

# Vaccinegate:

## Resoconto dei risultati finora ottenuti

(Marzo 2019)



## 1. Resoconto dei risultati finora ottenuti

Da luglio 2018 a oggi sono passati 8 mesi e in questi mesi abbiamo raggiunto risultati estremamente soddisfacenti. Abbiamo presentato un programma di ricerca (<https://goo.gl/7mCnKf>) e per quanto riguarda l'analisi dei vaccini siamo in grado di fare il punto della situazione, con gli obiettivi raggiunti, quelli in fase di completamento e quelli ancora in programma.

Con questo report vogliamo ricapitolare brevemente cosa abbiamo fatto, cosa stiamo attualmente facendo, cosa manca in programma e, forse, l'elemento più importante, quale obiettivo vogliamo raggiungere.

Sono stati analizzati i seguenti vaccini in maniera "completa":

### **Infanrix Hexa - GlaxoSmithKline Biologicals s.a.**

Vaccino (adsorbito) antidifterico (D), antitetanico (T), antipertossico (componente acellulare) (Pa), antiepatite B (rDNA) (HBV), antipoliomielitico (inattivato) (IPV) e anti-Haemophilus influenzae tipo b (Hib) coniugato.

### **Priorix Tetra - GlaxoSmithKline S.p.A.**

Vaccino a virus attenuati antimorbillo, antiparotite, antirosolia e antivaricella

### **Hexyon - Sanofi Pasteur Europe**

Vaccino coniugato (adsorbito) contro difterite, tetano, pertosse (componente acellulare), epatite B (rDNA), poliomielite (inattivato) ed Haemophilus influenzae di tipo b.

### **Gardasil 9 - MSD Vaccins**

Vaccino del Papillomavirus Umano 9-valente (Ricombinante, adsorbito) **proteine L1 dei tipi 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58**

Sono stati analizzati questi altri vaccini come screening iniziale:

### **Measles vaccine live B.P. - Poonawalla Group (Profarma AG, Baar)**

Vaccino virus vivo attenuato di morbillo

### **MMR vax Pro - MSD Vaccins, Francia**

Vaccino a virus vivi attenuati morbillo, parotite, rosolia

### **PoliInfanrix - GlaxoSmithKline, Belgio**

Vaccino (adsorbito) contro difterite, tetano, pertosse (componente acellulare) e poliomielite (inattivato).

### **Fluad - Seqirus Srl, Siena**

Vaccino contro l'influenza

### **Vivotif - PaxVax, Regno Unito**

Vaccino contro la febbre tifoide

Le analisi effettuate hanno permesso di concludere i seguenti step:

**1. Valutazione della conformità della composizione come indicato nella scheda tecnica dei vaccini**

**2. Screening delle contaminazioni chimiche, proteiche/peptidiche e di materiale genetico**

**3. Studio di conferma di composti target (chimici e proteici) con standard certificati di controllo**



## 2. Tecnologie utilizzate

Lo studio si è articolato su:

### Analisi delle impurezze e contaminazioni chimiche e proteiche

- Il sistema di analisi LC-SACI/ESI-MS associato all'innovativa piattaforma SANIST è stato utilizzato sia per eseguire un primo screening identificativo sui vaccini di interesse, che per la conferma con gli standard di controllo, con un limite minimo tra i nanogrammi e i microgrammi/dose
- La tecnologia MALDI-TOF-MS è stata utilizzata per studiare le macromolecole insolubili presenti nei vaccini

### Analisi del materiale genetico

- Test di presenza di acidi nucleici (DNA/RNA) di origine umana e animale e da microrganismi (virus, batteri) utilizzando la metodica Next Generation Sequencing, che ha permesso di quantificare in maniera altamente specifica e accurata la sequenza del materiale genetico contenuto nei vaccini esaminati.
- Verifica di corrispondenza delle sequenze genomiche dei batteri e virus vivi attenuati o inattivati presenti nei vaccini (presenza di varianti genetiche)

### Analisi quantitativa dei metalli

- la tecnologia ICP-MS ha permesso di quantificare i metalli presenti nei vaccini con un limite minimo di 5ng/dose.

## 3. Analisi delle contaminazioni chimiche e proteiche

Dopo un primo screening che aveva individuato la presenza di centinaia di segnali chimici all'interno dei vaccini, **sono state eseguite le conferme mediante standard di 2 composti per vaccino, utilizzando standard di controllo certificati**, scelti tra quelli noti per il loro profilo critico di pericolosità e per la quantità non residuale (tale da poter essere considerati dei componenti dei vaccini, quindi da inserire in scheda tecnica e quantificati).

**Queste conferme hanno dato esito positivo, pertanto confermano interamente la metodica di analisi.** Per ora sono state effettuate su soli due composti per motivi prettamente economici, questo studio infatti non è esaustivo perché limitato dal costo notevole dell'indagine ma abbiamo scelto di identificare gli standard che hanno maggiore impatto a livello di limitazioni normative ed è altresì vero che non spetterebbe a noi questo tipo di indagine così approfondita.

Le contaminazioni osservate sono probabilmente dovute a fenomeni e variabili associati al processo di lavorazione. Ciò che è stato osservato nel corso degli studi è una variazione interlotto di tale composizione che porta a presupporre che esistano processi difficilmente controllabili all'interno dell'iter complessivo di lavorazione del prodotto. Considerando i soliti fattori analitici si può ipotizzare che la concentrazione sia nell'ordine dei microgrammi/mL. Per quanto riguarda la quantità cumulativa è possibile stimare sulla base di una valutazione semiquantitativa (in quanto la maggior parte dei composti non sono noti) che i contaminanti siano dell'ordine dei 50 µg/mL. Questo dato è importante perché la linea guida dell'EMA/FDA <sup>1</sup> è chiara in proposito: le contaminazioni non devono essere presenti (sotto il limite di rivelabilità) o se lo sono vanno ben caratterizzate e va dimostrato di applicare metodiche appropriate per ridurle il più possibile. Nel nostro caso i contaminanti che abbiamo trovato non sono sotto il limite di rivelabilità dello strumento (ng/mL) e quindi a nostro avviso il produttore non sta applicando alcuna metodiche di purificazione. Per quanto riguarda la presenza di virus avventizi il problema non sussiste, perché devono essere assenti del tutto.

**IN CORSO - Sono in corso le analisi di conferma interlaboratorio di questi composti.**

I composti identificati mediante standard saranno riconfermati con la medesima tecnologia in altri laboratori. Uno dei target che ci siamo prefissati è coordinare questa azione anche mediante il supporto di associazioni internazionali.

**IN CORSO - Studio della cinetica di precipitazione degli antigeni legati all'alluminio.**

## 4. Analisi metagenomiche

**IN CORSO - Analisi con ulteriori standard di controllo del DNA e dell'RNA di un altro lotto per vaccino.**

Dall'inizio di questo progetto ci è stato chiaro che le analisi, per rispondere ai requisiti necessari della replicabilità e accuratezza del dato, dovessero essere effettuate con strumentazione d'avanguardia, e monitorando le eventuali differenze intralotto e tra lotti diversi. Mentre procediamo con le indagini, vengono continuamente analizzati altri lotti, ovviamente limitatamente ai costi e alla reperibilità dei prodotti.

<sup>1</sup> [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf)



**IN CORSO - Analisi di sequenziamento del genoma del DNA fetale proveniente dalla linea cellulare MRC-5.**

Già nel primo screening avevamo avuto modo di confermare mediante standard che le linee diploidi utilizzate erano MRC-5, come dichiarato in scheda tecnica. Vogliamo approfondire lo studio di questa linea cellulare anche in virtù del fatto che è presente in quantitativi notevoli e di dimensioni assolutamente considerevoli.

**IN CORSO - Studio delle varianti minori (quasispecie) dei virus del morbillo, parotite e rosolia.**

Rispetto al primo report di luglio 2018 (<https://goo.gl/cSspVH>) abbiamo commissionato lo studio approfondito delle varianti minori poiché le mutazioni dei virus attenuati vaccinali non erano le uniche riscontrate. Anche questo elemento pone enormi dubbi riguardo l'efficacia e la sicurezza del vaccino. Il risultato richiederà più tempo rispetto agli altri report perché la verifica delle sequenze dei vari mutanti deve essere fatta manualmente.

**IN CORSO - Analisi di conferma interlaboratorio**

Abbiamo identificato laboratori esteri e nazionali a cui abbiamo commissionato la replica delle analisi mediante standard.

## 5. Progetti in fase di valutazione

Studio della potenza degli antigeni vaccinali: tale studio deve essere svolto presso un centro accreditato dalle agenzie regolatorie per lo studio preclinico dei vaccini. Lo scopo è di verificare se gli antigeni vaccinali siano in grado di produrre o di legarsi ad anticorpi specifici (si assume teoricamente che questi anticorpi siano protettivi, ma questa analisi non permette di dimostrare che il vaccino è in grado di proteggere dalla malattia). Il costo di questo passaggio potrebbe essere notevole, pertanto il progetto è per ora ipotetico.



## 6. Tabella riepilogativa dei risultati delle analisi

Risultati Analisi effettuate	Infanrix hexa	Hexyon	Priorix tetra	Gardasil 9
<b>Antigeni</b>	Non sono stati identificati gli antigeni proteici. Presenza di una macromolecola insolubile e indigeribile che non è stato possibile sequenziare. Analisi MALDI-TOF della macromolecola: non è stato possibile studiarla perché ha inglobato la matrice dell'analisi. <sup>2</sup> Comportamento "prionico"?	Sono stati identificati e sequenziati 3 antigeni proteici su 6. Comportamento "prionico"? (gli antigeni si aggregano e precipitano nel tempo diventando insolubili)	Sono stati identificati e sequenziati 3 dei 4 virus attenuati. La rosolia è stata rilevata in bassissimo numero di copie I virus della varicella, parotite e morbillo presentano delle mutazioni maggiori probabilmente acquisite durante l'attenuazione un numero elevato di varianti minori (quasi-specie)	Sono stati identificati 7 dei 9 antigeni proteici. (mancano i ceppi 11 e 58) Comportamento "prionico"? (gli antigeni si aggregano e precipitano nel tempo diventando insolubili)
<b>Contaminanti chimici (segnali)</b>	65 (35% noto) PEG, acido formico	216 (30% noto)	115-173 (29-43% noti)	338 (22% noti)
<b>Tossine chimiche</b>	8	16	no	10
<b>Contaminanti proteici</b>	no	no	Sarcoplasmin calcium-binding protein, Actina e Vimentina	no
<b>Contaminanti peptidici liberi</b>	16	no	no	no
<b>DNA/RNA residuale Proveniente dalle cellule di coltura</b>	Sotto i limiti di rivelabilità dello strumento	DNA ed RNA proveniente dalle colture batteriche. DNA/RNA di scimmia (cellule Vero) e da primati. Poliovirus 1 e 2 Il materiale riscontrato era in tracce e degradato	DNA totale: 1.7-3.7 µg/dose di cui l'80% umano (DNA/RNA fetale umano proveniente dalla linea cellulare MRC-5). Altro DNA: di pollo	DNA umano e di topo (in tracce)
<b>Virus avventizi</b>	no	Fago del tetano Vettori utilizzati per il clonaggio	Human endogenous retrovirus K Equine infectious anemia virus Avian leukosis virus HERV-H/env62	Molluscum contagious virus Retrovirus (DNA): Murine leukemia virus Human endogenous retrovirus K Retrovirus (RNA): Equine infectious anemia virus Murine leukemia virus
<b>Altri contaminanti microbici</b>	no	no	Proteobatteri, nematodi-elminti	Batteri Lievito e i suoi virus
<b>Residui di lavorazione di materiale genetico</b>	no	no	no	DNA: Frammenti L1 (manca il ceppo 58; presenza ceppo 20) RNA: costrutti sintetici (sequenze artificiali)

<sup>2</sup> <https://goo.gl/tZB6OD>



## 7. Approfondimenti sui vaccini analizzati

### Priorix Tetra (GlaxoSmithKline) <sup>3</sup>

#### Studio sul profilo di composizione chimica <sup>4</sup>

- A. Il Lotto #1 ed il Lotto #2 sono diversi sotto molti aspetti, 115 segnali contro 173 segnali rilevati. Un quantitativo di segnali <sup>5</sup> noti <sup>6</sup> (composti) molto differente l'uno dall'altro.
- B. Ciò che ci deve preoccupare è sì ciò che abbiamo trovato, cioè i segnali noti, ma anche e soprattutto quelli non identificabili poiché siamo nel campo delle ipotesi e possono essere qualsiasi cosa. (tra il 29 e il 43% è noto)
- C. Entrambi i lotti contengono tracce che sono quantificabili tra i nanogrammi e i microgrammi come ordine di grandezza indicativo, cioè al di sopra della soglia normalmente definita come residuale (al di sotto dei nanogrammi). Questo dato è importante poiché alcuni composti sono altamente tossici, altri sono allergeni noti ed altri ancora sono molto probabilmente molecole farmaceutiche che, se presenti nei vaccini, devono essere segnalati nella scheda tecnica e quantificati.
- D. In entrambi i lotti di prodotto sono state rilevate proteine potenzialmente provenienti dal processo di purificazione, di origine umana e animale, che possono dare fenomeni di ipersensibilità e allergia, soprattutto con i richiami, ma anche autoimmunità per similarità con le proteine umane.
- E. Entrambi i lotti contengono tracce che sono associabili a diversi antibiotici (alcuni dei quali non permessi, ad es. derivati delle penicilline e cefalosporine perché altamente allergenici), a diserbanti, erbicidi, acaricidi e metaboliti della morfina.

#### Studio sul profilo metagenomico <sup>7</sup>

Le analisi metagenomiche del vaccino "Priorix Tetra" presentavano una popolazione di virus mutanti, per ciascun virus attenuato, dette quasispecie. Le varianti genetiche degli antigeni vaccinali potrebbero alterare significativamente sia la sicurezza del vaccino che la sua efficacia. Inoltre, si pongono seri dilemmi non solo di tipo medico e scientifico ma anche etico; vi elenchiamo di seguito i punti che per noi sono più rilevanti:

- A. La quantità di DNA: È stata confermata la presenza di DNA fetale in grossi quantitativi: 1,7 µg sul primo lotto e 3,7 µg sul secondo lotto, circa 325 volte superiore al limite massimo di 10 nanogrammi e ben 325.000 volte superiore al limite minimo di 10 picogrammi, limiti che EMA ci ha comunicato essere riferiti solo alle cellule che sono note per l'attività cancerogena. Secondo quanto da loro scritto, le cellule fetali degli anni '60, utilizzate per la produzione di questi vaccini, non sarebbero cancerogeniche perché "utilizzate da decenni". Questo punto andrebbe maggiormente investigato, vi sono infatti alcuni studi che mettono in serio dubbio l'assenza di cancerogenicità di queste linee cellulari, come riportato dalla letteratura. <sup>8-9</sup>
- B. La dimensione del DNA: Abbiamo appurato in maniera più precisa le dimensioni dei frammenti del DNA rilevato ed è stato appurato che il DNA contenuto ha un peso molecolare di 20.000/60.000 bp. Questo significa sostanzialmente che non vi sono all'interno di questo farmaco "frammenti" di DNA, cioè degradati, ma un genoma integro, appartenente a un essere umano di sesso maschile, confermato dal confronto tra il DNA fetale del vaccino e quello della linea cellulare MRC-5 utilizzata per la produzione del vaccino.
- C. La non rilevazione del virus della rosolia: con il livello di sequenziamento utilizzato per lo screening non si è riusciti ad individuare il virus della rosolia. Poiché vi era il dubbio si trattasse di un errore nella procedura utilizzata, si è aumentato notevolmente il livello di sequenziamento fino a raggiungere un'altissima profondità (260 milioni di sequenze prodotte). In questo modo il virus della rosolia è stato rilevato in 114 copie, pari allo 0.00004% del totale delle sequenze e attraverso una lettura manuale delle sequenze è stato possibile eliminare qualsiasi fonte di errore del software utilizzato e confermare in maniera definitiva la (minima) presenza della rosolia nel campione. Questa procedura però ha permesso di identificare anche i **virus avventizi** presenti in basso numero di copie, e ciò che si è visto è che **il numero delle copie dei virus avventizi supera quello della rosolia**.
- D. Quindi emergevano altre due questioni molto importanti da risolvere:
  1. La **rosolia** presente nel vaccino è in quantità sufficiente per produrre un effetto immunogenico o si può considerare sottosoglia (cioè come una contaminazione avventizia)?

<sup>3</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000200\\_038200\\_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000200_038200_RCP.pdf&retry=0&sys=m0b113)

<sup>4</sup> <https://goo.gl/T19nx2>

<sup>5</sup> lo spettro di massa rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica; un composto può generare più ioni e quindi più segnali, in particolare più alto è il peso molecolare della molecola più segnali genera.

<sup>6</sup> Per "noti" si intende che i segnali relativi ad un composto con un determinato peso molecolare, inseriti nei database, generano una o più possibili associazioni con strutture chimiche note

<sup>7</sup> <https://goo.gl/WeX4mM>

<sup>8</sup> Deisher TA, Doan NV, Koyama K, Bwabye S. Epidemiologic and Molecular Relationship Between Vaccine Manufacture and Autism Spectrum Disorder Prevalence. Issues Law Med. 2015 Spring;30(1):47-70. PubMed PMID: 26103708.

<sup>9</sup> Jarzyna P, Doan NV, Deisher TA. Insertional mutagenesis and autoimmunity induced disease caused by human fetal and retroviral residual toxins in vaccines. Issues Law Med. 2016 Fall;31(2):221-234. PubMed PMID: 29108182.



## 2. I virus avventizi sono realmente presenti? Se sì possono essere pericolosi?

Per quanto riguarda il punto 1) possiamo mettere in forte dubbio la capacità del virus attenuato della rosolia di agire come antigene immunogeno, per la quantità trascurabile e per l'attenuazione che ne indebolisce ulteriormente l'efficacia. **Questo aspetto necessita approfondimento perché vi è il concreto rischio che vi siano in commercio lotti di vaccino che non immunizzano e che dunque non sono efficaci, non contenendo quanto dichiarato in scheda tecnica.**

Per quanto riguarda il punto 2) ovvero la presenza di virus avventizi: per confermarla è stato necessario verificare le sequenze una per una manualmente mediante un software diverso (BLAST). E' stato così possibile **confermare la presenza dei seguenti retrovirus contaminanti** <sup>10</sup>:

Human endogenous retrovirus K	32 sequenze
Equine infectious anemia virus	2 sequenze
Avian leukosis virus	2 sequenze
HERV-H/env62	4 sequenze

Questi virus sono noti per essere dei contaminanti avventizi dei vaccini ed è nota la loro **potenziale pericolosità, motivo per cui i produttori sono tenuti a verificarne la completa assenza nel vaccino.**

Ne segue che da questa analisi di approfondimento in questo vaccino sono **confermate due non conformità sull'efficacia e la sicurezza:**

- A. **La presenza in bassissimo numero di copie (sottosoglia) della rosolia**
- B. **La presenza di virus avventizi potenzialmente pericolosi** il che attesta che non vi è controllo adeguato sui vaccini perché se ci fosse, questi elementi sarebbero stati rilevati.

Ricordiamo le linee guida EMA <sup>11-12-13</sup> che attestano come i reads di virus "estranei" devono essere ASSENTI quindi neanche 1 copia è consentita. A ciò si aggiunge la presenza riconfermata di una quantità non residuale di DNA fetale umano, tale da rendere questa impurezza un vero e proprio costituente del vaccino che andrebbe riportato in scheda tecnica e quantificato.

## Infanrix Hexa (GlaxoSmithKline) <sup>14</sup>

### Studio sul profilo di composizione chimica <sup>15</sup>

Nel vaccino sono state riscontrate:

- A. Contaminazioni chimiche provenienti dal processo di lavorazione o da contaminazioni crociate con altre linee di produzione
- B. Tossine chimiche
- C. Tossine peptidiche batteriche
- D. Macromolecola insolubile e indigeribile che reagisce al saggio per le proteine, ma non viene riconosciuta dalle banche dati delle proteine

Non è stata riscontrata la presenza di:

- A. **Antigeni proteici dei tossoidi della difterite, tetano, pertosse, epatite B, Haemophilus influenzae B, Poliomielite 1-2-3**
- B. **Formaldeide e glutaraldeide, fenossietanolo, residui di antibiotici (indicati nella composizione)**

Gli antigeni dichiarati nel vaccino **Infanrix Hexa** sono sei: i tossoidi del tetano, difterite e pertosse (tre antigeni), gli antigeni D dei tre virus della poliomielite, le proteine ottenute mediante ingegneria genetica per l'epatite B e i polisaccaridi dell'*Haemophilus* legati chimicamente al tossoide del tetano come carrier. Per formare i tossoidi è necessario un trattamento con formaldeide e glutaraldeide, che dovrebbe eliminare la tossicità mantenendo integra la capacità di stimolare anticorpi protettivi contro le tossine originali.

Ciò che ci aspettavamo di trovare erano i tre tossoidi e gli altri antigeni non modificati chimicamente dai trattamenti con formaldeide e glutaraldeide, separabili tra loro e digeribili dall'enzima specifico per le proteine (tripsina). **È stato invece trovato un vero e proprio polimero, insolubile e indigeribile, costituito dall'insieme degli antigeni legati chimicamente tra loro, sul quale risultano informazioni anche in letteratura per singoli antigeni.** <sup>1-2</sup>

**Questa macromolecola non è stata in alcun modo riconosciuta dalle banche dati delle proteine, e quindi di fatto risulta essere un composto**

<sup>10</sup> <https://goo.gl/WwJXFV>

<sup>11</sup> [www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin\\_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-5-r1-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-animal-origin_en.pdf)

<sup>12</sup> [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products_en.pdf)

<sup>13</sup> [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf)

<sup>14</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000231\\_034960\\_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000231_034960_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3)

<sup>15</sup> <https://goo.gl/UJkC7uf>



#### **solido di struttura chimica sconosciuta.**

La solubilità delle proteine e la possibilità di essere digerite (cioè ridotte in piccoli frammenti peptidici) sono le due caratteristiche tipiche, che ci permettono di studiarle con le metodiche per l'analisi delle proteine **e che sono un requisito necessario per l'interazione con il sistema immunitario per la formazione di anticorpi protettivi**, perché se la struttura di una proteina viene modificata profondamente rispetto a quella originale, anche gli anticorpi che si formano sono completamente diversi da quelli che sono in grado di attaccare gli antigeni originali che causano le malattie.

Poiché questo polimero che abbiamo incontrato, derivato dal mix di antigeni, non è solo diverso dal punto di vista della conformazione spaziale ma soprattutto è diverso dal punto di vista chimico, **possiamo affermare che non siamo in presenza di antigeni simili a quelli originali ma ad un composto con tossicità ed efficacia non note ed imprevedibili.**

Oltre a non essere stati di fatto rilevati gli antigeni vaccinali, sono stati riscontrati 65 segnali di contaminanti chimici di cui il 35% noto, cioè riconosciuto per confronto con le banche dati.

**Tra questi segnali sono state identificate anche 7 tossine chimiche;** tali tossine non ancora definite in maniera univoca nella struttura, sembrano in parte derivare dalla reazione della formaldeide, glutaraldeide, e bromuro di cianogeno con altri contaminanti chimici presenti nel vaccino. Si sottolinea che gran parte di queste tossine hanno una tossicità accertata e pubblicata in Pubchem o Toxnet e **pongono un problema significativo di sicurezza.**

Dallo studio della frazione proteica e peptidica sono risultati vari **peptidi liberi** (cioè frammenti corti di catene di aminoacidi) di origine batterica e fungina. **I peptidi batterici sono riportati in letteratura come potenziali allergeni e capaci di indurre reazioni autoimmuni** e anche questi pongono un **problema di sicurezza che andrà chiarito con le agenzie regolatorie.**

## **Hexyon (Sanofi Pasteur) <sup>16</sup>**

**Vaccino esavalente anti difterite, tetano, pertosse, epatite B, poliomielite e Haemophilus influenzae tipo b**

### **Studio sul profilo di composizione chimica <sup>17</sup>**

In questo campione di Hexyon (esavalente) sono state riscontrate, come per i precedenti vaccini analizzati:

- A. Contaminazioni chimiche provenienti dal processo di lavorazione o da contaminazioni crociate con altre linee di produzione.
- B. Tossine chimiche.
- C. Glutaraldeide

A differenza di quanto accaduto con Infanrix Hexa, sottolineiamo con la medesima metodica, sono stati riscontrati:

- A. Antigeni proteici dei tossoidi della difterite, tetano, pertosse.

Non è stata invece riscontrata la presenza di:

- A. Antigeni proteici di epatite B, Haemophilus influenzae B, Poliomielite 1-2-3
- B. Formaldeide, residui di antibiotici indicati nella composizione

Stavolta non è stato trovato un polimero, insolubile e indigeribile, come nel caso dell'Infanrix Hexa, a riprova che il problema non stava nella metodologia, bensì nel prodotto.

Anche in questo caso, comunque, ci troviamo di fronte ad un prodotto che NON sembra contenere quanto dovrebbe contenere. Ovvero, di 6 antigeni, ne sono stati rilevati solo 3.

Oltre a ciò, sono stati riscontrati ben **216 segnali di contaminanti chimici di cui il 30% noto.**

Tra questi segnali sono state identificate anche 16 (sedici) tossine chimiche, probabilmente provenienti dal processo di lavorazione degli antigeni o da altri processi di produzione presenti nella sede di produzione del vaccino.

### **Studio sul profilo metagenomico <sup>18</sup>**

**Analisi del DNA:**

- A. DNA proveniente dalle colture batteriche utilizzate per la produzione delle tossine (difterite, tetano e pertosse) e degli antigeni

<sup>16</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_004285\\_042817\\_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004285_042817_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3)

<sup>17</sup> <https://goo.gl/hBt3vY>

<sup>18</sup> <https://goo.gl/4AfG6Y>





**dell'Haemophilus influenzae B:** questo DNA è immunogeno ed è in grado di stimolare la formazione di citochine infiammatorie e quindi contribuire ad una consistente infiammazione sia nel sito d'iniezione che sistemica. Si pone il quesito se tali frammenti siano potenzialmente in grado di causare reazioni autoimmuni e integrarsi nel DNA umano causando mutazioni. Poiché è presente nel vaccino anche alluminio adiuvante, con molta probabilità questi frammenti sono legati all'alluminio, che ne protegge la degradazione potenziandone l'effetto biologico e tossicologico, ancora largamente sconosciuti.

- B. DNA di scimmia Cercopithecidae:** questo DNA può essere derivato dalle cellule Vero. Questo DNA si trova in tracce ed è degradato, quindi non dovrebbe essere in grado di integrarsi nel DNA ospite. Resta il fatto che la sua presenza è una prova della reazione incompleta della formaldeide e glutaraldeide sul materiale genetico, che dovrebbe essere invece completamente distrutto, e la presenza dell'alluminio, come per l'altro materiale genetico, può renderlo stabile alla degradazione nel tempo, ampliando i potenziali effetti tossici.

#### Analisi dei Virus avventizi:

- A. Fagi:** fago del tetano (Clostridium phage phiCT453A). Può potenzialmente causare malattie autoimmuni, soprattutto se legato all'alluminio.
- B. Vettori utilizzati per il clonaggio, tra cui il vettore dell'SV40:** questi sono frammenti di RNA che provengono con molta probabilità dal processo di produzione dell'antigene dell'epatite B NB: in questo caso l'SV40 non è il virus avventizio che si trovava nel vaccino della polio attenuato decenni orsono, ma un vettore utilizzato normalmente per la ricombinazione genetica per la produzione di vaccini ingegnerizzati. La tossicologia di questi frammenti non è nota ma, se sono utilizzati per integrare frammenti di materiale genetico, potrebbero anche loro integrarsi nel DNA ospite. Poiché la quantità è molto ridotta l'effetto biologico è impossibile da definire. Resta l'impossibilità di definire la tossicità di questa contaminazione legata all'alluminio.

#### Analisi dell'RNA:

- A. RNA proveniente dalle colture batteriche utilizzate per la produzione delle tossine (difterite, tetano e pertosse) e degli antigeni dell'Haemophilus influenzae B:** vale quanto detto sopra per il DNA. In realtà si tratta di DNA ed RNA batterici parzialmente degradati per l'effetto della formaldeide, e quindi non è possibile da questi dati comprendere se sono in grado di integrarsi nel DNA, mentre è molto probabile che siano in grado di causare infiammazione persistente e autoimmunità.  
RNA di scimmia: l'RNA potrebbe essere in grado di formare proteine, ma queste non sono state rilevate in spettrometria di massa (o perché sotto il limite dei nanogrammi, o perché legate all'alluminio e quindi non sequenziabili e non identificabili, o perché questo RNA non è funzionante). Come per l'RNA batterico può legarsi all'alluminio e causare autoimmunità e infiammazione.
- B. Poliovirus 1 e 2:** si suppone che siano disattivati dalla formaldeide e quindi non infettivi, tuttavia vale sempre il quesito: legati all'alluminio possono risultare neurotossici? Nella scheda tecnica si scrive che la potenza del poliovirus è definita dall'efficacia dell'antigene D. La risposta ricevuta da EMA (sempre in riferimento alle nostre prime analisi di luglio 2018) fa capire che non si dovrebbero più riscontrare i genomi dei virus.

Nel complesso questa analisi ci dice che rispetto all'Infanrix hexa (l'altro esavalente analizzato) il trattamento con formaldeide è molto più blando, ed è presente materiale genetico proveniente dalle colture di partenza, che non dovrebbe proprio esserci. Questo può comportare un potenziale rischio per autoimmunità, infiammazione locale e sistemica, mutazioni genetiche.

## Gardasil 9 (MSD Vaccins) <sup>19</sup>

### Studio sul profilo di composizione chimica <sup>20</sup>

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.

**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) in quantità variabili tra 20 e 60 microgrammi. Non sono però stati rilevati tutti gli antigeni che vengono dichiarati, ma solo 7 su 9.

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

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

<sup>19</sup> [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000737\\_044268\\_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000737_044268_RCP.pdf&retrv=0&sys=m0b1i3)

<sup>20</sup> <https://qoo.gl/p88zNB>



## Approfondimenti sulle sequenze di acidi nucleici (DNA e RNA) relativi al frammento L1 del genoma di HPV in Gardasil 9 <sup>21</sup>

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).

- A. 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.
- B. Del ceppo 11 è stata confermata la presenza solo di RNA ma con un numero di reads molto basso (6 reads).
- C. Assenza del ceppo 58 confermata.
- D. 545 reads del ceppo 20: sono una probabile contaminazione che attesta una non conformità rispetto alla scheda tecnica.

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 (fermo restando i 6 reads di DNA dell'11) più un ceppo, il 20, che non è dichiarato in scheda tecnica. Questo apre una questione importante sulla conformità del prodotto.

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.

In conclusione, anche Gardasil 9 - così come gli esavalenti Hexyon ed Infanrix Hexa nonché il quadrivalente Priorix Tetra - secondo la metodica da noi commissionata, lascia dubbi sia sull'efficacia che sulla sicurezza.

## Studio sul profilo metagenomico <sup>22</sup>

Vi è materiale genetico avventizio presente in quantità residuali. Si possono riassumere i seguenti punti essenziali:

### Materiale genetico avventizio presente come DNA:

- A. **Batteri:** la percentuale è rilevante: 54% del DNA totale; sono stati effettuati più bianchi per ridurre al minimo l'errore dovuto alla contaminazione ambientale, ma avremo un dato più accurato quando faremo i replicati con altri laboratori. Il DNA batterico potrebbe interagire con l'alluminio adiuvante e causare allergie, infiammazione e autoimmunità. **Dato da confermare.**
- B. **DNA umano e di topo:** la loro origine non è nota. Può essere che il DNA umano provenga dai residui presenti nelle materie prime del virus HPV prelevato da tessuti umani. Il DNA di topo potrebbe invece essere una contaminazione crociata da altre linee cellulari utilizzate per la produzione di vaccini (è un'ipotesi). Questi DNA potrebbero interagire con l'alluminio adiuvante e causare reazioni infiammatorie e autoimmuni.
- C. **Virus avventizi:** Frammento L1 del virus HPV di DNA a doppia catena - proviene dal processo di fabbricazione degli antigeni; è un contaminante e pone dei problemi di sicurezza in quanto non viene degradato e rimane a lungo nei macrofagi legato all'alluminio adiuvante; il suo effetto biologico non è del tutto noto ma può probabilmente integrarsi nel DNA dell'ospite, stimolare l'infiammazione attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie e reazioni autoimmunitarie (vedi ricerche del prof. Lee). <sup>23-24</sup>
- D. **Fagi:** provengono dal processo di produzione, sono contaminanti avventizi di pericolosità non nota. Non è noto se gli anticorpi prodotti contro i fagi possono interagire con i batteri della flora batterica intestinale, o possono integrarsi nel DNA batterico della flora batterica.
- E. **Molluscum contagiosum virus:** appartiene alla famiglia Poxviridae, sottofamiglia Chordopoxvirinae, genere Molluscipoxvirus. Il termine pox contenuto nel nome di questi virus, deriva dalle vescicole (in inglese: poxes) prodotte dal virus del vaiolo (smallpox).
- F. **Retrovirus:** potenzialmente integrati nel DNA; possono causare trasformazione neoplastica e mutazioni del genoma dell'ospite; provengono dalle contaminazioni di DNA umano e di topo, quali possibili cross contaminazioni con altre linee cellulari.
  - a. **Virus della leucemia del topo.**
  - b. **Retrovirus endogeno umano K.**

### Materiale genetico avventizio presente come RNA:

- A. **Batteri:** i trascritti stanno ad indicare che il DNA batterico è funzionante.
- B. **Costrutti sintetici (sequenze artificiali):** possono provenire dal processo di produzione degli antigeni mediante ricombinazione genetica con il plasmide; sono potenzialmente in grado di ricombinarsi con il DNA umano; il legame con l'alluminio adiuvante può prolungarne e

<sup>21</sup> <https://goo.gl/6ftjJr>

<sup>22</sup> <https://goo.gl/9wstR1>

<sup>23</sup> *J Inorg Biochem.* 2012 Dec;117:85-92. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil. [Lee SH](#).

<sup>24</sup> *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3, 1214-1224 - Detection of human papillomavirus L1 gene DNA fragments in postmortem blood and spleen after Gardasil® vaccination—A case report. Sin Hang Lee



potenziarne l'effetto biologico (infiammazione e autoimmunità).

- C. **Lievito e suoi virus (virus L-BC e narnavirus):** l'RNA di lievito può dare origine a proteine allergeniche (che si possono legare all'alluminio adiuvante), mentre i virus non sono noti per gli effetti sulle cellule umane e sul microbiota.
- D. **Virus dell'anemia equina infettiva e virus della leucemia del topo:** (quest'ultimo è presente sia come DNA che RNA e quindi è un virus funzionante): questi virus provengono dalle contaminazioni delle materie prime e non devono essere presenti.

## Analisi dei metalli mediante ICP-MS <sup>25</sup>

Abbiamo commissionato le analisi dei metalli attraverso L'ICP-MS che rappresenta la tecnica di spettroscopia atomica più sensibile ed è quindi idonea all'analisi quali-quantitativa di elementi in tracce e alla determinazione simultanea di circa 30 elementi in una corsa singola.

Al laboratorio è stato chiesto di abbassare il limite di rilevabilità fino alla soglia 5 ng/g.

Dalle risultanze possiamo affermare che sotto l'aspetto della presenza di alluminio non abbiamo trovato non conformità per i vaccini Infanrix Hexa, Hexyon e Gardasil 9. Lasciamo aperta una parentesi per il vaccino Priorix Tetra.

Nel 2016 l'Associazione tedesca AGBUG <sup>26</sup> si era attivata per analizzare una serie di vaccini, ben 16 tipologie. Con questa scheda vogliamo comparare i vari risultati, precisamente paragonando i nostri con quelli dell'Associazione AGBUG e con ciò che è indicato nella scheda tecnica del prodotto.

Utilizzeremo solo l'alluminio come comparazione perché tutti gli altri metalli sono sotto al nostro limite di rilevabilità di 5 ng/g.

Infanrix Hexa			
Corvelva	AGBUG <sup>27</sup>	Scheda Tecnica	Risultato
723,5 µg / dose	678,60 µg / dose	830 µg / dose	Conforme alla Scheda Tecnica

Hexyon			
Corvelva	AGBUG <sup>27</sup>	Scheda Tecnica	Risultato
546 µg / dose	678,58 µg / dose	600 µg / dose	Conforme alla Scheda Tecnica

Priorix Tetra			
Corvelva	AGBUG <sup>27</sup>	Scheda Tecnica	Risultato
0,8 µg / dose	0,06 µg / dose	0 µg / dose	Da approfondire

Gardasil 9			
Corvelva	AGBUG <sup>27</sup>	Scheda Tecnica	Risultato
416 µg / dose	583,79 µg / dose	500 µg / dose	Conforme alla Scheda Tecnica

Questo significa che i prodotti sono conformi? Sì sull'alluminio, no su tutto il resto ovvero mutazioni genetiche dei virus, presenza di contaminanti, presenza di DNA, assenza di antigeni e/o non rilevabilità di essi.

L'alluminio, se pur sotto a ciò che è dichiarato in scheda tecnica, ha effetti nocivi? Non è il nostro compito definirlo, vogliamo anzitutto verificare se i prodotti inoculati ai nostri figli per obbligo di legge sono o non sono conformi.

Infine ricordiamo che sono stati misurati mediante standard ben 30 metalli (Afnio, Antimonio, Arsenico, Bario, Bario, Bismuto, Cadmio, Cromo, Gallio, Indio, Iridio, Ittrio, Lantanio, Lantanio, Mercurio, Nichel, Palladio, Piombo, Platino, Rame, Rodio, Rutenio, Scandio, Stagno, Stronzio, Tantalio,

<sup>25</sup> <https://goo.gl/3zecB6>

<sup>26</sup> <http://www.agbug.de/>

<sup>27</sup> <http://www.agbug.de/download/lmpfstoffuntersuchung01.pdf>



Tallio, Tungsteno, Vanadio) e tutti, a parte l'alluminio, risultano sotto il limite di rilevabilità di 5 ng/g.

## 8. Riepilogo di tutti i report e documenti

1. Primo screening	
Report analisi metagenomiche su campioni vaccinali	<a href="https://goo.gl/cSspVH">https://goo.gl/cSspVH</a>
2. Priorix Tetra	
Studio sul profilo di composizione chimica Priorix Tetra	<a href="https://goo.gl/T19nx2">https://goo.gl/T19nx2</a>
Report analisi metagenomiche Priorix Tetra	<a href="https://goo.gl/WeX4mM">https://goo.gl/WeX4mM</a>
Approfondimenti sull'analisi della presenza di sequenze del virus della rosolia e di virus avventizi nei dati RNA-seq ottenuti per Priorix Tetra, lotto A71CB256A	<a href="https://goo.gl/WwJXFV">https://goo.gl/WwJXFV</a>
3. Infanrix Hexa	
Studio sul profilo di composizione chimica Infanrix Hexa	<a href="https://goo.gl/UKC7uf">https://goo.gl/UKC7uf</a>
Relazione tecnica analisi MALDI relativa al composto insolubile presente nel vaccino Infanrix Hexa	<a href="https://goo.gl/tZB6QD">https://goo.gl/tZB6QD</a>
4. Hexyon	
Studio sul profilo di composizione chimica Hexyon	<a href="https://goo.gl/hBt3vY">https://goo.gl/hBt3vY</a>
Report analisi metagenomiche su Hexyon	<a href="https://goo.gl/4AfG6Y">https://goo.gl/4AfG6Y</a>
Gardasil 9	
Studio sul profilo di composizione chimica Gardasil 9	<a href="https://goo.gl/p88zNB">https://goo.gl/p88zNB</a>
Approfondimenti sulle sequenze di acidi nucleici relativi al frammento L1 del genoma di HPV in Gardasil 9	<a href="https://goo.gl/6ftjlr">https://goo.gl/6ftjlr</a>
Report analisi metagenomiche su Gardasil 9	<a href="https://goo.gl/9wstR1">https://goo.gl/9wstR1</a>
Analisi dei metalli mediante ICP-MS	<a href="https://goo.gl/3zecB6">https://goo.gl/3zecB6</a>
Relazione Tecnica Finale analisi di profilo molecolare di vaccini	<a href="https://goo.gl/Dqnhfq">https://goo.gl/Dqnhfq</a>
Lettere	
Comunicazione Corvelva alle Istituzioni in data 9 luglio 2018	<a href="https://goo.gl/W4jJop">https://goo.gl/W4jJop</a>
Comunicazione Corvelva alle Istituzioni in data 22 novembre 2018	<a href="https://goo.gl/rE9gA9">https://goo.gl/rE9gA9</a>
Risposta dell'Istituto Superiore di Sanità in data 21 dicembre 2018	<a href="https://goo.gl/Nxzp6w">https://goo.gl/Nxzp6w</a>
Comunicazione Corvelva all'Istituto Superiore di Sanità in data 26 dicembre 2018	<a href="https://goo.gl/BZ1CAQ">https://goo.gl/BZ1CAQ</a>
Comunicazione Corvelva al Ministero della Salute in data 6 gennaio 2019	<a href="https://goo.gl/qEAX3d">https://goo.gl/qEAX3d</a>
Risposta dell'Agenzia Italiana del Farmaco in data 18 gennaio 2019	<a href="https://goo.gl/AuXQZ">https://goo.gl/AuXQZ</a>
Comunicazione Corvelva all'Agenzia Italiana del Farmaco in data 18 gennaio 2019	<a href="https://goo.gl/AUpuZD">https://goo.gl/AUpuZD</a>
Comunicazione Corvelva al Ministero della Salute in data 30 gennaio 2019	<a href="https://goo.gl/2kkp1Z">https://goo.gl/2kkp1Z</a>
Replica tecnica alla critica dell'On. Marco Bella in data 29 gennaio 2019	<a href="https://goo.gl/iKhnB7">https://goo.gl/iKhnB7</a>
Replica tecnica di Corvelva alla critica del dott. Bucci in data 6 febbraio 2019	<a href="https://goo.gl/gqTyaD">https://goo.gl/gqTyaD</a>
Interviste e Conferenze	



Intervista della d.ssa Bolgan su Il Giornale dei Biologi - Settembre 2018	<a href="https://goo.gl/ta88va">https://goo.gl/ta88va</a>
"Scientists slam donation to question vaccine safety" articolo pubblicato su Nature - Dicembre 2018	<a href="https://goo.gl/shZ2Bj">https://goo.gl/shZ2Bj</a>
Il Tempo - 23 dicembre 2018	<a href="https://goo.gl/tdLwXx">https://goo.gl/tdLwXx</a>
Camera dei Deputati - Conferenza Stampa alla Camera dei Deputati - 24 gennaio 2019	<a href="https://youtu.be/yVWHdrRL-fP4">https://youtu.be/yVWHdrRL-fP4</a>
Convegno "Vaccinare in sicurezza" organizzato dall'Ordine Nazionale dei Biologi Intervento della d.ssa Loretta Bolgan - 25 gennaio 2019	<a href="https://youtu.be/7cLpMOUpvrg">https://youtu.be/7cLpMOUpvrg</a>
Intervista su Byoblu "Ecco cos'abbiamo trovato nei vaccini: lo studio Corvelva" 26 febbraio 2019	<a href="https://youtu.be/V3h_G6BN9PM">https://youtu.be/V3h_G6BN9PM</a>

