



ESTRATEGIA DE DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A COVID-19

FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CRISTINA OLMOS MACHADO



ESTRATEGIA DE DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A COVID-19

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia
Grado en Farmacia

Cristina Olmos Machado

Tutor: Francisco Araujo Rodríguez

Trabajo bibliográfico

Área Prácticas Tuteladas- Hospital Virgen del Rocío- Tecnología Farmacéutica

Aula 4, Facultad de Farmacia.

Sevilla, 21 de Julio de 2021

RESUMEN

A principios de 2020, lo que en un principio era considerado apenas un brote epidémico de una enfermedad infecciosa, en poco tiempo pasó a ser una pandemia, la pandemia COVID-19, siendo el agente microbiológico causante el virus SARS-CoV-2.

Ante esta situación surgió la necesidad de encontrar una pronta solución, es por ello que se planteó el hipotético desarrollo en un tiempo récord de una vacuna para erradicar el virus ante la inexistencia de un tratamiento farmacológico eficaz.

Con el objetivo de analizar y comparar las diferentes vacunas contra el SARS-CoV-2 se enfocó el estudio en las vacunas basadas en la tecnología de ARNm. Para ello se realizó una revisión bibliográfica en la base de datos PubMed con la literatura publicada desde el año 2020, junto con la información disponible en la web de la Agencia Española del Medicamento.

La implementación de estas fue posible mediante el uso de adyuvantes que permitieron la incorporación del ARNm en la célula huésped, con el fin de traducirse a antígenos que una vez presentados en la superficie de estas, provocasen una reacción inmunitaria que produjera anticuerpos neutralizantes contra el virus.

La autorización en la Unión Europea de dos vacunas basadas en esta tecnología (las desarrolladas por las empresas Pfizer-BioNTech y Moderna), condujo a una significativa bajada en la transmisión de la enfermedad, consecuencia de la alta eficacia que ambas vacunas presentan, contribuyendo de forma significativa a la bajada en la incidencia de la enfermedad; destacando la utilidad de esta tecnología que no había sido usada con anterioridad.

PALABRAS CLAVE: ARNm, COVID-19, SARS-CoV-2, Vacuna, Virus.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN Mensajero
Cap	Caperuza-5'
CMH	Complejo Mayor De Histocompatibilidad
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CPA	Células Presentadoras De Antígenos Profesionales
dsRNA	Double-stranded RNA
ECA-2	Enzima Convertidora De Angiotensina 2
EMA	European Medicines Agency
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
NPL	Nanopartículas Lipídicas
Nsp	Non-structural protein
OMS	Organización Mundial De La Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polietilenglicol
RBD	Receptor binding domain
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-In
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
TLR	Toll-like Receptor
UE	Unión Europea
UTR	Untranslated Region

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 CONTEXTO DE LA PANDEMIA ACTUAL DEL COVID-19.....	5
1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	5
1.2 VIRUS SARS-COV-2	6
1.2.1 FAMILIA CORONAVIRIDAE.....	6
1.2.2 SARS-COV-2.....	6
1.2.3 SARS, MERS y COVID-19	10
1.3 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE VACUNAS	11
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....	13
3. METODOLOGÍA.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1 PRODUCCIÓN Y DESARROLLO: TECNOLOGÍA DE LAS VACUNAS DE ARNm	15
4.1.1 ¿POR QUÉ VACUNAS DE ARN?	15
4.1.2 PROYECTOS Y ESTRATEGIAS ACTUALES DE LAS VACUNAS DE ARNm	16
4.1.3 RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR VACUNAS DE ARNm	20
4.2 VACUNAS DE ARNm EXISTENTES FRENTE A COVID-19.....	22
4.2.1 VACUNAS APROBADAS EN LA UNIÓN EUROPEA: CARACTERÍSTICAS, DIFERENCIAS, EFICACIA Y SEGURIDAD.	22
4.2.2 FUNDAMENTOS COMUNES DE LAS VACUNAS COMERCIALIZADAS BASADAS EN LA TECNOLOGÍA DEL ARNm CONTRA EL SARS-CoV-2.....	29
4.2.3 PRÓXIMAS VACUNAS DE ARNm CONTRA EL COVID-19	31
4.3 VACUNAS DE ARNm: UNA VISIÓN AL FUTURO	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONTEXTO DE LA PANDEMIA ACTUAL DEL COVID-19

A finales de diciembre de 2019 se informó de la aparición de casos de neumonía grave causados por un agente microbiológico no identificado en la ciudad china de Wuhan, en la provincia de Hubei (Wu et al., 2020). Se trataba de un brote de neumonía de origen incierto, posteriormente denominado Enfermedad por Coronavirus 2019, (*Coronavirus disease 2019*, COVID-19). El agente etiológico se identificó más adelante, el 11 de enero de 2020, como un virus de la familia Coronaviridae, un β -CoV, el SARS-CoV-2, (por sus siglas en inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (Lu et al., 2020; Lv et al., 2020).

El foco, de origen zoonótico, igual que otras pandemias a gran escala producidas por virus Coronavirus, como SARS, (*Severe Acute respiratory syndrome*), o MERS, (*Middle East respiratory síndrome*); se hallaba en el mercado mayorista de pescado en Wuhan (Ji et al., 2020), donde se encontraban animales salvajes, como murciélagos (Malaiyan et al., 2021) conocidos por ser reservorios naturales de virus de esta familia, comprobándose que los casos iniciales del brote tenían en común la exposición a este mercado (Pandey et al., 2020).

Desde entonces, lo que era un brote epidémico se extendió rápidamente a otros países, en parte a consecuencia de la migración masiva de personas por la celebración del Año Nuevo Chino (Liu y Saif, 2020). Con lo que el 30 de enero de 2020 la Organización Mundial de la Salud, (OMS), declaró este brote por COVID-19 una emergencia de salud pública internacional, y más adelante, el 11 de marzo de 2020, fue declarado como una pandemia tras su rápida expansión a nivel global, que hasta la fecha ha causado millones de infectados y fallecidos a lo largo del planeta, derivando en terribles consecuencias tanto demográficas como económicas.

De expansión imparable debido a la alta tasa de replicación de este virus, una de las posibles soluciones para poder poner fin a esta pandemia evitando más muertes sería el uso de vacunas que, de forma segura, eficaz y efectiva, consiguieran erradicar este virus, o al menos mitigar sus síntomas y volver de alguna manera a la normalidad.

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Al no existir inmunidad previa frente al SARS-CoV-2, todas las personas son susceptibles de padecer la enfermedad COVID-19. Tras la infección, la mayoría desarrollarán inmunidad en relación a una respuesta inmune en forma de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, un 80% de las personas infectadas no requerirán hospitalización, mientras que el 20% restante padecerá una forma grave de la enfermedad, requiriendo cuidados intensivos un 5% del total de infectados.

Los factores de riesgo para sufrir una forma grave de la enfermedad serán principalmente la edad y padecer otras enfermedades concomitantes, como pueden ser: hipertensión arterial, diabetes u obesidad entre otras.

Los síntomas más comunes de la enfermedad son: fiebre, tos, falta de aire, escalofríos, pérdida del gusto y olfato, dolor de garganta, diarrea, vómitos, náuseas, fatiga, dolor de cabeza, congestión nasal y rinorrea. En los casos más graves encontramos: fiebre elevada, tos seca, disnea, mialgias o debilidad muscular; pudiendo llegar al síndrome de dificultad respiratoria aguda, desencadenando en fallo multiorgánico y muerte.

1.2 VIRUS SARS-COV-2

1.2.1 FAMILIA CORONAVIRIDAE

El virus SARS-CoV-2, responsable de la pandemia COVID-19, forma parte de un más amplio grupo de virus, conocidos como coronavirus; generalmente abreviados CoV, pertenecientes a la familia Coronaviridae, dentro del orden Nidovirales (Cui et al., 2019).

Estos coronavirus fueron descubiertos en la década de 1960, y deben su nombre a su estructura en forma de *corona*; con un genoma compuesto de una sola cadena positiva de ARN de unos 30kb de longitud, se trata de los virus de ARN más grandes conocidos (Chen et al., 2020). Y, al igual que los demás virus del orden Nidovirales, se caracterizan por poseer: largas cadenas de ARN, una alta tasa de replicación por su conservada organización genética, actividades enzimáticas únicas y un amplio desplazamiento del marco ribosómico. Son destacados patógenos de vertebrados, que pueden infectar al: sistema respiratorio, sistema nervioso, tracto gastrointestinal, sistema hepático y sistema nervioso entre otros (Rana, 2020).

1.2.2 SARS-COV-2

El SARS-CoV-2, (Figura 1), es un virus perteneciente a la familia Coronaviridae, un coronavirus, más específicamente un β -coronavirus. Posee una nucleocápside helicoidal unida al ARN en una conformación continua de tipo cordón. Con un diámetro aproximado de 65 a 125 nanómetros, y un genoma con una longitud de 26 a 32 Kbs, posee su núcleo genético envuelto en una bicapa lipídica donde se anclan las proteínas estructurales del virus.

Mediante un análisis filogenético se identificó que este SARS-CoV-2 tenía un 88% de similitud con los virus coronavirus que se encontraban en los murciélagos de forma habitual, el *bat-SL-CoVZC45* y *bat-SL-CoVZXC21* (Ji et al., 2020), con lo que se concluyó que este tuvo que evolucionar a partir del virus existente en los murciélagos, y llegó a la especie humana mediante una fuente intermedia no identificada, produciéndose un cruce entre especies, que mediante diferentes mutaciones dio lugar a la estructura final de este SARS-CoV-2 (Pandey et al., 2020).

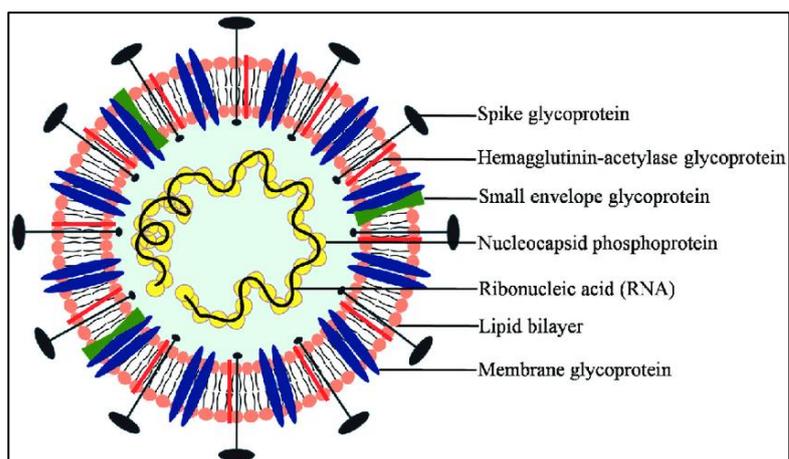


Figura 1 Estructura del virus SARS-CoV-2 con sus proteínas estructurales (Hussain et al., 2020).

El genoma, de unos 30.000 pares de bases, flanqueado por regiones UTR, (*untranslated region*, región no traducida), codifica por medio de marcos de lectura abiertos, ORF (por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*, marco abierto de lectura) (Jin et al., 2020), 16 proteínas no estructurales **Tabla 1**, (constituyendo el 67% del genoma total), y 5 proteínas estructurales y accesorias **Tabla 2**.

nsp1	Inhibe la señalización de IFN
nsp2	Función no conocida
nsp3	Proteasa que bloquea la respuesta innata del huésped
nsp4	Formación vesícula de doble membrana
nsp5	Proteasa principal, Mpro
nsp6	Restringe la expansión de autofagosomas
nsp7	Cofactor
nsp8	Cofactor
nsp9	Dimerización y unión de ARN
nsp10	Proteína-esqueleto para nsp14 y nsp16
nsp11	Función desconocida
nsp12	Proteína dependiente del cebador
nsp13	ARN-helicasa
nsp14	Exoribonucleasa
nsp15	Endoribonucleasa
nsp16	Enzima Nucleósido-2-O-metiltransferasa

Tabla 1. Proteínas no estructurales del virus SARS-CoV-2, que desempeñan en su mayoría funciones de replicación del proteosoma viral (Zhang et al., 2019).

Estas proteínas no estructurales, nsp, (por sus siglas en inglés *non-structural protein*), (Tabla 1), serán: proteasas virales, como nsp3, cisteín proteasa o nsp5; ARN polimerasas dependientes de ARN, RdRp y nsp12; helicadas: nsp13; y otras proteínas no estructurales de funciones no conocidas, que se espera participen en la transcripción y replicación viral.

Entre las diferentes proteasas, destaca la proteasa principal, conocida como M^{PRO}, codificada por nsp5. Su importancia radica en que es esencial para la producción del proteoma viral y la replicación. Será la primera proteína que se autoescinda y luego escinda a la poliproteína en

miembros individuales en el sitio de unión a la célula, de forma que transformándose en un octámero, alcanza su forma activa; mientras que en su forma no activa, su monómero y dímero coexisten en equilibrio.

También es importante el papel que juegan dentro de las proteínas no estructurales la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN, (abreviada RdRp), codificada por nsp12. Esta forma parte de un complejo proteico constituido por las proteínas encargadas de la replicación y transcripción viral, siendo clave el papel enzimático que juega RdRp, ya que esta será la que forme el complejo junto con otros cofactores, habiendo un surco central en el complejo, donde se catalice la síntesis de ARN mediada por un molde de ARN, existiendo una interacción electrostática entre la cadena de ARN que se esté formando (positiva) y el complejo (negativo), con lo que se libera el nuevo material genético.

S	Proteína Spike o de la espícula
M	Proteína de la membrana
E	Proteína de la envoltura
N	Proteína de la nucleocápside
HE	Proteína de la hemaglutinina esterasa

Tabla 2. Proteínas estructurales del virus SARS-CoV-2, responsables de la patogénesis y multiplicación del virus (Zhang et al., 2019).

Por otra parte, las cinco proteínas estructurales antes mencionadas, (Tabla 2), trabajan todas en sincronía para conseguir la replicación viral en la célula huésped, de ahí la importancia de estas en la patogénesis y multiplicación viral. Entre ellas destacan: la proteína M, proteína de la membrana de triple extensión, esencial para el ensamblaje del virus; la proteína E, proteína de la envoltura, que a pesar de ser la más pequeña tiene un papel central en la maduración y germinación; y por último destacamos la proteína más importante, la proteína de la espícula, S.

También conocida como Spike, la proteína S forma la espiga trimérica que se extiende desde la membrana lipídica, dándole al virus la apariencia de corona característica. Es crucial para la infectividad, el tropismo tisular y la internalización del virus en la célula huésped, será la llave de entrada del virus en nuestro organismo. Se encuentra en la superficie de la partícula del virus antes de la fusión con la célula huésped, pues, tras esto, la proteína es procesada por las proteasas, derivando en una eficiente internalización del virus.

Se trata de una proteína de fusión de clase I trimérica glicosilada, que posee: un gran ectodominio, una sola porción transmembrana que ancla la proteína en la membrana lipídica y un pequeño segmento intracelular. El ectodominio estará formado por dos subunidades: S1 y S2, ambas se encontrarán formando homotrímeros. El carbono terminal del dominio funcional de S1 estará involucrado en la unión al receptor, y en la subunidad S2 encontraremos: un péptido de fusión, HR1 (*heptad repeat región 1*, secuencia heptada repetida 1), HR2 (*heptad repeat región 2*, secuencia heptada repetida 2), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que ayudará en la envoltura viral.

En la proteína S del SARS-CoV-2 encontramos también un poro S1/S2 de tipo furínico, no presente en otras especies de coronavirus, como en el caso del SARS-CoV, (responsable de la pandemia SARS). La presencia de este sitio protolítico aumenta la patogenicidad del virus y el tropismo tisular. Este poro está correlacionado con el salto entre especies y una eficiente transmisión humano-humano. Con todo esto, vemos que la proteína S está sometida a una enorme presión evolutiva: cualquier cambio en la proteína S tendrá consecuencias en la transmisión e infectividad del virus; es por ello que será la proteína más importante y por lo tanto una posible diana para acabar con el virus.

El virus, mediante la subunidad S1 de la Proteína S, debido a su afinidad, se une al receptor en la célula huésped, (Figura 2), que será la enzima convertidora de angiotensina II, (por sus siglas ECA-2). Esta enzima se encuentra casi en su totalidad en las células pulmonares, por esto el SARS-CoV-2 ataca en su mayoría al sistema respiratorio. Sin embargo, la ECA-2 se encuentra también en menor medida en: intestino delgado, riñones, hígado y testículos; por lo que el virus también puede afectar a estas zonas del organismo; produciéndose en las zonas afectadas: atrofia, fibrosis, inflamación y vasoconstricción, lo que lleva a lesiones tisulares en el ser humano (Umakanthan et al, 2020).

Tras la unión del virus al receptor se produce la entrada del virus en la célula, posteriormente a su internalización mediante endocitosis mediada por el receptor, liberándose posteriormente el material genómico viral, el ARN, en el citoplasma de esta célula huésped.

El genoma viral sufre un proceso de traducción con la posterior formación de proteínas no estructurales, constituyendo el complejo de transcripción de replicación, lo que conduce a la formación de ARN mensajero, codificando las proteínas estructurales y accesorias.

El nuevo ARN viral unido a la proteína N y otras proteínas accesorias es transportado en forma de vesículas desde el retículo endoplasmático y aparato de Golgi de la célula hasta la membrana plasmática, donde se fusionará liberándose fuera de la célula nuevas copias del virus (Chowdhury et al., 2020).

Al igual que en el contacto del organismo ante otros antígenos extraños, se produce una respuesta inmune, tanto humoral, mediada por linfocitos T que ayudados por linfocitos B producirán anticuerpos contra el SARS-CoV-2; como una respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T colaboradores y citotóxicos que por medio de las células presentadoras de antígenos liberarán diferentes citocinas, de forma que las células infectadas por el virus sean destruidas (V'kovski et al., 2021).

Según los datos que se tienen hasta la fecha, la producción de anticuerpos se produce de siete a catorce días desde el contacto con el virus: inmunoglobulina M (al comienzo de la infección), inmunoglobulina G (tras la inmunoglobulina M), e inmunoglobulina A, esta última en mucosas; la cantidad de estas será proporcional a la gravedad de la infección. Así pues, esta combinación de inmunidad celular y humoral será lo que queramos conseguir mediante la vacunación.

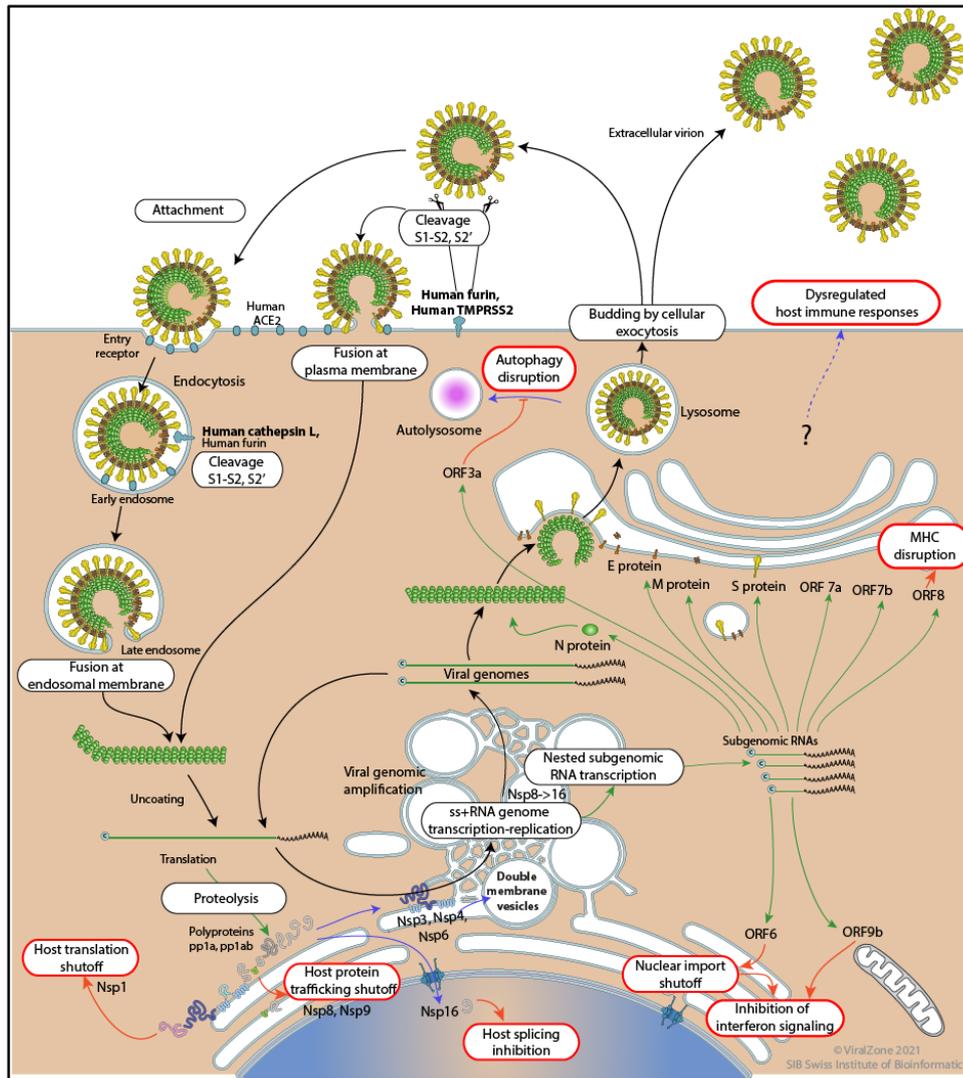


Figura 2. Esquema que muestra el ciclo infeccioso del SARS-CoV-2 al entrar en contacto con una célula del huésped: entrada del virus, replicación y formación de nuevos viriones. Fuente: (ViralZone, 2021).

1.2.3 SARS, MERS y COVID-19

A pesar de conocerse los virus coronavirus desde los años 1960, no fue hasta la pandemia del SARS, comenzada en China en el 2003 por el virus SARS-CoV, y la del MERS en Oriente Medio en el 2012 por MERS-CoV, cuando se empezaron a conocer estos virus más ampliamente. Sin embargo, estas dos pandemias no llegaron a producir consecuencias tan devastadoras como si lo ha hecho el COVID-19, en parte porque no llegaron a propagarse mucho más allá de sus lugares de origen.

En el caso del SARS y MERS sí que se conoce el animal intermedio que introdujo el patógeno en la especie humana, siendo las civetas y los dromedarios respectivamente a partir del murciélago, reservorio habitual de ciertas especies de coronavirus.

Tras la realización de estudios filogenéticos se concluyó que el nuevo SARS-CoV-2 tenía un 79% de similitud con el virus del SARS, y un 50% con el del MERS (Cui et al., 2019) ; con lo

que podemos apreciar las enormes diferencias entre los tres virus, algo que es especialmente llamativo al ver las dianas fisiológicas de estos, ya que aunque SARS-CoV y SARS-CoV-2 se unen a la misma diana, la enzima convertidora de angiotensina, (MERS-CoV se une, por otra parte, a la proteína DPP4, dipeptidil peptidasa-4); SARS-CoV-2 presentará diez veces más afinidad por la ECA-2, con lo que es más patógena, produciendo una conexión pulmonar más grave. Una de las razones de esta mayor afinidad podría ser la presencia en el SARS-CoV-2 del poro de tipo furínico entre las subunidades 1 y 2 de la proteína S, como ya se explicó con anterioridad; y otra sería la presencia de aminoácidos no polares en la proteasa principal dimérica a diferencia de SARS-CoV, con lo que aumentaría la actividad catalítica de esta proteasa en el SARS-CoV-2.

Con lo cual, a pesar de ser virus de la misma familia, sus diferencias tanto en términos epidemiológicos como de patogenicidad son más que notables, no pudiendo interpolar a esta pandemia actual los datos de estas dos anteriores.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE VACUNAS

Ante la falta de tratamiento farmacológico efectivo contra esta enfermedad por la rápida extensión, multiplicación y patogenicidad a nivel mundial del SARS-CoV-2, desde el inicio de la pandemia uno de los principales objetivos ha sido el desarrollo de vacunas que pudieran frenar la alta tasa de contagios y mortalidad (Andersen et al., 2020).

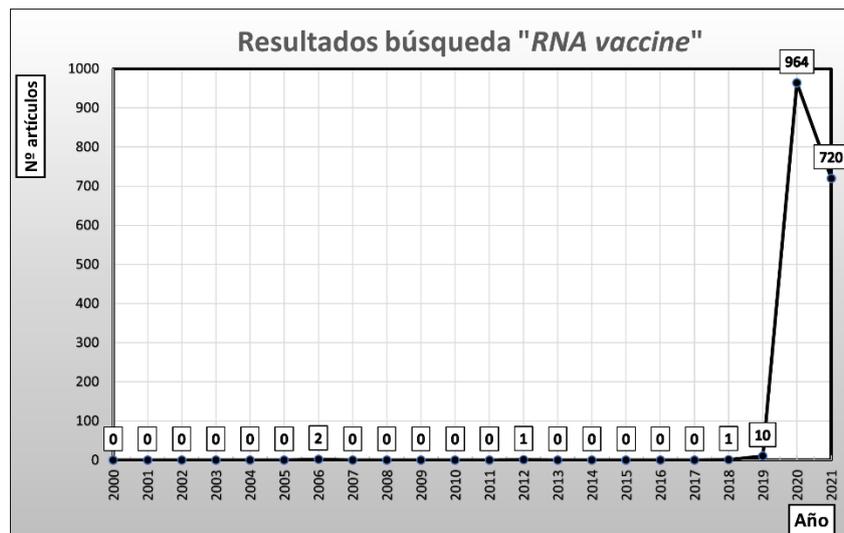
Así, los principales laboratorios farmacéuticos comenzaron su carrera para conseguir la vacuna desde que el virus comenzó a propagarse sin control a nivel mundial, con un importante apoyo económico por parte de los gobiernos.

La urgencia a la hora de obtener una vacuna ha supuesto un cambio de paradigma en lo que se conocía hasta ahora en el desarrollo de vacunas: hemos pasado de obtener una vacuna en una media de 15 años a obtenerla en menos de un año. Esto solo ha sido posible mediante el esfuerzo de muchos organismos que actuando conjuntamente han logrado que los ensayos clínicos de fases 1, 2 y 3 se hayan hecho de forma solapada, con procedimientos más acelerados, y una mayor farmacovigilancia en la fase 4.

Los principales objetivos serán la obtención de una molécula que, administrada de forma segura, eficiente y con una adecuada vía de administración, induzca una respuesta inmune equilibrada en el sujeto, de forma que este pueda adquirir anticuerpos neutralizantes contra el virus SARS-CoV-2, generando en la población en conjunto inmunidad global contra este virus, duradera y eficaz, acabando así con la pandemia COVID-19.

La importancia del uso de vacunas, en especial las vacunas basadas en la incorporación de la tecnología del ARNm (ARN mensajero), se vio reflejado entre diferentes aspectos, en el número de artículos publicados en relación a esta tecnología.

Para ello nos servimos de la herramienta PubMed, donde tras la búsqueda de “*RNA vaccine*” (Gráfica 1), se puede ver el número de artículos publicados a lo largo del tiempo; con ello queda reflejado el interés internacional respecto a esta tecnología vacunal, duplicándose el número de artículos publicados en el último año tras la irrupción de la pandemia COVID-19, ya que como se ha venido comentando, el uso de una posible vacuna siempre ha estado presente para erradicar el virus, y en especial estas vacunas.



Gráfica 1. Relación entre el número de revisiones encontradas con los términos descritos y el año de publicación.

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo principal de esta revisión fue analizar y comparar las diferentes vacunas de ARNm existentes contra el virus SARS-CoV-2, causante de la pandemia COVID-19. Para resolver este objetivo intentaremos responder a dos preguntas:

- ¿Por qué el uso de vacunas contra este virus es la mejor opción a día de hoy?, y una segunda:
- ¿Por qué usar vacunas de ARNm contra el SARS-CoV-2 cuando no existe experiencia previa, y qué ventajas nos aportan estas vacunas de ARNm frente a otra clase de vacunas?

3. METODOLOGÍA

Con el fin de dar respuesta al objetivo de esta revisión se realizó una búsqueda de la literatura publicada hasta la fecha. Para ello, se recopiló la información más relevante en PubMed, consultando también las referencias bibliográficas de los artículos revisados, y adicionalmente, se consultaron diversas revistas científicas como son: Science, Nature, Cell y The Lancet.

Por otra parte, la información más actualizada de las diferentes vacunas analizadas la obtuvimos de: EMA, (por sus siglas en inglés, *European Medicines Agency*, Agencia Europea del Medicamento), FDA, (por sus siglas, Food and Drug Administration), OMS y la Agencia Española del Medicamento.

Para la búsqueda de información en PubMed, se realizó una primera búsqueda de aproximación con la palabra “Vaccine” y “RNA” en la base de datos, filtrando posteriormente los resultados desde el año 2020 a la fecha de consulta (1 de junio de 2021) pulsando en la categoría *Review*, y dentro de las restricciones se seleccionó la opción que mostrara los artículos cuyos términos aparecieran en el título o en el resumen (Title/abstract), obteniendo así 282 resultados, (Figura 3).

```
(vaccine*[Title/Abstract] AND RNA[Title/Abstract]) AND (("2020"[Date - Entry] : "3000"[Date - Entry]))
```

Figura 3. Barra de búsqueda de artículos en la herramienta PubMed con los términos “Vaccine” y “RNA” en el último año.

De esta forma, se obtuvo una búsqueda con un número de artículos abarcables para su revisión, de los que ocho se seleccionaron (Anderson et al., 2020; Khehra et al., 202; Lozano Jiménez et al., 2020; Pandey et al., 2020; Polack et al., 2020; Sahin et al., 2020; Tombácz et al., 2021; Walsh et al., 2020) para así responder al objetivo y las preguntas de esta revisión.

Más adelante se completaron las fuentes de información con la búsqueda de algunos artículos citados o referenciados en estos utilizando la herramienta *Wok of Science*, incluyéndose finalmente todos estos artículos en la bibliografía.

Por último, con el fin de recopilar y almacenar los artículos y demás fuentes bibliográficas, la información fue organizada mediante la herramienta Zotero, gestor de referencias bibliográficas que nos permitió gestionar las diferentes colecciones bibliográficas de las que nos servimos para la realización de este trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la situación de emergencia mundial originada por la pandemia COVID-19, los principales laboratorios a nivel mundial (Callaway, 2020) dispusieron sus medios y fondos a la investigación y posterior desarrollo de una vacuna que pudiera acabar con el virus SARS-CoV-2 tras la ineficacia de los tratamientos farmacológicos existentes.

Así, se teorizaron diferentes tecnologías para poder obtener rápidamente una solución, llegando a la conclusión que una posible vacuna de ARNm, nunca usada hasta la fecha, podría ser de gran utilidad por la rapidez con la que podría obtenerse. Basados en ensayos clínicos realizados con anterioridad, varias empresas farmacéuticas apostaron por el desarrollo de una vacuna de esta categoría.

4.1 PRODUCCIÓN Y DESARROLLO: TECNOLOGÍA DE LAS VACUNAS DE ARNm

4.1.1 ¿POR QUÉ VACUNAS DE ARN?

Las vacunas son consideradas en la actualidad el medio más exitoso para la prevención y control de enfermedades infecciosas. Descubiertas por el médico inglés Edward Jenner a finales del siglo XVIII, se estima que cada año previenen dos millones y medio de muertes en el mundo (De Gregorio y Rappuoli, 2014).

Aunque conocidas con anterioridad, fue a lo largo del siglo XX cuando su uso y desarrollo se generalizó, llegando incluso a la erradicación de enfermedades infecciosas, como es el caso de la viruela (Plotkin, 2014; Tognotti, 2010).

Hasta los años 60, hablábamos de dos tipos de vacunas: vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas; sin embargo, desde la década de 1980, los avances en el conocimiento de la biología molecular y el descubrimiento de nuevas tecnologías de ingeniería genética han permitido el descubrimiento de nuevas formas de vacunas más seguras y efectivas: las basadas en subunidades y péptidos, y por otra parte, los ácidos nucleicos de administración no viral.

Estos últimos, los ácidos nucleicos de administración no viral (tanto ADN como ARN dependiendo de su tipo de azúcar), imitan a la infección por el microorganismo vivo, produciendo una fuerte y amplia respuesta inmune, induciendo la síntesis de antígenos en las células transfectadas; y a diferencia de otras clases de vacunas, su fabricación es segura, y fácilmente escalable a nivel industrial en poco tiempo, es por ello que en la situación de pandemia actual esta fue una de las primeras ideas de vacuna que se manejó (Zhang et al., 2019).

Sin embargo, cabe destacar que las vacunas basadas en ácidos nucleicos de tipo ADN no llegaron a prosperar: ya que por una parte, para poder traducirse a proteínas antigénicas de interés requerían atravesar la membrana plasmática de la célula en cuestión, (Figura 4), atravesar la membrana nuclear, transcribirse a ARNm, regresar al citoplasma y una vez allí iniciar la

traducción en los ribosomas; y por otra parte, a pesar de usar la tecnología de electroporación para poder introducir más fácilmente el material genético, de forma que mejorase la potencia subóptima vista en los primeros ensayos clínicos (Kutzler & Weiner, 2008) ello no disminuyó el riesgo potencial de introducción de ADN exógeno en el genoma del huésped, con el consiguiente riesgo de producir mutagénesis (Tombácz et al., 2021).

Así, han sido únicamente las vacunas basadas en ARNm las que han entrado en los ensayos clínicos que se realizaron, ya que a diferencia de las de ADN, para traducirse a proteínas únicamente requieren atravesar la membrana plasmática de la célula huésped y en el citosol traducirse en los ribosomas, y además, el ARNm no posee el potencial riesgo de producir mutagénesis al no integrarse en el material genético de la célula, degradándose de forma natural (Liu, 2019).

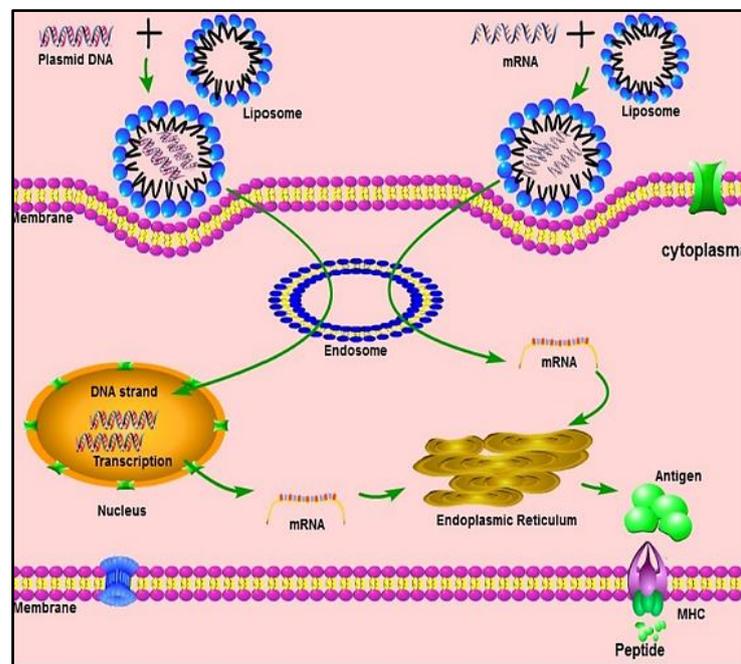


Figura 4. Diagrama que esquematiza la entrada de material genético exógeno, ADN y ARN, mediante la ayuda de partículas lipídicas, y su traducción posterior, mostrando la ventaja que supone incorporar esta información genética en una molécula de ARN frente al uso del ADN (Zhang et al., 2019).

4.1.2 PROYECTOS Y ESTRATEGIAS ACTUALES DE LAS VACUNAS DE ARNm

4.1.2.1 FORMACIÓN Y DISEÑO DE VACUNAS BASADAS EN ARNm

Desde la década de 1990 es conocida la utilidad de las vacunas basadas en esta tecnología para la transferencia activa de información y la producción de antígenos (Wolff et al., 1990), sin embargo, su posible uso clínico no fue demostrado hasta tiempo después, cuando se comprobó que la estabilidad de estas vacunas podía mejorar mediante la optimización y modificación de la secuencia inicial de ARNm (Ross, 1995).

Así, para aumentar la potencia de estas vacunas se vio que era necesario purificar la secuencia de ARNm por HPLC, (por sus siglas en inglés *high-performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución), además de usar nucleósidos modificados para evitar una respuesta inmunogénica por parte de los sensores inmunitarios; y por último, optimizar los codones de la secuencia genética.

La producción de la secuencia de ARNm se realiza mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN linealizado que posteriormente es digerido por ADNasas, purificando el ARNm. Por lo tanto, la fabricación de ARNm mediante transcripción *in vitro* es esencialmente un proceso químico sin componentes animales o celulares (Liu, 2019).

La optimización de la secuencia que codifica el antígeno en cuestión se hará evitando codones extraños, aumentando la producción de proteínas, la cantidad de ARNm y la estabilidad. Adicionalmente, como se indicó, será necesaria una modificación de la secuencia original mediante el cambio de nucleótidos por nucleósidos modificados que permitan obtener la proteína en cuestión en un estado más óptimo, como por ejemplo **pseudouridina**, (Ψ) o **N1-metil-3-pseudouridina**, ($N1m\Psi$), debido a que en diferentes ensayos se demostró que el uso de estos nucleósidos provocaba la no inducción de una respuesta inmunogénica contra el ARNm (Durbin et al., 2016; Karikó et al., 2008); e incluso se observó que aumentaba la capacidad de traducción de esta secuencia (Svitkin et al., 2017).

Finalmente se purifica el ARNm mediante HPLC, evitando la contaminación y formación de ARNm inmaduro, y eliminando el posible ARN de cadena corta o doble. A esta secuencia ya modificada se le añaden señales de protección en el extremo 5' en forma de estructuras Cap, (Caperuza-5'); y en el extremo 3' se le incorpora una cola de poliadeninas, formando una secuencia madura. Si estas modificaciones no se realizasen induciríamos una respuesta inmunogénica innata, interpretando este ARN como foráneo, no consiguiendo la traducción al antígeno de interés (Mandal et al., 2018).

4.1.2.2 ADYUVANTES MOLECULARES: ESTRATEGIAS DE MEJORA DE LA INMUNOGENICIDAD

Para conseguir una correcta distribución de estas vacunas en el organismo, obteniendo una eficiente respuesta inmune, se ha demostrado que el uso de moléculas inmunoestimuladoras codificadas en los plásmidos, lo que conocemos como adyuvantes moleculares, han mejorado la inmunogenicidad (Li y Petrovsky, 2016) condicionando así el direccionamiento subcelular. Algunas de las moléculas usadas son: ligandos de receptores de reconocimiento de patrones; citocinas que harán que se produzca una reacción inflamatoria en el lugar de la inyección; y por último, nanopartículas lipídicas, NPL, (Figura 5), estas últimas serán moléculas de tamaño

nanométrico, compuestas por un núcleo acuoso rodeado de una bicapa lipídica formada por la combinación de distintos lípidos (Hassett et al., 2019; Patel et al., 2019).

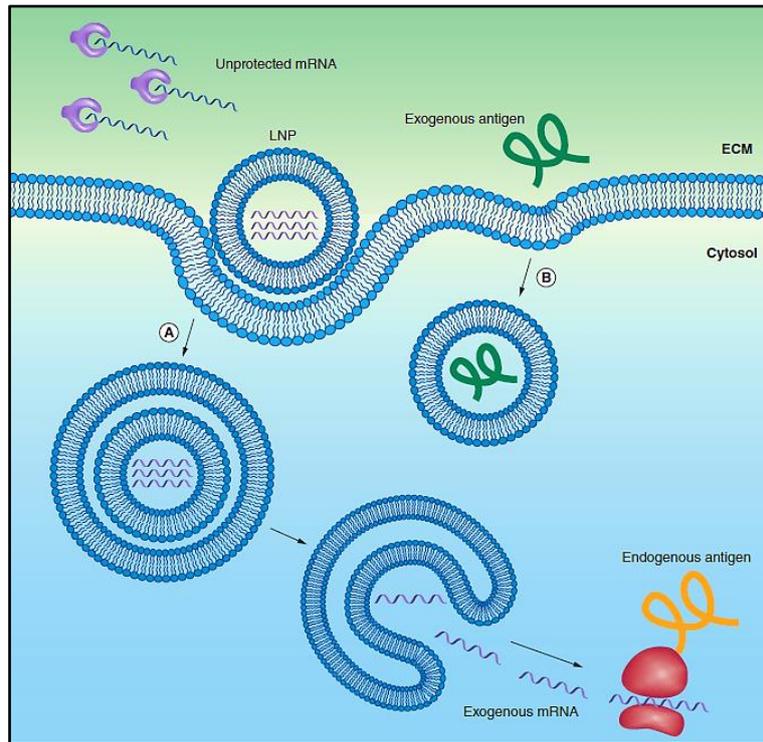


Figura 5. Transfección de NPL en células, liberación del ARNm y traducción a antígenos endógenos (Reichmuth et al., 2016).

A fin de mejorar la inmunogenicidad de este tipo de vacunas una de las estrategias que se desarrolló fue dirigir la expresión de estas moléculas a las células presentadoras de antígenos profesionales, (CPA), principalmente macrófagos y células dendríticas, CD (Démoulin et al., 2017; Reichmuth et al., 2016).

Estas células dendríticas serán el tipo de célula más relevante, expresando el antígeno codificado de forma nativa, procesados por el proteosoma, los epítomos de péptidos generados ingresan en el retículo endoplasmático donde se cargan en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I, (CMH-I), transportándose a la superficie, (Figura 6), y una vez allí serán presentadas a los linfocitos T CD8 junto con señales estimuladoras (Heath y Carbone, 2001; Swartz, 2001).

Para conseguir que la vacuna se dirija a estas células presentadoras de antígenos, que se encuentran en mayor concentración en los ganglios linfáticos, lo más efectivo será diseñar nanopartículas lipídicas que se acumulen en los ganglios. Según diferentes estudios, el tamaño aproximadamente ideal para que las nanopartículas se acumulen en los ganglios y no en el lugar de la inyección sería de un diámetro inferior a 150 nanómetros (Oussoren et al., 1998), ya que un

tamaño mayor podría provocar su reconocimiento por parte del sistema inmune y posterior eliminación (Ishida et al., 2002).

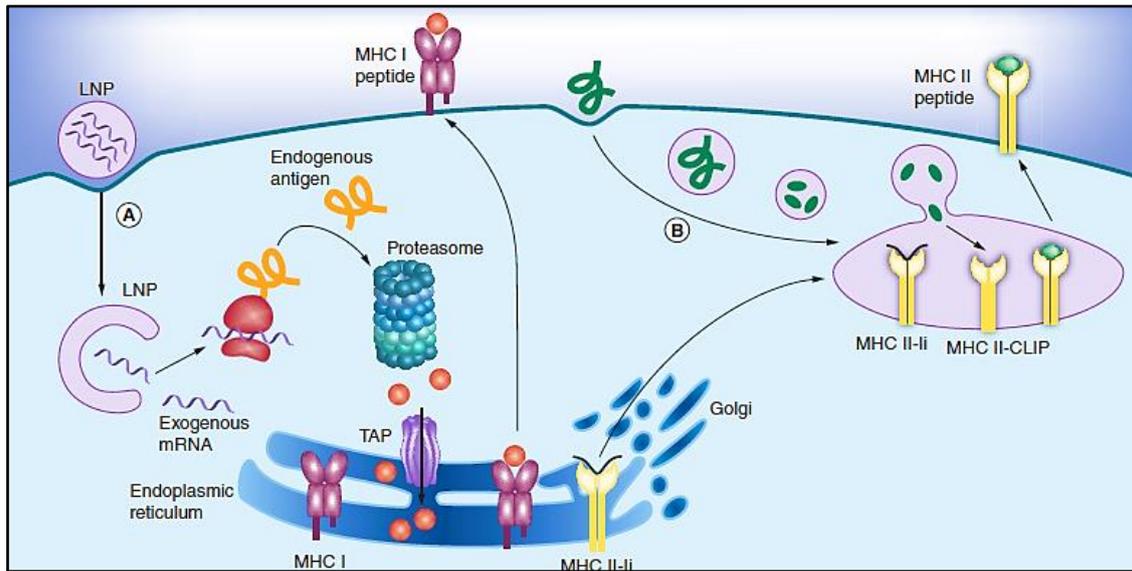


Figura 6. Presentación en una célula dendrítica de los antígenos codificados por el ARNm encapsulado en NPL, (en la imagen LNP), tras su traducción en los ribosomas de la célula huésped, procesados por los CMH-I y CMH-II (Reichmuth et al., 2016).

En estas CPA, los receptores endosomales tipo Toll, (TLR, por sus siglas en inglés *Toll-like Receptor*, Receptor tipo Toll), serán una clase de receptores expresados encargados de reconocer motivos moleculares conservados estructuralmente procedentes de patógenos. Estos TLR serán el objetivo del desarrollo de adyuvantes porque, al ser activados estos receptores, se producirán las citocinas que desencadenen la inflamación. La inclusión de adyuvantes con las NPL proporciona una forma de aumentar la potencia de la vacuna y guiar la respuesta inmune en la dirección deseada. Sería de esperar que los agonistas de estos TLR pudieran adaptarse para la formulación en NPL.

A la hora de formular estos adyuvantes será muy relevante conocer la farmacocinética y biodistribución de las nanopartículas, que varía significativamente al variar la densidad de los azúcares que la recubren; viéndose una mayor especificidad por las células dendríticas cuando un 11% de los lípidos estén manosilados (Perche et al., 2011). El papel del uso de los adyuvantes integrados dentro de estas propias nanopartículas estará muy condicionado por el efecto depósito que produzcan, prolongando la exposición al antígeno (Reichmuth et al., 2016). Por ello, es fundamental el recubrimiento de las nanopartículas, que podrá ser mediante:

- **Polietilenglicoles, PEG.** recurriendo a la pegilación mejorada. La molécula se deposita en la superficie de las nanopartículas por la zona lipídica. Con estos se estabiliza estéricamente la NPL y hace que disminuya la unión no específica a proteínas. Estos

influirán mucho en las propiedades de las nanopartículas ya que un mayor contenido suele aumentar el tiempo de circulación sanguínea, reduciendo a su vez la captación celular y la interacción con la membrana lisosomal.

- **Lípidos ionizables** con grupos amina que mantienen una carga superficial neutra o levemente catiónica a pH fisiológico. Así, disminuyen las interacciones inespecíficas lípido-proteína y facilita la liberación de oligonucleótidos en el citosol. Se ha demostrado que las NPL con lípidos catiónicos activan el receptor TLR4 e inducen una fuerte respuesta proinflamatoria con citocinas de tipo TH1 (Reichmuth et al., 2016).
- **Fosfolípidos** con un papel estructural por el grupo fosfato que poseen, que cargado negativamente, ayuda a la neutralización de la carga catiónica.
- **Colesterol**, será el elemento estabilizador de las NPL. A más cantidad de colesterol menor será la temperatura de fusión, lo que facilitará la entrada del ARNm en la célula.

4.1.3 RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR VACUNAS DE ARNm

Antes de comentar la respuesta inflamatoria que producen este tipo de vacunas, será importante conocer los diferentes sensores de ARN que encontramos en el organismo (Zhang et al), que serán por una parte la familia de receptores RIG-I (por sus siglas en inglés *retinoic acid-inducible gene-1*), y por otra los TLR anteriormente mencionados.

La familia de receptores RIG-I funcionará como un receptor de reconocimiento de patrones, RRP. Así, dentro de esta familia encontraremos al receptor RIG-I que reconocerá principalmente ssRNA, (por sus siglas en inglés *single-stranded RNA*, ARN monocatenario), y dsRNA, (por sus siglas en inglés *double-stranded RNA*, ARN de doble cadena o bicatenario), con 5' trifosfato, que desencadena la producción de interferones, IFN; otro receptor que encontremos será el MDA5, un sensor de ARN citosólico que detectará ARN de doble cadena producido durante la replicación de virus de ARN.

Por otro lado, los receptores endosomales tipo Toll, los TLR, se encuentran en el compartimento endosómico de las células presentadoras de antígenos profesionales, donde habrá varias clases de receptores TLR: TLR3 que reconocerá dsRNA mayores de 45 pares de bases y dsRNA derivado del monocatenario; TLR8 activado por ARN ricos en poliuridinas, guanosinas y uridinas, y ARN monocatenario; y por último el más destacado, el receptor TLR7, que se puede unir tanto a ARN monocatenario como ARN de doble cadena, siendo activado por ARN ricos en poliuridinas, guanosinas o uridinas, la activación de este receptor hará aumentar la presentación de antígenos, promoviendo la secreción de citocinas y aumentando la respuesta inmune celular. Así, las vacunas de ARNm pueden estimular la inmunidad innata a través de los receptores RIG-I, MDA5, TLR3, TLR7 Y TLR8.

Dentro de las CPA, las células dendríticas expresarán el antígeno codificado en el ARNm de forma nativa, estos serán procesados en el proteosoma, generándose epítomos específicos, que

se cargarán en moléculas de CMH-I, trasportándose a la superficie de la célula, de forma que serán presentados a linfocitos TCD8; y por otra parte, las células del CMH-II presentarán en su superficie antígenos específicos. Los linfocitos T promoverán la activación de linfocitos B, de forma que se generen anticuerpos específicos contra el antígeno en cuestión.

La inducción de una respuesta inmunitaria en mayor o menor medida dependerá principalmente de la vía de administración, calidad del ARNm y el vehículo de administración; por lo tanto, en base a los ensayos realizados se vio que:

- El *ARNm modificado con pseudouridina* y purificado con HPLC puede disminuir la activación inmunitaria y aumentar la estabilidad y expresión del antígeno.
- El *ARNm encapsulado con nanopartículas lipídicas* induce una potente respuesta de ayuda folicular, induciendo un alto número de linfocitos B que producirán anticuerpos neutralizantes de larga duración y alta afinidad (Midoux y Pichon, 2015).

Después de la inyección intramuscular del ARNm encapsulado en nanopartículas lipídicas, las células y ganglios del lugar de la inyección, (en su mayoría células dendríticas y macrófagos), absorben estas nanopartículas, distribuyéndose la secuencia del ARNm en el interior.

En el citosol de la célula transferida, se produce la traducción de la secuencia codificada, expresándose los antígenos en la superficie de la célula en la orientación adecuada. De esta forma, la proteína funcional se expresa en la superficie, y mediante presentación a células TCD8 se produce un aumento de citocinas que provocará la activación de células B, creadoras de anticuerpos específicos contra este antígeno.

4.2 VACUNAS DE ARNm EXISTENTES FRENTE A COVID-19

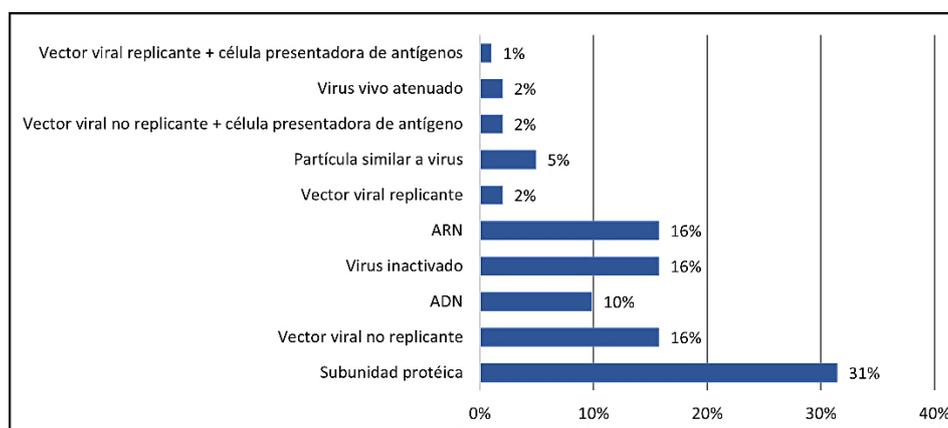
4.2.1 VACUNAS APROBADAS EN LA UNIÓN EUROPEA: CARACTERÍSTICAS, DIFERENCIAS, EFICACIA Y SEGURIDAD.

A fecha de 1 de junio de 2021(OMS) hay 102 vacunas candidatas en desarrollo clínico contra el SARS-CoV-2, de las cuales 16 se basan en la tecnología del ARN, (Gráfica 2), de las que solo se encuentran actualmente dos vacunas comercializadas y autorizadas para su uso: Comirnaty® y COVID-19 Vaccine Moderna ®.

Junto a estas dos mencionadas, la Agencia Europea del Medicamento también autorizó la comercialización de otras dos vacunas para su uso debido a la situación de emergencia sanitaria, tras finalizar con éxito las diferentes fases de desarrollo clínico, basadas en este caso en vectores virales:

Vaxzevria®: Vacuna compuesta por un vector único de adenovirus de chimpancé recombinante y no replicativo. Codifica la proteína S y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes contra esta.

COVID-19 Vaccine Janssen®: Vacuna monovalente recombinante compuesta por un vector de adenovirus humano no replicativo. Codifica la proteína S, estimulando la producción de anticuerpos neutralizantes contra la misma.



Gráfica 2. Porcentaje de vacunas contra la COVID-19 según el tipo de tecnología, que se encuentran a fecha de 1 de junio de 2021 en fase de ensayos clínicos (OMS,2021).

Debido a la situación de emergencia global, la EMA recomendó otorgar una autorización de comercialización condicional para estas vacunas, esta autorización de comercialización condicional es uno de los mecanismos regulatorios de la Unión Europea para facilitar un acceso temprano a medicamentos que satisfacen una necesidad médica insatisfecha, como es en el caso de situaciones de emergencia como la actual; debido a este tipo de comercialización, las empresas deben seguir proporcionando los resultados de los ensayos y estudios adicionales que se lleven a cabo durante los dos años posteriores a su comercialización.

Así, la seguridad y eficacia de estas vacunas se seguirá controlando a medida que avance la vacunación en los países miembros de la Unión Europea a través del sistema centralizado de

farmacovigilancia de la UE. En cualquier caso, es importante destacar que al haberse acortado los plazos de los ensayos clínicos y encontrarse todas las autorizadas en fase clínica IV, todas ellas estarán sujetas a un seguimiento adicional, de forma que se detecten antes las reacciones adversas y que estas sean notificadas en la mayor brevedad.

4.2.1.1 COMIRNATY®

Esta vacuna debe su nombre al término *comunidad*, Co, seguido de *RNA*m, y del sufijo ty. De nombre genérico Tozinameran, (BNT162b2), fue desarrollada por la empresa farmacéutica estadounidense Pfizer junto con la alemana BioNTech. Autorizada para su uso por la EMA el 21 de diciembre de 2020, fue la primera vacuna aprobada contra el virus en la Unión Europea, administrada por primera vez el 17 de diciembre de 2020. Su uso está aprobado en todas las personas mayores de 12 años tras la ampliación de su uso original que comprendía a los mayores de 16 años (AEMPS, 2021).

Se trata de un concentrado para dispersión inyectable por vía intramuscular, en forma de viales multiusos que deben ser diluidos antes de su administración con 1,8ml de una solución inyectable de cloruro sódico al 0,9%. El vial descongelado puede estar entre 2 a 8 grados, transportándose por un máximo de 12 horas, y antes de su uso, el vial sin abrir se puede conservar durante un máximo de 2 horas a temperaturas de hasta 30 grados. Se administrarán dos dosis de 0,3 ml cada una, una dosis equivalente de 30 microgramos de ARN, administrándose la segunda dosis a las 3 semanas después de haber recibido la primera, suponiendo un 95% de eficacia según los resultados que se obtuvieron en los ensayos clínicos.

Para su desarrollo industrial se partió de dos moléculas candidatas: BNT162b1 y BNT162b2 (Walsh et al., 2020). La primera, BNT162b1, codificaba un dominio del virus de unión al receptor, el RBD, (por sus siglas en inglés: *Receptor binding domain*); por otro lado, BNT162b2 codificaba una proteína S (conocida como proteína espina), de longitud completa, con la conformación de perfusión estabilizada anclada a la membrana.

Mediante la realización de dos estudios paralelos en los que se evaluaron los perfiles de seguridad e inmunogenicidad por una parte; y la eficacia por otra, se escogió finalmente BNT162b2 como molécula candidata para la continuación de los ensayos clínicos de fase 2-3. Esta decisión se basó en un perfil de reactividad sistémica más leve, con un balance más favorable para la molécula BNT162b2 en términos de respuesta inmune y toxicidad (Walsh et al., 2020).

SEGURIDAD

La seguridad de la vacuna Comirnaty® administrada en dos dosis, con 21 días de diferencia se evaluó mediante dos estudios de fase 1, y un estudio de fase 2/3. El primer ensayo de fase 1 se realizó en abril de 2020 en Alemania; y con posterioridad, en Estados Unidos se

procedió a un ensayo fase 1/2 que más adelante se amplió a un estudio de fase 3 global. Se estudiaron dos grupos de edad por separado: de 18 a 55 años y de 65 a 85; sin embargo, esta fase se modificó primero incluyendo en el primer grupo a adolescentes de 16 a 18 años, y más adelante se amplió incluyendo también a sujetos mayores de 12 años. Finalmente los 43.448 sujetos de forma aleatorizada recibieron dosis de 30 microgramos de BNT162b2 o placebo. Entre los sujetos de estudio, se incluyeron individuos que poseían comorbilidades asociadas al COVID-19. En general se observó un perfil de reactogenicidad similar al de otras vacunas, con una frecuencia de eventos adversos notificados bajos, siendo similares en los subgrupos de población, y las reacciones adversas generalmente locales, y las sistémicas transitorias y de corta duración, todas ellas de intensidad leve a moderada, destacando que las reacciones más leves se dieron en aquellos sujetos mayores de 55 años (Polack et al., 2020).

Con los estudios sobre seguridad se obtuvo también la información referente a los eventos de reacciones adversas. Los efectos secundarios adversos notificados más comunes fueron generalmente leve o moderados, mejorando en los días posteriores a la vacunación. Los que se dieron con mayor frecuencia fueron: en más de un 80% de los sujetos en estudio dolor en el lugar de inyección; en más de un 60% fatiga; en más de un 50% cefalea; en un 30% de los sujetos mialgia y escalofríos; en un 20% artralgia; y en más de un 10% fiebre e hinchazón en el lugar de la inyección. Junto a los ya nombrados, se dieron otras reacciones adversas de menor frecuencia, descritas en la Tabla 3, tratándose de efectos secundarios de leve a moderados que desaparecieron a los pocos días.

	Muy frecuentes	Frecuentes	Poco frecuentes	Raras	Muy raras	Frecuencia desconocida
Trastornos sanguíneos			Linfadenopatías			
Trastornos sistema inmunológico			Reacciones de hipersensibilidad: Erupciones cutáneas, prurito, urticaria, angioedema, etc.			Reacciones anafilácticas
Trastornos psiquiátricos			Insomnio			
Trastornos sistema nervioso	Cefalea			Parálisis facial periférica aguda		
Trastornos gastrointestinales	Diarrea	Náuseas Vómitos				
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	Artralgia Mialgia		Dolor en las extremidades			
Trastornos generales y en el lugar de inyección	Fatiga Escalofríos Fiebre (2ª dosis) Inflamación en el lugar de inyección	Eritema en el lugar de inyección	Malestar general Prurito en el lugar de inyección			

Tabla 3. Reacciones adversas producidas por la vacuna Comirnaty® (EMA,2020).

EFICACIA

La eficacia de la vacuna se evaluó en una población de 36.621 participantes. Aunque en un primer momento el estudio solo incluiría individuos de 18 hasta 85 años, finalmente este estudio se amplió en dos ocasiones incorporando primero a jóvenes desde los 16 años en adelante y posteriormente a mayores de 12 años; siendo toda esta población conformada por individuos sin evidencia de infección previa por SARS-CoV-2

De forma aleatorizada se distribuyó la población administrando placebo en 18.379 participantes y en los restantes 18.242 la molécula BNT162b2. Finalmente se concluyó que la eficacia protectora de la vacuna fue de un 95,5% 7 días después de la administración de la segunda dosis, no observándose diferencias clínicas significativas en esta eficacia global en aquellos participantes con alto riesgo de aparición de COVID-19, o aquellos que presentaban una o más comorbilidades.

Se demostró así una excelente eficacia de la vacuna en sujetos sin evidencia de infección previa, 95.0% (IC 95%: 90.3%, 97.6%), con resultados similares en los diferentes subgrupos de estudio. No conociéndose por otra parte, la duración de la protección por la vacuna.

EXCIPIENTES Y ADYUVANTES

La vacuna está conformada por una molécula activa, BNT162b2 envuelta en una mezcla de nanolípidos para permitir la transfección de esta en las células del huésped, y evitar la degradación del material genético por ARNasas presentes en el organismo; esta molécula nanolipídica se fusionará con las membranas plasmáticas de las células del huésped, trasladándose la molécula de ARNm al citosol en el interior celular, donde se traducirá hasta la conformación de proteína S cuya información genética contiene. La NPL será una mezcla conformada por: ALC-0315, ALC-0159, DSPC y colesterol.

- **ALC-0315:** ((4-hidroxibutil)azanodiil)bis(hexano-6,1-diil)bis(2-hexildecanoato).

Se trata de un lípido novedoso, fabricado para esta vacuna en concreto. Será un lípido funcional catiónico formado por una amina terciaria y dos restos de éter, (Figura 7). Será el principal impulsor de la administración, porque aporta a las nanopartículas lipídicas carga neutra en el entorno fisiológico, de forma que facilita la inmunización, ya que el entorno fisiológico exhibe carga positiva, mientras que el ARNm presenta carga negativa.

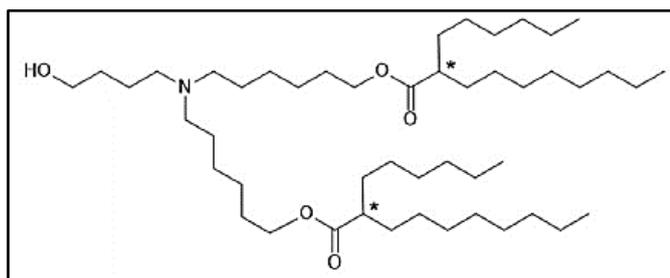


Figura 7. Lípido ALC-0315 (EMA, 2020).

Se observó una elevada reactividad para tanto reacciones locales como reacciones adversas sistémicas, en especial después de la segunda dosis; sin embargo, estas fueron en su mayoría reacciones de leves a moderadas, y desaparecieron a los pocos días, (de media tardaron en desaparecer estos efectos de uno a tres días).

Los participantes mayores de 65 años mostraron una menor frecuencia de reacciones adversas relacionadas con el lugar del pinchazo, siendo por el contrario, similar la incidencia de hipersensibilidad en ambos grupos de edad. Así, se consideró favorable el perfil de seguridad mostrado por la vacuna (Baden et al., 2021).

En los estudios de seguridad de la vacuna también se obtuvo información sobre los eventos de reacciones adversas. Los efectos secundarios más comunes de la vacuna COVID-19 Vaccine Moderna® fueron generalmente leves o moderados y mejoraron unos días después de la vacunación. Los efectos secundarios más comunes fueron dolor e hinchazón en el lugar de la inyección, cansancio, escalofríos, fiebre, ganglios linfáticos inflamados o sensibles debajo del brazo, dolor de cabeza, dolor muscular y articular, náuseas y vómitos (Tabla 4); siendo estas por lo general de intensidad leve a moderada, remitiendo a los pocos días de la vacunación.

Las reacciones adversas notificadas con más frecuencia fueron dolor en el lugar de la inyección (92 %), fatiga (70 %), cefalea (64,7 %), mialgia (61,5 %), artralgia (46,4 %), escalofríos (45,4 %), náuseas/vómitos (23 %), hinchazón/sensibilidad axilar (19,8 %), fiebre (15,5 %), hinchazón en el lugar de la inyección (14,7 %) y enrojecimiento (10 %).

	Muy frecuentes	Frecuentes	Poco frecuentes	Raras	Muy raras	Frecuencia desconocida
Trastornos sanguíneos	Linfadenopatía axilar en el lugar de inyección					
Trastornos sistema inmunológico						Anafilaxia Hipersensibilidad
Trastornos sistema nervioso	Cefalea			Parálisis facial periférica aguda		
Trastornos gastrointestinales	Náuseas Vómitos					
Trastornos musculoesqueléticos y del tejido conjuntivo	Artralgia Mialgia					
Trastornos de la piel y tejido subcutáneo		Erupción cutánea				
Trastornos generales y en el lugar de inyección	Dolor en el lugar de la inyección Fatiga Escalofríos Fiebre Hinchazón en el lugar de inyección	Eritema en el lugar de inyección Urticaria en el lugar de la inyección Erupción en el lugar de la inyección	Prurito en el lugar de inyección	Hinchazón facial		

Tabla 4. Reacciones adversas notificadas de la vacuna Covid-19 Vaccine Moderna®, (EMA, 2021).

EFICACIA

La eficacia de la vacuna mRNA-1273 se analizó en un estudio de fase 3 multicéntrico, aleatorizado, estratificado, ciego y controlado con placebo. Para ello, se analizó la eficacia en 30.351 sujetos mayores de 18 años, independientemente de que hubieran pasado una infección previa por SARS-CoV-2, incluyendo a sujetos que poseían factores de riesgo para padecer una COVID-19 de mayor gravedad, como fue el caso de sujetos que padecían sobrepeso, diabetes, pacientes portadores del virus VIH, etc.

Con los datos obtenidos en el estudio, se observó una robusta y elevada acción protectora de la vacuna desarrollada por Moderna, mostrando una eficacia contra el SARS-CoV-2 de (94.1% CI 89.3, 96.8). Mostrando también una acción protectora frente a posibles casos graves de COVID-19 incluso en grupos de riesgo.

EXCIPIENTES Y ADYUVANTES

La molécula CX-024414 se envolvió en una nanogota lipídica para su correcta distribución y absorción sistémica compuesta por la mezcla de varios nanolípidos, entre los que se encontraron compuestos de nueva fabricación, diseñados únicamente para esta vacuna. Los componentes de la NPL fueron:

- **SM-102:**(heptadecano-9-il8-{(2-hidroxi)etil}[6-oxo-(undeciloxi)hexil]amino}octanoato). Lípido ionizable fabricado por la empresa. Cargado positivamente para impulsar a los lípidos a interactuar electrostáticamente con el ARNm, (Figura 9). Al ser un lípido de nueva creación, su seguridad fue analizada y revisada (EMA, 2021).

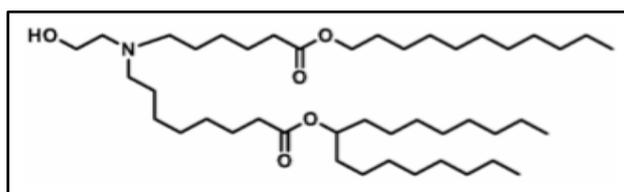


Figura 9. Lípido SM-102, (EMA, 2021).

- **PEG 2000-DMG:** 1,2-Dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli(etilenglicol)-2000. Lípido polietilenglicol conjugado, que confiere estabilidad estérica a las nanopartículas. Se trata de otro excipiente de nueva creación, (Figura 10).

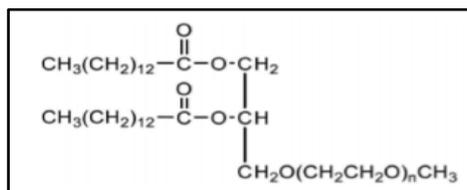


Figura 10. Lípido PEG 2000-DMG, (EMA, 2021).

- **DSPC:** 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Será un lípido auxiliar zwitteriónico, aumentará las propiedades fuso-génicas de las partículas.
- **Colesterol:** Proporciona estructura y estabilidad fisicoquímica a la molécula nanolipídica y a la de ARNm.

Además de los elementos que encontramos en la NPL, los otros excipientes serán: clorhidrato de trometamol, ácido acético, acetato de sodio dihidrato, sacarosa y agua para inyectables. Teniendo la vacuna un pH 7-8, adecuado para la administración intramuscular de esta vacuna desarrollada por el laboratorio Moderna.

4.2.2 FUNDAMENTOS COMUNES DE LAS VACUNAS COMERCIALIZADAS BASADAS EN LA TECNOLOGÍA DEL ARNm CONTRA EL SARS-CoV-2

MODIFICACIÓN SECUENCIA ARN EN LA VACUNA FINAL

Se basan en una molécula de ARNm de nucleósidos modificados, encapsulada en una NPL, que codifica la glicoproteína S del virus SARS-CoV-2, escogida en base a la secuencia original disponible del virus: *SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolate Wuhan-Hu-1, Complete Genome, 2020)*, de 29903 nucleótidos. De esta secuencia de ARN original se aisló la secuencia correspondiente a la glicoproteína S, la que se encuentra entre las bases: 21563-25384, siendo en total formada esta proteína por 3822 bases.

Para bloquear la conformación de la proteína S en el estado de perfusión con el receptor, la ECA-2, la secuencia original fue modificada en las bases 986 y 987 cambiando una lisina y una valina por dos prolinas, de forma que se obtuvo una proteína S con el ectodominio estabilizado (Wrapp et al., 2020).

Para evitar una respuesta inmunogénica innata, se cambiaron los nucleósidos uridina por N1metil-3-pseudouridina, mejorando la capacidad de traducción por una parte, y evitando el reconocimiento por parte del sistema inmune por otra. Tras lo cual se añadieron señales de protección en el extremo 5, Cap, y una cola de poliadeninas en el extremo 3. Habrá también en el extremo 5 una región UTR no traducida y un codón de señal optimizado. Por otra parte, en el extremo 3 a parte de la cola poli-A, habrá otra región UTR no traducible, (Figura 11). La glicoproteína S original no es igual a la final, habrá un 99,84% de similitud.



Figura 11. Secuencia general del ARNm exógeno que codificará el antígeno de interés, en este caso la proteína Spike del SARS-CoV-2, al traducirse en los ribosomas de las células del huésped, previa internalización en el citosol (García-Arriaza et al., 2021)

FUNDAMENTO DEL USO DE LA PROTEÍNA S DEL SARS-COV-2 COMO ANTÍGENO

Desde un primer momento, se escogió la proteína S como antígeno para las hipotéticas vacunas debido al importante papel que esta proteína juega en el ciclo del virus. En primer lugar, en el interior de esta proteína será donde se encuentre la subunidad encargada de la unión a la diana del organismo, la enzima convertidora de angiotensina, y por otra parte, también es en esta proteína donde esta unión proteína-receptor es catalizada.

Además, cabe destacar su posición dentro de la estructura viral, se encuentra en el extremo de su cápsula, es por tanto la proteína más visible y la que antes es reconocida y caracterizada por los diferentes sistemas de reconocimiento inmune del organismo (Lozano Jiménez et al., 2020).

Por todo ello, para que una posible vacuna fuera eficaz, era casi imprescindible que el antígeno que se administrase contuviese la información relativa a la proteína S, ya que esta será la diana terapéutica principal.

MECANISMO ACCIÓN

El mecanismo de acción de ambas vacunas es el mismo. El material genético, que en nuestro caso es ARNm, se encuentra encapsulado en NPL de diferente composición según la vacuna. Tras la inyección, las células dendríticas y macrófagos del sitio de inyección absorberán estas NPL, entregando el contenido al citosol de estas células, donde cerca del retículo endoplasmático, en los ribosomas, esta secuencia será traducida, expresándose el antígeno proteico codificado por la misma, que será la proteína S en la orientación adecuada; tendremos así en la superficie celular la proteína S funcional unida a la membrana celular de estas células parte del CMH-I, que serán reconocidas por linfocitos T y B, derivando en la producción de anticuerpos neutralizantes contra este antígeno por parte de estos linfocitos B, obteniendo inmunidad celular (Sahin et al., 2020).

Las vacunas de ARN administradas en cuya formulación encontramos NPL, por vía IM producen una inflamación local transitoria, que impulsa el reclutamiento de neutrófilos y células presentadoras de antígenos en el sitio de la inyección. Las CPA reclutadas serán capaces de captar las NPL y expresar las proteínas, y posteriormente pueden migrar a los ganglios linfáticos de drenaje local donde se produce el cebado de células T. Generalmente, después de la endocitosis de las NPL, el ARNm se libera del endosoma al citosol de la célula (Maruggi et al., 2019; Pardi et al., 2015).

4.2.3 PRÓXIMAS VACUNAS DE ARNm CONTRA EL COVID-19

A fecha de uno de junio de 2021, (OMS, 2021), las vacunas basadas en la tecnología de ARNm más destacadas contra el SARS-CoV-2 que se encuentran en los niveles III y II de ensayos clínicos, y por lo tanto las que más próximas se deben encontrar para su comercialización futura son las siguientes:

CVnCoV:

Conocida también como *zorecimeran*, fue desarrollada por la empresa biofarmacéutica alemana CUREVAC. Destaca que el contenido de su vacuna sea ARNm no modificado, a diferencia de las vacunas de Comirnaty y moderna, ya que afirman que las modificaciones en el ARN van a ser innecesarias (Rauch et al., 2021).

Se compone de NPL no modificadas químicamente, con el ARNm que codifica la proteína S con dos prolinas mutadas, estabilizando la conformación de la proteína que se une al receptor endógeno, la ECA-II.

En diferentes ensayos preclínicos se demostró la eficacia de esta vacuna para provocar una respuesta inmune adaptativa adecuada. Así, se trata de una prometedora vacuna, potente y segura respaldada por los datos preclínicos, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III, y en revisión por parte de la Agencia Europea del Medicamento.

arCOV:

Conocida como *Walvax*, esta vacuna de origen chino se encuentra en fases de investigación tras su desarrollo conjunto por AMS, (por sus siglas en inglés: *Academy of Military Science of the Chinese People's Liberation Army*), Suzhou Abogen Biosciences y Walvax Biotechnology; actualmente se encuentra en proceso de investigación clínica de fase III. Destaca que a diferencia de otras, eligió la secuencia de antígeno RBD para inducir anticuerpos neutralizantes en el organismo con un menor daño que las basadas en la proteína S, de mayor inmunogenicidad, (Liu et al., 2020). Con probada eficacia y efectividad en los ensayos realizados, es una vacuna muy prometedora en la lucha contra la pandemia COVID-19.

Otras de las vacunas que se encuentran en ensayos de investigación clínica aunque menos avanzadas serán las siguientes: *ARCT-021*, *LNP-nCoVsaRNA*, *ChulaCoVmRNA vaccine*, *PTX-COVID19-B*, *CoV2-SAM*, *MRT5500*, *DS-56709*, *HDT-301*, *EXG-5003*.

4.3 VACUNAS DE ARNm: UNA VISIÓN AL FUTURO

El uso de la tecnología del ARNm para el desarrollo de vacunas pasó en menos de un año de ser una simple prometedora técnica a ser una realidad que supuso un tratamiento eficaz (Verbeke et al., 2021), por la autorización del uso de emergencia de dos vacunas basadas en esta tecnología en la UE, tras la demostración mediante ensayos preclínicos y clínicos de su eficacia, seguridad y efectividad contra el virus SARS-CoV-2, destacando la rápida producción y escalabilidad que estas vacunas alcanzan.

La información obtenida hasta la fecha no cabe duda que contribuirá al diseño de futuras vacunas de ARNm y al conocimiento de sus efectos inmunológicos, no solo frente al COVID-19, sino para otras enfermedades infecciosas como la provocada por el virus VIH, y de forma más destacada, su posible uso en oncología (Sahin et al., 2020), contra la proliferación de células tumorales en pacientes con expresión mutada de genes oncogénicos basándose en neo-antígenos (Esprit et al., 2020), que promoviendo una respuesta inmune adaptativa que de forma selectiva atacara a las células cancerosas, consiguiera erradicar la tumoración en el organismo.

Es por esto que el uso de estas vacunas, impulsado por la emergencia del COVID-19, no ha hecho más que comenzar, y se prevé un futuro muy prometedor para su uso en terapias e infecciones que hasta la fecha carecen de tratamiento efectivo.

5. CONCLUSIONES

El desarrollo de las vacunas de ARNm se debe a una investigación previa básica de décadas, que ha permitido su diseño y desarrollo de forma rápida. Sin embargo, ha sido solo en estos dos últimos años cuando esta información ha sido recogida en forma de revisiones.

Actualmente en la lucha contra la pandemia COVID-19, en la Unión Europea disponemos de dos vacunas de gran eficacia basadas en esta tecnología de ARNm que fueron desarrolladas en un plazo inferior a un año.

Así podemos afirmar que las vacunas que basan su tecnología en el ARNm suponen una herramienta rápida y flexible en el control de la transmisión del virus SARS-CoV-2.

Finalmente junto con el gran avance en la erradicación de la pandemia que estas vacunas han supuesto, también se pone de manifiesto el descubrimiento de una técnica vacunal que en el futuro podría ser de gran utilidad en la erradicación de enfermedades infecciosas y oncológicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS [en línea]. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
2. Agencia Europea del medicamento, EMA. Human regulatory, COVID-19 vaccines [en línea]. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines>.
3. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. 2020; 26(4):450-2.
4. Anderson EJ, Roupahel NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, et al. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med*. 2020; 383(25):2427-2438.
5. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403-16.
6. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. *Nature*. 2020; 580(7805):576-7.
7. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020; 92(4):418-23.
8. Chowdhury MA, Hossain N, Kashem MA, Shahid MdA, Alam A. Immune response in COVID-19: A review. *J Infect Public Health*. 2020; 13(11):1619-29.
9. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(3):181-92.
10. De Gregorio E, Rappuoli R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(7):505-14.
11. Démoulin T, Englezou PC, Milona P, Ruggli N, Tirelli N, Pichon C, et al. Self-Replicating RNA Vaccine Delivery to Dendritic Cells. En: Kramps T, Elbers K, editores. *RNA Vaccines*. New York, NY: Springer New York; 2017 p. 37-75.
12. Durbin AF, Wang C, Marcotrigiano J, Gehrke L. RNAs Containing Modified Nucleotides Fail To Trigger RIG-I Conformational Changes for Innate Immune Signaling. *mBio*. 2016; 7(5).
13. Esprit A, de Mey W, Bahadur Shahi R, Thielemans K, Franceschini L, Breckpot K. Neo-Antigen mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4):776.

14. García-Arriaza J, Garaigorta U, Pérez P, Lázaro-Frías A, Zamora C, Gastaminza P, et al. COVID-19 Vaccine Candidates Based on Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the SARS-CoV-2 Spike Protein Induce Robust T- and B-Cell Immune Responses and Full Efficacy in Mice. *J Virol*. 2021; 95(7).
15. Hassett KJ, Benenato KE, Jacquinet E, Lee A, Woods A, Yuzhakov O, et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 15:1-11.
16. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2001; 1(2):126-34.
17. Hussain MA, Yadav S, Hadda V, Suri TM, Tiwari P, Mittal S, et al. Covid-19: a comprehensive review of a formidable foe and the road ahead. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2020; 14(9):869-79.
18. Ishida T, Harashima H, Kiwada H. Liposome clearance. *Biosci Rep*. 2002;22(2):197-224.
19. Ji W, Wang W, Zhao X, Zai J, Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol*. 2020; 92(4):433-40.
20. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020; 12(4): 372.
21. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*. 2008; 16(11):1833-40.
22. Khehra N, Padda I, Jaferi U, Atwal H, Narain S, Parmar MS. Tozinameran (BNT162b2) Vaccine: The Journey from Preclinical Research to Clinical Trials and Authorization. *AAPS PharmSciTech*. 2021; 22(5):172.
23. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*. 2008; 9(10):776-88.
24. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Review of Vaccines*. 2016; 15(3):313-29.
25. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*. 2019; 4(4):e123158.
26. Liu MA. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(2):37.
27. Liu S-L, Saif L. Emerging Viruses without Borders: The Wuhan Coronavirus. *Viruses*. 2020; 12(2):130.
28. Lozano Jiménez YY, Sánchez Mora RM, Giraldo Quintero SE. Potenciales estrategias terapéuticas basadas en péptidos para mitigar la infección por SARS-CoV-2. *nova*. 2020; 18(35):61-6.

29. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224):565-74.
30. Lv M, Luo X, Estill J, Liu Y, Ren M, Wang J, et al. Coronavirus disease (COVID-19): a scoping review. *Euro Surveill*. 2020; 25(15).
31. Malaiyan J, Arumugam S, Mohan K, Gomathi Radhakrishnan G. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol*. 2021; 93(1):499-505.
32. Mandal H, Katiyar SS, Swami R, Kushwah V, Katare PB, Kumar Meka A, et al. ϵ -Poly-L-Lysine/plasmid DNA nanoplexes for efficient gene delivery in vivo. *Int J Pharm*. 2018; 542(1-2):142-52.
33. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol Ther*. 2019; 27(4):757-72.
34. Midoux P, Pichon C. Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. febrero de 2015; 14(2):221-34.
35. Organización Mundial de la Salud. Global vaccine action plan 2011-2020. Geneva: World Health Organization; 2013.
36. Oussoren C, Velinova M, Scherphof G, van der Want JJ, van Rooijen N, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection . IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1370(2):259-72.
37. Pandey A, Nikam AN, Shreya AB, Mutalik SP, Gopalan D, Kulkarni S, et al. Potential therapeutic targets for combating SARS-CoV-2: Drug repurposing, clinical trials and recent advancements. *Life Sci*. 2020; 256:117883.
38. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015; 217:345-51.
39. Patel S, Ryals RC, Weller KK, Pennesi ME, Sahay G. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye. *J Control Release*. 2019; 303:91-100.
40. Perche F, Gosset D, Mével M, Miramon M-L, Yaouanc J-J, Pichon C, et al. Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes. *J Drug Target*. 2011; 19(5):315-25.
41. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(34):12283-7.
42. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020; 383(27):2603-15.

43. Rana MM. Polymer-based nano-therapies to combat COVID-19 related respiratory injury: progress, prospects, and challenges. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021; 32(9):1219-1249.
44. Rauch S, Roth N, Schwendt K, Fotin-Mleczek M, Mueller SO, Petsch B. mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents. *NPJ Vaccines.* 2021; 6(1):57.
45. Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv.* 2016; 7(5):319-34.
46. Romero-Brufau S, Chopra A, Ryu AJ, Gel E, Raskar R, Kremers W, et al. Public health impact of delaying second dose of BNT162b2 or mRNA-1273 covid-19 vaccine: simulation agent based modeling study. *BMJ* 2021; 373(1087).
47. Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* 1995; 59(3):423-50.
48. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature.* 2020; 585(7823):107-12.
49. Svitkin YV, Cheng YM, Chakraborty T, Presnyak V, John M, Sonenberg N. N1-methylpseudouridine in mRNA enhances translation through eIF2 α -dependent and independent mechanisms by increasing ribosome density. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(10):6023-36.
50. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50(1-2):3-20.
51. Tognotti E. The eradication of smallpox, a success story for modern medicine and public health: What lessons for the future? *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2010; 4(05):264-6.
52. Tombácz I, Weissman D, Pardi N. Vaccination with Messenger RNA: A Promising Alternative to DNA Vaccination. *Methods Mol Biol.* 2021; 2197:13-31.
53. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2020; 96:753-758.
54. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-70.
55. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *J Control Release.* 2021;333:511-20.
56. Walsh EE, Frenck R, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. RNA-Based COVID-19 Vaccine BNT162b2 Selected for a Pivotal Efficacy Study. *medRxiv.* 2020; 383:2439-2450.
57. Wolff J, Malone R, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990; 247(4949):1465-8.

58. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020; 367(6483):1260-3.
59. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798):265-9.
60. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:594.