

Vincent VANDE VELDE

Docteur en Sciences Chimiques, VVV Scientific Consultancy,  
v.vandeveld@outlook.com

# Alternatives to aluminium adjuvants for vaccines : a chemist's point of view

## Résumé

*Afin d'accélérer la recherche de meilleures formulations d'adjuvants vaccinaux, cet article passe en revue les propriétés physiques et chimiques d'une sélection de sels inorganiques. Leur disponibilité en termes d'approvisionnement industriel, leur coût, leur stabilité, leur fenêtre de pH de solubilité et d'insolubilité dans l'eau, leurs mesures de la charge superficielle des particules et leurs propriétés hydrophobes, leurs possibilités d'échange anionique, leur compatibilité avec les antigènes, leur capacité d'adsorption, leurs possibilités de pénétration dans la membrane des cellules immunitaires et leur biodégradabilité sont des facteurs clés à prendre en considération dans l'évaluation précoce des nouveaux candidats adjuvants vaccinaux. La réponse immunitaire et sa modulation possible semblent être liées à plusieurs propriétés cumulatives et émergentes inhérentes à la formulation des adjuvants vaccinaux.*

## Abstract

*To expedite the search for better vaccine adjuvant formulations, the physical and chemical properties of selected inorganic salts are reviewed in this article. Availability in terms of industrial supply, cost, stability, water solubility and insolubility pH window, particle surface charge measurements and their hydrophobic properties, anionic exchange possibilities, antigens compatibility, adsorption capacity, immune cell membrane penetration possibilities, and biodegradability are key factors to be considered in the early evaluation of new vaccine adjuvant candidates. The immune response and its possible modulation seem to be related to several cumulative and emergent properties inherent to the formulation of vaccine adjuvants.*

## Key words

*Hydroxide, Fluoride, Phosphate, Al, Ca, Mg, Zn, vaccine adjuvant.*

## 1. Introduction

Enfiler son tablier de labo : c'est « *revêtir son habit de lumière* » ; c'est comme, rentrer en piste sous les feux de la rampe, et présenter son *numéro d'artiste*. Car, oui, la chimie est bel et bien *un art*. Ne trouve-t-on pas dans de nombreux brevets la phrase « ... en suivant la technique bien connue de l'homme de l'art... » ?

Tout l'art du chimiste formulateur consiste de maîtriser les *propriétés émergentes* du mélange: celles qui font que cela va mieux. C'est comme le jardinier qui *rassemble les plantes amies* pour une meilleure récolte, comme le cuisinier étoilé qui sait *mariar les aliments*; ou bien comme le parfumeur où d'un mélange d'essences soudain *émerge* une senteur extraordinaire. Les connaissances de ces propriétés émergentes restent souvent cachées au fond du savoir-faire acquis par les anciens tout au long de leur vie professionnelle, et ne se transmettent que très discrètement en interne aux collègues successeurs (comme par exemple la recette du célèbre soda rouge, du lubrifiant rouge et bleu pour chaîne de vélo, ou d'une liqueur verte d'un montagnard monastère).

Cependant, quand il s'agit du domaine de la santé humaine, il y a grand intérêt à faire toute la lumière sur ces effets émergents, à tenter de comprendre pourquoi ils apparaissent, et surtout à partager ce savoir. Par exemple, dans la fabrication d'un vaccin, la *formulation* est l'étape où l'on rassemble le principe actif (l'antigène), les excipients, les tampons, les stabilisants, et quelques fois l'adjuvant, ce composé indispensable pour augmenter la réponse immunitaire, et donc considéré ici, dans ce texte, comme le responsable de l'effet émergent de la formule vaccinale.

Depuis 1926 [1], en un siècle d'utilisation, nos connaissances sur les *propriétés émergentes (tant positives que négatives)* des adjuvants vaccinaux aluminiques, ont beaucoup évolué et ce principalement grâce à :

- L'établissement, en 1993, du *Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS)* [2] qui, aux Etats-Unis, permet, à tout un chacun, à la fois de signaler un problème ou bien de consulter cette importante base de données.
- Les progrès dans les protocoles d'analyse chimique de l'aluminium [3] qui est un élément particulièrement difficile à doser avec justesse et précision.
- L'utilisation des "*Big-Data*" [4] permettant l'accès à un très large volume d'informations.
- Le "*pouvoir de l'image*" dans la microscopie confocale avec l'utilisation des marqueurs fluorescents [5].
- Les modèles informatiques utilisés pour la toxicocinétique de l'aluminium [6] permettant d'augmenter nos connaissances sans devoir les expérimenter en direct sur l'humain.
- L'intérêt et la curiosité pour des approches transversales interdisciplinaires. Par exemple, l'effet de l'aluminium sur le matériel biologique est connu depuis longtemps dans le domaine du tannage des peaux [7] et ne devrait donc pas être ignoré en cas d'injection.

Les sources de contaminations humaines par l'aluminium sont nombreuses (mais pourraient sans doute être évitées) : environnement, cosmétiques, tatouages, nourritures, ustensiles de cuisine, et cuisson sous feuille d'aluminium (*truites aux petits légumes en papillote* : quel désastre !).

En même temps, les progrès réalisés dans les domaines de l'immuno-toxicologie et de la neuro-toxicologie continuent de mettre en lumière le potentiel, jusqu'alors méconnu et/ou sous-estimé, des adjuvants vaccinaux à déclencher divers effets secondaires [8-13]. Voilà pourquoi, sans vouloir dénigrer les bénéfices incontestés des vaccins, nombreux sont les chimistes cherchant une alternative aux adjuvants aluminiques: un problème apparemment simple mais qui reste cependant loin d'être résolu ! Dans l'espoir que les jeunes générations poursuivront le travail, voici quelques pistes de réflexions pouvant devenir pertinentes à certains stades de leurs recherches.

## 2. Propriétés Physico-Chimiques d'un adjuvant idéal.

Comme les vaccins prophylactiques s'adressent à des personnes saines, leurs toxicités doivent donc être irréprochables. Il ne s'agit plus de mettre en balance les effets bénéfiques versus leurs inconvénients, comme c'est le cas pour la plupart des produits pharmaceutiques.

Simplement d'un point de vue logistique, l'industrie devrait choisir un adjuvant réalisé au départ d'un matériel suffisamment disponible et surtout présentant un prix attractif afin de pouvoir subvenir à la population mondiale.

La plupart des matériaux construits à base de polymères organiques synthétiques ne conviennent pas pour des applications vaccinales. En effet, leurs propriétés mécaniques dépendent des faibles forces d'interaction entre les chaînes polymériques (mesurables par leur température de transition vitreuse). Or, pour obtenir des propriétés mécaniques intéressantes ces chaînes doivent être longues et ramifiées, et forcément leurs poids moléculaires, devenant importants, seront rapidement trop élevés pour être éliminés par le filtre des reins, dont les limites sont aux alentours de seulement 3000 Daltons. Par contre, certains sels inorganiques, dont leurs propriétés mécaniques sont dues à des forces ioniques fortes (mesurables par leur température de fusion), seront plus avantageux pour former des particules solides et aussi plus intéressants sur le plan de leurs éliminations du corps humain.

Le matériel choisi devrait posséder une bonne stabilité (3 ans), être présenté sous forme d'une suspension aqueuse dont la granulométrie des particules doit être compatible avec les injections intramusculaires (idéalement dans l'ordre des 100 nm), biocompatible dans le milieu interstitiel intramusculaire (typiquement:  $\text{Na}^+$  145 mM,  $\text{K}^+$  4 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM,  $\text{Cl}^-$  117 mM), et être biodégradable : c'est-à-dire éliminable du corps dès que possible après la construction de la réponse immune. Cette réponse est généralement obtenue en trois semaines après l'injection, si bien qu'il est raisonnable d'exiger une élimination de l'adjuvant dans le mois qui suit la vaccination. Ceci est en contraste avec les nombreux mois nécessaires pour l'élimination de certains sels aluminiques [12,14].

La présence de charges positives (généralement portées par le cation) est avantageuse pour l'adsorption des antigènes via leurs charges négatives. Dans ce cas, le rapport des masses Cation/Anion devra être le plus grand possible afin de maximiser la charge positive par unité

de masse ( $\text{CaF}_2$  sera mieux que  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). L'antigène adsorbé sur l'inorganique lui confère un précieux regain de stabilité. Cependant, cette adsorption devra se faire en utilisant les forces électrostatiques plutôt que par les forces d'échanges ioniques (qui quelquefois fixent irréversiblement l'antigène et dès lors inhibent la réponse immunitaire). Dans cette optique, pour assurer la pression iso-osmotique de l'injectable, un sucre (non réducteur pour minimiser les réactions de Maillard) ou un petit polyol est préféré à l'utilisation du chlorure de sodium, celui-ci favorisant la désorption de l'antigène dans le mode électrostatique.

Le produit de solubilité du candidat adjuvant doit être judicieusement sélectionné : d'une part, relativement soluble pour permettre son élimination par les voies naturelles, tout en étant d'autre part, suffisamment peu soluble afin de minimiser la force ionique en équilibre dans son surnageant et qui pourrait parfois dégrader l'antigène lui-même (phénomène identique au « salting out » utilisé lors de la purification des protéines). Les phosphates et carbonates alcalino-terreux semblent de prime à bord favorables, mais se révèlent souvent trop peu solubles pour les premiers et pour les seconds en concurrence avec les 23 mM bicarbonate présents dans le liquide interstitiel. L'hydroxyde de magnésium, beaucoup moins soluble que son correspondant calcium, devient malheureusement soluble aux pH inférieurs à 8,3 et dès lors ne formera plus de particules lorsqu'il sera placé dans le liquide interstitiel.

Les propriétés hydrophobiques des particules semblent importantes si l'on désire traverser les bicouches phospholipidiques des cellules. En effet, *in fine* le cargo Antigène/Adjuvant devrait pénétrer dans les cellules dendritiques pour y être phagocyté ; et ainsi permettre à l'antigène d'être débité par le milieu acide et le contenu enzymatique des lysosomes, afin que les épitopes intéressants puissent être présentées aux cellules présentatrices du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, ce qui constitue la première étape pour enclencher la réponse immunitaire [15]. Les valeurs d'hydrophobicités

des principaux inorganiques naturels sont bien documentées par les minéralogistes qui s'en servent pour la séparation des minerais par les techniques de flottation; il est donc facile de s'en inspirer pour choisir un matériel adéquat présentant de préférence un angle de contact  $\theta$  le plus élevé possible ( $\text{CaCO}_3$   $\theta \sim 0^\circ$ ,  $\text{CaF}_2$   $\theta \sim 10^\circ$  [16] et pour certains  $\text{ZnO}$   $\theta \sim 100^\circ$ [17]).

La fenêtre de pH dans laquelle les particules resteront insolubles est capitale: d'un côté, insolubles au pH interstitiel de 7,3 ; et de l'autre côté, ne se dissolvant que dans les lysosomes (pH  $\approx$  4-5). Le chimiste observateur aura bien vu que dans ce milieu intracellulaire la composition a changé (typiquement:  $\text{Na}^+$  10 mM,  $\text{K}^+$  140 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  58 mM,  $\text{Cl}^-$  4 mM) ; ce qui lui donne l'occasion de fabriquer éventuellement des précipités sensibles à ces changements ioniques, afin d'espérer la livraison ciblée de l'antigène à l'intérieur des cellules immunitaires. Plus précisément, des précipités sensibles aux changements du rapport des concentrations  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ou  $\text{Mg}^{2+}/\text{Cl}^-$  seraient les bienvenus. Pour trouver cela, il est très enrichissant de faire des mesures de détermination de la charge des particules qui révéleront l'évolution de cette charge en fonction de son environnement. La titration potentiométrique, tel que décrite par Feldkamp [18], réalisée initialement en milieu aqueux et ensuite comparée à celles obtenues en présence d'électrolytes [Figure 1], est un

outils précieux permettant de connaître les ions qui, adsorbés en surface des particules, en influencent leurs charges. Comme dans le travail de Pyman [19] et plus tard dans celui de Lyklema [20], parce qu'à la fois les cations et les anions sont spécifiquement adsorbés sur les particules, chacun d'entre eux contribue à sa charge globale. Le pH correspondant au *point d'égale compensation des charges* peut ainsi être trouvé en réalisant des mesures successives en milieu cationique constant ( $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ...) pour y trouver l'anion le plus indifférent; et de manière similaire des mesures en milieu anionique constant ( $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ...) permettent de trouver le cation le plus indifférent. Dès lors, ces mesures, réalisées simplement avec un pH-mètre, permettent aussi de connaître, par la même occasion, les ions adsorbés considérés dès lors comme non-indifférents ; c'est-à-dire ceux qui pourront faire varier la charge de particules en fonction du pH du milieu dans lequel ils baigneront [Figure 2]. Poursuivant les mesures avec des milieux d'électrolytes appropriés (semblables à la composition interstitielle et ensuite intracellulaire), il est ainsi possible d'anticiper le comportement des particules Antigène/Adjuvant dans les environnements successifs allant depuis celui de la seringue d'injection vers celui du liquide interstitiel et ensuite vers celui, souhaité, du milieu intracellulaire.

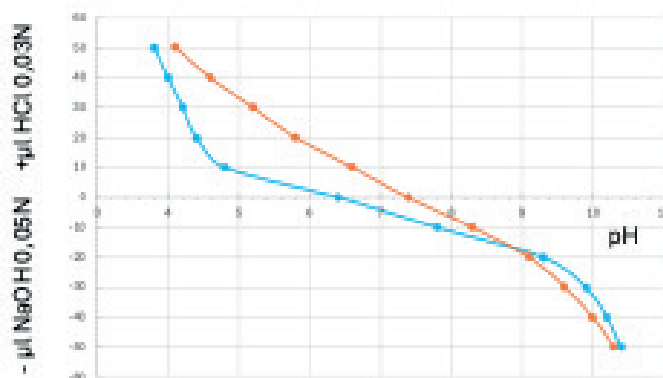


Figure 1: En présence de particules, les courbes de titration réalisées l'une en  $\text{H}_2\text{O}$  et l'autre en présence d'électrolyte (par exemple de  $\text{KNO}_3$ , 3M) ne sont pas identiques. Le croisement de ces courbes indique le P.E.C.C. (ici 8,8). En ce point, la présence d'électrolyte n'a plus d'influence sur la valeur du pH car les charges globales des particules se compensent. Au pH  $<$  8,8 les particules sont chargées positivement et inversement au pH  $>$  8,8.

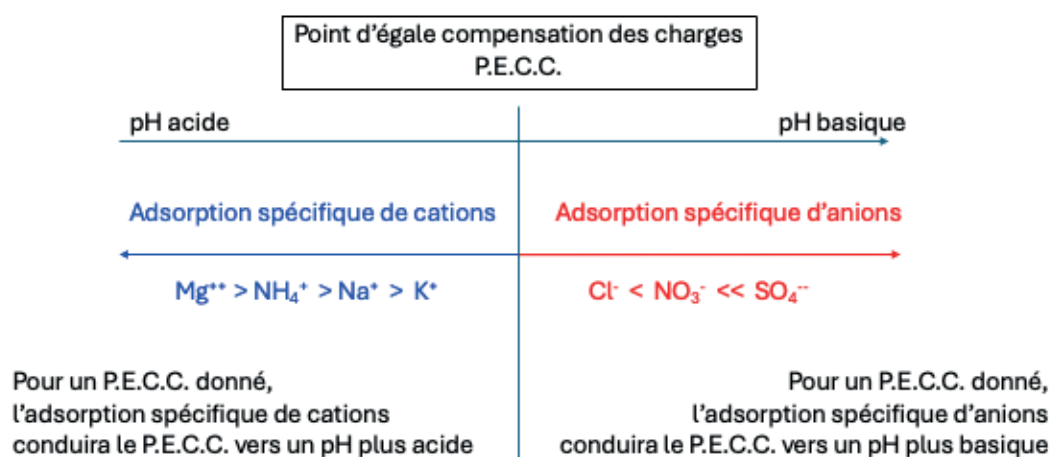


Figure 2: Influence des ions adsorbés sur le point d'égal compensation des charges (P.E.C.C.)

Quant à la précipitation des nanoparticules elles-mêmes, celle-ci se fera évidemment en milieu aseptique, sous un pH proche du *point d'égal compensation*, car c'est souvent là que sa solubilité se montre la plus faible. Le rendement le plus élevé de la précipitation s'obtient en se plaçant à un pH correspondant au pKa de l'anion entrant [21]. Bien sûr, durant ces précipitations un grand champ de possibilités reste ouvert (concentrations de départ, nature et influence des contre-ions, du tensio-actifs, de la base-retard, de la vitesse d'ajout, du temps de maturation, etc.). Par exemple différentes formes cristallines d'oxyde de zinc (allongées tel un grain de riz, en bâtonnets, en tétrapodes, ou en agrégats) sont obtenues en fonction du type de tensio-actifs et de stabilisants utilisés durant leurs précipitations [22-23]. Plus faibles seront les concentrations de départ et plus petite sera la granulométrie initiale des particules formées. Plus faibles seront les volumes additionnés et plus étroite sera la polydispersité des particules obtenues. L'utilisation de pompes linéaires (type pousse seringue) et d'une chambre de mélange configurée en Y est aussi souvent avantageuse sur le plan de la reproductibilité car elle maintient le rapport des volumes initiaux des mélanges constant tout au long de la précipitation et facilitera donc aussi une future montée en échelle.

D'un point de vue analytique, tout instrument, combinant une séparation de la suspension en même temps qu'une mesure, est incontournable pour une bonne caractérisation des préparations : par exemple STEP-Technology® (Space + Time resolved Extinction Profiles) développé par LUM-GmbH® où la séparation est accélérée par centrifugation ; ou d'autre comme Turbiscan® où la sédimentation est naturelle.

Puis viendra le temps de la formulation en elle-même. Faites attention à l'ordre des ajouts (gardez l'antigène pour la fin). Faites vos dilutions avec le surnageant du précipité adjuvant (quitte à devoir en sacrifier une partie de celui-ci). Peut-être sera-t-il préférable d'éviter un tampon phosphate, auquel cas un TRIS-Maléate-Na fera probablement l'affaire.

### 3. Quelques Adjuvants alternatifs potentiels

La variété de gel de calcium phosphate proposé par Relyveld [24], et caractérisé par Jiang et al. [25] comme une hydroxyapatite non-stoechiométrique  $[Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}]$  (avec x variant de 0 à 2), et utilisé principalement en France durant plusieurs années dans les vaccins commerciaux Diphtérie Tétanos Polio, a été retiré du marché en 2008. Il pourrait donc être tentant d'y revenir. Mais les autorités ne vont-elles pas demander de nouvelles études de

toxicité réalisées aux normes actuelles (double étude : l'une concernant l'adjuvant seul, et l'autre concernant le tandem Antigène/Adjuvant).

Cependant, son utilisation comme adjuvant avec des antigènes issus de protéines recombinantes ne semble pas fournir l'effet émergent espéré [26].

Plusieurs antigènes adsorbés sur des nanoparticules de fluorure de calcium ont donné des résultats intéressants en études animales [26]. Risqué serait cependant de sous-estimer la capacité d'échange de leurs fluorures en présence d'ions  $Al^{3+}$ , générant ainsi des composés de type fluorure d'aluminium, fort solubles en phase aqueuse et malheureusement connus pour leurs bonnes performances à traverser la barrière hémato-encéphaliques (ce qu'il faut bien s'assurer d'éviter dans le contexte d'un vaccin).

B. Dieter [27] rapporte l'utilisation d'un mélange de particules d'hydroxyde de zinc et de fer en présence de lécithine comme adjuvant pour un virus inactivé. Comme pour tous les virus inactivés, puisqu'ils ne se reproduisent pas *in vivo*, il faut leur adjoindre un adjuvant. Bien que breveté depuis 1993, à notre connaissance, il ne semble pas y avoir eu de vaccins humains commerciaux bénéficiant de cette invention.

L'école de Ivanovski [28-30] suggère d'utiliser l'hydroxyde, le sulfate ou le phosphate de zinc pour obtenir une alternative aux adjuvants aluminiques. Selon ces auteurs la dose vaccinale de zinc à utiliser serait nettement inférieure au niveau d'alerte de toxicité du zinc chez l'humain; et le zinc serait favorable pour la prévention de la neurotoxicité de l'aluminium (argument particulièrement intéressant dans ce contexte).

Chez l'humain, l'ion  $Zn^{2+}$  ne s'accumule pas ; il faut donc constamment en adsorber via l'alimentation pour assurer son homéostasie. La concentration en zinc est  $\mu M$  dans le milieu extracellulaire,  $nM$  dans le cytosol,  $pM$  dans le réticulum endoplasmique, et  $sub-pM$  dans les corps de Golgi [31].

Lors d'une infection bactérienne la ressource en zinc de l'hôte entre en forte compétition avec les

besoins en zinc du pathogène : il en résulte une bataille extrêmement sophistiquée où l'évolution a donné maintes fois à chacun des parades pour détourner la précieuse ressource en zinc à son profit [32]. Encore faudrait-il que dans cette orchestration biologique la quantité additionnelle de particules de zinc éventuellement donnée en tant qu'adjuvant d'un vaccin ne revienne pas en faveur du développement de la bactérie infectante (tout un nouveau domaine d'études à entreprendre).

Il convient de noter qu'outre la production d'anticorps, une réponse vaccinale efficace nécessite également l'induction de fortes réponses immunitaires cellulaires.

Matsumura et collègues utilisent des particules d'oxyde de zinc et rapportent une réponse immune de type Th2 chez la souris [33]. Ces résultats sont confirmés en 2014 par l'équipe de Roy [34] indiquant une formation d'anticorps OVA spécifiques IgG1 et IgE significativement augmentée lorsque l'antigène OVA est coadministré avec des particules d'oxyde de zinc d'une taille inférieure à 50 nm. Ces résultats sont décevants, car pour créer de la mémoire le vaccin doit favoriser une réponse immune plus équilibrée en faveur des cellules de type Th1.

*(Note de la rédaction : pour les sigles et abréviations, voir à la fin de l'article)*

Le brevet de Zhao et al. [35] énumère une liste de brevets antérieurs décrivant l'utilisation de particules de  $Zn(OH)_2$  comme adjuvant, générant tous un niveau d'anticorps supérieur à celui d'adjuvant aluminique. Une combinaison particulière de  $Zn(OH)_2$  et d'acide zolédronique y est revendiquée afin d'obtenir une réponse Th1/Th2 équilibrée. Cependant, l'introduction d'un principe actif pharmaceutique utilisé pour soigner l'ostéoporose dans la composition d'un vaccin est-elle vraiment une bonne idée ? N'y aurait-il donc pas d'autres sels de zinc plus acceptables et susceptibles d'influencer la balance Th1/Th2 ?

On touche ici au cœur du problème: que faut-il faire pour obtenir une réponse immunitaire de type Th1 afin de créer un effet mémoire

prolongé et avoir ainsi un adjuvant se distinguant des hydroxyde et phosphate d'aluminium qui généralement favorisent une réponse immune de type Th2 ?

Basée sur un grand nombre de données, P. Bretscher [36] suggère que la formation des cellules Th1 et Th2 serait dépendante de trois variables:

- i) De la nature de l'antigène (bien sûr ça c'est un minimum ; il faut les bons épitopes : ces séquences spécifiques d'une dizaine d'acides aminés construites le long de la chaîne peptique de l'antigène)
- ii) Pour les antigènes étrangers, la formation des cellules Th1 et Th2 pourrait dépendre de la dose administrée (une faible dose favoriserait donc une réponse de type Th1 plutôt que Th2)
- iii) Le temps passé après l'immunisation est la troisième variable (généralement les cellules Th1 se développent en priorité, et avec le temps souvent la réponse évolue vers un contenu Th2 plus important).

Si l'on suit cette hypothèse, il y aurait avantage à donner une faible dose d'adjuvant afin que celui-ci soit éliminé rapidement. Ceci semble contre intuitif car on croit souvent qu'un effet dépôt est nécessaire et qu'au plus il y a d'adjuvant au mieux ce sera.

Dès lors, la recherche devrait s'orienter vers des inorganiques tout à la fois plus performants sur le plan de l'adsorption de l'antigène (de manière à devoir en administrer moins), mais aussi plus solubles que ceux déjà évoqués ci-dessus (afin de favoriser leur élimination rapide), et aussi capable d'influencer des populations cellulaires ciblées.

Reste une question non-encore évoquée jusqu'ici : la recherche pour un adjuvant universel (valable pour tous les antigènes) ; ou bien faudra-t-il un adjuvant pour chaque antigène ?

#### 4. Conclusion

Compte tenu des arguments présentés ci-dessus, la famille des composés du zinc, malgré ses concentrations humaines faibles, reste attractive. En effet, grâce aux nombreuses publications scientifiques récentes relatives aux différents rôles du zinc dans le corps humain [37] et au rôle du zinc dans l'immunité [38], l'artiste chercheur circulera dans un domaine de mieux en mieux connu et bien balisé, ce qui est un atout quand il s'agit du labyrinthe de la santé humaine.

Trouver un sel de zinc insoluble aux pH physiologiques, adsorbant l'antigène, pénétrant dans les cellules immunes cibles, se solubilisant dans les lysosomes en y libérant les épitopes intéressants contenu dans l'antigène, permettant ainsi le déclenchement d'une réponse immune, et éliminable rapidement de manière à favoriser une population cellulaire de type Th1, reste un challenge où la contribution des chimistes sera décisive.

A vos tabliers alors !

#### Abréviations :

OVA : Ovalbumine (protéine principale du blanc d'œuf).

Th1 : cellules immunitaire T-helper de type 1.

Th2 : cellules immunitaires T-helper de type 2.

IgG1 : immunoglobuline G1 (sous classe d'anticorps la plus abondante des immunoglobulines de classe G.

IgE : immunoglobuline E (joue un rôle central dans les réactions allergiques).

## Références

- [1] A.T. Glenny, C.G. Pope, H. Waddington, U. Wallace. *J. Pathol. Bacteriol.* 1926; 29: 38–45.
- [2] <https://vaers.hhs.gov/>
- [3] C. Exley. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2013, 15, 1807-1816
- [4] C. Shaw, S. Kette, R. Davidson, S. Seneff. *Immunome Research* 9 (2013) 69-84
- [5] M. J. Mold, A. O'Farrell, B. Morris, C. Exley. *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 5 (2021) 283–294
- [6] C. Hethey, N. Hartung, G. Wangorsch, K. Weisser, W. Huisinga. *Archives of Toxicology*, 2021, Vol.95, p. 2977-3000
- [7] C. Chahine. *L'utilisation de l'alun dans la transformation de la peau en cuir*. L'alun de Méditerranée. Édité par Philippe Borgard, Jean-Pierre Brun and Maurice Picon ; Publications du Centre Jean Bérard, 2005 .
- [8] S. Yumoto, S. Kakimi, A. Ohsaki, A. Ishikawa. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 1579-1584.
- [9] M. Couette, M-F. Boisse, P. Maison, P. Brugieres, P. Cesaro, X. Chevalier, R.K. Gherardi, A-C. Bachoud-Levi, F-J. Authier. *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1571-1578.
- [10] C. Shaw, L. Tomljenovic. *Immunol. Res.* 56(2-3) (2013) 304-316.
- [11] S. Bondy. *Toxicology* 315 (2014) 1-7.
- [12] R. Gherardi, H. Eidi, G. Crépeaux, F. Authier, J. Cadusseau. *Front. Neurol.* 2015; 6: 4.
- [13] A. Rodríguez-Largo, Á. Gómez, E. Pérez, R. de Miguel, I. Moncayola, L. Biagini, G. Rossi, I. de Blas, A. Fernández, M. Pérez, I. Gllaria, R. Reina and L. Luján. *Journal of Comparative Pathology* 216 (2025) 1e9.
- [14] R. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P. Dreyfus, J.-F. Pellissier, P. Chariot, F.-J. Authier. *Brain* 124 (2001) 1821-1831.
- [15] H. F. J. Savelkoul, V. A. Ferro, M. M. Strioga, V. E. J. C. Schijns. *Vaccines* 2015, 3, 148-171.
- [16] Drzymala J. *Mineral Processing*, 2007, Wroclaw University of Technology, 1st edition page 271.
- [17] P. S. Kumar, A. D. Raj, D. Mangalaraj, D. Nataraj, N. Ponpandian, L. Li, G. Chabrol. *Applied Surface Science* 257 (2011) 6678–6686.
- [18] J.R. Feldkamp, D.N. Shah, S.L. Meyer, J.L. White, S.L. Hem. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (1981) 638-640.
- [19] M.A.F. Pyman, J.W. Bowden, A.M. Posner. *Austr. J. Soil Res.* 17 (1979) 191-195.
- [20] J. Lyklema. *Journal of Colloid and Interface Science*, 99(1) (1984) 109-117.
- [21] F.J. Hingston, R.J. Atkinson, A.M. Posner, J.P. Quirk. *Nature*, 1967 Vol 215, 1459-1461.
- [22] J. Gupta, M. Irfan, N. Ramgir, K.P. Muthe, A.K. Debnath, S. Ansari, J. Gandhi, C.T. Ranjith-Kumar, M. Surjit. *Viruses*. *Front. Microbiol.* 13:881595.
- [23] M.C. Sportelli, M. Izzi, D. Loconsole, A. Sallustio, R.A. Picca, R. Felici, M. Chironna, N. Cioffi. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3040.
- [24] E. H. Relyveld. 1986, *Dev. Biol. Stand.* 65:131-136.
- [25] D. Jiang, G. S. Premachandra, C. Johnston and S. L. Hem. *Vaccine* 2004, 23, 693-698.
- [26] V. Vande Velde. GlaxoSmithKline patent WO 2015/059224.
- [27] B. Dieter. Behringwerke Aktiengesellschaft patent US 5252327. 1993 Oct 12.
- [28] I. Ivanovski, A. Ivanovski, D. Nikolić, P. Ivanovski. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 51 (2019) 138–140.
- [29] I. Ivanovski, M. Flecher, A. Ivanovski, D. Nikolić, P. Ivanovski. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 55 (2019) 107–109.
- [30] A. Ćirković, A. Ćirković, D. Nikolić, A. Ivanovski, P. Ivanovski. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 68 (2021) 126822.
- [31] T. Hara, T. Takeda, T. Takagishi, K. Fukue, T. Kambe, T. Fukada. *J. Physiol. Sci.* (2017) 67:283–301.
- [32] K. Subramanian Vignesh, G. S. Deepe Jr. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611 (2016) 66e78.
- [33] M. Matsumura, M. Nagata, K. Nakamura, M. Kawai, T. Baba, K. Yamaki, S. Yoshino. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010; 32: 56–62.
- [34] R. Roy, S. Kumar, A. K. Verma, A. Sharma, B. P. Chaudhari, A. Tripathi, M. Das, P. D. Dwivedi. *Int Immunol* 2014; 26: 159–172.
- [35] Q. Zhao, X. Huang, S. Chen, Y. Li, C. Zhang, N. Xia. Xiamen Innovax Biotech Co.,Ltd., Xiamen University, Patent PCT/CN2020/084190 WO 2020/207472 A1).
- [36] P. A. Bretscher. *Scand J Immunol.* 2022;95:e13110.
- [37] L. Amling, L. Rink, S. B. Bannstein. *Journal of Translational Medicine* (2025) 23:333.
- [38] M. Maares, H. Haase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611 (2016) 58e65.