

Vaccinegate:

Approfondimenti sulle sequenze
di acidi nucleici (DNA e RNA) relativi
al frammento L1 del genoma di HPV
in Gardasil 9, lotto 9R009338



Presentazione in breve dei risultati

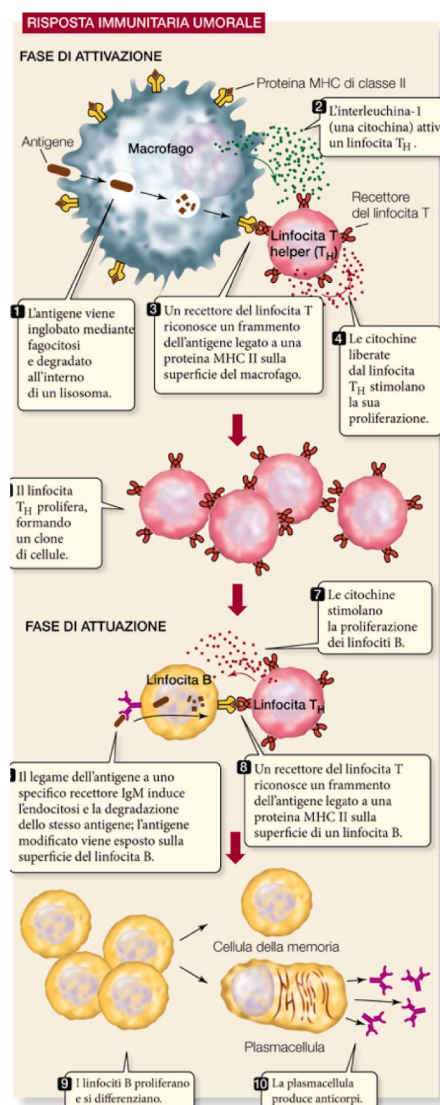
Dal precedente report sulle analisi metagenomiche del Gardasil 9 ¹ era emersa la presenza di frammenti L1 del genoma del virus HPV, ma non era stato studiato a quali tipi di papilloma virus appartengono (il vaccino contiene i ceppi 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58).

Dall'analisi in proteomica ² in LC-MS è risultato che mancavano i ceppi 11 e 58, ponendo un dubbio riguardo l'efficacia del vaccino, infatti l'assenza poteva essere interpretata in vari:

- A. con la presenza della proteina antigenica ma sottosoglia;
- B. con la presenza della proteina nella parte non identificata perché legata chimicamente all'alluminio e quindi indigeribile e insolubile (abbiamo il dubbio che la mancata digestione in vitro avvenga anche in vivo e questo impedisca la formazione di anticorpi specifici contro l'antigene vaccinale proteico, che ha bisogno di essere frammentato in peptidi corti per poter stimolare la risposta anticorpale corretta *);
- C. con l'assenza della proteina.

In ognuno dei casi la risposta immunitaria potrebbe essere parziale o nulla.

* Si ricorda che perché avvenga la risposta immunitaria umorale, che porta alla formazione di anticorpi come avviene in seguito alla vaccinazione, l'antigene deve essere digerito ed esposto sulla membrana delle cellule presentanti l'antigene (APC):

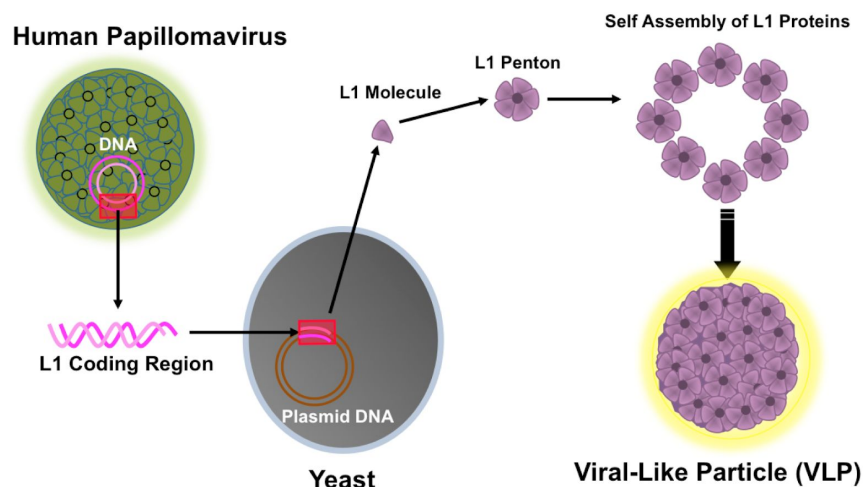


¹ <https://www.corvelva.it/it/speciale-corvelva/vaccinegate/analisi-metagenomiche-su-gardasil-9.html>

² <https://it.wikipedia.org/wiki/Proteomica>



Si ricorda che il processo di preparazione del vaccino coinvolge la sintesi ricombinante delle principali proteine L1 del capside che si autoassemblano in un guscio di 72 capsomeri pentamerici per formare particelle virali (VLP). Lo pseudovirus assemblato è molto simile al papillomavirus umano nativo ed è altamente immunogenico:



Dallo studio in metagenomica dei frammenti L1 dei ceppi HPV vaccinali è **risultato che il ceppo 58 è assente sia come DNA che come RNA**, ciò può essere dovuto per le stesse ragioni per cui non si trova la proteina, in quanto anche il sequenziamento del DNA e dell'RNA potrebbe essere ostacolato dal legame con l'alluminio (come dimostrato nei suoi studi dal prof. Lee citati in seguito nelle note), oppure effettivamente potrebbe mancare l'antigene.

L'assenza del DNA e la presenza dell'RNA per i tipi 16, 6, 11, 33, 52, 45, 31 sta ad indicare che i ceppi ci sono e c'è il riscontro anche nell'analisi con LC-MS con la rilevazione delle proteine, tranne per il ceppo 11.

Il ceppo 20 non è dichiarato nella scheda tecnica perciò si può ritenere un potenziale contaminante.

Le copie di virus indicate come Human papillomavirus e Unsigned Papillomaviridae sono pezzi dei frammenti L1 che non è possibile attribuire ad un ceppo specifico.

Per approfondimento sono stati sequenziati i frammenti L1 presenti in maggior numero di copie, cioè **i ceppi 18, 16, e 6 e sono stati confermati.**

Le implicazioni legate alla presenza di questi frammenti sono quelle già riportate dal prof. Lee nelle sue pubblicazioni, e cioè che la presenza dell'alluminio ne stabilizza la degradazione, potenziando la capacità di attivare una potente risposta infiammatoria a lungo termine e di essere trasportati attraverso il sistema linfatico nei macrofagi in vari distretti dell'organismo.



Approfondimenti sulle sequenze di acidi nucleici (DNA e RNA) relativi al frammento L1 del genoma di HPV in Gardasil 9, lotto 9R009338

Tipo di prodotto: Vaccino Papilloma virus umano, HPV (ceppi 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58); **Produttore:** MSD Vaccins - fabbricato Merck Sharp and Dohme; **Composizione:** Sostanze attive: 9 proteine L1 non infettive, altamente purificate di Papilloma virus umano (ceppi 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) in quantità variabili tra 20 e 60 microgrammi. Le proteine L1 sono nella forma di pseudo particelle virali prodotte su cellule di *Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 mediante tecnologia del DNA ricombinante. Adsorbite su adiuvante alluminio (Al: 0.5 milligrammi); cloruro di sodio, L-istidina, polisorbato 80, borato di sodio.

Tipizzazione delle sequenze di DNA e RNA relative al frammento L1 del genoma di HPV

La presenza di sequenze con omologia con il frammento L1 del genoma del virus HPV è stata rilevata sia nei dati RNA-seq (sequenze trascritte) che DNA-seq tramite software Kraken2 v 2.0.6³ utilizzando il database nt dell'NCBI. In particolare:

- DNA-seq: 752 frammenti da 250bp su 4.597.491, pari allo 0.02% dei frammenti sequenziati
- RNA-seq: 53184 frammenti da 250bp su 6.247.929, pari allo 0.9% dei frammenti sequenziati

Le sequenze del genoma di HPV sono state quindi confermate e tipizzate *in silico* utilizzando il software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sullo stesso database (nt di NCBI).

Di seguito i risultati ottenuti:

Gardasil papilloma virus type		
DNA	Absolute number of reads	% of reads
Human papillomavirus type 18	12	0,0003%
Human papillomavirus type 20*	545	0,01%
Human papillomavirus type 16	0	0%
Human papillomavirus type 6	0	0%
Human papillomavirus type 11	0	0%
Human papillomavirus type 33	0	0%
Human papillomavirus type 52	0	0%
Human papillomavirus type 45	0	0%
Human papillomavirus type 31	0	0%
Human papillomavirus type 58	0	0%
Human papillomavirus	96	0,002%
Unassigned Papilloma Viridea	87	0,001%

³ Wood and Salzberg. Kraken: ultra-fast metagenomic sequence classification using exact alignments Genome Biology 2014, 15: R46

RNA	Absolute number of reads	% of reads
Human papillomavirus type 18	28.224	0,5%
Human papillomavirus type 16	10.693	0,2%
Human papillomavirus type 6	1.649	0,03%
Human papillomavirus type 11	6	0,0001%
Human papillomavirus type 33	3	0,00005%
Human papillomavirus type 52	2	0,00003%
Human papillomavirus type 45	1	0,00002%
Human papillomavirus type 31	2	0,00003%
Human papillomavirus type 58	0	0%
Human papillomavirus	3.710	0,06%
Unassigned Papilloma Viridea	10.715	0,2%

* Genotipo non dichiarato in bugiardino

Si fa notare che i frammenti classificati come 'Human papilloma virus' e 'unassigned papilloma virus' sono sequenze di pezzi del frammento L1 che non sono distinguibili tra i diversi genotipi. La presenza di residui di DNA del frammento L1 nel vaccino per l'HPV è già stata riportata nella letteratura scientifica.⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷

⁴ Lee SH. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil. J Inorg Biochem. 2012 Dec;117:85-92.

⁵ Lee SH. Detection of human papillomavirus L1 gene DNA fragments in postmortem blood and spleen after Gardasil® vaccination—A case report. Advances in Bioscience and Biotechnology 2012; 3:1214-1224.

⁶ Lee SH. Topological conformational changes of human papillomavirus (HPV) DNA bound to an insoluble aluminum salt—A study by low temperature PCR. Advances in Biological Chemistry 2013; 3: 76-85.

⁷ Lee SH. Melting profiles may affect detection of residual HPV L1 gene DNA fragments in Gardasil®. Curr Med Chem. 2014 Mar;21(7):932-40.

Ricostruzione delle sequenze di DNA e RNA del frammento L1 del genoma di HPV

Per la numerosità non sempre elevata di sequenze attribuibili ai diversi tipi virali contaminanti, è stato possibile ricostruire tramite assembly de novo con software CLC Genomics Workbench v7.0 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) contigui (o contig) più lunghi a partire dalle sequenze estratte dai dati RNA-seq in base alla loro similarità per i genotipi 6, 16, e 18. I contig assemblati sono stati successivamente sottoposti a ricerca di omologia in sequenza contro il database NCBI tramite BLAST. Si riporta il miglior hit o nel caso ci fosse più di una sequenza omologa allo stesso livello è stata scelta la prima hit elencata, possibilmente appartenente ad un genoma completo.

Contiguo riferibile al genotipo 6 (1547 bp)

>ID1206_3_Ga.HPV_6.extracted_reads_contig_1

```
CATCTTTTCGTAAATTTCTGGCAAGGTAGACAAGCCGACAACTTGATTGGAGACTTGAC
CAAACCTCTGGCGAAGAAGTCCAAAGCTTGGATCTTACCTTTTAGTTTGGCGCGCTTAC
GTTTAGGGGCAGCAGAGGCTTTGGAAACAGCAGGGCGCTTAACACCGGTACGAATAGAGG
ACCGTCCCCTATATCCACTTTGTAAACAAAACTTGCGTCCCAAGGATACTGATCCAATT
CACTAGAAAACCTTTCTTTTAAATTAACCTCCCAAACTAAGGTTCTTATAGGGATCTG
GCTTTTCCTTTTCAGGAGTGGGCTTTTGACAGGTAATGGCCTGTGACTGCACATACCTAT
AGGTATCTTCTAATGTACCATTTGGGGAGGCGATAACCCAAAGTTCAGTCTTCCAAA
CAGAGGGATTCAATGTGTGAATATAGGCCATTACTTCAGCAGACAATGTAATGCTACATA
ATTGAAAAATAAATGTAAATCATACTCTCCACATGACGCATGTACTCTTTATAATCAG
AATTGGTGTATGTGGAAGATGTAGTTACGGATGCACATAATGTCAATGTTGGTACTGCGTG
TGGTATCTACCACAGTAACAAACAGTTGATTACCCCAACAAATACCATTGTTATGTCCCT
GGGCTTTTGTAGCCAATATGGCTTATTAACAATTTGTGCCTCAGAGGACACCAAAGAGC
CGCTTGGGGTGTAAACATATATACTACTCCCTACAGACGTGCGATTTCCTACTACCTTAA
TTATAAGAGTATCAGGCACAGGTTCCCCACCTCGCCAGCCCTGTTAAAAAATGTCTGG
CAACATTTGTTCCTTCCGTAGAAAAAATAATCTATCACCATATGGGCTGCGAGCCA
TTTGTAATAAATCTGGATATTTACATGTAGTGCCACATATGTCAATAGGAACATCTGATT
TATTGGTCTGCAATCAGCAAAATTCATAGCACCAAGCCTGTGTCAACCATATCGCCAT
CCTGTATAACACTGGTAATAAGTTCTAAGGGCGGGCAGTCACCAGCCTGTACAGGTGTAT
TAGTACACTGTTTACCTTTACCCCAATGCTCGCCAAAGGGGGGCACATCCAACCATGC
ATAATTGTGTTTGTATAATCCATACCTACATTAACCCTGTTATACAGGATGGCGATAT
GGTTGACACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTGCTGATTTGCAGACCA
```



L'analisi Blast di questa sequenza contigua di 1547 bp ha mostrato identità per 1152 basi con la sequenza avente numero di accessione gb|HG793929.1 e definita come 'Human papillomavirus type 6, isolate 121' (e-value = 0; 100% di similarità)

Contigui riferibili al genotipo 16 (1316 bp)

>ID1206_3_Ga.HPV_16.extracted_reads_contig_1

TGATACTTTAGGAACTAATATTTTGTGTTTGTAGGTTTTTAATAGGAAAATAGGGATG
TCCAACGTGCAAGTAGTCTGGATGTTCCCTGCATGATAATATATGTTTGTGCGTGCAACATA
TTCATCCGTGCTTACAACCTTAGATACTGGGACAGGAGGCAAGTAGACAGTGGCCTCACT
AGGCAGCCAAAGAGACATTTTGTGTTGTGAGATCCGGGTTTTTCTCCTTGACGTTAAA
GTA

>ID1206_3_Ga.HPV_16.extracted_reads_contig_2

TAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGTATCAACAACAGTAACAA
ATAGTTGGTTACCCCAACAAATGCCATTATTGTGGCCCTGTGCTCGTTGTAACCAATAAG
GTTTATTGAATATTTGGGCATCAGAGGTAAACATAGAACCCTAGGTGTAGGAAAATAAT
TTGAACTGGCTAAATTTGCAGTAGACCCAGAGCCTTTAATGTATAAATCGTCTGGTACAT
TTTCACCAACAGCACCAGCCCTATTAATAAATGTCTAACAAACATTTGTTCCCTTCGTA
AATAAAAAAATAAGCTGTCGCCATATGGTCTGACACCATTTAATATAATCTGGATATT
TGCAATAGATGTACAAATATCCAGTGGAACCTTCACTTTTGTAGCCTGTAATGTAGTAA
AGTCCATAGCACCAAGCCAGTATCAACCATATCACCATCCTGAATAACTGTGTTTATTA
ACTCTAATGGTGGACAATCACCTGGATTTACTGCAACATTGGTACATGGGGATCCTTTTGC
CCAGTGTTCCCTATAGGTGGTTTGCAACCAATTAAACACAATTGTGTTGTTGTAAAT
CCATAGATATACATTCTTATTATCCACACCTGCATTTGCTGCATAAGCACTAGCATTTT
CTGTGTCATCCAATTTATTTAATAAAGGATGGCCACTAATGCCACACCTAATGGCTGAC
CAGCCTACCTCAACACCTACACAGGCCCAAACCAGCCGCTGTGTATCTGGATTA

>ID1206_3_Ga.HPV_16.extracted_reads_contig_3

TCACCGTCTTGGATGACAGAGTTCTTCAATTCCAATCGGTGAACACTGGGGTAAGGGTTC
TCCATGTTCTAACAACGCTATCACCCAGGTGACTGTCCACCATTGGAATTGAAGAACTC
TGTCATCCAAGACGGTGACATGGTCGACACCGGTTTCGGTGTATGGACTTCACCGCTTT
GCAAGACACCAAGTCTAACGTCCCATTTGGACATCTGTAACCTCTATCTGTAAGTACCCAGA
CTACTTGAAGATGGTCGCTGAACCATACGGCGACACCTTGTTCTTCTACTTGCGTAG

L'analisi Blast di queste 3 sequenze contigue di complessivamente 1316 bp, ha mostrato identità con:

- **Contig_1 (243 bp):** per 200 bp con la sequenza gb|HQ644245.1| Human papillomavirus type 16 isolate Fr312312 (e-value= 2,59E-95; 99% di identità)
- **Contig_2 (776 bp):** per 776 bp con la sequenza gi|1368653152|dbj|LC368994.1|Human papillomavirus type 16 TK121 genomic DNA (e-value=0; 100% di identità)
- **Contig_3 (297 bp):** per 261 bp con la sequenza gb|KR029094.1|Human papillomavirus type 16 major capsid protein (L1) gene (e-value= 4,49E-44; 79.7% di identità)



Contiguo riferibile al genotipo 18 (1308 bp)

>ID1206_3_Ga.HPV_18.extracted_reads_contig_1

```
ATTTTCAGCTGGTGCAGCATCCTTTTGACAGGTAATAGCAACAGATTGTACAAAACGATA
TGTATCCACCAAACTAGTAGTTGGCGGGGGGGAACACCAAAGTTCCAATCCTCTAAAAT
ACTGCTATTCTACTATGAATATAGGACATAACATCTGCAGTTAAAGTAATAGTACATAA
CTGAAAAATAAACTGCAAATCATATTCTTCAACATGTCTGTCTACTGCTTAAATTTGGT
AGCATCATATTGCCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAAGCACATATTGTTAAATTTGGTACT
ACGAGTGGTATCTACCACAGTAACAAATAATTGATTATGCCAGCAGATACCATTTGTTATG
ACCCGTGTCCTTATGTAACCAATATGGTTTATTAAACAACCTGGGAGTCAGAGGTAACAAT
AGAGCCACTTGGAGAGGGAGAATACACACAGCTGCCAGGTGAAGCACGCATACCTGTGCC
TTTAATATATAAGGATTGAGGCACAGTGTACCCATAGTACCTGCCCTATTCCAAAAATG
CCTAGCAAAAAGCTGCTCACGTCGTAAGCAAAAAACATGGAATCCCATAAGGATCTGC
AGACATTTGTAAATAATCAGGATATTTACAAATAGACTGACAAATATCCAATGGTACCTC
ACATTTAGTATCTTGCAATGTACTAAAGTCCATGGCACCATATCCAGTATCTACCATATC
ACCATCTTCCAAAACCTGTGTTCTTAAGTTCTAAAGGGGGGCAATCGCCCTGTGATAAAGG
ACGCGATTTACAAGCAGTGCCTTTAGCCAGTGTTCCTCAATAGCAGGGGCACAGCCCAA
AATACATAACTGTGTCTGCTTATAATCTACAGACACATTGTCCCTAACGTCTCAGAAAC
ATTAGACGTAGCGGCATGGGAACCTTTCAGTGTCTCTAATTTATTATAAAATGGATGCC
ACTAAGGCCAACACCTAAAGGCTGACCACGGCCAATTTCCACTCCAGCACAGGCCACAC
TAAACGTTGTGTTTCAGGATTATAAATACTATTATCAGGTAAACCAATTTATTTGGGTC
AGGTAAGTGCACCCGAAATACTCTATATTGGTATGCAGAAACCTTAGGAATATCCTGCTT
ATTGCCACCACCTGCAGGAACCTTAAATATGGATTACCAACAGTTAATAATCTAGAGCT
GCCAGCATGATAAAATATGCTTGTGCGAGTCACATAATCATCAGTATTTACAACCTCTTGC
CACAGAAGGAGGTGGAAGGTATAC
```

L'analisi Blast di questa sequenza contigua di complessivamente 1308 bp, ha mostrato identità per con la sequenza numero di accessione gb|KC470227.1 Human papillomavirus type 18 isolate Qv12693 (e-value= 0; 99.89% di identità).

