



Autor: Corvelva



Tłumaczenie: Zespół Tłumaczy STOP NOP

Vaccinegate

Wstępne wyniki analizy szczepionki Hexacima/Hexyon

Analiza ilościowo-jakościowa związków organicznych ma ogromne znaczenie w dziedzinie farmakologii¹, ponieważ potencjalne problemy związane z bezpieczeństwem preparatów wynikają z nowych procesów produkcji leków i z kompleksowych cech strukturalnych i biologicznych tych produktów².

Przegląd dokumentacji rejestracyjnej szczepionek wojskowych, który znajdujemy w raporcie³ końcowym „Komsji Parlamentarnej ds. Zubożałego Uranu”⁴ ujawnił obecność zanieczyszczeń chemicznych i białkowych, które wymagały dalszych analiz.

Nasze stowarzyszenie zdecydowało się przejąć kontrolę nad powyższym raportem (na tyle na ile było to możliwe).

Ten projekt jest częścią wyżej wymienionych spostrzeżeń. Konieczne było zatem opracowanie technologii/metody pozwalającej na przeprowadzenie analizy szerokiego spektrum cząstek pochodzenia chemicznego, metabolicznego i białkowego, w celu oceny jakości uzyskanych wyników.

W związku z powyższym została opracowana metoda w oparciu o technologię SANIST w celu testowania szczepionek pod kątem czystości i bezpieczeństwa (więcej informacji poniżej)

Wyniki i dyskusja

1. Analiza składników deklarowanych w ulotce szczepionki

Składnik	Obecność	Rodzaj jonów
Aminokwasy	Tak	[M+H] ⁺
Sacharoza	Tak	[M+H] ⁺
Neomycyna	Nie odnaleziono	-

Formaldehyd ⁶	Nie odnaleziono	-
Streptomycyna ⁷	Nie odnaleziono	-
Aldehyd glutarowy	Tak	[M+H] ⁺
Trometamol ⁸	Tak	[M+H] ⁺
Dwufosforan sodu	Niewykrywalny	
Dwufosforan potasu	Niewykrywalny	
Toksoid błoniczy ⁹	Tak	[M+nH] ⁿ⁺
Toksoid tężcowy ¹⁰	Tak	[M+nH] ⁿ⁺
Toksoid krztuścowy ¹¹	Tak	[M+nH] ⁿ⁺
Hemaglutynina włókienkowa (FHA)	Tak	[M+nH] ⁿ⁺
Polisacharyd Hemophilus Influenzae B ¹²	Nie odnaleziono	-
Antygeny <i>Bordetella pertussis</i> ¹³	Tak	[M+nH] ⁿ⁺
Polimyksyna B	Nie odnaleziono	-
Hepatitis B (Zapalenie wątroby typ B)	Nie odnaleziono	-
Poliowirus Typ1,2,3	Nie odnaleziono	-

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_organico_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/>)

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/>

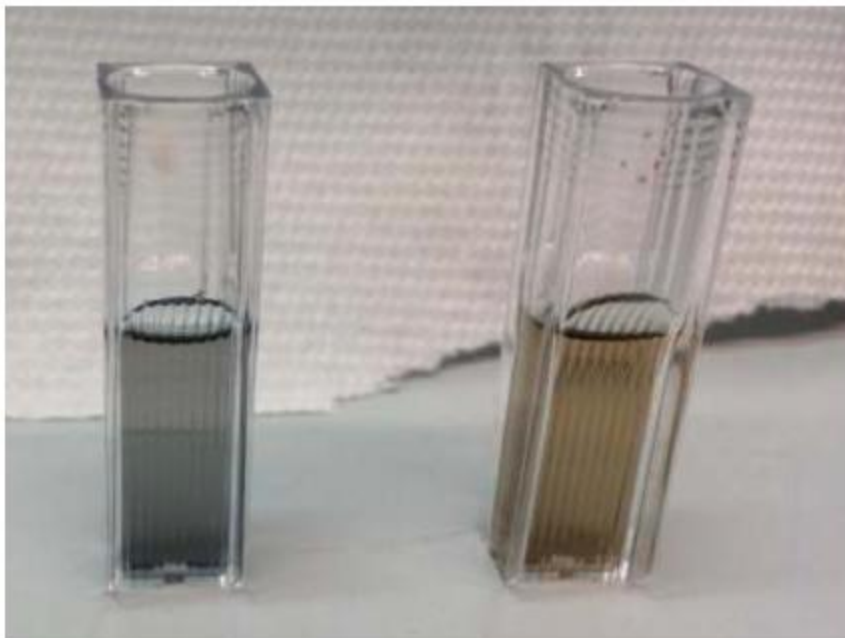
¹⁰ <https://www.who.int/ith/vaccines/tetanus/en/>

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

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

2. Badanie frakcji białek

Zgodnie ze specyfikacjami producenta szczepionka Hexyon zawiera niektóre białka. Próbkę poddano analizie w celu identyfikacji białek. Obecność białek lub sekwencji peptydów jest potwierdzona przez niebieskie zabarwienie próbki w pierwszej wizualnej analizie. Na rysunku 1, po prawej stronie pusta fiolka (odczynnik Bradforda), a po lewej fiolka zawierająca ten sam odczynnik z dodatkiem frakcji szczepionki Hexyon, powodujący niebieskie zabarwienie roztworu.



Rysunek 1. Test Bradforda.

2.1 – 1^a analiza: Test Bradforda

Aby ustalić, czy białka są obecne, szczepionkę Hexyona poddano badaniu Bradforda. 300 μL osmotycznej H_2O dodano do 200 μL szczepionki, aby osiągnąć odpowiednią objętość: 500 μL odczynnika Bradforda dodano do roztworu. Po analizie wizualnej obecność sekwencji białek lub peptydów została potwierdzona przez niebieskie zabarwienie próbki.

W oparciu o uprzednio wyznaczoną krzywą kalibracji stężenie białka oszacowano na 0,033 mg / ml

2.2 – 2^a analiza: Trawienie takie jakie jest

Po teście Bradforda próbka szczepionki została poddana trawieniu enzymatycznemu. 10 μL pierwotnej próbki zostało potraktowane 50 μL Trypsyny pozostawiono na noc w temp 37° C w przepływowym ogrzewaczu wody (Termoblock). Została przygotowana próbka kontrolna zawierająca hemoglobinę o stężeniu 1 mg / ml , która była traktowana jako próbka.

W tej analizie wykryto obecność białek w próbce.

2.3 – 3^a analiza: Trawienie osadów

Próbkę szczepionki poddano następnie drugiej analizie, w której frakcje stałą i ciekłą oddzielono przez odwirowanie.

Po odwirowaniu usunięto cały supernatant. Pozostałą strąconą frakcję stałą potraktowano następnie 30 μL trypsyny i pozostawiono na noc w temp 37° C w przepływowym ogrzewaczu wody.

Przygotowano kontrolę hemoglobiny o stężeniu 1 mg / ml i poddano obróbce zgodnie z tą samą procedurą co próbkę szczepionki.

Po trawieniu, zarówno próbka szczepionki jak i kontrola zostały poddane wirowaniu. Supernatant został wyekstrahowany i umieszczony w fiolkach do analizy. Dodano 20 µl osmotycznej H₂O w celu osiągnięcia dostatecznej do wstrzyknięcia objętości.

W tej analizie wykryto obecność białek w próbce.

W celu przetworzenia danych uzyskanych w ten sposób, początkowo wykorzystano bazę danych Mascot¹⁴

Tabela 1 – Próbkę #1 (N3FI38V)*

Nazwa Białka	Baza danych	Masa cząsteczkowa (kDa)	Wynik	Kod
włóknista hemaglutynina / adhezyna [Bordetella krztuśca]	NCBIInr	330	222/50	SNW24549.1
łańcuch A, Struktura Izolowanej Katalitycznej Domeny Toksyny Błoniczej	NCBIInr	20	114/50	1DTP_A
łańcuch A, Binarny Kompleks Toksyny Krztuśca i Atp	NCBIInr	26	76/50	1BCP_A
Podjednostka alfa syntazy tryptofanu [Methylobacterium sp. 10]	NCBIInr	30	73/50	WP_051439711.1
domniemane białko warstwy S / amidaza N-acetylmuramoilo-L-alanina [Clostridium tetani E88]	NCBIInr	119	69/50	AAO35094.1
łańcuch B, Kompleks Binarny Toksyny Krztuśca i	NCBIInr	22	64/50	1BCP_B

Atp				
-----	--	--	--	--

***Białka zidentyfikowano bez uwzględnienia potencjalnych zmian potranslacyjnych. Przyjętą metodologią nie zidentyfikowano żadnych innych sekwencji.**

Ocena toksyczności dla zidentyfikowanych sekwencji

Nie można było ocenić wskaźnika toksyczności molekularnej na podstawie zidentyfikowanych sekwencji peptydów.

Obecność wolnych peptydów

Nie wykryto żadnych wolnych peptydów.

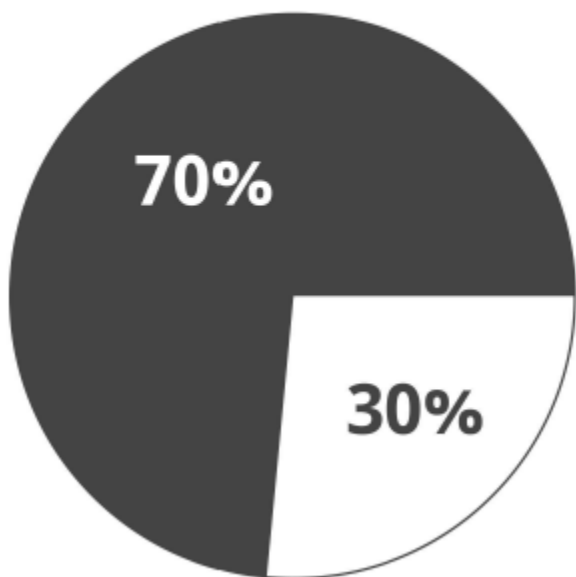
¹⁴ http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_db_gui.html

3. Analiza frakcji metabolicznej

Należy podkreślić, że to badanie przesiewowe dostarcza danych półilościowych, które odpowiadają zakresowi od nanogramów do mikrogramów jako orientacyjny rząd wielkości. W celu uzyskania dokładnych danych ilościowych konieczne będzie postępowanie z wykorzystaniem certyfikowanych standardów analitycznych o znanej czułości.

Poniżej przedstawiamy wyniki badań identyfikacyjnych uzyskane w dwóch badanych partiach:

Batch #1 (N3FI38V)



Ciemny obszar (70%) - nieznane składniki

Jasny obszar (30%) - znane składniki

W próbie zidentyfikowaliśmy 216 sygnałów, z czego tylko 30% znanych.

UWAGI POTRZEBNE DO ZROZUMIENIA: jest to analiza pierwszego poziomu, która oznacza identyfikację opartą na masie cząsteczkowej. Jeśli wynik jest jednoznaczny (tj. przy zmierzonej masie cząsteczkowej tylko jeden związek pasuje) jest bardziej prawdopodobne, że jest to dokładnie ten związek, ale w tej fazie nie możemy mieć absolutnej pewności. Jak zauważysz, w odniesieniu do niektórych związków, różne substancje mogą korespondować z tą samą masą cząsteczkową. Konieczna jest zatem dalsza ukierunkowana analiza, z zachowaniem odpowiednich standardów, w celu potwierdzenia dokładnego związku chemicznego.

3.1 Szczepionka Hexyon.

Wykryto **216 sygnałów**, z których tylko 30% dało potencjalną klasyfikację (tabela 2). Należy podkreślić, że proporcja sygnałów nie jest dokładnie skorelowana z proporcją związków, ponieważ w spektrometrii mas pojedynczy związek może generować kilka stosunków masy do ładunku (m/z).

Należy podkreślić, że dokładna nazwa związku chemicznego nie jest pewna i powinna być potwierdzona przez badanie drugiego poziomu przeprowadzane przy użyciu certyfikowanych norm analitycznych.

W rzeczywistości, podczas badania przesiewowego urządzenie mierzy dane za pomocą dokładnej masy cząsteczkowej (błąd pomiaru <10 ppm). Formuła empiryczna jest obliczana na podstawie tych pomiarów. Pewnego rodzaju wzory chemiczne mogą tak samo opisywać różne związki chemiczne mające tę samą masę cząsteczkową.

UWAGI DO ZROZUMIENIA: w istocie, ustalono, że mamy kilka nieznanych sygnałów, których nie można zidentyfikować za pośrednictwem międzynarodowych baz danych.

Badano molekuly potencjalnie należące do kategorii toksyn. Zaproponowano je na podstawie dokładnych badań stosunku masy do ładunku m / z (błąd <10 ppm) używając bazy związków toksycznych Metlin. Tabela 3 pokazuje uzyskanych kandydatów.

4. Ostateczne wnioski

Większość wykrytych zanieczyszczeń i nieczystości nie została scharakteryzowana przy użyciu baz danych dotyczących białek i metabolitów (KEGG, NCBI-Prot i SwissProt).⁸⁻⁹

Istnieje krytyczny problem związany z zanieczyszczeniem różnych związków potencjalnie lub zdecydowanie szkodliwych dla zdrowia ludzkiego.

Krótko mówiąc, pierwsze pytanie, które zadaliśmy sobie i uzyskane względne odpowiedzi, są następujące

1. Czy wymienione substancje chemiczne są obecne?	Częściowo
2. Czy występują jakiegokolwiek zanieczyszczenia chemiczne?	Tak
3. Ile jest związków zanieczyszczających?	Ponad 70
4. Co to za związki?	Toksyny chemiczne, związki chemiczne

Następna analiza:

1. Przede wszystkim należy z całą pewnością zidentyfikować najciekawsze prawdopodobne związki
2. Następnie, aby określić dokładną ilość każdego zanieczyszczenia

5. Przyszłe prace badawcze

Analiza potwierdzająca i analiza związków chemicznych będą wykonana przy użyciu techniki "Tandem Mass Spectrometry (MS / MS)" związanej z pomocą certyfikowanych standardów analitycznych. Analiza zostanie przeprowadzona zgodnie z dyrektywami europejskimi (dyrektywa UE 2002/657 / WE) przydatnymi do identyfikacji związków 29.

6. Opis technologii SANIST

Innowacyjna międzynarodowa platforma SANIST, poprzez publikacje w recenzowanych czasopismach naukowych¹⁵⁻¹⁶, została wykorzystana do wykonania pierwszego badania przesiewowego identyfikacji szczepionek będących przedmiotem zainteresowania.

7. Szczegóły dotyczące metody analitycznej.

Technologia SANIST składa się z:

- a) Zestaw do ekstrakcji analitów (nieznane substancje do określenia)

- b) System analizy LC-SACI/ESI-MS, który pozwala na redukcję szumu chemicznego spektrometrów mas i uzyskanie lepszego wykrywania sygnałów instrumentalnych;
- c) System orzetwarzania danych SANIST składający się z lokalnej platformy bioinformatycznej i sieciowej zdolnej do przetwarzania danych za pomocą dedykowanych baz danych i dostosowanych algorytmów. Wyszczególniono, że w fazie badania rozpoznawanie odbywa się w kontekście badań naukowych i oficjalnych bankach białek/związków (KEGG, NCBI-Prot i SwissProt)¹⁷⁻¹⁸ bez pomocy certyfikowanych standardów analitycznych. Konieczne jest zatem przeprowadzenie analizy drugiego poziomu z zastosowaniem certyfikowanych standardów analitycznych w celu potwierdzenia rodzaju związków chemicznych

8. Obszary zastosowania technologii SANIST

Do tej pory platforma SANIST znajduje zastosowanie w następujących dziedzinach:

- a. W badaniach klinicznych markerów choroby i ich bezpośredniego zastosowania w diagnostyce.
- b. Usługi gastronomiczne, identyfikowanie żywności. Badania porównawcze w celu określenia jakości produktów na podstawie ich złożonego składu cząsteczkowego. Kontrola podrobów.
- c. Sektor Nutra, rozwój wartości odżywczej suplementu diety w oparciu o jego skład cząsteczkowy. Wyszukiwarka(np: dodane leki).
- d. Sektor farmaceutyczny, kontrola leków i badania aktywnych biocząsteczek.
- e. Przemysł kosmetyczny: skład molekularny produktów kosmetycznych może być uważnie monitorowany i skorelowany z jakością produktu.

9. Jak interpretować tabele.

To jest faza badań przesiewowych: przyrząd mierzy dane za pomocą dokładnej masy cząsteczkowej (błąd pomiaru <10ppm). Na podstawie tych miar oblicza się wzory chemiczne. Pewnego rodzaju wzory chemiczne mogą tak samo opisywać różne związki chemiczne mające tę samą masę cząsteczkową. Przykład pojedynczego powiązanego komponentu:

2-feniloacetamid	C8H9NO
------------------	--------

W tym przykładzie przyrząd wykrył sygnał o określonej masie cząsteczkowej. Wstawiając wzór chemiczny do baz danych, możliwe byłopowiązanie danego wzoru z prawdopodobnym komponentem.

10. Tabele zanieczyszczeń

Tabela 2 – Próbkę #1 (N3FI38V)

Potencjalna klasyfikacja	Wzór chemiczny	Stosunek m/z
1-Palmitoilo-2- (5-keto-8-okso-6-oktenoilo-sn-glicero-3-fosfocholina	C32H58NO10P	648.3792725
2, 4, 6-Trihydroksybenzofenon	C13H10O4	231.0650024
2, 4-diamino-6-nitrotoluen	C7H9N3O2	168.0765686
2, 5-Dichloro-4-	C6H4Cl2O5	226.9511973

oksoheks-2-enodionian		
2-Hydroksymetyloceram	C6H9NO3	144.0629196
Amid 2-N, 6-N-bis (2,3- dihydroksybenzoilo) - L-lizyny	C20H23N3O7	418.1549835
Kwas 2-okso-7- metylotioheptanowy	C8H14O3S	191.0764275
2-fenyloacetamid	C8H9NO	136.0754967
3-Buten-1-amina	C4H9N	72.0809288
4'-O- demetylobikamycyna	C26H19CI2N3O7	556.0627441
5- Metylotetrahydrofolian	C20H25N7O6	460.2019119
7-Dezoksylo-anianian	C16H24O9	361.1529999
Acetylospiramycyna	C45H76N2O15	443.2720133
Adenina	C5H5N5	136.0615883
Amoksyclina	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-fruktoza 2 ', 1:2,1'-dianhydride	C12H20O10	325.1124496
Karbenicylina sodowa.	C17H16N2O6S2Na	423.063446
Cefamandol sodu	C18H17N6O5S2. Na	485.0637894
Celecoxib	C17H14F3N3O2S	382.0821533
Chivosazole F	C41H57NO8	692.405426
Chloral hydrate	C2H3Cl3O2	164.9265976
Deethylatrazine	C6H10ClN5	188.0704498
Dwuzasadowy fosforan sodu	Na2HPO4	142.9478836

Fusaproliferin	C27H40O5	445.2876994
Gentisin	C14H10O5	259.0637894
Difosforan geranylu	C10H20O7P2	315.0794678
2-O-beta-D-glukozyd gibereliny	C25H32O11	509.2208182
Gliotoksyna	C13H14N2O4S2	327.0510406
Glucobrassicin	C16H20N2O9S2	449.066246
Hydrocortisone cypionate	C29H42O6	487.2982686
▪		
▪		
Justicidin B	C21H16O6	365.1049805
L-Arginina	C6H14N4O2	175.1187363
L-Lysine 1,6-lactam	C6H12N2O	129.1021729
L-metionina	C5H11NO2S	150.0582275
Kwas Lowastatyny	C24H38O6	423.2746124
L-Pipekolan	C6H11NO2	130.0861511
L-treonina	C4H9NO3	120.0654202
L-Tryptofan	C11H12N2O2	205.0969772
L-tyrozyna	C9H11NO3	182.0809784
L-Valine	C5H11NO2	118.0862541
Mannitol	C6H14O6	183.0843315
Mibefradil	C29H38FN3O3	496.3033905
Mycinamicin IV	C37H61NO11	696.4367879
N-Acetylo-D-fukozamina	C8H15NO5	206.1002884
Netilmicin	C21H41N5O7	476.3059031
N-Formylo-4-amino-5-aminometylo-2-metylopirymidyna	C7H10N4O	167.0,0464623
Ophiobolina A	C25H36O4	401.2615814
Fenylopirogronian	C9H8O3	165.0544624
Phorbol 12-tiglate 13-decanoate	C35H52O8	601.3717499
Piperidyndyna	C5H11N	86.09650803
Pymetrozine	C10H11N5O	218.1002426
Resolvin D1	C22H32O5	377.2325999
Senampeline A	C25H31NO8	474.2177582
Sildenafil	C22H30N6O4S	475.2212067
Sacharoza	C12H22O11	343.1230164
Sulfluramid	C10H6F17NO2S	527.9948934
Tamsulosin	C20H28N2O5S	409.1865997
trans-cynamonian	C9H8O2	149.0596352
Walnemulin	C31H52N2O5S	565.3616435

Tabela.3

Stosunek masy do ładunku (m/z)	Cząsteczka* (wzór chemiczny)
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	C8H17FO2S 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

*wzory chemiczne, potencjalnie dopasowane do toksycznych związków