



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIO  
TECNOFARMACÉUTICO DE  
LAS VACUNAS APROBADAS  
EN ESPAÑA PARA LA  
PREVENCIÓN DE LA COVID-19**

***PABLO FERNÁNDEZ-PALACIOS SERRANO***



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA**



**TRABAJO FIN DE GRADO  
GRADO EN FARMACIA**

# **ESTUDIO TECNOFARMACÉUTICO DE LAS VACUNAS APROBADAS EN ESPAÑA PARA LA PREVENCIÓN DE LA COVID-19**

**PABLO FERNÁNDEZ-PALACIOS  
SERRANO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA**

**TUTOR: DR. JUAN MANUEL GINÉS DORADO**

**TIPOLOGÍA DE PROYECTO: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**Facultad de Farmacia. Julio de 2021**

# INDICE

---

RESUMEN .....	3
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
1.1 <b>Vacunas: concepto, historia y actualidad .....</b>	<b>4</b>
1.2 <b>Clasificación de las vacunas.....</b>	<b>5</b>
1.3 <b>Sars-CoV-2.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 <b>Proteína S .....</b>	<b>6</b>
1.4 <b>COVID-19.....</b>	<b>7</b>
1.5 <b>Tipos de vacunas comercializadas o en desarrollo frente a la COVID .....</b>	<b>8</b>
1.6 <b>Variantes del SARS-CoV-2.....</b>	<b>9</b>
1.7 <b>Proceso de aprobación de vacunas.....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3 METODOLOGÍA.....</b>	<b>13</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>14</b>
4.1 <b>Excipientes utilizados en las formulaciones de inyectables.....</b>	<b>14</b>
4.2 <b>Envasado y sistemas de administración de inyectables.....</b>	<b>18</b>
4.3 <b>Nanopartículas lipídicas .....</b>	<b>20</b>
4.3.1 <b>Obtención.....</b>	<b>23</b>
4.4 <b>Pfizer-BioNTech .....</b>	<b>24</b>
4.4.1 <b>Introducción .....</b>	<b>24</b>
4.4.2 <b>Mecanismo de acción.....</b>	<b>24</b>
4.4.3 <b>Forma farmacéutica y formulación .....</b>	<b>24</b>
4.4.4 <b>Fabricación .....</b>	<b>26</b>
4.5 <b>Moderna .....</b>	<b>27</b>
4.5.1 <b>Introducción .....</b>	<b>27</b>
4.5.2 <b>Mecanismo de acción.....</b>	<b>27</b>
4.5.3 <b>Forma farmacéutica y formulación .....</b>	<b>27</b>
4.5.4 <b>Fabricación .....</b>	<b>28</b>
4.6 <b>AstraZeneca .....</b>	<b>29</b>
4.6.1 <b>Introducción .....</b>	<b>29</b>
4.6.2 <b>Mecanismo de acción.....</b>	<b>29</b>
4.6.3 <b>Forma farmacéutica y formulación .....</b>	<b>29</b>
4.6.4 <b>Fabricación .....</b>	<b>31</b>

4.7	<b>Janssen</b> .....	32
4.7.1	Introducción .....	32
4.7.2	Mecanismo de acción.....	32
4.7.3	Forma farmacéutica y formulación .....	32
4.7.4	Fabricación .....	34
4.8	<b>Estudio comparativo</b> .....	35
5	<b>CONCLUSIONES</b> .....	36
6	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	37

### Índice de abreviaturas

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

COVID-19: “Coronavirus disease 2019” Enfermedad del Coronavirus 2019

ECA II: Enzima convertidora de Angiotensina II

EMA: “European Medicine Agency” Agencia Europea del Medicamento

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

NPL: Nanopartículas Lipídicas

OMS: Organización mundial de la Salud

PEG: polietilenglicol

PV: Periodo de validez

VOC: “Variant of concern” Variante de preocupación

VOI: “Variant of Interest” Variante de interés

## RESUMEN

---

El SARS-CoV-2, agente etiológico de la COVID-19, utiliza la proteína S como forma de entrada a la célula a través de los receptores de la ECA II. Es por ello que se utiliza esta proteína para el desarrollo de todas las vacunas.

Hasta el momento, son 4 las autorizadas en un muy corto periodo de tiempo, gracias al solapamiento de las fases de aprobación y el alto número de participantes en los ensayos clínicos, además del desarrollo de la producción a gran escala de manera simultánea a estos ensayos.

Las vacunas que hasta la fecha han sido autorizadas en España son elaboradas por los laboratorios Pfizer-BioNtech, Moderna, AstraZeneca y Janssen, respectivamente. Las dos primeras utilizan el mecanismo de ARNm vehiculizado en nanopartículas lipídicas (NPL), mientras que las dos últimas utilizan el vector vírico como método de acceso a nuestras células, por lo que realmente son dispersiones coloidales, debido al tamaño nanométrico del principio activo. Debemos diferenciar entre liposomas y NPL, a pesar de tener formulaciones análogas. Los primeros están formados por una bicapa lipídica que contiene un núcleo hidrófilo, mientras que las segundas están formadas por una membrana lipídica conteniendo un núcleo también lipídico en estado semisólido.

El estudio de sus formulaciones mostró que contienen los excipientes típicos de los sistemas inyectables, incluyendo crioprotectores, algunas porque se almacenan y distribuyen congeladas, y otras, como AstraZeneca, porque requieren este proceso durante alguna etapa de su elaboración.

En cuanto a sus procesos de fabricación, claro está, registrados bajo patente, las NPL se elaboran por un método de dilución del disolvente, mientras que en las que utilizan vectores víricos, el proceso llevado a cabo es el cultivo de los virus modificados genéticamente en cultivos celulares especiales.

El trabajo concluye con su estudio comparativo, para mostrar al lector de forma resumida, una serie de aspectos eminentemente prácticos.

**Palabras clave:** vacuna, COVID-19, nanopartículas, formulación, vector viral

# 1 INTRODUCCIÓN

---

En la ciudad china de Wuhan, en diciembre del año 2019 emerge una nueva enfermedad de carácter respiratorio de etiología desconocida. El 11 de febrero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS), nombra a dicha enfermedad como *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) y el Comité internacional de Taxonomía Viral identifica y nombra a su agente etiológico como SARS-CoV-2 (Jin et al., 2020). Desde ese momento comienza una frenética carrera para encontrar un remedio o una protección a la enfermedad, habiéndose aprobado en Europa, hasta ahora, 4 vacunas para la prevención de la COVID-19 (AEMPS).

## 1.1 VACUNAS: CONCEPTO, HISTORIA Y ACTUALIDAD

Según la OMS se entiende por vacuna, cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la protección de anticuerpos (OMS). El método más habitual para administrar las vacunas es la vía parenteral, aunque existen otras como la oral o intranasal, y otras vías minoritarias.

Existen antecedentes de vacunas desde el siglo VII, donde los monjes budistas indios ingerían veneno de serpiente para hacerse inmune a sus efectos. Desde el siglo X en China se practicaba la variolización, que consistía en someter la mezcla de pústulas variolosas y almizcle a un proceso de ahumado con el fin de disminuir su virulencia, para posteriormente inocularlas.

Pero el considerado inventor de la primera vacuna fue Edward Jenner, quien en 1796 inoculó al niño James Phipps la linfa de una pústula de viruela obtenida de la ordeñadora Sara Nelmes, quien aseguraba que no podía enfermar por ya haber sido infectada por la viruela del ganado vacuno. Como resultado, cuando al niño se le inoculó un preparado con viruela humana, nunca contrajo la enfermedad, publicando los resultados en *Variolae Vaccinae* en 1798 (Berdasquera et al., 2000). Sin embargo, la denominación de “vacuna” no se introdujo hasta unos años posteriores, cuando durante el Congreso Internacional de Medicina de Londres en 1881, el término fue acuñado por Louis Pasteur (Tuells & Duro, 2011).

Desde que Jenner descubriera ese método de inmunización, se han obtenido numerosas vacunas, entre las que destacan la vacuna frente a la rabia, descubierta por Louis Pasteur en 1885, contra el cólera, también ese mismo año por el español Jaime Ferrán, o algunas más actuales como la antimeningocócica en 1968 para el meningococo C y en 1971 para el meningococo A, por Gotschlich; o contra la hepatitis B en 1976 por Maupas y Hilleman (Berdasquera et al., 2000). Gracias a la vacunación también se han podido erradicar enfermedades como la viruela, en 1980 (OMS, 2020).

## 1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS VACUNAS

Las vacunas se pueden clasificar desde el punto de vista sanitario en sistemáticas y no sistemáticas, pero lo más habitual es hacerlo en función de un criterio microbiológico, como mostramos en la Figura 1:

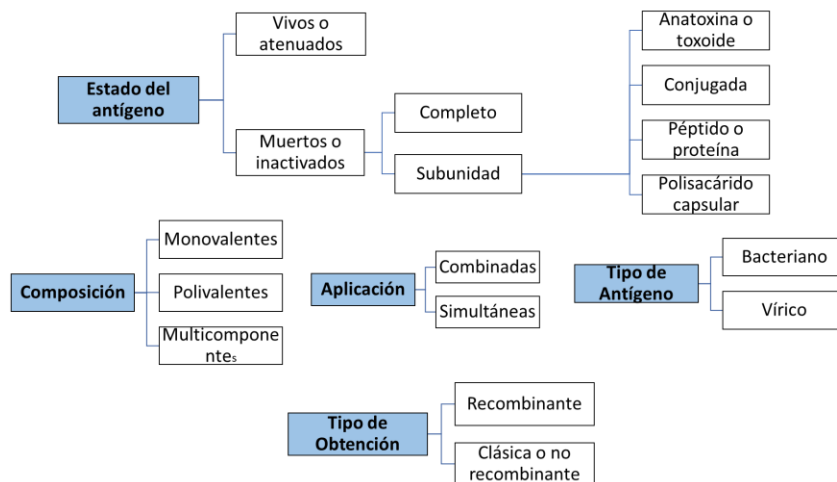


Figura 1. Clasificación de las vacunas según criterio microbiológico (Padilla & Ginés, 2019).

## 1.3 SARS-COV-2

Como ya se ha comentado, en febrero de 2020, se estableció que el agente causante de la enfermedad respiratoria emergente en China era un virus perteneciente a la subfamilia betacoronavirus. Tras la obtención de su código genético, por el aislamiento del virus a través de la muestra de fluido broncoalveolar de 5 pacientes infectados (Hu, 2020), se comprobó que compartía el 79,5% de secuencia genómica con el coronavirus causante del Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS-CoV), y un 96% con otro Coronavirus aislado en especies de murciélago, por lo que se postuló como origen una evolución natural del BatCoV RaTG13 al SARS-CoV-2 humano.

Este nuevo coronavirus, es un virus de Cadena de ARN monocatenaria simple en sentido positivo (+ssRNA), en cuya cadena está incluida toda la información genética necesaria para sintetizar 4 proteínas estructurales, **la proteína de la Nucleocápsida (N)** que envuelve el material genético, **la proteína de Membrana (M)**, **la proteína espiga (S)**, muy importante para la síntesis de vacunas orientadas a la inmunización, y **la proteína de envoltura (E)**; y 16 proteínas no estructurales, cuyas funciones están relacionadas entre otras con la replicación, traducción y dominios transmembrana (Wang et al., 2020).

Como podemos ver en un esquema de su estructura (Figura 2), la cadena de ARN está rodeada por una nucleocápsida formada por la proteína N, y se encuentra en el interior del virus. Todo ello se encuentra rodeado por la membrana, donde se incluyen las proteínas estructurales E y M. Además, por toda la cubierta del virus encontramos grandes proteínas S, que dan un aspecto coronado al mismo, de ahí el nombre de la familia *Coronaviridae* (Sotomayor et al., 2020).

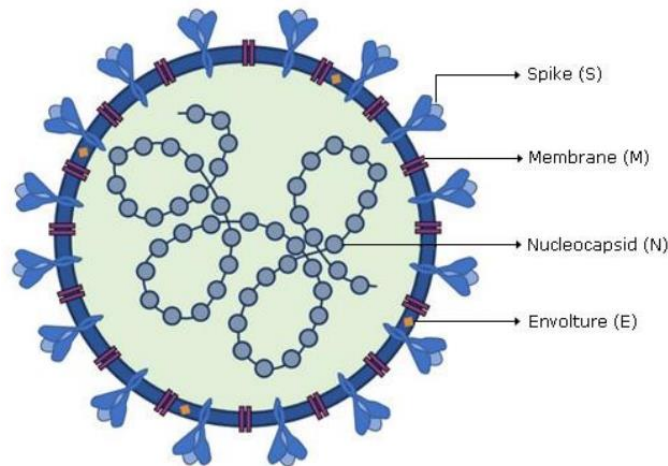


Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2 (Sotomayor et al., 2020).

### 1.3.1 Proteína S

Se trata de una proteína trimérica, en la cual cada monómero está compuesto por dos subunidades, la S1 y la S2. La primera, contiene el dominio de unión al receptor (RBD), y cuya función es unirse a la célula huésped y el dominio N-terminal. La S2, está compuesta por el péptido de fusión, los dos heptapéptidos de repetición HR1 y HR2, la región transmembrana y el dominio citosólico (Figura 3), y su finalidad es lograr la fusión con la membrana de la célula infectada (Huang et al., 2020).

La proteína S es la encargada de reconocer a la célula que va a ser infectada y mediar en la fusión con la membrana plasmática, ya que es capaz de unirse al receptor de la enzima convertidora de Angiotensina II (ECA II) de la célula hospedadora (presentes en tejidos vasculares, el miocardio, el riñón y las vías respiratorias), tras lo cual sufre un cambio conformacional. Dicha modificación le permite, a través de la furina (Hoffman et al., 2020), interactuar también con la serin-proteasa transmembrana de tipo II, que separa ambas subunidades de la proteína por el sitio de escisión S1-S2, lo cual promoverá la degradación proteolítica y permitirá el ingreso del virus dentro de la célula, donde liberará el material genético para replicarse, utilizando la maquinaria celular hospedadora (Choi et al., 2020).



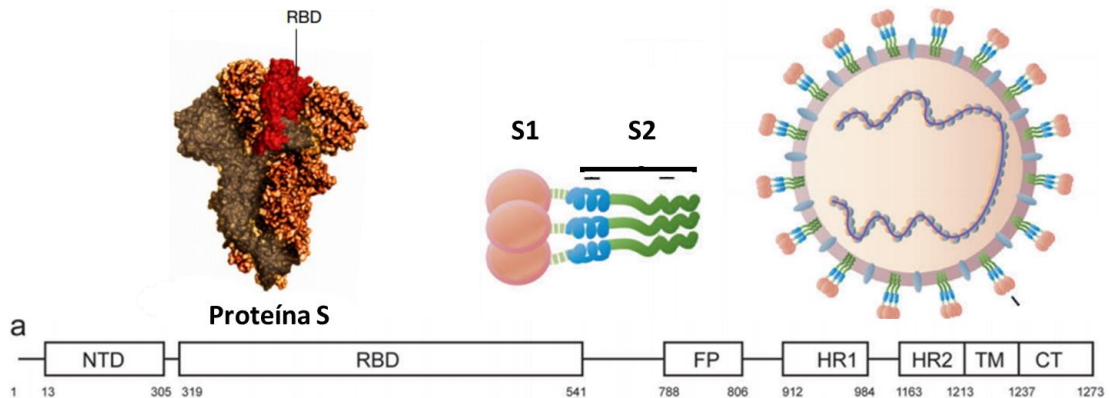


Figura 3. Estructura trimérica de la Proteína S (Huang et al., 2020).

Al ser la proteína responsable de la unión del SARS-CoV-2 a nuestras células, se ha convertido en el objetivo de todas las vacunas elaboradas para esta enfermedad.

## 1.4 COVID-19

Cuando se produce la infección por SARS-CoV-2, puede desarrollarse la enfermedad denominada COVID-19, caracterizada por síntomas parecidos a los gripales, entre los que se encuentran el desarrollo de fiebre, tos seca, disnea, cefalea o mialgia. Otros de los síntomas más característicos son las alteraciones otorrinolaringológicas como la disgeusia-hipogeusia y la hiposmia-anosmia, siendo los primeros síntomas en aparecer.

El periodo medio de incubación de esta enfermedad oscila entre 5,1 y 11,7 días, en el que el 95% de los infectados sintomáticos los desarrolla. También cabe la posibilidad de que un infectado no desarrolle la enfermedad y por lo tanto se convierta en una persona asintomática, capaz de transmitirla, pero sin padecerla.

En general, en un 80% de los casos, la enfermedad cursa de manera leve o moderada, pero también puede desarrollarse de forma grave, caracterizada por neumonía, que requiere ventilación mecánica, y que frecuentemente tiene como desenlace el fallecimiento del paciente. Estos casos también se relacionan con miocarditis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, daño renal agudo y sobreinfecciones bacterianas. Uno de los síntomas más graves son los trastornos de coagulación, caracterizados por la prolongación del tiempo de protrombina, el aumento del dímero D y la disminución del número de plaquetas (Ministerio de Sanidad, 2021).

Existen distintas maneras de diagnosticarse, la de elección y preferida es la detección de material genético del virus a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, en la que se lleva a cabo una amplificación del material genético del SARS-CoV-2 gracias a una muestra de exudado nasofaríngeo.

Por otro lado, existen las pruebas rápidas de detección de las inmunoglobulinas M (IgM) y las inmunoglobulinas G (IgG), que detectan la respuesta de nuestro organismo a la infección. Las de IgM permiten detectar la enfermedad desde los 9 días aproximadamente a partir de la infección, mientras que las de IgG requieren más de 15 días. Para ello se utilizan muestras de suero o sangre, y pueden llevarse a cabo incluso por el propio paciente (García et al., 2021).

## **1.5 TIPOS DE VACUNAS COMERCIALIZADAS O EN DESARROLLO FRENTE A LA COVID**

Para esta nueva enfermedad viral, la comunidad científica ha iniciado una carrera frenética para desarrollar una vacuna eficaz en el menor tiempo posible, existiendo 8 tipos que podemos agrupar en 4 categorías, dependiendo del mecanismo que utilicen para desarrollar la inmunidad (Callaway, 2020).

### **- Vacunas con el virus**

En ellas, se inyecta directamente el SARS-CoV 2, que podrá estar en dos estados, inactivado o atenuado. En el primer caso el virus se cultiva en líneas celulares para después ser inactivado a través de calor o con productos químicos como el formaldehído. En el segundo, se utiliza el coronavirus modificado genéticamente, para que no tenga capacidad replicativa y por lo tanto no pueda generar la enfermedad, pero sí inmunidad, de la manera más parecida a una infección natural por SARS-CoV-2.

### **- Vacunas de vectores virales**

En este caso, se utiliza otro virus, que contendrá la información necesaria para codificar la proteína S, pudiendo ser replicativos o no replicativos. En el primer caso el vector viral tendrá capacidad para reproducirse dentro del organismo, pero sin causar ninguna enfermedad, cuyo origen son cepas atenuadas o vacunales de virus, o bien virus animales sin capacidad replicativa eficiente en el ser humano. En el caso de virus no replicativos, se utiliza típicamente los adenovirus tanto de origen animal como humano, al que se le priva de sus genes de replicación, por lo tanto, infectarán a la célula hospedadora, pero no serán capaces de reproducirse ni de generar enfermedad.

### **- Vacunas de ácidos nucleicos**

Puede utilizar o bien una cadena de ADN o de ARN mensajero. En las primeras, el ADN, obtenido de cultivos de *E. coli*, se inyectaría directamente, por lo que generan poca inmunogenicidad, y para aumentarla sería necesario aplicar electroporación a las células para hacerlas más permeables. Las vacunas que utilizan ARNm, es necesario vehicularlo en forma de

nanopartículas lipídicas (NPL) con el fin de protegerlo y permitir su acceso a las células. En ambos casos la información genética contenida en el ARNm se utiliza dentro de nuestras células para generar la inmunidad.

- **Vacunas basadas en proteínas**

Estas vacunas se basan en inyectar subunidades proteicas del virus, que pueden estar libres o adheridas a una envoltura parecida a la cápside del virus (*virus-like*), para que sean reconocidas por nuestro sistema inmune. Se puede optar por inocular directamente la proteína S, o solo el dominio de unión al receptor ECA de las células huésped (RBD), al carecer del material genético, no presentan capacidad patógena (Krammer,2020).

## **1.6 VARIANTES DEL SARS-COV-2**

Los virus son organismos que, debido a su naturaleza, son susceptibles de sufrir mutaciones, que pueden no ejercer ninguna influencia, o hacer que el virus se vuelva más infectivo e incluso más letal. Dependiendo del tipo de mutación, las variantes se pueden clasificar en 2 grupos, variantes de interés (VOI) y Variantes de preocupación (VOC), denominadas así por sus siglas en inglés. Las VOI, aunque implican un cambio en su genoma respecto al de referencia, su capacidad de transmisión comunitaria no se modifica. Las VOC, incluyen a aquellas VOI, que han demostrado incrementar la capacidad de transmisión y/o su virulencia o disminuyen la eficacia de las medidas de Salud Pública o de vacunas y tratamientos disponibles (OMS, 2021).

A día de hoy, la OMS ha identificado 4 VOC distintas, que las ha denominado como Alpha, Beta, Gamma y Delta, y que son más conocidas como las variantes británica, sudafricana, brasileña e india, respectivamente.

La variante Alpha es predominante en Reino Unido, Israel e Irlanda, aunque ya se ha extendido casi a nivel global, y supone un mayor riesgo de transmisión y gravedad caso de sufrir la enfermedad, así como una ligera reducción de la efectividad vacunal.

La variante Beta, además de suponer un aumento en la transmisión, ha demostrado una reducción frente a la efectividad de las vacunas entre moderada y alta.

Tanto la variante Gamma como la Delta están aún en estudio, pero se sugiere de nuevo una mayor transmisión y probable resistencia a las vacunas actuales, como ejemplo, la vacuna elaborada por Pfizer-BioNTech, que sería hasta 5 veces menos eficaz contra la variante india respecto al virus de referencia.

Principalmente todas proceden de una mutación característica en la proteína S, una asparagina por una tirosina en el aminoácido 501, que es la que le confiere mayor capacidad infectiva. Por otra parte, a la variante sudafricana se le añade una mutación en el aminoácido 417 de una lisina por una treonina, mientras que en la brasileña se cambia por una asparagina; ambas mutaciones se han relacionado con una mayor capacidad de eludir la respuesta inmune (CAV-AEP, 2021).

Como ya se ha comentado, la eficacia de las vacunas contra estas nuevas variantes se ve comprometida debido a esas mutaciones, aunque en general se trata de variaciones puntuales que no afectan demasiado al desarrollo de la inmunidad. En el caso de que esas variantes afectaran de manera importante inmunización, los laboratorios están preparados para actuar con rapidez, y especialmente las vacunas que utilicen como mecanismo el ARNm o vectores virales. Ambos tipos de vacunas ya tienen diseñado el mecanismo de acción y la vehiculización de la información genética, ya sea en NPL o en vectores virales, por lo que bastaría con secuenciar el genoma de la nueva variante y reproducirlo en el principio activo de la vacuna, generando de esta manera inmunidad frente a ella (Cueto, 2021).

## **1.7 PROCESO DE APROBACIÓN DE VACUNAS**

Como cualquier otro medicamento, las vacunas deben seguir un proceso de ensayos clínicos pasando por 3 fases, desde que se tiene un candidato, hasta estar disponible para ser aprobada por el organismo regulatorio correspondiente, en el caso de Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y su salida posterior al mercado. Además, existe una fase de farmacovigilancia tras la comercialización, crucial en el caso de las vacunas para la COVID.

Es sorprendente cómo en tan poco tiempo, se ha conseguido la puesta en el mercado mundial de tantas variedades de vacunas, y las que están en una fase avanzada de desarrollo, cuando el proceso habitual suele ser superior a un quindenio (Figura 4).

Esto se debe a varios factores. Por un lado, debido a la situación de emergencia sanitaria, tanto la OMS como la EMA han reducido los procesos regulatorios, aprobando estas vacunas como tratamiento de emergencia con evaluación constante. Además, las fases se adaptaron para desarrollarlas de manera simultánea en la medida de lo posible, poniendo en marcha también la producción industrial a riesgo de no ser efectiva (Krammer, 2020).

Es importante señalar, además, que en el caso de las 4 vacunas aprobadas en Europa, como se puede comprobar en los estudios de eficacia publicados en *The Lancet* y en *The New England Journal of Medicine*, los ensayos en **Fase III**, han contado con más de 20000 voluntarios, fruto

de la implicación de la población con la búsqueda una profilaxis frente a la situación de pandemia, lo que supone una mayor fiabilidad del proceso y una manera de acelerarlo.

### Desarrollo tradicional



### Desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2

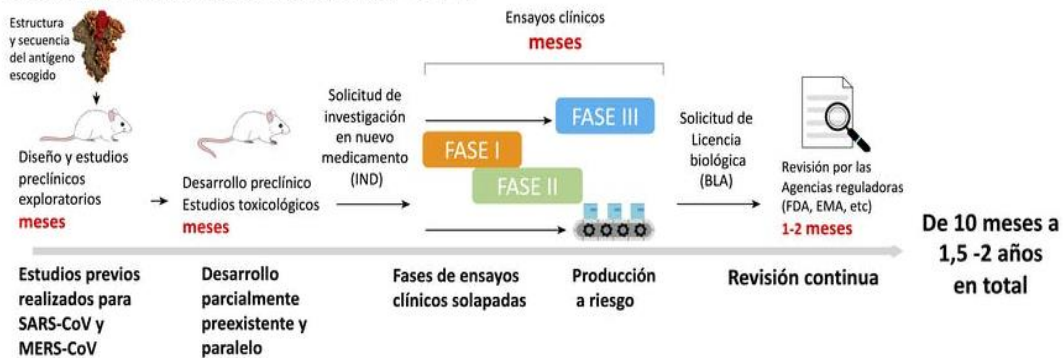


Figura 4. Esquema comparativo del desarrollo tradicional frente al desarrollo de las vacunas para la COVID-19 (Krammer, 2020; traducido y adaptado por Mercedes Jiménez).

## 2 OBJETIVOS

---

El presente trabajo se ha elaborado con doble objetivo:

El primero de ellos es recopilar información sobre la enfermedad de la COVID-19 y su agente etiológico, así como de las características generales de las vacunas en desarrollo y su aprobación en la Unión Europea.

Por otro lado, se ha realizado un estudio tecnofarmacéutico comparativo de las 4 vacunas presentes en España a fecha de finalización de este trabajo, haciendo especial hincapié en sus formulaciones, procesos de fabricación, almacenamiento y envasado.

### 3 METODOLOGÍA

---

La revisión bibliográfica ha sido realizada a partir de una serie de publicaciones entre las que se incluyen artículos, revisiones, capítulos de libros, páginas web y patentes. La investigación se realizó desde principios del mes de febrero hasta el mes de mayo de 2020. Se ha realizado en inglés, principalmente por ser la lengua universal en el campo científico. Para la búsqueda de artículos se han utilizado bases de datos como *Google Scholar*, *Google patent*, *Pubmed* o *Web of Science* o el buscador *Google*, desde marzo de 2021 hasta junio de 2021.

Para realizar el apartado de introducción se siguieron principalmente fuentes oficiales como la OMS, el ministerio de Sanidad, y medios de rigor como la revista *Nature*, añadiendo la información de artículos que recopilaran datos de la mayoría de revisiones en el caso de los apartados de SARS-CoV-2 y proteína S.

La identificación de las vacunas comercializadas en España, se realizó a través del apartado de vacunas para la COVID de la base de datos de la AEMPS, para después utilizar los datos de las mismas para realizar búsquedas en las bases de datos. Para obtener información más detallada sobre los métodos de fabricación y las características de los principios activos se recurrió a la búsqueda de los informes de aprobación de la vacuna por parte de la EMA utilizando el siguiente método de búsqueda “*(laboratorio)+ assessment report*”, así como los nombres comerciales de las mismas.

Para asignar las funciones de los excipientes y los mecanismos de vehiculización se utilizaron los conocimientos adquiridos en la asignatura de Tecnología Farmacéutica II, o utilizando palabras clave como “*(excipiente) + vaccine*”, “*viral vector*” o “*lipids nanoparticles*” y profundizando en algunos casos a través de la bibliografía citada en ciertos artículos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EXCIPIENTES UTILIZADOS EN LAS FORMULACIONES DE INYECTABLES

Dado que uno de los apartados de la presente memoria consiste en el estudio de las formulaciones de las vacunas contra la COVID-19, medicamentos de administración parenteral, en este apartado vamos a resumir brevemente los diferentes tipos de excipientes que se utilizan los inyectables en sus formulaciones.

- **Solubilizantes / Humectantes**

Dependiendo del tipo de formulación, podremos encontrar ambos (soluciones) o sólo los humectantes (suspensiones), estos últimos actúan facilitando y estabilizando dichos sistemas.

Es bien conocido que las proteínas, para mantenerse funcionales, deben estar en una conformación tridimensional específica, que si se altera puede provocar la pérdida de la su función biológica. Se han descrito varias causas de inestabilidad, las más frecuentes son adsorción entre ellas o a la superficie de materiales inertes como pueden ser el vidrio del material de envasado (Randolph & Jones, 2002).

Por ello las preparaciones inyectables que contienen proteínas como la insulina, hormonas, o en nuestro caso virus con cubiertas proteicas, incorporan suelen incorporar en sus formulaciones excipientes tensioactivos que, al establecerse en la interfase, evitan estos procesos (Kerwin, 2007).

Los más utilizados son lo Polisorbatos y más en concreto el Polisorbato 80, cuya estructura podemos observar en la Figura 5. Se trata de una molécula de sorbitano polietoxilado y esterificado con ácido oléico, presentando carácter no iónico. Debido a esa molécula polietoxilada, convierte al polisorbato 80 en una molécula anfipática, adquiriendo capacidad surfactante y humectante (Zang, 2009).

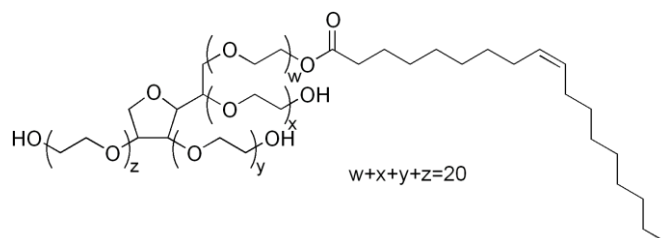


Figura 5. Molécula de Polisorbato 80.



- **Conservantes**

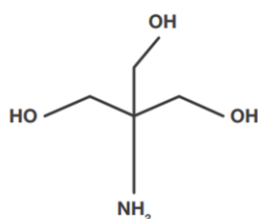
Las vacunas de la COVID, a pesar de ser preparados acuosos multidosis no requieren el empleo de conservantes, dada sus especiales características de administración. En efecto, se envasan directamente estériles en viales estancos, y tras su reconstitución se administra la totalidad de la dosis, por lo que no hay margen al posible crecimiento microbiológico.

- **Modificadores / Reguladores de pH**

Al tratarse de formas farmacéuticas inyectables, el pH final de la formulación además de intentar ser lo más cercano al fisiológico, con el fin de minimizar el dolor en el momento de su administración, está condicionado por dos factores adicionales, la estabilidad del fármaco y el pH adecuado para obtener el sistema fisicoquímico deseado.

Para lograr este pH, los inyectables incorporan en su formulación, ácidos, bases o sistemas reguladores de pH o tampones. Estos últimos se componen de un ácido y su sal conjugada, lo que permite captar o ceder protones, desplazando así el equilibrio ácido-base a un lado u otro de la reacción, con el fin de mantener el pH estable frente a cambios externos.

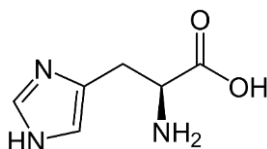
Pero también existen otros excipientes en los que una única especie molecular presenta capacidad tamponante, el ejemplo más típico son los aminoácidos o el tampón TRIS, también denominado trometamol, pues su principal componente es una amina primaria, la trometamina o hidroximetilaminometano, cuya fórmula molecular se recoge en la Figura 6. Este compuesto a es muy usado tanto en vacunas como en preparados con anticuerpos monoclonales o insulinas. Combinada en relación 1:3 con su sal, clorhidrato de trometamol, mantiene el pH en un rango entre 7,3 y 7,5 (ANGUS, 2017).



*Figura 6. Molécula de Trometamol (ANGUS®, 2017).*

Debido a la presencia de sus grupos aminos y carboxilo, los aminoácidos pueden ejercer también como un regulador del pH. Uno de los más usados, presente en la formulación de una de las vacunas que estudiaremos es la L-histidina, la cual forma parte naturalmente de la hemoglobina, ejerciendo junto al tampón bicarbonato, de uno de los principales mecanismos de tamponamiento de pH sanguíneo (González, s.f.). Además del grupo carboxilo, tiene otro grupo

ionizable, el anillo imidazólico (Figura 7), cuyo  $pK_a$  es de 6.0. Su punto isoeléctrico se encuentra a pH 7,59, lo que lo convierte en un excelente candidato para mantener el pH en niveles fisiológicos en los inyectables.



*Figura 7. Estructura de molécula de histidina.*

Para el ajuste fino del pH, en las formulaciones encontramos la presencia de un ácido o una base fuertes, el HCl y NaOH respectivamente.

- **Isotonizantes**

Al tratarse de inyecciones intramusculares, la tonicidad de la formulación debe ser lo más cercana a la fisiológica, es decir, la equivalente a una concentración de cloruro sódico al 0.9% p/v. Aunque como es evidente, todos los excipientes de la formulación que se encuentren disueltos aportarán tonicidad al medio, los excipientes más utilizados con esta función específica son el NaCl, la sacarosa o los aminoácidos.

- **Antioxidantes**

La utilización de este tipo de excipientes dependerá, claro está, de las necesidades de cada principio activo formulado. En el caso de algunas de las vacunas para la COVID-19 están compuestas por virus vivos, los cuales son susceptibles de sufrir reacciones de oxidación que pueden dañar las cadenas de ADN presentes en ellos, provocadas por la presencia de radicales libres (Paredes & Roca, 2002). Dado que las reacciones de síntesis de radicales libres pueden catalizarse por la presencia de iones metálicos, algunas formulaciones incorporan agentes quelantes capaces de secuestrar del medio dichos iones.

Los más utilizados son el AEDT o ácido etilendiaminotetraacético, y el ácido cítrico. Presentan grupos carboxilos que dependiendo del pH del medio estarán o no ionizados, por lo que pueden combinarse con iones metálicos polivalentes con carga positiva, para formar complejos coordinados cíclicos no iónicos, solubles en agua llamados quelatos cuyas estructuras se muestran en la Figura 8. Al secuestrar estos iones, se evitan las reacciones de oxidación catalizadas por ellos, por este motivo se le considera antioxidantes secundarios. Se suelen utilizar en forma de sal sódica, ya que en esta forma presentan mayor solubilidad acuosa.

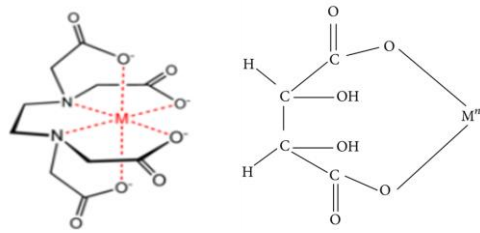


Figura 8. Estructura de los quelatos formados por AEDT (Mali et al., 2014), y ácido cítrico (Rajaeiyan & Bagheri-Mohagheghi, 2013).

- **Crioprotectores**

En el caso de que un medicamento necesite congelarse durante su fabricación o almacenamiento, requieren incluir en su formulación los denominados agentes crioprotectores, para proteger al principio activo durante este proceso.

En el caso de cultivos celulares, su viabilidad puede verse comprometida debido a la formación de cristales de hielo, para minimizar estos efectos los crioprotectores pueden actuar por varios mecanismos:

Los **permeables**, como el glicerol, aminoácidos de bajo peso molecular, dimetilsulfóxido o 1,2-propanodiol, son capaces de atravesar libremente la membrana citoplasmática y se distribuyen de igual manera en el espacio intracelular y extracelular, por lo que son osmóticamente inactivos. Estos crioprotectores disminuyen la temperatura a la que empiezan a formarse estos cristales, además de su tamaño. Ejemplos de este tipo de crioprotectores serían el dimetil sulfóxido o el glicerol.

Por otro lado, existen los crioprotectores **no permeables**, que pueden ser osmóticamente activos si son solubles como el manitol o la sacarosa, y los que no, ya que conducen a dispersiones coloidales, como la gelatina o maltodextrinas. Los primeros favorecen la salida de agua de la célula, retirándola del espacio intracelular y evitando que se formen los cristales de hielo, mientras que los segundos aumentan la temperatura de transición vítrea, permitiendo el almacenamiento a temperaturas bajo cero más altas (Sieme et al. 2016).

- **Lioprotectores**

En el caso de que los inyectables sean polvos liofilizados para administración parenteral, las formulaciones deben incluir los denominados excipientes lioprotectores (Baheti et al., 2010), que protegen al producto durante las diferentes etapas del proceso, pudiendo diferenciar entre agentes de carga (minimizan las pérdidas por arrastre durante el proceso), modificadores de la temperatura de eutexia o temperatura de colapso (evitan alteraciones estructurales del

producto) y facilitadores del proceso de reconstitución (promueven la penetración de líquidos en el material liofilizado).

Aunque de momento ninguna de las vacunas para la COVID-19 aprobada por la EMA está liofilizada, es muy probable que en un futuro se elaboren de esta forma, ya que se evitaría la necesidad congelar el producto para su almacenamiento. Pensamos que el hecho de no comercializarse actualmente en tales condiciones, con mucha probabilidad se debe a la urgencia frente a la pandemia, y la dificultad que entraña diseñar y escalar un proceso de liofilización de tal magnitud, que hubiera retrasado su puesta en el mercado.

- **Coadyuvantes**

Este tipo de excipientes son exclusivos de las vacunas, y tienen como finalidad aumentar la respuesta inmune de las mismas, asegurando un buen funcionamiento de los mecanismos de defensa y generando inmunidad suficiente (CAV-AEP, 2020).

El coadyuvante más clásico son las sales de aluminio, según se recoge en la bibliografía pueden actuar por varios mecanismos (induciendo eosinofilia, estimulando a los linfocitos CD y B, promoviendo la liberación de interleucina, etc.). Además, producen inflamación en el sitio de inyección, atrayendo de esta manera a células presentadoras de antígenos.

En algunas emulsiones que contienen parafina o escualeno en su formulación, se ha descrito que estos excipientes actúan como inmunopotenciadores, induciendo la producción de citocinas promoviendo la migración de células de defensa desde la sangre a tejidos periféricos.

Otros coadyuvantes que se utilizan son las saponinas derivadas de *Quillaria Saponaria*, que actúan en la liberación de citosinas y está presente en la candidata a vacuna de Novavax, partículas *virus-like*, que sólo contienen proteínas estructurales sin material genético, virosomas, endotoxinas bacterianas, etc. (Uberos, 2013).

## **4.2 ENVASADO Y SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE INYECTABLES**

Como se puede observar en la Figura 9, actualmente los viales han sido sustituidos por jeringas precargadas, como forma más habitual de envasado y administración de vacunas, pero en el caso de las vacunas de la COVID aprobadas actualmente en España, todas están comercializadas en forma de vial multidosis. En ellos podemos distinguir varios componentes con diferentes funciones (Figura 10).

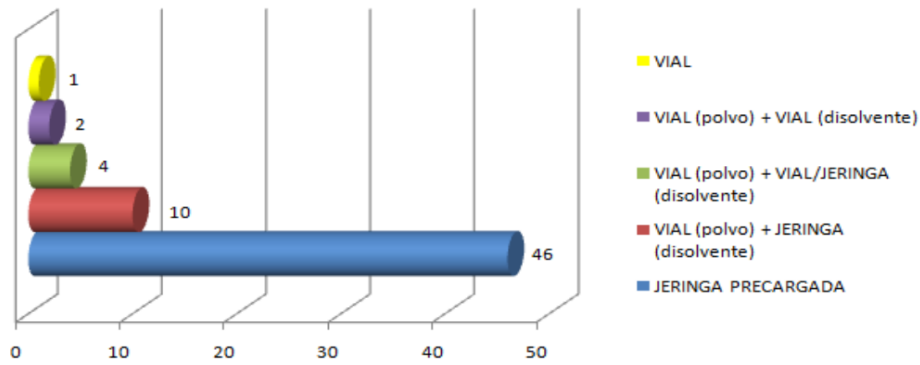


Figura 9. Distribución de vacunas en España según el dispositivo de administración (Mejías & Ginés, 2019).

El **septo**, que además del sellado del vial mediante un **precinto de aluminio**, permite sufrir varias punciones sin perder las cualidades ni la estanqueidad (RFE, 2015). En el caso de las vacunas es un elastómero que puede ser bromobutilo o clorobutilo.

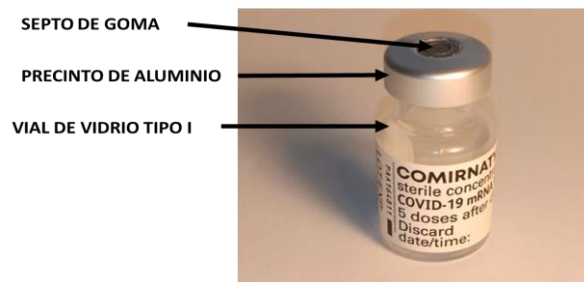


Figura 10. Vial de vacuna COVID.

Los viales de las vacunas para la COVID-19 están todos fabricados con Vidrio de tipo I, neutro borosilicatado, con una muy fuerte resistencia hidrolítica y a choques térmicos lo que los convierte en los viales ideales para contener dichas vacunas (RFE, 2015).

Contienen un sobrellenado, es decir, un volumen adicional con el cual se asegura la administración adecuada de la dosis, teniendo en cuenta las pérdidas asociadas a los espacios muertos de las agujas y jeringas, evitando también un sobreesfuerzo por llenar la última dosis. Pero, dadas las circunstancias de urgente necesidad de profilaxis y de optimización de los recursos, tanto la OMS a nivel mundial como la EMA a nivel europeo, recomiendan el uso de jeringas de bajo espacio muerto. En ellas, como se aprecia en la Figura 11, el volumen remanente tras la administración es mínimo, por lo que su uso permite obtener una dosis extra en cada vial (Pfizer, 2021).

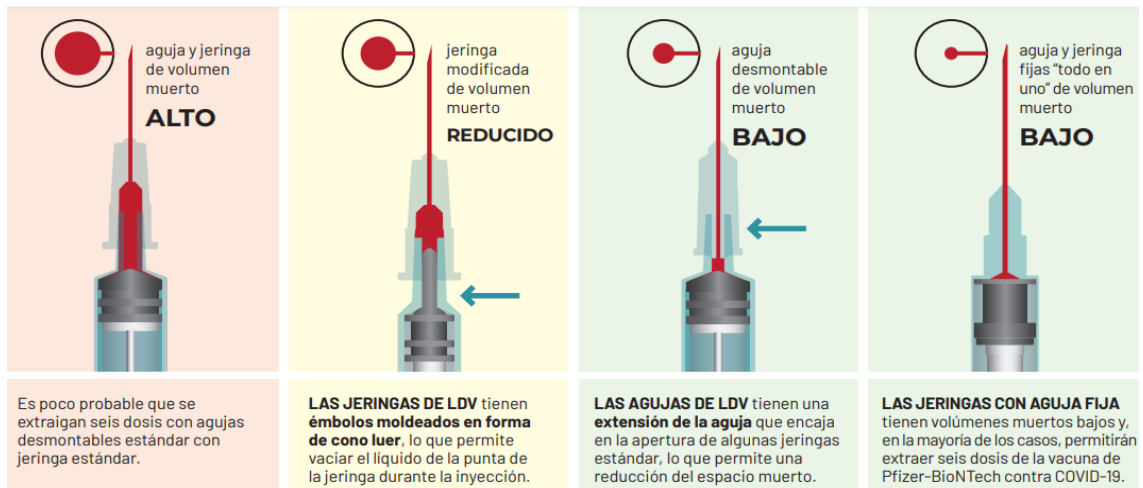


Figura 11. Posibilidades de administración de la vacuna Comirnaty con agujas de diferente espacio muerto (Pfizer-BioNTech, 2021).

### 4.3 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Dado que las NPL forman parte del mecanismo de vehiculización de dos de las vacunas comercializadas actualmente en nuestro país, las elaboradas por Pfizer-BioNTech y por Moderna, hemos considerado necesario recoger un apartado en la memoria, en el que explicar este tipo de estructuras.

En primer lugar, hay que diferenciar el concepto de **NPL** del de liposomas, ya que, aun siendo, los dos, formas nanométricas de vehiculizar principios activos, existen grandes diferencias estructurales.

En el caso del liposoma, este está compuesto por una o varias bicapas concéntricas de fosfolípidos, con sus cadenas lipídicas apolares enfrentadas (zona lipófila) y sus extremos o cabezas polares de naturaleza hidrofílica hacia el exterior e interior, por lo que el centro del liposoma será de naturaleza hidrófila. Su tamaño es muy variable, pero oscila entre 0.05 y 5  $\mu\text{m}$  (Sharma & Sharma, 1997).

Por el contrario, las NPL, están formadas por una monocapa lipídica con las cabezas polares hacia el exterior y las colas apolares hacia el interior, que encierran un núcleo o matriz semicristalina, compuesto por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, lo que proporciona a la formulación mayor estabilidad coloidal. Su tamaño suele oscilar entre 100 y 400 nm (Aldosari et al., 2020). Estas diferencias estructurales se ponen se pueden observar en la Figura 12.

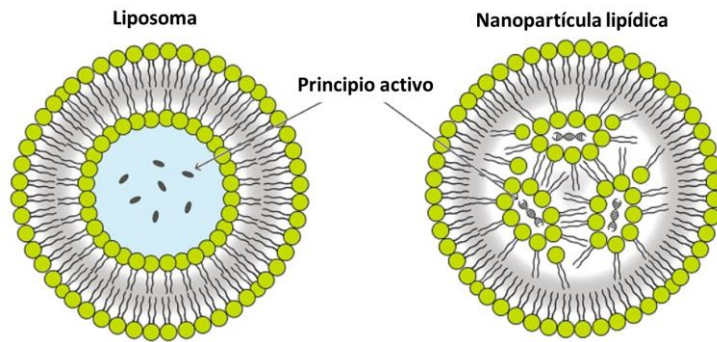


Figura 12. Diferencias estructurales entre liposomas y nanopartículas lipídicas (Biochempeg, 2020).

En el caso de las vacunas de Pfizer-BioNTech y de Moderna, la función de estas NPL es clave en la estabilidad del fármaco, ya que por un lado vehiculizaran el principio activo (ARNm) hasta dentro de la célula a través de la formación de un endosoma, facilitando así su liberación (Figura 13). Por otro lado, dado que el ARN puede sufrir su eliminación por parte de las ribonucleasas, que degradan las cadenas de nucleótidos exógenas, como mecanismo de defensa, al estar incluidos en una NPL, evitamos dicha acción (Gómez-Aguado et al., 2020).

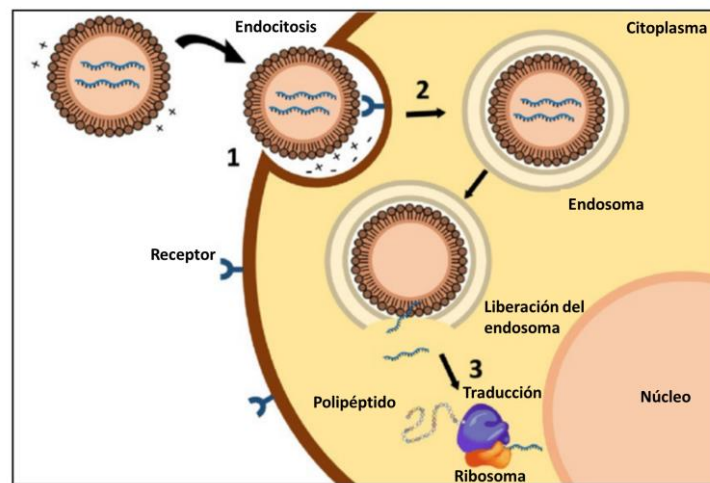


Figura 13. Mecanismo de liberación de las NPL. (Aldosari et al., 2020)

Las NPL utilizadas en las vacunas de la COVID-19, incluyen diferentes componentes estructurales: **una cubierta**, en la que podemos diferenciar un lípido PEGilado, colesterol y un derivado de la fosfatidilcolina, y **una matriz**, en la que se aloja el principio activo y un lípido catiónico ionizable, tal y como se muestra en la Figura 14.

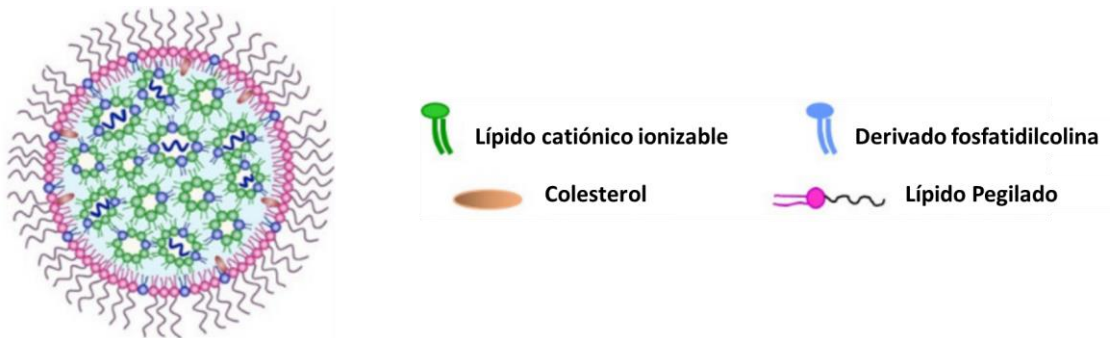


Figura 14. Disposición de los lípidos dentro de la nanopartícula (Aldosari et al., 2020).

### Lípidos posicionados en la cubierta externa:

El **colesterol**, debido a la baja solubilidad que tiene con el núcleo, desestabiliza la membrana y aporta fluidez a la estructura, al igual que ocurre en la membrana plasmática de nuestras células.

**Los derivados de la fosfatidilcolinas** poseen una región hidrófila, compuesta por ácido fosfórico y una molécula de colina, que se une a través de una molécula de glicerol a la región hidrófoba, compuesta por dos cadenas de ácidos grasos. Las fosfatidilcolinas adoptan una conformación cilíndrica que hace que, al depositarse en la cubierta, aporta fluidez y facilita la salida del principio activo del endosoma al igual que ocurre con el colesterol.

Los **lípidos PEGilados** están compuestos por cadenas lipídicas unidas a una larga cadena de polietilenglicol (PEG). Al posicionarse en la cubierta de las NPL aumentan el tiempo de circulación debido a que modifican la naturaleza superficial del liposoma aportándole hidrofilia. Por otro lado, las cadenas de PEG son cadenas alargadas que ejercen un impedimento estérico, obstaculizando la unión a las proteínas plasmáticas e impidiendo de esa manera que puedan ser eliminadas fácilmente por el sistema reticuloendotelial. El PEG también impide la fusión o entre las propias NPL durante el proceso de fabricación, homogeneizando la distribución de tamaño de partículas. La cantidad de lípidos PEGilados en la NPL debe controlarse minuciosamente, ya que, si se añaden demasiados, podría dificultar la fusión con el endosoma e impedir la liberación del principio activo al medio celular (Aldosari et al., 2020).

### Matriz de la NPL:

Los **lípidos catiónicos ionizables** constan de una cabeza polar con carga positiva formada por una amina terciaria unida a una cadena hidrocarbonada. Esta densidad de carga positiva permite que exista una interacción entre ellas y las cargas negativas de la cadena de nucleótidos. Por lo tanto, al colocarse este lípido en el interior de las NPL, la interacción electrostática atraerá a las cadenas de ARN del principio activo, “encapsulándolas” en el interior de la NPL, estabilizándolas.



### 4.3.1 OBTENCIÓN

Existen varios métodos de fabricación de las NPL, aunque el que se usa en la fabricación de la vacuna de Moderna y posiblemente en la vacuna de Pfizer-BioNTech es el método de Emulsificación-difusión del disolvente o método de dilución en etanol. A continuación, procederemos a describir brevemente los posibles métodos:

**-Método de extrusión:** También llamado como método de homogeneización a alta presión, consiste en poner en contacto el lípido fundido con una mezcla tampón que contenga los ácidos nucleicos. A continuación, se hace pasar la mezcla por unos filtros de policarbonato a alta presión. Como desventaja este proceso, tiene baja eficacia de encapsulación, además de problemas para el escalado del método debido a la compleja maquinaria que se requiere (Aldosari et al., 2020).

**-Método de preparación vía microemulsión:** en este caso, se funde el lípido al que se le añade el principio activo. A continuación, se añade el agente tensioactivo a alta temperatura y se vierte sobre agua fría, rompiéndose en nanogotículas de emulsión, que cristalizan como NPL. Este método tiene muchos inconvenientes, entre ellos el más importante es que el contenido de NPL se sitúe sólo alrededor del 1% dentro de toda la dilución (Torres & Seijo, 2009).

**-Método de emulsificación-difusión del disolvente:** Es el método que presumiblemente se sigue para la fabricación de las NPL de las vacunas para la COVID-19. En este procedimiento, los lípidos se disuelven en etanol a una concentración específica. En un micromezclador en forma de T (Hussong et al, 2009) se le añade por un lado los lípidos disueltos y por otro una solución acuosa a pH conocido que incluye el principio activo, en este caso el ARNm. El pH ácido ioniza los lípidos catiónicos, que adquieren carga positiva e interaccionan con las cargas negativas de los ácidos nucleicos, formando la matriz de la NPL. Al entrar en contacto las dos disoluciones, la concentración de etanol es menor y los lípidos, por tanto, son menos miscibles, por lo que comienzan a solidificar los lípidos y a formar la nanopartícula en sí. Por último, se le añade una disolución tamponada con el fin de eliminar la influencia del etanol y terminar de condensar los lípidos, manteniendo en el interior al ARN mientras que recupera la carga neutra. Es el método que presenta mayor eficacia de encapsulación (>80%), y además no se necesitan equipos especializados (Aldosari et al., 2020).

**-Método de emulsificación- evaporación del disolvente:** por último, existe esta variante del método anterior, en la que los lípidos en este caso se disuelven en un líquido inmiscible con el agua como el diclorometano. Una vez incorporado el principio activo a los lípidos, por agitación

o presión reducida, se evapora el disolvente orgánico, terminándose de formar la NPL (Torres & Seijo, 2009).

## **4.4 PFIZER-BIONTECH**

### **4.4.1 INTRODUCCIÓN**

La vacuna Comirnaty es elaborada por los laboratorios Pfizer y BioNTech, estadounidense y alemán respectivamente. El principio activo se trata de un ARNm monocatenario, que codifica para la glicoproteína S del SARS-CoV-2 y fue denominado BNT162b2. La vacuna se aprobó en Europa, y por lo tanto en España el 21 de diciembre de 2020, y está indicada para la inmunización activa para prevenir la COVID-19 causada por SARS-CoV-2 en individuos mayores de 12 años (EMA, 2021).

### **4.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN**

Como mecanismo de acción, la inmunización activa se consigue tras la transcripción de la cadena de ARNm por los ribosomas de las células del paciente, que generan una glicoproteína S mutante o fragmentos de ésta, que migran hasta la membrana plasmática y son presentadas en su superficie. Estos fragmentos son reconocidos por células del sistema inmune presentadoras de antígenos, que cuando sean reconocidas por linfocitos Th (helper) que inducirán la activación de linfocitos B y de otras células de defensa, para la síntesis de anticuerpos y de células de memoria que acabaran generando una inmunidad del organismo frente a la enfermedad (Corum & Zimmer, 2021).

### **4.4.3 FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN**

Respecto a su forma farmacéutica este medicamento se presenta en un vial que contiene una dispersión congelada de color de entre blanco y blanquecino, y un concentrado para dispersión inyectable estéril (Figura 15). El primer vial contiene 0,45 mL de producto final y deberá ser diluido con los 1,8 mL de solución salina estéril, hasta un volumen final de 2,25 mL en la dispersión tras reconstrucción (AEMPS, 2020).

En su formulación se encuentra la cadena de nucleótidos BNT162b2, que conforma el principio activo. Esta cadena de ARNm ha sido modificada con varias mutaciones, entre ellas las más importantes son dos: en las posiciones 986 y 987 se han sustituido dos aminoácidos, la lisina y la valina respectivamente, por dos prolinas para bloquear la conformación de la glicoproteína S en su estado de prefusión con el receptor de la membrana plasmática, consiguiendo así un estado óptimo de antigenicidad. Otra de las mutaciones que posee la sustancia activa es la no presencia de uridina como nucleósido, en su lugar se utiliza la forma artificial N-1-

metilpseudouridina, para evitar así una respuesta inmunogénica contra la cadena de ARNm foráneo. Además de estas mutaciones, Pfizer y BioNTech añaden más modificaciones para optimizar el rendimiento y la estabilidad del principio activo, como son la caperuza 5', el fragmento 5'-UTR de iniciación, el fragmento 3'-UTR de terminación y la cola de poli A final (Montoliu, 2020).

Para justificar e interpretar los excipientes de la formulación, hemos de tener en cuenta que el principio activo está contenido dentro de una nanopartícula lipídica, formada por cuatro lípidos distintos, siendo el ((4-hidroxi-butil)azanodiil) bis(hexano-6,1-diil) bis(2-hexildecanoato) o ALC-0315 el lípido mayoritario, el 2-[(polietilenglicol)-2000]-N, N-ditetradecilacetamida o ALC-0159, el 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina o DSPC y colesterol. Además de las NPL el fármaco Comirnaty va acompañado de otros excipientes tal y como se recoge en la tabla de la Figura 15, donde se indica su función en la formulación.

FORMULACIÓN	FUNCIÓN
ARN mensajero	Principio activo
((4-hidroxi-butil)azanodiil) bis(hexano-6,1-diil) bis(2-hexildecanoato) (ALC-0315) 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159) 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) Colesterol	Componentes de las NPL
Cloruro de potasio / Cloruro de sodio	Isotonizante
Fosfato de disodio dihidrato / Dihidrogenofosfato de potasio	Regulador pH
Sacarosa	Crioprotector
Agua para preparaciones inyectables	Vehículo




Figura 15. Vial y formulación de la vacuna de Pfizer-BioNTech.

En el caso de Comirnaty, esta función la aporta el lípido ALC-0315, formado por una amina terciaria, al que se le unen por un lado una cadena hidrocarbonada e hidroxilada en su extremo, y dos cadenas hidrocarbonadas esterificadas de nuevo con nuevas cadenas de carbono (Figura 16). La presencia de estos grupos éster es necesaria para la degradación de la NPL por parte de las esterasas y que puedan ser eliminadas con facilidad después de haber cumplido su función (Aldosari et al, 2021).

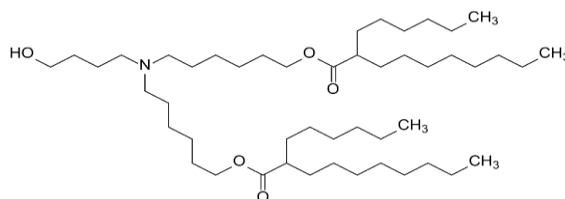


Figura 16. Estructura del ALC-0315.

En el caso de los lípidos PEGilados, esta función la aporta el lípido ALC-0159, formado por la unión mediante un enlace amida de una cadena de polietilenglicol a dos cadenas hidrocarbonadas (Figura 17).

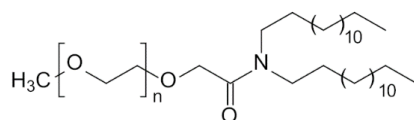


Figura 17. Estructura del ALC-0159

Además de los dos lípidos anteriores, la nanopartícula lipídica está formada por dos lípidos más, como se comentó en el apartado de generalidades, el colesterol y un derivado de la fosfatidilcolina, en este caso el DSPC, cuya estructura puede verse en la Figura 18, se observa la cabeza polar formada por la amina, y el grupo fosfato unido a la molécula de ácido graso.

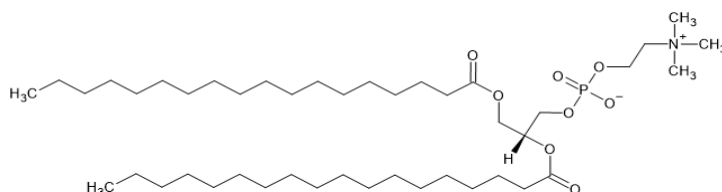


Figura 18. Estructura del DSPC.

La presencia de sacarosa en la formulación debe justificarse en base a las condiciones de almacenamiento de la vacuna, que necesita permanecer congelada a muy baja temperatura, por lo que aportará su función crioprotectora. Por otra parte, la combinación de cloruro de potasio, cloruro de sodio, dihidrogenofosfato de potasio y fosfato de disodio, es una mezcla muy usada en laboratorio, conocida como tampón fosfato salino o PBS (Martin et al., 2005).

#### 4.4.4 FABRICACIÓN

Para poder fabricar esta vacuna se siguen dos procesos, primero la obtención del principio activo y por último la formulación del medicamento. Para elaborar el principio activo, se obtiene por transcripción *in vitro*, de un plásmido insertado en líneas celulares de *E. coli*. Estas bacterias serán lisadas, y tras un proceso de purificación y filtración, se extraerá el ARNm BNT162b2, que pasará congelado a la segunda línea de producción. En este segundo proceso se descongelará y diluirá el principio activo, se formarán las NPL, para posteriormente añadir el buffer fosfato salino, filtrar, añadir el crioprotector, y tras una última filtración, en este caso estéril, llenar los viales y pasar a su congelación (EMA, 2020).

## 4.5 MODERNA

### 4.5.1 INTRODUCCIÓN

La vacuna COVID-19 Vaccine Moderna, es fabricada precisamente por el laboratorio estadounidense ModernaTX. En el caso del principio activo de nuevo, como en el caso de Comirnaty, se trata de una cadena de ARNm que codifica para la glicoproteína S del SARS-CoV-2. Fue aprobada por la EMA el 6 de enero de 2021 y está indicada para prevenir la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 en personas mayores de 18 años, de esta manera se convertía en la segunda vacuna aprobada en España para prevenir la COVID-19 (AEMPS, 2021).

### 4.5.2 MECANISMO DE ACCIÓN

De nuevo, su mecanismo de acción se debe a la traducción de la cadena de ARNm por parte de la maquinaria ribosomal propia del vacunado, al ser el mismo principio activo que el de Pfizer-BioNTech.

### 4.5.3 FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN

El medicamento se presenta en forma de una suspensión inyectable de color blanco blanquecino, a un pH aproximado de 7-8. Dicha suspensión se encuentra congelada dentro de viales (Figura 19), los cuales contienen cantidad suficiente para 10 dosis de 0,5 mL (EMA, 2021).

El principio activo de la vacuna de Moderna se trata del mismo que en el caso de Pfizer-BioNTech, con las mismas mutaciones en los lugares concretos de la cadena de ARNm.

Al igual que en la vacuna anterior, el principio activo se encuentra vehiculizado en una NPL formada por cuatro lípidos como puede observarse en la tabla de la Figura 19, dos de ellos obtenidos específicamente por el laboratorio para el desarrollo de esta vacuna (AEMPS, 2021), también se muestran el resto de los excipientes de la formulación.


FORMULACIÓN	FUNCIÓN	
ARN mensajero	Principio activo	
Lípido SM-102 1,2-Dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli-etilenglicol-2000 (PEG2000 DMG) 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) Colesterol	Componente de la NPL	
Trometamol / Clorhidrato de trometamol Ácido acético / Acetato sódico trihidrato	Regulador de pH	
Sacarosa	Crioprotector	
Agua para preparaciones inyectables	Vehículo	

Figura 19. Vial y formulación de la vacuna de Moderna.

SM-102 es un lípido patentado por ModernaTX, que consiste en una amina terciaria unida a una cadena hidrocarbonada terminada en un grupo hidroxilo, lo que le confiere cierta capacidad hidrofílica (Figura 20). Además, la presencia de grupos ésteres en las otras dos cadenas, como ya se ha comentado en apartados anteriores, es necesaria para facilitar la degradación de la NPL por parte de las esterasas, y evitar así su posible toxicidad (EMA, 2021).

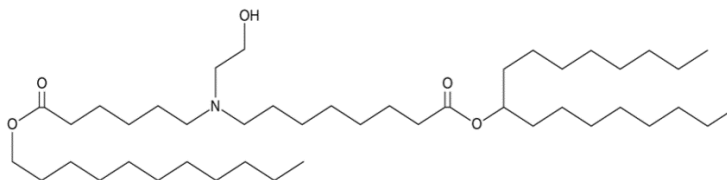


Figura 20. Molécula de SM-102 (EMA, 2021).

El lípido conjugado con polietilenglicol, en este caso es PEG 2000-DMG. En este caso se trata de un derivado del glicerol, unido a dos cadenas de hidrocarburos, y por último a una larga cadena de polietilenglicol, cuya estructura se refleja en la Figura 21, que actuará como impedimento estérico. (EMA, 2021).

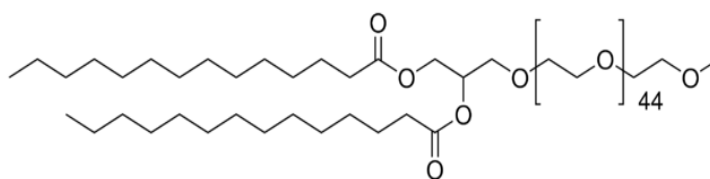


Figura 21. Molécula de PEG 2000-SMG (EMA, 2021).

Por último, encontramos dos lípidos más, los cuales son comunes a la vacuna de Pfizer-BioNTech, y son el colesterol y el DSPC, con la misma función.

Además de los excipientes que forman la nanopartícula lipídica, encontramos otros que aportarán estabilidad a la suspensión. Estos son el trometamol, clorhidrato de trometamol, ácido acético, acetato sódico trihidratado, sacarosa, y por supuesto el agua para inyectables, que conformará el vehículo del medicamento en cuestión.

En el caso de la sacarosa, de nuevo tiene un papel crioprotector, ya que esta vacuna se presenta en una suspensión congelada a  $-25^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.4 FABRICACIÓN

Para la fabricación de esta vacuna en primer lugar se sintetizó in vitro el principio activo a través de la enzima ARN polimerasa, haciendo uso de N-1-metilpseudouridina en lugar de uridina. Después, a través del método de dilución en etanol, anteriormente descrito, se encapsula la cadena de ARNm dentro de las NPL. La suspensión es neutralizada con un tampón a pH 7.5, y

posteriormente se le añade la sacarosa como crioprotector. Por último, es envasado en los viales a través de una filtración esterilizante (Corbett et al, 2020).

## **4.6 ASTRAZENECA**

### **4.6.1 INTRODUCCIÓN**

Vaxzevria es la vacuna elaborada por el laboratorio AstraZeneca en colaboración con la Universidad de Oxford. En este caso el principio activo no se trata de una cadena de ARNm, en su lugar, el laboratorio de origen británico opta por el uso de un Adenovirus de Chimpancé modificado genéticamente, al que han denominado como ChAdOx1, el cual codifica para la glucoproteína S del SARS-CoV-2.

Fue aprobada por la Agencia Europea del Medicamento el 29 de enero de 2021, y está indicada para mayores de 18 años, aunque en España, desde el 13 de abril, sólo se administra a personas entre 60 y 69 años o a personas que hayan recibido la primera dosis de Vaxzevria, debido a una posible asociación causal entre la administración de la vacuna y la aparición de posibles acontecimientos trombóticos, mayoritariamente en personas menores de 60 años (AEMPS, 2021).

### **4.6.2 MECANISMO DE ACCIÓN**

Su mecanismo de acción se basa en la inoculación de un virus vivo, que infectará las células propias del paciente.

Cuando el virus accede a la célula, se desplaza hasta el núcleo, para introducir su ADN en el interior, donde utilizará la maquinaria del núcleo para realizar la transcripción, y sintetizar una cadena de ARNm, cuyo mecanismo de acción es a partir de ahora igual al de las vacunas anteriores, pues se traducirá para presentar la proteína S a la maquinaria inmunogénica del paciente, generando así la inmunidad adquirida (Corum & Zimmer, 2021).

### **4.6.3 FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN**

La vacuna se trata de una suspensión inyectable, de incolora a marrón, transparente o ligeramente opaca, formulada a un pH de 6.6, envasada en viales multidosis capaces de inocular 8 o 10 dosis cada uno (Figura 22).

FORMULACIÓN	FUNCION
ChAdOx1-S	Principio activo
L-Histidina / Hidrocloruro de L-Histidina	Crioprotector / Regulador del pH
Cloruro de magnesio hexahidrato	Crioprotector / Coadyuvante
Polisorbato 80	Humectante
Etanol / AEDT	Antioxidante
Sacarosa	Isotonizante / Crioprotector
Cloruro de sodio	Isotonizante
Agua para inyectables	Vehículo



Figura 22. Vial y formulación de la vacuna de AstraZeneca.

Como ya hemos comentado, el principio activo se trata de un Adenovirus de chimpancé, el cual ha sido modificado genéticamente para no poseer capacidad replicativa, eliminando las regiones de replicación E1 y E3. En este caso la información genética necesaria para desarrollar la respuesta inmune va contenida en una doble cadena de ADN, a diferencia de cadena simple de ARNm vista en las dos vacunas anteriores. En dicha cadena de ADN se ha insertado a través de ingeniería genética, el gen que codifica para la glicoproteína S, en su conformación trimérica prefusión, debido a dos sustituciones de prolina y una modificación de la unión S1/S2. Esta conformación coincide con el estado que encontrarían nuestras células del sistema inmune en caso de infección por SARS-CoV-2.

El adenovirus se trata de un virus no encapsulado de entre 80 y 100 nm de tamaño, en la que su cubierta de polipéptidos es la que envuelve y protege a la cadena de polinucleótidos (Figura 23). Al no poseer las regiones de replicación E1 y E3 en su material genético, el virus tiene capacidad infectiva, es decir, de penetrar en la célula y usar la maquinaria para expresar sus proteínas, pero no tiene capacidad para desarrollar enfermedad, ya que no puede reproducirse y diseminarse (EMA, 2021).



Figura 23. Simulación de la estructura del ChAdOx1 (AstraZeneca, 2020).

Dado que la función específica de algunos de ellos se ha comentado en la parte de los excipientes habituales en formulaciones, obviaremos su estudio.



El cloruro de magnesio hexahidratado se trata de una sal que en disolución se disocia en dos iones cloros monovalentes y un ion magnesio bivalente. Este ion, a altas concentraciones tiene un papel estabilizador de la vacuna (Altaras et al., 2005), conservando la infectividad del virus a altas temperaturas y previniendo su inactivación, además se ha sugerido su papel coadyuvante de la inmunidad al ser inoculada, potenciando el efecto inmune de la vacuna (Selvaraj et al., 2015). Además, aportará isotonicidad a la muestra al ser una sal que se disocia rápidamente en agua.

El etanol además de conservante habitual en preparados líquidos actúa como inhibidor de las reacciones de oxidación de los radicales libres, ejerciendo un papel antioxidante de la muestra, lo mismo que el AEDT. Esta asociación etanol/EDTA es frecuente, y aparece descrita en la bibliografía por su efecto sinérgico de esa capacidad antioxidante, ayudando a la estabilidad y la conservación de la vacuna (Altaras, 2005).

Por último, hemos asignado a la sacarosa junto con la histidina una función crioprotectora, porque aun conservándose la vacuna a una temperatura de refrigeración, en el proceso de fabricación, el principio activo necesita ser trasladado de una planta de producción a otra, y en ese trayecto, los adenovirus son congelados entre  $-90^{\circ}\text{C}$  y  $-55^{\circ}\text{C}$  (EMA, 2021). Por tanto, este excipiente, los crioprotectores, resultarían imprescindibles en la formulación para mantener la integridad del adenovirus durante ese proceso de congelación.

#### **4.6.4 FABRICACIÓN**

En el procedimiento de fabricación de esta vacuna podemos diferenciar dos etapas, el proceso de escalado y cultivo del principio activo y en segundo lugar el proceso de envasado.

Para el cultivo de los adenovirus, se infectan un conjunto de células HEK (Human Embryonic kidney) llamadas T-Rex-293. Aunque el virus no tiene capacidad replicativa, en el genoma de estas células, en particular en el cromosoma 19, sí se ha introducido el gen de replicación E1 del virus para que este pueda replicarse, aumentar en número y producir un cultivo a gran escala.

Cuando se alcanza una cantidad suficiente de adenovirus, las células HEK son lisadas con detergente. La muestra posteriormente es tratada con enzimas tipo nucleasas para eliminar los restos de ADN libres en el medio tras la lisis de las células, y sometida a una filtración profunda, para eliminar el material celular. Tras otros procesos cromatográficos y de ultrafiltración, el principio activo se envasa y se congela entre  $-90^{\circ}\text{C}$  y  $-55^{\circ}\text{C}$  para ser trasladado a otra planta de fabricación.

En esta segunda planta se recibe el principio activo y se descongela, donde será mezclado con un tampón de dilución formando la suspensión. El medicamento será envasado directamente en los viales para después sellarlos, a través de una filtración esterilizante con un filtro menor de 0,22 micras, capaz de retener a las bacterias y hongos, pero dejando pasar a los adenovirus (EMA, 2021).

## **4.7 JANSSEN**

### **4.7.1 INTRODUCCIÓN**

COVID-19 Vaccine Janssen es la vacuna elaborada por el laboratorio belga Janssen, filial de la corporación estadounidense Johnson & Johnson. De nuevo se opta por la utilización de un Adenovirus como principio activo, aunque en este caso es de origen humano.

Esta vacuna fue aprobada por EMA el 11 de marzo de 2021, y está indicada para mayores de 18 años, siendo, de momento, la última vacuna aprobada en España para la inmunización frente a COVID-19 (AEMPS, 2021). La característica que más llama la atención de la vacuna de Janssen, y la que marca la diferencia respecto al resto de vacunas, es el hecho de necesitar una sola dosis para alcanzar la inmunización, ya que, según los estudios de eficacia, se alcanza aproximadamente un 67% de éxito en la inmunización y un 100% de efectividad evitando la mortalidad con una sola dosis, sin existir diferencias significativas entre la administración de una o dos dosis (Sadoff, 2021).

### **4.7.2 MECANISMO DE ACCIÓN**

Al utilizar también el mecanismo de acción del Adenovirus como vector vírico, su funcionamiento es análogo a la de AstraZeneca (Janssen, 2021).

### **4.7.3 FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN**

La vacuna consiste en una suspensión inyectable sin coloración o con una coloración ligeramente amarillenta, entre transparente y muy opalescente, con un pH de entre 6 y 6,4 (Figura 24). Se presenta en viales de 2,5 mL, que pueden venir en lotes de 10 o 20 unidades (AEMPS, 2021).

FORMULACIÓN	FUNCIÓN
Ad26.COVS-2 humano	Principio activo
2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBCD)	Coadyuvante / Crioprotector
Ácido cítrico monohidrato / Citrato de sodio dihidrato	Tampón / Antioxidante
HCl / NaOH	Ajuste fino de pH
Polisorbato 80	Humectante
Cloruro de sodio	Isotonizante
Etanol	Antioxidante / Humectante
Agua para preparaciones inyectables	Vehículo




Figura 24. Vial y formulación de la vacuna de Janssen.

El principio activo es análogo al de la vacuna elaborada por AstraZeneca, con la salvedad de que es un adenovirus humano tipo 26 de origen recombinante, que es sometido a una modificación genética similar al caso anterior. Sin embargo, la cadena de ADN (Figura 25) tiene las mismas modificaciones que en el caso de Vaxzevria (EMA, 2021).



Figura 25. Genoma del vector Ad26.COVS.2 (EMA, 2021).

A pesar de ser una vacuna similar a la anterior, existen diferencias en sus formulaciones que pasamos a comentar.

La primera es la del AEDT, que como comentamos ejercía la función de antioxidante secundario. Este hecho lo podríamos explicar en base a diferentes hipótesis. En primer lugar, por las diferentes condiciones de conservación, ya que mientras que Vaxzevria se conserva en estado líquido y sin congelar a temperatura entre 2° y 8°C, la elaborada por Janssen lo hace de forma congelada, lo que evitaría en gran medida los problemas de oxidación que pueda sufrir el principio activo, pudiendo prescindirse de este excipiente. Además, como ya indicamos el cítrico/citrato, además de regulador de pH, también puede ejercer una función antioxidante, con un mecanismo de acción similar al del AEDT.

Pero lo que más llama la atención en la formulación es la presencia 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HBCD). Este excipiente es un oligosacárido cíclico de 7 unidades de glucopiranosas derivada del almidón, que adopta una conformación rígida en forma de cono de tamaño variable (Rowe, 2009), tal y como podemos observar en la Figura 26.

Según el informe técnico de aprobación de la vacuna (EMA, 2021), la función de dicho excipiente en la formulación es estabilizante, que podemos interpretar en base a diferentes hipótesis.

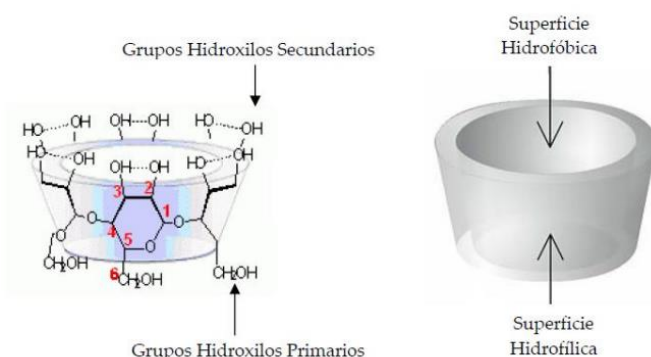


Figura 26. Estructura y conformación de las ciclodextrinas.

En primer lugar, las ciclodextrinas y en particular la HBCD, induce la respuesta de las células T *helper* de tipo 2, mejorando la producción de anticuerpos y manteniendo una respuesta inmunitaria más prolongada, por lo que podría tener un papel coadyuvante de la inmunidad (Wan et al., 2021). Así mismo, otro tipo de ciclodextrina como la sulfolipo-ciclodextrina, también se ha propuesto como coadyuvante, en este caso de una vacuna veterinaria de virus inactivado (Pfizer Salud Animal, 2017). En definitiva, sustituiría a la función coadyuvante que el cloruro de magnesio ejercía en vacuna anterior.

Por otro lado, las ciclodextrinas se pueden ejercer una función crioprotectora (Renteria et al., 2010), esta función se haría necesaria en la formulación ya que la vacuna se almacena congelada a -25°C, ejerciendo el papel de crioprotector no penetrante.

Por último, en la bibliografía hemos encontrado que la asociación de ciclodextrinas con tampón citrato, presente en esta vacuna, mejora la estabilidad adenoviral global en cuestión de cantidad, calidad e infectividad de los adenovirus, mencionando también su papel crioprotector (Adriaansen, 2015).

#### 4.7.4 FABRICACIÓN

El método de fabricación que sigue Janssen es parecido al proceso de fabricación de AstraZeneca, sólo que, en este caso para la producción del virus, utilizan unas células llamadas PER.C6, que derivan de células HER (Human embryonic retina), al que se le añade en su genoma la región E1 para que los adenovirus puedan replicarse (EMA, 2021).

## 4.8 ESTUDIO COMPARATIVO

Dado que el objetivo del trabajo es un estudio comparativo de las diferentes vacunas aprobadas en España, hemos creído interesante finalizar con su estudio comparativo (Tabla 1), en el que incluimos algunos aspectos que no se han comentado en el estudio monográfico.

Laboratorio	Pfizer	Moderna	AstraZeneca	Janssen
Principio activo	ARNm	ARNm	Adenovirus chimpancé	Adenovirus humano
Vehículo	NPL	NPL	Vector Vírico	Vector vírico
Efectividad	95%	94%	70%	67%
Conservación	-73°C	-25°C	2°-8°C	-25°C
Periodo de validez (PV)	6 meses	7 meses	6 meses	2 años
PV tras reconstitución o descongelación	6 horas	12 horas	-	12 horas
Numero de dosis necesarias	2 dosis	2 dosis	2 dosis	1 dosis
Tiempo entre dosis	21 días	28 días	4 a 12 semanas	-
Volumen de dosis	0,3 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Precio aproximado por dosis	16,5€	21€	2,9€	8,5€

*Tabla 1. Resumen de características de las vacunas aprobadas en Europa.*

## 5 CONCLUSIONES

---

1. Al solapar las fases de su desarrollo, se ha conseguido reducir el tiempo necesario para su aprobación y puesta en el mercado, lo que no supone una merma en su seguridad, habida cuenta además que los ensayos clínicos se han realizado con un mayor número de voluntarios de lo normal en este tipo de procesos.
2. La proteína S del SARS-CoV-2 debido a la importancia que tiene en el papel de reconocimiento celular, por lo que la información genética para su síntesis se incluye en las 4 vacunas.
3. La vacuna de Pfizer-BioNTech y Moderna utilizan el mecanismo de ARNm vehiculado en NPL mientras que AstraZeneca y Janssen emplean el vector vírico como método de acceso a nuestras células.
4. Las NPL no deben confundirse con los liposomas ya que, aun teniendo formulaciones análogas, los liposomas están formados por una bicapa lipídica o varias encerrando un núcleo hidrófilo, mientras que las NPL están formados por una cubierta lipídica que contiene una matriz también lipídica en estado semisólido.
5. Respecto a su forma farmacéutica todas ellas son preparados inyectables en forma de dispersión coloidal, menos envasadas en vial multidosis, si bien Pfizer-BioNTech, es la única que se comercializa en forma de concentrado para dilución. De forma errónea, AstraZeneca y Janssen reciben la denominación de suspensión.
6. El proceso que se sigue para la fabricación de los principios activos es, el método de dilución del disolvente en el caso de Pfizer-BioNTech y Moderna. En el caso de AstraZeneca y Janssen se realiza un escalado de cultivos en células modificadas genéticamente para ello.

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

Adriaansen J. Formulaciones de adenovirus mejoradas. Patente ES 2711115T3. Oficina Española de Patentes y Marcas. 30 de abril de 2019.

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Fichas técnicas de Vacunas aprobadas para la COVID-19. CIMA: Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS [en línea]. [Consultado en mayo 2021] Disponible en: <https://cima.aemps.es/cima/publico/lista.html>

Aldosari BN, Alfagih IM, Almurshedi AS. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics*. 2 de febrero de 2021;13(2):206.

Altaras NE, Aunins JG, Evans RK, Kamen A, Konz JO, Wolf JJ. Production and Formulation of Adenovirus Vectors. En: *Gene Therapy and Gene Delivery Systems*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 193-260. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; vol. 99).

ANGUS. Life Science. Ficha de producto de TRIS AMINO. Enero 2017 [Consultado en abril 2021]. Disponible en:

[https://www.angus.com/literature/downloaddoc?fileName=ANGUS\\_LifeSciences\\_TRISAMINO\\_Pharma-Support\\_AppBulletin.pdf&contentType=Application%20Bulletin&parentFolder=Literature](https://www.angus.com/literature/downloaddoc?fileName=ANGUS_LifeSciences_TRISAMINO_Pharma-Support_AppBulletin.pdf&contentType=Application%20Bulletin&parentFolder=Literature)

Baheti A, Kumar L, Bansal AK. Excipients used in lyophilization of small molecules. *J. Excipients and Food Chem*. 2010 1 (1). 41-54.

Berdasquera D, Cruz G, Suarez CL. La vacunación. Antecedentes históricos. *Rev cubana Med Gen Integr* 2000;16(4):375-8

Biochempeg. Liposomes and Lipid Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers. 8 de abril de 2020. [Consultado en mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.biochempeg.com/article/122.html>

Callaway E. The race for coronavirus vaccines. *Nature*. 30 de abril de 2020. Vol. 580. 576-7.

CAV-AEP: Comité asesor de Vacunas – Asociación Española de Pediatría. Variantes del SARS-CoV-2 y vacunas de la COVID. 16 marzo de 2021. [Consultada el 1 de junio de 2021]. Disponible en: <https://vacunasaep.org/profesionales/noticias/coronavirus-nuevas-variantes-y-vacunas>

CAV-AEP: Comité asesor de Vacunas – Asociación Española de Pediatría. Los adyuvantes también en algunas vacunas del COVID-19. 2 de noviembre de 2020. [Consultado el 30 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://vacunasaep.org/profesionales/noticias/adyuvantes-y-vacunas-del-COVID-19>

Choi M, Aiello EA, Ennis IL, Villa-Abrille MC. El SRAA y el SARS-CoV-2: el acertijo a resolver. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. Octubre de 2020;37(4):169-75.

Cook W, Quinn ME, Rowe RC. Cyclodextrins Monography. En: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 6. ed. London: APhA, (PhP) Pharmaceutical Press; 2009. 210-214.

Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*. 22 de octubre de 2020;586(7830):567-71.

Corum J, Zimmer C. Cómo funciona la vacuna de Oxford-AstraZeneca. *The New York Times*. 5 de marzo de 2021. [Consultado en mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.nytimes.com/es/interactive/2021/health/oxford-astrazeneca-vacuna-covid.html>

Corum J, Zimmer C. How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works. *The New York Times*. 7 de mayo de 2021. [Consultado en mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/pfizer-biontech-covid-19-vaccine.html>

Cueto JC. Vacunas contra el coronavirus: cómo se modifican y qué tan fácil sería actualizarlas si el patógeno se vuelve resistente. BBC News Mundo. 8 de febrero de 2021 [Consultado el 3 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-55840927>

EMA: European Medicines Agency. Assesment report Comirnaty. 19 febrero de 2021. [Consultado en marzo 2021] Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf)

EMA: European Medicines Agency. Assesment report COVID-19 Vaccine Moderna. 11 de marzo de 2021. [Consultado en marzo de 2021] Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf)

EMA: European Medicines Agency. Assesment report COVID-19 Vaccine AstraZeneca. 29 de enero de 2021 [Consultado en abril de 2021]. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-public-assessment-report_en.pdf)

EMA: European Medicines Agency. Assesment report COVID-19 Vaccine COVID-19 Vaccine Janssen. 11 de marzo de 2021 [Consultado en abril de 2021]. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-janssen-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-janssen-epar-public-assessment-report_en.pdf)

García M, Carbajal JA, Albert M, Al Kassam D, García-Martínez D, Salinas M. ACTUALIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO DEL VIRUS SARS-CoV-2 AGENTE DE LA INFECCIÓN COVID-19. Comunicación Vocalía Nacional de Analistas clínicos. CGCF. 21 enero 2021.

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. Heise MT, editor. J Virol [Internet]. 10 de marzo de 2021; 95(7).

Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. Nanomaterials. 20 de febrero de 2020;10(2):364. DOI: 10.3390/nano10020364

González V. Curvas de titulación de aminoácidos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Salamanca. Año desconocido.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. Molecular Cell. 21 de mayo de 2020;78(4):779-784.e5.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nat Rev Microbiol. marzo de 2021;19(3):141-54.

Huang Y, Yang C, Xu X, Xu W, Liu S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. Acta Pharmacol Sin. septiembre de 2020;41(9):1141-9.

Janssen. The Janssen COVID-19 Vaccine: How It's Designed. 2021 [Consultado en mayo de 2021] Disponible en: <https://www.janssencovid19vaccine.com/files/downloadables/cp-205016v2%20--%20Janssen%20COVID19%20Vaccine%20EUA%20Viral%20Vector%20Technology%20Flashcard.pdf>

Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. Viruses. 27 de marzo de 2020;12(4):372.

Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. Journal of Pharmaceutical Sciences. Agosto de 2008;97(8):2924-35.



- Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*. 22 de octubre de 2020;586(7830):516-27.
- Mali SS, Hajare AA, Karade RS, Salunkhe SS, Nadaf SJ, Honmane SM, et al. Expulsion by Ionic Complexation: Benchmark Therapy for Atherosclerosis A Review. *IJPBR*. 31 de marzo de 2014;2(01):103-7.
- Martin NC, Pirie AA, Ford LV, Callaghan CL, McTurk K, Lucy D, et al. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Science & Justice*. julio de 2006;46(3):179-84.
- Ministerio de Sanidad. Actualización de la situación epidemiológica de las variantes de SARS-CoV-2 de mayor impacto e interés en salud pública en España. 14 de junio de 2021 [Consultado 16 de junio de 2021]. Disponible en: [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/C\\_OVID19\\_Actualizacion\\_variantes\\_20210614.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/C_OVID19_Actualizacion_variantes_20210614.pdf)
- Ministerio de Sanidad. Información científico-técnica: Enfermedad por coronavirus. 15 enero de 2021 [Consultado el 31 de mayo 2021]. Disponible en: [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/IT\\_Coronavirus.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/IT_Coronavirus.pdf)
- Montoliu L. La ciencia que hay detrás de la primera vacuna contra la COVID-19. *Genética*. 27 de diciembre de 2020 [Consultado en abril de 2021]. Disponible en: <https://montoliu.naukas.com/2020/12/27/la-ciencia-que-hay-detras-de-la-primera-vacuna-contra-la-covid-19/>
- OMS. Organización mundial de la Salud. Conmemoración de la erradicación de la viruela: un legado de esperanza para la COVID-19 y otras enfermedades. 8 de mayo de 2020 [Consultado el 2 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/08-05-2020-commemorating-smallpox-eradication-a-legacy-of-hope-for-covid-19-and-other-diseases>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Tracking SARS-CoV-2 variants. 31 de mayo de 2021 [Consultado el 1 de junio de 2021] Disponible en: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
- OMS. Organización Mundial de la Salud. Vacunas e inmunización: ¿qué es la vacunación? 30 de diciembre de 2020 [Consultado en abril de 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjw8cCGBhB6EiwAgORey1dcFdXLYWcN\\_E48xcIRUF-nqZwhpKOFQSiRDDPFgMb1INTGxq3ShxoCOXwQAvD\\_BwE](https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=CjwKCAjw8cCGBhB6EiwAgORey1dcFdXLYWcN_E48xcIRUF-nqZwhpKOFQSiRDDPFgMb1INTGxq3ShxoCOXwQAvD_BwE)
- Padilla CM, Ginés JM. Generalidades sobre las vacunas comercializadas en España: Estudio monográfico de la vacuna contra el Sarampión. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Sevilla Julio de 2019.
- Paredes F, Roca JJ. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Bioquímica*. Julio - agosto 2002 Vol. 21. 7. 96-100
- Pfizer Salud animal. Pfizer Salud Animal presenta Suvaxyn® PCV en un único y original evento celebrado en la Plaza de Colón de Madrid. *Cría y Salud*. 2017. Nº 47. 16-19.
- Pfizer-BioNTech. La vacuna de Pfizer-BioNTech contra COVID-19 y las jeringas o agujas de volumen muerto bajo. Mayo de 2021. [Consultado el 15 de mayo de 2021] Disponible en: [https://www.cvdvaccine-us.com/images/pdf/Low-Dead-Volume-Syringe-Brochure\\_es.pdf](https://www.cvdvaccine-us.com/images/pdf/Low-Dead-Volume-Syringe-Brochure_es.pdf)
- Rajaeiyan A, Bagheri-Mohagheghi MM. Comparison of Urea and Citric Acid Complexing Agents and Annealing Temperature Effect on the Structural Properties of - and -Alumina Nanoparticles Synthesized by Sol-Gel Method. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2013; 2013:1-9.

Renteria SS, Clemens CC, Croyle MA. Development of a nasal adenovirus-based vaccine: Effect of concentration and formulation on adenovirus stability and infectious titer during actuation from two delivery devices. *Vaccine*. febrero de 2010;28(9):2137-48.

RFE. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Real Farmacopea Española. 5ª ed. Madrid: 2015.

Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COVS Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 10 de junio de 2021;384(23):2187-201.

Selvaraj J, Rajendran V. Formulation, Efficacy and Immunogenicity Studies of a Liquid State Rabies Vaccine with Magnesium Chloride as Stabilizer. *J Vaccines Vaccin* 2015;06(05).

Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 26 de agosto de 1997;154(2):123-40.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169 (2016) 2–5.

Sotomayor F, Corbacho JM, Valiente AM, Benítez Y, Viera T. General aspects about the structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2020;39(3): 867

Torres D, Seijo B. Nanosistemas lipídicos. En: José Luis Vila Jato. *Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 28. Real Academia Nacional de Farmacia. 133-67.

Tuells J, Duro Torrijos JL. El proceso de creación del Instituto Pasteur (1886–1888) según la prensa española de la época. *Vacunas*. Octubre de 2011;12(4):154-9.

Uberos J. Adyuvantes en vacunas. *Sociedad de pediatría de Andalucía Occidental*. 30 de septiembre de 2013.

Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Combating Coronavirus: Key Role of Cyclodextrins in Treatment and Prevention. Gallagher T, editor. *J Virol*. 17 de marzo de 2020. 94(7).

Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J, Gao X-F, Wang D-P, Cao J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 25 de noviembre de 2020;10: Article 587269.

Zang D. Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters Monography. En: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6. ed. London: APhA, (PhP) Pharmaceutical Press; 2009. 549-553.