



Universidad  
de La Laguna



Facultad de Farmacia  
Universidad de La Laguna

# Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

Curso 2023/24

---

*Vacunas de ARN mensajero para  
enfermedades parasitarias:  
situación actual y perspectivas  
futuras*

---

Autor: Victoria Wiaderkiewicz Pisera

[Alu0101206530@ull.edu.es](mailto:Alu0101206530@ull.edu.es)

Tutora: Dra. Emma Carmelo Pascual

## Índice

---

Índice .....	2
Siglas y abreviaturas .....	3
Datos referidos a la memoria: .....	4
Resumen .....	5
Abstract.....	5
I.Introducción.....	6
II.Objetivos.....	12
III. Metodología .....	13
IV. Resultados y discusión .....	14
V. Conclusiones .....	27
VI. Bibliografía.....	28

## Siglas y abreviaturas

RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
OMS	Organización Mundial de la Salud
IVT	In Vitro
Cap	Capuchón
UTR	Región no traducida
ORF	Marco de lectura abierto
LNP	Nanopartículas lipídicas
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
PfCSP	Proteína circumsporozoíto de <i>Plasmodium falciparum</i>
Pb ANKA = PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-12p70	Interleucina-12 p70
IL-2	Interleucina-2
PfS25	Proteína de superficie de <i>Plasmodium falciparum</i>
SMFA	Ensayos estándar de alimentación por membrana
TRM	Células T de memoria residentes
OVA	Ovoalbúmina
GFP	Proteína Fluorescente Verde
Pfs230D1	Proteína de superficie de <i>Plasmodium falciparum</i> con dominio específico
SP	Péptido señal
TM	Dominio transmembrana
PMIF	Factor inhibidor de migración de macrófagos producido por <i>Plasmodium</i>
Thf	Células T foliculares
PbAWT	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA wild type
SARS-CoV2	Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2

### Datos referidos a la memoria:

---

Número de páginas de la memoria	<b>29</b>
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	<b>3492</b>
Número de palabras del resumen	<b>157</b>
Número de palabras del abstract	<b>140</b>

## Resumen

---

En los últimos años, la investigación en vacunas de RNA mensajero (RNAm) ha experimentado un avance significativo. Su diseño está estrechamente vinculado con la respuesta inmunitaria que logran desencadenar, por lo que resulta crucial obtener un antígeno adecuado que, combinado con el vehículo de transporte, genere una respuesta inmunológica sólida. Estas vacunas están siendo exploradas en diversas áreas, incluida la parasitología. En esta revisión, nos enfocaremos en su aplicación para prevenir la malaria. Esta enfermedad, causada por parásitos del género *Plasmodium*, provoca cientos de miles de muertes en todo el mundo y carece de una vacuna eficaz que la combata. Se abordará la situación actual en la investigación de vacunas de RNA mensajero, que se ve obstaculizada principalmente por la falta de antígenos de superficie útiles, la necesidad de dosis de refuerzo y la limitada respuesta humoral y celular del hospedador y se explorará también las perspectivas futuras que se proponen para obtener una formulación más eficaz.

**Palabras claves:** vacunas de RNA mensajero, malaria, *Plasmodium*.

## Abstract

---

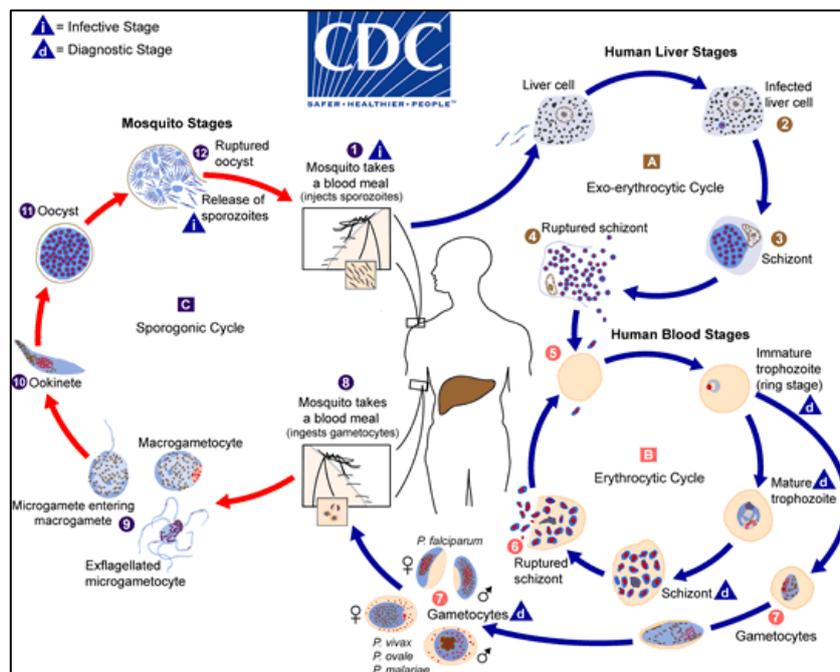
For the past few years, research on messenger RNA (RNAm) vaccines has experienced significant advances. Their design is closely linked to the immune response they can trigger, making it crucial to obtain an appropriate antigen that, when combined with the delivery vehicle, generates a robust immunological response. These vaccines are being explored in various areas, including parasitology. In this review, we will focus on their application in preventing malaria. This disease, caused by parasites of the genus *Plasmodium*, results in hundreds of thousands of deaths worldwide and lacks an effective vaccine. The current state of research on RNAm vaccines will be addressed, which is primarily hindered by the lack of useful surface antigens, the need for booster doses, and the limited humoral and cellular response of the host. Future perspectives for achieving a more effective formulation will also be explored.

**Keywords:** Messenger RNA vaccines, malaria, *Plasmodium*

## I. Introducción

Las enfermedades parasitarias afectan, según la OMS, a más de mil millones de personas en el mundo [1], concentrándose estas cifras en países en vías de desarrollo con bajo nivel socioeconómico y sanitario. Esto supone un freno para la inversión de recursos por parte de la industria farmacéutica y contribuye al aumento de resistencias de los tratamientos disponibles, que, frecuentemente, presentan una eficacia limitada. Es por ello por lo que se remarca la urgencia de encontrar un método efectivo para combatir estas enfermedades.

Por su alta prevalencia y mortalidad, con 608000 muertes en 2022, el 80% en niños menores de cinco años [2], la malaria será el foco principal de este análisis. La malaria es causada por varias especies diferentes del género *Plasmodium*, las cuales presentan un ciclo de vida complejo (Figura 1) que incluye una etapa sexual de replicación en los mosquitos y dos etapas asexuales en los vertebrados [3]. Los parásitos en etapa sanguínea desencadenan las manifestaciones clínicas de la enfermedad [3].



**Figura 1. Ciclo biológico de las especies del género *Plasmodium*. Extraído de [3].** Los esporozoitos son transmitidos al hospedador humano a través de la picadura de mosquitos *Anopheles* infectados. Estos se dirigen a las células hepáticas (1) donde maduran hasta la forma de esquizontes (2), para finalmente liberar

merozoitos (3 y 4). Tras este proceso, denominado esquizogonia exoeritrocítica, tiene lugar una multiplicación asexual en los eritrocitos, la esquizogonia eritrocítica. Los merozoitos infectan glóbulos rojos (5), posteriormente los trofozoítos en estadio de anillo maduran en esquizontes, liberando merozoitos tras su ruptura (6) [3].

La mayoría de las moléculas candidatas a vacunas contra la malaria están diseñadas contra los esporozoitos, con el objetivo de bloquear la entrada a las células hepáticas y evitar el desarrollo de la fase eritrocitaria (Tabla 1). Esto se debe a que, una vez que los merozoitos son liberados en sangre, se incrementa significativamente la carga parasitaria y se dificulta el control de la enfermedad [3].

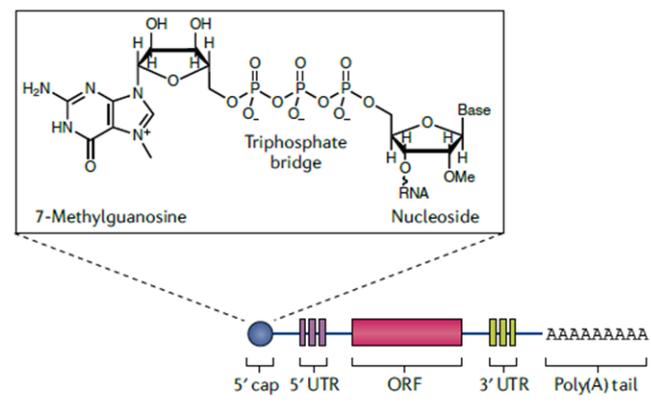
Vacuna	Compañía	Objetivo	Origen de los antígenos peptídicos	adyuvante	Respuesta inmunitaria	Fase de investigación
RTS,S/AS01E	GlaxoSmithKline Biologicals SA	Inhibe la infección por esporozoitos	Proteína circunsporozoica	AS01	Protección humoral y celular	Recomendado por la OMS
R21	Serum Institute of India (Pune, India)	Inhibe la infección por esporozoitos	Proteína circunsporozoica	Matrix-M	Protección humoral	Ensayo clínico en fase III
PfSPZ	Sanaria Inc.	Eliminación de hepatocitos infectados	Esporozoito completo	-	Protección humoral y celular	Ensayo clínico en fase II
PfSPZ-CVac	Sanaria Inc.	Eliminación de hepatocitos infectados	Esporozoito completo	-	Protección humoral y celular	Ensayo clínico en fase II

**Tabla 1. Principales características de las formulaciones de vacunas de esporozoitos. Modificado de [4].** Actualmente existen dos vacunas aprobadas para prevenir el paludismo en niños [5]. La primera, RTS, S/AS01, fue autorizada por la OMS en octubre de 2021. Los ensayos clínicos en fase 3 mostraron una eficacia media de la vacuna contra la malaria del 55,1%. A pesar de estos datos, se redujeron las admisiones hospitalarias graves en un 30% [4]. Recientemente, la vacuna R21/MM ha alcanzado el objetivo de la OMS de al menos un 75% de eficacia durante 12 meses en niños africanos menores de dos años que habían estado expuestos previamente a la malaria [4]. No obstante, estos datos se alejan de la realidad de una vacuna eficaz.

En definitiva, el complejo ciclo biológico unido a la falta de antígenos de superficie útiles [6] reflejan la complejidad del desarrollo de una vacuna efectiva.

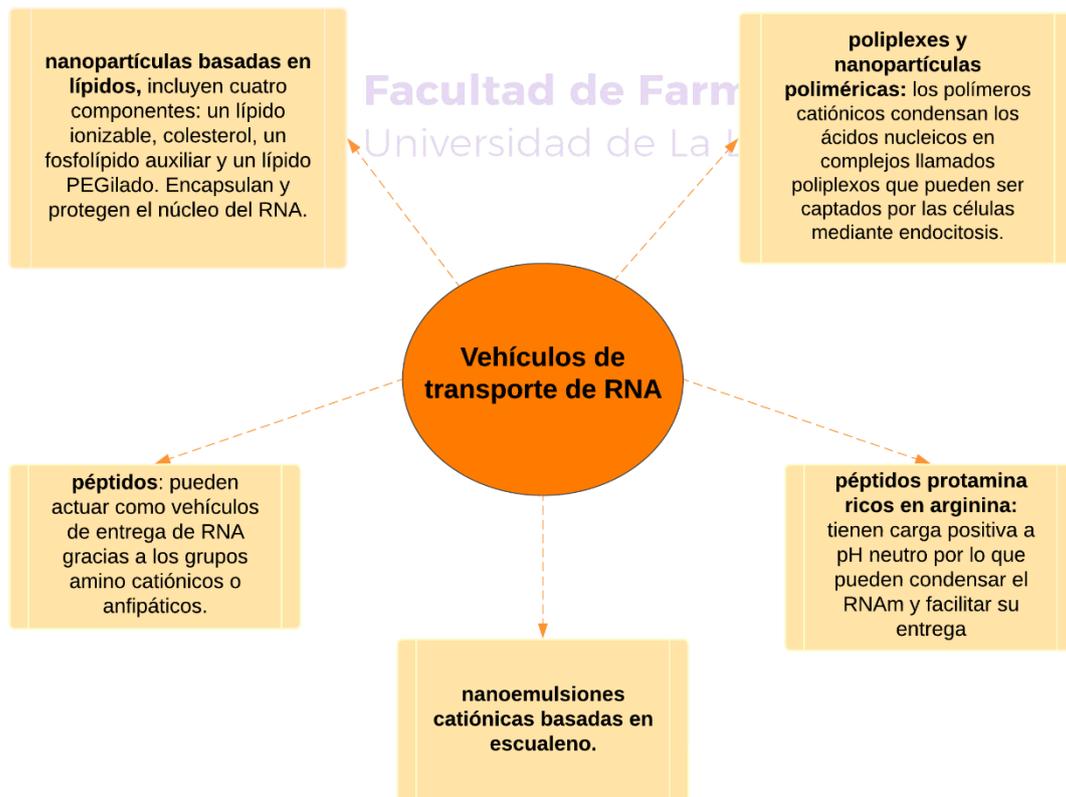
### a. Vacunas de RNA mensajero

El RNA mensajero es un ácido ribonucleico que desempeña un papel esencial en la síntesis de proteínas en las células. Esto ha sido aprovechado para el desarrollo de vacunas de RNA mensajero (RNAm), las cuales introducen información a la célula mediante moléculas sintéticas de RNAm (Figura 2), permitiendo así la producción del antígeno específico directamente en su interior [6], suponiendo una estrategia importante en el campo de la inmunización.



**Figura 2. Elementos estructurales del mRNA transcrito in vitro. Extraído de [6].** El RNAm transcrito in vitro (IVT) contiene cinco elementos estructurales: un cap 5' que contiene 7-metilguanósina unida a través de un puente trifosfato a un nucleósido 2'-O-metilado, regiones no traducidas (UTRs) flanqueando en 5' y 3', un marco de lectura abierto (ORF) y una cola de poli(A), imitando así la estructura del RNA endógeno [6].

El paso de esta molécula de RNAm sintético a través de la bicapa lipídica aniónica de las membranas celulares se ve dificultado por su gran tamaño (104-106 Da) y su carga negativa [6]. Por ello, resulta indispensable encontrar un vehículo adecuado que permita su transporte hasta las células, destacando, especialmente, el uso de nanopartículas basadas en lípidos (LNP) (Figura 3).

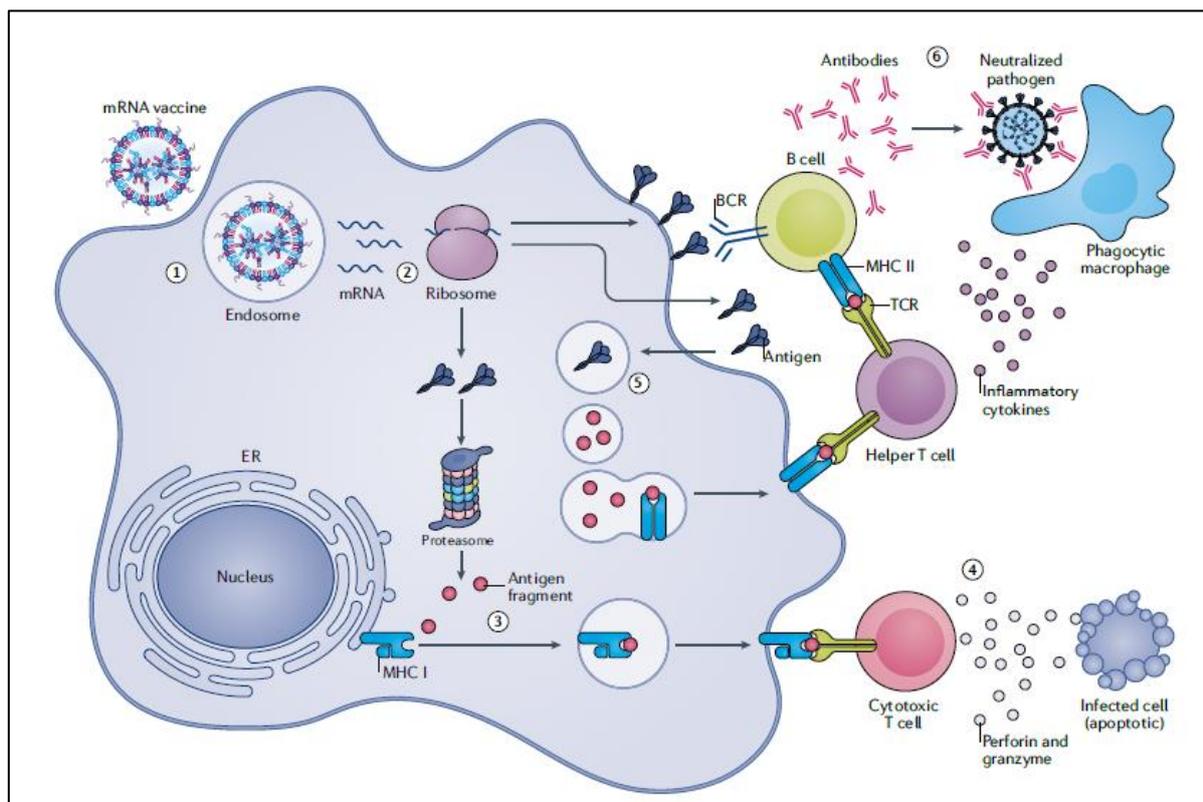


**Figura 3. Vehículos de transporte de RNA. Elaborado a partir de [6].** Se recogen los principales vehículos de transporte de RNA utilizados para la fabricación de vacunas. Las nanopartículas lipídicas (LNP) son la estrategia más avanzada clínicamente [6]. De hecho, las vacunas de RNAm para el COVID-19 fueron diseñadas a partir de LNP. En segundo orden de importancia encontramos los poliplexes y nanopartículas poliméricas, aunque menos estudiadas clínicamente, que muestran un resultado similar al obtenido con el uso de LNP. Por último, los péptidos y nanoemulsiones catiónicas basadas en escualeno también permiten condensar el RNA y transportarlo hasta las células [6].

En consecuencia, para obtener una vacuna de RNAm óptima, no solo es necesario seleccionar el antígeno idóneo, sino que es crucial garantizar una combinación viable y eficiente con el vehículo de transporte.

### **b. Funcionamiento de una vacuna de RNAm**

Para comprender los avances más recientes en vacunas de RNAm, es necesario conocer su mecanismo de acción (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismo de acción de una vacuna de RNAm. Extraído de [6].** (1) Endocitosis de la vacuna por células presentadoras de antígenos. (2) Salida del RNAm del endosoma al citosol y traducción por los ribosomas de la célula huésped en proteínas antigénicas. (3) Degradación en fragmentos más pequeños por el complejo proteosomal. Además, los fragmentos se muestran a las células T citotóxicas mediante proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. (4) Las células T citotóxicas activadas eliminan las células infectadas al secretar moléculas citolíticas, como perforina y granzima. (5) También puede ocurrir que los antígenos secretados sean captados por las células, degradados dentro de los endosomas y presentados en la superficie celular a las células T auxiliares mediante proteínas del MHC de clase II. (6) En este caso, las células T auxiliares facilitan la eliminación de patógenos circulantes estimulando a las células B para que produzcan anticuerpos neutralizantes, y activando a los fagocitos, como los macrófagos, mediante citoquinas inflamatorias [6].

Aunque el éxito de las vacunas de RNAm contra el COVID-19 ha abierto una nueva línea de investigación que pretende hacer frente a nuevos patógenos, existen ventajas e inconvenientes (Tabla 2) que deben ser considerados.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• no se integran en el genoma</li> <li>• producción rápida, rentable y escalable</li> <li>• presenta la posibilidad de codificar múltiples antígenos y flexibilidad para realizar modificaciones</li> <li>• el individuo no se expone a la forma activa o infecciosa del agente patógeno</li> <li>• inducción rápida de la respuesta inmunitaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dificultad para identificar antígenos específicos</li> <li>• formulación adecuada de vehículos de transporte</li> <li>• naturaleza frágil del RNA</li> <li>• duración de la respuesta inmunitaria limitada</li> <li>• toxicidad intrínseca asociada a ácidos nucleicos</li> </ul>

**Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de vacunas de RNAm. Elaborado a partir de [6] y [7].** Entre las ventajas descritas encontramos que no se integran en el genoma, destacando así su seguridad frente a las formulaciones de ADN [7]. No obstante, aunque las ventajas expuestas suponen notables avances, los inconvenientes resaltan elementos como la toxicidad intrínseca asociada a ácidos nucleicos que podría desencadenar una respuesta excesiva por parte del sistema inmune [7] o la naturaleza frágil del RNA que dificulta la estabilidad de la formulación [6].

## II. Objetivos

---

El objetivo principal de este trabajo es analizar la situación actual y futura de la investigación en vacunas de RNAm para enfermedades parasitarias, concretamente frente a la malaria. Para ello se plantean dos objetivos específicos:

- Realizar una revisión bibliográfica de los avances científicos actuales acerca de las vacunas de RNAm para el control de la malaria
- Analizar las perspectivas futuras de la aplicación de esta tecnología para el control de esta enfermedad parasitaria.

### III. Metodología

Se realiza una búsqueda rigurosa y sistemática en *Pubmed* utilizando términos específicos como “*RNA vaccine*”, “*malaria*” y “*not COVID*” (Figura 5). Asimismo, se establecen criterios de inclusión y exclusión (Tabla 3) que acotan los resultados obtenidos:

#### Criterios de inclusión y exclusión

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Idioma: inglés o español</li> <li>• Texto completo disponible</li> <li>• Entre 2018 y 2024</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se excluyen publicaciones enfocadas en COVID-19.</li> </ul>
--	--

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión aplicados para realizar la búsqueda.

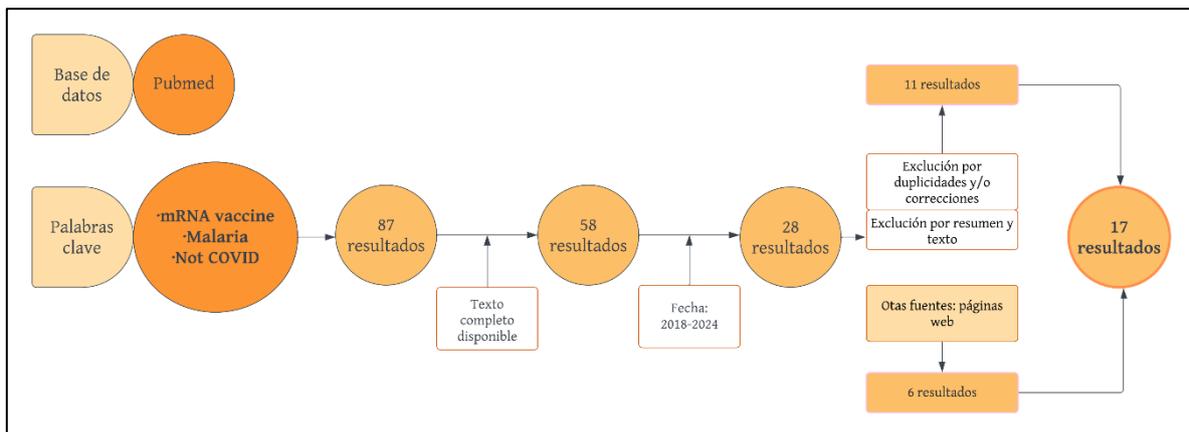


Figura 5. Diagrama de flujo de estrategias de búsqueda. Consultado en abril de 2024. Realizado con LucidChart.

Además, también se consulta la web estadounidense de ensayos clínicos, ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>), la web de la Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/es>) y la del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (<https://www.cdc.gov/>) para complementar la búsqueda.

## IV. Resultados y discusión

---

En los últimos años, haber hecho frente a la pandemia de COVID-19 nos ha revelado el potencial de las vacunas de RNAm, incluyendo su posible papel para combatir la malaria. Encontrar una vacuna eficaz, segura y fácil de administrar supondría combatir las devastadoras cifras presentadas al inicio de este trabajo. Es por ello que actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios destinados a evaluar la seguridad y eficacia de varios candidatos vacunales [6] [8].

### 1. Situación actual de la investigación de vacunas frente a malaria basadas en RNAm

En la actualidad no existe ninguna vacuna de RNAm destinada a malaria que esté aprobada para uso humano, aunque hay dos ensayos clínicos en ejecución.

- BNT165-b1

Este estudio ensaya una vacuna ARN-LNP que codifica parte de la proteína circunsporozoíto de *Plasmodium falciparum* (PfCSP) [9]. Se trata de un estudio multicéntrico en fase I dirigido por BioNTech SE que tiene como objetivo evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de los componentes de la vacuna en tres niveles de dosis y en tres dosis diferentes [9].

Se procedió a la segmentación de pacientes, con edades entre 18 y 55 años y sin patologías previas, en tres cohortes y se realizó una asignación aleatoria siguiendo una proporción de 4:1 entre la administración de BNT165b1 y placebo dentro de cada cohorte. No se incluyó en el estudio ningún paciente que hubiera tenido infección por malaria o viajado a regiones endémicas de malaria [9]. Por lo tanto, se trata de un estudio aleatorizado, de dosis creciente y triple ciego cuyos resultados aún no han sido publicados.

- BNT165e

El segundo ensayo clínico también se encuentra dirigido por BioNTech SE. Se trata de un ensayo aleatorizado y con evaluación ciega por terceros, de fase I / IIa de aumento de dosis cuyo objetivo es evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de una vacuna que combina tres RNA diferentes (BNT165c y BNT165d (compuesto a su vez por BNT165d1 y BNT165d2)) encapsulados en LNP, que codifican antígenos de *P. falciparum*. Los compuestos BNT165d codifican segmentos inmunogénicos conservados de proteínas expresadas en etapa hepática mientras que BNT165c codifica el total de proteína circumsporozoíto de *P. falciparum* [10].

Se administra en nueve combinaciones de dosis, en un régimen de 3 dosis de los 3 componentes citados anteriormente, asignados al azar 5:1 (activo: placebo) [10]. En este caso, además, se estudian los niveles de anticuerpos, inmunoglobulinas G-anti-CSP hasta 365 días después de la tercera dosis [10]. Hasta el momento no se han publicado los resultados de estos ensayos clínicos.

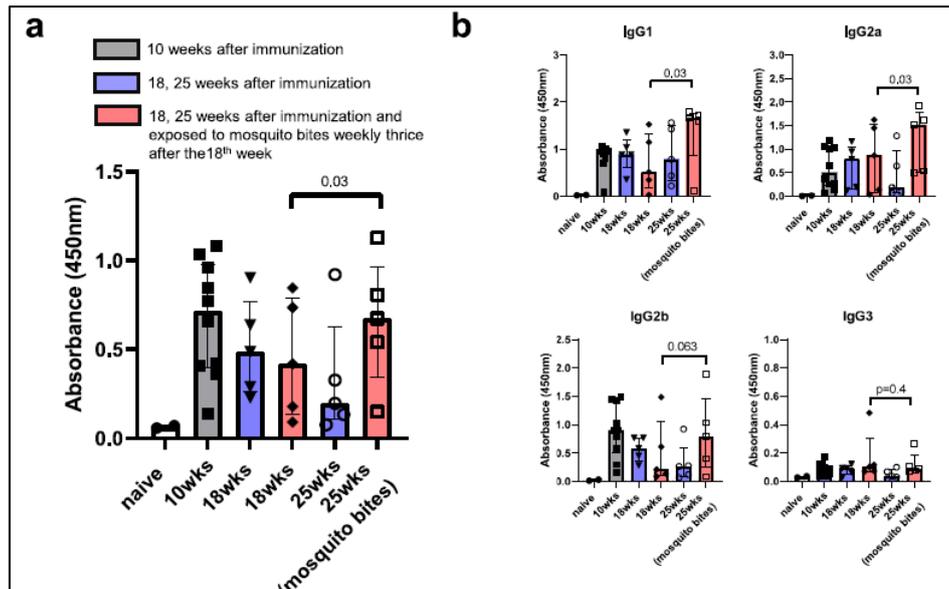
En paralelo, distintos estudios basados en tecnologías innovadoras han impulsado nuevas investigaciones. Esto ha abierto un abanico de frentes en la búsqueda de vacunas de RNA, ampliando así las estrategias de abordaje contra esta enfermedad. A continuación, se exponen algunos de los estudios más relevantes:

#### **a. AgTRIO mRNA-LNP**

Este ensayo preclínico con modelos murinos enfoca una posible vacuna de RNA dirigida hacia una proteína presente en la saliva de los mosquitos *Anopheles*: AgTRIO. Esta genera anticuerpos que disminuyen la infección por malaria tanto en un modelo de ratón tradicional como en un modelo de ratón humanizado [11].

Se formuló mediante una LNP con un ARNm codificante de la proteína de saliva de mosquito AgTRIO. Se inmunizó a ratones C57BL/6 y se observó una disminución en la carga inicial de *Plasmodium* en el hígado del 68% en comparación con el grupo control y en la parasitemia subsiguiente [11].

Además, se observó que las picaduras de mosquito pueden mantener anticuerpos IgG específicos de AgTRIO, después de la inmunización con AgTRIO mRNA-LNP (Figura 6) [20]. Esto confiere ventajas a la hora de la administración de una dosis de refuerzo, de manera que, en áreas endémicas de malaria, la exposición persistente al vector podría aumentar y mantener los anticuerpos de AgTRIO en individuos vacunados con AgTRIO mRNA-LNP [11].



**Figura 6. Inmunización por de picaduras de mosquitos.** Extraído de [11]. En la imagen se representan grupos de ratones que fueron inyectados con 10  $\mu$ g de AgTRIO RNAm-LNP o RNAm de control (Gluc mRNA-LNP) y reforzado dos veces en 4 semanas. Se representa en azul el grupo de ratones que no fue expuesto a picaduras de mosquitos y en rojo aquellos que fueron expuestos a picaduras de mosquitos semanalmente después de la décimo-octava semana. **a)** Se examinan sueros diluidos 1:2.500 para determinar los anticuerpos totales específicos IgG contra AgTRIO mediante ELISA. A las 18 semanas del inicio del estudio, 14 semanas después de la última inmunización de refuerzo, los títulos de IgG contra AgTRIO habían disminuido aproximadamente en un 40% en comparación con las 10 semanas después del inicio de los experimentos. Para demostrar la inmunización tras las picaduras de los mosquitos, un grupo de ratones fue expuesto a 10 picaduras semanales de mosquitos no infectados durante 3 semanas y el grupo de control de ratones no fue expuesto a AgTRIO. Como resultado, la concentración de IgG anti-AgTRIO aumentó notablemente en el grupo expuesto a las picaduras de mosquito, mientras que los niveles de IgG continuaron disminuyendo en el grupo de control. **b)** Se utilizan sueros diluidos para determinar anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b específicos de AgTRIO. Se observó un aumento significativo de IgG1 e IgG2a específicos de AgTRIO después de las picaduras de mosquito [11].

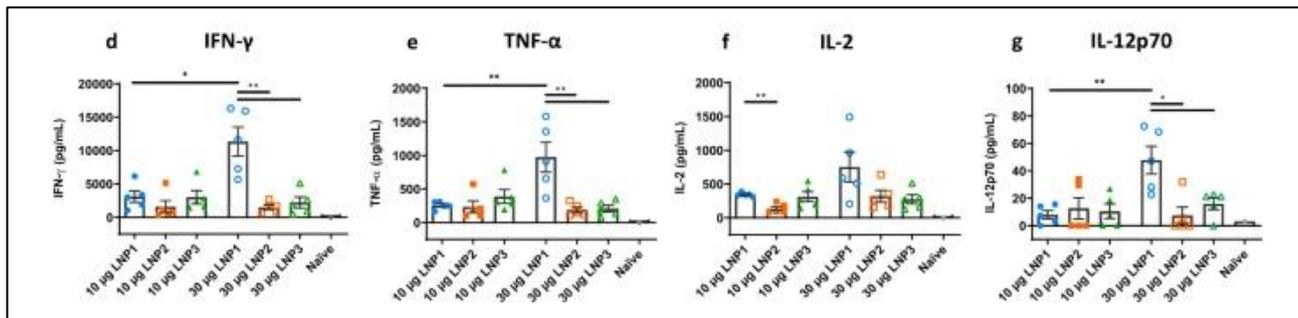
En resumen, se demostró que AgTRIO RNAm-LNP reduce de manera significativa la infección por *Plasmodium* en ratones, generando incluso anticuerpos del tipo IgG2a. Además, los anticuerpos pueden ser potenciados a través de las picaduras de los

mosquitos, al contener la proteína AgTRIO en la saliva, valorando la posibilidad de omitir una dosis de refuerzo [11].

**b. Vacuna RNAm-LNP dirigida al antígeno *PfCSP***

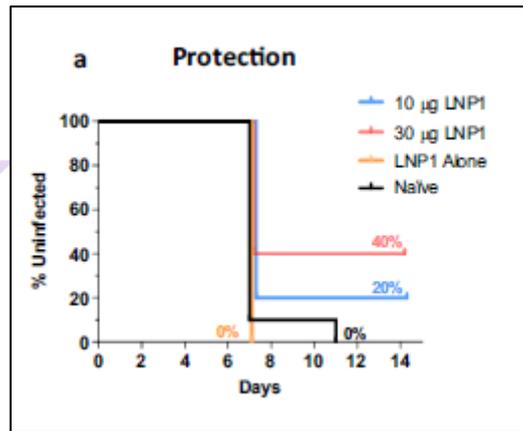
En este nuevo estudio, la metodología aplicada incluyó métodos *in vitro* para evaluar la expresión de proteínas en células de mamíferos transfectadas con ARNm de *PfCSP* y una posterior encapsulación en LNP para su investigación *in vivo*. En consecuencia, se descubrió que las proteínas *PfCSP* traducidas se expresan bien en células de mamíferos y que el ARNm-LNP de *PfCSP* es altamente inmunogénico [12].

El RNAm de *PfCSP* se encapsuló en LNP incorporando tres lípidos diferentes propiedad de Acuitas Therapeutics: LNP1, LNP2 y LNP3, para proteger el RNAm de *PfCSP* de las ribonucleasas extracelulares, facilitar la captación celular eficiente a través de la endocitosis y para proporcionar actividad adyuvante que estimula las células T foliculares auxiliares [12], resultando ARNm-LNP1 de *PfCSP* la mejor combinación por su rendimiento y resultados de inmunogenicidad en ratones BALB/c (Figura 7).



**Figura 7. *PfCSP* mRNA-LNP induce potentes respuestas de citocinas. Extraído de [12].** Para explorar un régimen de dosis única y un intervalo extendido entre dosis de ARNm de *PfCSP* (TriLink), se inmunizaron ratones BALB/c una vez con una dosis de 10 o 30 μg de ARNm-LNP de *PfCSP* en un período de 3 semanas. El grupo de alta dosis de LNP1 logró concentraciones significativamente más altas de IFN-γ, TNF-α e IL-12p70 en comparación con los grupos de alta dosis de LNP2 y LNP3. El grupo de baja dosis de LNP1 tuvo respuestas de IL-2 significativamente más altas en comparación con el grupo de baja dosis de LNP2 [12].

Además, se logró protección a corto plazo con dosis altas y bajas de *PfCSP* mRNA-LNP1 (TriLink), con una eficacia del 40% y 20% respectivamente, contra una infección letal de roedores con esporozoitos transgénicos de Pb-*PfCSP* (Figura 8) [12].



**Figura 8. *PfCSP mRNA-LNP1* induce protección en ratones BALB/c. Extraído de [12].** Se probó un régimen de primer refuerzo de 10 µg y 30 µg de *PfCSP mRNA-LNP1* (TriLink) con un intervalo de 3 semanas en un experimento de desafío transgénico Pb (ANKA)-*PfCSP* [12].

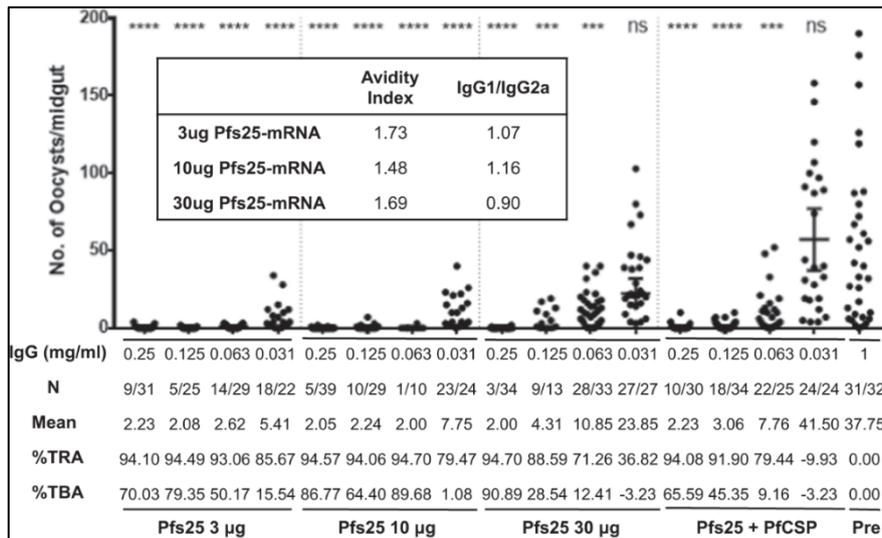
Finalmente, se demostró que una única dosis "prime" alta de *PfCSP mRNA-LNP* (TriLink) indujo respuestas medibles pero insuficientes para provocar los altos niveles de anticuerpos funcionales y respuestas celulares detectadas en los grupos vacunados dos veces [12], resaltando la necesidad de dosis de refuerzo.

### c. Vacuna RNAm-LNP dirigida a los antígenos *Pfs25* y *PfCSP*

En el contexto de este nuevo estudio se busca evaluar la inmunogenicidad de dos de las principales dianas, *Pfs25* y *PfCSP*, formuladas como vacunas de RNAm-LNP modificadas con nucleósidos y explorar la viabilidad de la co-inmunización utilizando dos construcciones de ARNm-LNP a diferentes dosis para generar inmunidad frente a los parásitos de la malaria en distintas fases del ciclo biológico [13].

Para evaluar las respuestas de anticuerpos frente a *Pfs25* y a *PfCSP*, se administraron varias dosis (3, 10 y 30 µg) de *Pfs25 mRNA-LNPs* y *PfCSP mRNA-LNPs* respectivamente a ratones BALB/c [13]. Se observó que tanto *Pfs25 mRNA-LNPs* como *PfCSP mRNA-LNPs* inducen títulos elevados de anticuerpos dependientes de la dosis. Además, resultó que la co-inmunización con *Pfs25* y *PfCSP mRNA-LNP* no comprometía las respuestas de anticuerpos [13].

También se observó que *Pfs25 mRNA-LNPs* induce potentes anticuerpos bloqueantes de la transmisión del parásito a diferentes dosis (Figura 9), incluyendo rangos desde 0,1  $\mu\text{g}$  [13]. Para ello, se estudió el suero de ratones inmunizados tres veces con 3  $\mu\text{g}$  y 10  $\mu\text{g}$  de RNAm de *Pfs25-LNP*, mientras que los grupos de ARNm de *Pfs25-LNP* de 30  $\mu\text{g}$  y (*Pfs25 + PfCSP*) ARNm-LNP combinados se evaluaron después de cuatro inmunizaciones [17].



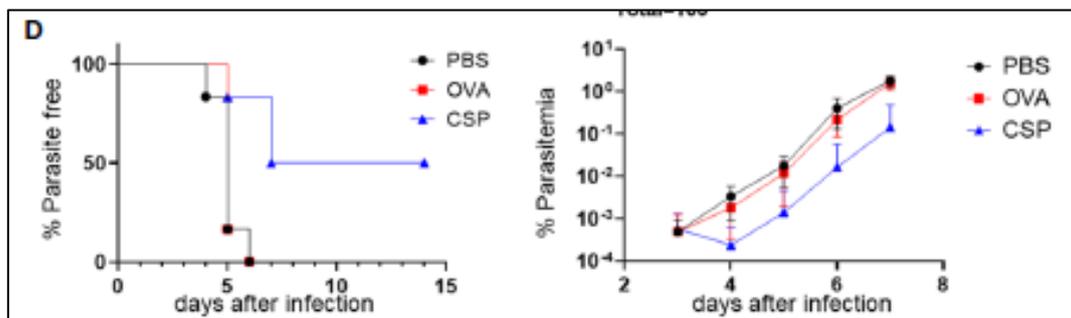
**Figura 9. Actividad reductora de la transmisión parasitaria de anticuerpos inducidos por *Pfs25 mRNA-LNPs*.** Extraído de [13]. Las IgG purificadas se evaluaron en ensayos estándar de alimentación por membrana (SMFA) de mosquitos a las concentraciones finales indicadas (0,25, 0,125, 0,63 y 0,031 mg/ml). El recuadro muestra las relaciones de isotipo IgG1/IgG2a y el índice de avidez de anticuerpos para los sueros evaluados mediante SMFA [13].

Se demostró que el uso de la plataforma RNAm-LNP con los antígenos *Pfs25* y *PfCSP* es altamente eficaz en la obtención de inmunogenicidad protectora. También que el uso de RNAm-LNP de *Pfs25* logró una actividad funcional potente tanto con dosis bajas como con regímenes cortos de refuerzo [13]. Se destaca además que las co-inmunizaciones no presentan consecuencias negativas para las respuestas de anticuerpos [13].

**d. Inducción de células T residentes de memoria en el hígado y protección frente a la malaria en fase hepática mediante nanopartículas lipídicas que contienen RNAm.**

Las células T de memoria residentes en el hígado, CD8<sup>+</sup> (TRM), juegan un papel importante en la protección contra la malaria en la etapa hepática. En este estudio se utilizó RNAm-LNP para inmunizar ratones BALB/c con RNAm de proteína circunsporozoito (CSP) de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), con el objetivo de conseguir una inducción potente de células CD8<sup>+</sup> específicas para la etapa hepática [14].

Los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intramuscular con CSP RNAm-LNP dos veces con intervalos de 3 semanas. Como control negativo, otro grupo de ratones se inmunizó con ovoalbúmina (OVA) RNAm-LNP. La proporción de células T CD8<sup>+</sup> específicas de CSP aumentó significativamente en los hígados de los ratones inmunizados con CSP RNAm-LNP 33 días después de la última inmunización [14]. Un mes después de la segunda inmunización, se administró a los ratones 200 esporozoitos PbA que expresaban GFP (PbA-GFP), obteniendo como resultado que la mitad de los ratones (3/6) mostraron inmunidad esterilizante y retraso de dos días en la etapa sanguínea con respecto a los ratones de control negativo (Figura 10) [14].



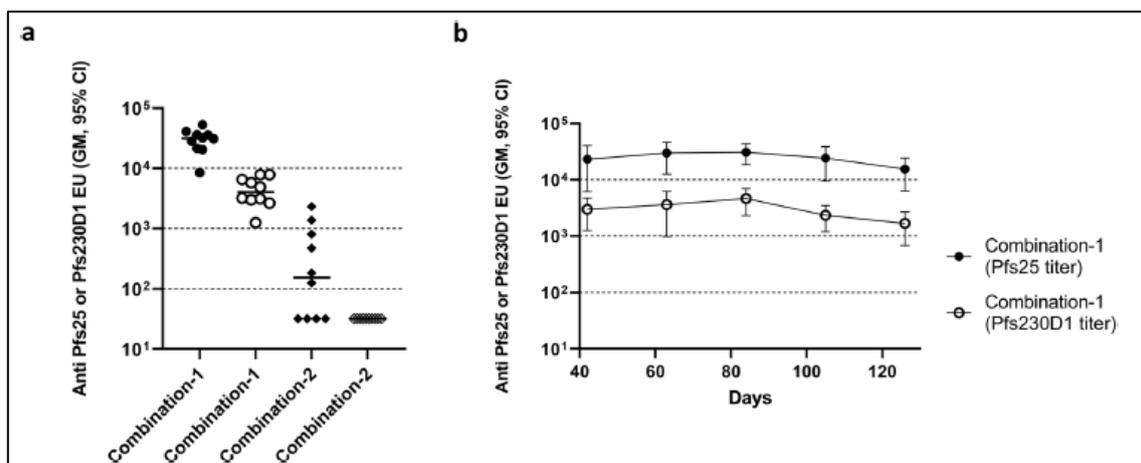
**Figura 10.** La inmunización con CSP RNAm-LNP resultó en inmunidad esterilizante en algunos ratones o en un retraso del desarrollo de la etapa sanguínea en otros. Extraído de [14]. En la izquierda se muestra la proporción de ratones no infectados. En la derecha se muestra la parasitemia 3-7 días después de la infección. El grupo CSP mostró una parasitemia más baja en comparación al grupo PBS a partir del día 3 día y con el grupo OVA a partir del día 6 después de la infección [14].

En conclusión, se observó que las inmunizaciones con RNAm-LNP que codifican CSP de *P. falciparum* (PfCSP) protegen sustancialmente contra las infecciones causadas por esporozoitos transgénicos de *P. berghei* que expresan PfCSP. Se destaca también el papel

crucial de las células CD8+ en la protección frente a infecciones por esporozoítos [14]. No obstante, la falta de inmunidad estéril completa se justifica con la posibilidad de un número insuficiente de células TRM específicas de la CSP o una baja función en las células TRM inducidas por las RNAm-LNPs [14].

**e. Vacunas de RNAm que expresan antígenos *Pfs25* y *Pfs230D1* con modificaciones que inducen respuesta inmune**

Se evaluaron *in vitro* construcciones de ARNm de *Pfs25* y *Pfs230D1* que incorporaban diversas modificaciones, como péptidos señal (SP), anclajes GPI y dominio Trans-Membrana (TM), y se seleccionaron para su evaluación en ratones. Solo las que portaban anclaje GPI o dominio TM resultaron en una alta expresión antigénica en la superficie celular, generando respuestas inmunitarias fuertes en ratones (Figura 11) [15].



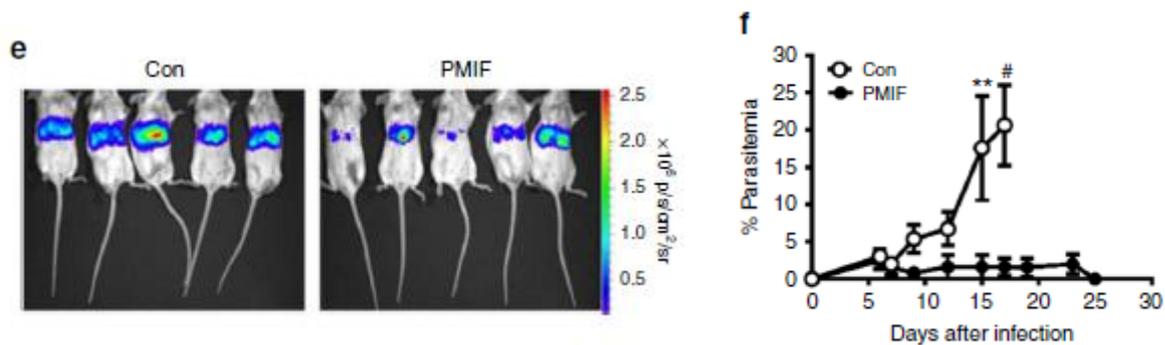
**Figura 11. Combinaciones de ARNm de *Pfs25* y *Pfs230D1* que codifican la expresión superficial de los antígenos. Extraído de [15].** La Combinación-1 consiste en ARNm de *Pfs25*-TM y ARNm de *Pfs230D1*-TM. Produjo altos títulos de anticuerpos contra *Pfs25* y *Pfs230D1*. La Combinación-2 comprende ARNm con SP solo (ARNm de *Pfs25*-SP + ARNm de *Pfs230D1*-SP). Esta, en cambio, mostró niveles bajos de respuesta de anticuerpos (figura a). En la figura b se puede observar como las respuestas de anticuerpos contra ambos antígenos, inducidas por la Combinación-1, persistieron hasta el día 126 sin disminución significativa [15].

En resumen, la unión de dominios TM favorece la respuesta inmunitaria en ratones, resaltando el ARNm de *Pfs25* en comparación con el ARNm de *Pfs230D1* [15].

**f. Vacunas frente al factor inhibidor de migración de macrófagos producido por *Plasmodium* (PMIF)**

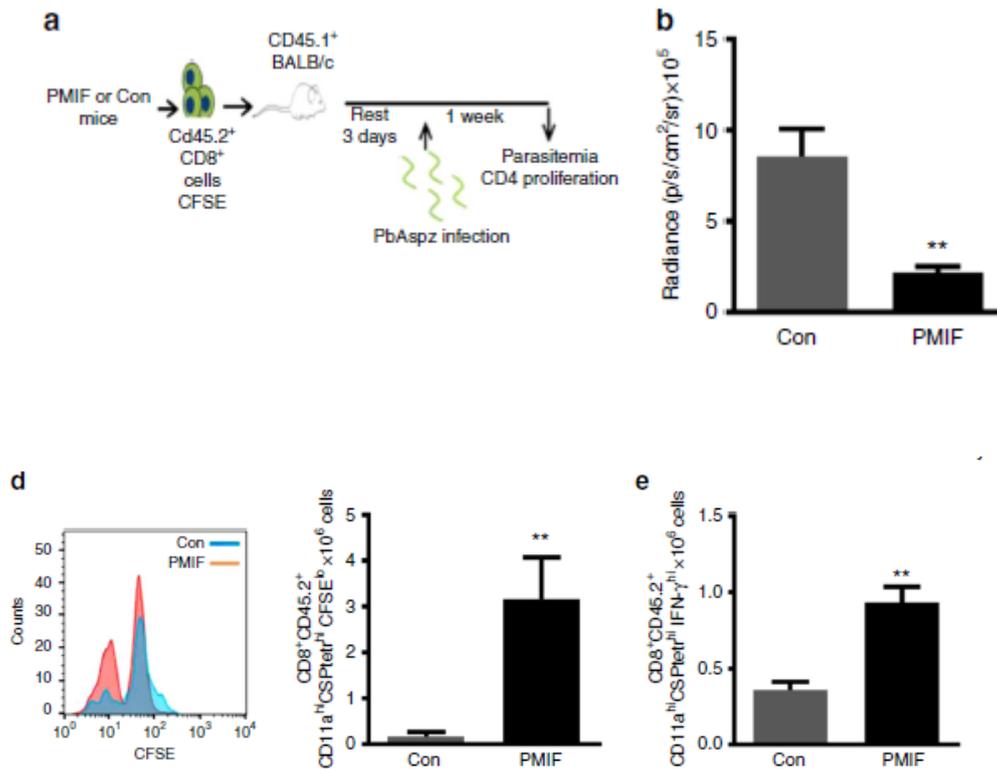
Se ha observado que el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) está involucrado en la respuesta inmune y el desarrollo del parásito de la malaria en el hígado [16]. PMIF se secreta en los eritrocitos infectados y se libera tras la ruptura del esquizonte, provocando una respuesta inflamatoria que interfiere en la diferenciación de células efectoras T-CD4+ específicas de *Plasmodium* [16].

En el estudio, ratones BALB/c infectados con *P. berghei* fueron sometidos a inmunizaciones con una vacuna basada en un replicón de RNA autoamplificante que expresa PMIF, mostrando un aumento en las respuestas de células Tfh y en los centros germinales, resultando así en mayores títulos de anticuerpos contra *Plasmodium*; una mejor diferenciación de células T-CD4 efectoras en precursores de memoria y un mejor control de la infección hepática y sanguínea con una mayor diferenciación de células T CD8 residentes en el hígado y células T CD4 de memoria en ratones vacunados. (Figura 12) [16].



**Figura 12. Diferencia entre la carga hepática de ratones control y ratones inmunizados. Extraído de [16].** Se estudia el efecto de PMIF en la etapa preeritrocítica de *Plasmodium* inmunizando ratones con replicones de RNA de PMIF o control, seguido de la inyección intravenosa de 2000 esporozoitos de PbA que expresan luciferasa (PbAluc). Por un lado, se observa una disminución del 65% en la carga hepática en los ratones inmunizados con ARN de PMIF a las 48 horas después de la infección (e). Por otro lado, ambos grupos de ratones desarrollaron una infección en la etapa sanguínea, no obstante, los ratones de control mostraron un rápido aumento en la parasitemia mientras que en los ratones inmunizados con RNA de PMIF, la parasitemia no superó el 2% (f) [16].

Además, la respuesta aumentada de células T CD8 hepáticas que se desarrolla en ratones infectados después de la inmunización con ARN de PMIF es suficiente para prevenir el establecimiento de la infección por esporozoitos de *Plasmodium* (Figura 13) [16].



**Figura 13. La inmunización con RNA de PMIF protege parcialmente a los ratones de la infección con esporozoitos y protege completamente de la reinfección cuando los ratones inicialmente infectados son curados con tratamiento de cloroquina. Extraído de [16].** Tras realizar una transferencia adoptiva de  $2 \times 10^7$  células T CD8 hepáticas de ratones inmunizados CD45.2 después de la segunda infección para evaluar la significancia funcional de esta población expandida de células T específicas del CSP y esperar tres días, se infectan ratones receptores CD45.1 Balb/cj con 2000 esporozoitos de PbAWT para evaluar el desarrollo de la infección y la respuesta de células T CD8 (a) [16]. El nivel de parásitos hepáticos se redujo significativamente a las 48 horas en los ratones que recibieron células T CD8 hepáticas de los anfitriones inmunizados con RNA de PMIF en comparación con aquellos inmunizados con el replicón de RNA de control (b). La protección conferida por la transferencia adoptiva de células T CD8 hepáticas de los ratones inmunizados con RNA de PMIF estuvo asociada con un mayor número de células T CD8 específicas del CSP en proliferación que producían IFN $\gamma$  (d y e) [16]

Destacamos, de esta manera, que la neutralización del PMIF mediante una vacuna basada en un replicón de ARN autoamplificante puede generar una respuesta inmune protectora significativa contra el parásito [16].

Tras haber expuesto los estudios más significativos en el desarrollo de vacunas de RNAm contra malaria, nos enfocaremos en las perspectivas futuras que surgen a partir de los resultados obtenidos y las limitaciones que se identifican en la investigación actual.

## **2. Perspectivas futuras de la investigación de vacunas frente a malaria basadas en RNA mensajero**

El significativo impacto generado por las vacunas de RNAm contra el SARS-CoV2 ha impulsado nuevas investigaciones en numerosas áreas. No obstante, y a la vista de los estudios presentados, el proceso para conseguir una vacuna eficaz contra la malaria está lejos de concluir. A continuación, describimos qué aspectos son limitantes y qué sería interesante incluir en el foco de futuras investigaciones.

En primer lugar, resaltamos los factores intrínsecos del parásito, como el complejo ciclo biológico, que dificulta la obtención de un antígeno o diana eficaz, o los mecanismos de evasión inmunológica, estrechamente relacionados, que explican la diversidad antigénica, las mutaciones y variabilidad genética de las proteínas de superficie [6]. A este conjunto, cabe añadir la importante resistencia a fármacos descrita en los últimos años.

En segundo lugar, encontramos los factores dependientes del sistema inmune del hospedador. El problema principal al que tenemos que hacer frente es la corta duración de la respuesta humoral y celular. Este hecho requiere de la administración de dosis de refuerzo, poco compatibles con los factores poblacionales que se describen en las zonas endémicas. Es por ello por lo que el enfoque presentado por Chuang *et al* [11] en el que la exposición a picaduras de mosquitos no infectados mantiene la respuesta humoral durante más tiempo, constituye un avance prometedor. Asimismo, es importante señalar que la población más afectada por la malaria está compuesta por gestantes y niños, quienes se caracterizan por presentar un sistema inmunológico debilitado, una variable que complica el desarrollo de la formulación.

Además, tal y como se describió en el inicio de la memoria, encontrar un vehículo de transporte adecuado es indispensable para una correcta formulación, ya que permite que el RNAm llegue a la célula y se traduzca en proteínas antigénicas, que son las que, a su vez, darán lugar a la respuesta inmune específica [7]. Actualmente existen numerosas estrategias dedicadas al estudio y mejora de nuevas LNP, demostrándose la importancia de este factor en el estudio realizado por Mallory *et al* [12] donde de tres posibles vehículos, se demostró que sólo uno, LNP1, obtenía datos de interés para continuar en el proceso.

En resumen, el objetivo consiste en obtener una respuesta protectora más completa. Para ello, no solo es importante encontrar el antígeno que produzca la respuesta deseada, sino que este debe estar incluido en un vehículo de transporte eficiente.

De forma análoga, las co-inmunizaciones también fueron objeto de estudio. Hayashi *et al* [13] administraron conjuntamente *PfCSP* y *Pfs25 mRNA-LNP*, combinando así la acción a nivel hepático y de bloqueo de la transmisión. Como resultado, obtuvieron una respuesta inmune potente. De esta manera, podemos concluir que las co-inmunizaciones sugieren la capacidad de aumentar las posibilidades de acabar con la malaria y son una fuente interesante de investigación para próximos estudios.

En este punto es interesante incluir las vacunas de mRNA autoamplificantes, ya que se ha demostrado que son significativamente más inmunogénicas que las vacunas de RNAm clásicas [4]. Proporcionan protección tanto en la etapa hepática como sanguínea y frente a la reinfección, reduciendo la necesidad aparente de dosis de refuerzo como se mostró en el estudio realizado por Baeza García *et al* [16]. Estos resultados atenderían los problemas relacionados con los factores de las regiones endémicas, donde resulta complicado administrar dosis de refuerzo. Hablamos no sólo de atención médica limitada, sino también de dificultades económicas, motivo principal por el que los pacientes no priorizan el ámbito sanitario. De igual manera, destacamos los factores logísticos como el coste o la distribución de la vacuna, que tienen que ser ajustadas a las condiciones de las regiones más afectados por la enfermedad.

Asimismo, se presentan los factores intrínsecos de la vacuna, principalmente su seguridad y eficacia. Hasta el momento los estudios realizados solo aportan información de seguridad y eficacia en especies murinas y durante un periodo de tiempo corto.

Basándonos en las premisas anteriores y enfocándonos en los aspectos que sería interesante aplicar en el futuro, encontramos algunos estudios que enfocan su investigación en proteínas antigénicas quiméricas y la administración intradérmica, demostrando también que existe activación de células presentadoras de antígenos eficaz en el sitio de inyección [17]. Esto supondría una ventaja importante a la hora de la aplicación de dosis repetidas en zonas endémicas. Siguiendo la misma línea, algunas estrategias novedosas apuntan a la conjugación de anticuerpos monoclonales a las superficies de las nanopartículas lipídicas y la adición de ligandos específicos de las células dendríticas a las superficies de las LNPs con el objetivo de conseguir una respuesta de anticuerpos más duradera [6].

Por último, es importante resaltar que las cepas con las que se realizan muchos estudios son de la especie *P. berghei*, propias de roedores, por lo que los resultados obtenidos en estas pruebas pueden diferir de los resultados esperados en estudios humanos, enfrentándonos así a nuevas incógnitas para obtener una vacuna óptima.

En resumen, los estudios presentados anteriormente ofrecen perspectivas prometedoras en relación con la obtención de vacunas de RNAm para malaria. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha aún se encuentran considerablemente alejados de los objetivos esperados.

## V. Conclusiones

---

De la literatura revisada se deduce que la tecnología de las vacunas de RNAm muestra los inicios de una nueva estrategia para hacer frente a la malaria.

Con los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos se evidencia, por un lado, la utilidad del uso de vehículos de transporte basados en LNP, pero también la necesidad de identificar los antígenos de superficie adecuados para generar una respuesta inmunitaria adecuada y duradera en el tiempo, o incluso la administración de dosis de refuerzo.

Sin embargo, se observan resultados esperanzadores en varias líneas novedosas de investigación, como las co-inmunizaciones, la unión con señales que modifican la localización celular de los antígenos generados, las vacunas de RNAm autoamplificantes y la inmunización frente a factores del parásito que bloquean la adecuada respuesta inmunitaria.

Todos estos avances permiten asegurar que el desarrollo de una vacuna de RNAm que ofrezca una adecuada protección frente a la malaria está cada día más cerca.

## VI. Bibliografía

---

- [1]. World Health Organization. World NTD Day 2024. WHO. <https://www.who.int/es/campaigns/world-ntd-day/2024>
- [2]. World Health Organization. Malaria. WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- [3]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Malaria. CDC. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>.
- [4]. Tsoumani, M.E.; Voyiatzaki, C.; Efstathiou, A. Malaria Vaccines: From the Past towards the mRNA Vaccine Era. *Vaccines* 11, 1452 (2023) <https://doi.org/10.3390/vaccines11091452>
- [5]. World Health Organization. Q&A on RTS,S malaria vaccine. WHO. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-rt-s-malaria-vaccine>
- [6]. Chaudhary, N., Weissman, D. and Whitehead, K.A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov* 20, 817–838 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- [7]. Wei, L.; Dong, C.; Zhu, W.; Wang, B.-Z. mRNA Vaccine Nanoplatfoms and Innate Immunity. *Viruses* 16, 120 (2024) <https://doi.org/10.3390/v16010120>
- [8]. MacMillen, Z., Hatzakis K., Simpson A. *et al.* Accelerated prime-and-trap vaccine regimen in mice using repRNA-based CSP malaria vaccine. (PREPRINT) (2023) <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3045076/v1>
- [9]. National Library of Medicine (US). ClinicalTrials.gov. Identifier NCT05581641, A Phase 1 Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Immunogenicity of RZ-001 in Healthy Adults; 2022 <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05581641?cond=Malaria&term=rna%20vaccine&rank=1>
- [10]. National Library of Medicine (US). ClinicalTrials.gov. Identifier NCT06069544, A Phase 2 Study to Evaluate Efficacy, Safety, and Immunogenicity of the Malaria RNA Vaccine; (2023) <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06069544?cond=Malaria&term=rna%20vaccine&rank=2&tab=table>
- [11]. Chuang, YM., Alameh, MG., Abouneameh, S. *et al.* A mosquito AgTRIO mRNA vaccine contributes to immunity against malaria. *npj Vaccines* 8, 88 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00679-x>

[12]. Mallory, K.L., Taylor, J.A., Zou, X. *et al.* Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. *npj Vaccines* 6, 84 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00345-0>

[13]. Hayashi, C.T.H., Cao, Y., Clark, L.C. *et al.* mRNA-LNP expressing PfCSP and Pfs25 vaccine candidates targeting infection and transmission of *Plasmodium falciparum*. *npj Vaccines* 7, 155 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00577-8>

[14]. Nakamae S., Miyagawa S. *et al.* Induction of liver resident memory T cells and protection at liver-stage malaria by mRNA-containing lipid nanoparticles. *Front. Immunol.* 14 (2023) doi: 10.3389/fimmu.2023.1116299

[15]. Scaria P.V., Roth N., Schwendt, K. *et al.* mRNA vaccines expressing malaria transmission-blocking antigens Pfs25 and Pfs230D1 induce a functional immune response. *npj Vaccines* 9, 9 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00783-y>

[16]. Baeza Garcia, A., Siu, E., Sun, T. *et al.* Neutralization of the *Plasmodium*-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection. *Nat Commun* 9, 2714 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05041-7>

[17]. Chaudhari R., Tandel N., Sahu K., *et al.* Transdermal Immunization of Elastic Liposome-Laden Recombinant Chimeric Fusion Protein of *P. falciparum* (PfMSP-Fu<sub>24</sub>) Mounts Protective Immune Response. *Nanomaterials*. 11(2):406 (2021); <https://doi.org/10.3390/nano11020406>