

[Int Immunopharmacol.](#) 2021 Dic; 101: 108231.

Publicado en línea 2021 Oct 7. doi: [10.1016/j.intimp.2021.108231](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108231)

PMCID: PMC8495003

PMID: [34655852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34655852/)

La vacuna oral basada en nanopartículas lipídicas de ARN autorreplicantes puede neutralizar simultáneamente las variantes alfa y delta del SARS-CoV-2

[Golamabbas Mohammadi](#),^a [Zahra Sotoudehnia Koranni](#),^b y Ali [Jebali](#),^{c,*}

[Información del autor](#) [Notas del artículo](#) [Información](#) sobre derechos de autor y licencia
Descargo [de responsabilidad](#)

Datos asociados

[Materiales complementarios](#)

[Vete a:](#)

Abstracto

El objetivo de este estudio fue evaluar nanopartículas lipídicas de ARN autorreplicantes (LNPs de ARN sa) para neutralizar las variantes del SARS-CoV-2 delta (linaje B.1.617) y alfa (linaje B.1.1.7). Antes de la inmunización de ratones con LNPs de saRNA, vimos una alta expresión de proteína S tanto a niveles de ARNm como de proteína después de la transfección de células HEK293T/17 con LNPs de SARN. Después de la inmunización oral de ratones BALB/c con 0,1 – 10 µg de LNP de ARN sa, se observó una alta cantidad de anticuerpos IgG e IgA específicos del SARS-CoV-2 con un patrón dependiente de la dosis. Es importante destacar que la proporción de IgG2a / IgG1 en el suero de ratones vacunados mostró una respuesta sesgada Th1 / Th2. También encontramos que los anticuerpos secretados podrían neutralizar las variantes del SARS-CoV-2 delta (linaje B.1.617) y alfa (linaje B.1.1.7). Los esplenocitos reestimulados de ratones vacunados mostraron una alta secreción de IFN-γ, IL-6 y TNF-α. Los autores piensan que aunque el estudio preclínico confirmó la eficacia de los ARN DE saS contra el SARS-CoV-2, la eficacia y seguridad reales de la vacuna oral deben evaluarse en ensayos clínicos.

Palabras clave: Vacuna oral, ARN autorreplicante, linaje B.1.1.7, linaje B.1.617

[Vete a:](#)

1. Introducción

Las vacunas tienen diferentes formulaciones y cada día son más avanzadas [1]. El uso de ácidos nucleicos y nanopartículas son dos ejemplos de materiales avanzados, utilizados recientemente en la producción [de vacunas](#) [2]. Los primeros estudios se centraron en el uso de ADN en lugar de ARN porque el ARN es menos estable que el ADN [3]. Las vacunas

de ADN produjeron malos resultados en ensayos clínicos en humanos [4] y esto llevó al uso de ARN. Por supuesto, este cambio en la estrategia se atribuyó al éxito de la inmunoterapia contra el cáncer por moléculas de ARNm [5], [6]. Además, el éxito del desarrollo de vacunas contra la COVID-19 basadas en ARNm abre una nueva ventana al diseño de vacunas [7], [8]. Actualmente existen dos tipos de vacunas de ARN, incluyendo el ARNm convencional y el ARN autorreplicante (saRNA) [9]. Estos ARN se producen in vitro y codifican antígenos patógenos [10].

Para producir un saRNA, se necesita la secuencia de un complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) de origen viral para amplificar el saRNA, así como las regiones no traducidas de 5' y 3' (UTR), para su replicación en citoplasma [11]. Después de la expresión de saRNA, se produce la activación del sistema inmune [12]. La producción de vacunas de saRNA no es muy complicada y puede integrarse fácilmente en una línea de producción [13]. Por ejemplo, Hekele et al. diseñaron y produjeron la vacuna saRNA para la influenza H7N9 en un plazo de ocho días [14]. Hay varias formulaciones que se pueden usar para administrar vacunas de saRNA, incluidos polímeros catiónicos [15], lipopolplexos [16] y nanopartículas lipídicas (LNP) [17]. Curiosamente, debido a la propiedad autorreplicante del saRNA, se puede lograr una alta respuesta inmune con dosis bajas de vacunas de saRNA [18]. Es importante destacar que el sitio de acción del saRNA es el citoplasma y no requiere entrar en el núcleo celular. De hecho, no hay riesgo de integración de saRNA en el genoma [5], [6], [19].

Aunque se han desarrollado una variedad de vacunas contra la COVID-19 y algunas se están utilizando a nivel mundial, la mayoría de la población de los países en desarrollo aún no se ha vacunado debido a la falta de fondos, la falta de infraestructura y los problemas sociales [20]. Necesitan una vacuna simple y económica. Por lo tanto, buscamos diseñar, producir y evaluar una vacuna oral que pudiera usarse fácilmente. El objetivo de este estudio fue evaluar los LNPs de saRNA en ratones para neutralizar las variantes delta (B.1.617) y alfa (B.1.1.7) del SARS-CoV-2.

[Vete a:](#)

2. Materiales y métodos

2.1. Construcción del plásmido

Para sintetizar el constructo de saRNA, se utilizó un vector plásmido bacteriano común con un promotor T7. La secuencia requerida para la construcción de saRNA fue sintetizada y subclónica por Biomatik, Canadá. Basado en (Fig. 1 a), la construcción de saRNA tiene 5' UTR (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)), nsP1-4 (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)), promotor subgenómico (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)), proteína S (número de acceso de GenBank: [MZ571142.1](#)), 5' UTR (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)) y cola de poliA. El constructo de control negativo (Fig. 1 b) tiene la misma estructura excepto para el promotor subgenómico y la secuencia codificante de la proteína S. La construcción de control positivo (Fig. 1 c) tiene 4 partes principales, incluyendo 5' UTR (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)), proteína S (número de acceso de GenBank: [MZ571142.1](#)), 3' UTR (número de acceso de GenBank: [NC 001449](#)) y cola de poliA. **El suplemento 1** muestra la secuencia de longitud completa de la construcción de saRNA utilizada en este estudio.

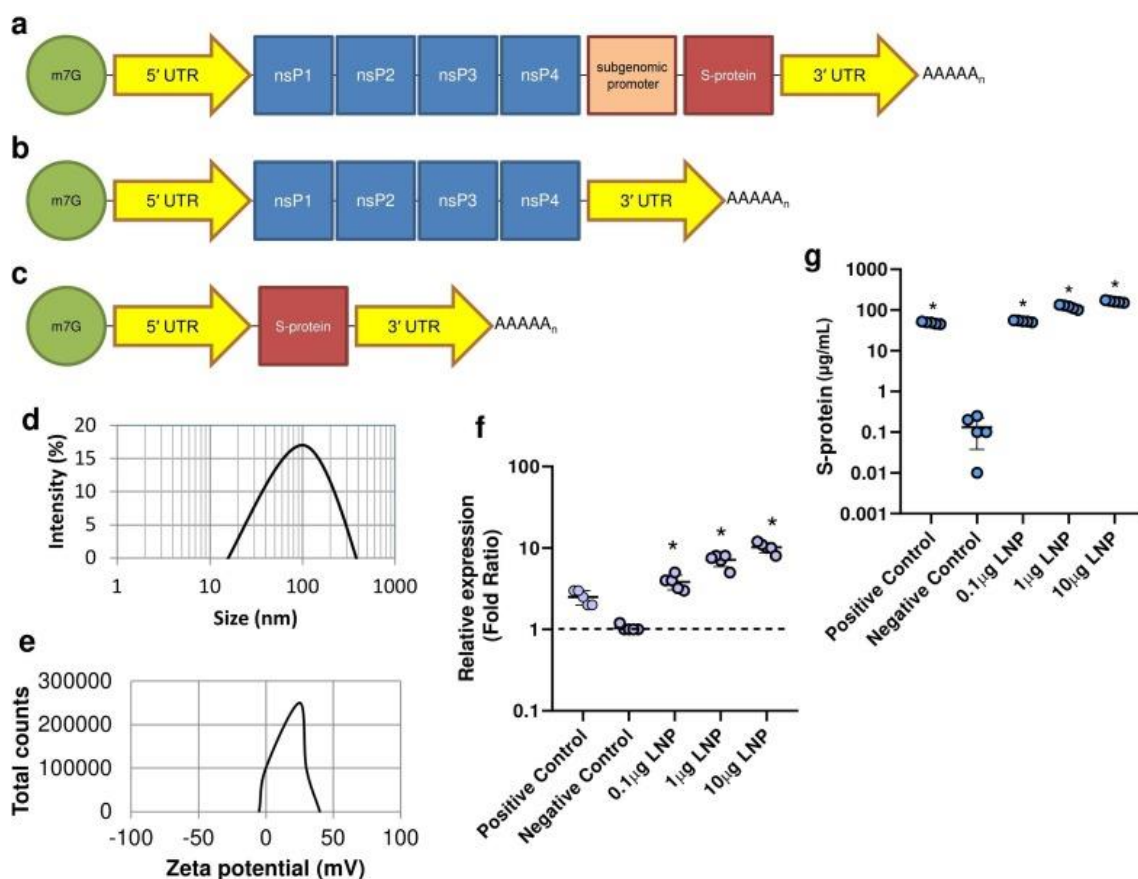


Figura 1

Los diagramas esquemáticos de saRNA (**a**), control negativo (**b**) y construcción de control positivo (**c**). Abreviatura: 7-metilguanosa (m7G); Región no traducida (UTR); Proteína no estructural (nsP), proteína Espiga (proteína s). La distribución de tamaño (**d**) y el potencial zeta (**e**) de los LNPs de saRNA por aparato DLS. Las células HEK293T/17 fueron tratadas con LNPs de saRNA a 0,1-10 μg y la expresión de la proteína S se evaluó mediante PCR en tiempo real (**f**) y ELISA (**g**). Todos los datos se mostraron como media \pm DE. * indica diferencia de significancia con $P < 0,05$ cuando se compara con controles negativos utilizando un ANOVA unidireccional ajustado para comparaciones múltiples con $n = 5$.

2.2. Síntesis de arNag lineal

El plásmido que codifica el constructo de saRNA se transformó en *E. coli* (instituto Pasteur, Irán), cultivado en caldo Luria con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina (Sigma Aldrich, Reino Unido). Los plásmidos se purificaron utilizando un kit Plasmid Plus MaxiPrep (QIAGEN, Reino Unido) y su concentración y pureza se midieron en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Reino Unido). Luego, los plásmidos clonados se linealizaron usando MluI durante 3 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Luego, las transcripciones de saRNA se produjeron utilizando 1 μg de plantilla de ADN linealizado en una reacción MEGAScript™ (Ambion, Reino Unido) durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se mezcló un saRNA lineal de μg con 1 μM ScriptCap™ (CellScript, WI, USA) durante 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. El saRNA sintetizado se purificó mediante precipitación de LiCl, se volvió a suspender en un tampón de almacenamiento de ARN y se almacenó a -80 $^{\circ}\text{C}$. Para evaluar la pureza del saRNA sintetizado, la relación A260/A280 se midió utilizando el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Reino Unido) [21].

2.3. Encapsulación de saRNA en LNPs

Para encapsular el ARN sa, utilizamos un proceso químico simple [21] en el que 0,1, 1 y 10 µg de saRNA purificado se mezclaron por separado con una mezcla de lípidos etanólicos de 1,2-dilinoylel oxi-3-dimetilaminopropano, 1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfolina,colesteroly 1,2-Dimirristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000 en una proporción de 10:48:2:40 a pH 4.0. La mezcla fue agitada vigorosamente por un mezclador en T y luego colocada en una bolsa de diálisis para purificar durante la noche. Luego, la distribución del tamaño y el potencial zeta de los LNP producidos se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). La encapsulación de saRNA se confirmó mediante electroforesis en gel y la eficiencia de atrapamiento se midió mediante un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Reino Unido) a 260 nm. Para los controles positivos y negativos, también se realizó el mismo proceso de encapsulación.

2.4. La expresión de saRNA en células HEK293T/17

En el Medio de Águila Modificada (DMEM) (Gibco) de Dulbecco que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 1% de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific) y 1% de penicilina-estreptomina (Thermo Fisher Scientific), se cultivaron células HEK293T/17 a 37 °C durante 5 días. Luego, las células se incubaron por separado con 0.1-10 µg de saRNA, control negativo y LNPs de control positivo. Después de 24 h, la expresión de la proteína S se confirmó mediante PCR en tiempo real y ELISA(**Suplementario 2**).

2.5. Inmunización

Todos los procedimientos relacionados con los experimentos con animales utilizados en esta sección fueron aprobados por el comité ético de la Escuela de Ciencias Médicas sirjan, Sirjan, Irán (Código ético: IR. SIRUMS. REC.1400.001). Utilizamos 10 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad en cada grupo de estudio y fueron inmunizados por vía oral con LNPs de SARNAs de 0,1, 1 y 10 µg en las semanas 1 y 3. Para cada ratón, se administraron 100 µL de mezcla de vacunas por vía oral utilizando una jeringa de insulina sin aguja. En los grupos de control, los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía oral con 10 µg de LNPs de control positivos y 10 µg de LNPs de control negativos en las semanas 1 y 3 como se describe. Las muestras de suero se recolectaron en las semanas 2, 4 y 6 y el bazo de los ratones vacunados se eliminó en la semana 6.

2.6. Muestras de pacientes COVID-19 recuperados

Aquí, las muestras de suero de pacientes recuperados de COVID-19 (n = 10) se obtuvieron de la Universidad de Ciencias Médicas de Zahedan, Zahedan, Irán. Todos ellos habían sido infectados con la variante delta. Se dio el consentimiento informado por escrito de todos los participantes (códigos éticos: IR. ZAUMS. REC.1399.317 e IR. ZAUMS. REC.1399.316). Todos los pacientes recuperados mostraron una prueba PCR negativa en el momento del muestreo.

2.7. Niveles séricos de anticuerpos en ratones y pacientes recuperados de COVID-19

Se utilizó un ELISA semicuantitativo para determinar los niveles de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA en los sueros de ratones vacunados. Además, se determinaron los niveles de anticuerpos IgG e IgA en los sueros de pacientes recuperados de COVID-19.

En primer lugar, las placas ELISA de alta unión (Biomat, Italia) se recubrieron con antígeno recombinante de la proteína S del SARS-CoV-2 (Sigma-Aldrich) a 1 µg mL⁻¹. Después de lavar las placas, se agregaron por separado a los pocillos 50 µL de muestras de suero diluido recolectadas de ratones inmunizados y pacientes recuperados con COVID-

19. Después de la incubación durante 1 h a 37 °C, las placas se lavaron con PBS y luego se agregaron por separado 100 µL del siguiente anticuerpo secundario: 1) IgG-HRP anti-ratón, 2) IgG1-HRP anti-ratón, 3) IgG2a-HRP anti-ratón, 4) IgA-HRP anti-ratón, 5) IgG-HRP anti-humano, 6) IgA-HRP anti-humano (Southern Biotech). Después de la incubación y el lavado con PBS, se agregaron 50 µL de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina y luego se detuvieron las reacciones agregando 50 µL de ácido sulfúrico al 10%. Finalmente, la absorbancia de cada pozo fue leída por un espectrofotómetro a 450 nm (BioTek Industries) y los niveles séricos de anticuerpos se midieron utilizando una curva estándar.

2.8. Ensayo de neutralización viral de tipo salvaje

Para evaluar la capacidad de ratones vacunados o pacientes recuperados de COVID-19 para neutralizar el virus SARS-CoV-2, se aplicó un ensayo de neutralización viral de tipo salvaje según McKey et al [21]. La variante B.1.1.7 del SARS-CoV-2 y la variante B.1.617 se aislaron por primera vez de pacientes con COVID-19. Luego, se cultivaron en células Caco2 en DMEM (Gibco) que contenían 10% de FBS (Gibco), 1% de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific) y 1% de penicilina-estreptomina (Thermo Fisher Scientific) durante 5 días a 37 ° C. Finalmente, los virus propagados fueron purificados por centrifugación por gradiente de cloruro de cesio. En el siguiente paso, todos los sueros se incubaron primero a 56 °C durante 30 min y se diluyeron en serie en DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) con penicilina-estreptomina al 1% (Thermo Fisher Scientific) y 0,3% BSA fracción V (Thermo Fisher Scientific). Las diluciones séricas se incubaron por separado con 100 TCID₅₀ por pocillo de sars-CoV-2 variante B.1.1.7 y variante B.1.617 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se transfirieron a placas de 96 pocillos presiembradas con células HEK293T/ 17 e incubadas a 37 ° C durante 5 días. Después de la incubación, se agregaron 100 µL de violeta cristalina (Sigma-Aldrich) a cada pozo y se puntuó para el efecto citopático. El título de neutralización se calculó como el recíproco de la dilución sérica más alta en la que se produjo la neutralización completa del virus.

2.9. IFN-γ ELISpots

Sobre la base del kit ELISpotPLUS (Mabtech) de mouse IFN-γ, primero se bloquearon placas anti-IFN-γ -pre-recubiertas con 10% de FBS (Gibco), y luego se agregaron 2.5×10^5 esplenocitos de ratones vacunados y 1 µg mL⁻¹ péptidos SARS-CoV-2 (AGX819, Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la incubación, se agregaron anticuerpos de detección biotinilados específicos de citoquinas (Mabtech), conjugado estreptavidina-enzima (Mabtech) y sustrato (Mabtech). Finalmente, cada pozo fue examinado bajo un microscopio óptico (Zeiss, Alemania) y se calculó el número de células teñidas.

2.10. Secreción de IL-6 y TNF-α

El nivel de IL-6 y TNF-α en muestras de suero de ratones inmunizados, pacientes recuperados de COVID-19 y el sobrenadante de esplenocitos activados se midió mediante el kit ELISA. Brevemente las placas ELISA de alta unión (Biomat, Italia) se recubrieron por separado con IL-6 anti-ratón y anti-humano y TNF-α (Southern Biotech) y luego se agregaron las muestras correspondientes por separado. Después de la incubación durante 1 h a 37 °C, las placas fueron lavadas por PBS, y luego se agregaron 100 µL de anticuerpos secundarios, incluyendo IL-6-HRP anti-ratón (Southern Biotech), IL-6-HRP anti-humano (Southern Biotech), anti-ratón TNF-α-HRP (Southern Biotech) y anti-humano TNF-α-HRP (Southern Biotech). Luego, se agregaron 50 µL de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se detuvo

agregando 50 μ L de ácido sulfúrico al 10% y la absorbancia de cada pozo fue leída por un espectrofotómetro a 450 nm (BioTek Industries). El nivel de IL-6 y TNF- α fue determinado por una curva estándar.

2.11. Análisis estadístico

GraphPad Prism (versión 8.4) se utilizó para preparar gráficos y estadísticas. Se utilizó ANOVA unidireccional y se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$ (con $n = 10$ ratones biológicamente independientes y $n = 10$ pacientes recuperados de COVID-19). Todos los datos se muestran como media \pm desviación estándar (DE).

[Vete a:](#)

3. Resultados

3.1. Caracterización del PNL

El saRNA lineal sintetizado se encapsuló en LNPs y luego se caracterizó. El tamaño medio de partícula y el potencial zeta de los LNPs de saRNA fueron de 100 ± 5 nm y $+ 22 \pm 0,6$ mV, respectivamente ([Fig. 1 d](#) y [Fig. 1 e](#)). La mayor eficiencia de atrapamiento del saRNA fue del 67 ± 2 %.

3.2. La expresión de la proteína S

Antes de la inmunización de ratones con LNPs de saRNA, se verificó su eficacia en células HEK273T/17. Se observó una alta expresión de proteína S tanto a nivel de ARNm como de proteína después de la transfección de células HEK293T/17 con LNPs de saRNA ([Fig. 1 f](#) y [Fig. 1 g](#)). Se encontró que la expresión relativa de la proteína S aumentó con el aumento de la dosis de LNP.

3.3. Niveles séricos de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA

Los ratones BALB/c fueron inmunizados por vía oral con LNPs de 0,1-10 μ g de saRNA en las semanas 1 y 3 y sus muestras de suero se recogieron en las semanas 2, 4 y 6. El ensayo ELISA mostró una alta cantidad de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA específicos del SARS-CoV-2 de manera dependiente de la dosis en suero de ratones ([Fig. 2 a-c](#)). Curiosamente, los niveles de anticuerpos IgG e IgA en ratones inmunizados con LNPs de 10 μ g de saRNA estuvieron casi cerca de los niveles de anticuerpos en pacientes recuperados de COVID-19 ($P > 0,05$). Aquí, se encontraron diferencias significativas entre el nivel de anticuerpos en ratones vacunados o pacientes recuperados de COVID-19 y el control negativo ($P < 0,05$). También se observó una respuesta sesgada Th1/Th2 ([Fig. 2 d](#)) en ratones vacunados con control positivo y 0,1-10 μ g de LNPs de saRNA. Significa que todos los ratones vacunados con LNPs de saRNA y LNPs de control positivo mostraron una respuesta sesgada por Th1.

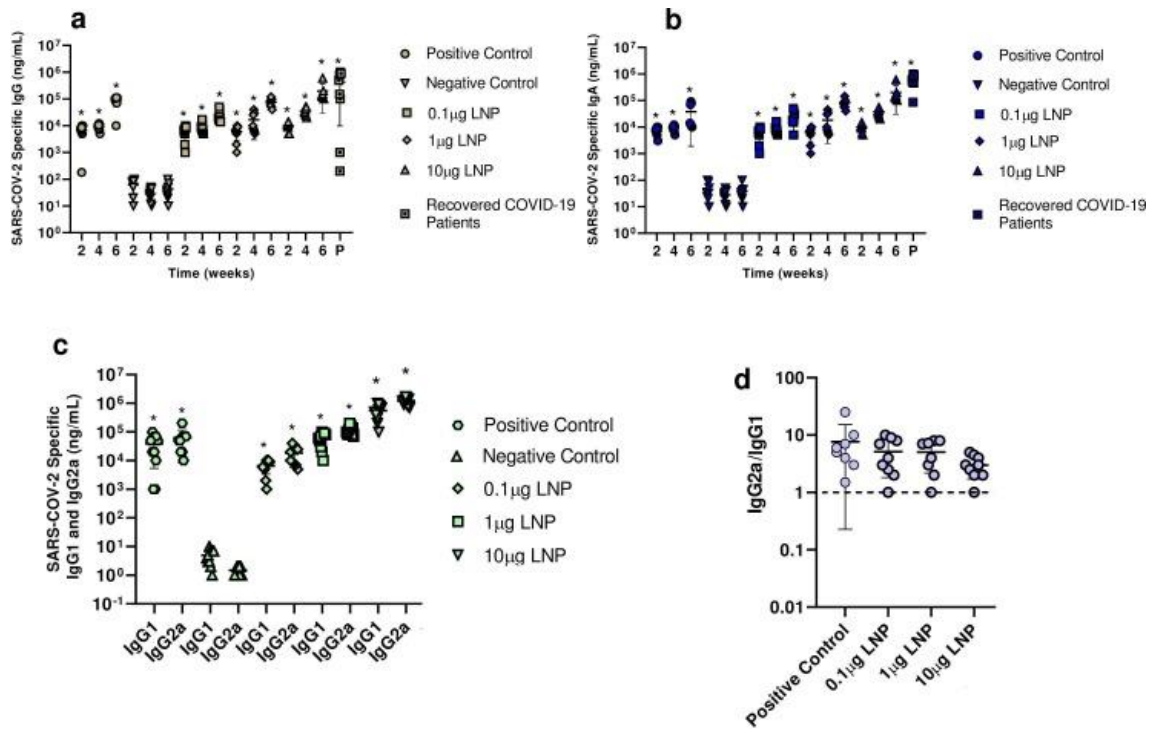


Figura 2

El nivel sérico de IgG (a), IgA (b), IgG1 e IgG2a (c) contrael SARS-CoV-2 en ratones vacunados con 0,1–10 µg de ARNV LNPs. La relación de IgG2a/IgG1 se utilizó para encontrar respuestas sesgadas Th1/Th2 en ratones vacunados (d). * indica una diferenciade significancia en $p < 0,05$ en comparación con el control negativo utilizando un ANOVA unidireccional ajustado para comparaciones múltiples con $n = 10$ ratones biológicamente independientes y pacientes recuperados de COVID-19.

3.4. Ensayo de neutralización viral de tipo salvaje

Las variantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7 y B.1.617 fueron aisladas y cultivadas en células Caco2. En el siguiente paso, las diluciones séricas se incubaron por separado con 100 TCID₅₀ por pocillo de ambas variantes del SARS-CoV-2. Luego, se transfirieron al pozo presiembrado con células HEK293T / 17 y se incubaron durante 5 días. Después de la incubación, se registró el efecto citopático y se calculó el título de neutralización. Observamos un título de neutralización viral alto en ratones vacunados con LNPs de saRNA a 0,1-10 µg de manera lineal dependiente de la dosis. También encontramos que los anticuerpos secretados inducidos por los LNPs de saRNA podrían neutralizar tanto las variantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7 (alfa) como B.1.617 (delta)(Fig. 3 a-b). Curiosamente, los anticuerpos secretados detectados en pacientes recuperados de COVID-19 podrían neutralizar ambas variantes. Se observó una correlación positiva significativa entre la IgG específica del SARS-CoV-2 y el título de neutralización del SARS-CoV-2 tanto en ratones vacunados como en pacientes recuperados de COVID-19(Fig. 3 c-d).

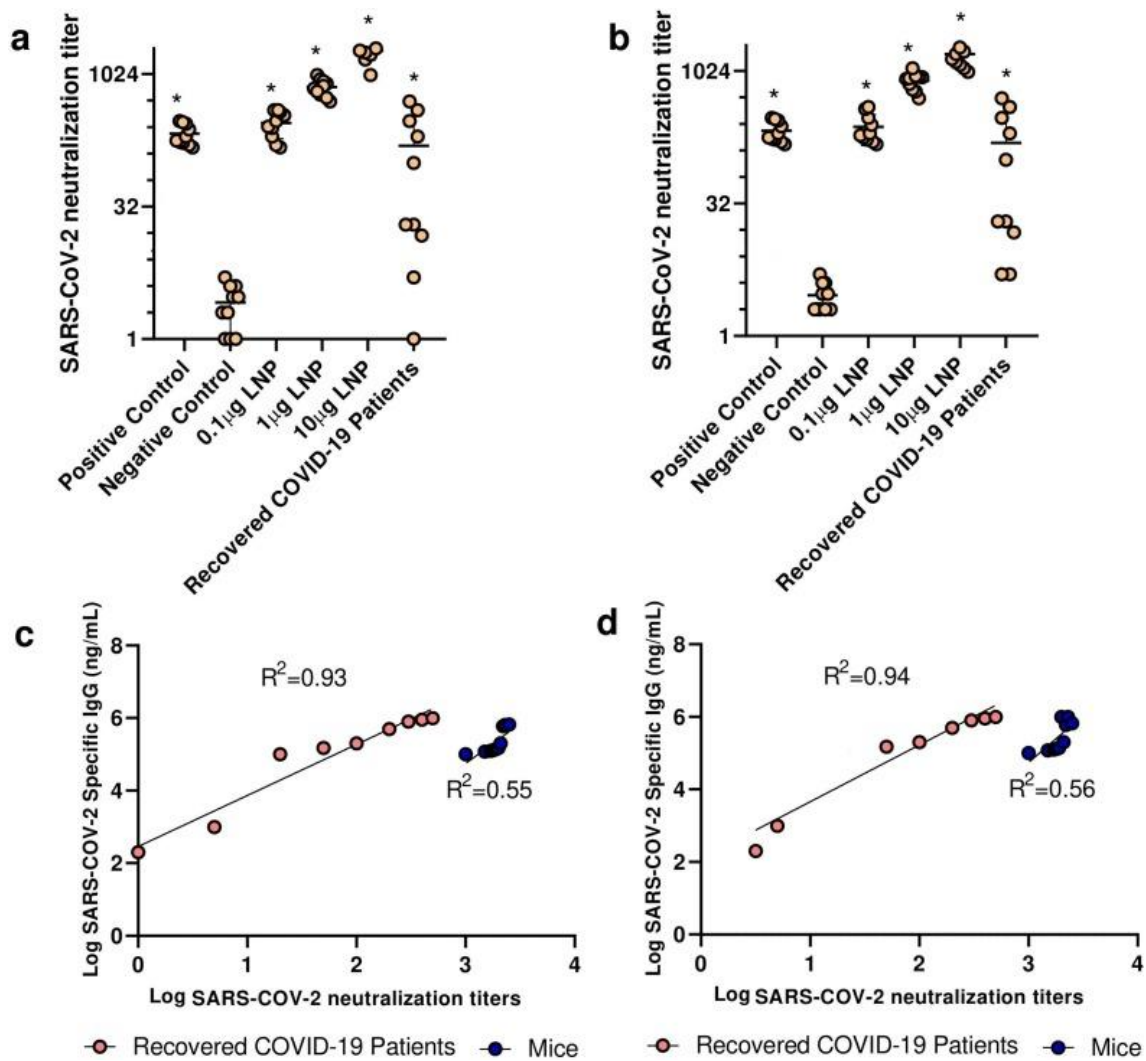


Figura 3

El título de neutralización viral contra las variantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7 (a) y B.1.617 (b) en ratones vacunados con LNPs de SARNAs de 0,1-10 μg y pacientes recuperados de COVID-19. Se observó una correlación positiva significativa entre la IgG específica del SARS-CoV-2 y el título de neutralización del SARS-CoV-2 de los anticuerpos secretados contra las variantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7 (c) y B.1.617 (d) tanto en ratones vacunados como en pacientes recuperados de COVID-19. * indica diferencia de significancia a $p < 0,05$ en comparación con el control negativo utilizando un ANOVA unidireccional ajustado para comparaciones múltiples con $n = 10$ ratones biológicamente independientes y pacientes recuperados de COVID-19.

3.5. Respuestas celulares y de citoquinas

Los esplenocitos de ratones vacunados se activaron primero con péptidos de SARS-CoV-2 y luego se agregaron a placas anti-IFN-γ-pre-recubiertas. Después de la incubación durante la noche a 37 ° C, se agregaron anticuerpos de detección, conjugado estreptavidina-enzima y sustrato. Finalmente, cada pozo fue examinado bajo un microscopio óptico y se calculó el número de células teñidas. Encontramos que los esplenocitos reestimulados de ratones vacunados tenían una secreción alta de IFN-γ y de manera lineal dependiente de la dosis (Fig. 4 a). Hubo una diferencia significativa entre los ratones vacunados con 10 μg de LNPs de SARNAs y otros grupos ($P < 0,05$).

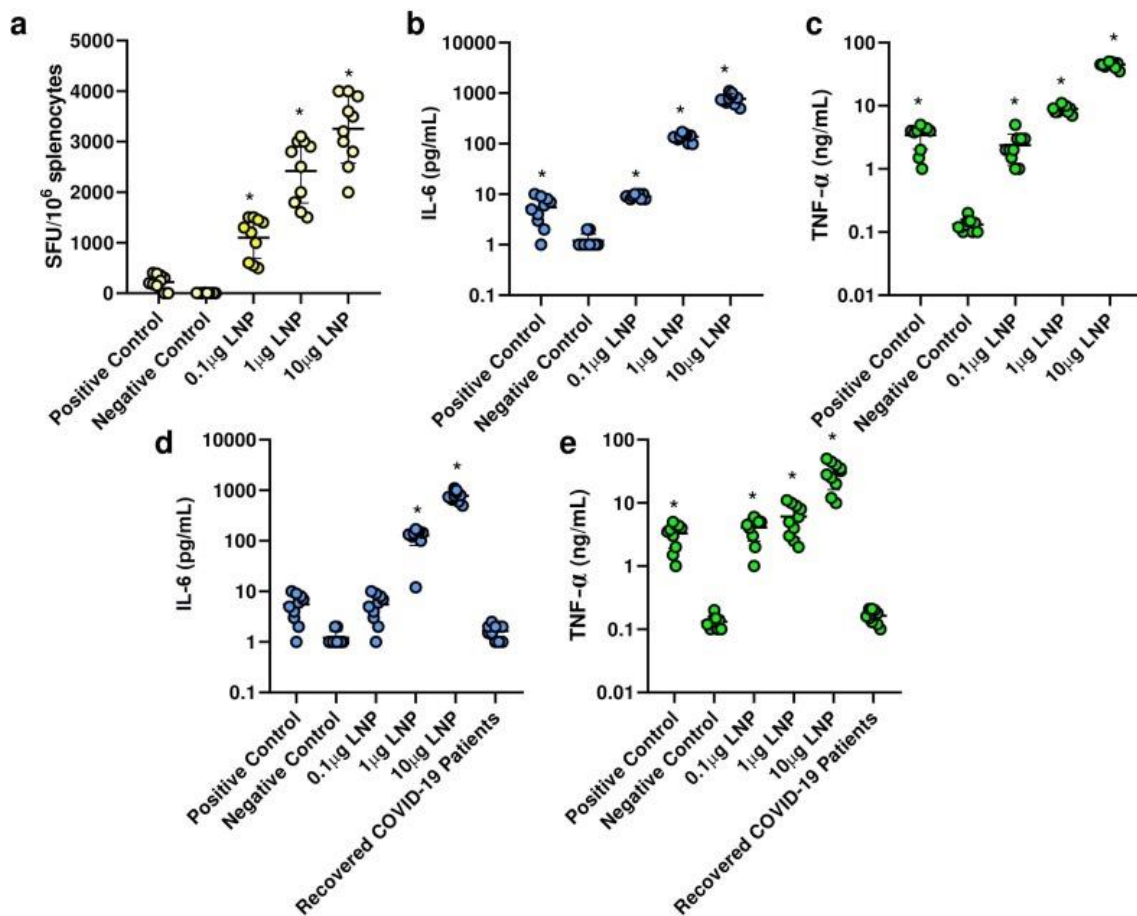


Figura 4

Los esplenocitos de ratones vacunados reestimulados con péptidos de SARS-CoV-2 tenían una secreción alta de IFN- γ de una manera lineal dependiente de la dosis(a). La secreción de IL-6 (b) y TNF- α (c) por esplenocitos reestimulados. El nivel sérico de IL-6(d) y TNF- α (e) en ratones vacunados (en la semana 6) y en pacientes recuperados de COVID-19 (una semana después de la recuperación). * indica diferencia de significancia a $p < 0,05$ en comparación con los grupos de control negativos utilizando un ANOVA unidireccional ajustado para comparaciones múltiples con $n = 10$ ratones biológicamente independientes y pacientes recuperados de COVID-19.

También medimos la secreción de IL-6 y TNF- α por esplenocitos reestimulados y los niveles séricos de IL-6 y TNF- α en ratones vacunados y pacientes recuperados de COVID-19. Se demostró que tanto en sobrenadantes de esplenocitos reestimulados como de sueros de ratón vacunados, hubo un alto nivel de IL-6 y TNF- α de manera dependiente de la dosis(Fig. 4 b-e). Aquí, se observaron diferencias significativas entre los ratones vacunados con LNPs de SARNAs de 10 μg y otros grupos vacunados ($P < 0,05$). Se encontraron diferencias significativas entre el nivel de IL-6 y TNF- α en el suero de los pacientes recuperados de COVID-19 en comparación con los ratones vacunados por LNPs de SARNAs ($P < 0,05$).

[Vete a:](#)

4. Discusión

En este estudio, buscamos desarrollar una vacuna oral basada en saRNA que pudiera combatir simultáneamente las variantes del SARS-COV-2 B.1.1.7 (alfa) y B.1.617 (delta). Las vacunas basadas en saRNA ya se han utilizado para algunas enfermedades infecciosas [14], [22]. Esta tecnología también ha sido estudiada para COVID-19, mostrando algunas ventajas frente al ARNm convencional [21], [23]. La fortaleza de las vacunas basadas en saRNA es que pueden inducir respuestas inmunes potentes a dosis bajas debido a su propiedad autorreplicante. Por supuesto, estas vacunas, al igual que otras vacunas, pueden tener efectos secundarios y deben ser evaluadas. Actualmente, aunque varias vacunas contra el SARS-COV-2 están diseñadas con diferentes plataformas [24], la mayoría de las personas de países no desarrollados y en desarrollo aún no han sido vacunadas, lo que puede deberse a diversas razones, como problemas económicos y sociales [20]. Desafortunadamente, la estructura genómica del SARS-COV-2 no es estable y es susceptible a mutaciones [25]. Este fenómeno conduce a una reducción significativa de la eficacia de la vacuna con cualquier plataforma [26].

En este estudio, el saRNA diseñado tenía alfavirus replicasa, RDRP, así como el gen que codifica para la proteína S. La replicasa fue requerida para la amplificación de saRNA y media la producción de este ARN [27]. Esto conduce a la producción de un gran número de proteínas S que son absorbidas por las células presentadoras de antígenos (APC). Por supuesto, debe tenerse en cuenta que los saRNAs, para ser entregados de manera eficiente a las células, deben ser protegidos. Una de las mejores maneras es usar LNPs [21] y se pueden optimizar para células diana [28]. Primero probamos la eficacia de los saRNAs en células HEK293T y luego en ratones. La alta expresión de proteína S tanto a nivel de ARNm como de proteína se observó después de la transfección de células HEK293T/17. Este valioso hallazgo nos dio la esperanza de que los LNP de saRNA podrían estimular el sistema inmunológico y podrían actuar como una vacuna efectiva. En este estudio, la vacuna se administró por vía oral porque nuestro objetivo era estimular las células inmunes ubicadas en la mucosa. La administración oral es mucho más fácil que las vacunas inyectables y es especialmente más aceptable para los niños. Después de la vacunación de ratones con LNPs de saRNA, vimos altos niveles de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgA contra el SARS-CoV-2 de una manera dependiente de la dosis. Curiosamente, la concentración de anticuerpos IgG e IgA en el suero de pacientes recuperados de COVID-19 fue aproximadamente igual a la concentración de anticuerpos en el suero de ratones vacunados con LNPs de saRNA a 10 µg. Otro hallazgo importante fue el sesgo Th1/Th2 o la respuesta sesgada por Th1. Además, se observó un alto título de neutralización viral en ratones vacunados con LNPs de saRNA a 0,1-10 µg y en pacientes recuperados de COVID-19. Curiosamente, estos anticuerpos podrían neutralizar ambas variantes del SARS-CoV-2 y esto demuestra que el sistema diseñado (saRNA LNPs) se ha expresado completamente. Es importante destacar que los esplenocitos reestimulados de ratones vacunados mostraron una secreción alta de IFN-γ de una manera lineal y dependiente de la dosis. Los sobrenadantes de esplenocitos reestimulados y sueros de ratón vacunados contenían un alto nivel de IL-6 y TNF-α de manera dependiente de la dosis.

Antes que nosotros, McKay et al. habían demostrado que la vacuna LNP saRNA SARS-CoV-2 induce títulos de anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 notablemente altos y dependientes de la dosis en sueros de ratón, así como una neutralización robusta tanto de un pseudovirus como de un virus de tipo salvaje [21]. Además, Spencer et al mostraron que la vacunación con saRNA y las vacunas adenovirales contra el COVID inducen respuestas inmunes robustas en ratones. Demostraron que la vacunación heteróloga de dos dosis era mejor que la dosis única. Los títulos neutralizantes después del prime-boost heterólogo fueron al menos comparables o más altos que los títulos medidos después de la

vacunación homóloga con prime-boost con vectores virales [23]. Es importante saber que las respuestas inmunitarias intestinales contra el SARS-CoV-2 son más efectivas que otras [29]. Algunos estudios en modelos animales covid-19 [30] y pacientes covid-19 con síntomas gastrointestinales [31] revelaron que los linfocitos CD8+ intraepiteliales y la lámina propia que residen en células T efectoras CD4+ y CD8+ se amplían significativamente en comparación con los controles sanos [32]. Es importante destacar que las células dendríticas inflamatorias se reducen significativamente en la lámina propia de pacientes con COVID-19 con síntomas gastrointestinales [32]. Estos datos sugieren que la infección intestinal con SARS-CoV2 altera las firmas inmunes y conduce a una respuesta inmune más favorable. Curiosamente, los niveles séricos de IL-6 e IL-17 son más bajos en pacientes con COVID-19 con síntomas gastrointestinales en comparación con los pacientes con COVID-19 sin síntomas gastrointestinales. Otro punto interesante es que la presencia del virus en el tracto gastrointestinal puede desencadenar una producción a largo plazo de anticuerpos IgA antivirales, en comparación con los anticuerpos IgG e IgM [33], [34].

En conjunto, la vacuna oral, basada en SNP de SARNAs, podría inducir una respuesta sesgada por Th1 para producir una gran cantidad de anticuerpos IgG e IgA específicos del SARS-CoV-2. También encontramos que los anticuerpos producidos podrían neutralizar las variantes del SARS-CoV-2 B.1.1.7 (alfa) y B.1.617 (delta).

[Vete a:](#)

Declaración de interés concurrente

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia conocidos o relaciones personales que podrían haber parecido influir en el trabajo reportado en este artículo.

[Vete a:](#)

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Cristian Smerdou (Cima Universidad de Navarra, España) y al **PD.** Dr. Vladimir Temchura, Instituto de Virología Clínica y Molecular, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen, Alemania por sus valiosas ayudas. Agradecemos a la Universidad de Ciencias Médicas de Zahedan, Zahedan, Irán, por proporcionar sueros de pacientes recuperados de COVID-19.

Financiación

Este trabajo fue apoyado financieramente por la Escuela de Ciencias Médicas de Sirjan, Sirjan, Irán (número de subvención: 99000071).

Aprobación ética

Todos los experimentos se realizaron bajo las directrices del Instituto Nacional de Salud, las disposiciones de la Declaración de Helsinki y el comité de ética de la Escuela de Ciencias Médicas sirjan, Sirjan, Irán. (Código ético: IR. SIRUMS. REC.1400.001).

Consentimiento informado

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos incluidos en este estudio.

[Vete a:](#)

Notas

Apéndice A Los datos complementarios de este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108231>.

[Vete a:](#)

Apéndice A. Material complementario

Los siguientes son los datos complementarios de este artículo:

Datos complementarios 1:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(25K, docx)

Datos complementarios 2:

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(19K, docx)

[Vete a:](#)

Referencias

1. D'Amico C., Fontana F., Cheng R., Santos H.A. Desarrollo de formulaciones de vacunas: pasado, presente y futuro. *Administración de fármacos e investigación traslacional*. 2021;11(2):353–372. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
2. Shen Y., Hao T., Ou S., Hu C., Chen L. Aplicaciones y perspectivas de los nanomateriales en el desarrollo de nuevas vacunas. *MedChemComm*. 2018;9(2):226–238. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
3. Kumaragurubaran K., Kaliaperumal K. Dna vaccine: the miniature miracle. *Mundo Veterinario*. 2013;6(3):228. doi: 10.5455/vetworld.10.5455/vetworld.2013.228-232. [[CrossRef](#)] [[GoogleScholar](#)]
4. Hobernik D., Bros M. Dna vaccines: ¿qué tan lejos del uso clínico? *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19(11):3605. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
5. Gilboa E., Vieweg J. Inmunoterapia contra el cáncer con células dendríticas transfectadas por ARNm. *Immunol. Rev*. 2004;199(1):251–263. [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
6. Schlake T., Thess A., Thran M., Jordan I. mRNA como tecnología novedosa para la inmunoterapia pasiva. *Celda. Mol. Ciencia de la vida*. 2019;76(2):301–328. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
7. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W., Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U., Gruber W.C. Seguridad y eficacia de la vacuna BNT162b2 mRNA Covid-19. *N. Inglés J. Med*. 2020;383(27):2603–2615. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
8. Teo S.P. Revisión de las vacunas de ARNm COVID-19: BNT162b2 y ARNm-1273. *Revista de Práctica Farmacéutica*. 2021;08971900211009650 [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
9. Verbeke R., Lentacker I., De Smedt S.C., Dewitte H. Tres décadas de desarrollo de vacunas de ARN mensajero. *Nano hoy*. 2019;28 [[Google Scholar](#)]
10. Phimister E.G., Fuller D.H., Berglund P. Amplifying RNA vaccine development. *N. Inglés J. Med*. 2020;382(25):2469–2471. [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]

11. Ferrero D., Ferrer-Orta C., Verdaguer N. ARN polimerasas virales dependientes de ARN: una visión general estructural. *Proteínas virales y complejos de nucleoproteínas*. 2018;39–71. [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
12. Vogel A.B., Lambert L., Kinnear E., Busse D., Erbar S., Reuter K.C., Wicke L., Perkovic M., Beissert T., Haas H., Reece S.T., Sahin U., Tregoning J.S. Las vacunas de ARN autoamplificador proporcionan una protección equivalente contra la gripe a las vacunas de ARNm, pero a dosis mucho más bajas. *Mol. Ther.* 2018;26(2):446–455. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
13. Jackson N.A., Kester K.E., Casimiro D., Gurunathan S., DeRosa F. La promesa de las vacunas de ARNm: una perspectiva biotecnológica e industrial. *Vacunas npj*. 2020;5(1):1–6. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
14. Hekele A., Bertholet S., Archer J., Gibson D.G., Palladino G., Brito L.A., Otten G.R., Brazzoli M., Buccato S., Bonci A., Casini D., Maione D., Qi Z.-Q., Gill J.E., Caiazza N.C., Urano J., Hubby B., Gao G.F., Shu Y., De Gregorio E., Mandl C.W., Mason P.W., Settembre E.C., Ulmer J.B., Craig Venter J., Dormitzer P.R., Rappuoli R., Geall A.J. La vacuna SAM® producida rápidamente contra la influenza H7N9 es inmunogénica en ratones. *Los microbios emergentes infectan*. 2013;2(1):1–7. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
15. Blakney A.K., Zhu Y., McKay P.F., Bouton C.R., Yeow J., Tang J., Hu K., Samnuan K., Grigsby C.L., Shattock R.J. Big is Beautiful: Enhanced saRNA delivery and immunogenicity by a higher molecular weight, bioreducible, cationic polymer. *ACS Nano*. 2020;14(5):5711–5727. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
16. Perche F., Clemençon R., Schulze K., Ebensen T., Guzmán C.A., Pichon C. Lipopolplexos neutros para la administración in vivo de la vacuna de ARN convencional y replicativa. *Terapia Molecular-Ácidos Nucleicos*. 2019;17:767–775. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
17. Goswami R., Chatzikleantous D., Lou G., Giusti F., Bonci A., Taccone M., Brazzoli M., Gallorini S., Ferlenghi I., Berti F., O'Hagan D.T., Pergola C., Baudner B.C., Adamo R. La modificación de LNP da como resultado una potencia mejorada para las vacunas de ARN autoamplificador (SAM). *ACS infectar. Dis.* 2019;5(9):1546–1558. [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
18. Lundstrom K. El potencial de las vacunas de ARN autoamplificadoras para enfermedades infecciosas y COVID-19. *Investigación de vacunas*. 2020;7(1):25–37. [[Google Scholar](#)]
19. Blakney A.K., Ip S., Geall A.J. Una actualización sobre el desarrollo de vacunas de ARNm autoamplificantes. *Vacunas*. 2021;9(2):97. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
20. Jentsch P.C., Anand M., Bauch C.T. Priorizando la vacunación contra la COVID-19 en paisajes sociales y epidemiológicos cambiantes: un estudio de modelización matemática. *Lanceta. Infecta. Dis.* 2021 [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[GoogleScholar](#)]
21. McKay P.F., Hu K., Blakney A.K., Samnuan K., Brown J.C., Penn R., Zhou J., Bouton C.R., Rogers P., Polra K., Lin P.J.C., Barbosa C., Tam Y.K., Barclay W.S., Shattock R.J. El candidato a vacuna de nanopartículas lipídicas de ARN autoamplificador SARS-CoV-2 induce títulos de anticuerpos neutralizantes altos en ratones. *NAT. Comunidad*. 2020;11(1) doi:

- 10.1038/s41467-020-17409-9. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[CrossRef](#)][[GoogleScholar](#)]
22. Luisi K, Morabito K.M., Burgomaster K.E., Sharma M., Kong W.-P., Foreman B.M., Patel S., Fisher B., Aleshnick M.A., Laliberte J., Wallace M., Ruckwardt T.J., Gordon D.N., Linton C., Ruggiero N., Cohen J.L., Johnson R., Aggarwal K., Ko S.-Y., Yang E.S., Pelc R.S., Dowd K.A., O'Hagan D., Ulmer J., Mossman S., Sambor A., Lepine E., Mascola J.R., Pierson T.C., Graham B.S., Yu D. Desarrollo de una potente vacuna contra el virus del Zika utilizando ARN mensajero autoamplificador. *Sci. Adv.* 2020;6(32):eaba5068. doi: 10.1126/sciadv.aba5068. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[CrossRef](#)][[GoogleScholar](#)]
23. Spencer A.J., McKay P.F., Belij-Rammerstorfer S., Ulaszewska M., Bissett C.D., Hu K., Samnuan K., Blakney A.K., Wright D., Sharpe H.R., Gilbride C., Truby A., Allen E.R., Gilbert S.C., Shattock R.J., Lambe T. Los regímenes de vacunación heterólogos con ARN autoamplificador y vacunas adenovirales contra la COVID inducen respuestas inmunes robustas en ratones. *NAT. Comunidad.* 2021;12(1) doi: 10.1038/s41467-021-23173-1. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[CrossRef](#)][[GoogleScholar](#)]
24. Li Y., Tenchov R., Smoot J., Liu C., Watkins S., Zhou Q. Una revisión exhaustiva de los esfuerzos mundiales en el desarrollo de vacunas contra la COVID-19. *ACS Cent. Sci.* 2021;7(4):512–533. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
25. Na W., Moon H., Song D. Una revisión exhaustiva de las mutaciones genéticas del SARS-CoV-2 y las lecciones de la recombinación del coronavirus animal en una perspectiva de salud. *J de Microbiología.* 2021;59(3):332–340. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
26. Noh J.Y., Jeong H.W., Shin E.-C. Mutaciones, vacunas e inmunidad del SARS-CoV-2: implicación de variantes preocupantes. *Transducción de señales y terapia dirigida.* 2021;6(1):1–2. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
27. Kim J., Eygeris Y., Gupta M., Sahay G. Vacunas de ARNm autoensambladas. *Adv. Droga Deliv. Rev.* 2021;170:83–112. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
28. Blakney A.K., McKay P.F., Yus B.I., Aldon Y., Shattock R.J. Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA. *Gene Ther.* 2019;26(9):363–372. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
29. Weidinger C., Hegazy A.N., Glauben R., Siegmund B. COVID-19— from mucosal immunology to IBD patients. *Mucosa Immunol.* 2021;14(3):566–573. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
30. Sia S.F., Yan L.-M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.-T., Wong A.Y.L., Kaewpreedee P., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Nicholls J.M., Peiris M., Yen H.-L. Patogénesis y transmisión del SARS-CoV-2 en hámsteres dorados. *Naturaleza.* 2020;583(7818):834–838. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]
31. Leung W.K., To K.-F., Chan P.K., Chan H.L., Wu A.K., Lee N., Yuen K.Y., Sung J.J. Afectación entérica de la infección por coronavirus asociada al síndrome respiratorio agudo grave. *Gastroenterología.* 2003;125(4):1011–1017. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[GoogleScholar](#)]

32. Livanos A.E., Jha D., Cossarini F., Gonzalez-Reiche A.S., Tokuyama M., Aydillo T., Parigi T.L., Ramos I., Dunleavy K., Lee B. La afectación gastrointestinal atenúa la gravedad y la mortalidad por COVID-19. *MedRxiv*. 2020 [[Google Scholar](#)]

33. Gaebler C., Wang Z., Lorenzi J.C., Muecksch F., Finkin S., Tokuyama M., Cho A., Jankovic M., Schaefer-Babajew D., Oliveira T.Y. Evolución de la inmunidad de anticuerpos al SARS-CoV-2. *Naturaleza*. 2021;591(7851):639–644. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)][[Google Scholar](#)]

34. Z. Wang, J. Lorenzi, F. Muecksch, S. Finkin, C. Viant, C. Gaebler, M. Cipolla, H. Hoffmann, T. Oliveira, D. Oren, neutralization by dimeric IgA, *Sci. Trad. Med* 13. [[Artículo gratuito de PMC](#)][[PubMed](#)]