

Table des matières disponible sur [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Journal of Inorganic Biochemistry

Page d'accueil de la revue : www.elsevier.com/locate/jinorgbio

Détection de l'ADN du gène L1 du papillomavirus humain (HPV) probablement lié à l'adjuvant d'aluminium particulière dans le vaccin Gardasil® contre le HPV

Sin Hang Lee¹

Milford Hospital et Milford Molecular Laboratory, 2044 Bridgeport Avenue, Milford, CT 06460, États-Unis

INFOS ARTICLE

Historique de l'article :

Date de réception 15 juin 2012

Date de réception après révision 26 août 2012

Date de validation 26 août 2012

Date de mise à disposition en ligne 30 août 2012

Mots clés :

Gardasil®

ADN du gène L1 du HPV

Nanoparticules de AAHS

Adjuvant

PCR

Séquençage ADN

RESUMÉ

Des médecins de neuf pays ont fourni des échantillons de Gardasil® (Merck & Co.) afin qu'ils soient testés pour déterminer la présence d'ADN du papillomavirus humain (HPV), car ils suspectaient que l'ADN résiduel recombinant du HPV laissé dans le vaccin puisse être un facteur contribuant à générer certains des effets secondaires non expliqués après la vaccination. Un total de 16 doses de Gardasil® ont été reçues d'Australie, de Bulgarie, de France, d'Inde, de Nouvelle-Zélande, de Pologne, de Russie, d'Espagne et des États-Unis. Une méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) nichée utilisant les amorces dégénérées MY09/MY11 pour l'amplification initiale et les amorces de PCR nichée à base de GP5/GP6 pour la seconde amplification a été utilisée pour préparer le modèle pour le séquençage de l'ADN par cycle automatique direct d'un segment hypervariable du gène L1 du HPV qui est utilisé pour fabriquer la protéine de capsid L1 du HPV par une technologie d'ADN recombinant dans la production du vaccin. La détection d'ADN du HPV et le génotypage du HPV de tous les échantillons positifs ont finalement été validés par analyse BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) d'une séquence de 45 à 60 bases de l'électrophérogramme généré par ordinateur. Les résultats ont montré que les 16 échantillons de Gardasil®, chacun ayant un numéro de lot différent, contenaient des fragments d'ADN du HPV 11, d'ADN du HPV 18 ou un mélange de fragments d'ADN provenant des deux génotypes. L'ADN du HPV détecté s'est révélé solidement lié à la fraction insoluble et résistante à la protéinase, vraisemblablement des nanoparticules de sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe (AAHS) utilisées comme adjuvant. La signification clinique de ces fragments résiduels d'ADN du HPV liés à un adjuvant à base de minéral particulière n'est pas connue après une injection intramusculaire, cela nécessite des recherches plus approfondies pour la sécurité vaccinale.

© 2012 Elsevier Inc. Tous droits réservés.

1. Introduction

Le vaccin quadrivalent contre le papillomavirus humain (HPV), Gardasil® (Merck & Co.), a été recommandé pour la prévention du cancer du col de l'utérus initié par le HPV et des pré-cancers depuis 2006 [1]. Les ingrédients actifs dans le vaccin sont les protéines de capsid L1 spécifiques du génotype du HPV sous forme de particules pseudo-virales (VLPs), qui sont hautement efficaces pour obtenir une production d'anticorps chez l'hôte contre une infection future par HPV 16, HPV 18, HPV 6 et HPV 11 et ne contiennent pas d'ADN viral [2,3]. Ces VLPs sont produites par une technologie de l'ADN recombinant dans laquelle les « gènes viraux codant pour les protéines de capsides » [4] spécifiques au génotype sont insérés dans le plasmide pGAL110 pour la transformation des sphéroplastes de levure [5]. Pour que le vaccin soit efficace, les jeunes

¹ Tél.: + 1 203 878 1438; fax: + 1 203 387 1431.

Adresse E-mail : shlee01@snet.net.

0162-0134/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. Tous droits réservés. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.08.015>

filles âgées de 9 à 12 ans sont destinées à être vaccinées avant que leur activité sexuelle ne débute [6].

Selon les archives conservées par les Centres nord-américains de prévention et de contrôle des maladies (CDC), un nombre apparemment élevé d'effets secondaires a été rapporté suite aux vaccinations contre le HPV dans certains types de problèmes de santé [7]. En utilisant la définition de l'anaphylaxie tirée du cas Brighton pour la sûreté du diagnostic, le taux d'anaphylaxie estimé chez les jeunes femmes après vaccination contre le HPV s'est révélé être de 5 à 20 fois supérieur à ceux identifiés lors de campagnes de vaccination comparables en milieu scolaire [8]. La polyarthrite rhumatoïde, y compris la polyarthrite rhumatoïde juvénile, a été relevée 3 fois plus fréquemment chez les sujets vaccinés au Gardasil® que dans le groupe témoin recevant de l'adjuvant au sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe (AAHS) lors d'essais cliniques [9]. Un certain nombre de cas de possibles troubles neurodégénératifs inflammatoires immunitaires impliquant le système nerveux central, connus sous le nom d'encéphalomyélite aiguë disséminée, après injections de Gardasil®, ont été rapportés dans la littérature mondiale [10–16]. Des médecins de plusieurs pays ont fourni des échantillons de ce vaccin quadrivalent HPV, actuellement utilisé sur le marché, au laboratoire de l'auteur sollicité par une association à but non lucratif (SANEVAX Inc.) pour tester la présence d'ADN du HPV dans les échantillons de vaccin. Ces médecins et certains de leurs patients suspectaient que de l'ADN recombinant résiduel du HPV laissé dans le Gardasil® puisse avoir contribué à certains des effets secondaires inexplicables après la vaccination.

Pour clarifier les caractéristiques du vaccin, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a récemment annoncé que le Gardasil® contient effectivement des fragments d'ADN recombinant spécifique au L1 du HPV [17]. Cependant, les propriétés physiques de ces fragments d'ADN du HPV dans le vaccin final n'ont pas été caractérisées. On ne sait pas s'ils sont sous forme de molécules d'ADN du HPV libres dans la phase aqueuse d'une suspension, enrobés dans les VLPs [18,19], liés de manière réversible à l'adjuvant AAHS insoluble comme les VLPs, ou s'ils sont liés de manière irréversible à l'aluminium minéral (Al^{3+}) [20].

Les molécules libres d'ADN étranger sont connues pour être dégradées et éliminées rapidement chez les mammifères [21]. Les fragments d'ADN enrobés dans les VLPs [22,23] ou liés à l'adjuvant d'aluminium particulaire [24] peuvent parvenir dans les cellules présentatrices d'antigènes ou les macrophages après injection. Leurs propriétés physiques dans le vaccin peuvent déterminer le sort de ces fragments d'ADN étranger chez une personne vaccinée et leurs effets physiopathologiques variables sur l'hôte. Différents composés inorganiques d'aluminium avec leurs caractéristiques physicochimiques spécifiques ont fait l'objet de recherches intensives [24–27] car ils peuvent stimuler la réponse immunitaire de l'hôte à la vaccination à base de protéine [27] et à celle à base d'ADN [24,28].

Cet article rapporte les résultats du test de l'ADN du HPV réalisé sur 16 échantillons de Gardasil®, chacun portant un numéro de lot différent et reçus de 9 pays, et révèle que les fragments d'ADN résiduels du gène L1 du HPV sont probablement solidement liés aux particules d'AAHS.

2. Expérimentation

Étant donné que le Gardasil® est un médicament sur ordonnance, tous les échantillons testés ont été achetés par des praticiens agréés dans le pays d'origine auprès des fournisseurs de médicaments locaux respectifs. Le Gardasil® est commercialisé sous forme de suspensions de 0,5 ml injectables dans un flacon unidosé et dans une seringue pré-remplie sous emballage scellé. Un total de 16 échantillons de Gardasil® dans leur emballage d'origine intact, dont 3 flacons non-ouverts et 13 seringues pré-remplies non-ouvertes, ont été reçus de la part de médecins d'Australie, Bulgarie, France, Inde, Nouvelle-Zélande, Pologne, Russie, Espagne et États-Unis, portant respectivement les numéros de lot suivants : #1437Z, #1511Z, #0553AA, #NL35360, #NP23400, #NN33070, #NL01490, #NM25110, #NL39620, #NK16180, #NK00140, #NM08120, #NL13560, #NL49190, #NN28160, ou #NM29390. Les trois échantillons envoyés par les médecins localisés aux États-Unis ont été remis au laboratoire dans des récipients isothermes avec des accumulateurs de froid. Les 13 autres échantillons provenant de divers pays hors États-Unis ont été transportés dans des récipients non-isothermes exposés aux températures ambiantes.

Une région cible courante de l'ADN du gène L1 du HPV a été d'abord amplifiée par une PCR primaire avec le couple d'amorces dégénérées MY09/MY11, suivie par une PCR nichée avec un couple d'amorces consensus GP5/GP6, GP6/MY11 ou GP5/MY09. Trois couples d'amorces ont été choisis pour réaliser la deuxième PCR pour amplifier les séquences multiples de 450 pb des produits de PCR MY09/MY11, afin d'examiner les variantes de séquence possibles des gènes L1 spécifiques au génotype qui sont utilisées dans la fabrication des vaccins quadrivalents HPV à l'aide de la technologie d'ADN recombinant [29], mais peuvent ne pas être identiques à celles pour lesquelles les amorces de consensus GP5/GP6 avaient été conçues. Les produits de PCR ont été identifiés visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose standard. Les positions relatives de ces sites de liaison d'amorce dans la phase ouverte de lecture du gène L1 du HPV, les séquences des amorces utilisées et la taille attendue de l'amplicon terminé par chaque couple d'amorces sont synthétisés dans la Fig. 1. Les amplicons présumés de la PCR nichée de l'ADN du HPV ont été soumis au séquençage automatique de l'ADN, en utilisant un oligonucléotide GP6 ou GP5 comme amorce du séquençage. Un segment de 45 à 60 bases de la région hypervariable de la séquence du gène L1 a été extrait de l'électrophérogramme généré par ordinateur pour effectuer des analyses BLAST pour la confirmation de

l'ADN du HPV détecté et pour valider son génotype. Le détail technique de cette méthodologie de séquençage de l'ADN / PCR nichée a été rapporté précédemment [30–35].

Les expériences ont d'abord été conçues pour déterminer si l'ADN libre du HPV était détectable dans la solution du vaccin Gardasil®. À cette fin, une aliquote de 100 µl de la suspension du vaccin a été centrifugée à ~ 16 000×g pendant 10 min dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml à température ambiante. L'intégralité du surnageant a été transféré dans un autre tube de microcentrifugation de 15 ml contenant 500 µl d'éthanol à 95 %, 12 µl d'eau et 68 µl d'acétate de sodium à 3M. Une fois le granulé lavé 3 fois avec 1 ml d'éthanol à 70 % à chaque fois et la suspension d'éthanol finale centrifugée à ~ 16 000 ×g pendant 5 min, le granulé a été séché avec de l'air. Le granulé sec a été remis en suspension dans 100 µl de 0,1 mg/ml de protéinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dans un tampon fait de Tris–HCl de 50 mM, d'EDTA de 1mM, de Tween 20 à 0,5 % et dont le pH est 8,1. Le mélange a été assimilé à 45–55 °C pendant la nuit. Après désactivation de la solution de protéinase K dans un bloc de métal chauffé à 95 °C pendant 10 min, 1 µl du digestat non séparé a été utilisé pour chaque PCR primaire suivie d'une PCR nichée (ou semi-nichée) avec divers couples d'amorces de PCR nichée décrits ci-dessous.

Afin de tester l'ADN du HPV dans la partie insoluble du vaccin Gardasil®, le granulé de la suspension de 100 µl du vaccin centrifugée décrite ci-dessus a été lavé deux fois avec 1 ml d'éthanol à 70 % à chaque fois et la suspension finale d'éthanol a été centrifugée à ~ 16 000 ×g pendant 5 min. Le granulé lavé a été séché avec de l'air. Le granulé sec a été remis en suspension dans 100 µL de solution de protéinase K. La suspension a été digérée à 45–55 °C pendant la nuit et centrifugée à ~ 16 000 ×g pendant 5 min le jour suivant. Le surnageant du digestat a été transféré dans un tube de centrifugation de 1,5 ml et a été chauffé à 95 °C pendant 10 min pour désactiver la protéinase K. Un microlitre du surnageant du digestat non séparé a été utilisé pour chaque PCR primaire suivie d'une PCR nichée.

Le granulé du digestat de la protéinase K de la partie insoluble du Gardasil® a été lavé minutieusement avec la solution tampon (Tris–HCl de 50 mM, EDTA de 1mM, Tween 20 à 0,5 %, pH 8,1) quatre fois, avec 1 ml à chaque fois. Le granulé lavé final, vraisemblablement constitué de particules d'AAHS sans protéines, a été remis en suspension dans 100 µl de tampon. Après avoir été chauffé à 95 °C pendant 10 min, 1 µl de la suspension particulaire insoluble lavée et chauffée a été utilisé pour chaque PCR primaire suivie d'une PCR nichée.

Région hypervariable du gène L1 du HPV terminé par les amorces MY09 et MY11

.....//.....MY09.....GP6.....GP5...MY11.....//...

(La taille de l'amplicon de PCR entre MY09 et MY11 est de ~450 pb, la représentation n'est pas à l'échelle)

MY09, MY11, GP5 et GP6 sont des sites de recuit pour les amorces de PCR, leur séquences de base sont listées ci-dessous :

MY09 = 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'

MY11 = 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

Code dégénéré des nucléotides : M=(A+C), R=(A+G), W=(A+T), Y=(C+T)

GP5 = 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3'

GP6 = 5'-GAAAAATAAAGTAAATCA-3'

Nombre de nucléotides de GP5 à GP6 ~ 150 bases (dépendant du génotype)

Nombre de nucléotides de GP6 à MY11 = 181 - 190 bases (dépendant du génotype)

Nombre de nucléotides de GP5 à MY11 = 65 bases (amplicon PCR INNO-LiPA) [52-55]

Fig. 1. Titre : Carte de position de quatre amorces de PCR pour la détection de l'ADN du gène L1 du HPV. Description : emplacements relatifs des sites des amorces MY09, GP6, GP5 et MY11.

Le génotypage du HPV d'une séquence cible courte a été réalisé par séquençage de l'ADN par cycle automatique direct [30–35]. Brièvement, une trace du produit de PCR nichée positive a été transférée directement avec une micro-baguettes de verre du tube de PCR nichée positive vers un volume de 20 µl d'un mélange réactionnel de séquençage par cycle constitué de 14,5 µl d'eau, 3,5 µl de tampon 5 X, 1 µl de BigDye Terminator 1.1 (Applied Biosystems) et 1 µl d'amorce de séquençage GP5 ou GP6 de 10 µM. Après le cyclage thermique selon les recommandations du fabricant, le mélange réactionnel a été chargé dans un analyseur génétique automatisé à quatre capillaires ABI 3130 pour l'analyse de séquence. L'analyse de l'alignement d'une séquence à 45–60 bases dans la région hypervariable du gène L1 extrait de l'électrophérogramme généré par ordinateur a été effectuée en confrontation avec différentes séquences de génotype du HPV standard stockées dans la GenBank, en utilisant le système en ligne BLAST pour valider le génotype du HPV particulier.

Des mesures de précaution exceptionnelles ont été prises pour assurer que la détection de tout ADN cible du HPV ne soit pas due à une amplification par inadvertance des séquences ADN du HPV environnantes. Un laboratoire moléculaire a été dédié exclusivement à ce projet de test du vaccin du 1er janvier au 31 octobre 2011. Au cours de cette période le projet a été complètement mené à terme et aucun autre test d'acide nucléique n'a été effectué dans les mêmes locaux. Le transfert des produits de PCR primaire vers le mélange de PCR nichée et des produits de PCR nichée vers le mélange réactionnel de Sanger a été réalisé à l'aide d'une micro-baguettes de verre afin d'éviter les aérosols des micropipettes et toutes les procédures ont été effectuées par des technologues moléculaires expérimentés et hautement qualifiés conformément à un ensemble d'instructions concernant la technologie de PCR nichée appliquée dans les laboratoires de diagnostic clinique [35]. Des témoins négatifs (eau) et amorces ont été inclus à chaque PCR de 4 échantillons maximum chacune. Toutes les amorces PCR, dont les nucléotides MY09, MY11, GP5 et GP6, ont été testés, comme décrit précédemment [30], en confrontation avec de l'ADN plasmidique standard du HPV de type 16, 18, 11 ou 6B acheté à l'American Type Culture Collection pour s'assurer que 1–10 copies de l'ADN plasmidique de chaque génotype puissent être détectées par le protocole de PCR nichée conçu pour ce projet.

3. Résultats

L'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR nichée de GP6/MY11 ou GP5/GP6 des 16 échantillons de Gardasil® testés ont révélé des bandes d'une taille attendue pour l'ADN du HPV lorsque la partie insoluble résistante à la protéinase K du vaccin, contenant vraisemblablement des fragments d'ADN du HPV liés à l'AAHS, a été utilisée comme modèle pour démarrer la PCR primaire. Cependant, la PCR primaire avec le couple d'amorces dégénérées MY09/MY11 n'a généré de bande de produit de PCR visible sur aucun des échantillons testés. Lorsque le couple d'amorces GP5/MY09 a été utilisé à la place des amorces GP6/MY11, dans des conditions expérimentales identiques, aucun produit de PCR nichée n'a été observé, même lorsque le granulé était utilisé dans sa totalité pour démarrer une PCR primaire. Étant donné qu'aucun produit de PCR nichée n'a été observé, on peut se demander si l'accumulation des copies d'ADN cible était numériquement exponentielle ou linéaire dans la PCR primaire de MY09/MY11.

Aucun produit de PCR, primaire ou nichée, n'a été obtenu lorsque le surnageant du vaccin Gardasil® ou le surnageant du digestat de la protéinase K des particules insolubles du vaccin Gardasil® a été utilisé comme matière pour débiter la PCR primaire.

Une fois les résultats ci-dessus obtenus, un flacon de vaccin contre l'hépatite B recombinant, Recombivax HB®, qui utilise également du AAHS comme adjuvant pour sa formulation [36], a été testé en parallèle avec les 4 échantillons du lot de Gardasil® pour déterminer si les fragments d'ADN du HPV détectés dans les lots de vaccin Gardasil® auraient pu être un contaminant lié aux ingrédients de l'adjuvant AAHS généralement utilisés dans d'autres formulations vaccinales par le fabricant (Merck & Co.). Les résultats de cette expérience de PCR nichée comparative en parallèle n'ont révélé aucune trace d'ADN du HPV dans les particules d'AAHS dans un flacon de Recombivax HB® acheté sur le marché américain (Fig. 2). Les derniers résultats ont soutenu l'interprétation selon laquelle les fragments d'ADN du HPV liés aux particules d'AAHS sont associés au processus de fabrication du Gardasil® et ne sont pas un contaminant de l'adjuvant utilisé dans la formulation vaccinale.

Pour déterminer si l'ADN du gène L1 du HPV détecté dans la fraction particulaire AAHS pourrait être en solution libre après la remise en suspension des particules insolubles pour les amplifications PCR, les dilutions doubles en série des 4 suspensions de particules de Gardasil® assimilées par la protéinase K utilisées pour l'expérience ci-dessus (Fig. 2) ont été réalisées dans un tampon et 1 µl de chaque dilution a été utilisé comme matière pour démarrer la PCR primaire puis la PCR nichée. Les résultats ont indiqué que la distribution des fragments d'ADN du gène L1 du HPV dans ces échantillons n'était pas homogène. La concentration de modèles d'ADN du HPV amplifiables par la PCR nichée à partir de l'échelle de dilution n'a pas diminué de manière équivalente à l'augmentation progressive des facteurs de dilution jusqu'à la fin de l'expérimentation (Fig. 3), comme il aurait été attendu si l'ADN libre du HPV dans une solution véritable avait été titré par dilutions en série [30]. Cette découverte milite en faveur du fait que les fragments d'ADN du gène L1 du HPV existaient en agrégation, ce qui empêcherait la réussite des méthodes de dilution en série pour obtenir des échantillons de molécule ADN du HPV seule pour réaliser une PCR nichée pour la préparation du modèle de séquençage sur certains lots de Gardasil® contenant des molécules d'ADN du HPV de plus d'un génotype (Fig. 6).

Il a été prouvé que tous les amplicons de PCR nichée positive contenaient une séquence hypervariable de la phase ouverte de lecture du gène L1 d'une construction synthétique d'ADN du HPV 11 (Fig. 4), une variante africaine de l'ADN du HPV 18 (Fig. 5) ou d'un mélange des deux (Fig. 6). Aucun résidu d'ADN du HPV 6 ou du HPV 16 n'a été détecté dans cette étude.

Les génotypes des HPV détectés dans les 16 échantillons de lot de Gardasil® sont repris dans le Tableau 1. Une partie des résultats présentés dans cet article a été reportée au préalable à la FDA par SANE VAX, Inc.



Fig. 2. Titre : PCR nichée avec AAHS provenant de vaccins contre le HPV et contre l'hépatite B. Description : Fragments d'ADN du gène L1 du HPV détectés dans les particules de AAHS du Gardasil®, mais pas dans les particules d'AAHS du Recombivax HB®. Électrophorèse sur gel de produits de PCR nichée de GP6/MY11 sur les 16 échantillons de vaccin Gardasil® et 1 échantillon de Recombivax HB® (Lot# 0908AA). La PCR primaire de MY09/MY11 a été initiée avec 1 µl de suspension d'une fraction résistante à la protéinase K dérivée de chaque échantillon de vaccin. La visualisation d'un amplicon de PCR nichée de ~190 pb dans les colonnes # 1–4, mais pas dans la colonne # 5, indique la présence de résidus d'ADN du gène L1 du HPV probablement lié à l'adjuvant AAHS dans le vaccin contre le HPV, mais pas dans l'adjuvant AAHS du vaccin contre l'hépatite B. Il a été confirmé par séquençage de l'ADN que tous les amplicons de PCR nichée de ~190 pb étaient de l'ADN du HPV 11 ou du HPV 18 ou encore un mélange des deux. M = règle moléculaire, 100–1 000 pb. Colonnes 1–4 = produits de PCR nichée de GP6/MY11 du Gardasil®. Colonne 5 = pas de produits de PCR nichée de GP6/MY11 dans Recombivax HB®. N = témoin négatif (eau) P = témoin positif (ADN du HPV 16).

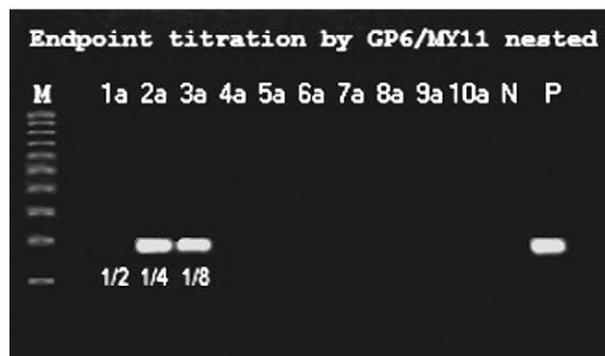


Fig. 3. Titre : PCR nichée de l'ADN du HPV dans des suspensions d'AAHS du Gardasil® diluées en série. Description : l'expérience de dilution en série suggère de l'ADN du HPV lié à des agrégats d'AAHS insolubles. Électrophorèse sur gel des produits de PCR après 10 dilutions doubles en série d'une des 4 suspensions particulières de Gardasil® (Fig. 2) qui ont été utilisées pour initier les PCR primaires respectives. Les facteurs de dilution allaient de 1/2 dans la colonne 1a à 1/1024 dans la colonne 10a. Les résultats n'ont révélé aucune bande de produit de PCR avec échantillon d'un facteur de dilution faible (colonne 1a) suivie de bandes de produits lourds de PCR débutée avec des échantillons de facteurs de dilution plus élevés (colonnes 2a et 3a). Aucune réduction graduelle dans la densité de la bande du produit de PCR dans l'échelle de dilution n'a été observée, suggérant que l'ADN du HPV était lié aux particules d'AAHS en agrégats solides. M = règle moléculaire, 100–1 000 pb. Colonnes 1a–10a = Produits de PCR nichée de GP6/MY11 après que la suspension de particules de AAHS ait été diluée doublement de 1/2 à 1/1024 dans un tampon. N = témoin négatif (eau) P = témoin positif (ADN du HPV 16).

4. Discussion

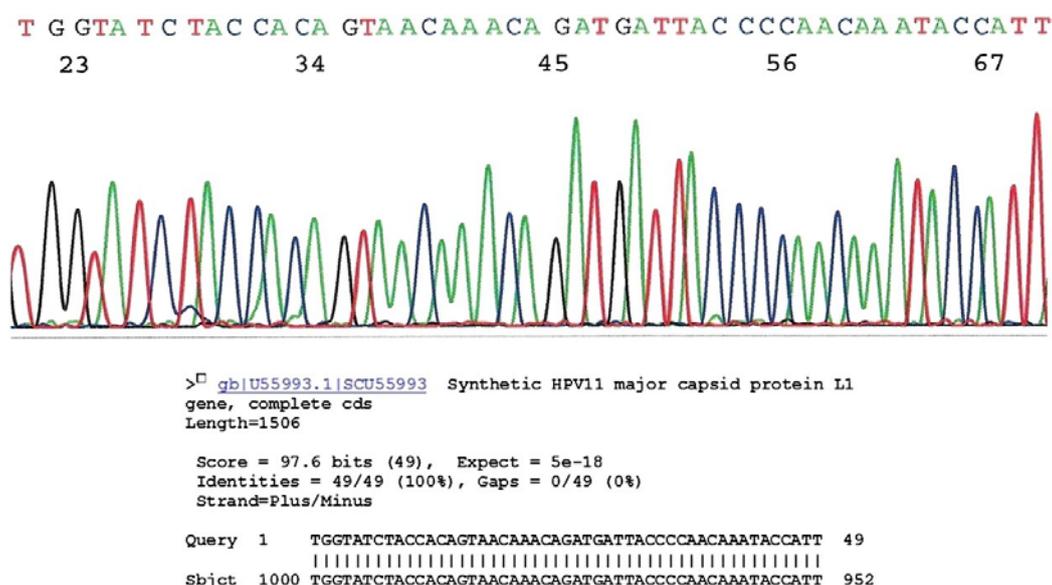
Étant donné que le vaccin quadrivalent contre le HPV, Gardasil®, est produit à l'aide d'une technologie d'ADN recombinant dans laquelle les gènes viraux codant pour les protéines de capsid L1 (4) majeures sont insérées dans du pGAL110 plasmidique pour la transformation des sphéroplastes de levure [5] afin de fabriquer les VLPs désirés spécifiques au génotype, tout ADN résiduel du HPV détecté dans le vaccin représente un fragment ou des fragments de l'ADN viral génétiquement modifié pour la fabrication du vaccin et non un virus auto-répliquant viable.

La présence d'ADN du HPV dans le Gardasil® est une surprise pour la plupart des médecins, car ce vaccin à base protéique a été purifié pour éliminer tout composant contaminant, y compris les ADN viraux et plasmiques, au moyen d'un processus breveté hautement efficace [37]. Selon les spécifications publiées du Gardasil®, les ingrédients actifs du vaccin sont « des particules pseudo-virales (VLPs) hautement purifiées de la protéine de capsid (L1) principale recombinante du HPV des types 6, 11, 16 et 18. Les VLPs ne contenant pas d'ADN viral, elles ne peuvent pas infecter les cellules ou se reproduire [2,3] ».

Cette étude montre que les fragments d'ADN du gène L1 du HPV sont liés aux nanoparticules d'AAHS et ne sont présents ni dans la phase aqueuse, ni dans les VLPs du vaccin Gardasil®, car ils ne sont pas détectables dans le surnageant du vaccin ou dans le surnageant de la protéinase K des précipités du vaccin. Selon la formulation du Gardasil®, les seuls excipients du vaccin insolubles dans l'eau et résistants à la protéinase K sont les précipités d'AAHS choisis par le fabricant et préparés spécifiquement comme adjuvant à base minérale. Il est inconcevable qu'une substance étrangère particulaire non-identifiée et résistante à la protéinase puisse avoir contaminé tous les lots de Gardasil® testés. L'interprétation des résultats de l'étude est étudiée plus en détail ci-dessous.

D'après les informations disponibles dans le domaine public, en plus des VLPs des protéines L1 des HPV 6, 11, 6 et 18, le Gardasil® contient un adjuvant AAHS, du chlorure de sodium, de la L-histidine, du polysorbate 80 (PS-80), du borate de sodium et de l'eau pour l'injection, ceux-ci étant ses excipients [2,3], et un système tampon permettant une variation de pH entre 6,0 et 6,5 [38]. À l'exception des VLPs et de l'adjuvant AAHS, tous les autres excipients énumérés dans la formulation sont des produits chimiques couramment utilisés en laboratoire et réputés pour leur grande solubilité dans l'eau [39]. L'adjuvant AAHS et les VLPs devraient se trouver dans le granulé du vaccin après centrifugation, alors que tous les autres excipients restent dans le surnageant.

Si les fragments résiduels d'ADN du gène L1 du HPV existaient sous forme libre dans la solution aqueuse, comme le sont les excipients solubles dans l'eau dans le vaccin, ils seraient rapidement dégradés par les nucléases présentes dans le sérum après l'injection intramusculaire, puis éliminés par l'organisme de l'hôte (21). Toutefois, une injection intramusculaire de 100 µg d'ADN plasmique libre du gène L1 du HPV-16 chez une souris BALB/C et sans adjuvant entraîne invariablement une forte réponse des lymphocytes T CD8 [27], indiquant que dans certaines conditions, l'ADN non-répliquant du gène L1 du HPV peut activer le système immunitaire.



peuvent se lier par électricité statique aux particules d'AAHS chargées positivement. Toutefois, les fragments d'ADN du gène L1 du HPV dans le vaccin sont détectés dans les précipités digérés par la protéinase K et sont vraisemblablement des nanoparticules d'AAHS ayant été lavées de façon intensive dans un tampon de détergent non-ionique de pH 8,1.

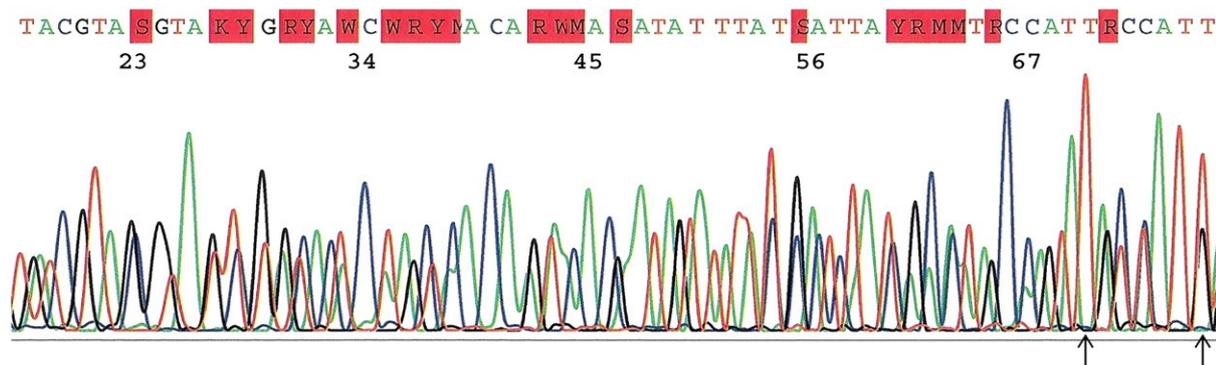


Fig. 6. Titre : courtes séquences cibles de HPV 11 et de HPV 18 mélangés. Description : séquences d'ADN du gène L1 du HPV 11 et du HPV 18 mélangés détectées dans la partie insoluble de l'échantillon de Gardasil® après digestion par la protéinase K et des lavages intensifs. Ceci est l'électrophérogramme du séquençage d'un court fragment d'ADN cible de l'un des produits de PCR nichée en utilisant un amplicon de PCR nichée de GP6/MY11, illustrant deux séquences d'ADN superposées. Sachant que l'amplicon PCR de GP6/MY11 pour l'HPV-11 mesure 181 pb et que l'amplicon de PCR de GP6/MY11 pour l'HPV 18 mesure 187 pb [35], certaines des séquences conservées communes à ces deux génotypes dans cet électrophérogramme composite peuvent être identifiées à deux positions différentes, séparées de six nucléotides. Pour une identification facile, le premier T 5' (en comptant à partir de la droite des courbes colorées) de la terminaison CCATT-5' caractéristique du site de fixation de l'amorce MY11 pour ces deux séquences, est indiqué par une flèche noire. Ces deux T sont séparés exactement de six bases. Puisque de nombreux fragments d'ADN du HPV des deux génotypes étaient solidement liés à toute particule individuelle d'AAHS, il n'a pas été possible d'obtenir un seul fragment d'ADN au moyen de dilutions en série des particules d'AAHS, et ce pour une amplification PCR dans le but de préparer un modèle d'ADN pur pour une réaction de séquençage Sanger.

Tableau 1

Numéros de lot du Gardasil®, pays d'origine et ADN du gène L1 du HPV détecté.

N° de lot	Pays/source	Génotype
1437Z ampoule	États-Unis, Connecticut	HPV 11 HPV 18
1511Z seringue pré-remplie	États-Unis, New York	HPV 18
0553AA ampoule	États-Unis, New Jersey	HPV 11 HPV 18
NL35360 seringue pré-remplie	France	HPV 11 HPV 18
NP23400 seringue pré-remplie	Espagne, Valence	HPV 11 HPV 18
NN33070 seringue pré-remplie	Espagne, Valence	HPV 11 HPV 18
NM25110 seringue pré-remplie	Australie, Sydney	HPV 11 HPV 18
NL01490 seringue pré-remplie	Nouvelle-Zélande, Tauranga	HPV 18
NK16180 seringue pré-remplie	Nouvelle-Zélande, Northland	HPV 18
NK00140 seringue pré-remplie	Nouvelle-Zélande, Tauranga	HPV 11 HPV 18
NM08120 seringue pré-remplie	Nouvelle-Zélande, Christchurch	HPV 11 HPV 18
NL13560 seringue pré-remplie	Nouvelle-Zélande, Wellington	HPV 11 HPV 18
NL39620 seringue pré-remplie	Pologne	HPV 11
NN28160 ampoule	Russie	HPV 11 HPV 18
NL49190 seringue pré-remplie	Bulgarie	HPV 11 HPV 18
NM29390 seringue pré-remplie	Inde	HPV 18

Ce dernier pH est bien supérieur au PZC des nanoparticules d'AAHS et du point isoélectrique de l'ADN. Toute molécule d'ADN initialement liée par électricité statique aux AAHS insolubles aurait été éliminée lors du lavage, car les molécules d'ADN et les particules d'AAHS sont toutes deux chargées négativement à un pH de 8,1, et se repoussent ainsi par électricité statique.

Le mécanisme de liaison le plus probable entre l'ADN du gène L1 du HPV et les nanoparticules d'AAHS dans le Gardasil® est de nature chimique au moyen d'un échange de ligands, remplaçant le phosphate par l'hydroxyle, indépendant des forces électrostatiques [20, 44]. Lorsque l'aluminium (Al³⁺) et l'ADN interagissent, le site de fixation de l'Al³⁺ sur les chaînes d'ADN se situe au niveau des groupes phosphates sur le squelette de l'ADN, et non les bases de la molécule d'ADN [20]. Les complexes aluminium-ADN diffèrent d'autres complexes métal-ADN. Il semblerait qu'il puisse exister plus d'une seule forme d'ADN à tout moment en présence d'aluminium. Les complexes ADN-aluminium formés à des pH différents sont connus pour avoir des profils de fusion d'ADN variables dont seule une portion d'ADN est « stabilisée » ou « dénaturée » [45], ce qui pourrait expliquer le succès de l'amplification des fragments d'ADN du gène L1 du HPV 11 et du HPV 18 en utilisant le MY11, le GP6 et le GP5 comme amorces de PCR, et l'échec de l'amplification avec le MY09 comme amorce de PCR dans la présente étude. Les méthodes biochimiques existantes à base enzymatique ne peuvent pas quantifier l'ADN lié à l'adjuvant aluminique particulière. La quantification du HPV par analyse qPCR implique l'extraction de l'ADN du HPV présent dans le digestat de la protéinase K par phénol/chloroforme [46]. Une telle analyse ne peut être utilisée pour quantifier l'ADN lié à un minéral, qui nécessite une PCR nichée utilisant une ADN-polymérase hautement efficace pour sa détection.

Ce rapport fournit la première preuve qu'une liaison chimique puisse s'être produite entre des fragments d'ADN nu et un adjuvant à base aluminique, formant un complexe très stable dans le vaccin. Cependant, la preuve reste indirecte. Un nouveau complexe chimique tel que celui-ci peut nécessiter des analyses physiques directes de sa structure moléculaire pour une validation finale. Un complexe ADN de HPV et AAHS de nature chimique et protégé dans le cytoplasme des macrophages pourrait expliquer pourquoi des fragments d'ADN du gène L1 du HPV ont été détectés *post mortem* dans le sang et dans les tissus de la rate obtenus suite à une autopsie, après qu'une adolescente ait succombé à une mort soudaine et inattendue six mois après avoir reçu la dernière injection du vaccin Gardasil® (S.H. Lee, manuscrit en préparation basé sur un rapport rendu au médecin légiste de Wellington en Nouvelle-Zélande pour une enquête criminelle menée les 8 et 9 août 2012). Les macrophages chargés de particules d'adjuvants à base aluminique sont connus pour migrer dans le sang depuis le site d'injection intramusculaire du vaccin jusqu'à la rate et d'autres organes [47–49].

Nous pouvons débattre des réponses possibles expliquant le fait que seuls des fragments d'ADN résiduels de HPV 11 et de HPV 18, et aucun fragment d'ADN de HPV 6 et de HPV 16, ont été détectés dans le vaccin quadrivalent contre le HPV dans la présente étude. Premièrement, il est tout à fait possible que la méthode de PCR nichée utilisant les amorces de consensus ne soit pas adaptée à la détection de faibles quantités d'ADN résiduel de résidus de HPV 6 et de HPV 16, alors que les résidus de HPV 11 et de HPV 18 sont présents en quantités faramineuses. Une autre possibilité réside dans le fait que le fabricant du vaccin puisse disposer de procédures plus efficaces pour éliminer des vaccins les résidus d'ADN du HPV 6 et du HPV 16 que pour éliminer les résidus de fragments d'ADN du HPV 11 et du HPV 18. (Note de l'auteur — après la soumission de ce manuscrit, des fragments d'ADN du gène L1 du HPV 16 ont été détectés dans au moins quelques-uns des lots de vaccin Gardasil® en utilisant différents types d'amorces de PCR spécifiques au génotype).

Tous les kits de tests commerciaux existants et tous les protocoles d'analyse de l'ADN du HPV publiés sont conçus pour tester un analyte en solution. Une recherche assidue dans la littérature n'a pas permis de trouver une publication traitant de la détection d'ADN de HPV lié à des particules à base aluminique. Le concepteur [50, 51] et le fabricant [52, 53] du vaccin Gardasil® semblent tous deux se fier fortement à l'utilisation du kit INNO-LiPA [54, 55] pour les tests ADN du HPV. Si cette procédure-ci était utilisée comme outil pour le test des résidus d'ADN du HPV lors de la fabrication du vaccin, il est possible que les résidus de HPV 11 et de HPV 18 non-reconnus soient le résultat d'un échec technique concernant leur détection. Dans une enquête parrainée par l'OMS publiée récemment, 9 des 12 laboratoires utilisant le kit INNO-LiPA se sont révélés incompetents dans la détection des types de HPV testés [56].

Comme présenté dans le Tableau 2, la sonde INNO-LiPA de détection de la séquence d'ADN du HPV 11 immédiatement en aval de la région d'amorce du MY11, est conçue pour détecter des fragments isolés de HPV 11 naturellement présents. À la différence de toutes les variantes connues du HPV 11 isolées chez des patients, la construction synthétique génétiquement modifiée de la protéine codante L1 du HPV 11 utilisée pour la production du vaccin Gardasil® présente 4 bases dépareillées vis-à-vis de la séquence de la sonde au niveau de la région inter-amorce constituée de 22 bases et ciblée pour l'hybridation, pouvant ainsi entraîner l'échec de cette-dernière car la sonde ne correspond pas à la séquence cible. Pour permettre la

détection d'au moins 43 différents génotypes de HPV dans une région constituée d'une séquence de 22 bases, une sonde d'hybridation dépareillée doit être éliminée de la séquence cible par lavage [54].

Tableau 2

Séquences d'ADN dépareillées du HPV 11 et du HPV 18 entre la région cible de l'ADN de HPV dans le Gardasil® et les sondes INNO-LiPA

Cible / sonde Gardasil®	Séquence ADN (22 bases)
ADN de HPV-11 L1 du Gardasil® ^a	CAGATGATT <u>A</u> CCCCA <u>A</u> CAAATA-5'
Sonde INNO-LiPA du HPV-11	CAAGTGGTT <u>T</u> CCCCAGCAAATA-5'
ADN de HPV-18 L1 du Gardasil® ^b	TAATTGATTATGCCAGCAG <u>A</u> TA-5'
Sonde INNO-LiPA du HPV-18 ^c	TAATTGATTATGCCAGCA <u>A</u> CA-5'

^a Le segment inter-amorce de 22 bases de l'ADN du gène L1 du HPV-11 du Gardasil®, sur la droite, peut être amplifié par les amorces de PCR INNO-LiPA conçues pour toutes les variantes d'ADN du HPV anogénital dans cette région du L1. Cependant, le gène viral codant pour la protéine principale de capsid L1 du HPV 11 utilisé pour la production des VLPs du HPV 11 du Gardasil® est une construction synthétique possédant une séquence d'ADN unique dans cette région avec l'emplacement de l'inter-amorce à 978 et 957 sur la carte génique décrite dans GenBank Locus SCU55993. Les quatre bases dépareillées entre la sonde INNO-LiPA du HPV-11 [54] et le HPV 11 du Gardasil® dans cette région sont soulignées.

^b Le segment d'ADN du gène L1 du HPV 18 du Gardasil® amplifié par les amorces de PCR INNO-LiPA correspondent à une séquence inter-amorce de 22 bases localisée de 6573 à 6552 de la carte complète du génome du HPV 18, de type africain, comme décrite dans GenBank Locus EF202155.

^c La sonde INNO-LiPA du HPV 18 [54] est conçue pour cibler la séquence inter-amorce de 22 bases commune à toutes les variantes européennes du HPV 18, par exemple GenBank Locus EF202148, et à toutes les variantes asio-américaines, par exemple GenBank Locus EF202145. Les deux bases dépareillées entre la sonde INNO-LiPA du HPV 18 et le HPV 18 du Gardasil® dans cette région inter-amorce sont soulignées.

Il existe de nombreuses variations de la séquence d'ADN du gène L1 dans le génotype du HPV 18, dont la finalité détermine la composition en acides-aminés de la protéine de capsid principale d'un virion. Une analyse phylogénétique a démontré que tous les HPV 18 isolés peuvent être classifiés en trois sous-types selon l'alignement des séquences d'ADN des variants, c'est-à-dire les sous-types européens, asio-américains et africains [57]. En Europe, il a été rapporté que tous les HPV 18 isolés chez des patients se sont révélés être des variants européens ou asio-américains [58]. Aux États-Unis, 91 % des HPV 18 isolés chez des femmes blanches se sont révélés être des variants européens et asio-américains, et 64 % des HPV 18 isolés chez des femmes américaines d'origine africaine appartiennent aux variants africains [59].

Sachant que la prévalence des variants africains du HPV 18 chez les patients européens est négligeable [58], les chercheurs danois à l'origine du développement du kit INNO-LiPA [54] ont naturellement choisi une sonde de HPV 18 ciblant une séquence homologue commune à tous les variants européens et asio-américains du HPV 18 pour les tests. Toutefois, le gène codant pour la protéine L1 du HPV 18 sélectionné par le fabricant pour la production du Gardasil® est très proche d'un sous-type africain [57, 60]. L'échec de la détection d'une séquence cible d'ADN d'un variant africain du HPV 18 dans le vaccin Gardasil® à l'aide d'une sonde d'hybridation spécifiquement conçue pour l'ADN des variants européens et asio-américains peut simplement refléter la diversité des séquences d'acides-aminés de la protéine L1 au sein du génotype du HPV 18 (Tableau 2).

La conclusion de la présence inattendue de résidus d'ADN du HPV dans un vaccin est à prendre très au sérieux. En plus des mesures d'une précaution extrême prises pour éviter toute amplification possible de séquences d'ADN d'HPV environnant en menant ce projet de recherches, comme décrit dans la section « Expérience », la séquence d'ADN illustrée en Fig. 4 certifie que le modèle ADN de cette séquence est bien tirée du vaccin Gardasil®, car il représente une séquence signature de la construction synthétique du gène L1 du HPV 11 spécifiquement conçue par le fabricant pour la production de ce vaccin. Ce modèle d'ADN du HPV 11 n'existe pas à l'état naturel et ne peut pas provenir d'un échantillon prélevé chez un patient. Dans le laboratoire de l'auteur utilisé par une population de femmes suivies par des gynécologues libéraux, le HPV 18 représente environ 6 % des HPV isolés habituels [33], et environ 80 % des HPV 18 isolés dans les échantillons cliniques appartiennent au sous-type européen/asio-américain (données de l'auteur non-publiées). Tous les fragments d'ADN du HPV détectés dans les échantillons de vaccin autres que ceux de la construction synthétique du HPV 11 sont de sous-type africain du HPV 18. Il est peu probable que les échantillons de vaccins aient été contaminés par seulement un sous-type de HPV si rarement rencontré à l'état naturel.

Une limite principale de cette étude réside dans le fait que seuls 16 échantillons de Gardasil® sélectionnés de façon

aléatoire ont été testés. Les résultats présentés dans ce rapport ne peuvent pas prouver que les vaccins Gardasil® commercialisés autres que ces 16 échantillons contiennent également des fragments d'ADN du HPV 11 et du HPV 18 ; ils n'excluent pas non plus la possibilité que les vaccins Gardasil® du marché mondial puissent contenir des résidus d'ADN du gène L1 du HPV 6 et du HPV 16 en plus des résidus d'ADN du gène L1 du HPV 11 et du HPV 18, ou des résidus d'ADN du plasmide pGAL110 et des cellules de levure utilisés lors de la production des VLPs du HPV.

La formulation du Gardasil® avec un adjuvant AAHS a augmenté de façon significative le pic des titres des anticorps neutralisants chez les mammifères vaccinés au moyen de mécanismes peu compris [61]. Les résultats présentés dans ce rapport supposent que l'ADN résiduel du gène L1 du HPV lié à un adjuvant à base minérale d'aluminium particulaire dans le Gardasil® peut activer les cellules présentatrices d'antigènes ou les macrophages lors d'une réaction immunitaire innée après endocytose, ce qui pourrait avoir joué un rôle important dans l'augmentation de son immunogénicité. Il est connu que le co-transport d'un vaccin à ADN et d'un vaccin protéique avec des sels de phosphate d'aluminium stimule une réponse immunitaire puissante et polyvalente [62]. Cependant, le développement de vaccins à ADN préventifs à usage humain est encore au stade expérimental [63,64]. Les risques potentiels d'un vaccin à ADN peuvent inclure l'intégration d'ADN dans le génome de l'hôte, l'induction d'antigènes anti-ADN [65] et l'activation des macrophages avec libération de cytokines, ainsi qu'un facteur de nécrose tumorale [27, 66].

Pour la production du vaccin Gardasil®, l'ADN du HPV codant pour les protéines L1 de la capsid est inséré dans le plasmide pGAL110 afin de transformer les cellules de levure pour produire des VLPs [5,67,68]. Les systèmes d'expression possibles incluent aussi les cellules de mammifères [69]. La rétention d'ADN recombinant résiduel dans un vaccin à base protéique a fait l'objet d'inquiétudes dans l'industrie sachant que l'induction d'un cancer est un phénomène unicellulaire, et une seule unité fonctionnelle d'ADN étranger intégrée au génome de la cellule hôte peut servir à induire des transformations, qu'il s'agisse d'un événement unique ou d'une partie d'une série d'événements multifactoriels [70]. L'intégration chromosomale d'ADN étranger peut se produire suivant des mécanismes peu connus [71, 72] avec des conséquences incertaines [73]. L'impact sur le court et le long terme de fragments résiduels d'ADN plasmique ou d'ADN du gène L1 du HPV en cas de liaison à l'aluminium minéral des nanoparticules d'AAHS est largement inconnue et justifie des recherches plus approfondies.

5. Conclusion :

Des fragments résiduels d'ADN du gène L1 du HPV sont présents dans le vaccin quadrivalent à base protéique contre le HPV. Ces fragments d'ADN se révèlent être solidement liés aux particules insolubles d'adjuvant AAHS. La signification clinique de ces fragments résiduels d'ADN du HPV liés à l'AAHS est incertaine après une injection intramusculaire, et nécessite des recherches plus approfondies pour la sécurité de la vaccination.

Conflits d'intérêts

Cette étude a été parrainée et réalisée pour le compte de SANEVAX, Inc. pour une rémunération future n'excédant pas un dollar U.S.

Remerciements

L'auteur remercie M^{lle} Veronica S. Vigliotti et M^{lle} Jessica S. Vigliotti pour le temps technique et professionnel extrêmement précieux qu'elles ont accordé pour aider à achever ce projet.

Titre Original : *Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil®*

Traduction : *Pour E3M - Héloïse Marguier et Isabelle Meyer, traductrices diplômées en Traductions Scientifiques et Techniques - heloise.marquier@gmail.com; izabela_viata@hotmail.fr*

Références

- [1] <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/QuestionsaboutVaccines/ucm096052.htm>.
- [2] P.L. McCormack, E.A. Joura, *Drugs* 70 (2010) 2449–2474.
- [3] http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/sbd_smd_2007_gardasil_102682-eng.pdf.

- [4] PHARMEUROPA: Human Papillomavirus vaccine (rDNA), vol. 21, No. 3, July 2009. page 418.
- [5] J.T. Bryan, Vaccine 25 (2007) 3001–3006.
- [6] <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM235889.pdf>.
- [7] <http://www.cdc.gov/vaccinesafety/vaccines/hpv/gardasil.html>.
- [8] J.M. Brotherton, M.S. Gold, A.S. Kemp, A.S. Kemp, P.B. McIntyre, M.A. Burgess, S. Campbell-Lloyd, CMAJ 179 (2008) 525–533.
- [9] http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf.
- [10] I. Sutton, R. Lahoria, I. Tan, P. Clouston, M. Barnett, Mult. Scler. 15 (2009) 116–119.
- [11] B. Wildemann, S. Jarius, M. Hartmann, J.U. Regula, C. Hametner, Neurology 72 (2009) 2132–2133.
- [12] Z. Mendoza Plasencia, M. González López, M.L. Fernández Sanfiel, J.R. Muñoz Montes, Neurologia 25 (2010) 58–59.
- [13] J. Chang, D. Campagnolo, T.L. Vollmer, R. Bompreszi, J. Neurol, Neurosurg. Psychiatry 82 (2011) 1296–1298.
- [14] F.J. DiMario Jr., M. Hajjar, T. Ciesielski, J. Child, Neurology 25 (2010) 321–327.
- [15] G. Balamoutsos, M. Bouktsi, M. Paschalidou, N. Tascos, I. Milonas, Abstract No. P297, www.guthyjacksonfoundation.org/services/download.php?2297.pdf+374.
- [16] M. Rossi, C. Bettini, C. Pagano, J. Med. Cases 2 (2011) 222–224.
- [17] <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm276859.htm>.
- [18] M. Pawlita, M. Müller, M. Oppenländer, H. Zentgraf, M. Herrmann, J. Virol. 70 (1996) 7517–7526.
- [19] L.F. Pease III, D.L. Lipin, D.H. Tsai, M.R. Zachariah, L.H. Lua, M.J. Tarlov, A.P. Middelberg, Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 845–855.
- [20] R.-Y. Zhang, Y. Liu, D.-W. Pang, R.-X. Cai, Y.-P. Qi, Anal. Sci. 18 (2002) 761–766.
- [21] R. Schubbert, D. Denz, B. Schmitz, W. Doerfler, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 961–966.
- [22] Y. Seow, M.J. Wood, Mol. Ther. 17 (2009) 767–777.
- [23] S. Peng, B. Ma, S.H. Chen, C.F. Hung, T. Wu, Cell Biosci. 1 (2011) 26.
- [24] E.B. Lindblad, Immunol. Cell Biol. 82 (2004) 497–505.
- [25] L.S. Burrell, C.T. Johnston, D. Schulze, J. Klein, J.L. White, S.L. Hem, Vaccine 19 (2000) 275–281.
- [26] L.S. Burrell, C.T. Johnston, D. Schulze, J. Klein, J.L. White, S.L. Hem, Vaccine 19 (2000) 282–287.
- [27] M.J. Caulfield, L. Shi, S. Wang, B. Wang, T.W. Tobery, H. Mach, P.L. Ahl, J.L. Cannon, J.C. Cook, J.H. Heinrichs, R.D. Sitrin, Hum. Vaccines 3 (2007) 139–146.
- [28] S. Manam, B.J. Ledwith, A.B. Barnum, P.J. Troilo, C.J. Pauley, L.B. Harper, T.G. Griffiths II, Z. Niu, L. Denisova, T.T. Follmer, S.J. Pacchione, Z. Wang, C.M. Beare, W.J. Bagdon, W.W. Nichols, Intervirology 43 (2000) 273–281.
- [29] M.P. Nepper, K.J. Hofmann, K.U. Jansen, Gene 180 (1996) 1–6.
- [30] S.H. Lee, V.S. Vigliotti, J.S. Vigliotti, S. Pappu, Infect. Agent Cancer 2 (2007) 11.
- [31] S.H. Lee, V.S. Vigliotti, S. Pappu, Int. J. Gynaecol. Obstet. 105 (2009) 210–214.
- [32] S.H. Lee, V.S. Vigliotti, S. Pappu, BMC Women's Health 9 (2009) 8.
- [33] S.H. Lee, V.S. Vigliotti, J.S. Vigliotti, S. Pappu, BMC Clin. Pathol. 9 (2009) 3.
- [34] S.H. Lee, V.S. Vigliotti, S. Pappu, J. Clin. Pathol. 63 (2010) 235–239.
- [35] S.H. Lee, Methods Mol. Biol. 903 (2012) 65–101.
- [36] http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/r/recombivax_hb/recombivax_pi.pdf.
- [37] US Patent #6,602,697.
- [38] US Patent #6,251,678.
- [39] The Merck Index, 8th edition Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. USA, 1968.
- [40] H. Mach, D.B. Volkin, R.D. Troutman, B. Wang, Z. Luo, K.U. Jansen, L. Shi, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 2195–2206.
- [41] J. Forstová, N. Krauzewicz, V. Sandig, J. Elliott, Z. Palková, M. Strauss, B.E. Griffin, Hum. Gene Ther. 6 (1995) 297–306.
- [42] H. Zhang, R. Fayad, X. Wang, D. Quinn, L. Qiao, J. Virol. 78 (2004) 10249–10257.
- [43] N. Mistry, C. Wibom, M. Evander, Virol. J. 5 (2008) 118.
- [44] S. Iyer, H. HogenEsch, S.L. Hem, Pharm. Dev. Technol. 8 (2003) 81–86.
- [45] S.J. Karlik, G.L. Eichhorn, P.N. Lewis, D.R. Crapper, Interaction of aluminum species with deoxyribonucleic acid, Biochemistry 19 (1980) 5991–5998.
- [46] C. Constandinou-Williams, S.I. Collins, S. Roberts, L.S. Young, C.B. Woodman, P.G. Murray, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 19 (2010) 832–837.
- [47] R.K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P.A. Dreyfus, J.F. Pellissier, P. Chariot, F.J. Authier, Brain 124 (2001) 1821–1831.
- [48] C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.J. Authier, Med. Hypotheses 72 (2009) 135–139.
- [49] R.K. Gherardi, F.J. Authier, Lupus 21 (2012) 184–189.

- [50] P.E. Castle, C. Porras, W.G. Quint, A.C. Rodriguez, M. Schiffman, P.E. Gravitt, P. González, H.A. Katki, S. Silva, E. Freer, L.J. Van Doorn, S. Jiménez, R. Herrero, A. Hildesheim, *J. Clin. Microbiol.* 46 (2008) 3437–3445.
- [51] https://www.fbo.gov/index?s=opportunity&mode=form&id=da396b97ad6eb7ec4f7d511f85d9e325&tab=core&_cvview=0.
- [52] T. Iftner, L. Germ, R. Swoyer, S.K. Kjaer, J.G. Breugelmans, C. Munk, F. Stubenrauch, J. Antonello, J.T. Bryan, F.J. Taddeo, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009) 2106–2113.
- [53] E.A. Else, R. Swoyer, Y. Zhang, F.J. Taddeo, J.T. Bryan, J. Lawson, I. Van Hyfte, C.C. Roberts, *J. Clin. Microbiol.* 49 (2011) 1907–1912.
- [54] B. Kleter, L.-J. van Doorn, J. ter Schegget, L. Schrauwen, K. van Krimpen, M. Burger, B. ter Harmsel, W. Quint, *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 1731–1739.
- [55] D. van Hamont, M.A.P.C. van Ham, J.M.J.E. Bakkens, L.F.A.G. Massuger, W.J.G. Melchers, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 3122–3129.
- [56] C. Eklund, O. Forslund, K.L. Wallin, T. Zhou, J. Dillner, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 2289–2298.
- [57] W. Lurchachaiwonga, P. Junyangdikule, W. Termrungruanglertb, S. Payungporn, P. Sampatanukulc, D. Tresukosolb, S. Niruthisardb, P. Trivijitsilpb, A. Karalakf, S. Swangvareeg, Y. Poovorawana, *Intervirology* 53 (2010) 161–166.
- [58] M.A. De Boer, L.A.W. Peters, M.F. Aziz, B. Siregar, S. Cornain, M.A. Vrede, E.S. Jordanova1, G.J. Fleuren, *Int. J. Cancer* 114 (2005) 422–425.
- [59] L.F. Xi, N.B. Kiviat, A. Hildesheim, D.A. Galloway, C.M. Wheeler, J. Ho, L.A. Koutsky, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 1045–1052.
- [60] US patent #5,820,870.
- [61] W. Ruiz, W.L. McClements, K.U. Jansen, M.T. Esser, *J. Immune Based Ther. Vaccines* 3 (2005) 2.
- [62] M. Kwissa, E.B. Lindblad, R. Schirmbeck, J. Reimann, *J. Mol. Med.* 81 (2003) 502–510.
- [63] C.-F. Hung, A. Monie, R.D. Alvarez, T.-C. Wu, *Exp. Mol. Med.* 39 (2007) 679–689.
- [64] <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm074770.htm>.
- [65] R.G. Webster, H.L. Robinson, *BioDrugs* 8 (1997) 273–292.
- [66] T. Sparwasser, T. Miethke, G. Lipford, A. Erdmann, H. Häcker, K. Heeg, H. Wagner, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 1671–1679.
- [67] K.J. Hofmann, J.C. Cook, J.G. Joyce, D.R. Brown, L.D. Schultz, H.A. George, M. Rosolowsky, K.H. Fife, K.U. Jansen, *Virology* 209 (1995) 506–518.
- [68] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000703/WC500021140.pdf.
- [69] US patent #7,494,787.
- [70] M.R. Hilleman, *J. Med. Virol.* 31 (1990) 5–12.
- [71] H. Würtele, K.C. Little, P. Chartrand, *Gene Ther.* 10 (2003) 1791–1799.
- [72] E. Milot, A. Belmaaza, J.C. Wallenburg, N. Gusew, W.E. Bradley, P. Chartrand, *EMBO J.* 11 (1992) 5063–5070.
- [73] W. Doerfler, R. Schubbert, H. Heller, C. Kämmer, K. Hilger-Eversheim, M. Knoblauch, R. Remus, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 297–301.