

# ARN ADSORBIDO EN PARTÍCULAS DE NANOEMULSIÓN LIPÍDICA Y SUS FORMULACIONES

## EL CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de preparación de una formulación líquida de ARN complejado con partículas de nanoemulsión lipídica o nanoportadores. En particular, proporciona un método para la preparación del ARN adsorbido en partículas de nanoemulsión lipídica en líquido y las formulaciones de dichos complejos de ARN como tales.

## ANTECEDENTES

Recientemente, en muchas aplicaciones farmacéuticas terapéuticamente relevantes, los ácidos nucleicos, como tales, se utilizan con fines terapéuticos y diagnósticos. A modo de ejemplo, en los últimos años en el campo de la terapia basada en ARN se han logrado resultados prometedores. En este sentido, varios tipos de moléculas de ARN se consideran herramientas importantes para la terapia génica, así como para la vacunación profiláctica y terapéutica contra muchas enfermedades infecciosas y malignas.

Los ácidos nucleicos, tanto el ADN como el ARN, se han utilizado ampliamente en la terapia génica, ya sea en forma desnuda o compleja. El uso del ARN es ventajoso en la medicina molecular moderna, ya que tiene algunas propiedades superiores sobre el uso del ADN. Como es sabido, la transfección de moléculas de ADN puede dar lugar a complicaciones graves y estos riesgos no se producen si se utilizan especialmente ARNm en lugar de ADN. Una ventaja de utilizar ARN en lugar de ADN es que no es necesario administrar ningún elemento promotor derivado del virus in vivo y no puede producirse ninguna integración en el genoma y el ARN no necesita viajar al núcleo para su expresión.

El uso de ARN, como tales, como agentes farmacéuticos se ha limitado debido a su sensibilidad a la degradación y a los problemas de entrega a través de las membranas celulares tras la inyección en el cuerpo de sujetos animales o humanos. Las moléculas de ARN son inherentemente inestables debido a sus propiedades estructurales y se degradan rápidamente en condiciones generales si no se estabilizan.

Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un método para la administración efectiva de moléculas de ARNm modificadoras de enfermedades en combinación con nuevas partículas de nanoemulsión lipídica [también llamadas nanoportadores] que forman una formulación farmacéutica líquida, que es clínicamente efectiva, segura, escalable y también eficiente en tiempo y costo. Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar una composición de dichas partículas de nanoemulsión lipídica y un método de complejación de moléculas de ARNm de interés con las partículas, y dichas moléculas de ARN al ser transportadas a una célula, un tejido o un organismo generando los efectos terapéuticos o inmunológicos requeridos. Otro objeto de la invención es proporcionar métodos para la preparación de moléculas de ARNm y nanoportadores adecuados para dichas formulaciones.

## DESCRIPCIÓN

La presente invención tiene los siguientes aspectos:

1. moléculas de ARNm y su preparación;
2. Partículas de nanoemulsión lipídica o nanoportadores y su preparación; y
3. Preparación de formulaciones líquidas de dichas moléculas de ARNm adsorbidas sobre dichos nanotransportadores.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la preparación de moléculas de ARN o ARNm capaces de expresar una proteína o péptido cuando se administran en el interior de una célula viva utilizando nanotransportadores. Dicho ARN, al ser de naturaleza terapéutica o profiláctica, es útil en las aplicaciones farmacéuticas. Dichos ARNm tienen secuencias de

los genes de interés, que pueden estar relacionados con antígenos derivados de genes de virus, bacterias u otros microorganismos u organismos superiores.

En una modalidad preferida, dicho ARN o ARNm comprende de 50 a 50000 nucleótidos, preferiblemente tiene de 200 a 15000 nucleótidos y más preferiblemente tiene de 500 a 12000 nucleótidos. Aparte del ARN mensajero, en la invención aquí divulgada se pueden utilizar tipos no codificantes como el ARN ribosómico o el ARN de transferencia y otras moléculas de ARN codificante, como el ARN viral, el ARN retroviral, el ARN autorreplicante, el ARN interferente pequeño, el microARN, el ARN nuclear pequeño, el ARN de horquilla pequeña o una combinación de los mismos. Además, dicho ARN codificante o no codificante puede comprender ARN modificado que tiene propiedades mejoradas como la estabilidad in vitro e in vivo. Dicha modificación del ARN puede referirse a modificaciones químicas que comprenden modificaciones de la columna vertebral, así como modificaciones de azúcar o modificaciones de bases.

En la invención aquí divulgada, dicho ARN puede estar codificando una proteína o un péptido o un antígeno, que puede seleccionarse, sin ninguna restricción, a partir de proteínas o péptidos terapéuticamente activos, seleccionados a partir de proteínas adyuvantes, de antígenos tumorales, antígenos patógenos (por ejemplo, seleccionados, de antígenos animales, de antígenos virales, de antígenos protozoarios, de antígenos bacterianos), antígenos alergénicos, antígenos autoinmunes, o otros antígenos, de alérgenos, de anticuerpos, de proteínas o péptidos inmunoestimuladores o de cualquier otra proteína o péptido adecuado para una aplicación terapéutica.

En este caso, una molécula de ARN modificada puede contener análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo, modificaciones de la columna vertebral, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. Una modificación en relación con la presente invención es una modificación en la que el taponamiento de las moléculas de ARN se realiza en el extremo 5' utilizando enzimas in vitro.

En una modalidad preferida, dicha formulación líquida de la invención comprende al menos un ARN, en el que el ARN es una molécula de ARNm, que tiene al menos un marco de lectura abierto, que codifica al menos un péptido o proteína. Además, dicha molécula de ARN modificada tiene dos o más marcos de lectura abiertos para péptidos o proteínas, que ayudan en la replicación de dichas moléculas de ARN in vivo [también llamadas ARNm autorreplicantes] y, preferiblemente, la secuencia del marco de lectura abierto en dicha molécula de ARN se modifica como se describe en este documento.

En la presente invención, dicho ARN comprendido en dicha composición comprende 5' y/o 3' regiones no traducidas (5'-UTR o 3'-UTR, respectivamente). Preferiblemente, el al menos un ARN comprende al menos uno seleccionado del grupo que consta de una UTR 5', una UTR 3', una secuencia poli(A) y/o una secuencia poli(C). Más preferiblemente, al menos un ARN comprende una estructura 5'-CAP.

En la presente invención, una UTR-5' es típicamente la parte de un ARNm, que se encuentra entre la región codificante de la proteína y el extremo terminal 5' del ARNm. Un 5'-UTR de un ARNm no se traduce en ninguna secuencia de aminoácidos. La secuencia 5'-UTR generalmente está codificada por el gen, que se transcribe en el ARNm respectivo durante el proceso de expresión génica. En el contexto de la presente invención, una 5'-UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro, que se encuentra a 3' de la secuencia promotora e inmediatamente a 5' del codón de inicio de la región codificante de la proteína.

En una modalidad preferida adicional, dicho ARN de la invención comprende al menos una 5'-UTR. Más preferiblemente, al menos un ARN comprende un 5'-UTR, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivada del 5'-UTR de un gen del virus Alfa.

Preferiblemente, al menos un ARN comprende una 5'-UTR, que puede derivarse de un gen que se relaciona con un ARNm con una vida media mejorada. La secuencia de nucleótidos del elemento 5'-UTR de un gen del virus alfa es, a saber, ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCCCAAAA de la cepa TC-83 del Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV).

En la presente invención, una UTR 3' es típicamente la parte de un ARNm, que se encuentra entre la región codificante de la proteína y el extremo 3' del ARNm. Una 3'-UTR de un ARNm no se traduce en ninguna secuencia de aminoácidos. La secuencia 3' -UTR generalmente está codificada por el gen, que se transcribe en el ARNm respectivo durante el proceso de expresión génica. En el contexto de la presente invención, una UTR 3'-corresponde a la secuencia de un ARNm maduro, que se encuentra a 3' del codón de parada de la región codificante de la proteína, preferiblemente inmediatamente 3' al codón de parada de la región codificante de la proteína, y que se extiende al lado 5' del extremo 3' del ARNm o de la secuencia poli(A), preferiblemente al nucleótido inmediatamente 5' a la secuencia poli(A).

En una modalidad preferida adicional, dicho ARN de la invención comprende al menos una 3'-UTR. Más preferiblemente, al menos un ARN comprende un 3'-UTR, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivada del 3'-UTR de un gen del virus Alfa. Preferiblemente, al menos un ARN comprende un 3'-UTR, que puede derivarse de un gen que se relaciona con un ARNm con una vida media mejorada. La secuencia de nucleótidos del elemento 3'-UTR de un gen del virus alfa es, a saber, GGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCCTAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATATTTTC de la cepa TC-83 del Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV).

Preferiblemente, al menos una 5'-UTR y al menos una 3'-UTR actúan sinérgicamente para aumentar la producción de proteínas a partir de dicho ARN incluido en la formulación líquida de la invención, cuando se entregan a las células.

En una modalidad preferida, dicho ARN de la invención comprende además una secuencia poli(A). La longitud de la secuencia poli(A) puede variar. La secuencia poli(A) puede tener

una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 300 nucleótidos de adenina, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 200 nucleótidos de adenina. Preferiblemente, dicho ARN comprende una secuencia poli(A) de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente 45 nucleótidos de adenina.

En una modalidad preferida, para la síntesis de dicho ARN, se prepara una plantilla de ADN a partir de un plásmido cultivado en una línea celular de *E. coli*. El plásmido se aísla de la bacteria y se linealiza enzimáticamente para obtener la plantilla de ADN o, alternativamente, dicha plantilla de ADN se obtiene mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando una pequeña cantidad del plásmido o huésped bacteriano que alberga dicho plásmido como fuente de reacción.

Una vez que el ADN molde está listo, la transcripción *in vitro* se realiza en presencia de un promotor de fagos adecuado, no limitado a la ARN polimerasa T7. El inhibidor de la ARNasa también se puede utilizar para proteger el ARN de la degradación. La reacción también utiliza una enzima pirofosfatasa que convierte el pirofosfato insoluble en fosfato inorgánico, un subproducto de la transcripción *in vitro*. La plantilla de ADN, la mezcla de enzimas y los rNTP se incuban en las condiciones adecuadas para producir el ARNm de un tamaño entre 500 y 50000 nucleótidos.

Después de la síntesis de ARNm, la plantilla de ADN es degradada de la mezcla de reacción por las enzimas de ADNasa en presencia de sales en las condiciones adecuadas. El siguiente paso es la protección del ARNm mediante el taponamiento 5'. Esto se puede lograr mediante conjugación química o reacción enzimática. A continuación, la preparación de ARNm crudo se purifica primero mediante cromatografía en columna en el modo de flujo continuo, uniendo las impurezas a la resina mientras el ARNm fluye a través de la resina. Este flujo se recoge para el siguiente paso de la cromatografía de afinidad para eliminar las impurezas similares. El eluido de la columna de afinidad se concentra y diafiltra con los módulos de fibra hueca y se esteriliza posteriormente mediante filtros de membrana. Este producto se utiliza para la complejación con nanoportadores.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a partículas de nanoemulsión lipídica (también llamadas nanoportadores) y a un método para prepararlas en líquido. Dichos nanoportadores comprenden propiedades de adsorción de moléculas de ARNm de cadena simple en sus superficies y permiten la entrega de dichas moléculas de ARNm a través de las membranas celulares hacia las células. En una modalidad particularmente preferida, dichos nanoportadores comprenden al menos un compuesto lipídico catiónico o policationico, preferiblemente como se define en el presente documento, en el que dicho compuesto catiónico o policationico está presente en un complejo con otros componentes que forman partículas de nanoemulsión lipídica estables o nanoportadores. Dichos nanoportadores de la invención comprenden preferentemente un compuesto lipídico catiónico o policationico, preferiblemente DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano), DDA (dimetildioctadecilamonio) o lípidos catiónicos/policationicos similares.

En una modalidad preferida, el término "nanoportador(es)" se refiere típicamente a una composición de las partículas de nanoemulsión lipídica [aquí también citadas como GNP o sus derivados] que comprenden un compuesto catiónico o policationico y otros componentes que apoyan la formación y estabilidad de dichos complejos. Los GNP también se conocen como nanoemulsiones catiónicas (CNE) o nanoemulsiones lipídicas catiónicas (CLNE) en la técnica.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores tienen el tamaño promedio, preferiblemente en un rango de 30 a 300 nm, más preferiblemente de 50 a 200 nm. En una modalidad particularmente preferida, el tamaño medio de los nanoportadores que comprenden o consisten en ARN complejo es de 50 a 100 nm.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores con o sin ARN adsorbido en él, tienen un índice de polidispersidad [PDI] relacionado con su tamaño en un rango de 0.150 a 0.300, más preferiblemente de 0.170 a 0.230. En una modalidad preferida, dichos nanoportadores que comprenden o consisten en un compuesto catiónico o policationico, tienen un valor potencial zeta en un rango de -10 a -50 mV, más preferiblemente de -25 a -35 mV.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores permanecen estables en un disolvente adecuado.

Preferiblemente, un disolvente, que permita la disolución de dicho ARN y, otros componentes, como agentes tampón, etc. como se define en este documento. Preferiblemente, el disolvente es volátil con un punto de ebullición preferiblemente inferior a 120 °C. Además, el disolvente es preferiblemente no tóxico. Preferiblemente, el disolvente es una solución acuosa. En el caso de un disolvente orgánico, el disolvente es preferiblemente miscible con agua. El disolvente suministrado puede consistir en un tampón, preferiblemente seleccionado a partir de un tampón tal como se define en el presente documento.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores proporcionados pueden contener adicionalmente al menos un componente seleccionado, por ejemplo, de inmunoestimulantes, compuestos metálicos o iones metálicos, tensioactivos, polímeros o agentes complejantes, tampones, etc., o una combinación de los mismos.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores suministrados pueden contener adicionalmente un componente adicional seleccionado del grupo de tensioactivos. Dicho grupo podrá comprender, sin limitarse a él, cualquier tensioactivo apto para la preparación de una composición farmacéutica, preferentemente, sin limitarse a ello, polisorbato, sorbitán, etc.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores proporcionados pueden contener adicionalmente un componente adicional seleccionado del grupo de inmunoestimulantes no específicos. Dicho grupo podrá comprender, sin limitarse a ello, cualquier inmunoestimulante no específico adecuado para la preparación de una composición farmacéutica, preferiblemente, sin limitarse a ello, escualeno o cualquier otro compuesto similar.

En una modalidad preferida, dichos nanoportadores proporcionados pueden contener adicionalmente un componente adicional seleccionado del grupo de inmunoestimulantes

específicos. Dicho grupo podrá comprender, sin limitarse a ello, cualquier inmunoestimulante específico adecuado para la preparación de una composición farmacéutica, preferiblemente, sin limitarse a ello, el lípido monofosforilo-A [MPL] o el lípido glucopiranosilo-A [GLA] o cualquier otro compuesto adyuvante similar.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación líquida que comprende un ARNm adsorbido sobre partículas de nanoemulsión lipídica o nanoportadores como se describe a continuación y dicha formulación que comprende dicho ARNm a una concentración preferiblemente entre 0,1 y 1 mg/mL. En una modalidad preferida, dicho ARN o ARNm comprendido en la formulación líquida está complejoado, al menos parcialmente, con un lípido catiónico o policationico contenido en dichos nanotransportadores. Parcialmente significa que solo una parte de al menos una molécula de ARN está complejada con un compuesto catiónico o policationico y que el resto de al menos una molécula de ARN está en forma no complejada ("libre"). Preferiblemente, la proporción de ARN complejoado a 10 ARN libre está entre 25:1 (p/p) y 50:1 (p/p), más preferiblemente es de aproximadamente 50:1 (p/p).

En una modalidad preferida, la integridad relativa se determina preferiblemente como el porcentaje de ARN de longitud completa (es decir, ARN no degradado) con respecto a la cantidad total de ARN (es decir, ARN de longitud completa y fragmentos de ARN degradados (que aparecen como una mancha en las imágenes de electroforesis en gel), preferiblemente después de la deducción del ruido de fondo, por ejemplo, mediante el uso de una densitometría basada en software. Preferiblemente, la integridad relativa de dicho ARN en la formulación líquida del método inventivo es del 80% y más preferible al menos el 90% después del almacenamiento a temperatura de congelación durante al menos seis meses.

En una modalidad preferida, la actividad biológica de dicho ARN de la formulación líquida después del almacenamiento a temperatura ambiente, preferiblemente como se ha definido anteriormente con respecto a la integridad relativa de dicho ARN, es preferiblemente de al menos el 70%, más preferiblemente al menos del 80% y más preferiblemente al menos del 90% de la actividad biológica del ARN recién preparado. La actividad biológica se determina

preferentemente mediante el análisis de las cantidades de proteína expresadas a partir de ARN reconstituido y de ARN recién preparado, respectivamente, por ejemplo, después de la transfección en una línea celular de mamífero o en un sujeto. Alternativamente, la actividad biológica puede determinarse midiendo la inducción de una respuesta inmune (adaptativa o innata) en un sujeto.

Además, la invención divulgada prevé el uso del método inventivo y de los productos en la fabricación de un preparado farmacéutico o una vacuna. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende o consiste en la formulación líquida que se puede obtener por el método inventivo. En una modalidad preferida, la formulación farmacéutica inventiva comprende al menos un ingrediente adicional farmacéuticamente aceptable, como un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la formulación farmacéutica inventiva podrá complementarse con otros componentes, tal como se ha definido anteriormente en relación con la formulación líquida. La formulación farmacéutica inventiva se prepara en su totalidad mediante el método inventivo.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica inventiva puede administrarse por inyección parenteral, más preferiblemente por inyección subcutánea, intravenosa e intramuscular. Las formas inyectables estériles de las formulaciones farmacéuticas inventivas pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones podrán formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas aceptables, incluidas emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticamente aceptables, también pueden utilizarse para los fines de la formulación de la invención.

La composición farmacéutica inventiva comprende normalmente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la formulación farmacéutica inventiva, tal como se ha definido anteriormente, en particular de al menos un ARN comprendido en dicha formulación que pueda obtenerse mediante el método inventivo. Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad de al menos un ARN que es suficiente para inducir significativamente una modificación positiva de una enfermedad o trastorno tal como se define en el presente documento. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios graves, es decir, para permitir una relación razonable entre ventaja y riesgo. La formulación farmacéutica inventiva puede utilizarse para fines médicos humanos y también veterinarios, preferiblemente para fines médicos humanos, como formulación farmacéutica en general o como vacuna.

De acuerdo con una modalidad específica, la formulación farmacéutica comprende un adyuvante. En este contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto que sea adecuado para iniciar o aumentar una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario innato, es decir, una respuesta inmunitaria inespecífica. En otros términos, cuando se administra, la vacuna inventiva provoca preferiblemente una respuesta inmunitaria innata debido al adyuvante, opcionalmente contenido en ella. Preferiblemente, dicho adyuvante puede seleccionarse a partir de un adyuvante conocido por una persona experta y adecuado para el presente caso, es decir, que apoye la inducción de una respuesta inmunitaria innata en un mamífero. En este contexto, el adyuvante se selecciona preferiblemente a partir de compuestos que se sabe que son inmunoestimulantes debido a su afinidad de unión (como ligandos) al receptor-4 humano tipo toll [TLR4] como GLA [adyuvante lipídico de glucopiranosilo] o MPL [adyuvante lipídico de glucopiranosilo].

La presente invención proporciona además varias aplicaciones y usos de la formulación que se puede obtener por el método descrito, la formulación farmacéutica inventiva, la vacuna inventiva o el kit inventivo o kit de piezas.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras que se muestran a continuación son meramente ilustrativas y describirán la presente invención de una manera más detallada. Estas cifras no se interpretarán en el sentido de limitar las presentes 10 invenciones a las mismas.

**FIGURA 1:** Representa la estructura general de los plásmidos pVEE [que se basa en el plásmido pMB1] con casetes de expresión de ARNm autorreplicantes para diferentes antígenos como se describe en la invención divulgada.

**FIGURA 2:** SEQ ID NO: 1, es la secuencia de la proteína correspondiente a la variante B.1 de la proteína de pico del SARS-COV-2 con una mutación D614G.

**FIGURA 2-1:** SEQ ID NO: 2, es la secuencia de proteínas correspondiente a la variante Wuhan-Hu-1 de la proteína de pico del SARS-COV-2 [GISAIDAccessionN0.:EP1 ISL 402125 Nombre del virus: hCoV-19/Wuhan/Hu-1/2019 Fecha de recolección: 31 de diciembre de 2019].

**FIGURA 3:** Representa la calidad del ARNm durante el proceso de IVT. [A] muestra diferentes pasos de IVT, paso IVT-A: Carril 2 [2 h de incubación], 3 [3 h] y 4 [4 h]; Escalón IVT-B: Carril 5 y escalón IVT-C: Carril 6. [B] muestra diferentes pasos de purificación del ARNm, la preparación del ARNm crudo del carril 2 a partir de IVT-C, mientras que el carril 10 se obtiene finalmente del retenido. [C] muestra la sustancia farmacológica final obtenida del retenido, carril 2. El marcador de peso molecular en todos los geles es el mismo, teniendo un primer banco de 9 kb, una sexta banda de 3 kb y una décima banda de 0,5 kb de ARN monocatenario.

**FIGURA 3-1:** Representa el perfil cromatográfico de la muestra de lote de ARNm purificada como se describe en el Ejemplo 3.

**FIGURA 4:** Muestra el perfil SEC-HPLC de la construcción de ARNm de la proteína de pico SAR-CoV-2 purificada de aproximadamente 12 kb con un tiempo de retención [RT] de aproximadamente 8,15 minutos.

**FIGURA 5:** Muestra la integridad relativa del ARNm después de la adsorción en partículas de nanoemulsión lipídica o nanoportadores de diferentes tipos. [A] muestra la adsorción de moléculas de ARNm en nanoportadores que no muestran ningún movimiento de dichas moléculas de ARNm en el campo eléctrico. [B] muestra la protección de la ARNasa de las moléculas de ARNm unidas a diferentes nanotransportadores. Las moléculas de ARNm unidas permanecen intactas incluso después del tratamiento con ARNasa.

**FIGURA 5-1:** Muestra el perfil de expresión del ARNm desnudo y el ARNm adsorbido o acomplexado en el nanotransportador en los ELL HEK 293T in vitro.

**FIGURA 6:** Muestra la respuesta inmunitaria generada por las formulaciones de vacunas que comprenden las moléculas de ARNm y los nanotransportadores del método inventivo descrito en este documento. La proteína de la espícula del SARS-CoV-2 que produce construcciones de ARNm autorreplicantes cuando se adsorbe en los nanotransportadores, es decir, GNP, GNP-M o GNP-G y se inyecta en ratones, produce respuestas robustas de IgG.

**FIGURA 7:** Muestra la respuesta de anticuerpos neutralizantes generada por las formulaciones de vacunas que comprenden las moléculas de ARNm y los nanotransportadores del método inventivo descrito en este documento. La proteína de la espícula del SARS-CoV-2 que produce construcciones de ARNm autorreplicantes cuando se adsorbe en los nanotransportadores, es decir, GNP, GNP-M o GNP-G y se inyecta en ratones, produce anticuerpos neutralizantes del virus robustos.

## **EJEMPLOS**

Los ejemplos que se muestran a continuación son ilustrativos, describen con más detalle la presente invención y no deben interpretarse como una limitación.

## **EJEMPLO 1: PÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ARNm**

Los plásmidos capaces de producir moléculas de ARNm que expresan las proteínas deseadas, como los antígenos de la proteína de la espícula del virus corona, los antígenos de la proteína del virus del zóster, los antígenos de los protozoos de la malaria, etc., cuando se entregan a las células, se prepararon mediante técnicas estándar de biología molecular. Estos plásmidos contenían las Proteínas No Estructurales (NSP1 a NSP4) del Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) en cis con las secuencias codificantes para los antígenos proteicos deseados o genes de interés. Los productos del gen NSP ayudan a la autorreplicación de las moléculas de ARNm dentro de las células huésped. Por ejemplo, cuando se realiza una secuencia descendente a las secuencias NSP, la secuencia que codifica la proteína de la espícula del SARS CoV-2 se transcribe simultáneamente durante la autorreplicación y, a continuación, traduce los antígenos de la proteína de la espícula viral en la célula huésped. Junto con la replicación y la expresión prolongada de la proteína de la espícula, se generan respuestas inmunitarias de refuerzo duraderas. Todos los plásmidos se mantuvieron rutinariamente en las células de *E. coli* utilizando los protocolos estándar. Una ilustración representativa se muestra en la FIGURA 1, que muestra los elementos estructurales de los plásmidos pVEE que contienen varios genes de interés, como el mutante D614G del gen de la proteína de pico del SARS-CoV-2 de la variante B.1 como se muestra en la FIGURA 2, entre otras variantes de las proteínas de pico o genes relevantes para el antígeno de interés de otros virus y organismos. En la TABLA 1 se muestran los diversos mutantes o variantes de la proteína de pico del SARS-CoV-2 que pueden utilizarse con la secuencia de la proteína de pico base de la variante de Wuhan-Hu-1 [véase la FIGURA 2-1]. El vector pVEE se basa en el plásmido pMB1 conocido en la técnica.

Este vector contiene el elemento promotor de la polimerasa T7, el elemento 5'-UTR, los ORF para las proteínas no estructurales autorreplicantes (NSP1-4), la secuencia de señal, el gen de interés como la proteína de la espícula, el elemento UTR 3' fluído por el elemento de cola poli A en una serie, junto con los elementos plásmidos base pMB1 y el marcador de resistencia a la kanamicina.

TABLA

| 2.12.1                                                                                                                                                                                                       | BA.4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | BA.5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | VARIANTES                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| L24del<br>P25del<br>P26del<br>S<br>A27S<br>L2D<br>G3G<br>V7D<br>IF<br>3P<br>5A<br>5N<br>8S<br>7N<br>OK<br>2Q<br>7N<br>8K<br>4A<br>3R<br>8R<br>1Y<br>5H<br>4G<br>5Y<br>9K<br>1H<br>4L<br>4K<br>6Y<br>4H<br>9K | V3G<br>T19I<br>L24del<br>P25del<br>P26del<br>S<br>A27S<br>H69del<br>V70del<br>G142D<br>V213G<br>G339D<br>S371F<br>S373P<br>S375F<br>T376A<br>D405N<br>R408S<br>K417N<br>N440K<br>L452R<br>S477N<br>T478K<br>E484A<br>F486V<br>Q498R<br>N501Y<br>Y505H<br>D614G<br>H655Y<br>H655Y<br>N679K<br>P681H<br>N764K<br>N764K<br>D796Y<br>Q954H<br>N969K<br>A1020S | T19I<br>L24del<br>P25del<br>P26del<br>L452R<br>A27S<br>H69del<br>V70del<br>G142D<br>V213G<br>G339D<br>S371F<br>S373P<br>S375F<br>T376A<br>D405N<br>R408S<br>K417N<br>N440K<br>L452R<br>S477N<br>T478K<br>E484A<br>F486V<br>Q498R<br>N501Y<br>Y505H<br>D614G<br>H655Y<br>H655Y<br>N679K<br>P681H<br>N764K<br>D796Y<br>Q954H<br>N969K<br>A1020S | CAMBIO DE AMINOCIDOS, INSERCIÓN Y/O<br>ELIMINACIÓN EN EL PICO DE PROTEÍNA DEL SARS-CoV- |

## **EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DEL ARNm.**

Se utilizó el protocolo de transcripción in vitro [IVT] para la preparación de moléculas de ARNm a partir de un molde de ADN obtenido del plásmido descrito en el Ejemplo 1. Para un tamaño de lote de aproximadamente 1200 ml para producir el ARNm de la variante D614G de la proteína de pico del SARS-CoV-2 [todos los ejemplos a continuación relacionados con esta molécula de ARNm], la preparación se dividió en tres partes. En la primera parte, se tomaron alrededor de 14 mL de agua de alta pureza en un recipiente de 50 mL, se tamponó con 1,5 mL de solución de Tris-HCL 1 M, pH 8.0. A esta masa de reacción se añadieron aproximadamente 0,975 mL de solución de 1 M de MgCl<sub>2</sub>, aproximadamente 10,5 mL de 25 mM de rNTP cada uno en solución y aproximadamente 0,375 mL de solución de ditiotreitól 1 M. Además de dicha masa de reacción, se añadieron aproximadamente 1,5 mL de solución de espermidina de 50 mM, aproximadamente 7-5 mL de 250 ng/gL de solución de ADN molde y aproximadamente 0,75 mL de 1 ug/gL de solución inorgánica de pirofosfatasa. A esto le siguieron aproximadamente 0,21 ml de 1,5 ug/gL de solución inhibidora de ARNasa y aproximadamente 0,28 ml de 2 ug/gL de solución de polimerasa T7. La masa de reacción resultante de aproximadamente 38 ml se mezcló suavemente y se incubó a aproximadamente 32 °C en un agitador a unas 100 RPM durante aproximadamente 4 horas. Esta parte permitió una síntesis robusta de ARNm a partir de la plantilla de ADN [ver FIGURA 3A Carriles 2 a 4, el carril 1 es la escala de peso molecular del ARN: la primera banda es de 9 kb y la última es de 0,5 kb, que es la misma en todos los experimentos]. En la segunda parte, al final del tiempo de reacción, dicha masa de reacción de 38 mL se transfirió a un matraz de 500 mL y al que se le añadieron unos 350 mL de agua de alta pureza. Esta masa de reacción se complementó con aproximadamente 0,2 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> 1 M y aproximadamente 0,05 ml de solución de ADNasa 2,5 ug/gL. La masa de reacción resultante de unos 390 ml se mezcló suavemente y se incubó a unos 32 °C en un agitador a unas 100 rpm durante unos 30 minutos. Esta parte elimina por completo la plantilla de ADN utilizada en la primera parte [ver FIGURA 3A Carriles 5]. En la tercera parte, al final del tiempo de reacción, dicha masa de reacción de 390 mL se transfirió a un matraz de 2000 mL y al que se le añadieron unos 730 mL de agua de alta pureza. Esta masa de reacción se complementó además con aproximadamente 58 ml de solución tampón de 1 M de Tris-HCl, pH 8,0,

aproximadamente 0,225 ml de solución de 1 M de  $MgCl_2$ , aproximadamente 2,5 ml de solución de KCl de 1 M, aproximadamente 12 ml de solución de 100 mM de solución de GTP y aproximadamente 7-5 ml de 32 mM de solución de sadenosilmetionina y aproximadamente 0,8 ml de solución de 1 M de ditioneitol. Además, se añadieron unos 0,2 ml de solución de inhibidor de la ARNasa de 1,5 ug/gL y unos 0,75 ml de solución de 2 ug/g de guaniltransferasa. La masa de reacción resultante de aproximadamente 1200 ml se mezcló suavemente y se incubó a aproximadamente 32 °C en un agitador a unas 100 RPM durante aproximadamente 2 horas [ver FIGURA 3A Carriles 6]. Este método proporcionó alrededor de 150 ug/mL de ARNm transcrito in vitro en un período de aproximadamente 7 horas. En este trabajo, la síntesis de ARNm se realizó en condiciones estériles y libres de nucleasas en condiciones de aire limpio. La FIGURA 3A muestra la calidad del ARNm producido como el anterior en diferentes partes.

### **EJEMPLO 3: PURIFICACIÓN DE ARNm**

La masa de reacción del Ejemplo 2 que contenía moléculas de ARNm se sometió a purificación de ARNm mediante cromatografía y métodos de filtración. En este trabajo, dicha masa de aproximadamente 1200 mL se suplementó con soluciones madre de Tris-HCl y KCl para lograr las concentraciones finales de 10 mM de Tris-HCl y 250 mM de KCl a pH 8.0. El primer paso cromatográfico se utilizó en modo de flujo continuo en el que las impurezas se unen a la columna mientras que las moléculas de ARNm se recogen en la solución de flujo continuo. En este caso, dicha solución diluida se sometió a una columna preequilibrada que tenía la resina de agarosa altamente reticulada a base de octilamina [CaptoCore 700 - Cytiva] o una matriz de resina similar y se recolectó el flujo a través de fracciones, que contenían dichas moléculas de ARNm [ver FIGURA 3B, Carril 2 antes del primer paso, Carril 3 después del primer paso; ver FIGURA 3-1 Cromatógrafo A]. El segundo paso cromatográfico se utilizó en modo de afinidad en el que las moléculas de ARNm se unen a la columna mientras que las impurezas salen con el flujo a través de fracciones. En este trabajo, dicha masa de primer paso de aproximadamente 1000 mL se suplementó con soluciones madre de Tris-HCl, NaCl y EDTA para lograr las concentraciones finales de 10 mM de Tris-HCl, 0.8 M de NaCl y 1 mM de EDTA a pH 8.0.

A continuación, se sometió a una columna preequilibrada con la resina de afinidad reticulada de poli(estireno-divinilbenceno) basada en oligo(dT)25 [POROS - ThermoFisher] o una matriz de resina de afinidad similar y, tras completar la unión de las moléculas de ARNm, se lavó con un tampón de lavado que contenía 10 mM de citrato de sodio y 0,8 M de NaCl a pH 6,5 y se desechó el flujo a través de las fracciones [véase la FIGURA 3B, Carril 4 al 7]. A continuación, las moléculas de ARNm unidas se eluyeron utilizando un tampón de elución que contenía 1 mM de citrato de sodio a pH 6,5 [ver FIGURA 3B, carril 8; ver FIGURA 3-1 Cromatógrafo B]. Este paso proporcionó alrededor de 800 ml de eluido que contenía las moléculas de ARNm purificadas. En el tercer paso se utilizó un sistema de diafiltración con fibra hueca de membrana de corte molecular de 30 kDa para concentrar dicho eluido en un retenido final llamado sustancia farmacológica de ARN de aproximadamente 500 mL que contenía aproximadamente 200 ug/mL de dicho ARNm [ver FIGURA 3B, carril 10].

Además, dicha sustancia farmacéutica se esterilizó con filtro utilizando un sistema de filtración de membrana de 0,2 y se almacenó a -80 °C hasta su uso [ver FIGURA 3C, carril 2]. Además, se realizó el análisis de HPLC de exclusión de tamaño en dicha sustancia farmacéutica utilizando métodos estándar, dicha sustancia farmacéutica tiene un tiempo de retención de aproximadamente 8,15 minutos y mostró una pureza molecular superior al 95% [ver FIGURA 4]. La sustancia farmacológica de ARN se diluyó o concentró de forma rutinaria para lograr una concentración de ARNm de entre 0,1 y 1,5 mg/ml y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso.

#### **EJEMPLO 4: PREPARACIÓN DE NANO-EMULSIONES LIPÍDICAS / NANO-PORTADORES**

La preparación de los nanoportadores o GNPs se logró en un proceso de tres partes. En una primera parte, la fase oleosa se preparó utilizando todas las sustancias hidrófobas que forman parte de dicho portador. En este trabajo, para preparar unos 4 mL de dicha fase oleosa, se mezclaron unos 3 g de DOTAP, unos 3-7 g de monoestearato de sorbitán [SPAN-60] y unos 3-75 g de escualeno en un recipiente de vidrio. Dicha mezcla se calentó alrededor de 65 °C hasta que todos los componentes quedaron bien mezclados en consistencia homogénea. En

la segunda parte, se mezclaron unos 3-7 g de polisorbato-80 con unos 96 mL de citrato de sodio 10 mM, solución tamponada de pH 6,0, que se mantuvo caliente a 65 °C. En la tercera parte, tanto la fase de aceite como la acuosa se mezclaron bajo un mezclador de alto cizallamiento que funcionaba a unas 5000 RPM durante unos 15 minutos. Luego, esta mezcla se pasó unas 10 veces a través de un homogeneizador de alta presión a aproximadamente 30,000 psi y se preparó con la fase acuosa restante, lo que proporcionó aproximadamente 100 ml de solución de nanoportadores. Dicha solución nanotransportadora contenía opcionalmente sustancias inmunoestimulantes como MPL o GLA en una cantidad de aproximadamente 0,5 ug/ml cuando se deseaba. El GNP nanoportador no contenía MPL ni GLA, mientras que el GNP-M contenía el adyuvante MPL y el GNP-G contenía el adyuvante GLA [véase el CUADRO 2].

#### **EJEMPLO 5: PREPARACIÓN DE COMPLEJOS DE NANOTRANSPORTADORES Y MOLÉCULAS DE ARNm**

La adsorción de moléculas de ARNm en dicho nano-portador se realizó un proceso muy cuidadoso y preciso de mezcla de dicha solución de ARNm en dicha solución de nanoportador formando los complejos estables. En este caso, la proporción de nitrógeno [presente en las moléculas de DOTAP] y fosfato [presente en las moléculas de ARN; La relación N:P] se tomó como una medida de asociación de dichas moléculas de ARNm a dichas partículas nanotransportadoras, ya que las moléculas de ARNm se cargan negativamente mientras que las moléculas DOTAP se cargan positivamente, lo que conduce a la adsorción de dichas moléculas de ARNm en dichos nanoportadores. Para lograr los complejos estables de moléculas de ARNm con nanotransportadores, se probaron varias relaciones N:P entre 1 y 150 DOTAP a cantidades de ARN, manteniendo constante la cantidad de ARN. Esto llevó a que las relaciones N:P entre 5 y 15 fueran ideales para obtener los complejos estables del ARNm adsorbido en dichos nanoportadores. Por lo tanto, para preparar dichos complejos, dicha solución de nanotransportadores del Ejemplo 4 se diluye a unos 6 mg/ml de DOTAP con citrato de sodio 10 mM, solución de pH 6,0. Luego, se tomaron alrededor de 50 mL de esta solución nanoportadora diluida en un recipiente de 1000 mL y se colocaron en un agitador orbital que giraba entre 70 y 120 RPM. A continuación, se añadieron unos 50 ml de

solución de ARNm [sustancia farmacéutica de ARN], tal como se preparó en el Ejemplo 3, disminuyendo la velocidad utilizando una bomba de jeringa en unos 5 minutos en condiciones de agitación constante a una temperatura de unos 2-8 °C. Luego se dejó que la mezcla formara complejos a 2-8 °C durante unos 30 minutos, se diluyó aún más 1:1 con citrato de sodio 20 mM, pH 6.0 que contenía aproximadamente 540 mg / mL de sacarosa y luego dicha solución compleja se filtró a través de filtros de membrana de 0.45 mm y 0.22 mm para obtener la solución de vacuna estéril. Para determinar la cantidad de moléculas de ARN adsorbidas en las partículas nano-portadoras y los cambios en las propiedades de dichas nano-portadoras, se midieron los tamaños promedio de las partículas y los parámetros de distribución del tamaño de partícula mediante la dispersión dinámica de la luz en el sistema Zetasizer Nano [Malvern Panalytical].

En la TABLA 2 se presentan los cambios observados en dichos parámetros de los nanoportadores tras la adsorción de moléculas de ARN.

TABLA 2:

| SN | PARA-METRO                    | Producto nacional bruto | PNB -M    | PNB-G | GNP + ARNm | PNB-M + ARNm | PNB-G + ARNm |
|----|-------------------------------|-------------------------|-----------|-------|------------|--------------|--------------|
| 1  | Tamaño de partícula [nm]      | 51.00                   | 40.7<br>1 | 50.50 | 63.34      | 56.98        | 72.28        |
| 2  | PDT                           | 0.271                   | 0.19<br>6 | 0.184 | 0.224      | 0.207        | 0.180        |
| 3  | Potencial zeta [mV]           | 34.8                    | 28.3      | 33.2  | 11.1       | 11.4         | 10.5         |
| 4  | ARN Contenido [mV]            | -                       | -         | -     | 40.70      | 44.80        | 40.40        |
| 5  | Encuadernación Eficiencia [%] | -                       | -         | -     | 98.30      | 98.10        | 89-90        |

## **EJEMPLO 6: DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN ADSORBIDO EN NANOPORTADORES**

La integridad de las moléculas de ARNm como tales o después de la extracción de los nanoportadores se determinó mediante la electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante con formaldehído utilizando métodos conocidos en la técnica. Brevemente, las muestras de ARNm se prepararon en tampón MOPS con formaldehído, bromuro de etidio y un colorante de seguimiento como el azul de metileno calentando dicha mezcla a unos 70 °C durante unos 30 minutos. Luego, las muestras se separaron en geles de agarosa al 1% al completar la ejecución deseada de las muestras en el gel y se vieron bajo iluminación UV y las imágenes se conservaron para el registro. Para la extracción de las moléculas de ARNm del nanotransportador, dichos complejos fueron sometidos a extracción de fenol-cloroformo. Los resultados se muestran en la FIGURA 5A, en la que el ARNm de control desnudo se ejecuta en el gel correspondiente a un tamaño de aproximadamente 12 kb [Carril 3], mientras que el ARN complejo con nanoportadores permanece en los pozos de carga [Carriles 5 - GNP, 8 - GNP-M y 11 GNP-G], mientras que las moléculas de ARNm extraídas de los nanoportadores también funcionan a unos 12 kb [Carriles 6 - GNP, 9 - GNP-M y 12 GNP-G] sin ninguna degradación de su integridad, demostrando la integridad de las moléculas de ARNm en asociación con los nanoportadores.

La integridad del ARNm se probó además con ensayos de protección de la ARNasa. Brevemente, las muestras de ARNm con o sin nanoportadores se sometieron a un tratamiento con ARNasa y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa con formaldehído. Como se muestra en la FIGURA 5B, el ARNm desnudo fue tratado con ARNasa y mostró una degradación completa en el carril 3 en comparación con el ARNm no tratado en el control del carril 2. En el caso del ARNm complejo con GNPs, dichos nano-portadores protegieron las moléculas de ARNm, el Carril 4 es GNP sin tratamiento y el Carril 5 es GNP tratado con RNasa, en ambos casos el ARN permanece unido a las partículas de GNP y permanece en los pocillos de carga, mostrando protección del ARNm en complejo con el nano-portador. El ARNm extraído de las partículas de GNP tratadas con ARNasa [ver Carriles 7, 11 y 15] y las partículas de GNP no tratadas [ver Carriles 6, 10 y 14] mostraron un tamaño de banda

ligeramente por encima de la banda marcadora de 9 kb, lo que indica que dicho ARNm está intacto sin pérdida de integridad incluso después del tratamiento con ARNasa de dicho complejo.

## **EJEMPLO 7: CUANTIFICACIÓN DE ARN**

La cantidad de ARNm se determinó en diferentes muestras mediante el kit de ensayo de ARN ultrasensible Qunati-IT RiboGreen [ThermoFisher-Invitrogen] según el protocolo del fabricante. Brevemente, cuando se une a moléculas de ARNm libres, el reactivo RiboGreen tiene máximos de absorción y emisión a 500 nm y 525 nm, respectivamente. La sensibilidad de detección de este método está entre 1 y 200 ng/mL de ARN en solución. Además, el ARN extraído asociado con las partículas nanotransportadoras lipídicas también se puede detectar fácilmente utilizando este método.

## **EJEMPLO 7A: PROTEÍNA DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS HEK POR ARN ADSORBIDO EN NANOTRANSPORTADORES**

Para determinar la potencia del ARNm adsorbido o complejo en el transportador GNP, se realizó un análisis de expresión in vitro de la proteína en las células HEK 293T. Como se muestra en la FIGURA 5-1, el análisis de Western blot se utilizó la proteína de pico recombinante como control estándar [Carril 2], mientras que el lisado de células no tratadas se utilizó como control negativo [Carril 3]. El ARNm desnudo se transfectó en las células utilizando el reactivo Lipofectamine [Carril 4], mientras que el ARNm adsorbido o complejo en el portador de GNP se agregó al cultivo celular y se incubó como se indica [Carril 5]. Se observó la expresión robusta de la proteína de la espícula, se observó que las muestras incubadas transfectadas y complejadas de ARNm corrían como bandas de aproximadamente 170 kD. En este caso, las células HEK 293T se cultivaron durante aproximadamente 24 horas en DMEM de 1 mL con FBS en placas de cultivo celular y luego se trataron según lo revelado y se incubaron a 37 °C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% durante aproximadamente 48 horas. Después de la incubación, se descartó el sobrenadante de la monocapa celular y las células adheridas se lisaron con el tampón de lisis 200 PL. La solución

lisada se sometió a Western blot utilizando un anticuerpo de pico contra el SARS-CoV-2 (COVID-19) para la detección de la proteína de pico expresada. Se realizó ELISA sándwich con anticuerpos de la espícula del SARS-CoV-2 (COVID-19) para estimar la proteína de la espícula expresada en el lisado celular.

## **EJEMPLO 8: ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD**

La solución vacunal obtenida en el Ejemplo 5 fue sometida a los estudios de inmunogenicidad para determinar las propiedades productoras de inmunógeno de las moléculas de ARNm adsorbidas en dichos nanotransportadores. En este trabajo, dicha solución vacunal o soluciones de control se inyectaron a poblaciones de ratones C57BL/6 o BALB/c. Se utilizaron alrededor de seis ratones por grupo, como se muestra en la FIGURA 6. Al primer grupo de control se le inyectó únicamente el diluyente simple o la solución tampón. Al segundo grupo de control se le inyectó ARNm desnudo equivalente a su cantidad presente en la solución de la vacuna de prueba, a los grupos de control de nanotransportadores se les inyectó GNP o GNP-M o GNP-G desnudos de nanoportadores equivalentes a su cantidad presente en la solución de la vacuna de prueba. Al primer grupo de prueba se le inyectaron alrededor de 100 YL de solución de vacuna de prueba que contenía aproximadamente 5 ug de ARNm complejo con GNP. Al segundo grupo de prueba se le inyectaron alrededor de 100 YL de solución de vacuna de prueba que contenía aproximadamente 5 ug de ARNm complejo con GNP-M. Al tercer grupo de prueba se le inyectaron alrededor de 100 PL de solución de vacuna de prueba que contenía aproximadamente 5 ug de ARNm complejo con GNP-G. A continuación, se sometió a pruebas de producción de anticuerpos contra la proteína de la espícula del SARS-CoV-2 en los 14, 28 y 43 días posteriores a la inyección de dichos materiales. Como se muestra en la FIGURA 6, el grupo de ratones inyectados con las soluciones de la vacuna [es decir, el ARNm complejo con GNP, GNP-M o GNP-G] mostró un marcado aumento en la producción de anticuerpos contra la proteína de la espícula en comparación con el grupo de ARNm desnudo inyectado, mientras que otros grupos de control no produjeron ningún anticuerpo contra la proteína de la espícula. Los anticuerpos IgG en diferentes grupos se detectaron mediante protocolos estándar mediante ensayos ELISA. Estos datos revelan la

estabilidad, inmunogenicidad e idoneidad para las aplicaciones clínicas de 10 de dichas soluciones vacunales en las que el ARNm se adsorbe en las partículas de nanoemulsión lipídica o nanotransportadores.

#### **EJEMPLO 9: ESTUDIOS DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES**

La prueba de neutralización del virus sustituto del SARS-CoV-2 [sVNT] se realizó utilizando el kit de detección de anticuerpos de neutralización del SARS-CoV-2 [Genscript] cPass. Los ensayos se realizaron según el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras se diluyeron 10 veces en tampón de dilución. Las muestras diluidas junto con los controles positivos y negativos proporcionados en el kit se incubaron con volúmenes iguales de RBD 20 conjugado 1000 veces HRP suministrado en el kit. A continuación, la incubación se realizó a 37 °C durante unos 30 min.

A continuación, se toman unos 100 uL de todas las muestras y controles en los pocillos recubiertos de proteína ACE-2 provistos con el kit. Las reacciones se dejaron en la oscuridad durante unos 15 minutos a 37 °C. Después de 15 minutos, los pocillos se lavaron 4 veces antes de añadir 100 uL de sustrato TMB suministrado con el kit. Los colores se dejaron actuar durante 15 minutos en la oscuridad antes de que se detuvieran las reacciones con una solución de HCl de 50 uL suministrada con el kit. La placa se leyó a 450 nm en un lector de placas. El porcentaje de inhibición se calcula como  $(1 - (\text{OD de la muestra} / \text{DO del control negativo})) \times 100 \%$ . Los resultados se muestran en la FIGURA 7. El ARNm, cuando se adsorbe en diferentes nanotransportadores, como GNP, GNPM o GNP-G, mostró un marcado aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes de la proteína de pico del SARS-CoV-2.

## REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Formulaci3n l3quida de ARN para administraci3n en un sujeto humano que comprende:
  - a) un ARN capaz de expresar in vivo una prote3na, adsorbida;
  - b) un portador de part3culas de nanoemulsi3n lip3dica; y
  - c) formando un complejo de ARN estable en el que dicho ARN mantiene su integridad al almacenarse durante un per3odo prolongado de 10per3odo de tiempo.
2. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que la concentraci3n de dicho ARN, antes de la formaci3n del complejo, est3 entre 0,1 y 1,5 mg/mL.
3. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que dicho ARN es capaz de expresar una variante de la prote3na de la esp3cula del virus SARS-CoV-2.
4. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que dicho ARN se prepara mediante un proceso de traducci3n in vitro a una pureza de entre 70 y 95 00.
5. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que la cantidad de dicho ARN es eficaz para producir dicha prote3na a un nivel que genera una respuesta inmune efectiva en dicho sujeto.
6. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que dicha cantidad de ARN es eficaz para reducir el riesgo de desarrollar signos cl3nicos de infecci3n contra los que se dirige dicho ARN.
7. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que dicho ARN es un ARN mensajero capaz de autorreplicarse en las c3lulas HEK 293T.

8. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho ARN tiene 10 elementos genéticos virales para su autoamplificación in vivo.
9. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador de partículas de nanoemulsión comprende: un lípido líquido; un lípido catiónico; un tensioactivo hidrofóbico; un tensioactivo hidrofílico; y, opcionalmente, un adyuvante inmunoestimulante.
10. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador forma una emulsión de aceite en agua.
11. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho lípido líquido es escualeno a una concentración entre 3 y 40 mg/mL.
12. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho lípido catiónico es DOTAP a una concentración entre 3 y 30 mg/mL.
13. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho tensioactivo hidrofóbico es monoestearato de sorbitán a una concentración entre 3 y 40 mg/mL.
14. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho tensioactivo hidrófilo es polisorbato 80 a una concentración entre 3 y 40 mg/mL.
15. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante inmunoestimulante es adyuvante GLA o MPL.
16. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador tiene un tamaño de partícula entre 50 y 70 nm.

17. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador tiene un potencial zeta entre 10 y 30 mV.
18. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador tiene un índice de dispersión de partículas entre 0,1 y 0,3.
19. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho portador es capaz de adsorber entre 30 y 50 ug de ARNm por ug de dicho portador.
20. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho complejo de ARN tiene un tamaño de partícula entre 50 y 120 nm.
21. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho complejo de ARN tiene un potencial zeta entre 10 y 20 mV.
22. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho complejo de ARN tiene un índice de dispersión de partículas entre 0,2 y 0,4.
23. La formulación de la reivindicación 1, en la que dicho ARN en complejo con dicho portador es resistente al tratamiento con ARNasa.

## RESUMEN

ARN adsorbido sobre partículas de nanoemulsión lipídica y sus formulaciones. La presente invención se refiere a un método de preparación de una formulación líquida de ARN complejado con partículas de nanoemulsión lipídica o nanoportadores. En particular, proporciona un método para la preparación del ARN adsorbido en partículas de nanoemulsión lipídica en líquido y las formulaciones de dichos complejos de ARN como tales.