



Facultad de farmacia
Grado en Farmacia

“DISEÑO Y FORMULACIÓN DE VACUNAS ARNm”

Memoria Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant
Junio 2022

Autor: Lucía Rodríguez Saura

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Marta González Álvarez y
María Isabel González Álvarez

ÍNDICE:

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN.....	14
6.1. SÍNTESIS DE ARNm <i>in vitro</i>	14
6.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE PARA ARNm	22
6.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE VACUNAS ARNm. TIPOS.....	31
6.4. APLICACIONES DE VACUNAS ARNm	33
7. CONCLUSIONES.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXO I. GLOSARIO	44
ANEXO II. CÓDIGO OIR	45

1. RESUMEN

El ácido ribonucleico mensajero es una molécula monocatenaria que porta consigo la información genética necesaria para elaborar proteínas. En células eucariotas dicha información se obtiene del ADN en el núcleo celular, y posteriormente se traduce a proteínas en el citoplasma.

El desarrollo de vacunas de ARNm tiene como propósito codificar la información genética de una proteína de interés, e introducir dicha secuencia en el interior de una molécula de ácido ribonucleico mensajero sintetizado in vitro.

La combinación de ARNm y secuencia antigénica de interés se une a un sistema de transporte, que la conducirá hasta la célula diana. Una vez ahí se inserta en el citoplasma de la célula por endocitosis, donde el ARNm procederá a traducirse, obteniendo así la proteína o proteínas que posteriormente serán presentadas al sistema inmune mediante el MHC.

Esta tecnología de formulación de vacunas ofrece multitud de posibilidades en el ámbito terapéutico

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MARCO HISTÓRICO

2.1.1. ORIGEN DE LAS VACUNAS

Aproximadamente han transcurrido más de doscientos años desde que la primera vacuna fue desarrollada, un hito histórico que revolucionó el campo de la medicina, con el consecuente impacto sobre la mejora de la calidad de vida y la longevidad de la humanidad.

La viruela es una enfermedad vírica con una elevada tasa de contagio cuyo comienzo se estima que fue alrededor del 10.000 A.C, dicha afección arremetió contra la vida de millones de personas durante decenas de siglos. (1)

Estudios consideran que la viruela se originó en el continente africano, desde dónde se propagó a la India y al resto de oriente, a causa de los comerciantes egipcios. No fue hasta la edad media que se extendió al continente europeo.(1)

La variolización fue una técnica desarrollada en oriente, la cual consistía en infectar, de forma premeditada, a un individuo sano, mediante técnicas como la inoculación de polvo de costra perteneciente a un enfermo de viruela, o bien introduciendo pus de las pústulas infectadas en el interior de las fosas nasales del individuo sano. Dichas acciones se realizaban con el fin de que los individuos sanos quedaran protegidos ante la infección por el virus.(2)

Lady Montagu, esposa del embajador de Inglaterra en Estambul, fue la responsable de importar la técnica de variolización a Inglaterra en el siglo XVIII. Este suceso fue clave en el posterior desarrollo de la vacuna contra la viruela por parte de Edward Jenner.

Jenner fue un médico británico que recibe el título de padre de la inmunología, a consecuencia de ser el autor de la primera vacuna desarrollada en la historia, la cual inmunizaba contra el temido virus de la viruela.

El médico británico escuchó rumores entre las mujeres encargadas de ordeñar a rebaños de vacas, las cuales afirmaban que, al haber contraído la viruela vacuna se hallaban, de alguna manera, protegidas ante la exposición con viruela humana.

Los comentarios de las ordeñadoras inspiraron años después las investigaciones de Jenner sobre la viruela. En 1796, Edward inoculó a un niño materia de una pústula de viruela obtenida de una ordeñadora. Transcurridas seis semanas, repitió el procedimiento, esta vez inoculando al mismo niño con virus de viruela humana. El individuo no enfermó, con lo que el experimento fue un éxito.

En septiembre de 1798, Edward Jenner hizo pública su famosa investigación *Investigación acerca de las causas y efectos de la viruela vacuna*, a partir de lo

que comenzó una campaña en pos de la vacunación, que causó gran controversia entre la comunidad médica.

Transcurridos dos siglos desde el hallazgo de Jenner, en 1980, se certificó el logro la erradicación de la viruela, a consecuencia de la enorme inversión en campañas de vacunación contra esta, llevadas a cabo durante el siglo XX por parte de la Organización Mundial de la Salud.

2.1.2. VACUNAS DE LA HISTORIA

La vacuna contra el virus de la viruela dio paso a la investigación de otras enfermedades, y consiguio a la creación de vacunas desarrolladas a partir de distintas premisas.

En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se exponen algunas de las vacunas más relevantes descubiertas a lo largo de la historia:

VACUNAS A LO LARGO DE LA HISTORIA			
AÑO	PAÍS	DESCUBRIDOR	DESCUBRIMIENTO
1796	Gran Bretaña	Edward Jenner	Vacuna contra la Viruela
1881	Francia	Louis Pasteur	Vacuna contra el Ántax
1885	Francia	Louis Pasteur	Vacuna Antirrábica
1892	Rusia	Hapfkine	Vacuna anticolérica
1898	Gran Bretaña	Wright	Vacuna contra el Tifus
1921	Francia	Calmette y Guérin	Vacuna contra la Tuberculosis
1923	Francia	Ramon y Glenney	Vacuna contra la Difteria
1923	Gran Bretaña	Madsen	Vacuna contra la Tos ferina
1927	Francia	Ramon y Zoeller	Vacuna contra el Tétano
1937	EEUU	Salk	Primera vacuna Antigripal
1954	EEUU	Salk	Vacuna Antipoliomielítica inerte

1960	EEUU	Engers	Vacuna contra el Sarampión
1962	EEUU	Weller	Vacuna contra la Rubéola
1976	Francia	Maupas	Vacuna contra la Hepatitis B
1983	Japón	Takahshi	Vacuna contra la Varicela
1986	Francia	Mérieux	Vacuna triple antisarampionosa, contra las paperas y la rubéola
1986	EEUU	Laboratorios Chiron	Primera vacuna por Ingeniería Genética contra la Hepatitis B
2005	-	-	Vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH)
2020	-	-	Vacuna contra el COVID-19

Tabla 1. Tabla agrupadora de las vacunas trascendentales de la historia ⁽³⁾

2.2. VACUNAS

Entendemos como vacuna a un preparado de microorganismos, (atenuados, inactivados o sus fracciones), destinado a estimular la respuesta inmune del organismo ante ciertos agentes patógenos, con el fin de prevenir o proteger al sujeto de una enfermedad. La vía más usual de administración es la inyección, aunque en algunas vacunas se emplean alternativas como la administración mediante un vaporizador nasal.

Al administrar una vacuna en un sujeto sano, se generará una respuesta inmunitaria, provocada por el reconocimiento de antígenos como células extrañas. Posteriormente al reconocimiento antigénico, se producirá una respuesta humoral (linfocitos B, células plasmáticas) y/o celular (linfocitos T), procediendo a eliminar o neutralizar el antígeno, frenando de esta manera la enfermedad. De este modo los antígenos contenidos en la vacuna o producidos endógenamente, en el caso de las vacunas de material genético, serán eliminados, mientras que en el sujeto quedarán anticuerpos específicos contra la enfermedad.

Dichos anticuerpos actuarán si la persona es expuesta a la enfermedad contra la que ha sido vacunada, evitando que dicho sujeto enferme (inmunización), o previniéndolo de sufrir dicha enfermedad de forma aguda.

2.2.1. TIPOS DE VACUNAS

Existen una gran variedad de vacunas las cuales pueden clasificarse por diversos criterios tales como su composición, utilidad clínica, vía de administración, tecnología de fabricación, microbiología...

- Organización en base a la tecnología empleada en fabricación^{(3), (4)}:
 - Vacunas basadas en virus o bacterias:
 - Vacunas con patógenos inactivos. Se usa el agente patógeno muerto o completamente desactivado, a partir de distintas técnicas como aplicación de calor, utilización de productos químicos o radiación. Dichos métodos arrebatan la capacidad de división de la bacteria o virus en cuestión, impidiendo la producción de la enfermedad. Este tipo de vacunas requiere administrar varias dosis al paciente espaciadas en el tiempo para conseguir inmunidad. Algunas de las vacunas en las que se ha usado esta técnica son la vacuna contra el Tifus, antirrábica, antigripales...
 - Vacunas con patógenos atenuados. Se emplea el agente patógeno vivo, atenuado o modificado, es decir, conserva su cualidad de dividirse. Se produce la atenuación de un virus a partir de su cultivo en células humanas o animales, hasta que desarrolle las mutaciones que lo hagan menos virulento, con el fin de disminuir la posibilidad de que provoque la enfermedad. La vacuna contra el sarampión, paperas y rubeola fueron desarrolladas con este método.
 - Vacunas basadas en proteínas. Consisten en administrar fragmentos del antígeno que desencadena la respuesta inmune, es decir, se administran proteínas antigénicas, que pueden ir aisladas, o bien en armazones proteicos

que simulen la apariencia de un virus determinado. Se distinguen dos tipos de vacunas basadas en proteínas:

- Vacunas de subunidades. Se desarrollan a partir de subunidades de las estructuras externas del virus, las cuales suelen corresponder a los principales sitios antigénicos. Los antígenos seleccionados se usan como epítomos (parte de una molécula que será identificada por el sistema inmune) utilizados con el fin de incentivar la aparición de anticuerpos. Esta clase de vacunas ofrece gran seguridad, ya que reduce las posibles reacciones adversas, al contrario que otro tipo de vacunas como pueden ser las atenuadas. Ejemplos de este tipo son las vacunas contra hepatitis B, C, y contra la Covid-19 (Nuvaxovid).
- Vacunas virus-like particles. Este tipo de vacunas se desarrollan a partir de los armazones víricos vacíos (virus like particles, cápsida del virus sin material genético), imitando la estructura del virus sin la cualidad de ser infeccioso. Este tipo de vacunas provoca respuesta tanto humoral como celular, y un ejemplo conocido de estas son las vacunas contra el virus del papiloma humano.
- Vacunas basadas en material genético
 - Vacunas de vectores virales. Este tipo de vacunas acarrean información genética del virus que queremos combatir, en un virus más inocuo como un adenovirus, que actúa como vector, diseñado para que no sea capaz de replicarse en el huésped. Este “vector” se utiliza como plataforma para introducir el fragmento del patógeno en el organismo el cual, posteriormente, inducirá una respuesta inmunitaria. Un ejemplo de este tipo de vacunas es la vacuna contra el ébola.
 - Vacunas de ácidos nucleicos. Están conformadas por ácidos nucleicos desnudos o bien encapsulados en nanopartículas. Ya que la información genética no la porta un vector viral, esto elimina el riesgo de que exista inmunidad previa contra el vector, lo cual podría disminuir su eficacia. A diferencia de las vacunas convencionales, este tipo de vacunas se basan en

el uso de instrucciones genéticas (ADN, ARNm) de una proteína viral para desatar una respuesta inmunitaria. El ácido nucleico, empleado en este tipo de vacunas, penetra en las células del organismo humano, las cuales sintetizan la proteína antigénica en abundancia desencadenando una respuesta inmune tanto humoral como celular, que podrá combatir el agente infeccioso productor de la enfermedad.

Si se trata de una vacuna de ADN, al introducirse en las células, se produce la transcripción de ADN a ARNm el cual es usado como modelo para la creación de proteínas específicas. Si la vacuna es de ARNm se elude el proceso de transcripción.

Ejemplos de este tipo de vacunas son las vacunas contra el COVID-19 (Moderna y Pfizer).

- Vacunas conjugadas: Más allá de las vacunas ilustradas con anterioridad, también encontramos las vacunas recombinantes obtenidas a partir de ingeniería genética. El desarrollo de este tipo de vacunas se da modificando el agente infeccioso mediante la eliminación de genes virulentos, con el fin de conservar la cualidad de estimular al sistema inmune a la par que se evade la producción de la enfermedad. Vacunas contra la Hepatitis B, o la del papiloma humano han sido desarrolladas con ingeniería genética.

2.3. COMPONENTES DE LAS VACUNAS

Una vacuna no se compone únicamente de fragmentos del organismo patógeno, fragmentos de este o su material genético, sino que también precisan de otros componentes que resultan indispensables para proporcionarles seguridad y eficacia. Cada componente tiene una función concreta(5):

- Antígenos. Son el compuesto activo de la vacuna, encargado de generar la respuesta inmunitaria. No todas las vacunas contienen esta figura como tal, sino que algunas contienen las instrucciones para generar ese antígeno una vez inoculada en el individuo.

- Conservantes. Imposibilitan que la vacuna se contamine una vez se abra el vial que la contiene. La utilización de conservantes no será necesaria si se trata de un vial monodosis.
- Estabilizantes. Evitan que los componentes de la vacuna se adhieran a las paredes del vial, a la par que impiden la producción de reacciones químicas entre los diversos compuestos de la vacuna.
- Tensoactivos. Preservan todos los componentes de la vacuna mezclados, y evitan que los elementos existentes en la fase líquida de la vacuna se aglutinen o sedimenten.
- Sustancias residuales. Son cantidades mínimas de diversas sustancias usadas en la producción y elaboración de la vacuna, los cuales no se encuentran entre los compuestos activos de la vacuna final.
- Diluyentes. Es un líquido, generalmente agua esterilizada, encargado de diluir una vacuna hasta su concentración indicada.
- Coadyuvantes. Son sustancias, de estructura química muy diversa, usadas para fortalecer la respuesta inmune a la vacuna.(5)

2.4. FASES EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA

Así como todos los fármacos, las vacunas también precisan de numerosas y rigurosas pruebas que determinen su seguridad y efectividad previamente a ser administradas en humanos.

A continuación, se relatan de forma resumida las fases a las que se somete una vacuna para su desarrollo⁽⁶⁾:

Fase preclínica. Se llevan a cabo estudios de investigación, con el propósito de identificar los antígenos que se usaran para desembocar una respuesta inmunitaria en el organismo del sujeto.

En este paso las vacunas experimentales obtenidas se testean en animales con el fin de evaluar su potencialidad en la prevención de una enfermedad a la par que su seguridad. Si la vacuna provoca respuesta inmunitaria y supera los requisitos de seguridad pasará a la siguiente fase.

Fase 1. La vacuna se inyecta a un número limitado de voluntarios humanos (entre 20 y 100), generalmente jóvenes y sanos, con el objetivo de verificar que exista una respuesta inmunitaria, a la par que determinar una dosis concreta y evaluar su seguridad en personas.

Fase 2. La vacuna se administra a cientos de voluntarios, con la meta de comprobar su capacidad de desembocar una respuesta en el sistema inmune de estos. En esta fase se evalúa la eficacia y se pone a prueba la seguridad de la vacuna.

Los voluntarios, en esta fase, forman diversos grupos etarios, a su vez estos comparten características similares (edad, sexo...) a las de las personas a las que van dirigidas estas vacunas.

En esta fase suele incluirse un grupo control, al cual no se le administra dicha vacuna, con el fin de descartar que los cambios producidos en el grupo vacunado no sean significativos.

Fase 3. La vacuna se administra a miles de voluntarios, entre los que se hallan sujetos que no recibirán la vacuna, pero si un compuesto semejante. Este procedimiento es similar al llevado a cabo con el grupo control en la fase anterior.

Tanto los participantes como los científicos implicados desconocerán, hasta que finalice esta fase, cuales son los individuos a los que se les ha administrado la

vacuna en cuestión o el compuesto semejante. Este tipo de ensayo recibe la denominación de ensayo de doble ciego.

Con dichos ensayos clínicos se concretará la eficacia y la seguridad de la vacuna en un grupo de personas considerablemente grande. A partir de ellos el consiguiente paso consiste en la aprobación de la vacuna por las autoridades sanitarias pertinentes, y su posterior comercialización.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el diseño y la formulación de las vacunas de ácido ribonucleico mensajero.

En concreto, los objetivos específicos perseguidos son:

1. Identificar las claves para el desarrollo de vacunas de ARNm.
2. Determinar las ventajas de este tipo de vacunas sobre las demás.
3. Comentar las posibles aplicaciones de esta familia de vacunas y sus previsiones de futuro.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el propósito de poder desarrollar el presente trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de una variedad de artículos, extraídos de bases de datos relacionadas con el ámbito científico. Las principales bases de datos empleadas han sido: MEDLINE (vía PubMed), Web of Science y Scopus entre otras.

Se han definido los siguientes descriptores para realizar las pertinentes búsquedas vía PubMed:

((((mRNA Vaccines) OR (RNA, Messenger)) AND (((Vaccines) OR (Vaccine Development)) OR (Vaccine Excipients)) OR (Immunogenicity, Vaccine))) AND (((Nanoparticles)) OR (Nanoparticle Drug Delivery System)) OR (Multifunctional Nanoparticles)) AND (((Growth and Development) OR (Drug Design)) OR (Drug Compounding))

Con el fin de seleccionar los artículos más apropiados para nuestro ensayo se aplicaron a través filtros los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
✓ Artículos en inglés.	✗ Artículos que no se encuentran en inglés o castellano.
✓ Artículos con una antigüedad no superior a 10 años.	✗ Artículos anteriores a 10 años. (excepto para búsqueda manual)
✓ Humanos.	

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión aplicados en la búsqueda de documentos.

Los términos incluidos en la ecuación se aplicaron de forma similar en otras bases de datos. Una vez aplicados los criterios de exclusión e inclusión en la búsqueda se obtuvieron un total de x referencias: 27 en MEDLINE, 25 en Scopus, 10 en Web of Science y 14 a través de búsqueda manual.

De los 76 registros totales se han incorporado a esta revisión bibliográfica un total de 37.

5. RESULTADOS

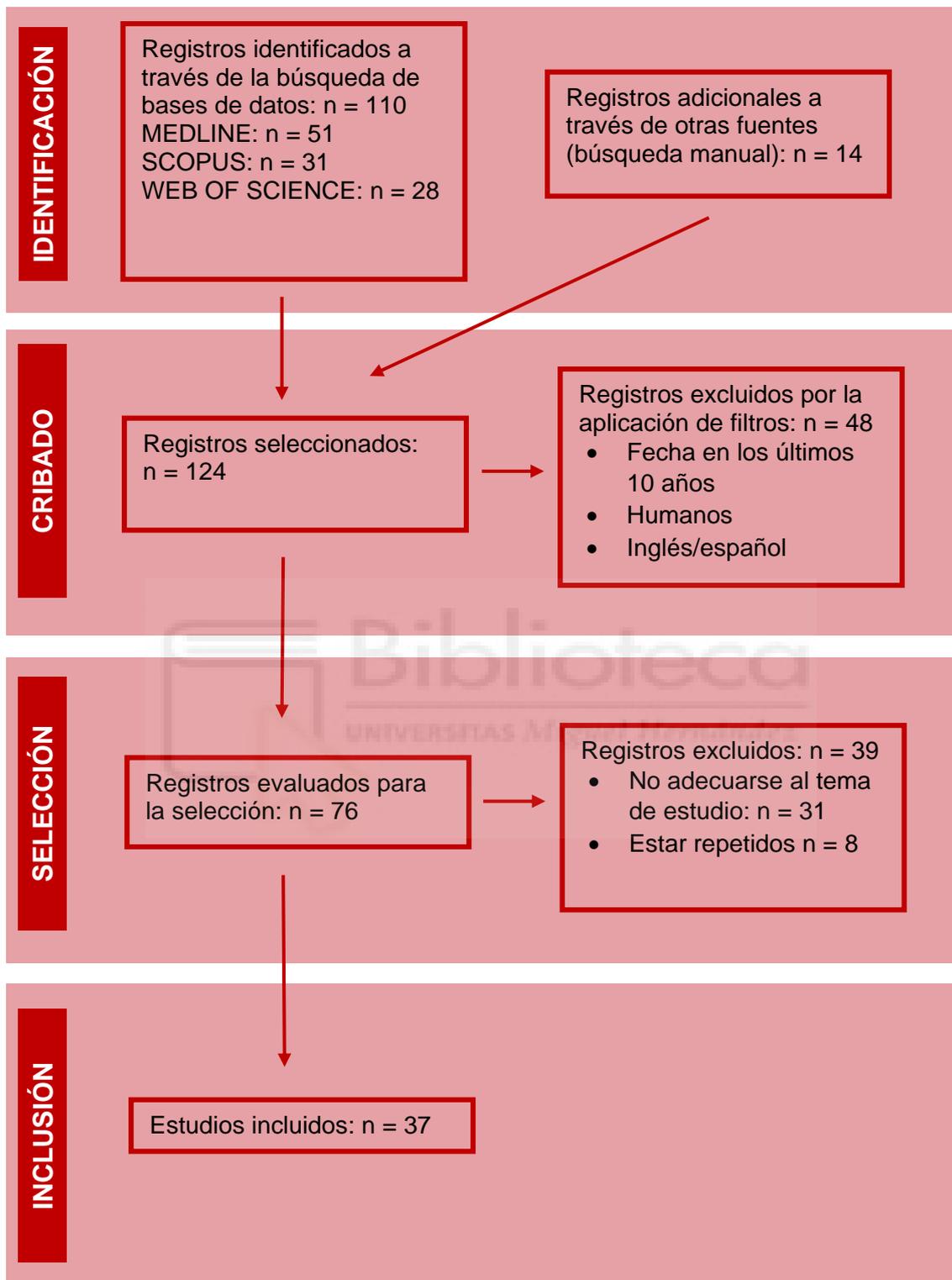


Tabla 3. Diagrama de identificación y selección de documentos

6. DISCUSIÓN

La velocidad, en su desarrollo y su alto perfil inmunogénico, han trasladado a las vacunas de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a un primer plano en los últimos años. La pandemia por coronavirus en la que nos hayamos inversos, ha servido como acelerador en la implementación de tecnologías de vacunas ARNm.

En la presente revisión bibliográfica se comentará, principalmente, como se lleva a cabo el desarrollo de dichas vacunas, a la par que se tratarán otros temas relacionados.

6.1. SÍNTESIS DE ARNm *in vitro*

La producción de ARNm transcrito *in vitro* se considera un proceso relativamente sencillo. El desafío viene dado cuando este ARNm ha de ser:

- con carácter terapéutico,
- cumplir ciertos estándares de calidad,
- ser altamente traducible
- y que no desencadene una respuesta inflamatoria grave en el organismo.

El primer paso para generar una vacuna de ácido ribonucleico mensajero es determinar cuál es la proteína antigénica de interés. Este proceso variará dependiendo del tipo de microorganismo, o bien, de una enfermedad como puede ser un tipo de cáncer.

Una vez aislada la proteína antigénica es necesario conocer su secuencia genética. Esta secuencia será clave para el desarrollo del ADN a partir del cual se producirá la obtención del ARNm de interés.

6.1.1. DISEÑO DE ADN RECOMBINANTE

En primer lugar, obtenemos la secuencia genética de la proteína que produce la respuesta inmune a partir del material genético secuenciado que la incluye. La

técnica de escisión enzimática se aplica con el fin de obtener distintos fragmentos de ADN, usando endonucleasas restrictivas para una secuencia concreta de ADN deseada.

El proceso de obtención de un ADN lineal que contenga la secuencia genética de la proteína que queremos producir, se puede llevar a cabo de diversas formas: a partir de ADN sintético preparado por **PCR**, o bien, mediante el uso de **plásmidos** recombinantes.

Si aplicamos este último proceso de obtención, los plásmidos recombinantes han de ser diseñados mediante la introducción de la secuencia genética de la proteína antigénica de interés en plásmidos¹ procedentes de células procariotas. La secuencia del gen de interés se incorpora en el ADN del plásmido por enzimas de restricción y ADN-ligasas. La combinación de nuestro gen de interés y el plásmido se denomina vector.⁽⁷⁾

La figura de un plásmido cuenta con varias zonas claves para su aplicación en investigación. Estas son⁽⁸⁾:

- ORI (origen de replicación). Secuencia de ADN que permite el inicio de la replicación.
- Marcador seleccionable. Gen introducido en el plásmido que le confiere un rasgo diferenciador.
- Sección de resistencia antibiótica. Esta sección es de utilidad en el momento de selección de los plásmidos tras la replicación.
- Múltiples sitios de clonación. Se trata de un segmento del plásmido el cual cuenta con numerosos lugares de restricción, lo cual permitirá la introducción del gen deseado.
- Promotor. Secuencia genética típicamente localizada cerca del comienzo del gen de interés, responsable del inicio del proceso de transcripción. Esta secuencia consta de un sitio de unión para una enzima ARN-polimerasa específica.
- Elementos reguladores. Estos determinan cuando se ha de iniciar o detener el proceso de transcripción.

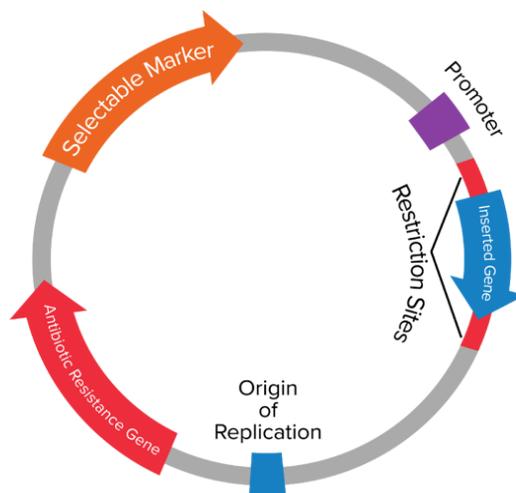


Figura 1. Mapa de un plásmido y sus zonas clave. Tomada de addgene.com

Mediante ingeniería genética obtenemos plásmidos recombinantes que, posteriormente, serán inoculados en un hospedador. Usualmente, bacterias con el fin de llevar a cabo la replicación de dicho vector o ADN recombinante (ADNr). Estas bacterias serán introducidas en medios de cultivo que alberguen los nutrientes necesarios para su crecimiento. De esta forma, se conseguirán numerosas copias de dicho ADN recombinante. Es decir, los plásmidos son usados como vectores genéticos para clonación y amplificación de material genético.⁽⁷⁾

Habitualmente, se introducen marcadores seleccionados en el ADN del plásmido. Estos son genes que permiten identificar posteriormente si las colonias generadas tras la replicación contienen la secuencia genética deseada. Un ejemplo de marcador seleccionable puede ser un gen de resistencia a un determinado antibiótico.

El contenido celular de los cultivos mencionados se concentra por centrifugación, y posteriormente se lisa con ayuda de distintos procesos como pueden ser tratamiento con calor o álcalis, detergentes y disolventes orgánicos.

Una vez obtenido el ADN del plásmido recombinante, el procedimiento consiste en determinar la calidad de él, eliminar los posibles contaminantes existentes, y

comprobar que la secuencia proteica de interés no haya sufrido mutaciones debidas al proceso de amplificación bacteriano. El plásmido recombinante se ha de linealizar mediante enzimas restrictivas con el propósito de realizar la transcripción.⁽⁹⁾

6.1.2. OBTENCIÓN DE ARNm *in vitro* Y PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es un acto por el que se produce la transferencia de la información contenida en una secuencia de ADN de doble cadena, a una cadena de ARN cuya secuencia será complementaria a una de las dos hebras.

El ADN lineal, obtenido por PCR o plásmidos recombinantes, consta de promotores. Estos son secuencias específicas que determinan el inicio del proceso de transcripción de ADN. Por lo general, en procariontes son usadas secuencias promotoras de ARN-polimerasas T7, T3 o SP6.⁽¹⁰⁾

Una vez se produce la unión del ARN-polimerasa a su respectiva secuencia promotora, comienza el proceso de transcripción, dirección 5' → 3', de la hebra template (no codificante). Mediante este proceso, obtenemos una molécula de ARNm inmaduro, cuya secuencia corresponde a la de la hebra codificante. Considerando que las bases nitrogenadas en ADN son (Adenina-Timina y Citosina-Guanina) y en ARN (Adenina-Uracilo y Citosina-Guanina).

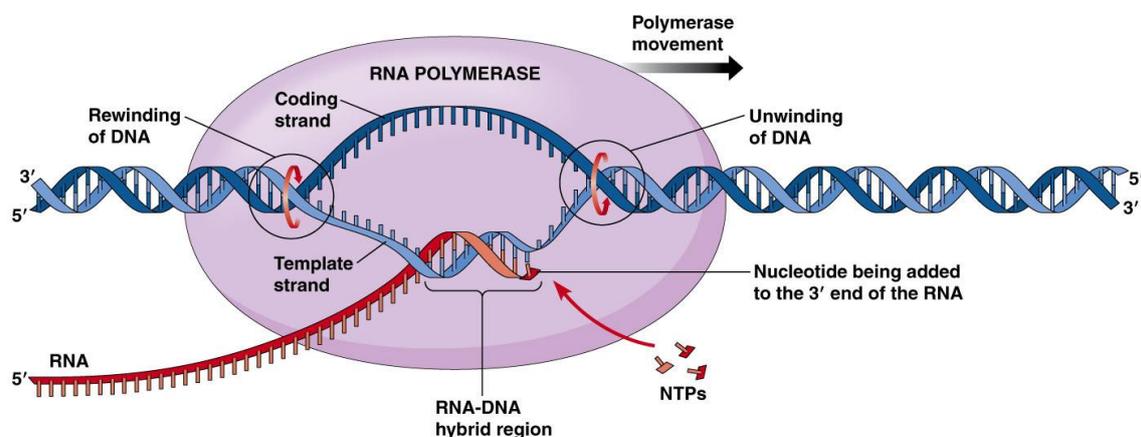


Figura 2. Proceso de transcripción de ADN a ARNm. Tomada de National Human Genome Research Institute of USA

6.1.3. PURIFICACIÓN DE ARNm OBTENIDO in vitro

El producto de la transcripción puede contener múltiples contaminantes. Entre ellos se incluyen moléculas de ARNm de doble cadena ((dc)ARN), fragmentos de ARN producidos por iniciación abortiva de la ARN-polimerasa y presencia de ARNasas, entre otros.

Purificar ARNm obtenido in vitro es clave para obtener un alto nivel de traducibilidad de este y, aminorar la posibilidad de activación exacerbada de la respuesta inmune innata. Esta respuesta estimula la secreción de interferón I y citoquinas inflamatorias.

En procedimientos de desarrollo de vacunas se trabaja con largas cadenas de ARN, por lo que se precisan de técnicas reproducibles y eficaces a gran escala. La cromatografía basada en la exclusión por tamaño (SEC), es capaz de eliminar nucleótidos libres, pequeñas secciones de transcripción abortiva y restos del templete pertenecientes al plásmido. Sin embargo, su eficacia se ve limitada ante contaminantes con un tamaño similar al del ARNm que se busca purificar.

Con el fin de paliar ese hándicap, estudios realizados por Katalin Karikó et al. (11) concluyeron que la implementación de técnicas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o la cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), permitía eliminar de manera efectiva ARN de doble cadena del ARNm de interés.

Actualmente existen numerosos kits de purificación de ARNm comercializados.

6.1.4. OPTIMIZACIÓN DE ARNm Y DISEÑO DE ARNm MODIFICADO

El ARNm sintético elaborado con fines terapéuticos, se diseña siguiendo el patrón del ARNm producido por células eucariotas. Existen algunos elementos

estructurales básicos que han de formar parte del ARNm sintético, que resultan esenciales para mantener la estabilidad y la funcionalidad de dicha molécula.

Estos elementos básicos son:

- Caperuza en el extremo 5´.
- Región sin traducir en el extremo 5´ (5´ UTR: Untranslated region).
- Región sin traducir en el extremo 3´ (3´ UTR: Untranslated region).
- Marco abierto de lectura (ORF: open reading frame).
- Estructura de cola poli A (cola poliadenilada en el extremo 3´).

Con el propósito de mejorar la durabilidad⁽¹²⁾ y la expresión antigénica del ARNm sintético, existen una serie de estrategias que implican la modificación de algunos de los elementos estructurales mencionados con anterioridad.

A continuación, se relatan algunos de los elementos que son objeto de modificación^{(13), (8), (10)}:

A) Caperuza 5´ (cap)

Durante el proceso de transcripción la caperuza puede ser introducida en el ARNm, mediante la introducción de un análogo de cap en la reacción. Sin embargo, se ha demostrado que dicho análogo es incorporado, usualmente, en la orientación inversa, lo que provoca que el nucleótido 7-metilguanosina se convierta en el primer nucleótido transcrito, en lugar de constituir la caperuza. Esto desemboca en un ARNm poco traducible y altamente ineficiente.

Con el objetivo de evadir la cap no metilada por la inversión de la orientación de esta, el ARNm puede ser transcrito sin análogo de cap, y esta última ser añadida con posterioridad mediante un complejo enzimático. El complejo enzimático en cuestión, consta con actividad trifosfatasa, guaniltransferasa y (7-guanina)-metiltransferasa, que le permite añadir una caperuza en el extremo 5´ de la molécula de ARN. No obstante, esta opción resulta ineficaz en producciones a gran escala.

Alternativamente, la orientación correcta de la caperuza se puede obtener mediante la implementación de unos análogos de cap anti-inversión, denominados ARCA (anti-reverse cap analogs). Las posiciones C2 o C3 de dichos análogos son modificadas, con el objetivo de asegurar que los grupos metilo reaccionen con los hidroxilos en el sitio correcto durante la transcripción.

B) Regiones no traducidas (UTRs)

Las UTR son regiones no codificantes localizadas en los extremos 3' y 5' de la hebra de ARNm. A pesar de tratarse de fragmentos no traducidos, las UTR contienen secuencias reguladoras asociadas tanto con la mejora de la traducibilidad y estabilidad, como con el reconocimiento de ARNm por los ribosomas.

Por medio de interacciones con las proteínas de unión al ARN, las UTR pueden influenciar en el grado de degradación de ARNm y su traducibilidad. A continuación, se exponen algunas de las modificaciones que se pueden realizar en estas regiones:

La región 5' no traducida puede ser modificada mediante distintas estrategias, como pueden ser: evitando la presencia de codones de inicio canónicos y no canónicos en la 5' UTR, que puedan interrumpir el marco abierto de lectura, o usando UTR 5' más cortos han probado mejorar la traducción del ARNm.

La 3' UTR se considera una región repleta de factores inestables en el ARNm. Si evitamos dichos factores mientras se produce la síntesis en esta región, reduciríamos la inestabilidad del ácido ribonucleico mensajero. La secuencia de la 3' UTR derivada de α -globulina y β -globulina contiene numerosos elementos reguladores. Esta cualidad la convierte en una estrategia ampliamente usada en ARNm sintético.

Incluir un sitio de entrada al ribosoma (IRES), en ARNm transcrito in vitro, ensalza la expresión de proteínas terapéuticas.

C) Marco abierto de lectura (ORF)

La elección apropiada de los codones en esta región puede optimizar la traducción del ARNm.

La estrategia de modificación de los codones en el ORF dependerá de la naturaleza de la proteína antigénica. La sustitución de codones extraños en ORF, por otros que sean más frecuentes, permite que los genes altamente expresados puedan ser traducidos mediante los mismos codones del huésped, a la par que garantizan la abundancia del ARNt durante la expresión del ARNm exógeno. Por otro lado, esta táctica no es beneficiosa si se trata de proteínas que requieren una baja tasa de traducción, ya que necesitan plegarse adecuadamente. En este último caso, se implementaría el uso de codones con baja frecuencia en el marco de lectura.

D) Estructura de cola poli A

Situada en el extremo 3' de la hebra de ARNm, se halla una región poliadenilada, denominada cola poli A. Tanto la estructura de caperuza como la cola poli A, están directamente ligadas con la esperanza de vida de la molécula de ARNm.

Las dimensiones de la cola poli A repercuten sobre la degradación del ARNm (Conry et al.)⁽¹⁴⁾, lo que convierte a esta característica en una diana de modificación.

La poliadenilación del extremo 3' del ARNm in vitro, puede venir codificada en el templete del vector (plásmido recombinante), o bien, se puede llevar a cabo mediante enzimas poli (A) polimerasas recombinantes.

La inserción de nucleótidos modificados en la cola poli A, por vía poli (A) polimerasas, inhibe la desadenilación llevada a cabo por nucleasas (Korner y Wahle)⁽¹⁵⁾.

En células eucariotas de mamíferos la longitud de la cola poli (A) se extiende, aproximadamente, hasta 250 nucleótidos. Esta cola se ve reducida durante su estancia en el citoplasma.

Por otro lado, cuando se trata de ARNm sintético colas poli A de unos 100 nucleótidos, resultan más convenientes si se emplean con fines terapéuticos.

E) Modificación de nucleótidos

Las moléculas de ARN están compuestas por cuatro nucleótidos básicos (ATP, GTP, UTP y CTP). Durante el proceso de maduración del ARN transcrito, algunos de los nucleótidos sufren modificaciones de carácter natural. Entre estas posibles transformaciones se pueden encontrar nucleótidos como la pseudouridina y la 5-metilcitosina.

Según ensayos realizados por Karikó et al.⁽¹⁶⁾ la implementación de estas bases modificadas, permite evitar el reconocimiento del ARNm in vitro por receptores como receptores tipo Toll (proteína transmembrana) o proteína quinasa-R (implicación en apoptosis celular). Estos pertenecen al sistema inmune innato, y su activación puede desencadenar respuestas inflamatorias no deseadas.

Existe cierta controversia, en la comunidad científica, entorno al uso de nucleótidos modificados. En diversos estudios realizados en los últimos años, como los realizados por Thess et al. ⁽¹⁷⁾, no se observa una clara relación entre la estabilidad del ARNm y la variación de estructuras de nucleótidos.

6.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE PARA ARNm

Contrariamente al ARNm producido endógenamente, el ARNm sintético generado in vitro ha de introducirse en el citoplasma desde el espacio extracelular.

El ácido ribonucleico mensajero es una molécula muy proclive a ser degradada por ribonucleasas, este hándicap le confiere su fama de inestable. Por otro lado, el ARNm tiene un tamaño considerable (10^5 - 10^6 Da), a la par que se halla cargado negativamente, lo que dificulta su endocitosis celular, aminorando así las probabilidades de ser traducido.⁽¹⁸⁾

Con el objetivo de deshacerse de esos inconvenientes se han desarrollado múltiples sistemas de transporte de ARNm in vivo.

El arquetipo de sistema de transporte ha de proporcionar protección ante la degradación por ARNasas, facilitar la endocitosis del ARNm y dirigirse a células presentadoras de antígeno (APC).

En esta sección del trabajo se procederá a comentar los distintos métodos usados con el fin de que la molécula de ARNm de interés llegue al citoplasma celular.

6.2.1. ARNm DESNUDO

Las vacunas de ARNm pueden ser inoculadas sin necesidad de transportador. Este método se caracteriza por su facilidad de preparación y almacenaje.

El ARNm es diluido en un sistema tampón, y posteriormente inoculado vía intramuscular, intradérmica, nodular, intravenosa... Usualmente, se emplean como sistema tampón Ringer lactato o solución Ringer. Ambos contienen calcio lo que dio pie a sugerir que este elemento puede suscitar la endocitosis del ARNm (Probst et al. ⁽¹⁹⁾).

En presencia de un reactivo, el ARN desnudo puede permanecer estable a temperaturas de 4°C, durante unos 10 meses (Jones et al. ⁽²⁰⁾)

Otra de las cualidades de la inoculación de ARNm desnudo, es su inmunogenicidad. Por un lado, la inmunogenicidad puede ensalzar la respuesta ante la vacuna, proporcionando actividad adyuvante, que potencia el reconocimiento de ARNm por receptores característicos del sistema inmune innato (TLR, RIG-I, PKR). Este hecho desembocará en la producción de quimioquinas y citoquinas que a su vez estimularán la producción de una respuesta humoral y celular más potente (respuesta inmune adaptativa). Por otro lado, esta cualidad puede convertirse en un inconveniente, ya que puede

provocar una respuesta inflamatoria no deseada tras la administración de la vacuna.⁽²¹⁾

Como se ha mencionado anteriormente, el ARNm desnudo in vivo presenta numerosos inconvenientes, como son: su facilidad de ser degradado por ARN nucleasas, su polaridad negativa y su tamaño considerable, que dificulta la endocitosis al interior celular.

6.2.2. TRANSPORTE MEDIADO POR CÉLULAS DENDRÍTICAS ex vivo.

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras de antígenos (APC), capaces de estimular la respuesta inmunitaria celular y humoral. Estas células presentan el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), estimulando el crecimiento de linfocitos T colaboradores (CD4+) y citotóxicos (CD8+), lo que desemboca en la producción de respuestas inmunes específicas.⁽²¹⁾

Con el propósito de utilizar las células dendríticas como transportadoras, se les introduce in vitro el ARNm que codifica al antígeno o proteína de interés. Tras esto se transfieren de vuelta en el organismo del hospedador.

La introducción del ARNm en la célula dendrítica ex vivo se puede llevar a cabo a través transportadores derivados de lípidos, o bien, mediante electroporación. La electroporación es la técnica más recurrente. En esta, se emplea una descarga eléctrica que aumenta la permeabilidad de la membrana celular dendrítica, lo que facilita la introducción del ARNm de interés en su interior.⁽²¹⁾

Las rutas de administración del complejo CD-ARNm suelen ser subcutánea, intravenosa, nodular o intradérmica. En ocasiones se combinan varias vías de administración para un mismo objetivo.

Las células dendríticas se han empleado mayoritariamente en estudios de inmunoterapia para el cáncer. En un ensayo realizado por Van Nuffel et al., se usaron las CD autólogas de un paciente con un melanoma de estadio IV.

Mediante electroporación se introdujo una mezcla de ARNm que codificaban para diversos antígenos asociados al melanoma y distintas proteínas inmunoestimuladoras. El paciente respondió positivamente al tratamiento, la enfermedad se estabilizó y se detectaron en sangre linfocitos CD8+ y CD4+ específicos para el antígeno tumoral. ⁽²²⁾

La desventaja que presenta este transporte en concreto recae en la complejidad de la manipulación y caracterización de CD.

6.2.3. VECTORES VIRALES

Este tipo de transporte consiste en el uso de virus genéticamente modificados que acarrean el material genético de interés (ARNm) hasta la célula. Los virus más recurrentemente empleados en esta técnica son adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, y retrovirus. ⁽²³⁾

Mediante ingeniería genética se sustituye gran parte del genoma viral con los ácidos nucleicos de interés. La acción que se lleva a cabo sobre estas se realiza con el propósito de eludir el carácter patógeno del virus.

Un vector viral idóneo es aquel que conserva sus capacidades biológicas de unión a la membrana celular, internalización en la célula y fuga del endosoma. Estos vectores presentan altas tasas de transfección.

A pesar de que este tipo de transporte resulte eficiente, ha pasado a un segundo plano a consecuencia de los inconvenientes que presenta. Entre estos inconvenientes encontramos: ^{(24), (23)}

- Replicación del vector vírico.
- Reconocimiento del vector por parte del sistema inmune, con la consiguiente respuesta que dificulte el transporte del ARNm de interés.
- Integración genómica.
- Inmunogenicidad

De las problemáticas recién enumeradas, nace la necesidad de implementar vectores no víricos, los cuales serán expuestos a continuación.

6.2.4. POLÍMEROS CATIÓNICOS

Los polímeros catiónicos atrapan el ARNm de interés en el interior de complejos denominados poliplejos. Estos complejos pueden tener numerosas formas y tamaños, su diseño variará en función del tipo de células en las que se busque realizar la endocitosis.

A pH fisiológico los polímeros con carga positiva interaccionan de manera electrostática con los grupos fosfato del ARNm, lo que da lugar a su condensación y el desarrollo de partículas que permiten custodiar y liberar el material genético en el interior celular. ^{(18), (24)}

Entre los polímeros más empleados encontramos polietilenimina (PEI) y dendrímeros derivados de poliamidoamina (PAMAM).

En concreto, PEI es el polímero catiónico más empleado en transporte in vitro de material genético. Su eficacia en la transfección in vitro de ARNm es muy elevada. Sin embargo, su aplicación clínica se ha visto limitada por su toxicidad, debida a su alta densidad de carga. ⁽²¹⁾

Recientemente se publicó un estudio llevado a cabo por Moyo et al., en el que se hacía uso de formulaciones basadas en PEI en combinación con ARNm que codificaba proteínas Gag y Pol del VIH-1. Tras una inoculación intramuscular en ratones, se observó respuestas específicas mediadas por linfocitos CD8+ y CD4+. ⁽²⁵⁾

Con el propósito de mitigar estos inconvenientes, se han aplicado estrategias como usar formas de bajo peso molecular, incorporar PEG en la formulación de PEI, conjugar con ciclodextrina, o desarrollar polímeros biodegradables. ⁽²⁶⁾

6.2.5. PÉPTIDOS CATIÓNICOS

Otro de los sistemas de transporte de ARNm son los péptidos cargados positivamente. Su composición basada en unidades monoméricas y aminoácidos biodegradables los convierte en una opción altamente biocompatible. Entre los péptidos vectores más representativos encontramos las protaminas y los péptidos de penetración celular (CPPs).⁽²⁷⁾

Las protaminas son pequeños péptidos (4000 Da aprox.), ricos en residuos de arginina que le confieren la carga positiva. Estas cargas positivas reaccionan mediante interacciones electrostáticas con la molécula de ARNm de interés, protegiéndolas de la degradación mediada por ribonucleasas. Las nanopartículas de protamina estimulan la producción de IFN- α , encargado de regular las respuestas inmunes innata y adaptativa (función auto-adyuvante).⁽²¹⁾

Por otro lado, los péptidos de penetración celular (CPP) son pequeños polipéptidos constituidos por menos de 30 residuos de aminoácidos. Estos son capaces de cruzar la membrana celular para un transporte efectivo de ARNm al citoplasma celular. Udhayakumar et al.⁽²⁸⁾ describen el papel interpretado por CPPs que contienen un motif anfipático RALA. Este condensa al ARNm en nanocomplejos que permiten que dicho ácido ribonucleico escape del interior del endosoma, siendo liberado en el citoplasma de CD para su traducción. A su vez, en este estudio se relata como el uso de bases modificadas induce una potente respuesta inmune contra el antígeno codificado mediada por linfocitos T.

La acción conjunta de péptidos con poliplejos (polímero+ARNm) o lipoplejos (liposoma+ARNm) facilita que el vector llegue a la célula diana.

6.2.6. NANOEMULSIONES CATIÓNICAS (CNE)

Se trata de partículas cuyo diámetro ronda los 130nm, y se hallan compuestas por aceite, agua y agentes emulsionantes. Las nanoemulsiones usan emulsionantes hidrófilos e hidrofóbicos para estabilizar el núcleo oleoso de la fase acuosa (O/W).

Este tipo de emulsiones pueden ser inducidas por numerosos métodos entre los que se incluyen agitación vigorosa, ultrasonido y microfluidos.

Un ejemplo relevante de este tipo de vectores es el MF59, se trata de una nanoemulsión aprobada por la FDA como adyuvante de la vacuna de la gripe. Su objetivo es aumentar la inmunogenicidad de la vacuna inactivada de la gripe. Los componentes de MF59 incluyen escualeno (lípidos), Span™85 (triéster de sorbitán), Tween™80 (polisorbato 80) y un tampón de citrato.^{(21), (18)}

Una pieza clave para la encapsulación del ARNm negativamente cargado en CNEs es el uso de un lípido catiónico, como puede ser DOTAP. Esta combinación posibilita la protección de ARNm ante la degradación mediada por ribonucleasas, a la par que facilitan el transporte hasta la célula.⁽²¹⁾

Actualmente, Gennova Biopharmaceuticals Ltd ha desarrollado una nanopartícula lipídica inorgánica candidata a vacuna contra el SARS-CoV-2 que se encuentra bajo ensayos clínicos. La cualidad más disruptiva de esta candidata a vacuna es su estabilidad, ya que se estima que almacenada a temperaturas entre 4° y 25° tiene un periodo de validez de 3 meses. Un hecho que contrasta con el periodo de validez que ofrecen las vacunas contra el SARS-CoV-2 de Moderna (6 meses a -20 °C; hasta 30 días a 2-8 °C y 12 horas a temperatura ambiente), y Pfizer-BioNTech (6 meses entre -80°C/-60 °C; hasta 5 días a 2–8 °C y hasta 2 h a temperatura ambiente).⁽¹⁸⁾

6.2.7. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP)

En los últimos años el desarrollo de nanopartículas lipídicas (LNPs) se ha posicionado en un primer plano, considerándose actualmente como una de las tecnologías más prometedoras en cuanto a sistemas de transporte in vivo.

Esto es debido a las numerosas ventajas que presentan los sistemas LNP, entre las que encontramos⁽²⁷⁾:

- Baja inmunogenicidad.
- Biocompatibles.
- Seguros y estables.

- Flexibilidad de diseño.
- Alta eficiencia en encapsulación y transporte.
- Gran capacidad de carga.
- Producción a gran escala.

Las LNP son sistemas de nanopartículas, con un diámetro de 100nm o menos, compuestas de materiales lipídicos de origen sintético o fisiológico. No solo son idóneos protegiendo al ARNm de la degradación mediada por ribonucleasas, sino que además conducen eficientemente el material genético hasta el citoplasma.

Los componentes de estos sistemas de transporte son⁽¹⁸⁾:

- Lípidos ionizables catiónicos que formen complejos (lipoplejos) con el ARNm de interés.
- Lípidos estructurales entre los que hallamos:
 - Lípidos de polietilenglicol (PEG). Estos se emplean recubriendo la superficie de las nanopartículas (PEGilación), con el propósito de impedir la agregación de otras partículas en la superficie del vector, a la par que mejorar la eficiencia de la administración del ARNm a las células diana.
 - Fosfolípidos. Mantienen la estructura de la bicapa lipídica.
 - Colesterol. Estabiliza la estructura de las nanopartículas lipídicas.

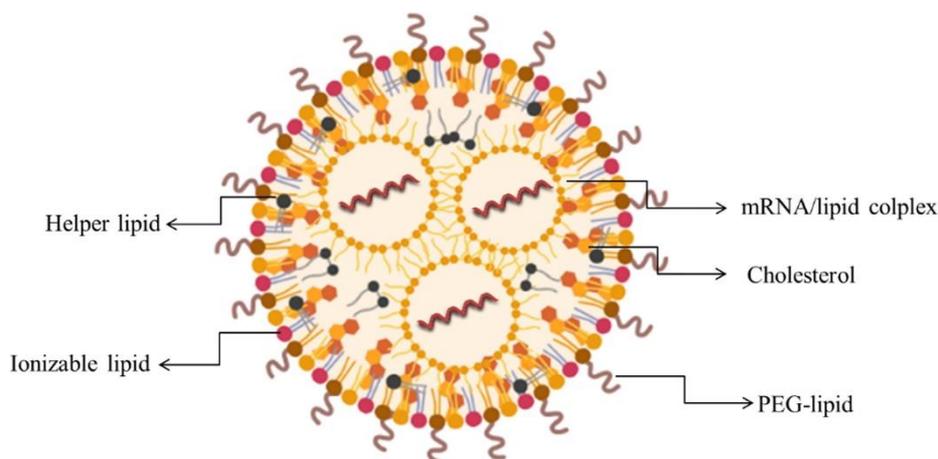


Figura 3. Representación de las partes claves implicadas en la formulación LNPs.⁽²⁷⁾

A continuación, se desarrollará en profundidad los aspectos clave en la formulación de nanopartículas lipídicas^{(18), (24)}.

- **Lípidos catiónicos ionizables.** Los lípidos catiónicos son esenciales para la encapsulación del ARNm cargado negativamente. Las cargas positivas del lípido interactúan con las negativas de la molécula de ARNm mediante interacciones electrostáticas, formando un lipoplejo. Se aplican modificaciones en la estructura del lípido catiónico ionizable, de manera que a pH inferiores al pK_a del grupo amino en cabeza, esos lípidos catiónicos se protonan adquiriendo carga positiva. Sin embargo, permanecen neutros (sin carga) a Ph superiores al pK_a mencionado. Esto se traduce en que cuando las LNPs viajen por el torrente sanguíneo (pH~7.4) permanecerán sin carga, y una vez se encuentren en el interior del endosoma celular (ph~6.5) se protonarán facilitando su fusión con la membrana del endosoma, quedando libre en el citoplasma de la célula diana.
Algunos de los ejemplos de lípidos catiónicos ionizables empleados actualmente son: ALC-0315, DLin-MC3-DMA...
- **Polietilenglicol (PEG).** Se emplea recubriendo la superficie de las nanopartículas (PEGilación), con el propósito de impedir la agregación de otras partículas en la superficie del vector, a la par que mejorar la eficiencia de la administración del ARNm a las células diana.
A su vez, los lípidos PEG mejoran la estabilidad de almacenaje de LNP, debido a que evitan que se produzcan fenómenos de agregación en la solución. Dichos fenómenos de agregación podrían dar lugar a un incremento en el tamaño de las LNPs, desembocando en la liberación prematura del ARNm encapsulado.
- **Fosfolípidos.** Se trata de lípidos que confieren estabilidad a la bicapa lipídica de LNPs. Estos son claves tanto en la distribución como en la capacidad de fusión de las nanopartículas lipídicas.
Algunos de los fosfolípidos más empleados son DSPC y DPPC.
- **Colesterol.** Es una sustancia lipídica que se intercala en la bicapa lipídica aportándole rigidez y estabilidad.

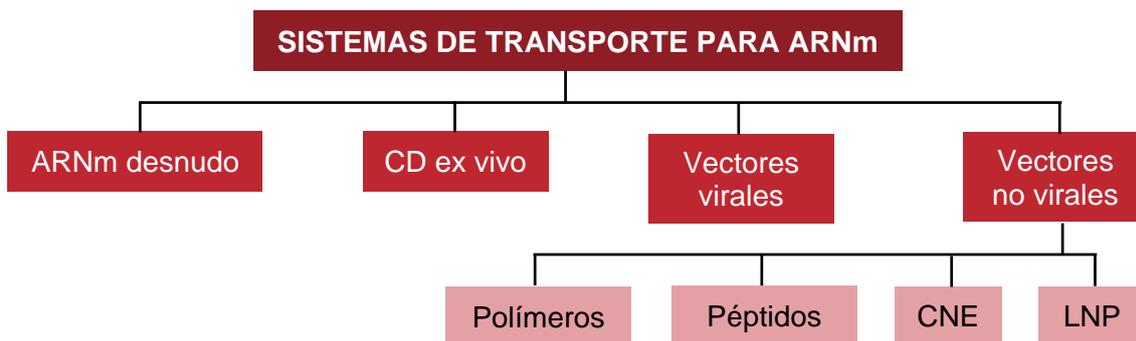


Tabla 4. Resumen de los sistemas de transporte para ARNm

6.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE VACUNAS ARNm. TIPOS.

6.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN GENERAL DE VACUNAS ARNm

Una vez el ARNm es inoculado se transporta hasta la célula donde se introduce por endocitosis. Una vez incorporado en el citoplasma por endocitosis, se traduce endógenamente por el complejo ribosómico de manera inmediata. Las proteínas, fruto de esta traducción, pueden permanecer en el interior de la célula, o bien, secretadas al espacio intercelular.

En el primer caso, algunos de los péptidos son presentados en la superficie de la membrana celular a través del complejo de histocompatibilidad I (MHCI). El MHC I forma parte de la mayoría de las células del organismo, la presentación del antígeno por este complejo desencadena la acción de los linfocitos T citotóxicos (CD8+).

En el segundo de los casos algunos de los péptidos secretados podrán ser fagocitados por células presentadoras de antígenos (APCs). Este tipo de células (macrófagos, células dendríticas, células B) expondrán el antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), lo que desencadena la activación de linfocitos T ayudantes (CD4+), esto lleva consigo la producción de una respuesta inmune más específica.(29)

Las vacunas de ARNm estimulan sistema inmune innato, activando receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en el endosoma y citoplasma celular. Dicha activación genera la secreción de quimiocinas y citocinas como interferón I, interleucina-12 y factor de necrosis tumoral (TNF). Esto conduce a una fuerte respuesta específica tanto humoral como celular, lo que confiere una alta inmunogenicidad a este tipo de vacunas.(30)

Por tanto, las vacunas de ARNm producen una potente respuesta inmune adaptativa.

6.3.2. TIPOS DE VACUNAS ARNm

Actualmente existen dos tipos de vacunas ARNm, las cuales son resumidas a continuación:

- Vacunas de ARNm **convencionales**. Son conocidas como vacunas de ARNm no replicables, estas vacunas llevan codificada la secuencia antigénica de interés entre las regiones 3' y 5' no traducidas. A su vez están conformadas por los elementos estructurales esenciales que desarrollaremos posteriormente, estos son el marco de lectura abierto, caperuza, y cola poli A. (31)
- Vacunas de ARNm **autoamplificables (saARNm)**. Este tipo de vacunas no solo codifican el antígeno de interés y contienen los elementos estructurales típicos, sino que, además, incorporan maquinaria de replicación vírica.

Las vacunas con saARN usan ARN-polimerasas derivadas del ARN de un virus, comúnmente un alfavirus. Los alfavirus conforman un grupo de virus pequeños de ARN cadena positiva, los cuales, durante el proceso de replicación, son capaces de producir gran cantidad de ARN subgenómico codificado en las proteínas estructurales de estos virus.(29)

El reemplazo de la información genética de las proteínas víricas estructurales por el antígeno de interés generará replicones que, al ser

introducidos en las células hospedadoras, serán autoamplificados por medio del complejo de ARN polimerasa viral codificado en el replicón. A consecuencia de esto se produce la expresión de grandes cantidades de antígeno de interés, lo que desemboca en una respuesta inmune más potente.

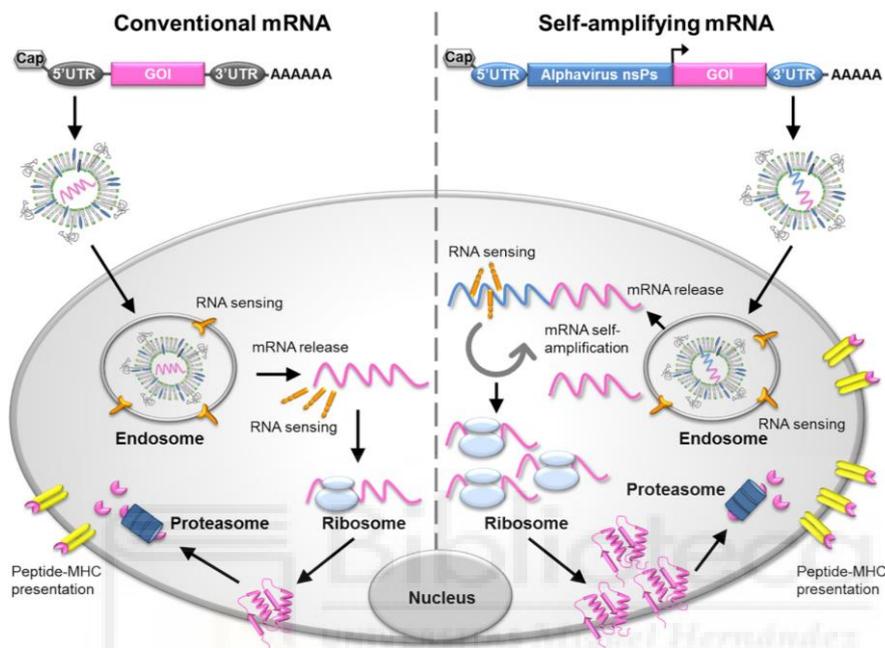


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de expresión de antígenos en vacunas de ARNm convencionales y autoamplificables⁽³¹⁾

6.4. APLICACIONES DE VACUNAS ARNm

Para culminar con el apartado de discusión se van a comentar una serie de patologías, incidiendo en la repercusión que tiene, o puede llegar a tener, la aplicación de vacunas de ARNm en su tratamiento.

6.4.1. SARS-CoV-2.

Virus perteneciente a la familia Coronaviridae responsable de causar la enfermedad por coronavirus. Se trata de un virus de ARN monocatenario positivo, causante de la pandemia transcurrida en los últimos años.

A nivel bioquímico, la diana terapéutica de este virus se trata de una proteína espícula (proteína Spike), cuya función es la de unirse a unos receptores de membranas celulares denominados ACE2 (enzima convertidora de angiotensina

2). Dicha unión es la encargada de mediar la endocitosis del virus en el interior celular.⁽³²⁾

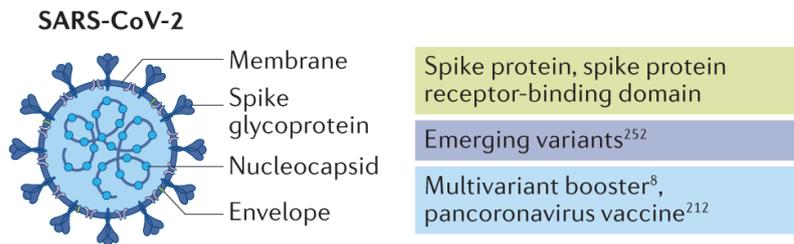


Figura 5. Estructura de SARS-CoV-2⁽²⁶⁾. Subrayada en verde se halla la proteína antigénica.

Los tratamientos contra el virus SARS-CoV-2 se basan en vacunas cuyo desarrollo se envuelve alrededor del uso de la proteína Spike.

A continuación, se muestran las tecnologías implicadas en el desarrollo de vacunas contra la COVID-19⁽³³⁾:

- Vacunas de ARNm. Estas son Comirnaty™ desarrollada por Pfizer/BioNTech, y Spikevax™ realizada por Moderna. Se basan en la secuencia genética de la proteína Spike incorporada en una molécula de ARNm sintético. Este ARNm sintético es transportado hasta las células diana por LNPs.
- Vacunas con vectores víricos. Dos vacunas representativas de esta tecnología son Jcovden™ desarrollada por Janssen y Vaxzevria™ generada por AstraZeneca. Este tipo de vacunas consiste en el uso de un virus modificado, generalmente un adenovirus, que contiene y transporta el gen para la formación de la proteína Spike en las células diana.
- Vacunas de subunidades peptídicas. Nuvaxovid™ desarrollada por Novavax, se basa en el uso de una versión de la proteína Spike.

Todas las vacunas recién mencionadas tienen en común el objetivo de que las APCs presenten, mediante MHCs, la proteína S al sistema inmune, generando las pertinentes respuestas inmunitarias contra esta.

- Vacunas de virus inactivado. El desarrollo de este tipo de vacunas se basa en la inactivación del virus. Entre los distintos ejemplos encontramos CoronaVac y Wuhan Sinopharm.

A continuación, se resumen las ventajas que ofrecen las vacunas de ARNm contra el SARS-Cov-2 con respecto al resto(34), (26):

- **Facilidad de obtención de una vacuna.** Esto viene dado a que una vez secuenciado el genoma del virus, y ubicado su antígeno patógeno, se puede desarrollar una molécula de ARNm sintético en un tiempo muy limitado. Un ejemplo de esto es la vacuna Spikevax, la cuál entró en la fase I de ensayos clínicos en tan solo 42 días tras la publicación de la secuencia genética del SARS-CoV-2.
- **Alto perfil de seguridad.** El ARNm mensajero una vez entra en la célula diana por endocitosis se traduce en el citoplasma y es consiguientemente degradado. Es decir, no se produce integración en el genoma de la célula diana.
- Habilidad de adaptar, velozmente, el diseño de la vacuna ante la aparición de **nuevas cepas** víricas.
- Potente cualidad **autoadyuvante**, lo que le confiere un alta inmunogenicidad. No precisa de la implicación de potentes coadyuvantes en su formulación, como es el caso de las vacunas peptídicas (Nuvaxovid).
- Contrariamente a las vacunas de virus inactivado (CoronaVac), no se precisan técnicas de cultivo e inactivación víricas. Dichas técnicas demoran el proceso de desarrollo de la vacuna.
- Se descarta la existencia de **inmunidad previa** al vector, situación inversa a la que nos encontramos con vacunas cuyo vector se trata de un adenovirus.

6.4.2. VIH

VIH o virus de la inmunodeficiencia humana es un virus perteneciente a la familia de los retrovirus, el cuál infecta células del sistema inmune (T CD4+, macrófagos y células dendríticas).

El VIH afecta aproximadamente a unos 38 millones de personas. Pese a la urgencia de encontrar una solución contra este virus, no se ha desarrollado ningún tratamiento efectivo. Este hecho es debido principalmente a la diversidad

antigénica que presenta la envoltura viral de dicho virus, y al escudo de glicanos que oculta los epítomos.⁽³⁵⁾

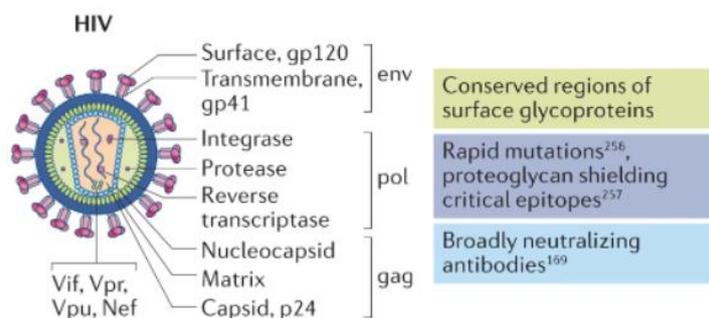


Figura 6. Estructura VIH ⁽²⁶⁾

Los tratamientos actuales para el VIH se basan en terapias antirretrovirales (TAR), estas no ofrecen una cura al infectado, sin embargo, brindan la posibilidad de controlar el virus y mejorar su calidad de vida.

La implementación de la tecnología de vacunas ARNm ha supuesto un punto de inflexión en la investigación de la lucha contra el VIH.

En marzo de 2022, la empresa biotecnológica Moderna, comunicó que se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase I de una vacuna de ARNm contra el VIH. En los ensayos clínicos de fase I que están aconteciendo, se pondrán a prueba distintas vacunas de ARNm⁽³⁶⁾: BG505 MD39.3 mRNA; BG505 MD39.3 gp151 mRNA, y BG505 MD39.3 gp151 CD4KO mRNA.

El objetivo de estas vacunas es codificar una determinada proteína antigénica del VIH en una molécula de ARNm. Esta molécula de ARNm, respaldada por un vector, se introducirá en el citoplasma de células diana (ej. células dendríticas). Una vez en el interior celular el ARNm se traducirá en la proteína objetivo, esta será presentada a células del sistema inmune a través del MHC.

Lo que convierte en idóneo el uso de tecnologías ARNm en el desarrollo de una vacuna contra el VIH es su perfil seguro y selectivo.

6.4.3. TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

El cáncer es la consecuencia de un crecimiento celular anormal en una o diversas partes del organismo.

Los tratamientos contemporáneos contra el cáncer incluyen radioterapia, quimioterapia e intervenciones quirúrgicas. A pesar de los avances implementados en estos tratamientos, son incapaces de ayudar a un significativo número de pacientes.⁽³⁷⁾

El desarrollo de vacunas de ARNm contra el cáncer siguen alguna de los siguientes objetivos en su desarrollo:

- La inmunización de los pacientes a través de una molécula de ARNm que lleve consigo un gen o genes codificados correspondientes a antígenos tumorales.
- Usar el ARNm con el fin de modificar el microambiente tumoral.

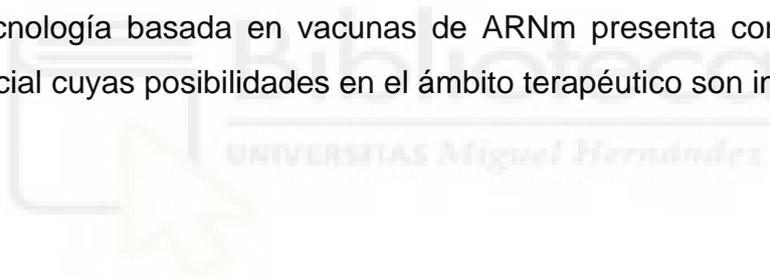
La selectividad sobre las células diana es una característica clave de las vacunas de ARNm, de especial relevancia en la aplicación de esta tecnología al ámbito tumoral. Mediante la secuenciación de las mutaciones específicas responsables de provocar el crecimiento celular anormal, se podría desarrollar una vacuna de ARNm específica para una o varias mutaciones.

Compañías biotecnológicas como la antes mencionada Moderna, trabajan en desarrollar tratamientos personalizados contra el cáncer.

Las únicas vacunas de ARNm comercializadas por el momento son Comirnaty (Pfizer/BioNTech) y Spikevax (Moderna). Las mencionadas en este apartado se hallan bajo estudio. Actualmente se estudia la aplicación de vacunas ARNm en otras enfermedades infecciosas o patologías, como son el Zika, Rabia, Gripe o enfermedades cardiovasculares, además de las desarrolladas en este apartado.

7. CONCLUSIONES

- La molécula de ARNm presenta un alto grado de inestabilidad y se debe encapsular para que ARNasas presentes en el torrente sanguíneo no la degraden. Actualmente los vectores más empleados en el desarrollo de vacunas ARNm se tratan de nanopartículas lipídicas catiónicas (LNPs).
- Las principales ventajas de las vacunas ARNm respecto a otras vacunas son:
 - Elevado carácter inmunogénico.
 - Facilidad de desarrollo a partir de la secuencia genética de la proteína antigénica.
 - Incapacidad de incorporarse en el genoma de la célula diana
 - Bajo coste de producción.
 - Alto nivel de biocompatibilidad.
- La tecnología basada en vacunas de ARNm presenta con un enorme potencial cuyas posibilidades en el ámbito terapéutico son innumerables.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Riedel S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Bayl Univ Med Cent Proc.* enero de 2005;18(1):21-5.
2. Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med.* 2005;11(Suppl 4):S5-11.
3. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 de agosto de 2014;111(34):12283-7.
4. González Díaz C, González Díaz C. Las formulaciones anti-COVID-19 con ácido ribonucleico mensajero en la clasificación general de las vacunas antivirales. *Rev Cuba Hig Epidemiol [Internet].* 2021 [citado 21 de abril de 2022];58. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1561-30032021000100018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
5. ¿Cómo se desarrollan las vacunas? [Internet]. [citado 17 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines/how-are-vaccines-developed>
6. Desarrollo de vacunas [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [citado 24 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%e2%80%9119/vacunas-contra-la-covid%e2%80%9119/desarrollo-de-vacunas/>
7. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* 1 de noviembre de 2012;9(11):1319-30.
8. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era—Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospecption. *Int J Mol Sci.* enero de 2020;21(18):6582.
9. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *Int J Genomics.* 8 de diciembre de 2016;2016:e2405954.

10. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* abril de 2018;17(4):261-79.
11. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 1 de noviembre de 2011;39(21):e142-e142.
12. Bettini E, Locci M. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond. *Vaccines.* 12 de febrero de 2021;9(2):147.
13. Kim SC, Sekhon SS, Shin WR, Ahn G, Cho BK, Ahn JY, et al. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency. *Mol Cell Toxicol.* 1 de enero de 2022;18(1):1-8.
14. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res.* 1 de abril de 1995;55(7):1397-400.
15. Körner CG, Wahle E. Poly(A) Tail Shortening by a Mammalian Poly(A)-specific 3'-Exoribonuclease *. *J Biol Chem.* 18 de abril de 1997;272(16):10448-56.
16. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* noviembre de 2008;16(11):1833-40.
17. Thess A, Grund S, Mui BL, Hope MJ, Baumhof P, Fotin-Mleczek M, et al. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol Ther.* 1 de septiembre de 2015;23(9):1456-64.
18. Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharm Med.* 2022;36(1):11-20.
19. Probst J, Weide B, Scheel B, Pichler BJ, Hoerr I, Rammensee HG, et al.

- Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* agosto de 2007;14(15):1175-80.
20. Jones KL, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *BioTechniques.* noviembre de 2007;43(5):675-81.
21. Zeng C, Zhang C, Walker PG, Dong Y. Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2 de junio de 2020;10.1007/82_2020_217.
22. Van Nuffel AMT, Benteyn D, Wilgenhof S, Corthals J, Heirman C, Neyns B, et al. Intravenous and intradermal TriMix-dendritic cell therapy results in a broad T-cell response and durable tumor response in a chemorefractory stage IV-M1c melanoma patient. *Cancer Immunol Immunother.* 1 de julio de 2012;61(7):1033-43.
23. Geall AJ, Mandl CW, Ulmer JB. RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin Immunol.* 1 de abril de 2013;25(2):152-9.
24. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics.* 28 de enero de 2020;12(2):102.
25. Moyo N, Vogel AB, Buus S, Erbar S, Wee EG, Sahin U, et al. Efficient Induction of T Cells against Conserved HIV-1 Regions by Mosaic Vaccines Delivered as Self-Amplifying mRNA. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 15 de marzo de 2019;12:32-46.
26. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* noviembre de 2021;20(11):817-38.
27. Ibba ML, Ciccone G, Esposito CL, Catuogno S, Giangrande PH. Advances in mRNA non-viral delivery approaches. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de octubre de 2021;177:113930.

28. Udhayakumar VK, De Beuckelaer A, McCaffrey J, McCrudden CM, Kirschman JL, Vanover D, et al. Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv Healthc Mater.* julio de 2017;6(13).
29. Kim J, Eygeris Y, Gupta M, Sahay G. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de marzo de 2021;170:83-112.
30. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol.* 1 de agosto de 2020;65:14-20.
31. Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D. mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Mol Ther.* 10 de abril de 2019;27(4):757-72.
32. Peng XL, Cheng JSY, Gong HL, Yuan MD, Zhao XH, Li Z, et al. Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. *Mil Med Res.* 16 de diciembre de 2021;8(1):67.
33. Información de vacunas autorizadas [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. [citado 24 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%e2%80%9119/vacunas-contra-la-covid%e2%80%9119/informacion-de-vacunas-autorizadas/>
34. Li M, Li Y, Li S, Jia L, Wang H, Li M, et al. The nano delivery systems and applications of mRNA. *Eur J Med Chem.* 5 de enero de 2022;227:113910.
35. Jones LD, Moody MA, Thompson AB. Innovations in HIV-1 Vaccine Design. *Clin Ther.* 2020;42(3):499-514.
36. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). A Phase 1, Randomized, Open-label Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of BG505 MD39.3, BG505 MD39.3 gp151, and BG505 MD39.3 gp151 CD4KO HIV Trimer mRNA Vaccines in Healthy, HIV-uninfected Adult Participants [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 abr [citado 22

de mayo de 2022]. Report No.: NCT05217641. Disponible en:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05217641>

37. Van Hoecke L, Verbeke R, Dewitte H, Lentacker I, Vermaelen K, Breckpot K, et al. mRNA in cancer immunotherapy: beyond a source of antigen. *Mol Cancer*. 3 de marzo de 2021;20(1):48.



ANEXO I. GLOSARIO

- **APC:** células presentadoras de antígenos.
- **ARCA:** del inglés anti-reverse cap analogs.
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- **ATP:** adenosín trifosfato.
- **CAP:** caperuza.
- **CD:** células dendríticas.
- **CPP:** péptidos de penetración celular
- **CTP:** citidina trifosfato.
- **dc ARN:** ARNm de doble cadena.
- **FDA:** food and drugs administration.
- **GOI (Figura 4):** gen de interés.
- **GTP:** guanosín trifosfato.
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia.
- **LNP:** nanopartículas basadas en lípidos.
- **MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad.
- **mod ARNm:** ARNm modificado.
- **PAMAM:** poliamidoamina.
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- **PEG:** polietilenglicol.
- **PEI:** polietilenimina.
- **Poly A:** referencia a la poliadenilación del extremo 3' del ARNm.
- **RALA:** péptido rico en arginina.
- **RIG I:** retinoic acid inducible gen
- **SARS-CoV-2:** coronavirus tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo.
- **Span™85 y Tween™80:** agentes emulsionantes.
- **TLR:** toll like receptor o receptores tipo toll
- **TTP:** timidina trifosfato.
- **UTR:** untraslated regions (regiones no traducidas).

ANEXO II. CÓDIGO OIR



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)

Elche, a 08 de abril del 2022

Nombre del tutor/a	MARTA GONZALEZ ALVAREZ
Nombre del alumno/a	LUCIA RODRIGUEZ
Tipo de actividad	1. Revisión bibliográfica (no incluye revisión de historias clínicas ni ninguna fuente con datos personales)
Título del 1. TFG (Trabajo Fin de Grado)	DISEÑO Y FORMULACIÓN DE VACUNAS ARNm
Código/s GIS estancias	
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Registro provisional	220408040338
Código de Investigación Responsable	TFG.GFA.MGA.LR.220408
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **DISEÑO Y FORMULACIÓN DE VACUNAS ARNm** ha sido realizada de manera automática en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere someterse a dicha evaluación. Dicha información se adjunta en el presente informe. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación