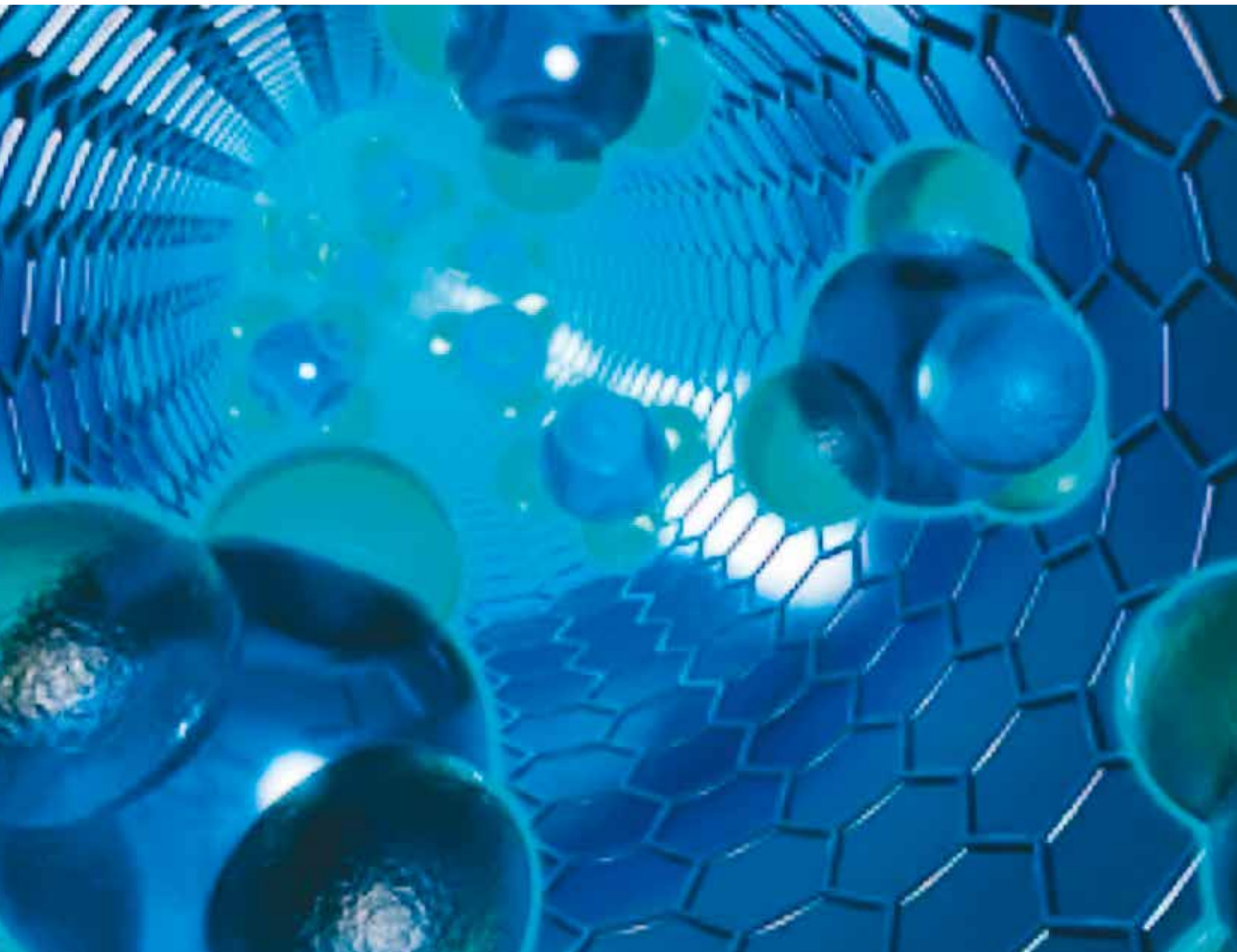


# DISINFECTION

*Quaderno monografico 02/2022*



GABRIELE SEGALLA

## **Criticità chimico-fisiche e potenziale tossicologico dei nanomateriali lipidici contenuti in un vaccino a mRNA**

DIFFUSIONE RISERVATA AGLI OPERATORI SANITARI

**Lofrano Marcello** (Brescia): *Presidente*  
**Radaelli Massimo Enrico** (Parma): *Coordinamento*

**Adamanti Simonetta** (Parma):  
*Anestesia e Rianimazione*

**Carraro Renato** (Padova):  
*Biosicurezza*

**Colombo Giovanni Battista** (Milano):  
*Chimica*

**Di Fede Angelo Maria** (Parma):  
*Immunologia*

**Guerrini Gian Luca** (Milano):  
*Innovazione industriale*

**La Manna Antonino** (Brescia):  
*Microbiologia applicata*

**Luisetto Mauro** (Piacenza):  
*Tossicologia ambientale*

**Polizzi Manuela** (Parma):  
*Ingegneria civile*

**Pucci Ennio** (Pavia):  
*Medicina del Lavoro*

**Spagnulo Stefano** (Lecce):  
*Biologia agroalimentare*

**Vento Maurizio** (Parma):  
*Otorinolaringoiatria*

**Zurca Gianina** (Rieti):  
*Residenze per anziani*



Natura docet la Natura insegna

Medicina, Salute, Alimentazione, Benessere, Turismo e Cultura

Quaderno monografico N. 02/2022 - Diffusione riservata ai medici  
 Autorizzazione di Tribunale di Verona n.2133 del 14/02/2020

**Sede legale:**

**A.Na.M.** - Via Caprera, 1 - 37126 Verona (VR)

**Direzione scientifica e redazione:**

Strada della Lodesana 649 SX - 43036 Fidenza (PR)

**Direttore scientifico:**

Massimo Enrico Radaelli [radamass1@gmail.com](mailto:radamass1@gmail.com)

**Direttore responsabile:**

Gianluigi Pagano [paganoprom@hotmail.com](mailto:paganoprom@hotmail.com)

**Direttore editoriale:**

Giovanni Battista Colombo [gianbattista.colombo@libero.it](mailto:gianbattista.colombo@libero.it)

**Direttore amministrativo:**

Rosalba Lofrano [rosalba.lofrano@gmail.com](mailto:rosalba.lofrano@gmail.com)

**Direttore commerciale:**

Marcello Lofrano [marcello.lofrano@icloud.com](mailto:marcello.lofrano@icloud.com)

**Stampa:**

Tipografia La Grafica - Molteno (Lc)

**Segreteria di Redazione:**

Alisée Maksimovna Radaelli - Manuel Lofrano

**Osservatorio internazionale:**

Africa: Martin Obioha  
 Argentina: Santiago Spadafora  
 Azerbaijan: Tural Mammadov  
 Brasile: Patricia Urquiza Lundgren, Spartaco Bolognini  
 Cina: Giovanni Cubeddu  
 Giappone: Hiroshi Kazui  
 India: Luca Riccò  
 Israele: Moshe Jean  
 Kazakhstan, Kirgystan: Anara Bayanova  
 Marocco: Miriem Dasser  
 Moldova: Tatiana Cojocaru  
 Paesi balcanici: Olja Turanjanin  
 Paesi scandinavi: Simona Aramini  
 Romania: Bianca Constantin  
 Spagna: Josè Miguel Lainez  
 Sudafrica: Antonio Pappalardo  
 Sud Est Asiatico: Adriano Ciocca  
 Tunisia: Wael Toumi  
 Ucraina: Nataliya Dyachyk  
 Uruguay: Federico Dajas

*Eventuali detentori di copywriting sulle immagini ai quali non siamo riusciti a risalire, sono invitati a mettersi in contatto con [amministrazione@saintgeorge.it](mailto:amministrazione@saintgeorge.it)*

*La Rivista è distribuita telematicamente in abbonamento gratuito e in versione cartacea a target selezionati. I dati sono trattati elettronicamente e utilizzati dall'Editore per la spedizione della pubblicazione e di altro materiale da essa derivato. Nessun testo può essere riprodotto con qualsiasi mezzo senza il consenso scritto. "I contenuti dei 'Quaderni' esprimono il parere degli Autori e non necessariamente quelli dell'Editore e della Direzione scientifica della Collana"*

## Biotecnologie e nanomateriali

# Fra scienza e cautela



di **Marcello Lofrano**,  
Presidente  
A.T.T.A.  
(Associazione  
Tossicologi  
e Tecnici  
Ambientali)

*Una delle più famose raffigurazioni di un orologio analogico che rappresenti l'evoluzione biologica sul pianeta Terra, vede, nelle ventiquattr'ore, la comparsa dell'uomo negli ultimi minuti, ma non basta l'estensione grafica di pochi secondi per far capire l'inarrestabile crescita esponenziale delle sue conquiste scientifiche. In ambito biomedico, da quando Kary Banks Mullis (1944-2019, Premio Nobel 1993 per la Chimica insieme a Michael Smith) elaborò la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR), impensabili sviluppi teorici e applicativi hanno coinvolto il mondo della diagnostica immunologica e, analogamente, la grande e progressiva espansione delle nanotecnologie, ha consentito progressi tali da rendere possibile la "creazione" di nuove molecole, in ambito farmaceutico, con tempistiche accelerate, del tutto imprevedibili fino a tempi relativamente recenti. La favola biblica del serpente e della mela, evoca peraltro molto efficacemente i rischi connessi con l'accesso all'albero della conoscenza... Così l'evidente incidenza anomala di reazioni avverse di farmaci genici a mRNA, sviluppati in tempi-record quali "vaccini" per contrastare il nuovo coronavirus SARS-Cov-2, responsabile della pandemia Covid-19, molecole realizzate con biotecnologie e nanomateriali, ha scatenato ipotesi di ogni genere quando, con buona probabilità, il problema va forse solo ricercato nel controllo di qualità a livello della produzione di queste sostanze. Il secondo Quaderno monotematico che Disinfection pubblica, dopo uno precedente dedicato allo studio di anomalie ematologiche in soggetti vaccinati sintomatici, probabilmente connesse a residui di lavorazione in alcuni lotti, si affianca idealmente, nella stessa direttrice di ricerca. Con l'invito, che quale Presidente della Associazione Tossicologi e Tecnici Ambientali (ATTA) non posso che apprezzare e condividere, ad una sistematica e riflessiva etica sperimentale (perché sperimentale è la natura di questi "vaccini", nati nell'emergenza), in ossequio alle precise norme dettate in merito dal Codice di Norimberga.*

A.T.T.A.  
il Presidente  
Prof. Marcello Lofrano

# Criticità chimico-fisiche e potenziale tossicologico dei nanomateriali lipidici contenuti in un vaccino a mRNA



**Gabriele Segalla**  
gabriele.segalla@gmail.com  
Biochimico  
Ricercatore indipendente \*

## SOMMARIO

Il preparato medicinale denominato Comirnaty di Pfizer-BioNTech è una sospensione acquosa di nanomateriali lipidici, destinata a costituire, dopo le fasi di scongelamento e diluizione, il prodotto finito iniettabile per via intramuscolare.

Nel presente studio, si esaminano alcune evidenti criticità chimico-fisiche del preparato, in merito alla manifesta instabilità della sua composizione quali-quantitativa, nonché al suo conseguente potenziale tossicologico, nella fattispecie correlato alla possibile formazione di ROS (*reactive oxygen species*), dopo l'inoculazione intramuscolare, in diversi siti biologici, quali, potenzialmente, reni, fegato, cuore, cervello, ecc., provocandone disfunzioni e alterazioni.

Particolare preoccupazione desta la presenza nel formulato dei due eccipienti funzionali, ALC-0315 e ALC-0159, mai usati prima in un prodotto medicinale, né registrati in Farmacopea Europea, né tantomeno nell'inventario europeo C&L.

Le attuali Schede di Dati di Sicurezza del fabbricante risultano omissive e inadempienti,

soprattutto in merito a quanto previsto dalle vigenti normative europee in tema di registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione dei nanomateriali.

La presenza di elettroliti nel preparato e la successiva fase di diluizione dopo lo scongelamento e prima dell'inoculazione destano fondate preoccupazioni sulla precaria stabilità della sospensione risultante e sull'Indice di polidispersione dei nanomateriali in essa contenuti, fattori questi ipotizzabili come le *root causes* di numerosi effetti avversi post-vaccinazione registrati a livello statistico-epidemiologico.

Si consigliano e auspicano ulteriori immediati studi e verifiche in merito, prendendo nel frattempo in considerazione, se del caso e a scopo meramente precauzionale, l'immediata sospensione delle vaccinazioni con il preparato Comirnaty di Pfizer-BioNTech, alla luce dell'articolo 10 del Codice di Norimberga: *“Durante l'esperimento lo scienziato responsabile deve essere pronto a interromperlo in qualunque momento se indotto a credere che la continuazione dell'esperimento comporterebbe probabilmente lesioni, invalidità o morte per il soggetto umano”*.

### \* Dr. Gabriele Segalla,

Chimico, Specialista in Chimica organico-biologica, Chimica cosmetica e delle preparazioni ad uso topico per medicina estetica, Chimica delle micro-emulsioni e dei sistemi colloidali, Chimica delle sostanze organiche naturali.

E-mail: gabriele.segalla@gmail.com

L'Autore dichiara di avere eseguito la ricerca riportata nel presente lavoro in qualità di Ricercatore Indipendente, di non aver ricevuto alcun finanziamento e di non aver conflitti di interesse.

## 1. Nanomateriali: nozioni generali e riferimenti normativi Europei

Il prodotto medicinale (*medicinal product*) denominato *Comirnaty Covid-19 mRNA BNT162b2* è un semilavorato concentrato, a base di un particolare filamento di mRNA incapsulato in Nanoparticelle Lipidiche (*Lipid Nanoparticles*, LNPs), e destinato a costituire, dopo le fasi di scongelamento e diluizione mediante l'aggiunta di una soluzione di cloruro di sodio, una sospensione di nanomateriali iniettabile per via intramuscolare. È stato immesso in commercio in Europa, con autorizzazione subordinata a condizioni, rilasciata da EMA (European Medicines Agency) in data 21/12/2020 e *Assessment Report* in data 19/02/2021.<sup>1</sup>

I nanomateriali (chiamati anche nanoparticelle o nanoforme a seconda del contesto, tecnico-scientifico o normativo, in cui il termine viene usato) sono così definiti e descritti da ECHA (*European Chemicals Agency*):<sup>2</sup>

*“I nanomateriali sono sostanze chimiche o materiali composti da particelle con almeno una delle **dimensioni compresa tra 1 e 100 nanometri**.<sup>3</sup>*

*A causa di una maggiore superficie specifica per volume, i nanomateriali possono avere **caratteristiche diverse rispetto allo stesso materiale privo delle caratteristiche di nanoscala**. Di conseguenza, **le proprietà fisico-chimiche dei nanomateriali possono differire da quelle di sostanze sfuse o particelle di dimensioni maggiori**.*

*Molti prodotti di uso quotidiano contenenti nanomateriali sono già presenti sul mercato europeo come batterie, rivestimenti, indumenti antibatterici e cosmetici. Sebbene possano offrire opportunità tecniche e commerciali, **i nanomateriali possono anche comportare rischi per la nostra salute e per l'ambiente**. Proprio come per qualsiasi altra sostanza immessa sul mercato dell'UE, è **importante garantire che i loro usi siano opportunamente valutati e che eventuali rischi siano adeguatamente controllati**.”*

Ed è proprio al fine di garantire un adeguato controllo e una attenta valutazione dei rischi per la salute che ECHA

*“...opera in stretta collaborazione con le autorità competenti degli Stati membri, la Commissione europea, le ONG e le associazioni di settore, nonché le organizzazioni internazionali come l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE), al fine di **aiutare ad attuare la legislazione dell'UE sulle sostanze chimiche per i nanomateriali**.”<sup>4</sup>*

Già nel 2011, la Commissione europea aveva pubblicato una Raccomandazione<sup>5</sup> contenente la definizione di nanomateriale, invitando gli Stati membri, le agenzie dell'Unione e gli operatori economici ad usarla nell'adozione e nell'applicazione della legislazione e dei programmi strategici e di ricerca relativi ai prodotti derivanti dalle nanotecnologie, in particolare apportando le opportune modifiche in diversi regolamenti europei, tra cui il Regolamento REACH<sup>6</sup> e il Regolamento CLP<sup>7</sup>, al fine di armonizzare il modo in cui i nanomateriali erano definiti nei vari quadri giuridici.

Detta Raccomandazione veniva successivamente accolta dal Regolamento (UE) 2018/1881, entrato in vigore il 1° gennaio 2020, che, oltre ad introdurre alcune sostanziali modifiche al Regolamento REACH, enunciava una definizione di nanomateriale molto più articolata e completa, introducendo specifiche indicazioni per la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e le restrizioni concernenti le cosiddette *nanoforme*.

In tale Regolamento, si legge:

**“Definizione di nanoforma e serie di nanoforme simili:**

*Sulla base della raccomandazione della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale, una nanoforma è una forma di una sostanza naturale o fabbricata contenente particelle allo stato libero, aggregato o agglomerato, e in cui, per almeno il 50 % delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica, una o più dimensioni esterne siano comprese tra 1nm e 100nm, inclusi in deroga i fullereni, i fiocchi di grafene e i nanotubi di carbonio a parete singola con una o più dimensioni esterne inferiori a 1nm. A tal fine, il termine «particella» indica una parte minuscola di materia con limiti fisici definiti; «agglomerato» indica un insieme di particelle o aggregati con legami deboli in cui la superficie esterna risultante è simile alla somma delle superfici dei singoli componenti e «aggregato» indica una particella composta da particelle fuse o fortemente legate fra loro.”<sup>9</sup>*

Perché è importante caratterizzare e distinguere fra loro i vari tipi di nanoforme, quali appunto le singole particelle e i loro eventuali “aggregati” o “agglomerati”? Diciamo subito che i primi criteri di valutazione della pericolosità e tossicità delle nanoforme sono sostanzialmente quelli correlati alle loro **dimensioni**. Si noti, infatti, che nella sopra riportata definizione prescrittiva non vi è alcun riferimento alla composizione chimica (organica o inorganica) del materiale in questione, ma solo ed esclusivamente alle **dimensioni delle particelle** che lo costituiscono, sia esso **di origine naturale, derivata o sintetica**. In particolare, al fine di valutarne il profilo tossicologico, devono essere prese in considerazione prima di tutto le **caratteristiche fisico-chimiche**, e in particolare la **dimensione** delle particelle, la loro **distribuzione dimensionale** numerica, la loro **forma** e altri **parametri morfologici** (quali ad es. cristallinità, informazioni sulla struttura dell'insieme, comprese ad esempio strutture a conchiglia o strutture cave, ecc.), la **superficie** (superficie specifica in volume, superficie specifica in massa o entrambe), nonché la **struttura molecolare**.<sup>10</sup>

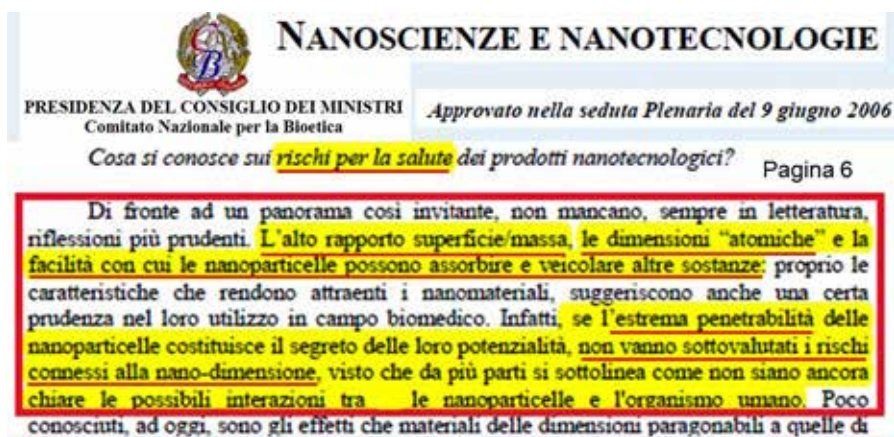


Figura 1. Il Comitato Nazionale per la Bioetica della Presidenza del Consiglio approva, nella seduta plenaria del 9 Giugno 2006, il primo documento ufficiale italiano sui rischi e benefici delle Nanotecnologie

L'evidente correlazione tra le dimensioni nanometriche e i rischi per la salute umana era già stata ampiamente esaminata e descritta dallo stesso C.N.B. (Comitato Nazionale per la Bioetica della Presidenza del Consiglio dei Ministri), che, nella seduta Plenaria del 9 giugno del 2006 (Figura 1), a tale proposito rilevava:

*“... L'alto rapporto superficie/massa, le dimensioni “atomiche” e la facilità con cui le nanoparticelle possono assorbire e veicolare altre sostanze: proprio le caratteristiche che rendono attraenti i nanomateriali, suggeriscono anche una certa prudenza nel loro utilizzo in campo biomedico. Infatti, se l'estrema penetrabilità delle nanoparticelle costituisce il segreto delle loro potenzialità, non vanno sottovalutati i rischi connessi alla nano-dimensione, visto che da più parti si sottolinea come non siano ancora chiare le possibili interazioni tra le nanoparticelle e l'organismo umano.*

...

*Il maggior numero dei dati scientifici disponibili sulle risposte fisiologiche alle nanoparticelle riguardano il sistema respiratorio, in merito al quale i dati sperimentali dimostrano che, alla medesima concentrazione di massa, le nanoparticelle producono effetti tossici maggiori rispetto a particelle più grandi di una stessa sostanza. Inoltre, secondo i dati evocati, l'interazione delle nanoparticelle con biomolecole quali il DNA, l'RNA o le proteine cresce con il decrescere della dimensione delle particelle considerate.*

...

*Nella considerazione dei rischi specifici derivanti dalle nanoparticelle, pertanto, vengono in rilievo non solo la dimensione, ma anche la forma e la composizione, oltre che la carica di superficie assorbita; ugualmente significativi sono i fenomeni di modifica, aggregazione, dissoluzione o degradazione della superficie delle nanoparticelle, da cui può derivare il rilascio di nanoparticelle. Posto che le nanoparticelle immediatamente solubili in ambiente fisiologico perdono le loro specifiche proprietà, è significativo verificare se esse si dissolvono o meno in molecole nocive. Riguardo alle nanoparticelle essenzialmente insolubili, esiste una possibilità di biopersistenza, derivante dall'esposizione di lungo termine e da specifici effetti associati alle nanoparticelle. Inoltre, la translocazione delle nanoparticelle può avvenire ad un livello più esteso e in siti diversi rispetto a quanto si verifica con particelle di dimensioni maggiori: pertanto si potrebbe verificare una distribuzione ed una accumulazione sistemica di tali particelle. È stato provato che le nanoparticelle sono in grado di translocare dal loro punto di accesso nel corpo umano e raggiungere altre parti, compreso il sangue e il cervello, anche se la portata e il significato di tale translocazione non sono chiari e pochi studi sono stati condotti in proposito. In particolare, è incerto se le nanoparticelle siano in grado di raggiungere il feto, anche se la distribuzione sistemica appare probabile nelle applicazioni mediche che comportano la somministrazione parenterale di nanoparticelle.”<sup>11</sup>*

## 2. Composizione e nanomateriali del vaccino Comirnaty Covid-19 mRNA BNT162b2

Come ormai ben noto, il vaccino Covid-19 Pfizer-BioNTech, denominato Comirnaty BNT162b2, contiene un particolare filamento di **mRNA incapsulato in nanoparticelle lipidiche**. Tali nanoparticelle hanno la funzione primaria di proteggere l' mRNA da degradazioni enzimatiche e permetterne così la penetrazione nelle cellule dell'organismo ospite, dopo l'iniezione intramuscolare.<sup>12</sup>

Nel formulato, si distinguono **quattro specifici componenti lipidici**, atti a formare, in combinazione tra di loro, nanoparticelle disperse in un mezzo acquoso:

- a) **ALC-0315** (lipide funzionale ionizzabile, **cationico**). Nome chimico: *((4-hydroxybutyl) azanediyl) bis (hexane-6,1-diyl) bis (2-hexyldecanoate)*. N. CAS 2036272-55-4. Molecola anfifilica<sup>13</sup>, di origine sintetica, costituita da una struttura amminica terziaria con un gruppo idrossi-butilico e due gruppi esilici esterificati con acido 2-esildecanoico.

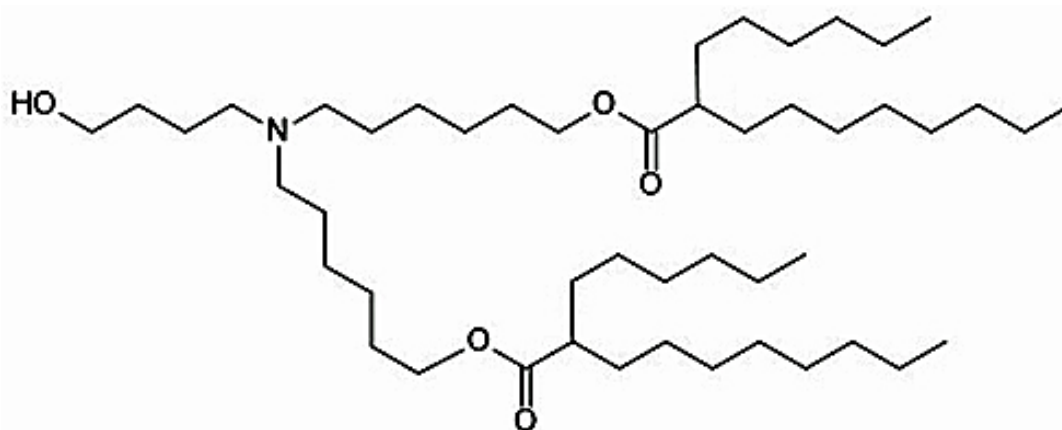


Figura 2. Struttura molecolare di ALC-0315

- b) **ALC-0159** (lipide funzionale, non-ionico, **polietossilato**). Nome chimico: *2 [(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide*. N. CAS 1849616-42-7. Molecola anfifilica, di origine sintetica, costituita da una di-miristil-ammide dell'acido idrossiacetico, polietossilato con 45/50 moli di ossido di etilene.

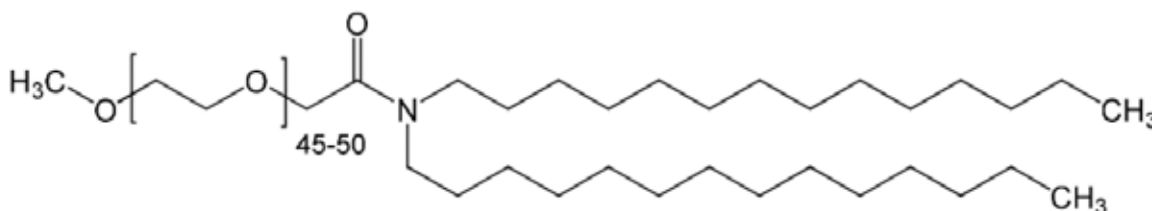


Figura 3. Struttura molecolare di ALC-0159

- c) **DSPC** (fosfolipide di supporto strutturale, *“helper lipid”*). Nome chimico: *1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*. N. CAS 816-94-4. Molecola di origine semi-sintetica, anfifilica, costituita da un fosfogliceride in cui un gruppo è la fosfatidilcolina e due gruppi sono catene di acido stearico (18:0).



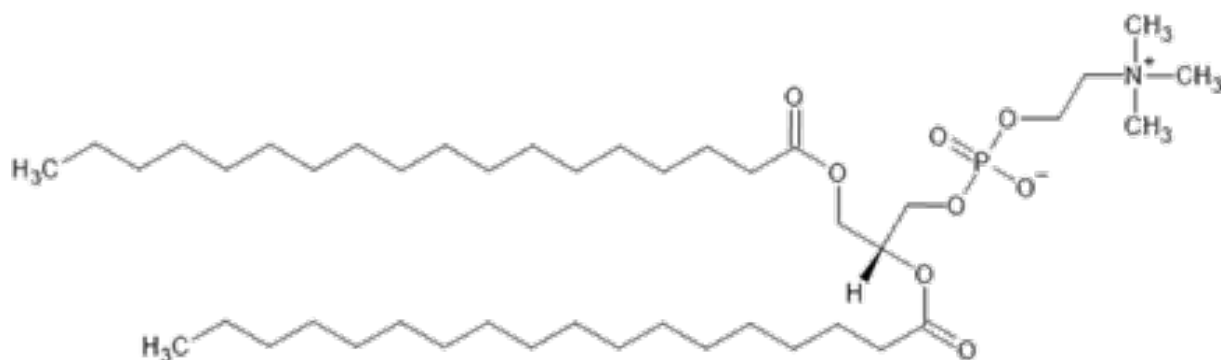


Figura 4. Struttura molecolare della DSPC

d) **Colesterolo** (lipide avente funzioni, in questo caso, di sostegno strutturale). Molecola organica appartenente alla classe degli steroli. N. CAS 57-88-5.  
 Questi quattro componenti lipidici costituiscono gli eccipienti fondamentali del Comirnaty, preposti alla formazione di nanoforme (LNPs) sferoidali <sup>14</sup>, del tipo di quelle schematicamente rappresentate nelle figure 5 e 6, e destinate ad incapsulare, inglobare, proteggere e veicolare il principio attivo, costituito dall'mRNA *BNT162b2*.

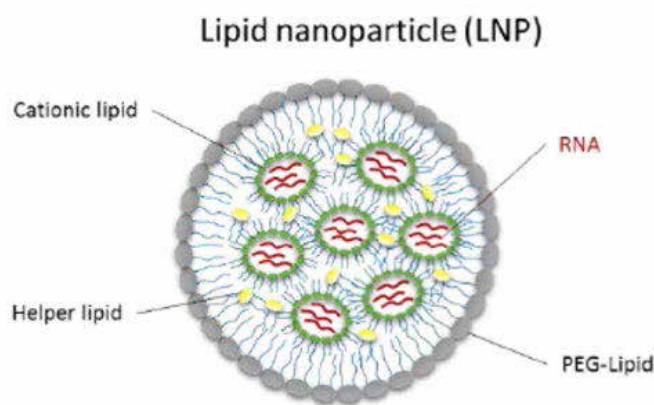


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura di una nanoparticella del Vaccino Comirnaty Pfizer-BioNTech (da: CHMP assessment report EMA/594686/2021 – 14 Oct 2021, p. 15 - Cfr. nota 68)

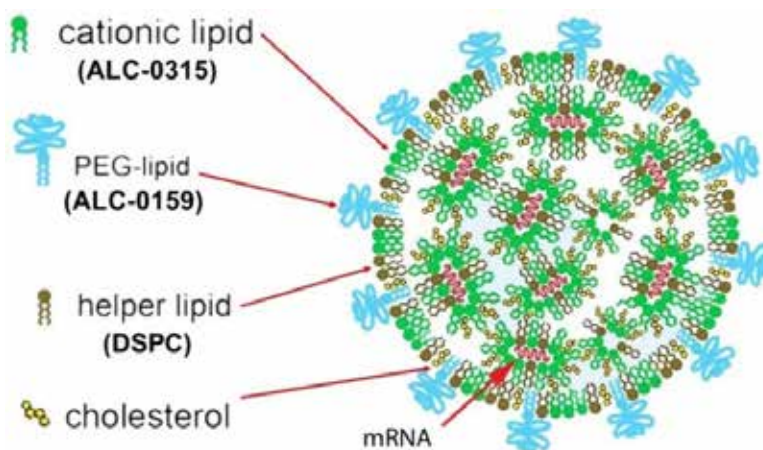


Figura 6. I quattro lipidi componenti del vaccino Pfizer-BioNTech e loro funzionalità nella possibile conformazione delle nanoparticelle costituenti il carrier protettivo e di trasporto dell'mRNA

Come descritto da EMA nel suo sopraccitato *Assessment report Comirnaty* del 19 febbraio 2021, le nanoparticelle formate dai quattro lipidi sopradescritti sono particelle solide, tenute in sospensione in un mezzo acquoso e **in presenza di un tampone fosfato salino (costituito da elettroliti inorganici)**, che mantiene il pH a valori compresi tra 6,9 e 7,9, e di uno zucchero (saccarosio), come agente crioprotettivo.

E, a pagina 140, proprio in merito ai due ingredienti lipidici funzionali, si legge che, essendo **l'autorizzazione all'immissione in commercio subordinata a condizioni**, il titolare dell'autorizzazione stessa (Pfizer-BioNTech) deve completare, entro la tempistica stabilita, alcune attività specifiche. Tra queste, al fine di *“confermare il profilo di purezza, garantire un controllo di qualità approfondito e assicurare l'uniformità tra i vari lotti lungo tutto il ciclo di vita del prodotto finito, il titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio deve fornire informazioni aggiuntive sul processo di sintesi e sulla strategia di controllo”* per entrambi i “nuovi” eccipienti lipidici **ALC-0315** e **ALC-0159**. La data di scadenza prevista dall'autorizzazione per la consegna di tali informazioni è entro il luglio 2021, con relazione intermedie previste per gennaio 2021 e aprile 2021. La relazione finale sullo studio clinico, *“per confermare l'efficacia e la sicurezza di Comirnaty”*, è invece prevista e richiesta entro il dicembre 2023.

**Assessment report Comirnaty**  
 Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)  
 Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000  
 19 February 2021  
 EMA/707383/2020 Corr.1  
 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

**Specific Obligation to complete post-authorisation measures for the conditional marketing authorisation**


This being a conditional marketing authorisation and pursuant to Article 14-a of Regulation (EC) No 726/2004, the MAH shall complete, within the stated timeframe, the following measures:

In order to confirm the purity profile and ensure comprehensive quality control and batch-to-batch consistency throughout the lifecycle of the finished product, the MAH should provide additional information about the synthetic process and control strategy for the excipient ALC-0315.	July 2021. Interim reports: January 2021, April 2021.
In order to confirm the purity profile and ensure comprehensive quality control and batch-to-batch consistency throughout the lifecycle of the finished product, the MAH should provide additional information about the synthetic process and control strategy for the excipient ALC-0159.	July 2021. Interim reports: January 2021, April 2021.
In order to confirm the efficacy and safety of Comirnaty, the MAH should submit the final Clinical Study Report for the randomized, placebo-controlled, observer-blind study C4591001.	December 2023

Page 140/140

**Figura 7. Assessment Report EMA/Pfizer-BioNTech Comirnaty, 19 febbraio 2021, pagina 140: OBBLIGO SPECIFICO DI COMPLETARE LE ATTIVITÀ POST-AUTORIZZATIVE PER L'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO SUBORDINATA A CONDIZIONI.**

Tale condizione obbligatoria (SO, *Specific Obligation*) è ripresa, *tel quel*, dal Report 154/2020<sup>15</sup> di AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) denominato “Classificazione di medicinali per uso umano ai sensi dell’art. 12 comma 5 del decreto-legge 13 settembre 2012 n. 158 convertito con modificazioni nella legge 8 novembre 2012 n. 189”, concernente il “Farmaco di nuova registrazione” Comirnaty (Codice ATC – J07BX, Titolare: BioNTech Manufacturing GmbH).



Rep. n. 154/2020 del 23/12/2020  
**Farmaco di nuova registrazione: Comirnaty**  
**Codice ATC – J07BX Principio Attivo:** (nucleoside modificato)  
 Vaccino a mRNA contro COVID-19 (modificato a livello dei nucleosidi)  
**Titolare:** BioNtech Manufacturing GmbH  
**Cod. Procedura** EMEA/H/C/0005735/0000

La presente autorizzazione all'immissione in commercio è subordinata a condizioni; pertanto ai sensi dell'articolo 14-a(4) del regolamento 726/2004/CE e successive modifiche, il titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio deve completare, entro la tempistica stabilita, le seguenti attività:

Descrizione	Tempistica
Per confermare il profilo di purezza, garantire un controllo di qualità approfondito e assicurare l'uniformità tra i vari lotti lungo tutto il ciclo di vita del prodotto finito, il titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio <b>deve fornire informazioni aggiuntive sul processo di sintesi e sulla strategia di controllo per l'eccipiente ALC-0315.</b>	<u>Luglio 2021.</u> Relazioni intermedie: gennaio 2021, aprile 2021
Per confermare il profilo di purezza, garantire un controllo di qualità approfondito e assicurare l'uniformità tra i vari lotti lungo tutto il ciclo di vita del prodotto finito, il titolare dell'autorizzazione all'immissione in commercio <b>deve fornire informazioni aggiuntive sul processo di sintesi e sulla strategia di controllo per l'eccipiente ALC-0159.</b>	<u>Luglio 2021.</u> Relazioni intermedie: gennaio 2021, aprile 2021

Pagina 8 di 8

Figura 8. AIFA - Autorizzazione Farmaco di nuova registrazione subordinata a condizioni. Rep. n. 154/2020 del 23/12/2020

Come ormai noto, alla data del presente scritto, il contenuto delle relazioni inoltrate dal titolare dell'autorizzazione entro le date previste (gennaio 2021, aprile 2021, luglio 2021) è stato **sorprendentemente segreto** da EMA.

Sorgono, a questo riguardo, alcune inevitabili e incalzanti domande: *le informazioni aggiuntive sul processo di sintesi e sulla strategia di controllo*, fornite nelle relazioni intermedie, contengono o no le informazioni previste dalla normativa Europea in merito alla **disciplina attinente alle nanoforme**? Sono state cioè fornite tutte le informazioni relative alle **caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche delle nanoforme del preparato medicinale Comirnaty**? E, in tal caso, perché segretarle se sono previste per legge europea?

### 3. Inadempienze regolatorie e assenza di studi tossicologici

#### 3.1 Mancata registrazione in Farmacopea

Tutti gli eccipienti del prodotto medicinale Comirnaty sono **noti in Farmacopea Europea, fatta eccezione per ALC-0315 e ALC-0159**. Entrambi questi nanomateriali sono classificati da EMA come “*nuovi* eccipienti” in quanto “*mai precedentemente usati in un prodotto medicinale in Europa*” e **non registrati né in Farmacopea EU, né in nessun'altra Farmacopea di nessuno Stato, né occidentale né orientale**.<sup>16</sup>

È sconcertante pensare che un prodotto medicinale che è stato fabbricato, autorizzato e somministrato in miliardi di dosi contenga degli ingredienti che non sono mai stati registrati in Farmacopea. Il significato e la portata di una tale manifesta omissione è facilmente intuibile dalla lettura della descrizione dello **Scopo della European Pharmacopoeia**:

#### *“Background*

*La Farmacopea Europea è un'unica opera di riferimento per il controllo della qualità dei medicinali negli Stati firmatari della Convenzione.*

*Gli standard ufficiali in essa pubblicati forniscono una base legale e scientifica per il controllo della qualità durante i processi di sviluppo, produzione e commercializzazione.*

*Riguardano la composizione qualitativa e quantitativa e le prove da effettuare sui medicinali, sulle materie prime utilizzate nella produzione di medicinali e sugli intermedi di sintesi. Tutti i produttori di medicinali e/o sostanze per uso farmaceutico devono pertanto applicare tali norme di qualità per poter commercializzare i loro prodotti negli Stati firmatari della Convenzione.*

#### *Mission*

*Lo scopo della Farmacopea Europea è promuovere la salute pubblica attraverso la fornitura di norme comuni riconosciute per la qualità dei medicinali e dei loro componenti. Tali norme devono essere appropriate come base per l'uso sicuro dei medicinali da parte dei pazienti. Inoltre, la loro esistenza facilita la libera circolazione dei medicinali in Europa e oltre.*

*Le monografie della Farmacopea Europea e altri testi sono concepiti per essere adeguati alle esigenze di:*

- autorità di regolamentazione;*
- coloro che sono impegnati nel controllo di qualità dei medicinali e dei loro componenti;*
- fabbricanti di medicinali e dei loro singoli componenti.*

*La Farmacopea Europea è ampiamente utilizzata a livello internazionale. Poiché la globalizzazione e l'espansione del commercio internazionale presentano una crescente necessità di sviluppare standard di qualità globali per i medicinali, la Commissione lavora a stretto contatto con tutti gli utilizzatori della Farmacopea in tutto il mondo.”*<sup>17</sup>

#### 3.2 Schede dati di sicurezza omissive e inadempienti

Oltre ad essere sorprendentemente sconosciuti alla Farmacopea Europea, i due componenti lipidici ALC-0315 e ALC-0159 non sono riportati neppure nell'inventario C&L<sup>19 20</sup> né tanto meno nell'inventario delle sostanze registrate dell'ECHA. Non hanno pertanto un numero di registrazione REACH e non ne è nota la classificazione CLP. In altre parole, non ne è ufficial-

mente noto il profilo tossicologico generale, né come sostanze, né tantomeno come nanoforme da essi generate.

Ciò è confermato anche da quanto dichiarato nella sez. 3 (*Composizione/ Informazioni sugli ingredienti*) della Scheda di Dati di Sicurezza del Prodotto Pfizer-BioNTech Covid-19 vaccine, datata 07 Dicembre 2021 <sup>21</sup>, dove, sotto la voce “Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP)” compare la nota “Nessun informazioni disponibili” [sic], e sotto la voce “Numero di Registrazione REACH”, non compare nessun numero.

SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA							
Denominazione del Prodotto Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine				Pagina 2 / 13		Versione 3	
Data di revisione 07-dic-2021				<a href="https://safetydatasheets.pfizer.com">https://safetydatasheets.pfizer.com</a>			
Sezione 3: COMPOSIZIONE/INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI							
Denominazione chimica	Peso-%	Numero di registrazione REACH	Numero CE	Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]	Limite di concentrazione e specifico (SCL)	Fattore M	Fattore M (lungo termine)
ALC-0315 2036272-55-4	< 2		Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
ALC-0159 1849616-42-7	< 1		Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili

Figura 9. Sezione 3 della Scheda Dati Di Sicurezza del Prodotto Pfizer-BioNTech Covid-19 vaccine, datata 07/12/21

Nel sito ufficiale dell’Unione Europea “Your Europe”, si legge:

*“Chi produce o importa una tonnellata o più all’anno di una sostanza chimica nello SEE ha l’obbligo di registrarla nella banca dati REACH. L’acronimo REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) si riferisce al regolamento concernente la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche.*

***Il regolamento REACH si applica a tutte le sostanze chimiche, sia quelle necessarie per i processi industriali sia quelle che utilizziamo nella nostra vita quotidiana, presenti ad esempio in vernici, prodotti per la pulizia, vestiti, mobili ed elettrodomestici. Riguarda quindi la maggior parte delle imprese dello Spazio Economico Europeo (SEE). Le sostanze non registrate non possono essere commercializzate o utilizzate.*”<sup>22</sup>**

Nella relativa Scheda di Dati di Sicurezza del fabbricante, dovrebbero inoltre essere indicate le caratteristiche delle particelle che specificano la nanoforma, come previsto e descritto dall’Allegato VI del Regolamento REACH:

***Se la sostanza è registrata e riguarda una nanoforma, devono essere indicate le caratteristiche delle particelle che specificano la nanoforma, come descritto nell’allegato VI.***

***Se la sostanza non è registrata, ma la scheda di dati di sicurezza riguarda nanoforme le cui caratteristiche delle particelle incidono sulla sicurezza della sostanza, occorre indicare tali caratteristiche.*** <sup>23</sup>



## SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

Data di revisione 07-dic-2021

Versione 3

Pagina 1 / 13

### Sezione 1: IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA/MISCELA E DELLA SOCIETÀ/IMPRESA

#### 1.1. Identificatore del prodotto

Denominazione del Prodotto	Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine
Codici dei prodotti	PF00092
Forma	nanoforma
Sinonimi	Comirnaty; PF-07302048 containing PF-07305885 (BNT162b2); CorVAC Containing PF-07305885 (BNT162b2); CoVVAC Containing PF-07305885 (BNT162b2); COVID Vaccine Containing PF-07305885 (BNT162b2); COVID-19 Vaccine Containing PF-07305885 (BNT162b2)
Nome commerciale :	Non applicabile
Numero composto	PF-07302048
Codice articolo	H000022941; H000023057; H000024547; H000024742
Famiglia Chimica:	Lipid Nanoparticles containing PF-07305885 (BNT162b2) and Lipids

Figura 10. Nella sez. 1.1 della Scheda di Dati di Sicurezza della Pfizer-BioNTech, datata 07 dic 2021, versione 3, è espressamente indicata la configurazione in *nanoforma* del prodotto.

Nonostante sia espressamente indicato, nella sezione 1 della stessa Scheda di Dati di Sicurezza della Pfizer-BioNTech, che il prodotto è una “*nanoforma*” e appartiene alla Famiglia Chimica denominata “*Lipid Nanoparticles containing PF-07305885 (BNT162b2) and Lipids*” (Fig. 10), **le caratteristiche del nanomateriale presente nella composizione non sono riportate in nessun'altra sezione della stessa scheda**, in contrasto con il dettato del Reg. (UE) 2020/878, che prescrive chiaramente come le caratteristiche delle nanoforme debbano essere riportate nella sottosezione 9.1 della Scheda di Dati di Sicurezza:

**“Sez. 9.1. Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali**

Ciascuna scheda di dati di sicurezza deve includere le proprietà di seguito menzionate. Se è specificato che una determinata proprietà non si applica o se non sono disponibili informazioni su una determinata proprietà, tale circostanza deve essere segnalata chiaramente, indicandone se possibile i motivi:

...

**r) caratteristiche delle particelle:**

si applica soltanto ai solidi.

Occorre indicare la **dimensione** delle particelle [diametro equivalente medio, metodo di calcolo del diametro (basato su numero, superficie o volume) e l'intervallo di valori entro il quale tale valore mediano varia]. Si possono indicare anche altre proprietà, come la distribuzione dimensionale (ad esempio sotto forma di intervallo di valori), la forma e il rapporto d'aspetto, **lo stato di aggregazione e agglomerazione**, la superficie specifica e la polverosità. **Se la sostanza è in nanoforma o se la miscela fornita contiene una nanoforma, tali caratteristiche devono essere indicate in questa sottosezione oppure, se sono già specificate altrove nella scheda di dati di sicurezza, va inserito in questa sottosezione un riferimento a tali caratteristiche.**”<sup>24</sup>

La sottosezione 9.1 della SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA di Pfizer-BioNTech è riportata in figura 11. Alla voce “*Caratteristiche delle particelle*”, si legge: **Nessuna informazione disponibile.**

SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA	
Denominazione del Prodotto Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine Data di revisione 07-dio-2021	<a href="https://safetydatasheets.pfizer.com">https://safetydatasheets.pfizer.com</a>
Pagina 7 / 13 Versione 3	
Sezione 9: PROPRIETA FISICHE E CHIMICHE	
9.1. Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali	
Stato fisico	Liquido
Colore	Latteo bianco
Odore	Nessuna informazione disponibile.
Soglia olfattiva	Nessuna informazione disponibile
Formula molecolare	Miscela
Peso molecolare	Miscela
Proprietà	Valori
pH	7.4
Punto di fusione / punto di congelamento	Nessun informazioni disponibili
Punto/intervallo di ebollizione	
Punto di infiammabilità	Nessuna informazione disponibile
Tasso di evaporazione	Nessun informazioni disponibili
Infiammabilità (solidi, gas)	Nessun informazioni disponibili
Limite di infiammabilità in aria	
Limite di infiammabilità superiore:	Nessun informazioni disponibili
Limite di infiammabilità inferiore	Nessun informazioni disponibili
Tensione di vapore	Nessun informazioni disponibili
Densità di vapore	Nessun informazioni disponibili
Densità relativa	Nessun informazioni disponibili
Idrosolubilità	Nessun informazioni disponibili
La solubilità/le solubilità	Nessun informazioni disponibili
Coefficiente di ripartizione	Nessun informazioni disponibili
Temperatura di autoaccensione	Nessun informazioni disponibili
Temperatura di decomposizione	Nessun informazioni disponibili
Viscosità cinematica	Nessun informazioni disponibili
Viscosità dinamica	Nessun informazioni disponibili
<b>Caratteristiche delle particelle</b>	
Dimensioni delle particelle	Nessuna informazione disponibile
Ripartizione delle particelle per dimensione	Nessuna informazione disponibile
Proprietà esplosive	Nessuna informazione disponibile

Figura 11. Sezione 9.1 della Scheda di Dati di Sicurezza, datata 07 dicembre 2021, versione 3, del Vaccino Comirnaty di Pfizer-BioNTech

### 3.3 Assenza di studi di cancerogenicità, genotossicità e mutagenicità

L'analisi delle caratteristiche delle nanoparticelle (dimensioni, area superficiale totale, stato di aggregazione o agglomerazione, Indice di polidispersione, carica superficiale, ecc.), come già sopra descritto e come espressamente ribadito in diversi punti dei regolamenti sopra citati, è essenziale al fine di determinarne l'eventuale potenziale citotossico, genotossico, mutagenico, cancerogeno.

Lo **stato di agglomerazione**, in particolare, può rappresentare di per sé un fattore di rischio importante, in quanto può condizionare non solo la **translocazione dei nanomateriali in o attraverso vari organi e tessuti**, ma anche il **grado di accumulazione** all'interno di tali tessuti e, di conseguenza, i relativi processi di eliminazione catabolica.<sup>25</sup>

Ciononostante, l'EMA, nel suo report del 19 Febbraio 2021 sul vaccino Comirnaty, a pagina 55, scrive:

*“Non sono stati forniti studi di genotossicità né cancerogenicità. I componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non dovrebbero avere un potenziale genotossico.”*

E, a pagina 56: *“Secondo le linee guida, non sono stati condotti studi di genotossicità o cancerogenicità. Non si prevede che i componenti del vaccino (lipidi e mRNA) abbiano un potenziale genotossico. Questo è accettabile per il CHMP [Committee for Medicinal Products for Human Use]”.*<sup>26</sup>

Si noti come, nell’esprimere una ipotetica assenza di genotossicità e cancerogenicità dei componenti lipidici del vaccino Comirnaty, EMA sembri ignorare che i due *novel excipients* ALC-0315 (ionizzabile, cationico) e ALC-0159 (non-ionico, polietossilato) non sono semplici “lipidi” (= grassi), ma, come del resto ampiamente descritto in altre sezioni dello stesso report di EMA, sono lipidi funzionali, fondamentali e determinanti al fine di realizzare la formazione, *in situ*, di LNP, cioè *Lipid Nanoparticles*, cioè **Nanoparticelle Lipidiche**, cioè **Nanoforme**, cioè **NANOMATERIALI**. E cioè sostanze soggette a tutte le sopracitate disposizioni e normative europee in tema di registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione dei Nanomateriali. Disposizioni e normative includenti, fra l’altro, **l’obbligatorietà per i fabbricanti di predisporre ANCHE gli opportuni test di genotossicità e cancerogenicità previsti appunto per le nanoforme.**

In particolare, come recita il sopracitato **Regolamento (UE) 2018/1881** concernente le nanoforme:

*“...La valutazione dovrebbe sempre includere una dichiarazione che precisi se la sostanza o, se del caso, le sue nanoforme rispondono o no ai criteri enunciati nel regolamento (CE) n. 1272/2008 per la classificazione nella classe di pericolo «cancerogenicità», categorie 1A o 1B, nella classe di pericolo «mutagenicità sulle cellule germinali», categorie 1A o 1B, o nella classe di pericolo «tossicità per la riproduzione», categorie 1A o 1B...”*<sup>27</sup>

Tra i maggiori rischi per la salute umana causati dalla eccezionale penetrabilità e mobilità delle nanoforme all’interno dei sistemi biologici, vanno infatti annoverati proprio quelli correlati alla genotossicità e cancerogenicità. E i relativi saggi in vitro sono ritenuti uno strumento estremamente importante, se non indispensabile, ai fini di un’approfondita comprensione dei meccanismi di tossicità e di una **adeguata valutazione dei rischi per la salute causati dai nanomateriali, soprattutto a medio-lungo termine.**<sup>28</sup>

Altrettanto incomprensibilmente inadempiente e in netto contrasto con l’ormai consolidata prassi regolatorio-tossicologica attinente alle nanoforme, appare quanto riportato nella Sezione 11 (Informazioni tossicologiche) della Scheda di Sicurezza della Pfizer-BioNTech, in riferimento al prodotto Comirnaty: *“Non sono state condotte indagini approfondite sulle proprietà tossicologiche”.*

Le uniche informazioni tossicologiche riportate sono quelle relative ai singoli componenti, inclusi, ad esempio, i profili tossicologici dello zucchero (*saccarosio*) e del comune sale da cucina (*cloruro di sodio*), ma esclusi quelli dei succitati lipidi nano-funzionali ALC-0315 e ALC-0159. E senza mai alcun riferimento alla presenza nel formulato di nanoforme e ai relativi saggi tossicologici richiesti per legge sulle nanoforme.



## Sezione 11: INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

## 11.1. Informazioni sulle classi di pericolo secondo la definizione del Regolamento (CE) n. 1272/2008

Informazioni generali:	Non sono state condotte indagini approfondite sulle proprietà tossicologiche. Le seguenti informazioni sono disponibili per i singoli componenti.
Breve termine	Nel caso di iniezione accidentale, può verificarsi una reazione allergica. Se si verifica una irritazione allergica, il lavoratore dovrebbe essere portato nel più vicino pronto soccorso e dovrebbe essere adottata la terapia adatta.
Effetti Clinici Conosciuti:	Sulla base delle prove cliniche sull'uomo, i possibili effetti negativi a seguito di esposizione endovenosa possono essere: dolore al sito di iniezione, dolore muscolare, Mal di testa, Febbre, brividi, stanchezza, dolore alle articolazioni, rossore della pelle anomalo (eritema), e disturbi del sonno. Si sono riscontrate gravi reazioni allergiche, inclusa l'anafilassi.

## Tossicità acuta: (Specie, Via di esposizione, End Point, Dose)

## Saccarosio

Ratti Via orale LD 50 29,700 mg/kg

## CLORURO DI SODIO

Ratti iniezione sub-tenone (occhio) LC50/1hr > 42 g/m<sup>3</sup>

Ratti Via orale LD 50 3 g/kg

Topo Via orale LD 50 4 g/kg

Conigli Dermico LD 50 &gt; 10 g/kg

Figura 12. Sez. 11 (Informazioni tossicologiche) della Scheda di Dati di Sicurezza della Pfizer-BioNTech, datata 07 dic 2021, versione 3.

## 4. Formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e tossicità delle nanoparticelle

È importante rilevare inoltre che il principale componente lipidico nel formulato di Pfizer-BioNTech, l'ALC-0315, essendo costituito da un'ammina terziaria, tende come tale a protonarsi in ambiente a basso pH, dando così origine alla formazione di **nanoforme cationiche**, aventi cioè **carica superficiale positiva**. Infatti è proprio grazie all'attrazione con le porzioni dell'mRNA aventi carica elettrica opposta che ha luogo la formazione di nanoforme sferoidali, come quelle illustrate in figura 6.

Ciò che viene clamorosamente ignorato negli Assessment Report di EMA e nelle Schede di Dati di Sicurezza di Pfizer-BioNTech è che

*".. dati sperimentali mostrano che gli effetti citotossici e genotossici sono potenziati se le nanoparticelle hanno una carica positiva..."* <sup>29 30</sup>

Le nanoparticelle costituite da lipidi monovalenti cationici, del tipo appunto di ALC-0315, si sono infatti dimostrate significativamente più efficienti nell'indurre la morte delle cellule attraverso la produzione di **specie reattive dell'ossigeno** (ROS, *reactive oxygen species*).

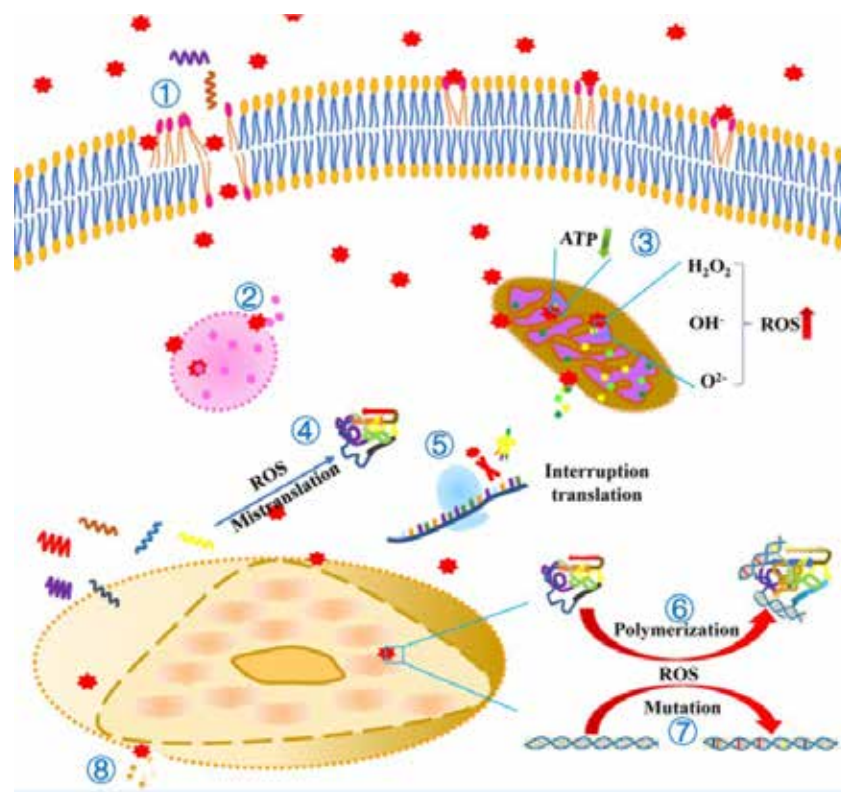
È ormai confermato da numerosi studi che gli effetti tossici, prodotti dalle nanoparticelle nei sistemi biologici, sono dovuti principalmente e sostanzialmente alla formazione di ROS all'interno delle cellule.

I ROS sono particelle che contengono ossigeno, tra cui le più rilevanti sono il **perossido di idrogeno** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), il **radicale anionico superossido** (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e i **radicali idrossilici** (•OH).

Vengono prevalentemente prodotti negli organelli cellulari come il reticolo endoplasmatico (ER), nei perossisomi e in particolare nei mitocondri.

Le nanoparticelle contenenti lipidi monovalenti cationici, sono state ampiamente utilizzate, in terapie antitumorali, per la somministrazione di acidi nucleici come siRNA e polipeptidi, direttamente nelle cellule target. Diversi studi hanno però dimostrato che i liposomi cationici inducono la formazione di ROS e tossicità mediata da ROS nelle cellule sane e, contemporaneamente, riducono la vitalità cellulare. Ad esempio, a seconda della concentrazione lipidica, della densità superficiale dei lipidi cationici e della dimensione delle particelle, le nanoparticelle contenenti lipidi cationici possono condurre alla generazione di ROS e alla morte delle cellule tumorali epatiche *HepG2*.<sup>31</sup>

In pressoché tutti gli studi scientifici sul tema, si rileva che, nonostante gli indubbi benefici e progressi compiuti nell'utilizzazione dei nanomateriali in campo biomedico, permangono ancora significative preoccupazioni sui potenziali effetti tossicologici delle nanoparticelle, soprattutto in relazione alla loro comprovata tendenza a generare quantità eccessive di specie reattive dell'ossigeno. A causa del forte potenziale di ossidazione, l'eccesso di ROS indotto dalle nanoparticelle può causare il danneggiamento delle biomolecole e delle strutture degli organelli e produrre carbonilazione ossidativa delle proteine, perossidazione lipidica, rottura del DNA / RNA e destrutturazione delle membrane cellulari, fattori questi che possono indurre un complesso di effetti fisiopatologici gravi, quali genotossicità, necrosi, apoptosi, infiammazioni citochiniche, fibrosi, metaplasia, ipertrofia, cancerogenicità o persino mutagenesi.<sup>32</sup>



**Figura 13. Eventi cellulari indotti da Nanoparticelle (NP):** (1) Le NP contribuiscono alla distruzione della membrana cellulare e alla perossidazione lipidica. (2) La membrana lisosomiale viene distrutta dalle NP e provoca il rilascio del loro contenuto. (3) La membrana mitocondriale è danneggiata dalle NP, provocando il rilascio del contenuto. Le NP riducono la formazione di ATP e aumentano la produzione di ROS. (4) I ROS indotti dalle NP provocano una traduzione errata dell'RNA. (5) Le NP impediscono il legame del tRNA al ribosoma. (6) I ROS indotti dalle NP provocano la polimerizzazione delle proteine e del DNA. (7) I ROS indotti dalle NP portano a mutazioni del DNA (8) La membrana nucleare viene distrutta da parte delle NP, con conseguente rilascio del suo contenuto  
(Yu, Z., Li, Q., Wang, J. et al. - Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field – Cfr. nota 32)

Inoltre, **l'estrema penetrabilità e mobilità delle nanoparticelle** all'interno dell'organismo sono fattori essenziali che favoriscono il loro **facile ingresso nella circolazione sistemica e deposito in organi come reni, fegato, cuore, cervello, tratto intestinale, polmoni, provocandone disfunzioni e alterazioni.**

Esistono ormai prove schiaccianti che la sovrapproduzione di ROS è la causa principale della biotossicità delle nanoparticelle. Queste, concentrandosi principalmente nei lisosomi, nei mitocondri e nel nucleo della cellula, e generando ROS in quei siti, possono provocare conseguenze catastrofiche. Numerosi studi inconfutabilmente confermano che i nucleotidi componenti del DNA e dell'RNA cellulari costituiscono un target significativamente vulnerabile all'aggressione di ROS generati dai nanomateriali.<sup>34 35 36</sup>

Ne possono conseguire **danni genetici irreparabili**, con conseguente sviluppo di **genotossicità**,<sup>37 38 39 40 41</sup> **mutagenicità**,<sup>42 43 44 45 46</sup> **cancerogenicità**.<sup>47 48 49 50</sup>

L'accumulo di nanoparticelle nel corpo può ulteriormente indurre infiammazioni e risposte immunitarie, che a loro volta provocano **lesioni cellulari** o **apoptosi** (morte cellulare), **disfunzioni di organi vitali** e, infine, stimolare l'insorgenza di numerose malattie, come **l'Alzheimer, il Parkinson, l'infiammazione del fegato e la disembrionopatia**.<sup>51</sup>

## 5. Criticità chimico-fisiche delle nanoforme e conseguenti rischi tossicologici

Come già accennato, le nanoparticelle inserite in un mezzo disperdente, quale ad esempio una soluzione acquosa del tipo di quella del preparato Comirnaty, tendono a formare degli **aggregati** o degli **agglomerati di forme e dimensioni diverse**, modificando così le loro caratteristiche dimensionali originarie, e, conseguentemente, tutti quei parametri cruciali per la valutazione del loro profilo tossicologico.

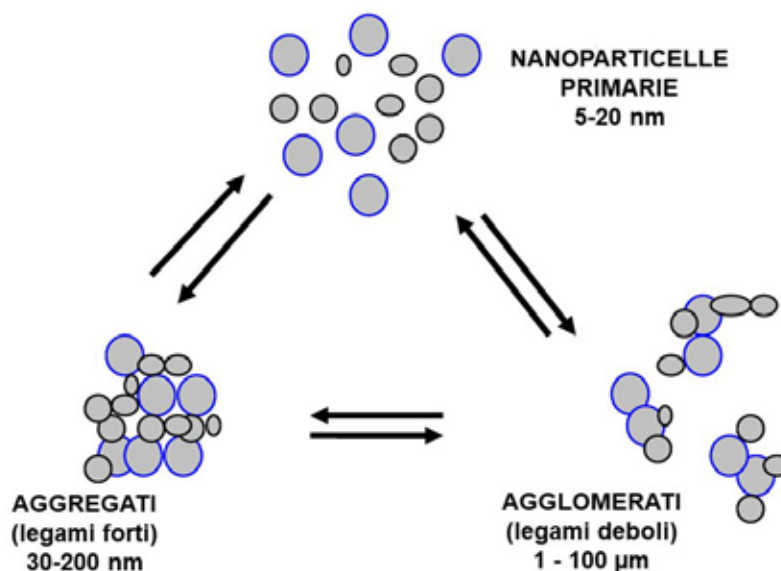
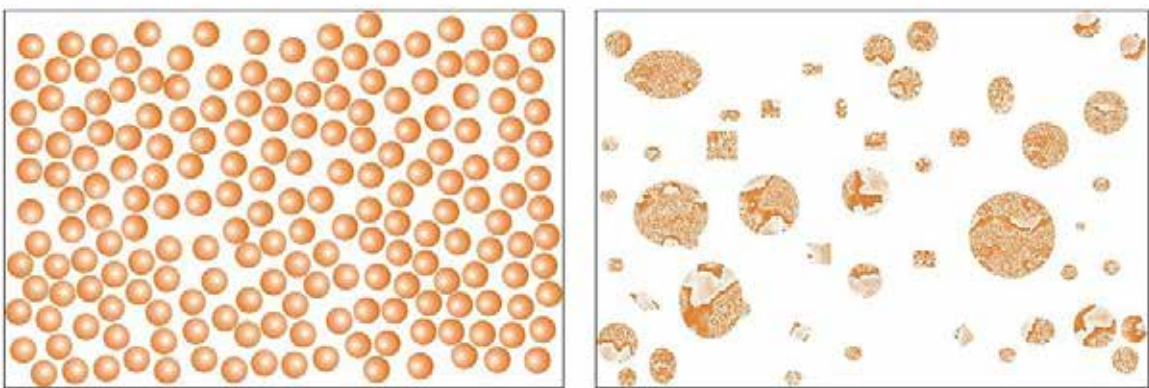


Figura 14. Formazione di aggregati e agglomerati di nanoparticelle

Un parametro fondamentale a cui sia i tossicologi che il legislatore europeo attribuiscono grande rilevanza è proprio il **grado di agglomerazione/ aggregazione** (detto *Indice di polidispersione*) delle nanoparticelle in un mezzo acquoso.

### 5.1 L'Indice di polidispersione (PI)

L'**Indice di polidispersione di un nanomateriale** (PI, *polydispersity index*) è una misura dell'eterogeneità di dimensioni di un campione di quel nanomateriale. Tale indice è compreso tra 0 e 1: quanto più è vicino a 0 tanto più la sospensione è *monodispersa*, mentre per indici pari a 1 le sospensioni si considerano *totalmente polidisperse*. Le organizzazioni internazionali di normazione (ISO) hanno stabilito che i valori di PI < 0,05 sono propri dei campioni monodispersi, mentre valori > 0,7 sono relativi a distribuzione di particelle di grandi dimensioni (polidisperse).<sup>52</sup> In generale, una sospensione può considerarsi **monodispersa** per valori di PI  $\leq 0,2$ , **mediamente polidispersa** per  $0,2 \leq \text{PI} \leq 0,5$  e **polidispersa** per valori superiori a 0,6. Il PI può essere ottenuto da strumenti che utilizzano la diffusione dinamica della luce (DLS) o micrografie elettroniche.



**Massa di particelle uniforme (monodispersa)**

**Rappresentazione di un ammasso polidisperso**

**Figura 15. Monodispersione e Polidispersione di una sospensione di nanomateriali**

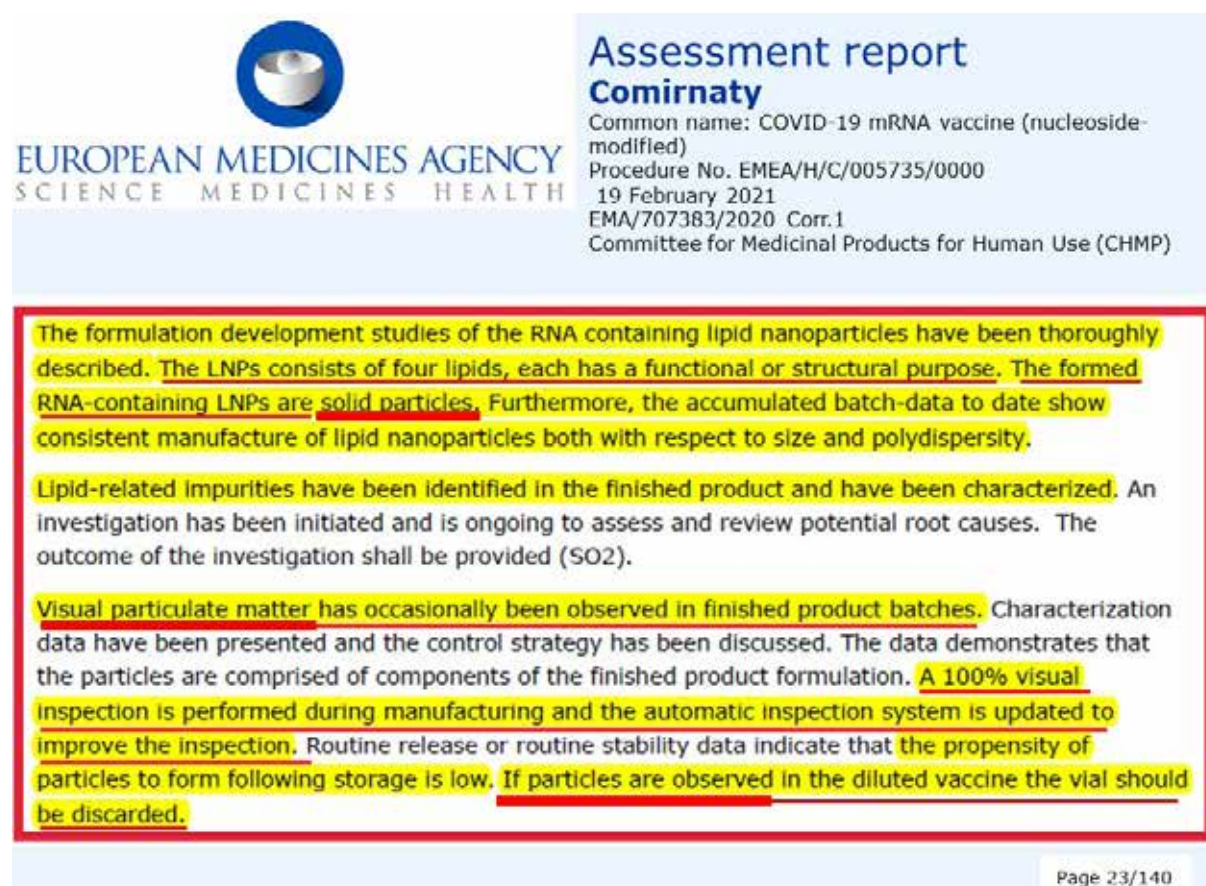
Il fatto che il profilo tossicologico di un certo nanomateriale sia direttamente, seppur non esclusivamente, collegato all'Indice di polidispersione è facilmente comprensibile considerando che, a seconda di quanto le nanoparticelle primarie si aggregano o si agglomerano, vengono generate nanoparticelle secondarie di dimensioni maggiori, che potrebbero influenzare in modalità diverse l'esposizione e la biodisponibilità del preparato stesso. Ad esempio, se le particelle primarie si aggregano o si agglomerano formando particolati più grossi ed eterogenei, con un PI più alto, il materiale, o parte del materiale, potrebbe non entrare in una cellula e/o depositarsi in tessuti o organi non previsti nel destino biologico primario del materiale stesso. L'eterogeneità di distribuzione dimensionale può, in altre parole, determinare una notevole variabilità del potenziale impatto sia sulla traslocazione dei diversi aggregati, sia sulla penetrazione delle barriere biologiche, quali ad esempio l'attraversamento della barriera emato-encefalica, la penetrazione nelle cellule e nelle strutture subcellulari, sia sulla veicolazione nei sistemi biologici di eventuali impurezze o contaminanti inglobati nel particolato, specie qualora tali impurezze o contaminanti presentassero anch'essi rilevanza tossicologica.<sup>53</sup>

Appare a questo punto evidente che, se una sospensione di nanoforme, del tipo di quella del prodotto medicinale Comirnaty, presentasse, al momento dell'inoculazione, un Indice di polidispersione eccessivo (es. > 0,7), la sua efficacia (intesa come capacità di penetrare attraverso

le membrane cellulari e subcellulari e rilasciare l'attivo mRNA (BNT162b2) nel distretto endosomale, e da qui nel citosol della cellula ospite) ne risulterebbe sostanzialmente inibita, se non completamente inficiata. Avremmo dunque un **prodotto medicinale totalmente inefficace**, perché non in grado di espletare il compito immunologico di rilascio dell'mRNA codificante per la proteina Spike all'interno della cellula ospite. E, nel contempo, i nano-aggregati o nano-agglomerati di dimensioni superiori (spesso impropriamente denominati *particolati*), non riuscendo a penetrare nelle cellule, potrebbero seguire percorsi biologici diversi ed imprevisi o addirittura depositarsi in tessuti da cui potrebbero essere metabolizzati o eliminati con difficoltà, scatenando nel contempo **possibili reazioni allergiche o anafilattiche**.<sup>54</sup>

Un'indagine pubblicata sul *British Medical Journal*, nel marzo 2021, evidenzia che tali problemi sono rimasti irrisolti, ponendo **serie preoccupazioni sulla localizzazione delle nanoparticelle lipidiche nell'organismo, dopo l'avvenuta inoculazione**.<sup>55</sup>

È altresì curioso come, nell'intero report dell'EMA del 19 febbraio 2021, non si faccia mai riferimento al valore effettivo dell'Indice di polidispersione dei nanomateriali lipidici del Comirnaty, seppur si asserisca che “*Si è occasionalmente [sic] notato del particolato visibile in lotti del prodotto finito... Se nel vaccino diluito si osservassero particolati, il flaconcino dovrà essere eliminato...*”<sup>56</sup>



**Assessment report**  
**Comirnaty**  
Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)  
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000  
19 February 2021  
EMA/707383/2020 Corr.1  
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

The formulation development studies of the RNA containing lipid nanoparticles have been thoroughly described. The LNPs consists of four lipids, each has a functional or structural purpose. The formed RNA-containing LNPs are solid particles. Furthermore, the accumulated batch-data to date show consistent manufacture of lipid nanoparticles both with respect to size and polydispersity.

Lipid-related impurities have been identified in the finished product and have been characterized. An investigation has been initiated and is ongoing to assess and review potential root causes. The outcome of the investigation shall be provided (SO2).

Visual particulate matter has occasionally been observed in finished product batches. Characterization data have been presented and the control strategy has been discussed. The data demonstrates that the particles are comprised of components of the finished product formulation. A 100% visual inspection is performed during manufacturing and the automatic inspection system is updated to improve the inspection. Routine release or routine stability data indicate that the propensity of particles to form following storage is low. If particles are observed in the diluted vaccine the vial should be discarded.

Page 23/140

Figura 16. Assessment Report EMA/Pfizer-BioNTech Comirnaty, 19 febbraio 2021, pagina 23

È doveroso chiedersi: che significato ha l'avverbio “**occasionalmente**”, soprattutto se collocato in un siffatto contesto farmacologico, immunologico, tossicologico, normativo e regolatorio? Quanto *occasionalmente*? In quali e quanti lotti? Quali erano i valori del PI di ogni specifico lotto in oggetto? A quale specifica fase del processo industriale erano correlabili tali “occasio-

nali” anomalie? Perché avvenivano in certi lotti e non in altri? Quali ipotesi sono state formulate al fine di fornire, nel più breve tempo possibile, una spiegazione tecnica plausibile e logica del manifestarsi di una simile criticità? Quali sono stati i rimedi previsti per evitare il ripetersi dell’anomalia?

Qualche pagina dopo, l’estensore del report di EMA, riconosce comunque che:

*“Poiché l’integrità dell’ mRNA e la **polidispersione** sono CQA [Critical Quality Attributes, Attributi critici di qualità - NdT] per l’efficacia del prodotto medicinale, i criteri di accettazione del prodotto finito per quanto concerne questi parametri dovrebbero essere rivisti man mano che saranno disponibili ulteriori dati provenienti da studi clinici in corso e in linea con la capacità del processo di fabbricazione. Tempistica: entro luglio 2021, relazioni intermedie entro marzo 2021.”*<sup>57</sup>

È dunque presumibile, seppur non confermato, che le variazioni anomale relative all’Indice di polidispersione di alcuni lotti siano state successivamente risolte e riportate ad EMA entro il luglio 2021.

Quali sono stati, quindi, i valori medi stabilizzati (non soggetti cioè a variabilità “occasionale”) del PI di ogni specifico lotto preso in esame? A quale specifica fase del processo industriale erano correlabili le precedentemente riscontrate “anomalie” nei valori di polidispersione? Perché avvenivano in certi lotti e non in altri? Quali sono state le *root causes* che, una volta individuate, hanno fornito una spiegazione tecnica e scientifica inequivocabile a proposito del manifestarsi di una simile criticità? Quali sono stati i rimedi adottati per evitare il suo ripetersi? Quali, in definitiva, sono state le *CA/PA* (*Corrective Actions/ Preventive Actions*) adottate al fine di assicurare ad EMA (ma soprattutto ai futuri soggetti sottoposti all’inoculazione) che un simile preoccupante fenomeno non si potesse mai più verificare?

Purtroppo, tali domande, alla data del presente scritto, attendono ancora dettagliate ed esaurienti risposte.

In mancanza di sufficienti informazioni e conferme ufficiali, possiamo, tuttavia, formulare alcune ipotesi, che, una volta verificate nelle opportune sedi cliniche o medico-legali, potrebbero fornire ulteriori spiegazioni e conferme definitive sia al riguardo dell’instabilità chimico-fisica del preparato Comirnaty sia dei rischi e conseguenze di natura immunologica e tossicologica che tale instabilità può provocare e/o ha già, purtroppo, provocato.

## **5.2 Instabilità dei sistemi colloidali e Potenziale Zeta**

**Il preparato medicinale Comirnaty** è, in buona sostanza, descrivibile, sul piano chimico-fisico, come:

***una sospensione colloidale, termodinamicamente instabile, costituita da nanoparticelle lipidiche e loro aggregati o agglomerati, caratterizzata da un Indice di polidispersione variabile.***

Il termine “colloide” deriva dal greco *kòlla* colla, glutine, con il suffisso aggettivale *-oide*, che indica ‘somiglianza’, ‘affinità’, cioè simile alla colla: si presenta dunque come una massa amorfa che, diluita in acqua, forma una dispersione colloidale più fluida (e, nel caso di Comirnaty, più adatta per somministrazioni parenterali).

Una “*sospensione colloidale*” è semplicemente una miscela le cui particelle solide disperse (in questo caso nanoparticelle lipidiche) rimangono sospese in un mezzo disperdente acquoso, per tempi più o meno lunghi. Una sospensione di particelle di dimensioni molto piccole (quali appunto quelle formate dai lipidi di Comirnaty) può avvicinarsi nell’aspetto ad una soluzione vera e propria. In genere, il sistema sarà tanto più stabile (durevole nel tempo) quanto più è piccola la grandezza delle particelle disperse, quanto più le densità delle due fasi (dispersa e disperdente) sono vicine tra di loro, e quanto maggiore è la densità della fase disperdente (legge di Stokes). La capacità delle particelle di dar luogo alla formazione di aggregati o agglomerati (e quindi il loro Indice di polidispersione) dipende da un altro importante parametro, che il fabbricante di nanoforme è tenuto a misurare, registrare e riportare alle autorità regolatorie: il **Potenziale Zeta**.

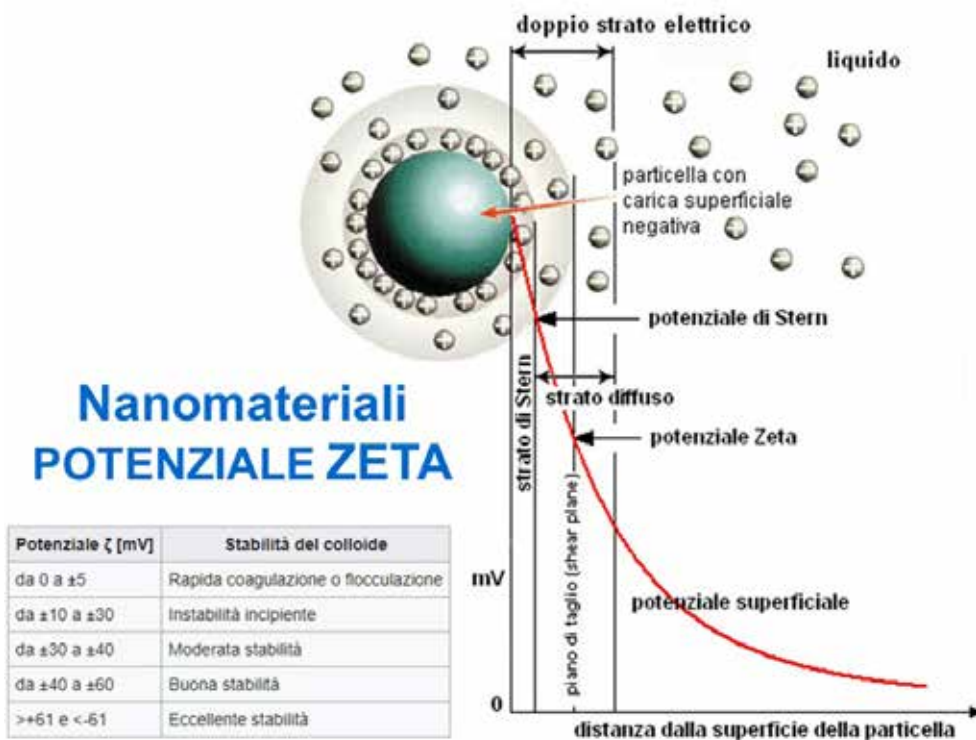


Figura 17 Il Potenziale Zeta definisce fundamentalmente la stabilità del colloide (<http://www.galenotech.org/potzeta.htm> )

Il Potenziale Zeta, o potenziale elettrocinetico (indicato come potenziale ζ facendo ricorso alla lettera zeta dell’alfabeto greco) è il potenziale generato in seguito alla formazione di un doppio strato elettrico intorno alle singole particelle. (Fig. 17). Esso rappresenta il fattore chiave per la determinazione dei fenomeni elettrocinetici e della stabilità dei sistemi colloidali<sup>58</sup> e, di conseguenza, della biodisponibilità di un composto o di un farmaco veicolato da nanoforme destinate ad attraversare membrane cellulari o subcellulari.<sup>59</sup>

Come ben descriveva un articolo pubblicato nel 2017, dalla rivista *Energia ambiente e innovazione* dell’ENEA:<sup>60</sup>

“Una nanoparticella posta in soluzione forma **un sistema colloidale** per un tempo più o meno lungo. Una maggiore stabilità dei sistemi colloidali, previene il **fenomeno di aggregazione delle particelle** in quanto si originano repulsioni elettrostatiche che ne favoriscono la dispersione. **Il parametro utilizzato per calcolare la stabilità colloidale è il Potenziale Zeta che si riferisce**

*al potenziale generato da un doppio strato di cariche elettriche. Quando il potenziale è basso, le forze attrattive prevalgono sulle repulsive e quindi si formeranno maggiori aggregati. La conoscenza della reale concentrazione delle particelle alla quale il sistema biologico è esposto è importante per determinare la stima del rischio per la salute e può essere espressa sia come numerosità particellare sia come area superficiale totale e risente fortemente del grado di aggregazione delle particelle. Negli esperimenti in vitro la variazione di tali parametri può influire sul maggiore o minore grado di endocitosi (internalizzazione delle particelle da parte delle cellule), dato importante per definire il modo di azione del nanomateriale.*

Un valore elevato di Potenziale Zeta (ad es. da 40 a 60 mV) conferisce maggiore stabilità ai sistemi colloidali, in quanto si originano repulsioni elettrostatiche che impediscono l'aggregazione delle particelle disperse. Quando il potenziale invece è basso (ad es. da 5 a 10 mV), le forze attrattive prevalgono su quelle repulsive e quindi risulta più semplice il verificarsi di processi quali l'**agglomerazione** o addirittura la **flocculazione**.<sup>61</sup> Quest'ultima non è altro che la formazione di **particolato grossolano**, talvolta, ma non sempre, visibile anche ad occhio nudo. È questo lo stadio che preannuncia la **coalescenza**, fenomeno che avviene quando il film che circonda le particelle si rompe e gli aggregati di varie dimensioni si combinano tra loro per formare un agglomerato più grande (*cluster*), fino a determinare la "rottura" della dispersione e la **separazione delle fasi**.

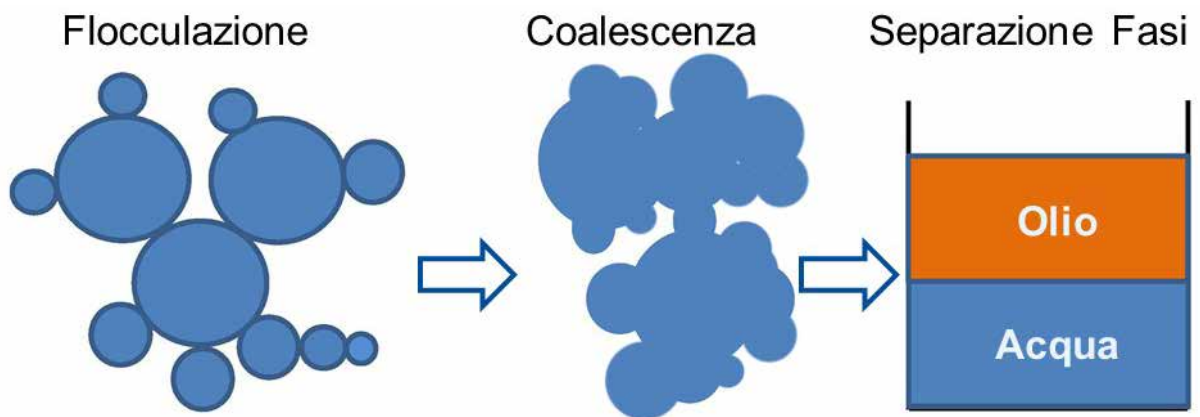


Figura 18. Flocculazione, coalescenza e separazione di fasi in un sistema colloidale instabile



Figura 19. "Rottura" della dispersione omogenea e separazione delle due fasi



### 5.3 Cause di instabilità dei sistemi colloidali

Le cause che provocano l'instabilità di un sistema bifasico colloidale sono molteplici, e vanno sempre analizzate e individuate caso per caso con gli opportuni strumenti di laboratorio. Tra le più comuni, ricordiamo per esempio: rapporti errati tra la fase dispersa e la fase disperdente; scelta del metodo errato di lavorazione; temperature di raffreddamento o riscaldamento troppo alte o troppo basse; eccessivo assorbimento di aria che potrebbe modificare i rapporti del sistema bifasico; e, soprattutto, la **presenza di elettroliti**.<sup>62</sup> Un elettrolita è una sostanza che in soluzione o allo stato fuso subisce la suddivisione in ioni (particelle elettricamente cariche) delle proprie molecole. Le sostanze che non si dissociano in particelle elettricamente cariche vengono dette "non-elettroliti". Il termine "elettrolita" si riferisce alla capacità di condurre la corrente elettrica grazie all'intervento di ioni, caratteristica peculiare di queste specie chimiche. I sali minerali inorganici, tipo il cloruro di sodio, ne sono il più classico esempio (NaCl si dissocia in ioni Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>). **Gli elettroliti**, a seconda delle concentrazioni in gioco, **possono drasticamente alterare il Potenziale Zeta** di una dispersione colloidale, provocando l'aggregazione e l'agglomerazione delle nanoparticelle, e la loro successiva flocculazione per attrazione elettrostatica.<sup>63</sup> In altre parole: **l'aggiunta di elettroliti costituisce una delle cause più comuni della variazione del Potenziale Zeta e dell'Indice di polidispersione** e, conseguentemente, **dell'instabilità del colloide**, con tutte le conseguenze, facilmente prevedibili, che questo comporta, sia in merito all'inefficacia che ai rischi tossicologici che andranno a caratterizzare il preparato stesso, come già sopra descritto.

### 5.4 Composizione del prodotto medicinale Comirnaty

Comirnaty viene fornito, all'origine, come un preparato liquido concentrato multi-dose (0,45 mL di volume), conservato congelato tra -90°C e -60°C in un flaconcino di vetro da 2 mL, e destinato ad essere diluito, poco prima della inoculazione, con una soluzione iniettabile di cloruro di sodio. Il flaconcino viene scongelato tenendolo in frigorifero (da 2°C a 8°C) per 2-3 ore o a temperatura ambiente (fino a 25°C) per 30 minuti. Una volta riportato a temperatura ambiente, il flaconcino a dosi multiple viene diluito con 1,8 mL della soluzione di sodio cloruro da 9 mg/mL (0,9%). Dopo la diluizione, ogni flaconcino di Comirnaty contiene 2,25 mL dai quali è possibile estrarre 6 dosi da 0,3 mL di vaccino. Ogni dose contiene 30 µg dell'attivo (mRNA BNT162b2, destinato a codificare per la glicoproteina spike di SARS-CoV-2) e gli eccipienti riportati in tabella 1:<sup>64</sup>

Ingrediente	Funzione	Quantità per dose
BNT162b2	Attivo	30 µg
ALC-0315	Lipide funzionale	0,43 mg
ALC-0159	Lipide funzionale	0,05 mg
DSPC	Lipide strutturale	0,09 mg
Colesterolo	Lipide strutturale	0,2 mg
Saccarosio	Crioprotettivo	6 mg
Cloruro di sodio*	Componente tampone pH e soluzione diluente	2,52 mg
Cloruro di potassio*	Componente tampone pH	0,01 mg
Sodio fosfato bibasico diidrato*	Componente tampone pH	0,07 mg
Potassio diidrogenofosfato*	Componente tampone pH	0,01 mg

Tabella 1 Composizione di una dose del vaccino Comirnaty dopo l'aggiunta della soluzione fisiologica di cloruro di sodio (\*Elettroliti.)

Dopo la diluizione, secondo le istruzioni di Pfizer-BioNTech, i flaconcini vengono conservati ad una temperatura tra 2°C e 25°C e devono essere utilizzati entro 6 ore dal momento della diluizione.

**5.5 Presenza di elettroliti nella composizione del prodotto medicinale Comirnaty**

Come si evince dalla tabella 1 e dalla figura 20, la formulazione del vaccino Pfizer-BioNTech COVID19 contiene **4 elettroliti**, cioè dei sali inorganici, componenti del tampone pH, utilizzati per stabilizzare il pH del preparato ad un valore compreso tra 6,9 e 7,9: cloruro di sodio, cloruro di potassio, sodio fosfato bibasico diidrato, potassio diidrogenofosfato.

<https://www.fda.gov/media/151733/download>

**Summary Basis for Regulatory Action**

Date:	11/8/2021
From:	Ramachandra Naik, PhD, Review Committee Chair, DVRPA/OVRR
BLA STN:	125742/0
Applicant:	BioNTech Manufacturing GmbH (in partnership with Pfizer, Inc.)

The COMIRNATY Multiple Dose Vial is thawed in a refrigerator (2°C to 8°C) for 2 to 3 hours or at room temperature (up to 25°C) for 30 minutes. The vial must be warmed to room temperature for dilution. Once at room temperature, the COMIRNATY Multiple Dose Vial is diluted with 1.8 mL of the diluent. After dilution, each vial of COMIRNATY contain six doses of 0.3 mL of vaccine. Each 0.3 mL dose of COMIRNATY contains 30 µg of mRNA encoding the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and the following ingredients: lipids (0.43 mg ((4-hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), 0.05 mg 2-(polyethylene glycol 2000)-N,N-ditetradecylacetamide, 0.09 mg 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, and 0.2 mg cholesterol), 0.01 mg potassium chloride, 0.01 mg monobasic potassium phosphate, 2.52 mg sodium chloride, 0.07 mg dibasic sodium phosphate dihydrate, and 6 mg sucrose. After dilution, the vials are stored at 2°C to 25°C and must be used within 6 hours from the time of dilution.

COMIRNATY is preservative-free.

Page 4

Figura 20. Vaccino Pfizer-BioNTech COVID19 – Documento “Summary Basis for Regulatory Action” - FDA 11/08/2021 <https://www.fda.gov/media/151733/download>

Si noti come, nella composizione finale di Comirnaty, quella cioè dopo l’avvenuta diluizione con una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9%, la proporzione quantitativa (in peso) tra l’ammontare totale degli elettroliti presenti e quello dei due lipidi funzionali risulta essere 5,44:1. Per dose di vaccino inoculato, abbiamo infatti:

2,61 mg di elettroliti contro solo 0,48 mg di ALC-0315 + ALC-0159. Una quantità cioè che risulta essere **più di 5 volte la quantità dei due lipidi funzionali** preposti alla formazione di nanoparticelle in sospensione.

Il rapporto in peso tra il lipide ALC-0315 (cationico) e l’ mRNA (anionico) risulta essere 14:1. Può una simile sospensione colloidale essere considerata stabile? Valutando diligentemente quanto sopra esposto in merito al Potenziale Zeta e all’Indice di polidispersione, la risposta può essere, inevitabilmente, solo negativa: una così elevata concentra-

zione relativa di elettroliti, in una sospensione colloidale così precaria, **non può che ridurre drasticamente il Potenziale Zeta delle particelle disperse**, con conseguenti prevedibili fenomeni di **aggregazione, agglomerazione e, infine, flocculazione**.

Del resto, esaminando la stessa Guida alla diluizione e somministrazione del vaccino Comirnaty, si evince che sia il fabbricante che gli enti preposti all'autorizzazione erano ben consapevoli dei rischi attinenti alla sua instabilità e alla evidente possibilità di formazione di particolati grossolani *in situ*, poco prima della somministrazione.

Nelle istruzioni per la diluizione si legge infatti: <sup>65</sup>

- **Capovolgere delicatamente la dispersione diluita per 10 volte. Non agitare.**
- **Il vaccino diluito deve apparire come una dispersione di colore biancastro, priva di particelle visibili. In presenza di particelle o in caso di alterazione del colore, non utilizzare il vaccino diluito. (Fig. 21)**

**DILUIZIONE DI COMIRNATY 30 MICROGRAMMI/DOSE CONCENTRATO PER DISPERSIONE INIETTABILE (ADULTI E BAMBINI ≥12 ANNI)**

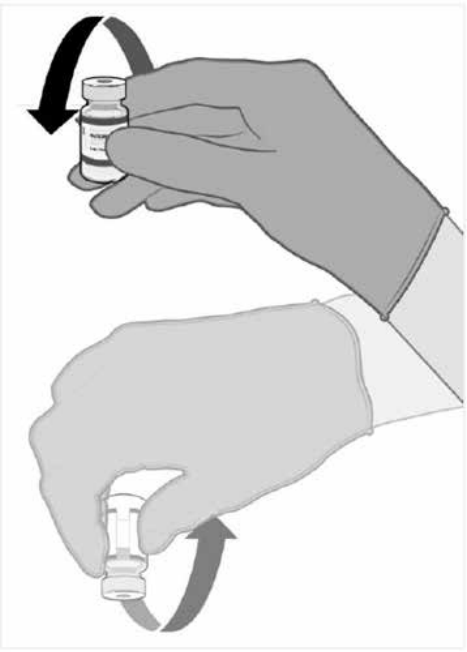
 <p><b>Delicatamente per 10 volte</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capovolgere delicatamente la dispersione diluita per 10 volte. Non agitare.</li> <li>• Il vaccino diluito deve apparire come una dispersione di colore biancastro, priva di particelle visibili. <u>In presenza di particelle o in caso di alterazione del colore, non utilizzare il vaccino diluito.</u></li> </ul>
---	---

Figura 21. Fase di diluizione / mescolamento della sospensione di nanoparticelle lipidiche Comirnaty

Tralasciando l'uso improprio, nel testo destinato agli operatori vaccinatori, del termine “particelle”, anziché quello più appropriato di “flocculato” o “flocculati”, non ci si può tuttavia esimere dal porsi alcune domande importanti nella valutazione dei rischi specifici inerenti all'ispezione della fiala, dopo l'avvenuta fase di diluizione:

- Qual è il valore del Potenziale Zeta della sospensione di nanoparticelle dopo la diluizione con la soluzione elettrolitica di cloruro di sodio?

- Qual è la differenza tra il valore del Potenziale Zeta dopo la diluizione e quello della sospensione concentrata (prima della diluizione)?
- Qual è il valore del Potenziale Zeta della sospensione diluita, in condizioni fisiologiche (pH 7,4; 2,2 mM di Ca<sup>++</sup>) a 37°C, cioè alla temperatura cui viene sottoposta pochi istanti dopo l'avvenuta inoculazione intramuscolare?
- Quanto accurata dovrebbe essere l'ispezione della fiala, dopo la diluizione, al fine di ridurre al minimo gli errori (casuali e sistematici) di valutazione della presenza o meno di aggregati o agglomerati o flocculati?
- Quanto numerose e "visibili" devono essere le "particelle" al fine di innescare nell'osservatore l'atto decisionale di scarto della fiala non conforme?
- Quanto "delicatamente" dovrebbe essere "capovolta" (non agitata) la fiala?
- Quali valori di Potenziale Zeta si ottengono in caso di scarsa o eccessiva agitazione della fiala?
- Quali sarebbero gli eventuali rischi attinenti ad un errore (umanamente comprensibile e motivato da stanchezza o tensione nervosa o disattenzione del medico vaccinatore) nel numero di capovolgimenti della fiala? In altre parole, se i capovolgimenti, invece che 10, fossero 8, oppure 12, oppure 5, quale sarebbe il rischio, in questi casi, di ottenere una insufficiente omogeneità (e quindi una maggior instabilità) della sospensione diluita?
- Chi verifica e controlla il valutatore della fase di diluizione/ capovolgimento/ ispezione viva/ approvazione delle fiale conformi o scarto di quelle non conformi?
- Quante fiale, statisticamente, sono state rilevate non conformi? I rilievi statistici sono significativamente congrui tra i vari operatori vaccinatori e le differenti aree di vaccinazione?

Questi sono, ovviamente, solo alcuni degli interrogativi più rilevanti che emergono da semplici ma doverose valutazioni e considerazioni attinenti a parametri fondamentali, come l'Indice di polidispersione e il Potenziale Zeta, e, conseguentemente, al grado di stabilità delle sospensioni colloidali. Sono, però, interrogativi che esigono delle risposte accurate e sollecite, considerando soprattutto le gravi conseguenze che eventuali errori, omissioni o negligenze nella fase di diluizione potrebbero comportare, sotto il profilo statistico-epidemiologico, clinico e medico-legale, per la salute di chi si sottoponesse all'inoculazione intramuscolare di una sospensione liquida di nanoparticelle eccessivamente polidispersa, o addirittura instabile, o addirittura prossima alla flocculazione o alla coalescenza.

### **5.6 Scomparsa degli elettroliti nella composizione del nuovo prodotto medicinale Comirnaty "Tris"**

Il 18 ottobre 2021, l'EMA annuncia, sul suo sito web,<sup>66</sup> che *"Il comitato per i medicinali umani (CHMP) dell'EMA ha approvato altri due siti industriali per la produzione di Comirnaty, il vaccino COVID-19 sviluppato da BioNTech e Pfizer. Un sito, situato a Monza, Italia, è gestito da Patheon Italia S.p.A. L'altro ad Anagni, sempre in Italia, è gestito da Catalent Anagni S.R.L. Entrambi i siti produrranno il prodotto finito. Questi siti produrranno fino a 85 milioni di dosi aggiuntive per rifornire l'UE nel 2021."*

E, sorprendentemente, nella stessa pagina, annuncia anche che:

*"...Il CHMP ha approvato una formulazione pronta all'uso di Comirnaty. Questa formulazione non richiede diluizione prima della somministrazione, sarà disponibile in confezioni da 10 flaconcini (60 dosi) e può essere conservata a 2-8°C per un massimo di 10 settimane. L'attuale formulazione concentrata richiede la diluizione prima della somministrazione, è disponi-*

bile in una confezione da 195 flaconcini (1.170 dosi) e può essere conservata a 2-8°C per un massimo di un mese). Queste differenze forniranno **migliori opzioni di stoccaggio, trasporto e logistica** per la distribuzione e la somministrazione del vaccino. **La nuova formulazione sarà disponibile in un lancio graduale a partire dall’inizio del 2022.**”

Secondo il singolare annuncio, la **nuova formulazione Comirnaty, pronta per l’inoculazione, non necessita più di diluizione e dei conseguenti 10 (delicati) capovolgimenti prima della somministrazione**, con evidenti vantaggi di **“stoccaggio, trasporto e logistica”**. Essa viene valutata ed autorizzata alle stesse condizioni della precedente, nel nuovo Assessment report dell’EMA, datato 14 ottobre 2021, intitolato **“CHMP assessment report on group of an extension of marketing authorisation and variations”**, in conformità con il Reg. (CE) N. 1234/2008,<sup>67</sup> con la premessa che si tratta di un **“Assessment report as adopted by the CHMP with all information of a commercially confidential nature deleted”** [ **“Relazione di valutazione adottata dal CHMP con tutte le informazioni di natura commerciale riservata soppresse”** - ndt]<sup>68</sup>

E, a pagina 14 del report, viene rivelata la nuova formulazione (Figura 22), e, con essa, alcuni dettagli che tendono a comprovare, sia sul piano chimico-fisico che su quello tossicologico, quanto sopra esposto in merito alla manifesta instabilità e potenziale pericolosità della precedente composizione.

Infatti, nella nuova formulazione di Comirnaty, denominata **“Tris/Sucrose finished Product”**, contenente lo stesso attivo (mRNA chimicamente modificato a livello dei nucleosidi), gli stessi lipidi funzionali e gli stessi eccipienti di supporto (alle stesse concentrazioni), **sono scomparsi tutti gli elettroliti** che erano presenti nella precedente formulazione **“elettrolitica”**, denominata per l’occasione **“PBS/Sucrose finished product”** (dove PBS sta per *Phosphate-buffered saline*, Tampone Fosfato **Salino**).

CHMP Assessment report  
**Comirnaty**  
Common name: tozinameran, COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)  
Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000  
**14 October 2021** / EMA/594686/2021  
Procedure No. EMEA/H/C/005735/X/0044/G  
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

**2.4.3.1. Description of the product and pharmaceutical development** Page 14/28

The finished product is a preservative-free, sterile dispersion of RNA-containing lipid nanoparticles in an aqueous cryoprotectant buffer for intramuscular injection. The finished product is a multidose vial presentation, containing 2.25 mL, intended for 6 doses. No overages are applied to the formulation of the finished product.

The composition of the finished product, including quality standard, function, concentration and amount per dose are given in Table 2.

**Table 2 Composition of BNT162b2 Tris/Sucrose Finished Product, Multi-dose Vial (225 µg/vial)**

Name of Ingredients	Reference to Standard	Function	Concentration (mg/mL)	Amount per 0.3 mL dose
BNT162b2 drug substance	In-house specification	Active ingredient	0.1	30 µg
ALC-0315	In-house specification	Functional lipid	1.43	0.43 mg
ALC-0159	In-house specification	Functional lipid	0.18	0.05 mg
DSPC	In-house specification	Structural lipid	0.31	0.09 mg
Cholesterol	Ph. Eur.	Structural lipid	0.62	0.19 mg
Sucrose	USP-NF, Ph. Eur.	Cryoprotectant	103	31 mg <sup>a</sup>
Thiomethamine (Tris base)	USP-NF, Ph. Eur.	Buffer component	0.20	0.06
Tris (hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris HCl)	In-house specification	Buffer component	1.32	0.4
Water for Injection	USP-NF, Ph. Eur.	Solvent/vehicle	q.s.	q.s.

**ELIMINATI TUTTI GLI ELETTROLITI**

**Figura 22. Nuova composizione (denominata Tris/Sucrose Finished Product ) del vaccino Pfizer-BioNTech Comirnaty, senza elettroliti, pronta all’uso: non richiede più la fase di diluizione e “delicato” mescolamento prima della somministrazione.**

Questa sorprendente, ancorché eloquente e rivelatrice, manovra di “epurazione elettrolitica” si manifesta, in modo ancor più eclatante, raffrontando le relative sezioni 3.2. delle schede di dati di sicurezza di Comirnaty PBS/Sucrose (cioè “l’Elettrolitico”) e Comirnaty Tris/Sucrose (“il Non-elettrolitico”).

3.2 Miscela **Vaccino Comirnaty PBS/Sucrose – SDS 07 Dicembre 2021**

Denominazione chimica	Peso-%	Numero di registrazione REACH	Numero CE	Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]	Limite di concentrazione e specifico (SCL)	Fattore M	Fattore M (lungo termine)
CLORURO DI POTASSIO 7447-40-7	< 1		231-211-6	Acute Tox 1	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
CLORURO DI SODIO 7547-14-5 ALC-0315 2036272-55-4	< 10		231-598-3		Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Fosfato di potassio 7778-77-0 PF-07305885	< 1		231-913-4		Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Fosfato disodico diidrato 10028-24-7 Colesterolo 57-88-5	< 1		200-334-9		Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
ALC-0159 1849616-42-7	< 1				Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili

**FORMULAZIONE CON ELETTROLITI**

**ELETTROLITA**

**ELETTROLITA**

**ELETTROLITA**

**ELETTROLITA**

**ELETTROLITA**

Questo sito diluente è somministrato dal vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 per operatori sanitari

il vaccino Pfizer-BioNTech COVID19 (Comirnaty) è distribuito in fiale multidose che devono essere diluite prima della somministrazione

La diluizione deve essere fatta solo ed esclusivamente con soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% (ulteriore soluzione elettrolitica aggiunta poco prima dell'inoculazione)

Figura 23. Vaccino Pfizer-BioNTech Comirnaty PBS/Sucrose ( “Elettrolitico”) SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA sez. 3.2 – 07/12/2021

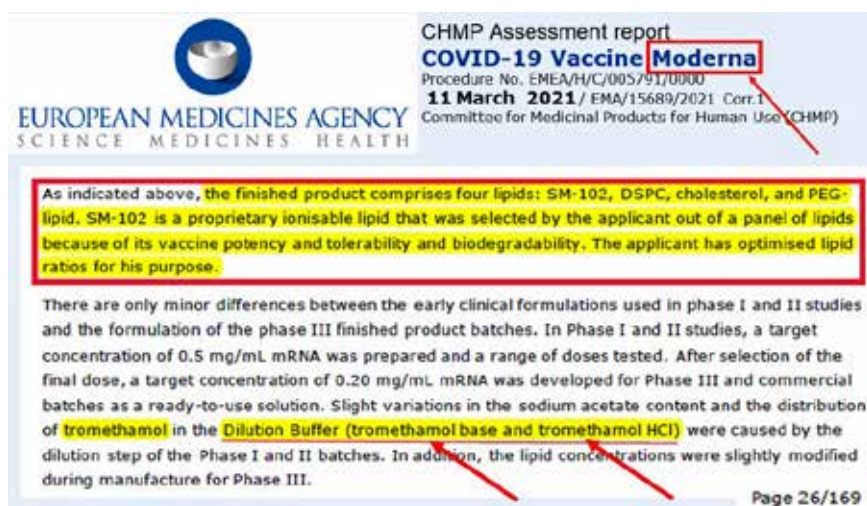
3.2 Miscela **NUOVO VACCINO Comirnaty Tris/Sucrose – SDS 14 Dicembre 2021**

Denominazione chimica	Peso-%	Numero di registrazione REACH	Numero CE	Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]	Limite di concentrazione e specifico (SCL)	Fattore M	Fattore M (lungo termine)
Acqua 7732-18-5	*		231-791-2	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Saccarosio 57-50-1	< 10		200-334-9	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
ALC-0315 2036272-55-4	< 2			Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Tromethamine 77-86-1	*		201-064-4	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride 1185-53-1	*		214-594-5	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
PF-07305885	< 1			Non certificato	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
PF-07302048	< 1			Non certificato	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
Colesterolo 57-88-5	< 1		200-334-9	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
ALC-0159 1849616-42-7	< 1			Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili
1,2-Distearoil-sn-glicerolo-3-fosfolcolina 816-94-4	< 1		212-440-2	Nessun informazioni disponibili	Non certificato	Nessun informazioni disponibili	Nessun informazioni disponibili

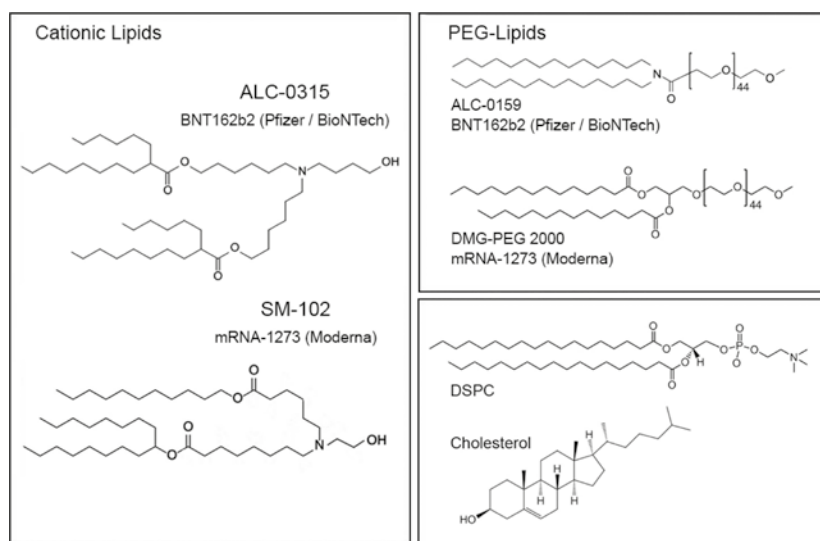
**NUOVA FORMULAZIONE SENZA ELETTROLITI**

Figura 24. Vaccino Pfizer-BioNTech Comirnaty TRIS/Sucrose ( “NON-elettrolitico”) SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA sez. 3.2 – 14/12/2021

Sotto l’aspetto tecnico, nella nuova formulazione, “pronta all’uso”, il precedente tampone pH fosfato salino (elettrolitico, inorganico) è stato eliminato e sostituito con il comunissimo tampone denominato “**Tris buffer**” (tampone Tris), ampiamente utilizzato in biologia per preparare soluzioni tampone (specialmente per soluzioni di acidi nucleici), in range di pH compresi tra 7 e 9. Si tratta di un tampone organico (NON contenente, cioè, elettroliti inorganici), che stabilizza il pH del prodotto Comirnaty Tris/Sucrose ad un valore fisiologico di 7,4, chimicamente costituito da *tris(idrossimetil) amminometano* (noto anche con il nome di *trometamina* o *trometamolo*) e dal suo cloridrato. È interessante notare che, scomparendo il tampone elettrolitico e comparando il nuovo tampone organico a base di trometamolo e trometamolo cloridrato, l’intera formulazione del nuovo preparato Pfizer-BioNTech denominata “Tris Sucrose” diventa, se non identica, quantomeno assai simile a quella del vaccino *Spikevax* di Moderna (quest’ultimo autorizzato da EMA in data 6 gennaio 2021, Assessment report 11 marzo 2021 <sup>69</sup>), comprendente cioè: un attivo mRNA chimicamente modificato a livello dei nucleosidi + un lipide funzionale cationico + un lipide polietossilato + un lipide *neutrale* (DSPC) + colesterolo + un tampone pH *non-elettrolitico* Tris.



**Figura 25. EMA Assessment Report, 11 marzo 2021, pag. 26. Composizione del Vaccino Covid-19 di Moderna.**



**Figura 26. Lipidi utilizzati nel vaccino a mRNA di Pfizer-BioNTech e nel vaccino a mRNA di Moderna.**  
**Da:** Rumiana Tenchov et al. - *Lipid Nanoparticles-From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement* (Cfr. nota 14)

Come dichiarato dalla stessa EMA, a pagina 22 dell'Assessment report del 14 ottobre 2021 sul nuovo Comirnaty Tris/Sucrose di Pfizer-BioNTech:

*“... il prodotto finito Tris/Sucrose è stato sviluppato per fornire un vaccino con un profilo di stabilità migliorato e una maggiore facilità d'uso nei siti di somministrazione.”*

Di quanto il “profilo di stabilità” è stato “migliorato”, rispetto a quello della precedente versione? Qual è il delta di variazione tra l'Indice di polidispersione delle nanoparticelle lipidiche del vaccino Tris/Sucrose non-elettrolitico, rispetto a quello del vaccino PBS/Sucrose elettrolitico? Qual è la differenza tra il Potenziale Zeta delle nanoparticelle lipidiche del vaccino Tris/Sucrose non-elettrolitico pronto per l'uso, rispetto a quello del vaccino PBS/Sucrose elettrolitico diluito e capovolto 10 volte prima della somministrazione? Qual è il valore del Potenziale Zeta della nuova formulazione Tris/Sucrose, in condizioni fisiologiche (pH 7,4; 2,2 mM di Ca++) e a 37°C, cioè alla temperatura cui viene sottoposta pochi istanti dopo l'avvenuta inoculazione intramuscolare?

Le risposte a tali quesiti, molto probabilmente, non arriveranno mai, forse perché ritenute “... informazioni di natura commerciale riservata” e quindi da sopprimere, ma, ciononostante, rimane e rimarrà sempre insopprimibile la logica constatazione che il vaccino originale Comirnaty PBS/Sucrose (iniettato in miliardi di dosi) è stato modificato, oltre che per una maggiore facilità d'uso, anche, in primis, per “migliorarne la stabilità”. È questa, finalmente, la prima evidente ammissione, ancorché parziale e paludata da giustificazioni di ordine “logistico”, che **la precedente versione elettrolitica PBS/Sucrose NON era sufficientemente stabile e presentava, di conseguenza, maggiori rischi tossicologici rispetto alla versione non-elettrolitica Tris/ Sucrose** successivamente elaborata da Pfizer-BioNTech e prontamente autorizzata da EMA.



Ciononostante, è assai singolare che la nuova versione non-elettrolitica *Tris/Sucrose* venga presentata nel web “solo” come un mero sviluppo (*upgrade*) farmaco-tecnologico e una mirabile soluzione a onerosi problemi di “stoccaggio, trasporto e logistica”, senza far cenno alcuno ai rischi di natura tossicologica e pericoli per la salute pubblica che la precedente formulazione presentava.

La versione elettrolitica, instabile e da diluire prima dell'inoculazione, rimane sorprendentemente in commercio, semplicemente contraddistinta da un **tappo viola** (*diluizione necessaria, per soggetti di età pari o superiore a 12 anni*), accanto alla “nuova” con **tappo grigio** (*diluizione NON necessaria, anch'essa per soggetti di età pari o superiore a 12 anni*).<sup>70</sup>

Nella relativa tabella riportata sul sito di AIFA (Figura 27), la versione con tappo grigio, quella cioè non-elettrolitica, è significativamente contraddistinta da un “\*” che conduce alla nota: “*La fornitura disponibile della formulazione da “Non diluire” per soggetti di età pari o superiore a 12 anni si basa sugli accordi contrattuali dei singoli paesi*”. Quali paesi? E l'Italia? Quali accordi contrattuali? Anche questi accordi contrattuali *segretati*?

Entrambe le versioni risultano comunque autorizzate all'immissione in commercio in Europa, sempre con la formula “autorizzazione subordinata a condizioni”



Formulazione	Da diluire prima dell'uso, soggetti di età pari o superiore a 12 anni	Non diluire, soggetti di età pari o superiore a 12 anni*
Colore tappo del flaconcino	Viola 	Grigio 
Tempo di conservazione in frigorifero	1 mese	10 settimane
Dose/Dose potenziale	30 mcg (con diluizione)	30 mcg
Quantità di diluente necessaria per dose	1,8 mL	Nessuna diluizione
Volume di iniezione	0,3 mL	0,3 mL
Dimensione del flaconcino	2 mL	2 mL
Volume di riempimento	0,45 mL	2,25 mL
Dosi per flaconcino	6 dosi per flaconcino (dopo diluizione)	6 dosi per flaconcino

\*La fornitura disponibile della formulazione da "Non diluire" per soggetti di età pari o superiore a 12 anni si basa sugli accordi contrattuali dei singoli paesi.

Figura 27. Estratto da “Guida alle formulazioni di COMIRNATY vaccino a mRNA – BioNTech & Pfizer” (Cfr. nota 70)

5.7 Instabilità e potenziale tossicologico della formulazione PBS/Sucrose: conferme e riscontri

Alla luce dei dati tecnici sopra esposti, è ormai del tutto evidente che l’instabilità del sistema colloidale di nanomateriali lipidici (e il conseguente maggior rischio tossicologico) della prima versione di Comirnaty sia sostanzialmente dovuta alla presenza, in quella formulazione, di **fattori destabilizzanti**, quali, appunto, i composti inorganici elettrolitici in eccesso, costituiti principalmente dai componenti del **tampone pH PBS** utilizzato da Pfizer-BioNTech. Leggiamo, a questo proposito, una definizione chiarificatrice del concetto di “stabilità”, in relazione a composizioni a base di nanoparticelle, nel brevetto di Moderna US 10,442,756 B2 “*Compounds and compositions for intracellular delivery of therapeutic agents*”<sup>71</sup>:

*“Stabilità”, “stabilizzato” e “stabile” nel contesto della presente informativa si riferisce alla resistenza delle composizioni di nanoparticelle e/o delle composizioni farmaceutiche qui divulgate a cambiamenti chimici o fisici (quali ad esempio, degradazione, variazione delle dimensioni delle particelle, aggregazione, modifica della tecnica di incapsulamento, ecc.) in determinate condizioni di fabbricazione, preparazione, trasporto, stoccaggio e/o uso, ad esempio quando viene applicato uno stress come la forza di taglio, stress da congelamento/scongelamento, ecc.”*

A questo proposito, però, risulta ancor più esplicito ed attendibile quanto riportato nel **brevetto della stessa BioNTech** (co-titolare, insieme a Pfizer, del vaccino Comirnaty) **US 10,485,884 B2 “RNA Formulation for Immunotherapy”** del 26 novembre 2019<sup>72</sup>, riguardante proprio le formulazioni di RNA incapsulato in nanoparticelle lipidiche cationiche (del tipo cioè di quelle

usate nel Comirnaty), e denominate, in questo contesto, “lipoplexes”. Nella descrizione del brevetto, si spiega, fra l’altro, come le nanoparticelle cationiche contenenti RNA si formino soprattutto grazie a determinati rapporti di massa/carica tra i lipidi cationici (+) e le componenti anioniche (-) dell’ RNA, e come tali rapporti giochino un ruolo fondamentale anche per quanto riguarda il passaggio delle nanoparticelle contenenti RNA attraverso la membrana cellulare e il conseguente trasferimento dell’RNA all’interno della cellula per modificarne le caratteristiche funzionali (trasfezione):

*“La maggior parte delle membrane naturali sono caricate negativamente, e quindi l’interazione elettrostatica attrattiva tra le nanoparticelle lipidiche caricate positivamente e la biomembrana caricata negativamente può svolgere un ruolo importante nel collegamento alla cellula e nell’assorbimento delle nanoparticelle lipidiche. Valori del rapporto carica positiva/carica negativa che sono considerati ottimali per la trasfezione sono compresi tra 2 e 4. Con una minore carica positiva in eccesso, l’efficacia della trasfezione scende drasticamente, andando praticamente a zero. Sfortunatamente, però, per liposomi e nanoparticelle lipidiche caricati positivamente è stata segnalata un’elevata tossicità, che può essere un problema per l’applicazione di tali preparati come prodotti farmaceutici.”*

<b>United States Patent</b>		(10) Patent No.:	<b>US 10,485,884 B2</b>
Sahin et al.		(45) Date of Patent:	<b>Nov. 26, 2019</b>

<b>RNA FORMULATION FOR IMMUNOTHERAPY</b>	(56)	<b>References Cited</b>
Applicants: <b>BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH, Mainz (DE); TRON-TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ GEMEINNÜTZIGE GMBH, Mainz (DE)</b>		<b>U.S. PATENT DOCUMENTS</b>
	4,897,355 A	1/1990 Eppstein et al.
	5,264,618 A	11/1993 Felgner et al.
	5,580,859 A *	12/1996 Felgner ..... A61K 9/1272 43 5/69.1
	5,703,055 A	12/1997 Felgner et al.
	6,251,399 B1	6/2001 Diamond et al.
	6,472,176 B2	10/2002 Kovesdi et al.
	6,500,641 B1	12/2002 Chen et al.
	6,586,410 B1	7/2003 Wheeler et al.
	7,303,881 B2	12/2007 Huang et al.
	7,462,354 B2	12/2008 Sette et al.
	7,790,696 B2	9/2010 Gregoriadis

1279-1287). Most natural membranes are negatively charged, and therefore the attractive electrostatic interaction between the positively charged lipoplexes and the negatively charged biomembrane may play a role in cell binding and uptake of the lipoplexes. Typical ranges of +/- ratios which are considered optimal for transfection are between 2 and 4.

With lower excess positive charge, the transfection efficacy goes drastically down to virtually zero. Unfortunately, for positively charged liposomes and lipoplexes elevated toxicity has been reported, which can be a problem for the application of such preparations as pharmaceutical products.

Figure 28. Brevetto BioNTech US 10,485,884 B2 “RNA Formulation for Immunotherapy” - 26 Nov. 2019 (sezione “Background of the invention”)

Le ragioni per cui i tamponi pH del tipo PBS, non vanno assolutamente bene in preparati a base di nanoparticelle cationiche inglobanti RNA sono spiegate molto chiaramente nella sezione del succitato brevetto intitolata “Effects of Buffers/ Ions on Particle Sizes and PI of RNA Lipoplexes” [Effetti dei tamponi / composti ionici sulle dimensioni e Indice di polidispersione delle nanoparticelle lipidiche contenenti RNA, ndt]:

*“L’uso del tampone pH, spesso necessario per le applicazioni farmaceutiche, e la presenza di composti ionici, sono fattori che possono portare all’aggregazione delle nanoparticelle lipidiche e sono dunque da ritenersi inadatti per applicazioni parenterali.*

...

*In presenza del tampone pH denominato PBS, lo stesso effetto è ancor più evidente. Le nanoparticelle lipidiche con un rapporto di carica positiva o neutra formano particelle più grandi (parzialmente stabilizzate dalle cariche positive).*

...

*In condizioni fisiologiche (cioè a pH 7,4; 2,2 mM Ca<sup>++</sup>), è imperativo assicurarsi che ci sia un rapporto di carica prevalentemente negativa, a causa dell’instabilità delle nanoparticelle lipidiche neutre o caricate positivamente.”*

United States Patent (10) Patent No.: US 10,485,884 B2  
Sahin et al. (45) Date of Patent: Nov. 26, 2019

**RNA FORMULATION FOR IMMUNOTHERAPY** (56) **References Cited**

Applicants: **BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH, Mainz (DE); TRON-TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ, GEMEINNÜTZIGE GMBH, Mainz (DE)**

U.S. PATENT DOCUMENTS	Pub. No.	Pub. Date	Inventor(s)
4,897,355 A	1/1990	Eppstein et al.	
5,264,618 A	11/1993	Felgner et al.	
5,580,859 A	12/1996	Felgner et al.	
5,703,055 A	12/1997	Felgner et al.	
6,251,399 B1	6/2001	Diamond et al.	
6,472,176 B2	10/2002	Kovosdi et al.	
6,500,641 B1	12/2002	Chen et al.	
6,586,410 B1	7/2003	Wheeler et al.	
7,303,881 B2	12/2007	Huang et al.	
7,462,354 B2	12/2008	Sotte et al.	
7,790,696 B2	9/2010	Giegoradis	

**45**

charged particles are smaller (mean size 100 to 200 nm) and more stable (PI<0.15) than uncharged particles (mean size 200 to 250 nm, PI<0.2).

(b) In PBS buffer, the same effect is more prominent. Lipoplexes with a positive or neutral charge ratio form larger particles (partially stabilized by the positive charges). Lipoplexes with a neutral charge ratio are building unstable aggregates. In contrast, negatively charged lipoplexes are both stable (as indicated by a low PI<0.2) and compact with average particle sizes of 250 nm and less.

(c) After addition of CaCl<sub>2</sub>, an increase in the particle sizes is observable. However, at physiological Ca<sup>++</sup> concentrations (shown: 2.2 mM; in some cell types the physiological concentration can be up to 5 mM, rarely up to 10 mM) negatively charged particles still have defined sizes below 500 nm with a polydispersity index not exceeding 0.6. For the sample with excess positive charge the size increased almost to 1000 nm.

(d) Addition of 22 mM CaCl<sub>2</sub> to the samples b) (PBS) induced aggregation/flocculation under all conditions, supposedly due to formation of calcium phosphate particles. These results demonstrate that in buffered solutions such as i.e. in PBS buffer and/or in the presence of CaCl<sub>2</sub>, positive or neutral charge ratios are poorly suited for the production of stable liposomal formulations. The stability of lipoplexes highly depends on the charge ratio +/- between the cationic DOTMA lipid and the charged RNA. In addition, both the ionic strength of the formulation buffer and the presence of bivalent cations have strong influences on particle sizes. Under physiological conditions (i.e. pH 7.4; 2.2 mM Ca<sup>++</sup>), a negative charge ratio appears to be imperative due to the instability of neutral or positively charged lipoplexes. For lipoplexes with excess negative charge the lowest trend for aggregation was observed.

**Example 2: Effect of Buffers/Ions on Particle Sizes and PI of RNA Lipoplexes**

Lipoplexes of liposomes and RNA at different charge ratios +/- between the cationic (positively charged) lipid DOTMA and the negatively charged RNA were prepared. The physicochemical characteristics of the liposomes were investigated by dynamic light scattering (PCS) and zeta potential measurements.

The use of buffer which is often necessary for pharmaceutical applications and ions can lead to aggregation of lipoplexes which makes them unsuitable for parenteral application to patients. In order to evaluate these effects on the a

**Example 3: Effect of Positive Charge on Stability of RNA Lipoplexes**

For an additional evaluation of a potential beneficial/detrimental effect of positive charges on the stability of lipoplexes (see e.g. FIGS. 1 b and c), particle sizes of lipoplexes of DOTMA/Chol liposomes (F5) [DOTMA/Chol (1:1 mol:mol)] and RNA with DOTMA/RNA charge ratios of 1/1 and 2/1 were measured in different buffers (see FIG. 2). For comparison, also the size of the pure liposomes was measured.

In 150 mM sodium chloride as well as in PBS buffer a positive 2/1 DOTMA/RNA charge ratio leads to largely increased/aggregated particle sizes with a polydispersity index greater than 0.4. This result indicates that positive charges are not suitable to stabilize lipoplexes and that aggregation has to be expected for the positively charged lipoplexes also under physiological conditions.

Figura 29. Brevetto BioNTech US 10,485,884 B2 “RNA Formulation for Immunotherapy” - 26 Nov. 2019 (Sezione “Examples”)

In altre parole, sulla base di quanto scientificamente documentato e riportato in un brevetto della stessa **BioNTech**, apprendiamo che un sistema colloidale di nanoparticelle lipidiche cationiche inglobanti mRNA

1. **NON** dovrebbe contenere nella propria formulazione **un tampone ionico come il PBS**, al fine di prevenire fenomeni di aggregazione, agglomerazione, flocculazione delle nanoparticelle lipidiche, con tutte le conseguenze di ordine tossicologico sopra descritte.
2. **NON** dovrebbe contenere nella propria formulazione **composti ionici** (come ad es. cloruro di sodio), al fine di prevenire fenomeni di aggregazione, agglomerazione, flocculazione delle nanoparticelle lipidiche, con tutte le conseguenze di ordine tossicologico sopra descritte.
3. **NON** dovrebbe essere **iniettato per via parenterale**, a causa della sua instabilità quando viene a trovarsi nelle **condizioni fisiologiche del distretto extracellulare** (pH 7,4; 2,2 mM Ca<sup>++</sup>)

Tutte e tre queste condizioni sono sorprendentemente e flagrantemente disattese, se non addirittura inspiegabilmente ignorate, sia da Pfizer-BioNTech sia dagli enti certificatori, sia nel merito della formulazione sia in quello della destinazione d'uso del preparato Comirnaty/PBS Sucrose.

In ultima analisi, il preparato medicinale Comirnaty/PBS Sucrose di Pfizer-BioNTech, autorizzato da EMA nel 2020, presenta delle gravi e palesi non-conformità di ordine chimico-fisico e tossicologico. **Non-conformità, curiosamente e paradossalmente, in apparente contrasto persino con le precedenti accurate indicazioni e precauzioni segnalate dalla stessa BioNTech in un suo brevetto del 2019.**

Sulla base di tali conferme e riscontri, possiamo dunque ipotizzare che l'aggiunta di una così importante quota di composti ionici elettrolitici al già precario equilibrio di un sistema colloidale di nanoparticelle cationiche, notoriamente sensibili alle cariche ioniche, abbia inevitabilmente condizionato la stabilità, conservabilità, funzionalità e conseguente potenziale tossicologico del prodotto finito Comirnaty PBS/Sucrose, causando in particolare: imprevedibili alterazioni dell'Indice di polidispersione e del Potenziale Z dei nanomateriali impiegati; possibile conseguente formazione di aggregati, agglomerati, flocculati, coalescenze; gradi diversi di penetralità e mobilità degli aggregati nanolipidici di diverse dimensioni, dopo l'inoculazione, in siti biologici imprevedibili e imprevedibili, con formazione irregolare di ROS in tali siti; conseguente eterogeneità di effetti avversi (*randomization*), potenzialmente variabili da lotto a lotto, da fiala a fiala, da vaccinatore a vaccinatore, da vaccinato a vaccinato, in una sorta di ineluttabile, incontrollabile e indecifrabile roulette russa.

## 6. Conclusioni

Il vaccino *Comirnaty Covid-19 mRNA BNT162b2*, nella sua versione e composizione originale, denominata *PBS/Sucrose*, presenta numerose criticità e non conformità, esaminate nel dettaglio nel presente studio e qui appresso sinteticamente elencate:

- I due eccipienti funzionali preposti alla formazione di nanoparticelle lipidiche, ALC-0315 e ALC-0159, non sono registrati in nessuna Farmacopea, né rientrano tra le sostanze esaminate e classificate in conformità al Regolamento (CE) CLP n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele in Europa.
- Tali eccipienti non compaiono neppure nell'inventario delle sostanze registrate in conformità al Regolamento (CE) REACH n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione

delle sostanze chimiche in Europa. Non se ne conosce pertanto il profilo tossicologico *in primis*.

- Non sono state espletate tutte le procedure di analisi chimico-fisica e test tossicologici previsti per le nanoforme di dette sostanze, in contrasto con quanto dettato dal Regolamento (UE) 2018/1881 che modifica il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), per ricomprendervi le nanoforme delle sostanze.
- Non sono stati effettuati, con il consenso dell'ente certificatore, studi di cancerogenicità, genotossicità e mutagenicità del preparato, nonostante sia stato ormai confermato da numerosi studi scientifici che le *Specie Reattive dell'Ossigeno* (ROS), generate dalle nanoparticelle, possono avere un alto potenziale cancerogeno, genotossico e mutageno.
- Le Schede di Dati di Sicurezza del preparato Comirnaty non riportano le informazioni relative alle caratteristiche delle nanoforme presenti nella composizione del preparato stesso, in contrasto con quanto previsto dal succitato Regolamento (UE) 2018/1881 e dal Regolamento (UE) 2020/878.
- Non sono noti l'Indice di polidispersione e il Potenziale Zeta delle nanoparticelle presenti nel preparato. Ciò comporta un'assoluta incertezza nella determinazione della stabilità chimico fisica delle nanoparticelle e dei loro aggregati, con conseguente imprevedibilità inerente sia alla potenziale efficacia del vaccino che al grado di penetrabilità e mobilità delle nanoparticelle all'interno dell'organismo umano, nonché il loro eventuale ingresso nella circolazione sistemica e deposito in organi come reni, fegato, cuore, cervello, polmoni.
- La presenza di elettroliti nel preparato originale (artatamente eliminati nella successiva versione Comirnaty Tris/Sucrose") induce ancor più a presumere che il prodotto denominato "Comirnaty PBS/Sucrose" possa dar luogo alla formazione di aggregati e agglomerati, prima, durante o dopo la procedura di inoculazione, e che pertanto possa essere sia inefficace (in quanto non in grado di veicolare l'mRNA codificante per la proteina Spike attraverso le membrane della cellula ospite) sia pericoloso, in quanto andrebbe a depositarsi in tessuti o organi non previsti nel suo destino biologico primario.

In conclusione, si ritiene urgente ed indispensabile uno studio accurato e sul lungo termine, da svolgersi nelle opportune sedi istituzionali, cliniche o medico-legali, soprattutto in relazione ad eventuali nessi di causalità o con-causalità tra quanto qui esposto e l'ampia eterogeneità patologica degli eventi avversi gravi o letali registrati dopo le vaccinazioni, al fine di adottare tutte le opportune e urgenti azioni correttive e preventive a tutela della salute pubblica, compresa quella di sospendere quanto prima, se del caso e in conformità con il principio di precauzione, le vaccinazioni con il preparato Comirnaty PBS/ Sucrose di Pfizer-BioNTech

***Durante l'esperimento lo scienziato responsabile deve essere pronto a interromperlo in qualunque momento se indotto a credere che la continuazione dell'esperimento comporterebbe probabilmente lesioni, invalidità o morte per il soggetto umano.*** (Codice di Norimberga - Articolo 10)

## NOTE

- 1) EMA - 19 February 2021 - EMA/707383/2020 Corr.1 - Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report Comirnaty - Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified) - Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000, [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) pp. 8, 13, 14, 15
- 2) <https://echa.europa.eu/it/regulations/nanomaterials>
- 3) 1 nanometro = 1 miliardesimo di metro = 1 milionesimo di millimetro, una dimensione cioè inferiore di decine di migliaia di volte allo spessore di un capello umano.
- 4) Ibid. op. cit. nota 2
- 5) RACCOMANDAZIONE della Commissione del 18 ottobre 2011 sulla definizione di nanomateriale (2011/696/UE) - <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696>
- 6) REGOLAMENTO (CE) n. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)
- 7) REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele
- 8) REGOLAMENTO (UE) 2018/1881 della Commissione del 3 dicembre 2018 che modifica il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda gli allegati I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII per ricomprendervi le nanoforme delle sostanze - Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 308
- 9) Ibid. p. 8
- 10) Ibid. pp. 10, 18
- 11) PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI - Comitato Nazionale per la Bioetica - Nanoscienze e Nanotecnologie, seduta Plenaria del 9 giugno 2006, p. 6, 16 [https://bioetica.governo.it/media/3119/p77\\_2006\\_nanoscienze\\_nanotecnologie\\_it.pdf](https://bioetica.governo.it/media/3119/p77_2006_nanoscienze_nanotecnologie_it.pdf)
- 12) EMA, op. cit. nota 1, p. 13
- 13) Una molecola è detta anfifilica (anche amfilica o anfipatica) quando contiene sia un gruppo idrofilo (amante dell'acqua, polare) sia uno lipofilo (amante del grasso, non polare).
- 14) Rumiana Tenchov, Robert Bird, Allison E. Curtze, and Qiongqiong Zhou - Lipid Nanoparticles-From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement, ACS Nano 2021 15 (11), 16982-17015, <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>
- 15) [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1281388/DETERMINA\\_154-2020\\_COMINRATY.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1281388/DETERMINA_154-2020_COMINRATY.pdf)
- 16) EMA, op. cit. nota 1, p. 23
- 17) Council of Europe, European Pharmacopoeia <https://www.edqm.eu/en/European-Pharmacopoeia-Background-Mission>
- 18) L'inventario C&L è una banca dati gestita dall'ECHA che contiene informazioni sulla classificazione e l'etichettatura delle sostanze immesse sul mercato europeo. Questa banca dati comprende informazioni sulle sostanze notificate e registrate, ma anche l'elenco delle classificazioni e delle etichettature armonizzate ai sensi dell'allegato VI del regolamento CLP.

- 19) La banca dati dell'inventario C&L: <https://echa.europa.eu/it/information-on-chemicals/cl-inventory-database>
- 20) Informazioni sulle sostanze chimiche: <https://echa.europa.eu/it/information-on-chemicals>
- 21) <https://safetydatasheets.pfizer.com>
- 22) Your Europe:  
[https://europa.eu/youreurope/business/product-requirements/chemicals/registering-chemicals-reach/index\\_it.htm](https://europa.eu/youreurope/business/product-requirements/chemicals/registering-chemicals-reach/index_it.htm)
- 23) REGOLAMENTO (UE) 2020/878 della Commissione del 18 giugno 2020 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)
- 24) Ibidem
- 25) Arie Bruinink, Jing Wang, Peter Wick - Effect of particle agglomeration in nanotoxicology, Published online: 25 January 2015 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-015-1460-6>
- 26) EMA, op. cit. nota 1, p. 55, 56
- 27) Regolamento (UE) 2018/1881, cfr. nota 8, p. 6
- 28) Flavia Barone, Isabella De Angelis, Cristina Andreoli e Chiara Laura Battistelli, Istituto Superiore di Sanità; Caterina Arcangeli e Giorgio Leter, Metodi in vitro e in silico per la valutazione del potenziale tossicologico dei nanomateriali. ENEA - 3/2017 Energia, ambiente e innovazione, DOI 10.12910/EAI2017-045
- 29) Ibidem
- 30) E. Fröhlich (2012), The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 7: 5577–5591
- 31) Chul-Ho Yun, Chun-Sik Bae, and Taeho Ahn - Cargo-Free Nanoparticles Containing Cationic Lipids Induce Reactive Oxygen Species and Cell Death in HepG2 Cells - *Biol. Pharm. Bull.* 39, 1338–1346 (2016), 2016 The Pharmaceutical Society of Japan
- 32) Yu, Z., Li, Q., Wang, J. et al. - Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field - *Nanoscale Res Lett* 15, 115 (2020). <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
- 33) Ibidem, p. 7
- 34) Imlay JA, S. L. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240: 1302–1309
- 35) Maki HSM (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic for DNA synthesis. *Nature*. 355:273–275
- 36) Demple B, Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63:915–948
- 37) Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TG, Wright CJ, Doak SH (2009) NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 30:3891–3914
- 38) Chompoosor A, Saha K, Ghosh PS, Macarthy DJ, Miranda OR, Zhu ZJ, Arcaro KF, Rotello VM (2010) The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*. 6: 2246–2249
- 39) Proquin H, Rodríguez-Ibarra C, Moonen C, Urrutia Ortega IM, Briedé JJ, de Kok TM, van Loveren H, Chirino YI (2018) Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis* 33:267–268

- 40) Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW (2008) Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 49:399–405
- 41) Di Bucchianico S, Fabbrizi MR, Cirillo S, Ubaldi C, Gilliland D, Valsami-Jones E, Migliore L (2014) Aneuploidogenic effects and DNA oxidation induced in vitro by differently sized gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 9:2191–2204
- 42) Dufour EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H (2006) Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 607: 215–224
- 43) Levine AS, Sun L, Tan R, Gao Y, Yang L, Chen H, Teng Y, Lan L (2017) The oxidative DNA damage response: a review of research undertaken with Tsinghua and Xiangya students at the University of Pittsburgh. *Sci China Life Sci* 60:1077–1080
- 44) Jena NR (2012) DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 37:503–517
- 45) Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Ilse D (2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res* 504:137–148
- 46) Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 88:1515–1531
- 47) Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311:622–627
- 48) Rusyn I, Asakura S, Pachkowski B, Bradford BU, Denissenko MF, Peters JM, Holland SM, Reddy JK, Cunningham ML, Swenberg JA (2004) Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for in vivo detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators. *Cancer Res* 64:1050–1057
- 49) Tretyakova NY, Groehler A, Ji S (2015) DNA-protein cross-links: formation, structural identities, and biological outcomes. *Acc Chem Res* 48:1631–1644
- 50) Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44:479–496
- 51) Yu, Z., Li, Q., Wang, J. et al. - op. cit. nota 32, p. 9
- 52) ISO 22,412:2017 Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)
- 53) OECD - Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme; ENV/JM/MONO(2009)20/REV first revision – 02 Jun 2010, pp. 55 – 58
- 54) S. Moein Moghimi Allergic Reactions and Anaphylaxis to LNP-Based COVID-19 Vaccines. *Perspectives* volume 29, issue 3, pp. 898-900, March 03, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yymthe.2021.01.030>
- 55) The EMA Covid-19 data leak, and what it tells us about mRNA instability. *BMJ* 2021;372:n627. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.n627> (Published 10 March 2021)
- 56) EMA, op. cit. nota 1, p. 23
- 57) Ibid. p. 37
- 58) <http://www.galenotech.org/potzeta.htm>
- 59) OECD op. cit. nota 53, pp. 33, 63
- 60) Flavia Barone et al., op. cit. nota 28



- 61) OECD op. cit. nota 53, p. 63
- 62) Giovanni D'Agostinis, Elio Mignini - Manuale del Cosmetologo – Tecniche Nuove, seconda edizione, 2014, p. 162
- 63) Tharwat F. Tadros - 7. Flocculation of colloidal dispersions. Volume 1 Basic Principles of Interface Science and Colloid Stability - Berlin, Boston: De Gruyter, 2017, pp. 117-128.  
<https://doi.org/10.1515/9783110540895-008>
- 64) FDA Summary Basis for Regulatory Action 11/8/2021 – COVID-19 Vaccine mRNA Comirnaty – p. 4  
<https://www.fda.gov/media/151733/download>
- 65) EMA – Product Information Comirnaty - Allegato I - Riassunto Delle Caratteristiche Del Prodotto – p.20  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/comirnaty-epar-product-information_it.pdf)
- 66) <https://www.ema.europa.eu/en/news/new-manufacturing-sites-new-formulation-approved-covid-19-vaccine-biontech-pfizer>
- 67) Regolamento (CE) n. 1234/2008 della Commissione, del 24 novembre 2008 , concernente l'esame delle variazioni dei termini delle autorizzazioni all'immissione in commercio di medicinali per uso umano e di medicinali veterinari. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1234/oj/ita>
- 68) EMA - 14 October 2021 EMA/594686/2021 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). CHMP assessment report on group of an extension of marketing authorisation and variations. COMIRNATY International non-proprietary name, Common name: tozinameran, COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside modified) - Procedure No. EMEA/H/C/005735/X/0044/G.  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/comirnaty-h-c-5735-x-0044-g-epar-assessment-report-extension\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/comirnaty-h-c-5735-x-0044-g-epar-assessment-report-extension_en.pdf)
- 69) EMA - 11 March 2021 - EMA/15689/2021 Corr.1- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Assessment report - COVID-19 Vaccine Moderna Common name: COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside-modified) - Procedure No. EMEA/H/C/005791/0000.  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- 70) [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1279946/Guida\\_formulazioni\\_COMIRNATY\\_dicembre\\_2021.pdf](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1279946/Guida_formulazioni_COMIRNATY_dicembre_2021.pdf)  
(downloaded settembre 2022)
- 71) <https://assets.modernatx.com/m/35f16c28b28fbafb/original/US10442756.pdf>
- 72) <https://patentimages.storage.googleapis.com/de/67/95/27ec2ea27a32d9/US10485884.pdf>

