

Vaccinegate:

Studio sul profilo di composizione chimica Hexyon



Presentazione in breve dei risultati

Ringraziando per la pioggia di critiche che abbiamo ricevuto sulle nostre metodiche (in riferimento ai precedenti risultati delle analisi chimiche di Infanrix hexa e Priorix Tetra), non siamo per nulla lieti di comunicarvi che, anche nell'esavalente Hexyon, abbiamo riscontrato delle problematiche, ma se non altro stavolta qualche antigene è stato rilevato (ovviamente con lo stesso tipo di analisi, stessa metodica con cui secondo alcuni "scienziati" non avremmo mai trovato nulla).

Alle contestazioni e critiche di tipo tecnico mosse nelle ultime settimane, abbiamo risposto (link report <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 Hexyon (esavalente) 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.**
- **Glutaraldeid**

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

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

Non è stata invece riscontrata la presenza di:

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

Stavolta non è stato trovato un polimero, insolubile e indigeribile, come nel caso dell'Infanrix Hexa (link report <https://goo.gl/FaitUS>), 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 troviamo vari residui di lavorazione e probabili contaminazioni crociate da altre linee di produzione, similari alle precedenti analisi.

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.

Ribadiamo il concetto: noi stiamo indagando la qualità dei vaccini e di conseguenza possiamo trarre anche delle informazioni sulla loro sicurezza ed efficacia e in realtà ci risulta difficile capire come sia possibile affermare che questi vaccini siano in grado di formare anticorpi protettivi contro tutte le sei malattie per le quali ci si vorrebbe proteggere e ci risulta ancora più difficile capire come possa essere stabilito che questi contenuti non siano tossici nei neonati, visto che si trova traccia di numerosi composti non identificabili tramite le principali banche dati. Come sempre, attendiamo il parere della comunità scientifica in merito.

In conclusione, anche l'esavalente Hexyon, come già Infanrix hexa, secondo la metodica da noi commissionata, lascia enormi dubbi sia sull'efficacia che sulla sicurezza... Proseguiamo, e attendiamo risposte.

Nota: le presenti analisi su Hexyon e quelle su Gardasil 9 che pubblicheremo nelle prossime ore, andranno ad aggiungersi alle altre nell'esposto in Procura.



Studio sul profilo di composizione chimica Hexyon

Introduzione e descrizione del bisogno

L'indagine quali-quantitativa di composti organici riveste molta importanza in campo farmacologico, ¹ 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.² Dall'esame dei dossier di registrazione dei vaccini militari che troviamo nella relazione finale ³ della "Commissione parlamentare di inchiesta sugli effetti dell'utilizzo dell'uranio impoverito" ⁴ 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 ⁵⁻⁶ 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
Amino acids	Sì	[M+H] ⁺
Saccarosio	Sì	[M+H] ⁺
Neomycin	Non rilevato	-
Formaldehyde ⁶	Non rilevato	-
Streptomycin ⁷	Non rilevato	-
Glutaraldehyde	Sì	[M+H] ⁺
Trometamol ⁸	Sì	[M+H] ⁺
Sodium phosphate dibasic	Non rilevabile	-
Potassium phosphate monobasic	Non rilevabile	-
Diphtheria Toxoid ⁹	Sì	[M+nH] ^{nt}
Tetanus Toxoid ¹⁰	Sì	[M+nH] ^{nt}
Pertussis Toxoid ¹¹	Sì	[M+nH] ^{nt}
Filamentous Haemagglutinin Adhesin (FHA)	Sì	[M+nH] ^{nt}
Haemophilus Influenzae B polysaccharide ¹²	Non rilevato	-

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

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

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

⁴ http://www.camera.it/leg17/436?shadow_organo_parlamentare=2588

⁵ 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/>)

⁶ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde>

⁷ <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>

⁸ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tromethamine>

⁹ <https://www.who.int/biologicals/vaccines/diphtheria/en/>

¹⁰ <https://www.who.int/ith/vaccines/tetanus/en/>

¹¹ <http://www.who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en/>

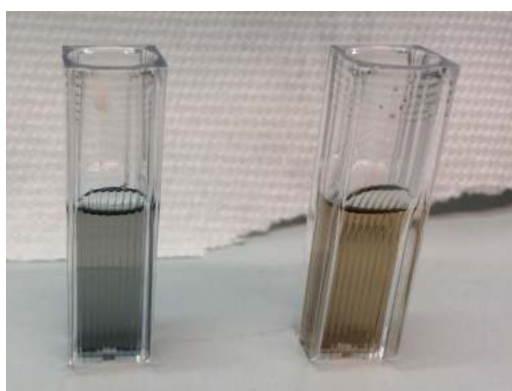
¹² https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus_influenzae_typeb_Hib/en/



Bordetella pertussis antigens ¹³	Sì	[M+nH] ⁿ⁺
Polymyxin B	Non rilevato	-
Hepatitis B	Non rilevato	-
Poliomyelitis 1, 2, 3	Non rilevati	-

2. Analisi della frazione proteica

Secondo quanto dichiarato dal produttore, il vaccino Hexyon contiene delle proteine. Il campione è stato sottoposto ad analisi per l'identificazione di queste proteine. Ad una prima analisi visiva si può confermare la presenza di proteine o di sequenze peptidiche data dalla colorazione blu. Nella Figura 1 si può osservare a destra un bianco (Reattivo di Bradford) e a sinistra il reattivo a cui è stata aggiunta un'aliquota di campione che ha portato alla variazione di colore:



2.1 - 1° analisi: Saggio di Bradford

Inizialmente, per accertare l'effettiva presenza delle proteine, il vaccino Hexyon è stato sottoposto al saggio di Bradford. Sono stati trattati 200 µL di campione tal quale con 300 µL di H₂O 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 **0.033 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 H₂O osmotizzata per avere abbastanza volume per l'iniezione.

¹³ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913389>

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

Per l'elaborazione dei dati così ottenuti si è inizialmente utilizzato il database Mascot.¹⁴

Tabella 1 - Lotto #1 (N3FI38V)*

Nome Proteina	Database	Peso molecolare (KDa)	Score	Codice
■ filamentous hemagglutinin/adhesin [Bordetella pertussis]	NCBIInr	330	222/50	SNW24549.1
■ Chain A, The Structure Of The Isolated Catalytic Domain Of Diphtheria Toxin	NCBIInr	20	114/50	1DTP_A
■ Chain A, Binary Complex Of Pertussis Toxin And Atp	NCBIInr	26	76/50	1BCP_A
■ tryptophan synthase subunit alpha [Methylobacterium sp. 10]	NCBIInr	30	73/50	WP_051439711.1
■ putative S-layer protein/N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Clostridium tetani E88]	NCBIInr	119	69/50	AAO35094.1
■ Chain B, Binary Complex Of Pertussis Toxin And Atp	NCBIInr	22	64/50	1BCP_B

* Le proteine sono state identificate senza considerare eventuali modificazioni post traslazionali. Non sono state identificate altre sequenze di frammentazione con la metodica in uso.

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

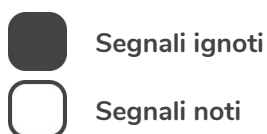
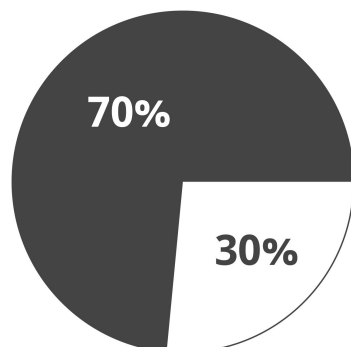
Non sono stati rilevati peptidi liberi.

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 (N3FI38V)



Nel Lotto #1 abbiamo 216 segnali di cui solo il 30% noto.

¹⁴ http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_db_qui.html





NOTE PER LA COMPrensione: 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 Hexyon

Sono stati rilevati **216 segnali**, di cui solo una percentuale del **30%** 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 a 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 COMPrensione: 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

La maggior parte dei contaminanti e delle impurità rilevati non sono stati caratterizzati utilizzando i database di riferimento metabolici e proteici (KEGG, NCBI-Prot e SwissProt).⁸⁻⁹

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?	in parte
2. Sono presenti contaminazioni chimiche?	Sì
3. Quanti sono i composti contaminanti?	Oltre i 70
4. Cosa sono potenzialmente?	Tossine chimiche, composti chimici

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 ¹⁵⁻¹⁶ 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** ⁶ 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** ⁵⁻⁶ 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) ¹⁷⁻¹⁸ senza l’ausilio di 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.

¹⁵ 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>)

¹⁶ 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>)

¹⁷ 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/>)

¹⁸ Cristoni S. et al., Expert Rev Proteomics. 2004 Dec; 1(4):469-83. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15966842>)



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 tab. 2).

Esempio di un solo componente associato:

■ Atovaquone	Farmaco per il trattamento della malaria
--------------	--

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 - Lotto #1 (N3FI38V)		
Calssificazione potenziale	Formula Bruta	Rapporto m/z
■ 1-Palmitoyl-2-(5-keto-8-oxo-6-octenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	C32H58NO10P	648.3792725
■ 2,4,6-Trihydroxybenzophenone	C13H10O4	231.0650024
■ 2,4-Diamino-6-nitrotoluene	C7H9N3O2	168.0765686
■ 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedioate	C6H4Cl2O5	226.9511973
■ 2-Hydroxymethylclavam	C6H9NO3	144.0629196
■ 2-N,6-N-Bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysine amide	C20H23N3O7	418.1549835
■ 2-Oxo-7-methylthioheptanoic acid	C8H14O3S	191.0764275
■ 2-Phenylacetamide	C8H9NO	136.0754967
■ 3-Buten-1-amine	C4H9N	72.0809288
■ 4'-O-Demethylrebeccamycin	C26H19Cl2N3O7	556.0627441
■ 5-Methyltetrahydrofolate	C20H25N7O6	460.2019119
■ 7-Deoxylogenate	C16H24O9	361.1529999
■ Acetylspiramycin	C45H76N2O15	443.2720133
■ Adenine	C5H5N5	136.0615883
■ Amoxicillin	C16H19N3O5S	366.1083069
■ ANTU	C11H10N2S	102.0338345
■ Atovaquone	C22H19ClO3	367.1093674
■ Auriculine	C31H45NO8	560.3268331
■ Benzo[b]fluorene	C17H12	217.0969086
■ Bikaverin	C20H14O8	383.0762405



▪ Bis-D-fructose 2',1:2,1'-dianhydride	C12H20O10	325.1124496
▪ Carbenicillin sodium	C17H16N2O6S. 2Na	423.063446
▪ Cefamandole sodium	C18H17N6O5S2. Na	485.0637894
▪ Celecoxib	C17H14F3N3O2S	382.0821533
▪ Chivosazole F	C41H57NO8	692.405426
▪ Chloral hydrate	C2H3Cl3O2	164.9265976
▪ Deethylatrazine	C6H10ClN5	188.0704498
▪ Dibasic sodium phosphate	Na2HPO4	142.9478836
▪ Fusaproliferin	C27H40O5	445.2876994
▪ Gentisin	C14H10O5	259.0637894
▪ Geranyl diphosphate	C10H20O7P2	315.0794678
▪ Gibberellin 2-O-beta-D-glucoside	C25H32O11	509.2058182
▪ Gliotoxin	C13H14N2O4S2	327.0510406
▪ Glucobrassicin	C16H20N2O9S2	449.066246
▪ Hydrocortisone cypionate	C29H42O6	487.2982686
▪ Justicidin B	C21H16O6	365.1049805
▪ L-Arginine	C6H14N4O2	175.1187363
▪ L-Lysine 1,6-lactam	C6H12N2O	129.1021729
▪ L-Methionine	C5H11NO2S	150.0582275
▪ Lovastatin acid	C24H38O6	423.2746124
▪ L-Pipecolate	C6H11NO2	130.0861511
▪ L-Threonine	C4H9NO3	120.0654202
▪ L-Tryptophan	C11H12N2O2	205.0969772
▪ L-Tyrosine	C9H11NO3	182.0809784
▪ L-Valine	C5H11NO2	118.0862541
▪ Mannitol	C6H14O6	183.0843315
▪ Mibefradil	C29H38FN3O3	496.3033905
▪ Mycinamicin IV	C37H61NO11	696.4367879
▪ N-Acetyl-D-fucosamine	C8H15NO5	206.1002884
▪ Netilmicin	C21H41N5O7	476.3059031
▪ N-Formyl-4-amino-5-aminomethyl-2-methylpyrimidine	C7H10N4O	167.0894623
▪ Ophiobolin A	C25H36O4	401.2615814
▪ Phenylpyruvate	C9H8O3	165.0544624
Phorbol 12-tiglate 13-decanoate	C35H52O8	601.3717499



Piperidine	C5H11N	86.09650803
▪ Pymetrozine	C10H11N5O	218.1002426
▪ Resolvin D1	C22H32O5	377.2325999
▪ Senampeline A	C25H31NO8	474.2177582
▪ Sildenafil	C22H30N6O4S	475.2212067
▪ Sucrose	C12H22O11	343.1230164
▪ Sulfluramid	C10H6F17NO2S	527.9948934
▪ Tamsulosin	C20H28N2O5S	409.1865997
▪ trans-Cinnamate	C9H8O2	149.0596352
▪ Valnemulin	C31H52N2O5S	565.3616435



Tabella 2

Rapporto m/z	Molecola*
90.97666931	C2H3PS C2H3ClSi
120.0807571	C8H9N
132.1054688	C6H12FN2
133.1051636	C7H16S
138.9197159	CK2O3
138.9305725	CH3AgO
174.1599579	C8H19N3O
180.9037399	C2H3Cl3OS
197.1006775	C8H17F02S C9H17LiS2
210.9352722	C3H5O3Sb C6H3LiS4 C3H3IN2O
232.9172516	C5H3Cl3O4 C6H2BrFN2S C5H4BrClF2O
242.9252167	C4H7BrN2OS2
262.9066467	C8H8Br2
278.9226532	C8H4CdO4 C7H7AgO3S C6H14SSe2 C7HBrF6
294.9385223	C7H7BrN2O4S C6H2BCl3F4N2 C9H9BrCl2N2 C9H8ClIO C6H10N2S2Sn
300.9044952	C4H5BrN4O3S2 C8H7Cl2I C4H12Sn2

* Formule brute associabili a composti tossici candidati.

