondente.

#### 3.1. Vaccino Gardasil

Sono stati rilevati **338 segnali**, di cui solo una percentuale del **22%** ha restituito una classificazione potenziale (**Tabella 1**). Si specifica il fatto che la percentuale di segnali non è esattamente correlabile con quella dei composti, in quanto, in spettrometria di massa un unico composto può generare più rapporti massa/carica ( $m/z$ ).

Deve essere specificato che l'identità dei composti non è certa e deve essere confermata mediante uno screening di secondo livello effettuato con standard analitico certificato.

Infatti, nella fase di screening, lo strumento misura un dato in peso molecolare accurato (errore di misura < 10 ppm). Sulla base di dette misure viene calcolata una formula bruta. Alcune formule possono corrispondere a più composti aventi lo stesso peso molecolare ma diversa identità chimica.



**NOTE PER LA COMPRESIONE:** in sostanza, il dato certo è che abbiamo diversi segnali incogniti a cui non è stata attribuita un'identificazione mediante ricerche nelle banche dati internazionali.

Sono state ricercate molecole potenzialmente appartenenti alla categoria delle tossine. Esse sono state ipotizzate sulla base di una ricerca in



modalità m/z accurato (errore <10 ppm) utilizzando la banca dati dei composti tossici presenti nel motore di ricerca Metlin. La Tabella 2 mostra i candidati ottenuti.

#### 4. Considerazioni finali

Dalle analisi effettuate sui due lotti risulta essere presente una variabilità significativa nel contenuto di contaminanti ed impurezze; di queste, gran parte non sono state caratterizzate utilizzando le banche dati metaboliche e proteiche di riferimento (KEGG, NCBI-Prot e SwissProt).<sup>8-9</sup> Emerge una criticità nella contaminazione da parte di svariati composti potenzialmente o sicuramente nocivi per la salute umana.

**In sintesi, le prime domande che ci siamo posti, e relative risposte ottenute, sono le seguenti:**

1. Sono presenti le sostanze chimiche riportate nella scheda tecnica?	<b>in parte</b>
2. Sono presenti contaminazioni chimiche?	<b>Sì</b>
3. Quanti sono i composti contaminanti?	<b>Oltre i 70</b>
4. Cosa sono potenzialmente?	<b>Tossine chimiche, composti chimici</b>

#### Prossime analisi

1. identificare in maniera certa i composti probabili più interessanti
2. determinare la quantità esatta di ciascun contaminante

#### 5. Sviluppi futuri della ricerca

Saranno eseguite le analisi di conferma, di identità, mediante la tecnica "Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)" associata all'ausilio di standard analitici certificati. Le analisi saranno eseguite in conformità alle direttive europee (EU directive 2002/657/EC) utili per l'identificazione dei composti.

29

#### 6. Descrizione della tecnologia SANIST

L'innovativa piattaforma SANIST riconosciuta a livello internazionale, mediante pubblicazioni su riviste scientifiche pre-referate<sup>6-7</sup> è stata utilizzata per eseguire un primo screening identificativo sui vaccini di interesse.

#### 7. Dettagli relativi alla metodica analitica

La tecnologia SANIST è composta da:

- un **kit** per l'estrazione degli analiti (le sostanze incognite da determinare);
- il sistema di analisi **LC-SACI/ESI-MS**<sup>6</sup> che consente di ridurre il rumore chimico degli spettrometri di massa ed ottenere una migliore rilevazione dei segnali strumentali;
- il **Sistema di elaborazione dati SANIST**<sup>5-6</sup> costituita da una piattaforma di bioinformatica locale e di rete in grado di elaborare i dati mediante l'ausilio di banche dati dedicate ed algoritmi personalizzati. Si specifica che, nella fase di screening, i riconoscimenti sono effettuati nell'ambito della ricerca scientifica e tramite ricerca nelle banche ufficiali (KEGG, NCBI-Prot e SwissProt)<sup>8-9</sup> senza l'ausilio di

<sup>6</sup> Albini A. et al., Rapid Commun Mass Spectrom. 2015 Oct 15;29(19):1703-10. doi: 20.1002/rcm.7270. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rcm.7270>)

<sup>7</sup> Cristoni S. et al., J Mass Spectrom. 2017 Jan;52(1):16-21. doi:10.1002/jms.3895. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776380>)

<sup>8</sup> Kanehisa M. et al., Nucleic Acids Res. 2017 Jan 4;45(D1):D353-D361. doi:10.1093/nar/gkw1092. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210567/>)

<sup>9</sup> Cristoni S. et al., Expert Rev Proteomics. 2004 Dec; 1(4):469-83. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15966842>)



standard analitici certificati. **Si rende quindi necessario effettuare un'analisi di secondo livello con standard analitici certificati per confermarne l'identità.**

## 8. Settori di applicazione della tecnologia SANIST

La **piattaforma SANIST** è applicabile fino ad oggi nei seguenti campi:

- Nella **ricerca clinica** di marcatori di malattie e loro applicazione diretta nel campo diagnostico.
- Servizi alimentari**, tracciabilità alimentare. Studi comparativi per determinare la qualità dei prodotti basati sulla loro complessa composizione molecolare. Controllo di contraffazione alimentare.
- Settore Nutraceutico**, sviluppo del valore nutrizionale di un integratore alimentare basato sulla sua composizione molecolare. Ricerca contraffatta (ad esempio: aggiunta di farmaci).
- Settore farmaceutico**, controllo di farmaci e ricerca di biomolecole attive.
- Industria cosmetica**: la composizione molecolare dei prodotti cosmetici può essere attentamente monitorata e correlata con la qualità del prodotto.

## 9. Come leggere le tabelle

Questa è una fase di screening, lo strumento misura un dato in peso molecolare accurato (errore di misura < 10 ppm). Sulla base di dette misure viene calcolata una formula bruta. Alcune formule possono corrispondere a più composti aventi lo stesso peso molecolare ma diversa identità chimica (vedi tabella 1)

**Esempio di un solo componente associato:**

■ Istamycin C1	C19H37N5O6
----------------	------------

In questo esempio, lo strumento ha rilevato un segnale con un determinato peso molecolare. Inserendo la formula bruta nelle banche dati, è stato possibile associare **un componente probabile**.

## 10. Tabelle complete dei contaminanti

**Tabella 1**

Composti candidati	Formula Bruta	Rapporto m/z
▪ (-)-Jasmonic acid	C12H18O3	211.1313019
▪ (10S)-Juvenile hormone III diol	C16H28O4	285.2043152
▪ 16alpha,17alpha-Dihydroxyprogesterone acetophenide	C29H36O4	449.2609863
▪ 1-Palmitoyl-2-(5-keto-8-oxo-6-octenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	C32H58NO10P	648.3792725
▪ 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedioate	C6H4Cl2O5	226.9511973
▪ 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedioate	C6H4Cl2O5	226.9511795
▪ 2-Ethylhexyl phthalate	C16H22O4	279.158844
▪ 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone	C5H3Cl3O3	216.9224243
▪ 4-Prenyldihydropinosylvin	C19H22O2	283.1706238
▪ 5-O-Methyl-myo-inositol	C7H14O6	195.0874863
▪ 6-Keto-prostaglandin F1alpha	C20H34O6	371.2367249
▪ 6-Mercaptopurine ribonucleoside triphosphate	C10H15N4O13P3S	524.9658813
▪ Acetylintermedine	C17H27NO6	342.1893311
▪ Acetylspiramycin	C45H76N2O15	443.2720133
▪ all-trans-Hexaprenyl diphosphate	C30H52O7P2	587.3295288
▪ Aphidicolin	C20H34O4	339.2527161
▪ Astemizole	C28H31FN4O	459.2644653
▪ Auriculine	C31H45NO8	560.3268331
▪ Avadharidine	C36H51N3O10	343.6897583
▪ Benzo[b]fluorene	C17H12	217.1044159
▪ Brunfelsamidine	C5H7N3	110.0712204
▪ Canthiumine	C33H36N4O4	553.2880859
▪ Chivosazole F	C41H57NO8	692.405426
▪ Chloral hydrate	C2H3Cl3O2	164.9265976
▪ Colubrinoside	C50H78O19	492.2683563
▪ Cucurbitacin B	C32H46O8	559.3309937
▪ Dauricine	C38H44N2O6	625.3318481
▪ Fasoracetam	C10H16N2O2	197.1282654
▪ Formothion	C6H12NO4PS2	257.9989014
▪ Fumitremorgin A	C32H41N3O7	290.6576843
▪ Fusaproliferin	C27H40O5	445.2876994
▪ Grayanotoxin I	C22H36O7	413.2475128
▪ GTP-gamma-S	C10H16N5O13P3S	539.9771729
▪ Hexachloro-1,3-butadiene	C4Cl6	258.8174744
▪ Hydrocortisone cypionate	C29H42O6	487.2982686
▪ Istamycin C1	C19H37N5O6	432.2798767





▪ JSTX-3	C27H47N7O6	566.3640747
▪ Kolanone	C33H42O4	503.3056641
▪ Lasiocarpine	C21H33NO7	412.2279358
▪ Lasonolide A	C41H60O9	697.4401855
▪ Leurosine	C46H56N4O9	405.2019348
▪ L-Histidine	C6H9N3O2	156.0765839
▪ Lovastatin acid	C24H38O6	423.2746124
▪ Melagatran	C22H31N5O4	430.2484894
▪ Methyllycaconitine	C37H50N2O10	683.3430176
▪ Mibefradil	C29H38FN3O3	496.3033905
▪ Mycinamicin IV	C37H61NO11	696.4367879
▪ Netilmicin	C21H41N5O7	476.3059031
▪ Oleoylglycerone phosphate	C21H39O7P	435.2471924
▪ Onnamide A	C39H63N5O12	794.454895
▪ Ophiobolin A	C25H36O4	401.2615814
▪ Pentachlorophenol	C6HCl5O	264.8521729
▪ Perfluorooctylsulfonyl fluoride	C8F18O2S	502.9395752
▪ Platycodin A	C59H94O29	634.3006592
▪ Pleurostyline	C25H29N3O2	404.2324829
▪ Prednisolone tebutate	C27H38O6	459.2792511
▪ Probucol	C31H48O2S2	517.3231506
▪ Protoporphyrinogen IX	C34H40N4O4	569.3136597
▪ Repaglinide	C27H36N2O4	453.2725677
▪ Repaglinide	C27H36N2O4	453.2766724
▪ Resolvin D1	C22H32O5	377.2325999
▪ Rhodojaponin IV	C24H38O8	455.2614441
▪ RU-0211	C20H32F2O5	391.2341309
▪ Sulfluramid	C10H6F17NO2S	527.9948934
▪ Symlandine	C20H31NO6	382.2190247
▪ Taurocholate	C26H45NO7S	516.300827
▪ Tiadinil	C11H10ClN3OS	268.0276947
▪ Trichloroethanol	C2H3Cl3O	148.9350891
▪ Valinomycin	C54H90N6O18	556.3158875
▪ Valnemulin	C31H52N2O5S	565.3616435
▪ Violacene	C10H13BrCl4	352.8970642
▪ Westiellamide	C27H42N6O6	547.3314819
▪ Zineb	C4H6N2S4. Zn	274.8809814



**Tabella 2**

Rapporto m/z	Molecola*
157.0799179	C7H12N2S
173.0782318	C4H8N6O2 C6H11F3O2
178.0585175	C6H6F3N3 C4H3N9
195.1224823	C8H18O5
200.0403748	C5H13NO3S2
206.893631	C4H2Cl4O
208.8906708	C3H4Cl4Si
218.9194489	C4H10Se2 C6H4BrO2P C5H5Cl3OS
272.1782837	C13H25N3OS C15H26ClNO
278.1966248	C14H23N5O C13H27NO5

\* Formule brute associabili a composti tossici candidati.

