



Autor - CORVELVA

Tłumaczenie - zespół tłumaczy STOP NOP

# Vaccinegate: Analiza składu chemicznego Gardasil 9

## Wprowadzenie i opis badania :

Dzięki tej analizie przechodzimy do czwartej szczepionki analizowanej tą metodą, która ma na celu określenie składu chemiczno-białkowego analizowanych próbek.

W tej sesji skupiliśmy się na szczepionce, która nie jest obowiązkowa we Włoszech, to szczepionka przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego, na której ciąży wiele negatywnych doniesień w związku z licznymi niepożądanymi odczynami poszczepiennymi, które pojawiły się z czasem. Na temat szczepionki HPV było prowadzone wiele debat, nawet poza Włochami; stąd decyzja, aby zwrócić naszą uwagę także na ten produkt.

**UWAGA:** Gardasil 9 to szczepionka przeciwko HPV (human *papillomavirus* - wirus brodawczaka ludzkiego) która powinna zawierać - 9 antygenów dla 9 różnych podtypów wirusa HPV (podtypy 6-11-16-18-31-33-45-52-58). Jednak nie wszystkie zgłoszone antygeny zostały wykryte, ale tylko 7 na 9.

Odnosząc się do metodologii, krytyki i uwag poczynionych w ostatnich tygodniach, wobec użytej technologii, odpowiedzieliśmy (raport:<https://www.corvelva.it/it/speciali-corvelva/analisi/vaccinegate-final-technical-report-molecular-profile-analysis-of-vaccines.html>) ostatecznym raportem z analiz, sugerujemy

zapoznanie się i rozpowszechnianie tego dokumentu, wraz z resztą analiz, ponieważ wyjaśnienia są bardzo szczegółowe i precyzyjne.

W naszej próbce szczepionki Gardasil 9 zostały znalezione, jak w przypadku poprzednich szczepionek analizowanych:

- zanieczyszczenia chemiczne z procesu produkcyjnego lub zanieczyszczenia krzyżowe z innymi liniami produkcyjnymi;
- toksyny chemiczne;

ANTYGENY: jak wcześniej wspomniano, Gardasil 9 jest szczepionką przeciwko-HPV, która powinna zawierać 9 antygenów dla 9 różnych podtypów wirusa HPV (podtypy 6-11 16-18-31-33-45-52 58). Spośród nich NIE wykryto:

- L1- białko wirusa brodawczaka ludzkiego typu 11 (jeden z podtypów, które są najczęściej związane z chorobami szyjki macicy),
- L1 -białko wirusa brodawczaka ludzkiego typu 58 (jeden z podtypów, które najczęściej są związane z rakiem szyjki macicy)

Te dwa podtypy nie zostały wykryte przy użyciu tej metody (w przeciwieństwie do pozostałych 7).

Także w tym przypadku mamy do czynienia z produktem, który nie zawiera tego, co powinien zawierać. Oznacza to, że z 9 antygenów, zostały wykryte tylko 7. To otwiera ważne zagadnienie dotyczące zgodności produktu. Zagadka, której rozstrzygnięcie nie należy do nas i jak zwykle kierujemy ją do osób odpowiedzialnych za bezpieczeństwo produktów farmaceutycznych.

Oprócz tego znaleziono 338 sygnałów zanieczyszczeń chemicznych, z czego tylko 22% było znanych. Również te dane są spójne z poprzednimi, Wśród tych sygnałów zidentyfikowano również 10 toksyn chemicznych, prawdopodobnie pochodzących z procesu przetwarzania antygenów lub z innych procesów produkcyjnych obecnych w miejscu produkcji szczepionki. Podsumowując, również Gardasil, jak również skojarzone 6w1 Hexyon i Infanrix HEXA oraz 4w1 Priorix Tetra zgodnie z metodą którą przeprowadziliśmy, pozostawiają ogromne wątpliwości zarówno pod względem skuteczności, jak i BEZPIECZEŃSTWA!!!

Te produkty, jak każdy inny produkt farmaceutyczny, wykazują szereg niepożądanych działań ubocznych w tym ciężkie. Jeśli skuteczność jest kwestionowana przez brak jednego lub więcej antygenów niż zadeklarowano przez producenta to pacjent przed przyjęciem szczepionki powinien zostać o tym poinformowany (w przeciwnym razie stanowi to oszustwo

ze strony tych, którzy sprzedają produkt i którzy go aplikują); wobec tego w tej chwili podstawowe znaczenie ma kontynuowanie badań laboratoryjnych nad zawartością szczepionek biorąc pod uwagę fakt że populacja pediatryczna (dzieci) jest ich największym odbiorcą, należy zwrócić uwagę aby osoby którym się je podaje nie cierpiały na żadną chorobę, oraz czy istnieje wskazanie na potrzebę profilaktyki zdrowotnej z wykorzystaniem tych produktów przez instytucje, które są również bezpośrednio zaangażowane w ocenie ich profilu bezpieczeństwa i ich zgodności.

## Badanie profilu składu chemicznego Gardasil 9

### Wprowadzenie i opis badania :

Kwantowo-ilościowe badanie związków organicznych ma ogromne znaczenie w dziedzinie farmakologii, ponieważ istnieją potencjalne problemy związane z bezpieczeństwem wynikające z nowych procesów produkcji leków biologicznych oraz ze złożonych cech strukturalnych i biologicznych tych produktów. Badanie dokumentacji rejestracyjnych szczepionek wojskowych, które znajdziemy w końcowym raporcie "Parlamentarnej komisji śledczej dotycząca skutków stosowania zubożonego uranu", ujawniło obecność zanieczyszczeń i zanieczyszczeń o charakterze chemicznym i białkowym, które wymagały dalszych analiz analitycznych. nasze stowarzyszenie postanowiło przejąć to zadanie, w miarę naszych możliwości. Projekt ten jest częścią tych badań i konieczne było opracowanie technologii zdolnej do analizy szerokiego spektrum cząsteczek pochodzenia chemicznego, metabolicznego i białkowego, które oceniają jakość otrzymanych produktów. Opracowano metodę opartą na technologii SANIST w celu wykonania kontroli czystości szczepionki (szczegóły poniżej)

SKŁAD	OBECNOŚĆ	GATUNEK JONOWY
Chlorek sodu	niewykrywalny	-
L-histydyna	Tak	(M+H)+
Polisorbat 80	Nie wykryto	-
Boran sodu	Niewykrywalny	-
Białko typu L1 typ 6 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 11 wirusa brodawczaka ludzkiego	Nie wykryto	-
Białko typu L1 typ 16 wirusa	Tak	(M+nH)n+

brodawczaka ludzkiego		
Białko typu L1 typ 18 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 31 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 33 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 45 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 52 wirusa brodawczaka ludzkiego	Tak	(M+nH)n+
Białko typu L1 typ 58 wirusa brodawczaka ludzkiego	Nie wykryto	-

## 2. Analiza frakcji białkowej:

Jak podaje producent, szczepionka Gardasil 9 zawiera białka. Próbkę poddano analizie w celu identyfikacji tych białek.

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=pdfel>

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

5 Albin 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 - Pierwsza analiza: Esej Bradforda :

Początkowo, w celu sprawdzenia obecności deklarowanych białek, szczepionka Gardasil 9 została poddana testowi Bradforda. 200 µl próbki poddano obróbce z 300 µL osmotycznej H<sub>2</sub>O w celu uzyskania objętości. Dodano do nich 500 µL odczynnika Bradforda. Później w analizie wizualnej możemy potwierdzić obecność białek lub sekwencji peptydowych wykrytych przez niebieski kolor.

Na podstawie skonstruowanej linii kalibracyjnej wykryto stężenie białka wynoszące 0,062 mg / ml.

### 2,2- druga analiza: Trawienie samo w sobie

Próbka została poddana enzymatycznemu procesowi trawienia: 10 µL próbki poddanej działaniu 50 µL lewej trypsyny

w termobloku w 37 ° C przez noc. Przygotowano kontrolę hemoglobiny 1 mg / ml, którą traktowano jako próbkę.

Z tej analizy wykryto obecność białek w próbce

### 2.3 - trzecia analiza : Trawienie osadu

Następnie próbkę poddano dalszej analizie przez oddzielenie, poprzez odwirowanie i oddzielenie części ciekłej od części stałej.

cały supernatant został zabrany. Pozostały osad potraktowano 30 µl trypsyny i pozostawiono w termobloku w 37 ° C przez noc.

przygotowaliśmy kontrolną hemoglobinę 1 mg / ml, którą traktowano jako próbkę. Po trawieniu próbka i próbka kontrolna były

poddawane wirowaniu. Supernatant pobrano i umieszczono w fiolkach do analizy. Dodano 20 µl osmotycznej H<sub>2</sub>O

wystarczająca objętość do wstrzyknięcia.

Z tej analizy wykryto obecność białek w próbce

NAZWA	CIĘŻAR MOLEKULARNY (KDa)	WYNIK	KOD
Łańcuch A, wysokiej rozdzielczości mapy cryo-EM człowieka Wirus brodawczaka 16 ujawnia lokalizację L2 i indukowaną heparyną zmiany konformacyjne	54	415/50	5KEP_A
główne białko kapsydu L1 [wirus brodawczaka ludzkiego typu 33]	56	226/50	ACV84008.1
Łańcuch A, struktura krystaliczna pentameru Hpv58 w kompleksie Z fragmentem Fab przeciwciała A12a3	55	219/50	5Y9C_A
główne białko kapsydu L1 [wirus brodawczaka ludzkiego typu 52]	59	175/50	ABU55765.1
Białko kapsydu L1 [wirus brodawczaka ludzkiego typu 31]	56	139/50	AAA92894.1
główne białko kapsydu L1, częściowe [typ wirusa brodawczaka ludzkiego 16]	6	123/50	ADB97224.1
Białko L1 [typ wirusa brodawczaka ludzkiego 18]	64	94/50	AAP20601.1
L1 [wirus brodawczaka ludzkiego typu 45]	57	69/50	AAV86494.1
L1 [wirus brodawczaka	56	72/50	AAF00066.1

Ocena toksyczności wykrytych sekwencji  
Wskaźnika toksyczności molekularnej nie można było ocenić na podstawie wykrytych sekwencji peptydowych.

#### Badanie wolnych peptydów

Nie wykryto wolnych peptydów.

#### 3. Analiza frakcji metabolicznej

Należy zauważyć, że to badanie przesiewowe dostarcza danych półilościowych, co odpowiada różnicy pomiędzy nanogramami a mikrogramami, jako orientacyjny rząd wielkości.

W celu uzyskania dokładnych danych ilościowych, niezbędne będzie przeprowadzenie badań według certyfikowanych standardów analitycznych.

Poniżej przedstawiamy wyniki badań przesiewowych otrzymane w dwóch badanych partiach:

##### Część #1 (R013092)

Wstawić wykres kołowy

Ślady znane

Ślady nieznanne

W partii nr #1 mamy 388 śladów, z czego tylko 22% jest znane.

Uwagi: jest to analiza na pierwszym poziomie, co polega na identyfikacji na podstawie dokładnej masy cząsteczkowej. Dla danej masy cząsteczkowej składniki znajdują się związki towarzyszące, których tożsamość musi być potwierdzona przez analizę odpowiedniego wzorca analitycznego.

##### 3.1. Szczepionka Gardasil

Wykryto 388 śladów, z których tylko odsetek w wysokości 22% odpowiada potencjalnej klasyfikacji (tabela 1). Określono, że odsetek procentowy śladów nie jest dokładnie skorelowany z odsetkiem związków, ponieważ w spektrometrii mas pojedynczy związek może generować więcej masy w stosunku do ładunku ( $m/z$ ). Należy określić, że tożsamość związków nie jest pewna i musi zostać potwierdzona poprzez badanie przesiewowe drugiego stopnia przeprowadzone według certyfikowanych standardów analitycznych. W rzeczywistości w fazie przesiewowej, przyrząd mierzy dokładne dane masy cząsteczkowej (błąd pomiaru  $<10$  ppm). Na podstawie tych miar wylicza się wzór cząsteczkowy. Niektóre wzory mogą odpowiadać kilku związkom o takiej samej masie cząsteczkowej, ale o różnej tożsamości chemicznej.

Uwagi: istotny jest fakt, że mamy kilka nieznanymi sygnałów, którym nie przypisano żadnej identyfikacji poprzez badania w międzynarodowych bazach danych.

Zbadane zostały molekuly potencjalnie należące do kategorii toksyn. Postawiono hipotezę na podstawie wyszukiwania w trybie  $m/z$  (błąd  $<10$  ppm), przy użyciu bazy danych związków toksycznych w wyszukiwarce Metlin.

#### 4. Uwagi końcowe

Z analiz przeprowadzonych na dwóch partiach to okazuje się, że posiadają znaczną zmienność zawartości substancji zanieczyszczających i zanieczyszczeń; z nich, większa część nie została scharakteryzowana za pomocą bazy danych przemiany i białka wzorcowego (KEGG NCBI-Prot Swissprot).

Istnieje krytyczna kwestia w przypadku zanieczyszczenia różnych związków potencjalnie lub zdecydowanie szkodliwych dla zdrowia ludzkiego.

**Krótko mówiąc, pierwsze pytania, które zadaliśmy sobie i uzyskane odpowiedzi względne, są następujące:**

1. Czy chemikalia są wymienione w arkuszu danych?	Częściowo
2. Czy są jakieś zanieczyszczenia chemiczne?	Tak
3. Ile jest związków zanieczyszczających?	Ponad 70
4. Co to potencjalnie może być?	Toksyny chemiczne, związki chemiczne

#### **PRZYSZŁE ANALIZY**

1. zidentyfikować w pewien sposób najciekawsze prawdopodobne związki
2. określić dokładną ilość każdego zanieczyszczenia

#### **5. Przyszłe prace badawcze**

Analizy potwierdzające i tożsamościowe będą wykonywane przy użyciu techniki "Tandem Mass Spectrometry (MS / MS)" związanej ze standardem certyfikaty analityczne. Analizy będą wykonywane zgodnie z dyrektywami europejskimi (dyrektywa UE 2002/657 / EC) przydatnymi do identyfikacji związków.

#### **6. Opis technologii SANIST**

Innowacyjna platforma SANIST uznawana na całym świecie za pośrednictwem publikacji w wcześniej przywoływanych czasopismach naukowych  
- została użyta wykonania pierwszego badania identyfikacyjnego na szczepionkach będących przedmiotem zainteresowania.

#### **7. Szczegóły dotyczące metody analitycznej**

Technologia SANIST składa się z:

- zestaw do ekstrakcji analitów (nieznane substancje do ustalenia);
- system analizy LC-SACI / ESI-MS, który pozwala na zmniejszenie szumu chemicznego spektrometrów mas i uzyskanie lepszego wykrywania sygnałów instrumentalnych;
- system przetwarzania danych SANIST

składający się z lokalnej platformy bioinformatycznej i sieciowej zdolnej do przetwarzania danych dzięki wykorzystaniu dedykowanych baz danych i dostosowanych algorytmów. Wyszczególniono, że w fazie przeglądu nagrody są

przeprowadzane w kontekście badań naukowych i badań w oficjalnych bankach (KEGG, NCBI-Prot i SwissProt)

- bez pomocy certyfikowanych standardów analitycznych, konieczne jest zatem przeprowadzenie analizy drugiego poziomu za pomocą certyfikowanych standardów analitycznych potwierdzić swoją tożsamość.

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

7 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>)

8 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/>)

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

## **8. Obszary zastosowania technologii SANIST**

Platforma SANIST obowiązuje do dzisiaj w następujących dziedzinach:

- a. W badaniach klinicznych markerów choroby i ich bezpośredniego zastosowania w diagnostyce.
- b. W usługach gastronomicznych, identyfikacji żywności. Porównawczo w celu określenia jakości produktów na podstawie ich złożonego składu cząsteczkowego. Kontrola podrabiania żywności.
- c. Sektor nutraceutyczny, rozwój wartości odżywczej suplementu diety w oparciu o jego skład cząsteczkowy. Wyszukiwanie podróbek (np. Z dodatkiem leków)
- d. Sektor farmaceutyczny. Kontrola leków i poszukiwanie aktywnych biomolekuł.
- e. Przemysł kosmetyczny. Skład cząsteczkowy produktów kosmetycznych uważnie monitorowany i skorelowany z jakością produktu.

## **9. Jak odczytać tabelę**

Jest to faza badań przesiewowych, przyrząd pomiarowy mierzy dokładne dane masy cząsteczkowej (błąd pomiaru <10ppm). Na podstawie tych pomiarów wyznacza się wzór cząsteczkowy. Niektóre wzory mogą odpowiadać kilku związkom o takiej samej masie cząsteczkowej, ale różnej tożsamości chemicznej (patrz tabela 1)

Przykład pojedynczego składnika powiązanego:

Istamycyna C1                      C19H37N5O6

W tym przykładzie przyrząd pomiarowy wykrył sygnał o określonej masie cząsteczkowej. Umieszczając wzór cząsteczkowy w bazach danych, możliwe było skojarzenie prawdopodobnego komponentu.

## **10. Kompletne tabele zanieczyszczeń**



**TABELA 1:**

<b>Związki kandydujące</b>	<b>Podstawowa formuła</b>	<b>Raport m/z</b>
(-) - Kwas jasmonowy	<b>C12H18O3</b>	211.1313019
■ (10S)-Juvenile hormone III diol	C16H28O4	285.2043152
■ 16alpha,17alpha-Dihydroxyprogesterone acetophenide	<b>C29H36O4</b>	449.2609863
■ 1-Palmitoyl-2-(5-keto-8-oxo-6-oc tenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	<b>C32H58NO10P</b>	648.3792725
■ 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedio ate	C6H4Cl2O5	226.9511973
■ 2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedio ate	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
■ Acetyl Intermedyna	C17H27NO6	342.1893311
■ Acetyl Spiramycyna	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
Sulfuramid	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

TABELA 2

raport m/z	Molekuła *
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

\*Podstawowe formuły związane z potencjalnymi związkami toksycznymi.