

# Badanie profilu składu chemicznego szczepionki sześciowalentnej Infanrix Hexa



**Autor:**

**Tłumaczenie: Zespół tłumaczy STOP NOP**

## Wstęp i opis motywacji dla przeprowadzenia tego badania

Analiza jakościowo-ilościowa związków organicznych ma wielkie znaczenie w dziedzinie farmakologii, jako, że potencjalne problemy z bezpieczeństwem mogą pojawić się w nowych procesach produkcyjnych leków biologicznych i w wyniku skomplikowanej natury strukturalnej i biologicznej tych produktów. <sup>2</sup>Przegląd akt z procesu rejestracji szczepionek do użytku wojskowego, który możemy znaleźć w raporcie końcowym Komisji Parlamentarnej z “dochodzenia w sprawie zubożonego <sup>3</sup> uranu”, ujawnił obecność białkowo-chemicznych zanieczyszczeń i niejednorodności, które wymagają dalszych badań analitycznych. Nasze stowarzyszenie <sup>4</sup> zdecydowało się zająć się tą kwestią na tyle, na ile mamy możliwości. Ten projekt jest częścią wyżej wymienionych spostrzeżeń. Stąd było konieczne rozwinięcie technologii, zdolnej do analizowania szerokiego spektrum molekuł chemicznego, białkowego i metabolicznego pochodzenia, aby móc oszacować jakość otrzymanych rezultatów. Metoda została zatem opracowana w oparciu o technologię SANIST, do testowania czystości i bezpieczeństwa szczepionek (dalsze informacje poniżej).

## Wyniki i dyskusja

### 1. Analiza składu zadeklarowanego w ulotce informacyjnej.

SKŁAD	OBECNOŚĆ	ZWIĄZKI JONOWE
Aminokwasy	Tak	[M+H] <sup>+</sup>
Formaldehyd <sup>5</sup>	<b>NIE WYKRYTO</b>	-
Laktoza bezwodna	Tak	[M+H.H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
Witaminy	Niewykrywalny	-
Woda	Tak	[M+H] <sup>+</sup>
Neomycyna	Słaby sygnał	[M+2H] <sup>2+</sup>
Toksoid błoniczy <sup>7</sup>	<b>NIE WYKRYTO</b>	[M+nH] <sup>n+</sup>
Toksoid tężcowy <sup>8</sup>	<b>NIE WYKRYTO</b>	[M+nH] <sup>n+</sup>
Toksoid krztuścowy <sup>9</sup>	<b>NIE WYKRYTO</b>	[M+nH] <sup>n+</sup>
Hemaglutynina włókienkowa (FHA)	<b>NIE WYKRYTO</b>	[M+nH] <sup>n+</sup>

Pertaktyna (PRN)	NIE WYKRYTO	[M+nH] <sup>na</sup>
Haemophilus Influenzae B polisacharyd <sup>10</sup>	NIE WYKRYTO	[M+nH] <sup>na</sup>
Poliomyelitis 1, 2, 3	NIE WYKRYTO	[M+nH] <sup>n+</sup>
Hepatitis b	NIE WYKRYTO	[M+nH] <sup>n+</sup>
Fosforan polirybozylorybitolu (PRP) <sup>10</sup>	Niewykrywalny	-
Polimyksyna <sup>11</sup>	Niewykrywalny	-

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

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

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

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

5 Albini A. et al., Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Apr 5;9:110.doi:10.3389/fendo.2018.00110. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29674995/>)

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

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

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

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

10 [https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus\\_influenzae\\_typeb\\_Hib/en/](https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus_influenzae_typeb_Hib/en/)

11 <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/polymyxin>.

## 2. Analiza frakcji białkowych

Według producenta szczepionka Infanrix Hexa zawiera białka. Próbkę poddano analizie mającej zidentyfikować te białka. Podczas analizy wizualnej próbka ma wygląd mleczny.

Przeprowadzono różne badania na próbkach:

### 2.1 - pierwsza analiza: Trawienie takie, jakie jest

Początkowo poddano próbkę enzymatycznemu procesowi trawienia: 10 µL próbki poddanej działaniu 50 µL Trypsyny pozostawiono w termobloku w 37 ° C przez noc. Przygotowano kontrolną hemoglobinę 1 mg / ml, którą traktowano jako próbkę.

**W tej analizie nie wykryto obecności białek w próbce.**

### 2.2 - druga analiza: Trawienie osadu

Następnie próbkę poddano dalszej analizie przez oddzielenie i odwirowanie części ciekłej od części stałej, obecnych w mlecznej zawieszynie. Cały nadsącz został usunięty. Pozostały osad potraktowano 30 µl trypsyny i pozostawiono w termobloku w 37 ° C przez noc. Przygotowano kontrolną hemoglobinę 1 mg / ml, którą traktowano jako próbkę. Po trawieniu, próbkę badaną i próbkę kontrolną poddano odwirowaniu. Pozostały nadsącz pobrano i umieszczono w fiolkach do analizy. Dodano 20 µl osmotycznej H<sub>2</sub>O, aby uzyskać wystarczającą objętość do wstrzyknięcia.

**W tej analizie nie wykryto obecności białek w próbce.**

### 2.3 - trzecia analiza: próba Bradforda

Aby określić faktyczną obecność białek, szczepionkę Infanrix Hexa poddano testowi Bradforda. 200 µl próbki zmieszano z 300 µl osmotycznej H<sub>2</sub>O w celu uzyskania objętości. Dodano do roztworu 500 µL odczynnika Bradforda. Po analizie wizualnej możemy potwierdzić obecność białek lub sekwencji peptydowych na podstawie niebieskiego zabarwienia próbki. (na załączonym obrazie)



Przy użyciu linii kalibracyjnej wykryto stężenie białka wynoszące 1,099 mg / ml.

#### 2.4 - czwarta analiza: Trawienie w temperaturze 57 ° C

Po teście Bradforda 20 µl pierwotnej próbki poddano działaniu 80 µl trypsyny. Przygotowano kontrolną hemoglobinę 1 mg / ml, którą traktowano jako próbkę. Próbka badana i kontrolna zostały pozostawione w termobloku w 37 ° C przez 4 godziny, a następnie w 57 ° C przez 30 minut. Próbkę badaną i kontrolną poddano wirowaniu, a nadsącz pobrano i umieszczono w fiolce do analizy.

W celu przetworzenia danych uzyskanych w ten sposób, początkowo wykorzystano bazę danych Mascot<sup>®</sup>, ale niczego nie znaleziono. Następnie wykorzystano GMP ale w tym przypadku także nie wykryto sekwencji białek. W badaniu DeNovo zidentyfikowano następujące sekwencje peptydów, nie spełniające kryteriów cięcia trypsyną, a zatem potencjalnie należące do wolnych peptydów. Poniżej przedstawiamy znalezione sekwencje:

YLSA	YLSA	SLGS	HNLPFT
QLYTCC	CHFAHD	WRASST	SYLPFT
SAGE	HLLNMT	YSDDQC	NMAWW
DEV	CHPPYL	TDTENW	GPFRVW
AEYHW	TLAPRF	ALAPWF	RWGPLH
DEV	GSAAG	MNFHR	DSYWH
VLYACPP	DEV	NSNWW	WGC
	SNCGYY	VFHRF	

Powyższe sekwencje zostały wprowadzone do wyszukiwarki MS-BLAST<sup>12</sup> i otrzymaliśmy charakterystyki przedstawione w tabeli 1. Jak można zauważyć, sekwencje te można przypisać do świata bakterii na podstawie strukturalnego podobieństwa. Białka odpowiadające antygenom, obecnym w szczepionce nie zostały wykryte. Może być za to odpowiedzialna ich znaczna modyfikacja strukturalna, spowodowana wprowadzeniem formaldehydu i glutaraldehydu. W rzeczywistości przeszukiwanie bazy danych zostało przeprowadzone bez brania pod uwagę zmian wprowadzonych przez wyżej wymienione związki.

Jest ważne aby zweryfikować czy te zmiany doprowadziły do ukształtowania się makromolekularnych usieciowanych kompleksów. W tej kwestii będziemy się starać o kolejne analizy z użyciem techniki MALDI-TOF-MS<sup>13</sup> szeroko uznanej w praktyce klinicznej do studiowania molekuł o dużej wadze.

Tabela1 - partia nr 1 (A21CD072D)

Nazwa białka	Organizm	Wynik
Hipotetyczna proteina CALCODRAFT_501505	Calocera cornea HHB 12733	159
Białko z rodziny erg4/erg24	Dictyostelium lacteum	154
Transporter kwasu 3-fenylopropionowego	Rhodopseudomonas Palustris	154
hipotetyczna proteina LAESUDRAFT_731137	Laetiporus Sulphareus 93-53	149
Oksydoreduktaza aldehyd:ferredoksyna	Alcaliphylus oremlandii Alcaliphylus oremlandii OhILAs	138
Hipotetyczna proteina KAFR_OH02570	Kazachstania africana CBS 2517	136
Hipotetyczna proteina	Pseudoxanthomonas mexicana	136
Hipotetyczna proteina	Endozoicomonas elysicola	135
Czynnik transkrypcyjny zawierający domeny wiążące DNA, typu homeodomeny	Phycomyces blakesleeanus NRRL 1555(-)	110
Regulator transkrypcji Proteina wiążąca DNA	Streptomyces clavuligerus Streptomyces clavuligerus ATCC 27064	109
N-końcowa domena białka hydrolazy glikozydowej rodziny 3	Firmicutes bacterium CAG:56	108
Proteina 69-podobna zawierająca motyw palca cynkowego CCCH	Pyrus X bretschneideri	108
Hipotetyczna proteina CC1G_06886	Coprinopsis cinerea okayama 7#130	108
Hipotetyczna proteina FIBSPDRAFT_917685	Fibulorhizoctonia sp. CBS 109695	107
Nie scharakteryzowana proteina Nienazwany produkt białkowy	Blastocystis hominis Blastocystis hominis	104
Hipotetyczna proteina J132_09024	Termitomyce ssp. J132	104

<sup>11</sup> [http://www.matrixscience.com/help/seq\\_db\\_setup\\_db\\_gui.html](http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_db_gui.html)

<sup>12</sup> <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>

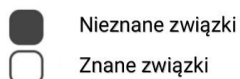
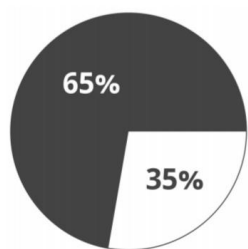
<sup>13</sup> <https://it.wikipedia.org/wiki/MALDI>

### 3. Analiza frakcji metabolicznej

Należy zauważyć, że to badanie przesiewowe zapewnia półilościową wartość odniesienia, która odpowiada luce między nanogramami i mikrogramami jako orientacyjny rząd wielkości. Aby móc uzyskać dokładne dane ilościowe, konieczne będzie użycie certyfikowanego standardu analitycznego o znanej mocy.

Poniżej przedstawiono wyniki przesiewowych badań identyfikacyjnych uzyskane z dwóch badanych partii:

#### Partia #1 (A21CD072D)



**W partii nr 1 mamy 65 sygnałów, z których tylko 35% jest znanych.**

Od ponad roku nie można było przeprowadzać analiz na różnych partiach bo wszystkie Infanrix Hexa, które kupujemy na terytorium krajowym, w różnych regionach i w różnych okresach, są z partii A21CD072D.

**UWAGI DLA WYJAŚNIENIA:** jest to analiza pierwszego poziomu polegająca na identyfikacji na podstawie masy cząsteczkowej, jeżeli wynik jest jednoznaczny (tzn. przy danej masie cząsteczkowej tylko jeden związek jest przypisany jako struktura) to bardziej prawdopodobne, że to ten właściwy, ale nie możemy mieć absolutnej pewności na tym etapie. Jak widać, dla pewnej liczby związków, masa cząsteczkowa odpowiada większej ilości substancji.

### 3.1 szczepionka Infanrix Hexa - Partia #1 (A21CD072D)

Wykryto 65 sygnałów wśród których tylko 35% można było potencjalnie sklasyfikować (**Tabela 2**).

**Musimy nadmienić, że tożsamość związku nie jest pewna i powinna być potwierdzona przez badanie przesiewowe drugiego poziomu, przeprowadzone z certyfikowanym standardem analitycznym.**

W rzeczywistości, podczas poziomu skanowania, urządzenie mierzy poszczególne dane poprzez ich konkretną masę molekularną (błąd pomiarowy <10ppm). Wzór empiryczny jest obliczany na podstawie tych pomiarów. Niektóre wzory mogą odpowiadać kilku związkom, mającym tą samą masę molekularną, ale inną tożsamość chemiczną.

**UWAGI DLA WYJAŚNIENIA:** zasadniczo, to co jest pewne w naszych danych to to, że mamy 65 różnych chemicznie związków, wśród których tylko 35% jest znanych.

Molekuły mogące potencjalnie należeć do kategorii toksyn zostały przebadane. Molekuły zasugerowano w oparciu o precyzyjny tryb badania m / z (masa / ładunek) (błąd <10ppm) przy użyciu bazy danych związków toksycznych w silniku wyszukiwarki Metlin. Tabela 3 pokazuje otrzymanych kandydatów.

**Należy podkreślić, że dla każdego wykrytego związku istnieje empiryczny wzór kandydat zawierający związki siarki lub siarkę w formie różnych grup funkcyjnych. Ponadto, obecność kwasu mrówkowego w formie soli sodowej i jeden polimer pochodzący z zanieczyszczenia Polietylenu Glikolu (PEG)<sup>14</sup> ze średnią masą molekularną wynoszącą 1340 Da zostały wykryte.**

## 4. Rozważania końcowe

Większość wykrytych zanieczyszczeń i zanieczyszczeń nie została scharakteryzowana przy użyciu referencyjnych baz danych metabolicznych i białkowych (KEGG, NCBI-Prot e SwissProt).<sup>8,9</sup>

Istnieje krytyczna kwestia zanieczyszczenia różnymi związkami potencjalnie lub zdecydowanie szkodliwymi dla zdrowia ludzkiego.

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

1. Czy substancje chemiczne obecne wymienione są w karcie danych?	<b>Częściowo</b>
2. Czy występują zanieczyszczenia chemiczne i białkowe?	<b>TAK</b>
3. Ile jest zanieczyszczeń?	<b>Od 65</b>
4. Czym one są?	<b>Toksyny chemiczne, związki chemiczne, peptydy</b>

#### **Dalsza analiza**

1. Przede wszystkim konieczne jest zidentyfikowanie z całą pewnością najciekawszych prawdopodobnych związków
2. Następnie określenie dokładnej ilości każdego zanieczyszczenia
3. Wreszcie, aby określić strukturę makrocząsteczki utworzonej przez zestaw antygenów

## **5. Dalsze badania naukowe**

Potwierdzenie i analiza tożsamości będą przeprowadzane przy użyciu techniki „Tandemowej Spektrometrii Masowej (MS / MS)” związanej certyfikowanymi standardami analitycznymi. Analiza zostanie przeprowadzona zgodnie z dyrektywami europejskimi (dyrektywa UE 2002/657 / WE) przydatnymi do identyfikacji związków.

W szczególności celem badań będzie potwierdzenie tych substancji, których toksyczność i alergenność jest znana, a 7 zidentyfikowanych toksyn będzie elementem starannego badania.

## **6. Opis technologii SANIST**

Innowacyjna platforma SANIST o międzynarodowej renomie, dzięki publikacjom w recenzowanych czasopiśmie naukowych<sup>15,16</sup> - została wykorzystana do przeprowadzenia pierwszego skriningu identyfikacyjnego interesujących nas szczepionek.

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

W skład technologii SANIST wchodzi:

- a. zestaw do ekstrakcji analitów (nieznane substancje do ustalenia);
- b. system analizy LC-SACI / ESI-MS, który pozwala zmniejszyć szum chemiczny spektrometrów masowych i uzyskać lepsze wykrywanie sygnałów instrumentalnych;
- c. system przetwarzania danych SANIST, składający się z lokalnej, sieciowej platformy bioinformatycznej, zdolnej do przetwarzania danych używając dedykowanych baz danych i dostosowanych algorytmów. Zgodnie ze specyfikacją, podczas fazy skanowania, rozpoznanie jest wykonywane w kontekście badania naukowego, więc poprzez przeszukiwanie oficjalnych banków danych (KEGG, NCBI-Prot and SwissProt) - bez pomocy certyfikowanych standardów analitycznych. Jest więc<sup>17,18</sup> koniecznym przeprowadzenie analizy drugiego stopnia przy użyciu certyfikowanych standardów w celu potwierdzenia ich tożsamości.

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

Do tej pory platforma SANIST ma zastosowanie w następujących dziedzinach:

- W **badaniach klinicznych** markerów choroby i ich bezpośrednim zastosowaniu w dziedzinie diagnostyki.
- Usługi żywieniowe**, identyfikowalność żywności. Badania porównawcze w celu określenia jakości produktów w oparciu o ich złożony skład cząsteczkowy. Kontrola fałszowania żywności.
- Sektor nutraceutyczny**, rozwój wartości odżywczej suplementu diety na podstawie jego składu molekularnego. Wykrywanie fałszerstw (dla przykład: dodane narkotyki).
- Sektor farmaceutyczny**, kontrola leków i badania aktywnych biocząsteczek.
- Przemysł kosmetyczny**: skład molekularny produktów kosmetycznych może być dokładnie monitorowany i skorelowany z jakością produktu.

## 9. Jak czytać tabele

Faza przesiewowa; urządzenie mierzy określone dane poprzez dokładną masę cząsteczkową (błąd pomiaru <10 ppm). Na podstawie tych pomiarów oblicza się wzór chemiczny. Niektóre wzory mogą odpowiadać kilku związkom o tej samej masie cząsteczkowej, ale o różnej tożsamości chemicznej.

Przykład pojedynczego powiązanego komponentu:

Atovaquone	lek do leczenia malarii
------------	-------------------------

W tym przykładzie przyrząd wykrył obecność cząsteczek o określonej masie cząsteczkowej. Poprzez wstawienie wzoru chemicznego do baz danych możliwe było skojarzenie prawdopodobnego komponentu.

Przykład wielu powiązanych komponentów:

<ul style="list-style-type: none"><li>■ Tetracenomycyna F2</li><li>■ Decaketydowy tricykliczny związek pośredni</li><li>■ 1'-hydroksyversikoloron</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Monokarboksyłowy hydroksykwas</li><li>■ związek z grupy antracenów</li><li>■ Antrafuran</li></ul>
---	---

W tym przykładzie przyrząd wykrył sygnał o określonej masie cząsteczkowej. Wprowadzając wzór chemiczny do baz danych, można było skojarzyć trzy prawdopodobne komponenty.

## 10. Tabele zanieczyszczeń

Tabela 2 - partia nr 1 (A21CD072D)

<ul style="list-style-type: none"><li>■ Węglík wolframu</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Nieorganiczny węglík stosowany przemysłowo do syntezy węglików spiekanych.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Tetracenomycyna F2</li><li>■ Decaketydowy tricykliczny związek pośredni</li><li>■ 1'-hydroksyversikoloron</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Monokarboksyłowy hydroksykwas</li><li>■ związek z grupy antracenów</li><li>■ Antrafuran</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Laktoza</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Dodano jako stabilizator.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ Metallilosulfonian sodu</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Monomer stosowany w przemyśle polimerowym.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>■ 6-fosforan salicyny</li><li>■ Pachyrrizon</li><li>■ Arnottin II</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>■ Fosforan glikozydu pochodzący z salicyny (środek przeciwzapalny)</li><li>■ związek z rodziny Rotenone</li><li>■ związek z rodziny 2-benzofuranów</li></ul>

■ Tetracenomycyna F1	■ Monokarboksylowy hydroksykwas
■ Octadekanamid	■ Amid kwasu stearynowego
■ L-Leucyna	■ Aminokwas
■ Lichenin (19 innych możliwych kandydatów)	■ Glucan. Badano by stosować glukany jako adiuwanty szczepionkowe
■ Justycydyna B	■ Lignan
■ Dihydrochelirubine ■ 6-oxochelerithrine ■ 7,8-Didemetylo-8-hydroksy-5-deazariboflavin	■ Alkaloid dihydrobenzofenantrydynowy ■ Alkaloid ■ Ryboflawina
■ Deamino-alfa-keto-demethylphosphinothricin	■ -
■ Cassythine ■ (6-alfa-D-glukozaaminylo) -1D-myo inozytol	■ Alkaloid ■ Pochodna D-glukozaminidu i monosacharydu.
■ Sól sodowa karbenicyliny	■ Antybiotyk bakteriobójczy
■ bis-D-fruktoza 2', 1: 2, 1'-dibezwodnik ■ D-fruktofuranosa 1,2': 2,3'-dibezwodnik ■ Prazepam ■ 2,3-Dehydro-UWM6 / ■ Lewofuraltadon ■ Mykocyklosyna	■ Cukier Dianhydrat ■ Cukier Dianhydrat ■ Pochodna benzodiazepiny ■ Związek fenantrenu ■ Antybiotyk, który można stosować w połączeniu ze szczepionką składający się z komórek hybrydowych do leczenia raka ■ Związek heterotetracykliczny
■ Atovaquone	■ Leki stosowane w leczeniu malarii
■ Amoksycylina ■ monohydrat cefaleksyny ■ Cefroksadyna ■ CGP 28-392	■ Antybiotyk ■ Antybiotyk, który zmniejsza skuteczność szczepionek ■ Antybiotyk cefalosporynowy ■ Eter aromatyczny
■ 7-deoksyloganian ■ Kwas 8-epideskysyloganowy ■ LY395153 ■ AL-294	■ Metabolit roślin ■ Metabolit roślin ■ Związek z rodziny benzamidów ■ Alkilobenzen
■ 4-chloro-orto-fenylendiamina	■ Związek z rodziny monochlorobenzenów
■ 2-N, 6-N-Bis (2,3-dihydroksy amid benzoilo) -L-lizyny	■ -
■ 2-jodo-6-metoksyfenol	■ Związek z rodziny fenoli



■ Wolframian	■ Związek zawierający anion wolframowy
■ 2-amino-5-chloromukonian-6-semialdehyd	■ Półprzewodnik
■ 2,5-dichloro-4-oksoheks-2-enedian	■ związek z rodziny średnio łańcuchowych kwasów ketonowych
■ 1-Palmitoyl-2-(5-hydroksy-8-okso-6-oktenoil) -sn-glicero-3-fosfatydylocholina	■ 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina

Tabela 3 - partia nr 1 (A21CD072D)

Związek kandydat	Wzór chemiczny
■ Mrówczan sodu	CHNaO <sub>2</sub>
■ Hepta-2,3,4,5,6-pentanonitryl	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> N
■ (Metanosulfonyl) (diokso) -lambda-5-azan ■ Kwas oksazyrydino-2-sulfonowy	CH <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S
■ 3,4-Dihydro-3-tiokso-1,2,4-triazyn-5 (2H) -on ■ 5-tiokso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3 (2H) -on ■ 1,2,4-oksadiazolo-3-karbotioamid ■ 1,2,3-tiadiazolo-4-karboksyamid ■ 5-amino-1,3,4-tiadiazolo-2-karbaldehyd ■ 1,1-Difluoro-1-izocyjanianetan ■ 1,1-Difluoro-2-izocyjanianetan	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> OS
■ 3- (metylosulfonylo) -1H-1,2,4-triazol ■ 1H-imidazolo-2-sulfonamid ■ N- (4,5-dihydro-1,3-tiazol-2-ilo) nitramid ■ 1H-imidazolo-5-sulfonamid ■ 1H-pirazolo-4-sulfonamid ■ Undeca-2,4,6,8,10-pentaynenitrile	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> F <sub>2</sub> NO
■ 2-aminobenzenotiolu ■ 4-metylo-5-winylotiazol ■ 2-pirydynometanotiol ■ 2-izopropenylotiazol ■ 5,6-dihydro-4H-cyklopenta [d] [1,3] tiazol ■ 4-aminotiofenol 3-pirydynometanotiol ■ pirydyna, 2- (metylotio) ■ pirydyna, 3- (metylotio) -	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NS
■ Fentiazamina	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S
■ 4-chloro-N-hydroksybenzeno-1-sulfonamid	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ClNO <sub>3</sub> S
■ Kwas karbamoditiowy, (4-hydroksyfenyl)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NOS <sub>2</sub>