República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112019026615-1 B1

(22) Data do Depósito: 15/06/2018

(45) Data de Concessão: 02/08/2022

(54) Título: CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS E EMULSÕES ESTÁVEIS E USOS DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: A61K 9/107; A61K 9/127; C07K 16/10; C07K 16/20.

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2017 US 62/540,973; 04/06/2018 US 62/680,454; 07/11/2017 US 62/582,859; 08/09/2017 US 62/556,291; 09/05/2018 US 62/669,262; (...).

(73) Titular(es): INFECTIOUS DISEASE RESEARCH INSTITUTE.

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER B. FOX; AMIT PRAFUL KHANDHAR; NEAL VAN HOEVEN; JESSE H. ERASMUS; SUSAN S. LIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2018037783 de 15/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/232257 de 20/12/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/12/2019

(57) Resumo: Trata-se de composições de carreador lipídico nanoestruturado e métodos para produzir e utilizar os mesmos. As composições compreendem um carreador lipídico nanoestruturado (NLC), em que o NLC compreende um núcleo de óleo que compreende uma mistura de um lipídio em fase líquida e um lipídio em fase sólida, um lipídio catiônico, um éster de sorbitano e um tensoativo hidrofílico, e opcionalmente um agente bioativo. O agente bioativo pode ser associado ao NLC. As composições têm capacidade para entregar uma biomolécula a uma célula para a geração de uma resposta imunológica, por exemplo, para usos em vacina, terapêuticos ou de diagnóstico. As composições e os métodos relacionados para produção das composições e uso das composições para estimular uma resposta imunológica também são fornecidos.

“CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS E EMULSÕES ESTÁVEIS E USOS DOS MESMOS”

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório nº U.S. 62/520,204, depositado 15 em junho de 2017; 62/540.973 depositado em 3 de agosto de 2017; 62/556.291, depositado em 8 de setembro de 2017; 62/563.544, 26 de setembro de 2017; 62/582.859, depositado em 7 de novembro de 2017; 62/622.748, depositado em 26 de janeiro de 2018; 62/622.755, depositado em 26 de janeiro de 2018; 62/669.262, depositado e 9 de maio de 2018; 62/677.336, depositado em 29 de maio de 2018; e 62/680.454, depositado em 4 de junho de 2018; dentre os quais cada um é incorporado a título de referência no presente documento em sua totalidade para qualquer fim.

CAMPO

[0002] A presente revelação refere-se, de modo geral, ao campo de formulações farmacêuticas e de vacina.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] A imunização do ácido nucleico é uma estratégia interessante para o desenvolvimento rápido de vacinas para ameaças de doenças infecciosas existentes ou emergentes. Os candidatos de vacina de ácido nucleico são gerados facilmente por métodos sintéticos comuns e podem ser construídos dentro de semanas do surgimento de uma nova doença infecciosa. Além disso, visto que as características biofísicas de uma vacina de ácido nucleico são independentes do antígeno expresso, a nova vacina precisa de um desenvolvimento de processo antígeno-específico mínimo para fabricação. As vacinas de DNA plasmidial estão atualmente em desenvolvimento para doenças infecciosas; no entanto, até agora, nenhuma vacina à base de DNA foi aprovada para uso em seres humanos devido a complicações associadas (McKay, Cope et al. 2014, Tregoning e Kinnear 2014).

[0004] A entrega de antígenos com o uso de

plataformas à base de RNA foi proposta como uma alternativa em comparação a plataformas à base de DNA. A natureza transitória do RNA ´é desejável para entrega de antígeno; o risco de persistência de vacina a longo prazo é reduzido em relação a DNA, e translocação nuclear da vacina entregue não é necessária para produção de proteína. No entanto, a instabilidade relativa do RNA e a expressão limitada de uma transcrição limitada de uma transcrição de mRNA único tornaram a distribuição e uso em grande escala dessas vacinas difíceis no campo e para desenvolvimento comercial. A pesquisa abundante em métodos para aprimorar a estabilidade de RNA através da modificação da estrutura de RAN forneceu diversas soluções a esse problema (Tavernier, Andries et al. 2011, Youn e Chung 2015). Em particular, as vacinas à base de RNA de autoamplificação demonstraram um mecanismo potencial para aprimorar a magnitude e duração da expressão do antígeno (Revisado em in (Vander Veen, Harris et al. 2012, Ljungberg e Liljestrom 2015)).

[0005] A fim possibilitar uma resposta imunológica robusta, as formulações, tais como lipossomas e emulsões de óleo em água são empregados tipicamente para aperfeiçoar a entrega de RNA em células (Geall, Verma et al. 2012, Ulmer, Mason et al. 2012, Brito, Chan et al. 2014, Bogers, Oostermeijer et al. 2015, Brito, Kommareddy et al. 2015, Geall e Ulmer 2015). Além disso, essas formulações também podem ser usadas para intensificar a entrega de fármacos outros produtos terapêuticos em células. No entanto, lipossomas ou emulsões de óleo em água, tais como emulsões catiônicas de lipídeo (CNE) podem ser estruturalmente instável em ambientes fisiológicos, aumentando a probabilidade de toxicidade de exposição aguda a componentes individuais. O potencial tóxico de tais carreadores também pode compor ou afetar preocupações tóxicas comumente associadas a fosfolipídeos necessários para a absorção de RNA (Bertholet et al. 2010). Adicionalmente, há um entendimento limitado sobre como a formação físico-química de emulsões de óleo em água (por exemplo, tamanho, carga de superfície, natureza química dos excipientes e suas razões relativas) afeta a ligação de RNA, entrega e, também,

a expressão de antígeno.

[0006] Desse modo, há uma necessidade de plataforma de formulação que seja adequada tanto química quanto fisicamente para servir como um sistema versátil, estável e seguro para a entrega de agentes bioativos incluindo ácidos nucleicos a células.

[0007] Todas as referências citadas no presente documento, incluindo publicações de patente, são incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade, como se cada referência individual fosse indicada específica e individualmente para ser incorporada a título de referência.

BREVE SUMÁRIO

[0008] Os presentes inventores desenvolveram formulações que são surpreendentemente eficazes na entrega de um agente bioativo a uma célula. Consequentemente, no presente documento, são fornecidas, entre outras, tais formulações (também denominadas no presente documento de composições) e método uso das mesmas. As formulações são formulações à base de carreador de lipídeo nanoestruturado (NLC). Será entendido pelo técnico versado que um NLC é formado por partículas de NLC. Os NLCs são descritos em Beloqui et al., Nanomedicine. NBM 2016; 12: 143 a 161. As partículas de NLC exemplificativas da presente invenção compreendem (a) um núcleo de óleo que compreende um lipídeo em fase líquida e um lipídeo em fase sólida, (b) um lipídeo catiônico, (c) um tensoativo hidrofóbico (de preferência, um éster de sorbitano (por exemplo, monoéster de sorbitano, diéster ou triéster) e (d) um tensoativo hidrofílico. As composições exemplificativas são estável e têm capacidade da entrega de agentes bioativos às células. A entrega do agente bioativo pode ser, por exemplo, para a geração de uma resposta imunológica e/ou para o tratamento de uma doença ou de condições de saúde em um indivíduo.

[0009] Esses e outros aspectos da presente invenção ficarão evidentes mediante a referência à descrição detalhada e os desenhos

anexos. Além disso, são apresentadas no presente documento várias referências que descrevem mais detalhadamente determinados aspectos da presente invenção e são, portanto, incorporados a título de referência em sua totalidade.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0010] As Figuras 1A a 1E retratam comparações de estabilidade entre as formulações de CNE e NLC. Comparação de tamanho de partícula (Malvern Zetasizer Z/ZS) de difusão de luz dinâmica (DLS) entre CNE (QG386) e QG752, uma formulação e NLC, armazenada a 5 ºC (Figura 1A), 25 ºC (Figura IB), 37 ºC (Figura 1C) 60 ºC (Figura ID) e 80 ºC. As setas estão incluídas a penas para auxiliar na distinção das linhas.

[0011] As Figuras 2A a 2B retratam o diâmetro médio Z de NLCs como uma função da razão óleo/tensoativo ou tensoativo/óleo medida com o uso da difusão de luz dinâmica (DLS).

[0012] As Figuras 3A a 3E retratam a análise de densitometria óptica do ensaio de retardamento de gel (GRA) para determinar a quantidade de RNA ligada a NLCs como uma função da razão nitrogênio/fosfato (Figura 3A). As Figuras 3B a E mostram uma sobreposição de expressão de SEAP *in vitro* (Unidades de Luminescência Relativa, RLUs) e as curvas de ligação RNA-NLC como uma função de valores N:P para QG942, QG963, QG807 e QG843 (QG843 também é denominado no presente documento de CNE).

[0013] As Figuras 4A a 4C retratam a comparação do tamanho de partícula de DLS (média Z, nm) de complexos de formulação-RNA com razões entre nitrogênio e fosfato variáveis (calculadas) (Figura 4A), razão entre RNA e partícula (teórica) (Figura 4B) ou razão de massa entre DOTAP e RNA (calculada) (Figura 4C).

[0014] A Figura 5 retrata titulações de anticorpo de neutralização dos camundongos (n=5/grupo) 14 dias após uma única administração de IM de rvRNA que expressa o antígeno Zika complexados com

diferentes quantidades de formulação de QG768. As titulações de anticorpo de neutralização foram determinadas por um teste de neutralização de redução de plaqueta a 80% ($PRNT_{80}$). A significância foi determinada por ANOVA simples (one-way).

[0015] A Figura 6 retrata titulações de anticorpo de neutralização dos camundongos (N=5/grupo) após administração intramuscular (IM) com RNA ou complexado com a formulação (0,1 µg de RNA misturado a 1:1 (em v/v) com a formulação) ou puro (0,1 µg ou 10 µg de RNA misturado a 1:1 com solução salina). As titulações de anticorpo de neutralização foram determinadas por um teste de neutralização de redução de plaqueta a 80% ($PRNT_{80}$). A significância foi determinada por ANOVA simples (one-way).

[0016] As Figuras 7A a 7E retratam os níveis de liberação de quimiocina das células de sangue total humano na presença das formulações indicadas. Os níveis de expressão de quimiocina foram determinados pelo ensaio Luminex com o uso de um arranjo múltiplo de microesferas de citocina.

[0017] As Figuras 8A a 8B retratam a capacidade de selecionar formulações para entregar rvRNA *in vitro*. As células 293T ou BHK foram submetidas à transfecção ou com 10 ng (Figura 8A) ou 100 ng (Figura 8B) de rvRNA que codifica SEAP com o uso das formulações indicadas assim como lipofectamina como um controle positivo e uma solução de 10% de sacarose como um controle negativo. Após a transfecção, os sobrenadantes foram colhidos, e a atividade de SEAP foi medida com o uso de um ensaio de luminescência.

[0018] A Figura 9 retrata a cinética da expressão de proteína *in vivo* para formulações seletas. Os camundongos C57BL/6 foram injetados por meio da rota IM com 1 µg de rvRNA que codifica SEAP e formulado ou em 10% de sacarose, CNE, QG807 ou QG808. Os camundongos injetados com solução salina foram utilizados como um controle de simulado. O soro foi colhido a 3, 7, 14, 21 e 28 dias após injeção e a atividade de SEAP foi medida

com o uso de um ensaio de luminescência.

[0019] A Figura 10 retrata a otimização de carregamento por RNA para a formulação, QG807. O rvRNA que codifica o SEAP foi diluído em várias concentrações indicadas no eixo geométrico x em 10% de sacarose e complexado a uma razão de 1:1 com QG807. Em seguida, o RNA formulado foi diluído para obter uma dose ou de 1 µg ou 0,1 µg em um volume de 50 µl. Em seguida, os camundongos C57BL/6 forma injetados com cada dose por meio da rota IM, e o soro foi colhido 3 e 8 duas após injeção. Em seguida, a atividade de SEAP foi medida pelo ensaio de luminescência.

[0020] As Figuras 11A a 11C. Para as Figuras 11A e 11B, simulado = 10% de sacarose, puro= 100 ng de rvRNA de SEAP não formulado d, CNE= rvRNA de SEAP complexado com CNE (contendo Span 85) QG768 = Span60 que contém NLC, QG906 = Span80 que contém NLC, QG808= Span85 que contém NLC, SQ807= Span60 que contém NLC. A Figura 11A retrata quatro formulações de NLC com composições emulsificadoras diferentes que foram comparadas às CNE ou diluente quanto à sua capacidade para aperfeiçoar a expressão de proteína seguindo a complexação com RNA que codifica fosfatase alcalina secretada (SEAP). Três dias após uma injeção intramuscular (IM) de 100 ng (n=3 por grupo), os soros foram colhidos dos camundongos, e a atividade de SEAP foi submetida ao ensaio. Cada ponto de dados point é plotado assim como seu desvio padrão médio ± (S.D.) A Figura 11B retrata as mesmas formulações usadas (Figura 11A) complexadas com RNA que codifica o ZIKV prM e, e os anticorpos de neutralização foram submetidos a ensaio 14 dias após uma única IM de 100 ng (n=5 por grupo). Os dados foram analisados por ANOVA simples (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (*p<0,05; Span 60 de NLC em comparação a CNE ou Span 85 de NLC, ** p<0,008; Span 60 de NLC em comparação a Span 80 de NLC, *** p=0,0007, CNE em comparação a Span 80 de NLC ou 85, não significativo). A Figura 11C retrata CNE ou NLC composto de 2 diferentes tensoativos hidrofóbicos, Span 85 e Span 60, complexados com RNA que codifica ZIKV prM e E e anticorpos de

neutralização e submetidos a ensaio 14 dias após uma única injeção de FM a 100 ng. Os dados foram analisados por ANOVA múltipla (dupla) com teste de comparação múltipla de Tukey. ** p 0,0001. Figuras 12A a H. Os camundongos de C57B1/6 (n=9/grupo) foram imunizados com uma única injeção IM de RNA formulada com 1 µg de CE ou de NLC e em comparação a RNA não formulado com 10 ou 1 µg (A Figura 12A). Os anticorpos de neutralização foram avaliados 14 dias após a imunização e, em seguida, a 28 dias, 3 camundongos por grupo foram reforçados com uma segunda dose de cada vacina (Figuras 12B a 12F). 46 dias após a intensificação, os baços foram colhidos e estimulados com peptídeos CD8 correspondentes aos epítopos em ZIKV prM e E. As Figuras 14G a H: Os Camundongos (n=6/grupo) imunizados com uma única administração IM forma desafiados no dia 30, seguindo um bloqueio de receptores de interferon alfa por administração de anticorpo monoclonal, com uma dose letal de ZIKV. Os soros foram submetidos a ensaio (Figura 12G) para vírus por ensaio de plaqueta 4 dias após o desafio, embora a sobrevivência tenha sido monitorada (Figura 12H). NLC4 é QG807.

[0021] Figuras 13A a 13B. Os camundongos C57BL/6 (n=3/grupo) foram injetados IM com 1 µg de SEAP RNA não formulado ou formulado com QG807, QG924, QG925, QG941 ou QG942 complexando-se com RNA A 400 µg/ml, e a expressão de SEAP em comparação a QG807 complexado sua concentração de RNA ideal de 40 µg/ml (Figura 13A). As células de BUK forma incubadas com uma diluição de 1:20 de cada formulação de alta carga de RNA por 4 horas e, em seguida, marcada com iodeto de propídio e anexina para detectar células que foram mortas ou se submetem a apoptose. Em seguida, a citometria de fluxo foi usada para quantificar a proporção de células que não estavam mortas ou se submeteram a apoptose (A Figura 13B).

[0022] A Figura 14 retrata dados de expressão de SEAE *in vivo* comparando QG807 complexado o com RNA a 400 µg/ml ou 40 µg/ml.

[0023] As Figuras 15A a 15D retratam os níveis de

liberação de quimiocina das células de sangue total humano na presença das formulações indicadas. Os níveis de expressão de quimiocina foram determinados pelo ensaio Luminex com o uso de um arranjo múltiplo de microesferas de citocina.

[0024] As Figuras 16A a 16D. A Figura 16A retrata uma partícula de NLC exemplificativa. A Figura 16B retrata distribuição de tamanho ponderada por intensidade de NLC_{v1} e CNE (QG386). A Figura 16C retrata a evolução de tamanho de partícula (diâmetro médio Z) ao longo de nove meses para avaliar estabilidade coloidal de formulações armazenadas a 25 ºC. Comparação de tamanho de partícula (diâmetro médio Z, Malvern Zetasizer Z/ZS) por difusão de luz dinâmica (DLS) entre CNE (QG386) e QG752, uma formulação de NLC_{v1}. A Figura 16D retrata proteção de Rnase por NLCs com fração de Tween80 relativamente inferior na fase de tensoativo (35% de tensoativo total e massa de lipídeo catiônico) rvRNA protegido da degradação.

[0025] A Figura 17 retrata um processo de fabricação de NLC.

[0026] As Figuras 18A a 18B retratam durabilidade das respostas do anticorpo neutralizante seguindo dois experimentos independentes ou com uma ou duas doses de rvRNA do ZIKV formulado com NLC. Os camundongos C57BL/6 (n=5/grupo) foram imunizados uma vez no dia 0 (Figura 18A) ou no dia 0 e 28 (Figura 18B) por meio da rota FM com rvRNA do ZIKV 1 ou 0,1 µg formulado com NLC_{v1} e titulações de anticorpo de neutralização em vários instantes do tempo foram comparados a camundongos imunizados com rvRNA do ZIKV não formulado com 10 ou 1 µg. Os dados são plotados como ± S.D. médio de cada réplica biológica. A transformação de Log_{10} dos dados nas Figuras 18A a 18B foi analisada por ANOVA simples (one-way) com o teste de comparação múltipla Tukey, comparando o $PRNT_{80}$ médio em cada instante do tempo dentro de cada grupo à sua respectiva titulação de pico no dia 14. A Figura 18A, NLC_{v1}-1 µg ou 10 µg puros nos dias 88 e 156 em comparação a titulações no dia 14, ***p<0,0001, **p<0,001; na Figura 18B, NLC_{v1},1 µg nos dias 126 e 209

em comparação a titulações no dia 14, *p=0,05, ***p=0,0001, respectivamente

[0027] As Figuras 19A a 19B. Os camundongos foram imunizados com uma injeção FM de RNA formulado por NLC em comparação a RNA não formulado com 10 ou 1 µg e CNE para níveis de células T+ CD+ no dia 14 (Figura 19A) e dia 49 (Figura 19B).

[0028] Figuras 20A a 20E. Os camundongos foram imunizados com injeção FM de RNA formulado com NLC nas doses indicadas. NLC_{V2} (QG942) foi complexado com rvRNA que codifica ZIKV prM/E a um N:P e doses de 15 e 100, 30, 10 e 3 ng forma administradas a camundongos C57BL/6 por meio de uma única injeção IM (n=14/grupo) e 14 dias depois, mesclados para avaliar titulações de anticorpo de neutralização por $PRNT_{80}$ (A Figura 20A) ou submetidos a eutanásia (n=4/grupo) para quantificar as células T $B220_{10}CD8^{+}IFN\Gamma^{+}$antígeno-específicas em esplenócitos totais (Figura 20B) em comparação a camundongos (veículo) ou rvRNA puro a 100 ou 10 ng (sacarose) (n=14/grupo) ou 100 ng formulado com NLC_{v1} (n=14) ou CNE (n=4) a um N:P de 15 (Figuras 20A a 20B). Os dados são apresentados como valores individuais assim como ± S.D médio.

[0029] Trinta dias após imunização, os 10 camundongos restantes por grupo foram desafiados com 5 Log_{10} PFU de cepa ZIKV Dakar 41525 seguindo o bloqueio de anticorpo do interferon tipo I conforme descrito in Smith et al., PLoS Negl Trop Dis. 1 l(l):e0005296 (2017) e foi submetido a sangramento 4 dias depois para quantificar a viremia por ensaio de plaqueta (A Figura 20C). Os dados são apresentados como valores individuais assim como ± S.D médio. Os camundongos foram monitorados diariamente quanto à sobrevivência (Figura 20D) e perda de peso (Figura 20E). Os dados na Figura 25E são presentados como ± S.D médio. A transformação de Log_{10} dos dados nas Figuras 20A e 20C foi analisada por ANOVA simples (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (titulações $PRNT_{80}$ na Figura 25A entre grupos de controle - doses de 100 e 10 ng não formulados e simuladas, e doses de 100, 30 e 10 ng formuladas por NLC_{V2}, ****p<0,0001 ou CNE formuladas 100

ng, *p=0,04;

[0030] Entre doses de 100 e 30 ng formulados por NLC_{V2} e 100 ng formulado por CNE, **p=0,006;

[0031] Titulações de viremia na Figura 20C entre grupos de controle - doses não formuladas e simuladas de 100 e 10 ng, e todas as doses formuladas com NLC_{V2}- ou NLC_{v1}-, ****p<0,0001). Os dados na Figura 20E foram analisados por ANOVA dupla (two-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (nos dias 5 a 10, a mudança de peso porcentual entre grupos de controle - rvRNA simulado ou puro a 100 e 10 ng, e todos os grupos formulados, *p<0,05). Dados nas Figuras 20A a 20C representam dois experimentos diferentes.

[0032] As Figuras 21A a 21D retratam projeto e quantificação do rvRNA do ZIKV. A Figura 21A retrata DNA plasmidial que codifica um replicon de Encefalite Equino Venezuelano derivado da cepa da vacina, TC-83, sob o controle de um promotor de T7 RNA polimerase. A região não traduzida (UTR), subgenômico (SG), gene de interesse (GOI). A Figura 21B retrata o projeto de replicar RNAs virais que codificam a pré-membrana (prM) e os genes de envelope (E) da cepa H/PF/2013 do ZIKV ou fosfatase alcalina embrionária humana secretada (SEAP). 293 sobrenadantes de célula T submetidas à transfecção com rvRNA de ZIKV ou de SEAP foram analisadas seguindo a sedimentação através de 30% de sacarose pela Figura 21C western blot com o uso de anticorpos policlonais contra ZIKV e/ou com o uso do microscópio eletrônico de transmissão da Figura 21D.

[0033] As Figuras 22A a 22H retrata o mapeamento da relação física entre NLC_{V2} e rvRNA com respostas biológicas, incluindo a expressão de gene, imunogenicidade e reatogenicidade. Para experimentos *in vitro* (as Figuras 22A a 22D), NLC_{V2} foi complexado com rvRNA de SEAP em várias razões de N:P e a expressão de gene (Figura 11A) foi medida pelo ensaio SEAP, conforme descrito acima, o tamanho de partícula (Figura 11B) e o potencial zeta (Figura 22C) foram medidos por difusão de luz dinâmica, e a

ligação de RNA porcentual (Figura 22D) foi medida por densitometria seguindo eletroforese de gel. Os dados nas Figuras. 22A a 22D são apresentados como ± S.D. Média e representam pelo menos 3 experimentos independentes. Para experimentos *in vivo* que envolvem camundongos C57BL/6 (as Figuras 22E- a G), NLC_{V2} foi complexado com rvRNA de ZIKV ou SEAP a N:Ps de 3, 5,6, 15 e 37, e os camundongos (n=3/grupo para SEAP, ou n=5/grupo para ZIKV) foram injetados por meio da rota IM com 1.000, 100 ou 10 ng de rvRNA de SEAP ou 1.000 ou 100 ng de rvRNA do ZIKV. A expressão de SEAP foi determinado pelo ensaio de SEAP 3 dias após injeção (Figuras 22E a 22G) ao passo que as titulações de anticorpo de neutralização de ZIKV foram determinadas por $PRNT_{80}$ 14 dias após a injeção (Figuras 22F a 22G). A fim de determinar a reatogenicidade (Figura 22H), porquinhos-da-índia (n=4/grupo) foram injetados por meio da rota ID com rvRNA do ZIKV a 50 µg complexados com NLC_{V2} a N:Ps de 3, 5,6, 15 e 37, e o diâmetro de abertura foi medido 24 horas depois. Os dados de SEAP nas Figuras 22E-G são apresentados como ± S.D. médio e são de um único experimento ao passo que os dados de $PRNT_{80}$ nas Figuras 22F e G são apresentados como ± S.D. médio e plotagens de caixa min/max e representam 3 experimentos independentes. Os dados na Figura 22H foram de um único experimento e são apresentados como réplicas biológicas individuais com ± S.D. médio e plotagens de caixa min/max A transformação de Log_{10} dos dados $PRNT_{80}$ na Figura 22G foi analisada por ANOVA simples (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (titulações entre N:P de 37 e 15, não significativo; titulações entre N:P de 15 e 5,6, **p=0,0033). Os dados na Figura 22H foram analisados por ANOVA simples (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (diâmetro de abertura entre N:P de 37 e 15, ***p=0,0004; entre N:P de 15 e 5,6 ou 3, não significativo). Um desenho que retrata um modelo hipotético da interação física entre NLC e rvRNA sustentado pelos dados é apresentado com A Figura 22D.

[0034] As Figuras 23A a 23E retratam características de NLC_{V2} com capacidade de carregamento de RNA aperfeiçoada. A Figura 23A

retrata o tamanho de partícula conforme medido por DLS. Os dados são relatados como média Z. A Figura 22B retrata eletroforese em gel de agarose de RNA de desnaturação do rvRNA não tratado (coluna 2) e rvRNA de NLC_{V2} (coluna 4) ou rvRNA tratado com Rnase (coluna 3) e rvRNA de NLC_{V2} (coluna 5). Os dados representam 3 testes independentes. A Figura 23C apresenta a porcentagem de RNA ligado ao NLC_{v1} ou NLC_{V2}, conforme medido por análise de densitometria seguida da eletroforese de gel de agarose de desnaturação de NLC_{v1} ou NLC_{V2} complexado com concentrações crescente de rvRNA. Os dados representam 3 experimentos independentes. A Figura 23D retrata expressão de SEAP em sobrenadante de célula BUK 24 horas após incubação com NLC_{v1} ou NLC_{V2} complexado em várias razões N:P com rvRNA de SEAP. Os dados são representados como ± S.D. médio de três réplicas biológicas e representa os resultados de 3 experimentos independentes. Os dados de NLC_{v1} dados reproduzidos da Figura 23E a título de comparação. Para a Figura 23E, os porquinhos-da-índia (n=4/grupo) foram imunizados com uma dose única de 50 µg de rvRNA do ZIKV não formulado ou 5 ou 0,5 µg de rvRNA do ZIKV formulado com NLC_{v1}, ou com 50, 5 ou 0,5 µg de rvRNA do ZIKV formulado com NLC_{V2} por meio das rotas FM ou ID e titulações de anticorpo de neutralização séricas, conforme medido por $PRNT_{80}$, foram avaliados 28 dias depois. Cada ponto de dados é relatado assim como ± S.D. médio A transformada de Log_{10} de dados foi analisada por ANOVA simples (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (doses de 5 µg entre NLC_{v1} e as formulações de NLC_{V2} por via IM, *p=0,05 ou ID, *p=0,04).

[0035] As Figuras 24A a B. A Figura 24A retrata neutralização do ZIKV *in vitro* com diluições em série do soro colhido na Figura 11C acima. Cada diluição sérica é plotada como ± S.D. médio e a curva foi ajustada com o uso de um modelo de regressão não sigmoide. Os dados foram analisados por ANOVA dupla múltipla (two-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (a 1/640 diluição sérica Span 60 de NLC vs. Span 85 de CNE e Span 60 de CNE vs. Span 85 de CNE, *p<0,05; Span 60 de NLC vs Span 60

de CNE, **p<0,0001). A Figura 24B retrata concentração de Mip-ïβ, conforme determinado por ELISA, em sobrenadantes de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (n=6 doadores) colhidas 24 horas após incubação com 40 ng de rvRNA do ZIKV não formulado (puro) ou complexados a um N:P de 15 com CNE que contém SPAN 60 ou 85 em uma emulsão de esqualeno ou com NLCs que contêm Span 60, 80 ou 85 e esqualeno/dynasan ou emulsão de NLC que contém Span 60 e Miglyol®/dynasan. Duas réplicas de ELISA técnica foram realizadas a cada doador e a média de cada doador é plotada junto do ± S.D. médio dos 6 doadores. Os dados foram analisados por ANOVA simples múltipla (one-way) com teste de comparação múltipla de Tukey (comparação NLC-Span60-esqualeno ou NLC-Span85-esqualeno a ou puro ou CNE-Span 85, ** p<0,005).

[0036] A Figura 25 retrata cinética de expressão de proteína seguindo entrega de *in vivo* de rvRNA formulado com NLC_{v1} ou CNE. O rvRNA que codifica SEAP foi formulado ou com NLC_{v1}, CNE ou 10% sacarose (puro) e 100 ng foi administrado por meio da rota FM para camundongos C57BL/6 (n=3/grupo). Os camundongos com injeção simulada com 10% de sacarose somente foram usados como um controle negativo. Os camundongos sangraram nos dias 3, 7, 14, 21 e 28 e atividade de SEAP sérica foi medida pelo ensaio SEAP.

[0037] A Figura 26 retrata a otimização de capacidade de carregamento de rvRNA de NLC_{v1}. O rvRNA que codifica SEAP foi diluído em 10% de sacarose a concentrações finais de 400, 300, 200, 100, e 40 µ/ml e complexados a 1:1 com NLC_{v1} por aplicação suave de pipeta. As CNE foram complexadas a 1:1 com 40 µg/ml de rvRNA. Em seguida, o rvRNA complexado ou não formulado foi diluído em 10% de sacarose para dosagem de moco que cada 50 µl de injeção IM resultasse em uma dose de 100 ng. Em seguida, os camundongos foram submetidos a sangramento 3 dias depois e atividade de SEAP sérica foi medida por ensaio de SEAP e comparação a camundongos com injeção simulada.

[0038] A Figura 27 retrata o efeito de diminuição da concentração de esqualeno em NLCs de alta capacidade em atividade de SEAP sérica. NLCs de alta capacidade (que contém 3% em p/v de DOTAP) fabricada com 30, 15, 7,5 e 3,75% em p/v de esqualeno foram complexados 1:1 com rvRNA que codifica SEAP a um N:P de 37 e 100 ng foi administrado por meio da rota IM em camundongos C57BL/6 (n=3/grupo) e atividade sérica de SEAP foi medido 3 dias depois e comparação a camundongos com injeção de rvRNA não formulado ou simulada.

[0039] As Figuras 28A a G retratam imunogenicidade e eficácia de complexos de NLC_{v1}/rvRNA em camundongos C57BL/6. O NLC_{v1} foi complexada com rvRNA ou mRNA que codifica prM/E do ZIKV a um N:P de 50 e um único 1 µg de dose foi administrado aos camundongos C57BL/6 por meio da injeção IM (n=9/grupo) e 14 dias depois, submetidos a sangramento para avaliar as titulações de anticorpo de neutralização por $PRNT_{80}$ (Figura 28A) em comparação a camundongos com vacinação simulada ou rvRNA ou mRNA puro a 10 ou 1 µg (n=9/grupo) ou rvRNA a 1 µg formulado com CNE a um N:P de 50. Os dados são apesentados como valores individuais assim como ±S.D médio. Trinta dias após imunização, 6 camundongos por grupo foram desafiados com 5 Log_{10} PFU da cepa Dakar 41525 do ZIKV seguindo o bloqueio de anticorpo do interferon tipo I, conforme descrito em Smith et al. PLoS Negl Trop Dis 1 l(l):e0005296 (2017) e foi submetido a sangramento 4 dias depois para quantificar a viremia por ensaio de plaqueta (Figura 28B). Os camundongos foram monitorados diariamente quanto à sobrevivência (Figura 29C) e perda de peso (Figura 28D). Os 3 camundongos restantes por grupo receberam uma segunda imunização no dia 30 para avaliar responses de célula T $CD8^+$ pós-intensificação. Quatorze dias depois, os camundongos foram submetidos a eutanásia, e os espolenócitos forma isolados, marcados, e as células T $\%B220_{10}CD8^+$ que foram $IFN\gamma^+$(Figura 28E) $CD107a^+$(Figura 28F) ou $TNF\alpha^+$(Figura 28G) foram quantificadas por citometria de fluxo (Figura 37).

[0040] A Figura 29 retrata uma proteína de fusão exemplificativa, em que ID91 compreende quatro antígenos/proteínas Mtb: Rv3619, Rv2389, Rv3478 e Rv1 886 (topo) e um projeto de replicon de alfa vírus que codifica ID91. O construto de replicon contém um sinal de Gaussia luciferase como um gene repórter.

[0041] As Figuras 30A a 30B retratam a porcentagem de TH1 que células T CD4+/CD44+ (Figura 30A) ou CD8+/CD44+ (Figura 30B) que secretam citocina das vacinas de ID91 à base de proteína ou de RNA. A significância estatística de $P<0,05$ foi analisada com o uso de ANOVA dupla (two-way) e é denotada por um asterisco.

[0042] As Figuras 31A a D retratam dados da população CD4+ de proliferação ou de produção de citocina. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com proteína ID91/GLA-SE (azul) ou ID91 RNA/QG807 (vermelha) foram estimulados com o meio, um grupo de 13 de peptídeos de proteína inteira ID91 de 10 peptídeos de sobreposição ID91 agrupados com peptídeos.

[0043] As Figuras 32A-D retratam dados da população CD8+ de proliferação ou de produção de citocina. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com proteína ID91/GLA-SE (azul) ou ID91 RNA/QG807 (vermelha) foram estimulados com o meio, um grupo de 13 de peptídeos de proteína inteira ID91 de 10 peptídeos de sobreposição ID91 agrupados com peptídeos.

[0044] As Figuras 33A a B retratam a observação de que as imunizações com RNA ID91 foram profilaticamente protetoras e induziram epítopos diferenciais de célula T CD8+ em comparação à proteína ID91. Os coortes de camundongos foram imunizados das vezes, com três vezes de diferença ou com a proteína ID91+GLA-SE ou com o RNA de alfa vírus que codifica os antígenos ID91, os esplenócitos foram isolados e reestimulados *in vitro* com o uso de peptídeos ID91. A escala de intensidade do mapa de calor indica a porcentagem de CD4+ (vermelho) e a proliferação de célula T CD8+

(azul) e respostas de citocina a cada agrupamento (Figura 30A). A Figura 33A, M = média apenas, ID91 = ID91 apenas e PP1-PP13 se referem a agrupamentos de 1 a 13. As escalas no lado direto indicam a porcentagem de células de proliferação ou de citocina+ da população CD4+ ou CD8+. A Figura 33B retrata a carga bacteriana avaliada de homogenatos de pulmão 3 semanas após o desafio com Mtb H37Rv. Os coortes de camundongos forma imunizados uma vez a 3 emanas antes do desafio ou com solução salina, proteína ID91 +GLA-SE ou RNA de alfa vírus que codifica antígenos ID91 na formulação de RNA. A significância de $P<0,05$ em comparação à solução salina por ANOVA simples (one-way) com teste de múltiplas comparações Dunnetts é denominada por um asterisco.

[0045] As Figuras 34A a B comparam sequência sinal derivada dos Vírus Zika (ZIKV) ou de Encefalite japonesa (JEV). A Figura 34A retrata o modelo de rvRNAs que codificam prM/E do ZIKV com uma sequência de sinal ZIKV ou JEV a montante do prM. A Figura 34B retrata que rvRNAs que codificam prM/E do ZIKV com sequências de sinal do ZIKV ou JEV forma formulados em 10% de sacarose (puro) ou com nanoemulsão catiônica (CNE) e 10 µg do anterior ou 1 µg do último foram injetados por mio de rota IM em camundongos C57BL/6 (n=5/grupo) e as titulações PRNT80 foram medidas no soro 21 dias depois. Em seguida, os camundongos foram intensificados com uma segunda imunização e as titulações de PRNT80 foram medidas depois de mais 21 dias depois.

[0046] A Figura 35 retrata o efeito da razão molar entre tensoativo e óleo no tamanho de partícula de NLC (média Z (nm)). A razão entre tensoativo e óleo foi mudada variando-se a quantidade de tensoativo total durante a retenção da quantidade da constante de óleo. Os dados experimentais foram ajustados em uma equação de decaimento exponencial de uma fase (R-quadrado = 0,972). Todas as formulações foram microfluidizadas sob condições idênticas (10 passagens a 206,84 Mpa (30,000 psi)).

[0047] A Figura 36A a B retratam o efeito do

tensoativo hidrofílico sobre a proteção do desafio de RNase e entrega do SEAP que expressa rvRNA *in vivo*. O rvRNA foi complexado com variações de NLCs feias com 70% ou 35% de tensoativo total e lipídeo catiônico fabricados com ou sem tampão de citrato a 10 mM e avaliado quanto à sua capacidade de proteger o rvRNA contra o desafio RNase (Figura 36A). Os camundongos C57BL/6 (n=3/grupo) foram administrados com rvRNA que codifica SEAP complexada com 10% de sacarose (puro) ou com NLCs produzidos com 70% ou 35% do tensoativo e lipídeo catiônico ou com CNE, e a atividade sérica de SEAP foi medida 3 dias depois (Figura 36B).

[0048] A Figura 37 retrata uma estratégia de gating para citometria de fluxo exemplificativa.

[0049] As Figuras 38A a B retratam exemplos de ID91 modificado com enzimas de restrição. A Figura 38A retrata o vetor pET29, e a Figura 38B retrata o vetor pET28.

[0050] As Figuras 39A a E retratam sinalização imune em DCs derivados de PBMC humano após estímulo com agonistas TLR3 (Roboxxol, pIC:HMW) e RIG-I (SEVDI), com e sem formulação e NLC. PBMC-DCs de seis doadores humanos foram estimulados com poliIC:HMW, Riboxxol ou SEVDI, ou formulado com NLC ("formulado com QG942 ") ou puro ("não formulado"). O controle de apenas formulação é rotulado "Ctrl. de meios" Após incubação de 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2 de atmosfera, os sobrenadantes foram submetidos a ensaio para concentração de marcadores imunes inatos com o uso de kits ELISA disponíveis comercialmente. A análise estatística foi realizada por ANOVA dupla (2-way) com teste de múltiplas comparações de Sidak. Os valores de P: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

[0051] A Figura 40 retrata a indução de IFNα/β em células MM6 estimulada com adjuvante Riboxxol ou pIC:HMW. As células foram estimuladas ou com RNA puro ou formulado; composições de formulação fornecidas na Tabela XX. IFNα/β dos sobrenadantes de células MM6 estimuladas foi medido em relação a células MM6 não estimuladas e

determinadas com o uso da linhagem celular repórter de IFNα/β SEAP HEK azul. As linhas tracejadas correspondem ao estímulo relativo medido após adição de concentração de IFNα conhecida.

[0052] A Figura 41 retrata um mapa de calor que resume a indução de IFNα/β como uma função da razão molar de N:P e dose de riboxxol.

[0053] As Figuras 42A a 42D retratam expressão de citocina após a administração de adjuvantes de dsRNA formulados com NLC ou SE.

[0054] As Figuras 43 retratam expressão de SEAP diminuída após administração de SEAP formulada com adjuvantes de dsRNA (ligante de TLR3) e NLC.

[0055] As Figuras 44A a B retratam IP- 10 (Figura 42A) e expressão de SEAP (Figura 42B) após administração de VEErep-SEAP formulado com NLC, SE ou controle. A Figura 42A *** = significância estatística de 1 µg+QG942 vs. 1 µg puro. A Figura 42B * = significância estatística de 1 µg+QG942 vs. 0,1 µg +QG942, ** = significância estatística de 0,1 µg+QG942 vs. 0,1 µg SE ou puro, *** = significância estatística de 0,1 µg+QG942 vs. 0,1 µg puro. A Figura 45 retrata respostas de anticorpo antígeno-específico. Os camundongos C57BL/6 foram injetados um de 2 vezes, em um intervalo de 3 semanas, com 1 µg de proteína LEISH-F2 misturada com a formulação adjuvante indicada. Os soros foram coletados no dia 21 (antes da imunização de intensificação) e no dia 42, em seguida, titulações de desfecho IgG, IgG1 e IgG2c antígeno-específicas foram determinadas por ELISA. Os dados são mostrados como a média e SD, 5 camundongos por grupo.

[0056] As Figuras 46A a 46B retratam os efeitos da formulação Hiltonol® nas respostas de célula T. Os camundongos C57BL/6 foram injetados um de 2 vezes, em um intervalo de 3 semanas, com 1 µg de proteína LEISH-F2 misturada com a formulação adjuvante indicada. Três semanas após a imunização final, os baços foram removidos para preparar

suspensões de células únicas, as células foram incubadas com antígeno LEISH-F2, em seguida, o teor de citocina no sobrenadante de cultura foi determinado por ELISA. Os dados são mostrados como mínimo e máximo, com a caixa retratando a 25º e 75º percentis e a média indicada pela barra horizontal dentro da caixa, 5 camundongos per grupo.

[0057] As Figuras 47A a 47E retratam os efeitos da formulação Hiltonol® nas respostas de célula T. Os camundongos C57BL/6 foram injetados um de 2 vezes, em um intervalo de 3 semanas, com 1 µg de proteína LEISH-F2 misturada com a formulação adjuvante indicada. Três semanas após a final imunização, os baços foram removidos para preparar suspensões de células únicas, as células foram incubadas com antígeno F2, então, os fenótipos celulares foram determinados por citometria de fluxo. Os dados são mostrados como pontos individuais para cada camundongo, com a média e SEM indicados pelas barras horizontais verticais, respectivamente. N= 5 camundongos por grupo.

[0058] A Figura 48 retrata os efeitos da formulação Hiltonol® nas respostas de anticorpo antígeno-específico. Os camundongos C57BL/6 foram injetados uma vez com proteína LEISH-F3+ 1 mg misturada com a formulação adjuvante indicada. Quatro semanas após a imunização, os soros foram coletados e as titulações de desfecho de IgG antígeno-específicas foram determinadas por ELISA. Os dados são mostrados como pontos individuais para cada animal junto da média e SEM. N = 5 camundongos por grupo.

[0059] As Figuras 49A a 49C retratam os efeitos da formulação Hiltonol® nas respostas de célula T. Os camundongos C57BL/6 foram injetados uma vez com proteína LEISH-F3+ 1 µg misturada com a formulação adjuvante indicada. Quatro semanas após a imunização, os baços foram removidos para preparar suspensões de célula única, as células foram incubadas com proteína F3+ ou peptídeos limitados por MHCI-(epítopos de célula T CD8), em seguida, o teor de citocina no sobrenadante de cultura é determinado por ELISA. Os dados são mostrados como pontos individuais para

cada camundongo, com a média e SEM indicados pelas barras horizontais verticais, respectivamente. N = 5 camundongos por grupo.

[0060] As Figuras 50A a 50G retratam o impacto de entrega de vacina de antígeno nas respostas imunogênicas com diferentes formulações.

[0061] As Figuras 51A a 51B retratam o impacto de entrega de vacina de antígeno nas respostas imunogênicas com diferentes formulações.

[0062] As Figuras 52A a 52C retratam o impacto da entrega de vacina de antígeno nas respostas imunogênicas com diferentes formulações.

DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

[0063] A Tabela 1 fornece uma listagem de determinadas sequências citadas no presente documento.

Tabela 1: Descrição das Sequências

Descrição	Sequências	SEQ ID NO
ID91	MTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASDFW GGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMA QTDSAVGSSWADDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGGLQ ISQATWDSNGGVGSPAAASPQQQIEVADNIMKTQGPGAWPKC SSCSQGDAPLGSLTHILTFLAAETGGCSGSRDDVVDFGALPPEI NSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSAASAFQSVVWG LTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQAQLTAAQVRV AAAAYETAYRLTVPPPVIAENRTELMTLTATNLLGQNTPAIEA NQAAYSQMWGQDAEAMYGYAATAATATEALLPFEDAPLITN PGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQQLAQPAQGV VPSSKLGGLWTAVSPHLSPLSNVSSIANNHMSMMGTGVSMTN TLHSMLKGLAPAAAQAVETAAENGVWAMSSLGSQLGSSLGSS GLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQAVTPAARALPL TSLTSAAQTAPGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNALRVPARAYAI PRTPAAGFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSPAV YLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSF YSDWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKPTGS AAIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLI GLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIPKLVANN TRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNA AGGHNAVFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMKGDLQSSLGAG	1

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
Rv3619	MTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASDFW GGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNMA QTDSAVGSSWA	2
Rv2389	DDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGGLQISQATWDSNGG VGSPAAASPQQQIEVADNIMKTQGPGAWPKCSSCSQGDAPLG SLTHILTFLAAETGGCSGSRDD	3
Rv3478	VVDFGALPPEINSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSA ASAFQSVVWGLTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQ AQLTAAQVRVAAAAYETAYRLTVPPPVIAENRTELMTLTATN LLGQNTPAIEANQAAYSQMWGQDAEAMYGYAATAATATEAL LPFEDAPLITNPGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQ QLAQPAQGVVPSSKLGGLWTAVSPHLSPLSNVSSIANNHMSM MGTGVSMTNTLHSMLKGLAPAAAQAVETAAENGVWAMSSL GSQLGSSLGSSGLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQA VTPAARALPLTSLTSAAQTAPGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNA LRVPARAYAIPRTPAAG	4
Rv1886	FSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSPAVYLLDGLR AQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYSP ACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKPTGSAAIGLSM AGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMGPSLIGLAMGD AGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIPKLVANNTRLWVYC GNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDAYNAAGGHNAV FNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMKGDLQSSLGAG	5

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
vetor pET29	HMTINYQFGDVDAHGAMIRAQAGSLEAEHQAIISDVLTASDF WGGAGSAACQGFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVQAAGNNM AQTDSAVGSSWADDIDWDAIAQCESGGNWAANTGNGLYGGL QISQATWDSNGGVGSPAAASPQQQIEVADNIMKTQGPGAWPK CSSCSQGDAPLGSLTHILTFLAAETGGCSGSRDDVVDFGALPPE INSARMYAGPGSASLVAAAKMWDSVASDLFSAASAFQSVVW GLTVGSWIGSSAGLMAAAASPYVAWMSVTAGQAQLTAAQVR VAAAAYETAYRLTVPPPVIAENRTELMTLTATNLLGQNTPAIE ANQAAYSQMWGQDAEAMYGYAATAATATEALLPFEDAPLIT NPGGLLEQAVAVEEAIDTAAANQLMNNVPQALQQLAQPAQG VVPSSKLGGLWTAVSPHLSPLSNVSSIANNHMSMMGTGVSMT NTLHSMLKGLAPAAAQAVETAAENGVWAMSSLGSQLGSSLG SSGLGAGVAANLGRAASVGSLSVPPAWAAANQAVTPAARAL PLTSLTSAAQTAPGHMLGGLPLGHSVNAGSGINNALRVPARA YAIPRTPAAGFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSP AVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFEWYYQSGLSIVMPVGGQ SSFYSDWYSPACGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLSANRAVKP TGSAAIGLSMAGSSAMILAAYHPQQFIYAGSLSALLDPSQGMG PSLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSDPAWERNDPTQQIPKLV ANNTRLWVYCGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRSSNLKFQDA YNAAGGHNAVFNFPPNGTHSWEYWGAQLNAMKGDLQSSLG AGKL	6

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
ID9I	ACCATCAACTATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACGGCGC CATGATCCGCGCTCAGGCCGGGTCGCTGGAGGCCGAGCATC AGGCCATCATTTCTGATGTGTTGACCGCGAGTGACTTTTGGG GCGGCGCCGGTTCGGCGGCCTGCCAGGGGTTCATTACCCAG CTGGGCCGTAACTTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCAACGC CCACGGGCAGAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACATGGCA CAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCCGACGACAT CGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGGCGGCAATT GGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTTATACGGTGGTCTGCAG ATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGTGTCGGGTC GCCGGCGGCCGCGAGTCCCCAGCAACAGATCGAGGTCGCA GACAACATTATGAAAACCCAAGGCCCGGGTGCGTGGCCGA AATGTAGTTCTTGTAGTCAGGGAGACGCACCGCTGGGCTCG CTCACCCACATCCTGACGTTCCTCGCGGCCGAGACTGGAGG TTGTTCGGGGAGCAGGGACGATGTGGTGGATTTCGGGGCGT TACCACCGGAGATCAACTCCGCGAGGATGTACGCCGGCCCG GGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCGCCGCGAAGATGTGGGACAG CGTGGCGAGTGACCTGTTTTCGGCCGCGTCGGCGTTTCAGTC GGTGGTCTGGGGTCTGACGGTGGGGTCGTGGATAGGTTCGT CGGCGGGTCTGATGGCGGCGGCGGCCTCGCCGTATGTGGCG TGGATGAGCGTCACCGCGGGGCAGGCCCAGCTGACCGCCGC CCAGGTCCGGGTTGCTGCGGCGGCCTACGAGACAGCGTATA GGCTGACGGTGCCCCCGCCGGTGATCGCCGAGAACCGTACC GAACTGATGACGCTGACCGCGACCAACCTCTTGGGGCAAAA CACGCCGGCGATCGAGGCCAATCAGGCCGCATACAGCCAG ATGTGGGGCCAAGACGCGGAGGCGATGTATGGCTACGCCG	7

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
	CCACGGCGGCGACGGCGACCGAGGCGTTGCTGCCGTTCGAG GACGCCCCACTGATCACCAACCCCGGCGGGCTCCTTGAGCA GGCCGTCGCGGTCGAGGAGGCCATCGACACCGCCGCGGCG AACCAGTTGATGAACAATGTGCCCCAAGCGCTGCAACAGCT GGCCCAGCCAGCGCAGGGCGTCGTACCTTCTTCCAAGCTGG GTGGGCTGTGGACGGCGGTCTCGCCGCATCTGTCGCCGCTC AGCAACGTCAGTTCGATAGCCAACAACCACATGTCGATGAT GGGCACGGGTGTGTCGATGACCAACACCTTGCACTCGATGT TGAAGGGCTTAGCTCCGGCGGCGGCTCAGGCCGTGGAAACC GCGGCGGAAAACGGGGTCTGGGCGATGAGCTCGCTGGGCA GCCAGCTGGGTTCGTCGCTGGGTTCTTCGGGTCTGGGCGCT GGGGTGGCCGCCAACTTGGGTCGGGCGGCCTCGGTCGGTTC GTTGTCGGTGCCGCCAGCATGGGCCGCGGCCAACCAGGCGG TCACCCCGGCGGCGCGGGCGCTGCCGCTGACCAGCCTGACC AGCGCCGCCCAAACCGCCCCCGGACACATGCTGGGCGGGCT ACCGCTGGGGCACTCGGTCAACGCCGGCAGCGGTATCAACA ATGCGCTGCGGGTGCCGGCACGGGCCTACGCGATACCCCGC ACACCGGCCGCCGGATTCTCCCGGCCGGGGCTGCCGGTCGA GTACCTGCAGGTGCCGTCGCCGTCGATGGGCCGCGACATCA AGGTTCAGTTCCAGAGCGGTGGGAACAACTCACCTGCGGTT TATCTGCTCGACGGCCTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGG CTGGGATATCAACACCCCGGCGTTCGAGTGGTACTACCAGT CGGGACTGTCGATAGTCATGCCGGTCGGCGGGCAGTCCAGC TTCTACAGCGACTGGTACAGCCCGGCCTGCGGTAAGGCTGG CTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCCTGACCAGCGAGC TGCCGCAATGGTTGTCCGCCAACAGGGCCGTGAAGCCCACC GGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTCGATGGCCGGCTCGTCGGC AATGATCTTGGCCGCCTACCACCCCCAGCAGTTCATCTACG CCGGCTCGCTGTCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATG GGGCCTAGCCTGATCGGCCTCGCGATGGGTGACGCCGGCGG TTACAAGGCCGCAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGG CATGGGAGCGCAACGACCCTACGCAGCAGATCCCCAAGCTG GTCGCAAACAACACCCGGCTATGGGTTTATTGCGGGAACGG CACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGCCGAGT TCTTGGAGAACTTCGTTCGTAGCAGCAACCTGAAGTTCCAG GATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGCACAACGCCGTGTTCAA CTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCG CTCAGCTCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGTTCGTTA GGCGCCGGCtgaaagctt	

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
Rv3619	ACCATCAACTATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACGGCGC CATGATCCGCGCTCAGGCCGGGTCGCTGGAGGCCGAGCATC AGGCCATCATTTCTGATGTGTTGACCGCGAGTGACTTTTGGG GCGGCGCCGGTTCGGCGGCCTGCCAGGGGTTCATTACCCAG CTGGGCCGTAACTTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCAACGC CCACGGGCAGAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACATGGCA CAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCC	8
Rv2389	GACGACATCGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGG CGGCAATTGGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTTATACGGTG GTCTGCAGATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGT GTCGGGTCGCCGGCGGCCGCGAGTCCCCAGCAACAGATCGA GGTCGCAGACAACATTATGAAAACCCAAGGCCCGGGTGCGT GGCCGAAATGTAGTTCTTGTAGTCAGGGAGACGCACCGCTG GGCTCGCTCACCCACATCCTGACGTTCCTCGCGGCCGAGAC TGGAGGTTGTTCGGGGAGCAGGGACGAT	9

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
Rv3478	GTGGTGGATTTCGGGGCGTTACCACCGGAGATCAACTCCGC GAGGATGTACGCCGGCCCGGGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCG CCGCGAAGATGTGGGACAGCGTGGCGAGTGACCTGTTTTCG GCCGCGTCGGCGTTTCAGTCGGTGGTCTGGGGTCTGACGGT GGGGTCGTGGATAGGTTCGTCGGCGGGTCTGATGGCGGCGG CGGCCTCGCCGTATGTGGCGTGGATGAGCGTCACCGCGGGG CAGGCCCAGCTGACCGCCGCCCAGGTCCGGGTTGCTGCGGC GGCCTACGAGACAGCGTATAGGCTGACGGTGCCCCCGCCGG TGATCGCCGAGAACCGTACCGAACTGATGACGCTGACCGCG ACCAACCTCTTGGGGCAAAACACGCCGGCGATCGAGGCCA ATCAGGCCGCATACAGCCAGATGTGGGGCCAAGACGCGGA GGCGATGTATGGCTACGCCGCCACGGCGGCGACGGCGACC GAGGCGTTGCTGCCGTTCGAGGACGCCCCACTGATCACCAA CCCCGGCGGGCTCCTTGAGCAGGCCGTCGCGGTCGAGGAGG CCATCGACACCGCCGCGGCGAACCAGTTGATGAACAATGTG CCCCAAGCGCTGCAACAGCTGGCCCAGCCAGCGCAGGGCGT CGTACCTTCTTCCAAGCTGGGTGGGCTGTGGACGGCGGTCT CGCCGCATCTGTCGCCGCTCAGCAACGTCAGTTCGATAGCC AACAACCACATGTCGATGATGGGCACGGGTGTGTCGATGAC CAACACCTTGCACTCGATGTTGAAGGGCTTAGCTCCGGCGG CGGCTCAGGCCGTGGAAACCGCGGCGGAAAACGGGGTCTG GGCGATGAGCTCGCTGGGCAGCCAGCTGGGTTCGTCGCTGG GTTCTTCGGGTCTGGGCGCTGGGGTGGCCGCCAACTTGGGT CGGGCGGCCTCGGTCGGTTCGTTGTCGGTGCCGCCAGCATG GGCCGCGGCCAACCAGGCGGTCACCCCGGCGGCGCGGGCG CTGCCGCTGACCAGCCTGACCAGCGCCGCCCAAACCGCCCC CGGACACATGCTGGGCGGGCTACCGCTGGGGCACTCGGTCA ACGCCGGCAGCGGTATCAACAATGCGCTGCGGGTGCCGGCA CGGGCCTACGCGATACCCCGCACACCGGCCGCCGGA	10

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
Rv1886	TTCTCCCGGCCGGGGCTGCCGGTCGAGTACCTGCAGGTGCC GTCGCCGTCGATGGGCCGCGACATCAAGGTTCAGTTCCAGA GCGGTGGGAACAACTCACCTGCGGTTTATCTGCTCGACGGC CTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGGCTGGGATATCAACAC CCCGGCGTTCGAGTGGTACTACCAGTCGGGACTGTCGATAG TCATGCCGGTCGGCGGGCAGTCCAGCTTCTACAGCGACTGG TACAGCCCGGCCTGCGGTAAGGCTGGCTGCCAGACTTACAA GTGGGAAACCTTCCTGACCAGCGAGCTGCCGCAATGGTTGT CCGCCAACAGGGCCGTGAAGCCCACCGGCAGCGCTGCAATC GGCTTGTCGATGGCCGGCTCGTCGGCAATGATCTTGGCCGC CTACCACCCCCAGCAGTTCATCTACGCCGGCTCGCTGTCGG CCCTGCTGGACCCCTCTCAGGGGATGGGGCCTAGCCTGATC GGCCTCGCGATGGGTGACGCCGGCGGTTACAAGGCCGCAG ACATGTGGGGTCCCTCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGCAAC GACCCTACGCAGCAGATCCCCAAGCTGGTCGCAAACAACAC CCGGCTATGGGTTTATTGCGGGAACGGCACCCCGAACGAGT TGGGCGGTGCCAACATACCCGCCGAGTTCTTGGAGAACTTC GTTCGTAGCAGCAACCTGAAGTTCCAGGATGCGTACAACGC CGCGGGCGGGCACAACGCCGTGTTCAACTTCCCGCCCAACG GCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCTCAGCTCAACGCC ATGAAGGGTGACCTGCAGAGTTCGTTAGGCGCCGGC	11

vetor pET29	catatgACCATCAACTATCAATTCGGGGACGTCGACGCTCACG GCGCCATGATCCGCGCTCAGGCCGGGTCGCTGGAGGCCGAG CATCAGGCCATCATTTCTGATGTGTTGACCGCGAGTGACTTT TGGGGCGGCGCCGGTTCGGCGGCCTGCCAGGGGTTCATTAC CCAGCTGGGCCGTAACTTCCAGGTGATCTACGAGCAGGCCA ACGCCCACGGGCAGAAGGTGCAGGCTGCCGGCAACAACAT GGCACAAACCGACAGCGCCGTCGGCTCCAGCTGGGCCGAC GACATCGATTGGGACGCCATCGCGCAATGCGAATCCGGCGG CAATTGGGCGGCCAACACCGGTAACGGGTTATACGGTGGTC TGCAGATCAGCCAGGCGACGTGGGATTCCAACGGTGGTGTC GGGTCGCCGGCGGCCGCGAGTCCCCAGCAACAGATCGAGG TCGCAGACAACATTATGAAAACCCAAGGCCCGGGTGCGTGG CCGAAATGTAGTTCTTGTAGTCAGGGAGACGCACCGCTGGG CTCGCTCACCCACATCCTGACGTTCCTCGCGGCCGAGACTG GAGGTTGTTCGGGGAGCAGGGACGATGTGGTGGATTTCGGG GCGTTACCACCGGAGATCAACTCCGCGAGGATGTACGCCGG CCCGGGTTCGGCCTCGCTGGTGGCCGCCGCGAAGATGTGGG ACAGCGTGGCGAGTGACCTGTTTTCGGCCGCGTCGGCGTTT CAGTCGGTGGTCTGGGGTCTGACGGTGGGGTCGTGGATAGG TTCGTCGGCGGGTCTGATGGCGGCGGCGGCCTCGCCGTATG TGGCGTGGATGAGCGTCACCGCGGGGCAGGCCCAGCTGACC GCCGCCCAGGTCCGGGTTGCTGCGGCGGCCTACGAGACAGC GTATAGGCTGACGGTGCCCCCGCCGGTGATCGCCGAGAACC GTACCGAACTGATGACGCTGACCGCGACCAACCTCTTGGGG CAAAACACGCCGGCGATCGAGGCCAATCAGGCCGCATACA GCCAGATGTGGGGCCAAGACGCGGAGGCGATGTATGGCTA CGCCGCCACGGCGGCGACGGCGACCGAGGCGTTGCTGCCGT TCGAGGACGCCCCACTGATCACCAACCCCGGCGGGCTCCTT GAGCAGGCCGTCGCGGTCGAGGAGGCCATCGACACCGCCG CGGCGAACCAGTTGATGAACAATGTGCCCCAAGCGCTGCAA CAGCTGGCCCAGCCAGCGCAGGGCGTCGTACCTTCTTCCAA GCTGGGTGGGCTGTGGACGGCGGTCTCGCCGCATCTGTCGC CGCTCAGCAACGTCAGTTCGATAGCCAACAACCACATGTCG ATGATGGGCACGGGTGTGTCGATGACCAACACCTTGCACTC GATGTTGAAGGGCTTAGCTCCGGCGGCGGCTCAGGCCGTGG AAACCGCGGCGGAAAACGGGGTCTGGGCGATGAGCTCGCT GGGCAGCCAGCTGGGTTCGTCGCTGGGTTCTTCGGGTCTGG GCGCTGGGGTGGCCGCCAACTTGGGTCGGGCGGCCTCGGTC GGTTCGTTGTCGGTGCCGCCAGCATGGGCCGCGGCCAACCA GGCGGTCACCCCGGCGGCGCGGGCGCTGCCGCTGACCAGCC TGACCAGCGCCGCCCAAACCGCCCCCGGACACATGCTGGGC GGGCTACCGCTGGGGCACTCGGTCAACGCCGGCAGCGGTAT CAACAATGCGCTGCGGGTGCCGGCACGGGCCTACGCGATAC CCCGCACACCGGCCGCCGGATTCTCCCGGCCGGGGCTGCCG GTCGAGTACCTGCAGGTGCCGTCGCCGTCGATGGGCCGCGA CATCAAGGTTCAGTTCCAGAGCGGTGGGAACAACTCACCTG CGGTTTATCTGCTCGACGGCCTGCGCGCCCAAGACGACTAC AACGGCTGGGATATCAACACCCCGGCGTTCGAGTGGTACTA CCAGTCGGGACTGTCGATAGTCATGCCGGTCGGCGGGCAGT CCAGCTTCTACAGCGACTGGTACAGCCCGGCCTGCGGTAAG GCTGGCTGCCAGACTTACAAGTGGGAAACCTTCCTGACCAG CGAGCTGCCGCAATGGTTGTCCGCCAACAGGGCCGTGAAGC	12

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
	CCACCGGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTCGATGGCCGGCTCG TCGGCAATGATCTTGGCCGCCTACCACCCCCAGCAGTTCAT CTACGCCGGCTCGCTGTCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGG GGATGGGGCCTAGCCTGATCGGCCTCGCGATGGGTGACGCC GGCGGTTACAAGGCCGCAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGA CCCGGCATGGGAGCGCAACGACCCTACGCAGCAGATCCCCA AGCTGGTCGCAAACAACACCCGGCTATGGGTTTATTGCGGG AACGGCACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGC CGAGTTCTTGGAGAACTTCGTTCGTAGCAGCAACCTGAAGT TCCAGGATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGCACAACGCCGT GTTCAACTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACT GGGGCGCTCAGCTCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGT TCGTTAGGCGCCGGCtgaaagctt	
	CCACCGGCAGCGCTGCAATCGGCTTGTCGATGGCCGGCTCG TCGGCAATGATCTTGGCCGCCTACCACCCCCAGCAGTTCAT CTACGCCGGCTCGCTGTCGGCCCTGCTGGACCCCTCTCAGG GGATGGGGCCTAGCCTGATCGGCCTCGCGATGGGTGACGCC GGCGGTTACAAGGCCGCAGACATGTGGGGTCCCTCGAGTGA CCCGGCATGGGAGCGCAACGACCCTACGCAGCAGATCCCCA AGCTGGTCGCAAACAACACCCGGCTATGGGTTTATTGCGGG AACGGCACCCCGAACGAGTTGGGCGGTGCCAACATACCCGC CGAGTTCTTGGAGAACTTCGTTCGTAGCAGCAACCTGAAGT TCCAGGATGCGTACAACGCCGCGGGCGGGCACAACGCCGT GTTCAACTTCCCGCCCAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACT GGGGCGCTCAGCTCAACGCCATGAAGGGTGACCTGCAGAGT TCGTTAGGCGCCGGCtgaaagctt	
JEVss-FWD	gctggcctccctggctgtggtcattgcctgcgctggagcaGCCGAGGTGACCAGGA GAGG	13
JEVss-REV	cacatgattgatccggcactcctcttgcccatggcggcggcGTGAGCTGGCGGCGG GTG	14
ZIKVss-FWD	ggaatcgtgggcctgctgctgaccacagcaatggcaGCCGAGGTGACCAGGAGA GG	15
ZIKVss-REV	CACGGATGTGTCTGCTCCTCTCCGCATGGCGGCGGCGTGAG CTGGCGGCGGGTG	16
ZIKV-prM-E-FWD	AATGGACTACGACATAGTCGCCGCCGCCATG	17
ZIKV-prM-E-REV	GCGGTTTTTGACAccgcggTCAGGCAGACACGGCG	18

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 1	HMTINYQFGDVDAHG	19
epítopo Id91 2	FGDVDAHGAMIRAQA	20
epítopo Id91 3	GAMIRAQAGSLEAEH	21
epítopo Id91 4	AGSLEAEHQAIISDV	22
epítopo Id91 5	HQAIISDVLTASDFW	23
epítopo Id91 6	VLTASDFWGGAGSAA	24
epítopo Id91 7	WGGAGSAACQGFITQ	25
epítopo Id91 8	ACQGFITQLGRNFQV	26
epítopo Id91 9	QLGRNFQVIYEQANA	27
epítopo Id91 10	VIYEQANAHGQKVQA	28
epítopo Id91 11	AHGQKVQAAGNNMAQ	29
epítopo Id91	AAGNNMAQTDSAVGS	30

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
12		
epítopo Id91 13	QTDSAVGSSWADDID	31
epítopo Id91 14	SSWADDIDWDAIAQC	32
epítopo Id91 15	DWDAIAQCESGGNWA	33
epítopo Id91 16	CESGGNWAANTGNGL	34
epítopo Id91 17	AANTGNGLYGGLQIS	35
epítopo Id91 18	LYGGLQISQATWDSN	36
epítopo Id91 19	SQATWDSNGGVGSPA	37
epítopo Id91 20	NGGVGSPAAASPQQQ	38
epítopo Id91 21	AAASPQQQIEVADNI	39
epítopo Id91 22	QIEVADNIMKTQGPG	40
epítopo Id91 23	IMKTQGPGAWPKCSS	41

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 24	GAWPKCSSCSQGDAP	42
epítopo Id91 25	SCSQGDAPLGSLTHI	43
epítopo Id91 26	PLGSLTHILTFLAAE	44
epítopo Id91 27	ILTFLAAETGGCSGS	45
epítopo Id91 28	ETGGCSGSRDDVVDF	46
epítopo Id91 29	SRDDVVDFGALPPEI	47
epítopo Id91 30	FGALPPEINSARMYA	48
epítopo Id91 31	INSARMYAGPGSASL	49
epítopo Id91 32	AGPGSASLVAAAKMW	50
epítopo Id91 33	LVAAAKMWDSVASDL	51
epítopo Id91 34	WDSVASDLFSAASAF	52
epítopo Id91	LFSAASAFQSVVWGL	53

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
35		
epítopo Id91 36	FQSVVWGLTVGSWIG	54
epítopo Id91 37	LTVGSWIGSSAGLMA	55
epítopo Id91 38	GSSAGLMAAAASPYV	56
epítopo Id91 39	AAAASPYVAWMSVTA	57
epítopo Id91 40	VAWMSVTAGQAQLTA	58
epítopo Id91 41	AGQAQLTAAQVRVAA	59
epítopo Id91 42	AAQVRVAAAAYETAY	60
epítopo Id91 43	AAAYETAYRLTVPPP	61
epítopo Id91 44	YRLTVPPPVIAENRT	62
epítopo Id91 45	PVIAENRTELMTLTA	63
epítopo Id91 46	TELMTLTATNLLGQN	64

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 47	ATNLLGQNTPAIEAN	65
epítopo Id91 48	NTPAIEANQAAYSQM	66
epítopo Id91 49	NQAAYSQMWGQDAEA	67
epítopo Id91 50	MWGQDAEAMYGYAAT	68
epítopo Id91 51	AMYGYAATAATATEA	69
epítopo Id91 52	TAATATEALLPFEDA	70
epítopo Id91 53	ALLPFEDAPLITNPG	71
epítopo Id91 54	APLITNPGGLLEQAV	72
epítopo Id91 55	GGLLEQAVAVEEAID	73
epítopo Id91 56	VAVEEAIDTAAANQL	74
epítopo Id91 57	DTAAANQLMNNVPQA	75
epítopo Id91	LMNNVPQALQQLAQP	76

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
58		
epítopo Id91 59	ALQQLAQPAQGVVPS	77
epítopo Id91 60	PAQGVVPSSKLGGLW	78
epítopo Id91 61	SSKLGGLWTAVSPHL	79
epítopo Id91 62	WTAVSPHLSPLSNVS	80
epítopo Id91 63	LSPLSNVSSIANNHM	81
epítopo Id91 64	SSIANNHMSMMGTGV	82
epítopo Id91 65	MSMMGTGVSMTNTLH	83
epítopo Id91 66	VSMTNTLHSMLKGLA	84
epítopo Id91 67	HSMLKGLAPAAAQAVE	85
epítopo Id91 68	PAAAQAVETAAENGV	86
epítopo Id91 69	ETAAENGVWAMSSLG	87

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 70	VWAMSSLGSQLGSSL	88
epítopo Id91 71	GSQLGSSLGSSGLGA	89
epítopo Id91 72	LGSSGLGAGVAANLG	90
epítopo Id91 73	AGVAANLGRAASVGS	91
epítopo Id91 74	GRAASVGSLSVPPAW	92
epítopo Id91 75	SLSVPPAWAAANQAV	93
epítopo Id91 76	WAAANQAVTPAARAL	94
epítopo Id91 77	VTPAARALPLTSLTS	95
epítopo Id91 78	LPLTSLTSAAQTAPG	96
epítopo Id91 79	SAAQTAPGHMLGGLP	97
epítopo Id91 80	GHMLGGLPLGHSVNA	98
epítopo Id91	PLGHSVNAGSGINNA	99

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
81		
epítopo Id91 82	AGSGINNALRVPARA	100
epítopo Id91 83	ALRVPARAYAIPRTP	101
epítopo Id91 84	AYAIPRTPAAGFSRP	102
epítopo Id91 85	PAAGFSRPGLPVEYL	103
epítopo Id91 86	PGLPVEYLQVPSPSM	104
epítopo Id91 87	LQVPSPSMGRDIKVQ	105
epítopo Id91 88	MGRDIKVQFQSGGNN	106
epítopo Id91 89	QFQSGGNNSPAVYLL	107
epítopo Id91 90	NSPAVYLLDGLRAQD	108
epítopo Id91 91	LDGLRAQDDYNGWDI	109
epítopo Id91 92	DDYNGWDINTPAFEW	110

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 93	INTPAFEWYYQSGLS	111
epítopo Id91 94	WYYQSGLSIVMPVGG	112
epítopo Id91 95	SIVMPVGGQSSFYSD	113
epítopo Id91 96	GQSSFYSDWYSPACG	114
epítopo Id91 97	DWYSPACGKAGCQTY	115
epítopo Id91 98	GKAGCQTYKWETFLT	116
epítopo Id91 99	YKWETFLTSELPQWL	117
epítopo Id91 100	TSELPQWLSANRAVK	118
epítopo Id91 101	LSANRAVKPTGSAAI	119
epítopo Id91 102	KPTGSAAIGLSMAGS	110
epítopo Id91 103	IGLSMAGSSAMILAA	111
epítopo Id91	SSAMILAAYHPQQFI	112

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
104		
epítopo Id91 105	AYHPQQFIYAGSLSA	113
epítopo Id91 106	IYAGSLSALLDPSQG	114
epítopo Id91 107	ALLDPSQGMGPSLIG	115
epítopo Id91 108	GMGPSLIGLAMGDAG	116
epítopo Id91 109	GLAMGDAGGYKAADM	117
epítopo Id91 110	GGYKAADMWGPSSDP	118
epítopo Id91 111	MWGPSSDPAWERNDP	119
epítopo Id91 112	PAWERNDPTQQIPKL	120
epítopo Id91 113	PTQQIPKLVANNTRL	121
epítopo Id91 114	LVANNTRLWVYCGNG	122
epítopo Id91 115	LWVYCGNGTPNELGG	123

Tabela 1: Descrição das Sequências		
Descrição	Sequências	SEQ ID NO
epítopo Id91 116	GTPNELGGANIPAEF	124
epítopo Id91 117	GANIPAEFLENFVRS	125
epítopo Id91 118	FLENFVRSSNLKFQD	126
epítopo Id91 119	SSNLKFQDAYNAAGG	127
epítopo Id91 120	DAYNAAGGHNAVFNF	128
epítopo Id91 121	GHNAVFNFPPNGTHS	129
epítopo Id91 122	FPPNGTHSWEYWGAQ	130
epítopo Id91 123	SWEYWGAQLNAMKGD	131
epítopo Id91 124	QLNAMKGDLQSSLGA	132
epítopo Id91 125	AMKGDLQSSLGAGKL	133

DESCRIÇÃO

[0064] No presente documento são fornecidas composições para entregar um agente bioativo a uma célula métodos de tal

entrega. Os NLCs têm um núcleo que compreende uma combinação de lipídeos em fase líquida e fase sólida. Em contrapartida a nanopartículas de lipídeo sólido (LNPs), que têm um núcleo cristalino completamente sólido, o núcleo de fase misturada em NLCs fornece mais versatilidade para incorporar moléculas ativas de várias estruturas. Sem se ater nenhuma toeira, acredita-se que a adição de lipídeos sólidos à composição gera núcleos de NLC com integridade e estabilidade estrutural. Nos NLCs da presente invenção, o núcleo de óleo de fase misturada é emulsificado com uma mistura de tensoativos (tipicamente, um éster de sorbitano e um tensoativo hidrofílico) e um componente catiônico (tipicamente, um lipídeo catiônico ou fosfolipídeo). Em contrapartida, tipicamente, agentes bioativos, tais como fármacos de molécula pequena, foram incorporados no núcleo de óleo dos NLCs, os presentes inventores sintetizaram NLCs que também podem interagir com agentes bioativos, tais como moléculas carregadas negativamente (por exemplo, RNA) em sua superfície ou próximo da mesma (isto é, o agente bioativo não é encapsulado pelo NLC). Os presentes inventores constataram que a estabilidade do NLC, a capacidade dos NLCs descritos para entregar ácido nucleico a uma célula e a capacidade de um agente bioativo de ácido nucleico e NLC para ser fabricado e armazenado separadamente e misturado imediatamente antes do uso permitem o uso desses NLCs em várias aplicações, incluindo como uma tecnologia de plataforma de ácido nucleico de resposta rápida para o desenvolvimento de múltiplos tratamento profiláticos ou terapêuticos. A plataforma de entrega de ácido nucleico de resposta rápida se baseia em um sistema flexível que utiliza composições de NLC para entregar ácidos nucleicos (por exemplo, RNA de replicação viral (rvRNA)) para conduzir a replicação de RNA e/ou expressão de proteína (por exemplo, levando a resposta imunológicas robustas e rápidas para diversificar antígenos virais, bacterianos ou parasíticos). As composições de NLC da presente invenção podem ser fabricadas e estocadas em pilha por períodos extensos. Em seguida, o veículo estocado em pilha pode ser combinado com ácido nucleico (por exemplo, rvRNA sintética que expressa um

antígeno protetor) durante um surto de doença emergente ou outro evento de saúde pública.

[0065] Além de fornecer NLCs para combinação com um agente bioativo, aqueles NLCs também são fornecidos quando são combinados. Consequentemente, em alguns aspectos, o agente bioativo é associado ao NLC. O agente bioativo pode ser entregue a um indivíduo e um momento de necessidade pela administração da composição do agente bioativo de NLC.

I. DEFINIÇÕES

[0066] Os termos a seguir têm os seguintes significados salvo quando indicado de outro modo. Quaisquer termos não definidos têm seus significados reconhecidos na técnica.

[0067] Na presente descrição, os termos "cerca de" e "que consiste essencialmente em" significam ± 20% da faixa, valor ou estrutura indicada, salvo quando indicado de outro modo.

[0068] O uso da alternativa (por exemplo, "ou") deve ser entendido como significando um, ambos ou uma combinação dos mesmos dentre as alternativas.

[0069] Conforme usado no presente documento, os termos "inclui(em)", "tem(têm)" e "compreende(m)" são usados como sinônimos, em que os termos variantes dos mesmos devem ser interpretados como não limitativos.

[0070] Conforme usado no presente documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem o plural, salvo quando o contexto claramente ditar claramente de outro modo.

[0071] O termo "macromolécula", conforme usado no presente documento, se refere a moléculas grandes exemplificativas, porém sem limitação, peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e polinucleotídeos da origem biológica ou sintética.

[0072] O termo "alquila" significa um hidrocarbonato

alifático saturado ou insaturado de cadeia reta ou ramificada não cíclico ou cíclico que contém o número indicado de átomos de carbono.

[0073] As alquilas insaturadas contêm pelo menos uma ligação dupla ou tripla entre átomos de carbono adjacentes.

[0074] Os termos “polipeptídeo”, “peptídeo” e “proteína” são usados de maneira intercambiável no presente documento para se referir aos polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender nucleotídeos ou aminoácidos modificados e pode ser interrompido por não nucleotídeos ou não aminoácidos. Os termos também abrangem um polímero de nucleotídeo ou de aminoácido que foi modificado naturalmente ou por intervenção ou por intervenção; por exemplo, formação de ligação de bissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outa manipulação ou modificação, tal como conjugação com um componente de identificação. Também são abrangidos pela definição, por exemplo, polinucleotídeos ou polipeptídeos que contêm um ou mais análogos de um nucleotídeo ou um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais etc.), assim como outras modificações conhecidas na técnica.

[0075] O termo "isolado(a)" significa que a molécula foi removida de seu ambiente natural.

[0076] "Purificado(a)" significa que a molécula foi aumentada em pureza, de modo que exista em uma forma que é mais pura do que existe em seu ambiente natural e/ou quando sintetizado inicialmente e/ou amplificado sob afecções laboratoriais. A pureza é um termo relativo e não necessariamente significa pureza absoluta.

[0077] Um "polinucleotídeo" ou "ácido nucleico," conforme usado de maneira intercambiável no presente documento, se refere a polímeros de nucleotídeos de qualquer comprimento, inclui DNA e RNA. Os nucleotídeos podem ser, por exemplo, desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos, nucleotídeos ou bases modificadas e/ou análogos dos mesmos ou qualquer substrato que pode ser incorporado em um polímero por

DNA ou RNA polimerase ou por uma reação sintética. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e seus análogos. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e seus análogos.

[0078] "Oligonucleotídeo", conforme usado no presente documento, se refere geralmente a polinucleotídeos curtos, geralmente de fita simples, geralmente sintéticos que têm um comprimento, em geral, porém não necessariamente, inferior a cerca de 200 nucleotídeos. Os termos "oligonucleotídeo" e "polinucleotídeo" não são mutuamente exclusivos. A descrição acima para polinucleotídeos é igual e completamente aplicável a oligonucleotídeos.

[0079] Um “indivíduo” ou um “sujeito” é qualquer mamífero. Os mamíferos incluem, porém sem limitação, humanos, primatas, animais de gado, animais esportivos e animais domésticos (tais como, cachorros, cavalos) e roedores.

[0080] Um "replicon", conforme usado no presente documento, inclui qualquer elemento genético, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo, bacmídeo, fago ou vírus que tem capacidade para replicação ampla sob seu próprio controle. Um replicon pode ser ou RNA ou DNA e pode ser fita simples ou dupla fita.

[0081] Vitamina E se refere tanto a tocoferóis (TCPs) quanto tocotrienóis e podem ser de ocorrência naturais ou sintéticos.

[0082] Os monoacilgliceróis são ésteres do glicerol de álcool tri-hidrícos nos quais um dentre os grupos hidroxila é esterificado com um ácido graxo de cadeia longa.

[0083] Os lauroil polioxilglicerídeos são uma mistura de monoésteres, diésteres e triésteres de glicerol e monoésteres e diésteres de polietileno glicóis com um peso molecular relativo médio tipicamente entre 300 e cerca de 1.500.

[0084] O triglicerídeo cáprico/caprílico é um triéster

misturado de glicerina e caprílico e ácidos cápricos.

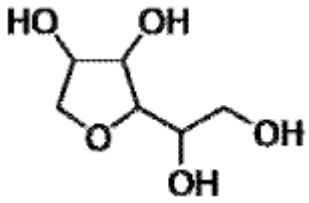
[0085] O termo lipídeo em fase líquida se refere a um lipídeo que, antes da mistura com qualquer outro componente, é líquido à temperatura ambiente.

[0086] O termo lipídeo em fase sólida se refere a um lipídeo que, antes da mistura com qualquer outro componente, é sólido à temperatura ambiente.

[0087] A temperatura ambiente está entre 15 ºC e 25 ºC.

[0088] O glicerolipídeo é uma molécula graxa composta de glicerol ligado estericamente a um ácido graxo. Os glicerolipídeos incluem triglicerídeos e diglicerídeos.

[0089] O termo "éster de sorbitano", conforme usado no presente documento, se refere a um éster de sorbitano. O sorbitano é conforme mostrado na Fórmula A



Fórmula A

[0090] Os ésteres de sorbitano particularmente preferenciais são ésteres alquílicos de sorbitano, em que a alquila é um grupo C_1-C_{30} alquila, de preferência, um grupo C_1-C_{20} alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C_{10}-C_{20} alquila saturado ou não saturado.

[0091] A prática da presente invenção empregará, salvo quando indicado de outro modo, técnicas convencionais de biologia molecular, DNA recombinante, bioquímica e química, que são abrangidos pelo escopo da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Consequentemente, por exemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., edição Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); DNA

Cloning, Volumes I e II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., Patente nº U.S. 4.683, 195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); e em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

II. CARREADORES DE LIPÍDEO NANOESTRUTURADOS

[0092] A presente revelação fornece, entre outros, NLCs para entrega de um agente bioativo a uma célula. As composições de NLC são formadas de partículas de NLC que compreende (a) um núcleo de óleo que compreende um lipídeo em fase líquida e um lipídeo em fase sólida, (b) a um componente catiônico (de preferência, um lipídeo catiônico ou fosfolipídeo) (c) um tensoativo hidrofóbico, de preferência, um éster de sorbitano (por exemplo, monoéster de sorbitano, diéster ou triéster) e (d) um tensoativo (de preferência, um tensoativo hidrofílico). Os NLCs da presente invenção compreendem tipicamente uma matriz de lipídeo sólido não estruturado ou amorfo formada por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos mesclados dispersos em uma fase aquosa. Um ou mais dentre os tensoativos podem estar presentes na fase de óleo, a fase aquosa ou na interface entre a fase oleosa e aquosa. Em determinados aspectos, o éster de sorbitano e o lipídeo catiônico estão presentes na interface entre a fase oleosa e aquosa.

[0093] Os presentes inventores constataram que os NLCs reivindicados são particularmente eficazes na entrega de ácido nucleico de codificação de proteína, tais como RNA. Além disso, constatou-se que manipulando-se determinados componentes do NLC, os níveis de expressão da proteína codificada podem ser aumentados. Supreendentemente, os NLCs exemplificativos não têm capacidade apenas para entregar com eficácia o RNA, os mesmos também podem aprimorar a resposta imunológica `às proteínas codificadas.

A. LIPÍDEOS DE FASE LÍQUIDA E DE FASE SÓLIDA

[0094] Os NLCs são compostos de uma mescla de lipídeos sólidos e líquidos. Os lipídeos líquidos e sólidos a serem usados nos NLCs podem ser qualquer lipídeo com capacidade para formar uma matriz de lipídeo sólido não estruturado ou amorfo e que forma uma composição estável. A razão de peso entre sólido e líquido pode variar amplamente, por exemplo, de 0,1:99,9 a 99,9:0,1. Em algumas modalidades exemplificativas, os lipídeos sólidos são misturados com lipídeos líquidos em uma razão de peso entre lipídeo sólido:líquido de cerca de 70:30 a cerca de 99,9:0,1 ou de cerca de 1:10 a cerca de 1:30. Em alguns aspectos, os lipídeos sólidos são misturados com lipídeos líquidos em uma razão de peso entre lipídeo sólido:líquido de cerca de 1:16.

[0095] O total do componente de núcleo de óleo (lipídeo sólido + óleo líquido) da composição ou formulação à base de NLC está tipicamente presente em uma quantidade de cerca de 0,2% a cerca de 50% (em p/v). Por exemplo, o NLC pode compreender de cerca de 0,2% a cerca de 50% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, 0,2% a cerca de 40%) (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 30% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 15%) (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 10% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2%) a cerca de 9% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 8% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 7% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 6%) (em p/v) componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2% a cerca de 5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,2%) a cerca de 4,3% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,3% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,4% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 0,5% a cerca de 20%) (em p/v) componente de núcleo de óleo, de cerca de 1% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 2% a cerca de 20% (em p/v) do

componente de núcleo de óleo, de cerca de 3% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 4% a cerca de 20% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, de cerca de 5% a cerca de 20%) do (em p/v) componente de núcleo de óleo, cerca de 0,5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 1% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 1,5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 2% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 2,5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 3% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 3,5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 4% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 4,3% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, cerca de 5% (em p/v) do componente de núcleo de óleo, ou cerca de 10% (em p/v) do componente de núcleo de óleo ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para o componente de núcleo de óleo. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0096] O núcleo de óleo do NLC compreende um lipídeo em fase líquida. De preferência, embora não necessariamente, o lipídeo em fase líquida é um óleo não tóxico metabolizável; com mais preferência, um dentre 6 a cerca de 30 átomos de carbono que inclui, porém sem limitação, alcanos, alcenos, alcinas e seus ácidos correspondentes e álcoois, os éteres e ésteres dos mesmos, e misturas dos mesmos. O óleo pode ser, por exemplo, qualquer óleo vegetal, óleo de peixe, óleo animal ou óleo sinteticamente preparado que pode ser administrado a um indivíduo. Em alguns aspectos, o lipídeo em fase líquida será não metabolizável.

[0097] O óleo pode ser, por exemplo, qualquer alcano, alcano ou alcina de cadeia longa ou um derivado de ácido ou de álcool do mesmo ou como o ácido livre, sal do mesmo ou um éster, tal como um mono- ou di- ou triéster, tal como os triglicerídeos e ésteres de 1,2-propanodiol ou álcoois de poli-hidróxi semelhantes. Os álcoois podem ser acilados empregando um ácido

mono- ou polifunctional, por exemplo, ácido acético, ácido propanoico, ácido cítrico ou semelhantes. Os éteres derivados de álcoois de cadeia longa que são óleos e atendem aos outros critérios apresentados no presente documento podem ser usados.

[0098] A porção química individual de alcano, alceno ou alcina e derivados de ácido ou álcool da mesa terá geralmente de cerca de 6 a cerca de 40 ou de 6 a cerca de 30 átomos de carbono. A porção química pode ter uma estrutura de cadeia reta ou ramificada. Esta pode ser completamente saturada ou pode ter uma ou mais ligações duplas ou triplas. Quando óleos à base de mono ou poliéster ou de mono ou poliéter são empregados, a limitação de cerca de 6 a cerca de 40 carbonos se aplica às porções químicas de ácido graxo individual ou de álcool graxo, não a contagem total de carbono.

[0099] Quaisquer óleos adequados de uma fonte animal, de peixe ou vegetal podem ser usados. As fontes para óleos vegetais incluem nozes, sementes e grãos e óleos adequados incluem, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de coco e óleo azeite e semelhantes. Outros óleos de semente adequados incluem óleo de cártamo, óleo de semente de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de semelhante de sésamo e semelhantes. No grupo de grãos, óleo de milho e o óleo de outros grãos de cereal, tais como trigo, aveias, centeio, arroz, arrulo, triticale e semelhantes também podem ser usados. A tecnologia para obter óleos vegetais é bem desenvolvida e bem conhecida. As composições desses e outros óleos semelhantes podem ser encontradas, por exemplo, no Índice de Merck, e as materiais de origem para alimentos, nutrição e tecnologia de alimentos.

[0100] A maioria dos peixes contém óleos metabolizáveis que podem ser recuperados prontamente. Por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, óleos de fígado de tubarão, e óleo de baleia, tais como espermacete, exemplificam diversos dentre os óleos de peixe que podem ser usados no presente documento. Vários óleos de cadeia ramificada são sintetizados de maneira bioquímica em unidades de isopropeno de 5 carbonos

e são denominados geralmente de terpenoides. Os terpenoides de ocorrência natural ou sintética, também denominadas de isoprenoides, podem ser usados no presente documento como um lipídeo em fase líquida. O esqualeno, um terpenoide ramificado não saturado, é particularmente preferencial no presente documento. Uma fonte principal de esqualeno é óleo de fígado de tubarão, embora óleos vegetais (primariamente, óleos vegetais), incluindo semente de amaranto, farelo de arroz, gérmen de trigo e azeites, também são fontes adequadas. O esqualano, o análogo saturado ao esqualeno, também é preferencial. Os óleos, incluindo óleos de peixe, tais como esqualeno e esqualano, estão prontamente disponíveis a partir de fontes comercial ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na técnica. Os óleos a serem usados no presente documento também podem ser produzidos com o uso de meios sintéticos, incluindo modificação genética (por exemplo, óleos produzidos a de levedura submetida a engenharia biológica, incluindo esqualeno.)

[0101] Os lipídeos em fase líquida exemplificativos que podem ser usados na presente invenção incluem, por exemplo, óleo de rícino, óleo de coco, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de prímula da noite, óleo de peixe, óleo de uva, óleo de jojoba, óleo de banha, óleo de linho, azeite, óleo de amendoim, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo de soja, esqualeno, esqualano, óleo de girassol, óleo de gérmen de trigo, óleo de mineral, triglicerídeo cáprico/caprílico (por exemplo, Myglyol®810, Myglyol®812, Labrafac™), vitamina E (por exemplo, TOS, TPGS), polioxilglicerídeos de lauroíla (por exemplo, Gelucire®44/14), monoacilgliceróis (por exemplo, Myverol 18-99 K), lecitina de soja (por exemplo, Epikuron™200), farneseno ou uma combinação dos mesmos.

[0102] O lipídeo em fase líquida pode incluir, por exemplo, esqualeno, óleo de girassol, óleo de soja, azeite, óleo de semente de uva, esqualano, triglicerídeo cáprico/caprílico ou uma combinação dos mesmos.

[0103] O lipídeo em fase líquida pode incluir, por exemplo, esqualeno, esqualeno, triglicerídeo cáprico/caprílico ou uma

combinação dos mesmos.

[0104] O lipídeo em fase líquida pode incluir, por exemplo, triglicerídeo cáprico/caprílico, vitamina E, lauroil polioxilglicerídeos, monoacilgliceróis, lecitina de soja, esqualeno ou esqualano ou uma combinação dos mesmos.

[0105] O lipídeo em fase líquida pode incluir, por exemplo, esqualeno, esqualeno ou farneseno ou uma combinação dos mesmos.

[0106] O núcleo de óleo do NLC compreende um lipídeo em fase sólida. Uma ampla variedade de lipídeos de fase sólida pode ser usada, incluindo, por exemplo, glicerolipídeos. Os lipídeos de fase sólida exemplificativos incluem, por exemplo, palmitoestearato de glicerila (Precitol ATO®5), glicerilmonoestearato, dibe-henato de glicerila (Compritol®888 ATO), palmitato de cetila (Crodamol™ CP), ácido esteárico, tripalmitina ou um triglicerídeo microcristalino. Os triglicerídeos microcristalinos exemplificativos incluem aqueles vendidos sobre o nome comercial Dynasan® (por exemplo, trimiristina (Dynasan® 114) ou tristearina (Dynasan® 118) ou tripalmitina (Dynasan®116)).

[0107] O lipídeo em fase sólida pode ser, por exemplo, um triglicerídeo microcristalino, por exemplo, um selecionado a partir de trimiristina (Dynasan® 114) ou tristearina (Dynasan® 118).

[0108] De preferência, o lipídeo em fase sólida do núcleo de óleo é sólido à temperatura ambiente. Quando em ambiente interno, a temperatura ambiente é tipicamente entre 15 ºC e 25 ºC.

[0109] Em qualquer uma das modalidades fornecidas no presente documento, o lipídeo em fase sólida pode ser um glicerolipídeo, por exemplo, um triglicerídeo microcristalino.

[0110] Em qualquer uma das modalidades fornecida no presente documento, o lipídeo em fase líquida pode ser esqualeno de ocorrência natural ou sintética.

B. COMPONENTE CATIÔNICO

[0111] Os NLCs descritos no presente documento compreendem um componente catiônico, tipicamente um lipídeo catiônico. O componente catiônico é útil para interagir com agentes bioativos negativamente mudados na superfície na NLC. Qualquer lipídeo catiônico com capacidade para interagir com agentes bioativos mudados negativamente que não prejudicaria a estabilidade do NLC e pode ser administrado a um indivíduo pode ser usado. De modo geral, o lipídeo catiônico contém um átomo de nitrogênio que é carregado positivamente sob condições fisiológicas. Os lipídeos catiônicos adequados incluem, cloreto de benzalcônio (BAK), cloreto de benzetônio, cetrimida (que contém brometo de tetradeciltrimetilamônio e, possivelmente, pequenas quantidades de brometo de dodeciltrimetilamônio e brometo de hexadeciltrimetilamônio), cloreto de cetilpiridínio (CPC), cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), aminas primários, aminas secundárias, aminas terciárias, incluindo, porém sem limitação N,N',N'-polioxietileno (10)-N-sebo-1,3-diaminopropano, outros sais de amina quaternária, incluindo, porém sem limitação brometo de dodeciltrimetilamônio, brometo de hexadeciltrimetil-amônio, brometo de alquil-trimetil-amônio misturado, cloreto de benzildimetildodecilamônio, cloreto de benzildimetil-hexadecil-amônio, metóxido de benziltrimetilamônio, brometo de cetildimetiletilamônio, brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB), cloreto de metilbenzetônio, cloreto de decametônio, cloreto de trialquilamônio misturado com metila, cloreto de metil trioctilamônio, cloreto de N,N-dimetil-N-[2(2-metil-4-(1,1,3,3tetrametilbutil)-fenoxi]-etoxi)etil]-benzenometa-namínio (DEBDA), sais de dialquildimetilamônio, cloreto de [l-(2,3- dioleiloxi)-propil]-N,N,N,trimetilamônio, 1,2-diacil-3-(trimetilamônio)propano (grupo acila=dimiristoila, dipalmitoila, distearoila, dioleoila), 1,2-diacil-3(dimetilamônio)propano (grupo acila=dimiristoila, dipalmitoila, distearoila, dioleoila), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amônio)butanoil-sn-glicerol, éster de 1,2-dioleoil 3-succinil-sn-glicerol colina, (4'-trimetilamônio)butanoato) de colesterila, sais de piridínio de N-alquila (por exemplo, brometo de cetilpiridínio e cloreto de cetilpiridínio), sais de N-

alquilpiperidínio, eletrólitos de blaforma dicatiônicos (C_{12}Me6; C_{12}Bu6), dialquilglicetilfosforilcolina, lisolecitina, L-α dioleoilfosfatidiletanolamina, éster de colina hemisucinato de colesterol, lipopoliaminas, incluindo porém sem limitação dioctadecilamidoglicilspermina (DOGS), fosfatidiletanol-amidospermina de dipalmitoila (DPPES), lipopoli-L (ou D)-lisina (LPLL, LPDL), poli (L (ou D)-lisina conjugada a N-glutarilfosfatidiletanolamina, éster de glutamato de didodecila com grupo amino pendente (C_{12}GluPhCnN+), éster de glutamato de ditetradecila com grupo amino pendente ($C_1$4GluCnN+), derivados catiônios de colesterol, incluindo, porém sem limitação, sal de colesteril-3β-oxisuccinamidoetilenotrimetilamônio, colesteril-3β-oxisuccinamidoetilenodimetilamina, sal de colesteril-3β-carboxiamidoetilenotrimetilamônio, colesteril-3β-carboxiamidoetilenodimetilamina e 3γ-[N— (N',N-dimetilaminoetanocarbomoil]colesterol) (DC-colesterol), 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamônio)propano (DOTAP), dimetildioctadecilamônio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetilamôniopropano (DMTAP), propano de dipalmitoil(C16:0)trimetilamônio (DPTAP), propano de distearoiltrimetilamônio (DSTAP) e combinações dos mesmos.

[0112] Outros lipídeos catiônicos adequados para uso na invenção incluem, por exemplo, os lipídeos catiônicos descritos nas Publicações de Patente nº U.S. 2008/0085870 (publicados em 10 de abril de 2008) e 2008/0057080 (publicado em 6 de março de 2008).

[0113] Outros lipídeos catiônicos adequados para a invenção incluem, por exemplo, lipídeos E0001- E0118 ou E0119-E0180, conforme revelado na Tabela 6 (páginas 112 a 139) do documento WO 2011/076807 (que também revela métodos para produzir e métodos para usar esses lipídeos catiônicos). Os lipídeos catiônicos adequados adicionais incluem cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), cloreto de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamônio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP), 1,2-

dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA).

[0114] Os NLCs podem compreender um ou qualquer combinação dentre dois ou mais dentre os lipídeos catiônicos descritos no presente documento.

[0115] Nas modalidades exemplificativas, o lipídeo catiônico é selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamônio)propano (DOTAP), 313-[N— (N',N'- Dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (Colesterol DC), dimetildioctadecilamônio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetilamôniopropano (DMTAP), propano de dipalmitoil(C16:0)trimetil amônio (DPTAP), propano de distearoiltrimetilamônio (DSTAP), lipídeos E0001-E0118 ou E0119-E0180, conforme revelado na Tabela 6 (páginas 112 a 139) do documento WO 2011/076807 e combinações dos mesmos.

[0116] Em outras modalidades exemplificativas, o lipídeo catiônico é selecionado a partir do grupo que consiste em 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamônio)propano (DOTAP), 313-[N— (N',N'- Dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (Colesterol DC), dimetildioctadecilamônio (DDA), 1,2-Dimiristoil-3-Trimetilamôniopropano (DMTAP), propano de dipalmitoil(C16:0)trimetil amônio (DPTAP), propano de distearoiltrimetilamônio (DSTAP), cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N- trimetilamônio (DOTMA), cloreto de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamônio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3- dimetilamônio-propano (DODAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), lipídeos E0001-E0118 ou EOl 19-E0180, conforme revelado na Tabela 6 (páginas 112 a 139) do documento WO 2011/076807 e combinações dos mesmos.

[0117] Os lipídeos catiônicos exemplificativos são selecionados a partir do seguinte: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamônio)propano (DOTAP), 3β-[N— (N',N'-Dimetilaminoetano)- carbamoil]colesterol (Colesterol DC), dimetildioctadecilamônio (DDA), 1,2- Dimiristoil-3-Trimetilamôniopropano (DMTAP), dipalmitoil(Ci6:o)trimetil amônio propano (DPTAP), propano de

distearoiltrimetilamônio (DSTAP), cloreto de N-[1-(2,3- dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), cloreto de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamônio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio-propano (DODAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA) ou uma combinação dos mesmos. Os lipídeos catiônicos adequados adicionais podem ser conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

[0118] Em determinadas modalidades, a composição ou formulação de composição à base de NLC compreende de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 50 mg/ml do componente catiônico (por exemplo, o lipídeo catiônico). Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DOTAP. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 25 mg/ml ou 30 mg/ml de DOTAP ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para DOTAP.

[0119] Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é Colesterol DC. Em determinados aspectos, o NLC pode compreender Colesterol DC a de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 5 mg/ml Colesterol DC. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DDA. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 5 mg/ml de DDA. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DOTMA. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 25 ou 30 mg/ml DOTMA. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DOEPC. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 25 mg/ml de DOEPC. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DSTAP. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 50 mg/ml de DSTAP. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DODAC. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 50 mg/ml de DODAC. Em determinadas modalidades, o lipídeo catiônico é DODAP. O NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,5 mg/ml a cerca de 50 mg/ml de DODAP.

[0120] Com relação ao peso por volume, uma

composição ou formulação exemplificativa à base de NLC pode compreender, por exemplo, de cerca de 0,05 % a cerca de 5% ou a cerca de 10% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico tal como DOTAP), de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v do componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 0,2% a cerca de 2% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 2% a 10% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 2% a cerca de 5% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 1% a cerca de 5% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP), de cerca de 3% a cerca de 5% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP) ou de cerca de 3% a cerca de 4% em p/v de componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico, tal como DOTAP) ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para o componente catiônico. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0121] Em alguns casos, pode ser desejável usar um lipídeo catiônico que é solúvel no núcleo de óleo. Por exemplo, DOTAP DOEPC, DODAC e DOTMA são solúveis em esqualeno ou esqualano. Em outros casos, pode ser desejável usar um lipídeo catiônico que não é solúvel no núcleo de óleo. Por exemplo, DDA e DSTAP não são solúveis esqualeno. É abrangido pelo conhecimento na técnica a determinação da possibilidade de um lipídeo particular ser solúvel ou insolúvel no óleo e escolher uma combinação apropriada de óleo e de lipídeo de modo correspondente. Por exemplo, a solubilidade pode ser prevista com base nas estruturas do lipídeo e óleo (por exemplo, a solubilidade de um lipídeo pode ser determinada pela estrutura de sua cauda). Por exemplo, os lipídeos que têm uma ou duas cadeias de ácido graxo (por

exemplo, caudas de oleoíla), tais como DOTAP, DOEPC, DODAC, DOTMA são solúveis em esqualeno ou esqualano; ao passo que os lipídeos que têm cadeias de ácido graxo saturados (por exemplo, caudas de estearoíla) não são solúveis em esqualeno.

[0122] Alternativamente, a solubilidade pode ser determinada de acordo com a quantidade do lipídeo que dissolve em uma determinada quantidade do óleo para formar uma solução saturada).

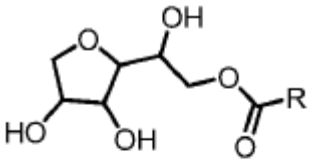
[0123] O NLC pode compreender lipídeos adicionais (isto é, lipídeos neutros e aniônicos) na combinação com o lipídeo catiônico desde que a carga de superfície líquida do NLC antes da mistura com o agente bioativo é positiva. Os métodos para medir a carga de superfície de um NLC são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, conforme medido pelo Difusão Dinâmica de Luz (DLS), Espectroscopia de Correlação de Fóton (PCS) ou eletroforese de gel.

C. MONOÉSTER DE SORBITANO

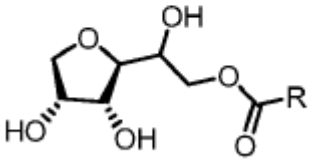
[0124] Os presentes inventores constataram que um éster de sorbitano quando adicionados à NLC podem atuar para intensificar a eficácia do NLC na entrega do agente bioativo a uma célula e/ou em elicitar anticorpos a um antígeno em um indivíduo em que o agente bioativo é um antígeno ou codifica o antígeno e a composição é administrada a um indivíduo. Em particular, constatou-se que a resposta imunológica às proteínas codificadas no ácido nucleico bioativo pode ser modulada pela seleção de éster de sorbitano usada no NLC. Constatou-se surpreendentemente que o uso de um monoéster de sorbitano foi particularmente eficaz no aperfeiçoamento do NLC. Em alguns aspectos, a cadeia de acila do monoéster de sorbitano é saturada. Além disso, sem se ater qualquer teoria, constatou-se supreendentemente que o éster de sorbitano e, em particular, o monoéster de sorbitano, atua em combinação com o lipídeo sólido (por exemplo, triglicerídeos microcristalinos) para aperfeiçoar a eficácia da atividade adjuvante do NLC (por exemplo, em elicitar anticorpos em um indivíduo em que o agente bioativo é um antígeno ou codifica o antígeno e a

composição é administrada a indivíduo).

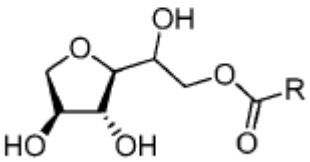
[0125] Os monoésteres de sorbitano estão comercialmente disponíveis sob as marcas registradas SPAN®ou ARLACEL®. Um monoéster de sorbitano exemplificativo para uso no presente documento pode ser representado como um composto de Fórmula I ou um estereoisômero do mesmo (incluindo, porém sem limitação, Fórmula la, lb, Ic ou Id) em que R é um grupo C_1-C_{30} alquila saturado ou não insaturado, de preferência, um grupo alquila C_1-C_{20} saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo alquila C_{10}-C_{20} saturado ou não saturado. Em modalidades exemplificativas, o grupo alquila é não cíclico. Os monoésteres de sorbinato exemplificativos também incluem isômeros posicionais de Fórmulas I, la, lb, Ic ou Id (por exemplo, um dentre os grupos hidróxi funcionais é substituído por um grupo éster funcional (por exemplo, um éster alquílico em que a alquila é um grupo C_1-C_{30} alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C_1-C_{20} alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo alquila C_{10}-C_{20} saturado ou não saturado e R é OH). O técnico versado na técnica observará que os monoésteres de sorbinato exemplificativos podem ser formas de sal (por exemplo, sais farmaceuticamente aceitáveis) de Fórmulas I, la, lb, Ic, Id e estereoisômeros ou isômeros posicionais dos mesmos.



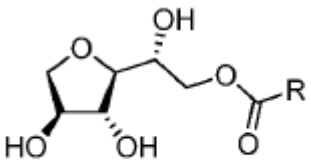
Fórmula I



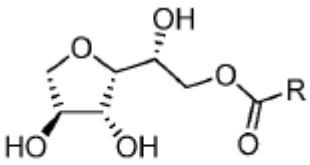
Fórmula Ia



Fórmula Ib

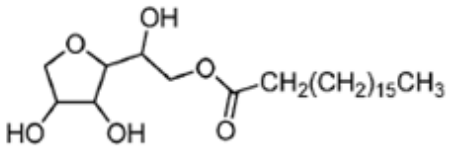


Fórmula Ic

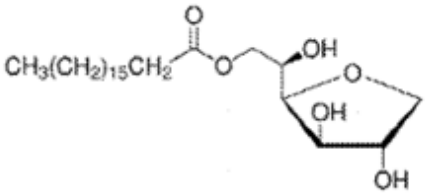


Fórmula Id

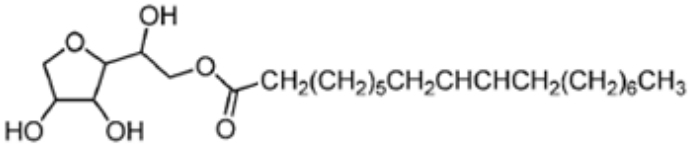
[0126] Os monoésteres de sorbinato particularmente preferenciais nesse sentido são monoestearato de sorbitano (também conhecido como Span®60 e mostrado abaixo) e mono-oleato de sorbitano (também conhecido como Span®80 e mostrado abaixo), embora outros monoésteres de sorbinato possam ser usados (incluindo, porém sem limitação, monolaurato de sorbitano (Span®20), monopalmitato de sorbitano (Span®40)). O monoestearato de sorbitano exemplificativo é representado pela Fórmula II ou IIa ou uma forma de sal dos mesmos e mono-oleato de sorbitano exemplificativo é representado pela Fórmula III ou IIIa ou uma forma de sal dos mesmos.



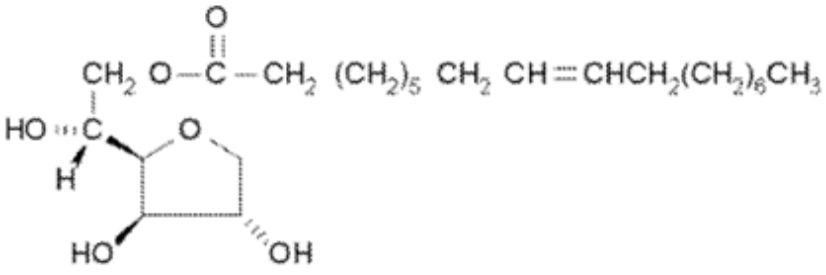
Fórmula II



Fórmula IIa



Fórmula III



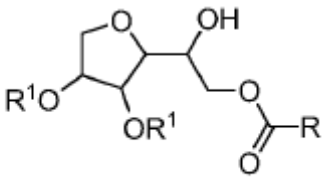
Fórmula IIIa

[0127] Além do fornecimento de monoésteres de sorbinato como um componente de NLC, é, também, contemplada a substituição do monoéster de sorbitano para um tensoativo hidrofóbico alternativo, incluindo tensoativos alternativos não iônicos à base de sorbitano. De modo correspondente, no presente documento também são fornecidas partículas de NLC que compreendem um núcleo de óleo que um lipídeo em fase líquida e um lipídeo em fase sólida, um componente catiônico (de preferência, um lipídeo catiônico ou fosfolipídeo), um tensoativo hidrofóbico (por exemplo, tensoativos não iônicos que incluem tensoativos não iônicos à base de sorbitano) e um tensoativo hidrofílico. Os tensoativos não iônicos à base de sorbitano incluem ésteres de sorbitano diferentes dos monoésteres de sorbinato, por exemplo, diésteres de sorbitano e triésteres de sorbitano, tais como por exemplo, trioleato de sorbitano (SPAN85™) e triestearato de sorbitano (SPAN65™). De modo geral, o tensoativo não iônico (incluindo tensoativo não iônico à base de sorbitano) terá um número de saldo hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 1,8 a 8,6. Todas as modalidades fornecidas no presente documento para os NLCs que compreendem um monoéster de sorbitano são aplicáveis e contempladas para os NLCs que compreendem um tensoativo hidrofóbico alternativo no lugar do monoéster de sorbitano, por exemplo, NLCs que compreendem um diéster de sorbitano ou triéster no lugar do monoéster de sorbitano. O diéster e triéster de sorbitano ou outro tensoativo hidrofóbico pode estar presenta nas mesmas concentrações que o monoéster de sorbitano. Em alguns aspectos, as cadeias acila do diéster ou triéster de sorbitano serão saturadas.

[0128] De modo geral, os ésteres de sorbitano (por exemplo, monoésteres de sorbinato) têm um valor de saldo hidrófilo-lipófilo (HLB) de 1 a 9. Em algumas modalidades, os ésteres de sorbitano (por exemplo, monoésteres de sorbinato) têm um valor de HLB de 1 a 5. Em algumas modalidades, o tensoativo hidrofóbico tem um valo de HLB de cerca de 4 a 5.

[0129] Um diéster de sorbitano exemplificativo para uso no presente documento pode ser representado como um composto da

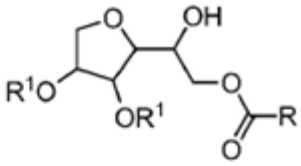
Fórmula IV a seguir ou um estereoisômero do mesmo (por exemplo, em que R é um grupo C_1-C_{30}alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C1-C20 alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C10-C20 alquila saturado ou não saturado e pelo menos um dentre R^1 é H ao passo que o outro é - C(=0)Y em que Y é um grupo C1-C30 alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C1-C20 alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C10-C20 alquila saturado ou não saturado). Em modalidades exemplificativas, o grupo alquila é não cíclico. Os diésteres de sorbitano exemplificativos também incluem isômeros posicionais das Fórmulas IV. O técnico versado na técnica observará que os diésteres de sorbitano exemplificativos podem ser formas de sal (por exemplo, sais farmaceuticamente aceitáveis) da Fórmula IV e estereoisômeros ou isômeros posicionais dos mesmos.



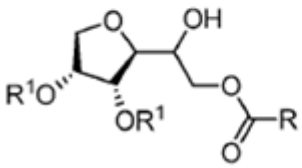
Fórmula IV

[0130] Como um triéster de sorbitano exemplificativos para uso no presente documento pode ser representado como um composto da Fórmula a seguir ou um estereoisômero da mesma (incluindo, porém sem limitação, a Fórmula Va, Vb, ou Vc) em que R é um grupo C1-C30 alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C1-C20 alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C10-C20 alquila saturado ou não saturado e R^1 é -C(=0)Y em que Y pode ser igual ou diferente em cada ocorrência e é um grupo C1-C30 alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C1-C20 alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C10-C20 alquila saturado ou não saturado. Em modalidades exemplificativas, o grupo alquila é não cíclico. Os triésteres de sorbitano exemplificativos também incluem isômeros posicionais das Fórmulas a seguir, Va, Vb, ou Vc (por exemplo, o grupo

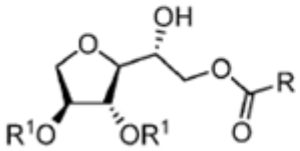
hidróxi funcional é substituído por um grupo éster funcional (por exemplo, um éster alquílico em que a alquila é um grupo C1-C30 alquila saturado ou não saturado, de preferência, um grupo C1-C20 alquila saturado ou não saturado, com mais preferência, um grupo C10-C20 alquila saturado ou não saturado) e um dentre os ésteres alquílicos (por exemplo, um éster alquílico de anel ou éster alquílico de não anel) é substituído por um grupo hidróxi funcional). O técnico versado na técnica observará que os triésteres de sorbitano exemplificativos podem ser formas de sal (por exemplo, sais farmaceuticamente aceitáveis) das Fórmulas a seguir, Va, Vb ou Vc e estereoisômeros ou isômeros posicionais dos mesmos.



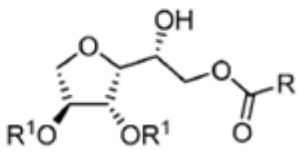
Fórmula V



Fórmula Va



Fórmula Vb



Fórmula Vc

[0131] Com relação a estereoisômeros, o técnico versado na técnica entenderá que os ésteres de sorbitano podem ser centros quirais e podem ocorrer, por exemplo, como racematos, misturas recêmicas e como enantiômeros individuais e diastereômeros.

[0132] Nas modalidades em que os tensoativos não iônicos à base de sorbitano é um éster de sorbitano, tipicamente, a composição ou formulação de composição à base de NLC contém tipicamente, por exemplo, de cerca de 0,1% a cerca de 15% éster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 10% de éster de sorbitano (em p/v), a partir de 0,1%) a cerca de 5% de éster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4% éster de sorbitano (em p/v),

cerca de 0, 1%) a cerca de 4% de éster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2,5% éster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1%) a cerca de 2% de éster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1,5% de éster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1% éster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 0,5% éster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 2,5% éster de sorbitano (em p/v), cerca de 0,3%) a cerca de 2% éster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 1,5% éster de sorbitano (em p/v), 0,3%) a cerca de 1%) éster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 0,5% éster de sorbitano (em p/v) ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para um éster de sorbitano, incluindo de cerca de 0,25 % a cerca de 15% éster de sorbitano, Em alguns aspectos, as composições à base de NLC contêm cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%, cerca de 1%), cerca de 2%), cerca de 3% ou cerca de 4% (em p/v) de éster de sorbitano. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0133] De modo correspondente, quando o éster de sorbitano é um monoéster de sorbitano (por exemplo, SPAN60™, SPAN80™), a composição ou formulação à base de NLC contém tipicamente, por exemplo, de cerca de 0,1%) a cerca de 15% monoéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 10% monoéster de sorbitano (em p/v), de 0,1%) a cerca de 5% monoéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4% de monoéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4% de monoéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2,5% de monoéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1,5% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,1% de cerca de 1% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,1% de cerca de 0,5% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,3% de cerca de 2,5% de monoéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0,3% de cerca de 2% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,3% de cerca de 1,5% de monoéster de sorbitano (em p/v), 0,3% de cerca de 1% de monoéster de

sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 0,5% de monoéster de sorbitano (em p/v) ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para um monoéster de sorbitano, incluindo de cerca de 0,25 % de cerca de 15% de monoéster de sorbitano, Em alguns aspectos, a composição ou formulação à base de NLC contém cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%), ou cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3% ou cerca de 4% (em p/v) monoéster de sorbitano. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0134] De modo correspondente, quando o éster de sorbitano é um diéster de sorbitano, a composição ou formulação à base de NLC contém tipicamente, por exemplo, de cerca de 0,1% a cerca de 15% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 10% de diéster de sorbitano (em p/v) de 0,1% a cerca de 5% de diéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4% de diéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4% de diéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2,5% de diéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2%) diéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1,5% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 0,5% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 2,5% de diéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0,3%) a cerca de 2% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 1,5% de diéster de sorbitano (em p/v), 0,3%) a cerca de 1%) diéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 0,5% de diéster de sorbitano (em p/v) ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para diéster de sorbitano, incluindo de cerca de 0,25 % a cerca de 15% de diéster de sorbitano. Em alguns aspectos, a composição ou formulação à base de NLC contém cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9%), ou cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3% ou cerca de 4% (em p/v) diéster de sorbitano. As porcentagens em p/v

superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0135] De modo correspondente, quando o éster de sorbitano é um triéster de sorbitano (por exemplo, SPAN85™ ou SPAN65™), a composição ou formulação de composição à base de NLC contém tipicamente, por exemplo, de cerca de 0,1% a cerca de 15% triéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 10% triéster de sorbitano (em p/v), de 0,1%) a cerca de 5% de triéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 4 % triéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1%) a cerca de 4% triéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1% a cerca de 2,5% triéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0, 1%) a cerca de 2% triéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1,5% triéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 1%) triéster de sorbitano (em p/v), 0,1% a cerca de 0,5% triéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 2,5% triéster de sorbitano (em p/v), cerca de 0,3% a cerca de 2% triéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 1,5% triéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 1% de triéster de sorbitano (em p/v), 0,3% a cerca de 0,5% triéster de sorbitano (em p/v) ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para triéster de sorbitano, incluindo de cerca de 0,25 % a cerca de 15% triéster de sorbitano. Em alguns aspectos, a composição ou formulação à base de NLC contém cerca de 0,1%, cerca de 0,2%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,5%, cerca de 0,6%, cerca de 0,7%, cerca de 0,8%, cerca de 0,9% ou cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3% ou cerca de 4% (em p/v) triéster de sorbitano. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0136] Em modalidades exemplificativas, o éster de sorbitano (por exemplo, monoéster de sorbitano, diéster ou triéster) está presente em uma quantidade suficiente para aumentar a capacidade da composição de facilitar a entregar e/ou expressão do agente bioativo (por exemplo, RNA) em comparação a uma composição comparável que carece do éster de sorbitano (por exemplo, monoéster de sorbitano, diéster ou triéster

respectivamente). Nas modalidades em que a composição é administrada ao indivíduo em uma quantidade eficaz, a composição pode elicitar titulações de anticorpo ao antígeno igual ou maior que as titulações de anticorpo elicitadas quando uma composição comparável que carece do éster de sorbitano é administrada ao indivíduo ao indivíduo ou quando o agente bioativo é administrado ao indivíduo sem o NLC. Em algumas modalidades, a composição induz uma resposta imunológica (por exemplo, neutraliza titulações de anticorpo) no indivíduo em um nível maior que a resposta imunológica induzida no indivíduo por uma composição comparável que carece do éster de sorbitano. A resposta imunológica pode ser, por exemplo, inata, celular ou resposta de anticorpo. A neutralização das titulações de anticorpo pode ser determinada por qualquer ensaio conhecido por uma pessoa versada na técnica, incluindo, sem limitação, uma análise de titulação de neutralização de redução de plaqueta (Ratnam, S et al. J. Clin. Microbiol (2011), 33 (4): 811 a 815; Timiryazova, T et al. Am J Trop Med Hyg (2013), 88(5): 962 a 970).

D. TENSOATIVOS

[0137] Os NLCs descritos no presente documento compreendem um tensoativo, além dos tensoativos não iônicos à base de sorbitano (por exemplo, éster de sorbitano). Estes são vários tensoativos projetados especificmaente e usados comumente em aplicações biológicas. Tais tensoativos são divididos em quatro tipos básicos e podem ser usados na presente invenção: aniônico, catiônico, zwiteriônico e não iônico. Um grupo particularmente útil de tensoativos são os tensoativos não iônicos hidrofílicos e, em particular, polioxietileno monoésteres de sorbinato e polioxietileno triésteres de sorbitano. Esses materiais são denominados de polisorbatos e estão comercialmente disponíveis sob a marca TWEEN® e são úteis para preparar os NLCs. Os tensoativos TWEEN® têm geralmente um valor de HLB abrangido entre 9,6 a 16,7. Os tensoativos TWEEN® estão comercialmente disponíveis. Outros tensoativos não iônicos que podem ser usados são, por exemplo, éteres de ácido graxo de polioxietileno derivado de laurila, acetila, estearila e álcoois

oleíla, ácidos graxos de polioxietileno produzidos pela reação de óxido de etileno com um ácido graxo de cadeia longa, polioxietileno, ésteres de ácido graxo de poliol, éter de polioxietileno, éteres graxos de polioxipropileno, derivados de cera de abelha que contêm polioxietileno, derivado de lanolina de polioxietileno, glicerídeos graxos de polioxietileno, ésteres de ácido graxo glicerol ou outro ácido graxo de polioxietileno, álcool ou derivados de éter de ácidos graxos de cadeia longa de 12 a 22 átomos de carbono.

[0138] Em algumas modalidades, é preferencial escolher um tensoativo não iônico que tem um valor de HLB na faixa de cerca de 7 a 16. Esse valor pode ser obtido através do uso de um único tensoativo não iônico, tal como um tensoativo TWEEN® ou pode ser obtido pelo uso de uma mescla de tensoativos. Em determinadas modalidades, o NLC compreende um único tensoativo não iônico, mais particularmente, um tensoativo TWEEN®, como o tensoativo não iônico estabilizante de emulsão. Em uma modalidade exemplificativa, a emulsão compreende TWEEN® 80 conhecido de outro modo como polisorbato 80.

[0139] A composição ou formulação à base de NLC contém pode conter, por exemplo, de cerca de 0,01% a cerca de 15% de tensoativo (em p/v), de cerca de 0,01% a cerca de 10% de tensoativo (em p/v) de cerca de 0,01% a cerca de 5% de tensoativo (em p/v), cerca de 0,01% a cerca de 2,5% de tensoativo, cerca de 0,01% a cerca de 2% de tensoativo, 0,01% a cerca de 1,5% de tensoativo, 0,01% a cerca de 1% de tensoativo, 0,01% a cerca de 0,5% de tensoativo, 0,05% a cerca de 0,5% de tensoativo, 0,08% a cerca de 0,5% de tensoativo, cerca de 0,08% de tensoativo, cerca de 0,5% de tensoativo, cerca de 0,6% de tensoativo, cerca de 0,7% de tensoativo, cerca de 0,8% de tensoativo, cerca de 0,9% de tensoativo ou cerca de 1% de tensoativo ou cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4 % de tensoativo ou qualquer outra quantidade ou faixa descrita no presente documento para o tensoativo. As porcentagens em p/v superiores ou inferiores são contempladas no presente documento, particularmente quando são consideradas formulações diluídas e concentradas.

[0140] Os componentes adicionais podem ser incluídos nos NLCs da presente invenção que inclui, por exemplo, componentes que promovem a formação de NLC, aprimoram formação complexa entre as moléculas carregadas negativamente e as partículas catiônicas, facilitam a liberação apropriada das moléculas carregadas negativamente (tais como, uma molécula de RNA) e/ou aumentam a estabilidade da molécula carregada negativamente (por exemplo, para impedir a degradação e uma molécula de RNA).

[0141] A fase aquosa (fase contínua) dos NLCs é tipicamente uma solução salina tamponada (por exemplo, solução salina) ou água. A solução salina tamponada é tipicamente uma solução aquosa que compreende um sal (por exemplo, NaCl), um tampão (por exemplo, um tampão de citrato), e pode compreender adicionalmente, por exemplo, um agente de ajuste de osmolalidade (por exemplo, um sacarídeo), um polímero, um tensoativo ou uma combinação dos mesmos. Caso as emulsões sejam formuladas para administração parenteral, é preferencial formar as soluções tamponadas finais de modo que a tonicidade, isto é, osmolalidade é essencialmente igual aos fluidos normais fisiológicos a fim de prevenir consequências pós-administração indesejada, tais como inchamento pós-administração ou rápida absorção da composição. Além disso, é preferencial tampar a fase aquosa a fim de manter um pH compatível com condições fisiológicas normais. Além disso, em determinadas ocorrências, pode ser desejável manter o pH em um nível particular a fim de garantir a estabilidade de determinados componentes do NLC. Por exemplo, pode ser desejável preparar um NLC que é uma concentração isotônica (isto é, o mesmo soluto permeável (por exemplo, sal) como as células normais do corpo e o sangue) e isosmótico. A fim de controlar a tonicidade, o NLC pode compreender a sal fisiológico, tal como um sal de sódio. Em alguns aspectos, o cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, pode ser usado a cerca de 0,9% (em p/v) (solução salina fisiológica). Outros sais que podem estar presentes incluem, por exemplo, cloreto de

potássio, fosfato de di-hidrogênio de potássio, fosfato de dissódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio e semelhantes. Os agentes de tonificação não iônicos também podem ser usados para controlar tonicidade. Os monossacarídeos classificados como aldoses, tais como glicose, manose, arabinose e ribose, assim como aqueles classificados como cetonas, tais como frutose, sorbose e xilulose podem ser usados como agentes de não tonificação na presente invenção. Os dissacarídeos, tais como sacarose, maltose, trealose e lactose também podem ser usados. Além disso, os alditóis (os álcoois de poli-hidroxi acílicos, também denominados de açúcar) tais como glicerol, manitol, xilitol e sorbitol são agentes de não tonificação não iônicas que podem ser úteis na presente invenção. Os agentes de modificação de tonicidade não iônicos podem estar presentes por exemplo, a uma concentração de cerca de 0,1% a cerca de 10% ou cerca de 1% a cerca de 10%, dependendo do agente que é usado.

[0142] A fase aquosa pode ser tamponada. Qualquer tampão fisiologicamente aceitável pode ser usado no presente documento, tais como água, tampões de citrato, tampões de fosfato, tampões de acetato, tampões tris, tampões de bicarbonato, tampões de carbonato, tampão de succinato ou semelhantes. O pH do componente aquoso estarão, de preferência, entre 4,0 a 8,0 ou de cerca de 4,5 a cerca de 6,8. Em outra modalidade exemplificativa, a fase aquosa é, ou o tampão é preparado com o uso, água livre de Rnase ou água tratado com DEPC. Em alguns casos, alto teor de sal no tampão pode interferir com a complexação de molécula carregada negativamente à emulsão partícula, portanto, é evitada. Em outros casos, uma determinada quantidade de sal no tampão pode ser incluída.

[0143] Em uma modalidade exemplificativa, o tampão é um tampão de citrato a 10 mM, por exemplo, (citrato de sódio) com um pH entre cerca de 5,0 e 8,0. Em outra modalidade exemplificativa, a fase aquosa é, ou o tampão é preparado com o uso, água livre de Rnase ou água tratado com DEPC. Em outras modalidades exemplificativas, as composições da presente

invenção não compreendem um tampão de citrato.

[0144] A fase aquosa também pode compreender componentes adicionais, tais como moléculas que mudam a osmolalidade da fase aquosa ou moléculas que estabilizam a molécula carregada negativamente após complexação. De preferência, a osmolaridade da fase aquosa é ajustada com o uso de um agente de tonificação não iônica, tal como um açúcar (por exemplo, trealose, sacarose, dextrose, frutose, palatinose reduzida etc.), como álcool de açúcar (tal como manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, maltitol, glicerol etc.) ou combinações dos mesmos. Caso desejado, um polímero não iônico (por exemplo, um poli(alquil glicol), tal como polietileno glicol, polipropileno glicol ou polibutileno glicol) ou tensoativo não iônico pode ser usado.

E. ÓLEO: RAZÕES DE TENSOATIVO

[0145] Os NLCs exemplificativos são compostos de um núcleo hidrofóbico que contém o óleo líquido e lipídeo sólido e tensoativos (também conhecidos como emulsificantes ou agentes emulsificantes) que formam a interface que separada a fase hidrofóbica - óleo líquido e lipídeo sólido, denominados coletivamente no presente documento de óleo - da fase aquosa. Visto que os tensoativos permanecem na superfície das nanopartículas de NLC, a quantidade dos mesmos dita a área de superfície disponível total. Por outro lado, o óleo permanece no núcleo e contribui primariamente para o volume total disponível. O aumento da razão entre tensoativo e óleo aumenta consequentemente a razão entre área de superfície (SA) e volume (V); logo, para um volume fixo do material, aumentando o aumento da razão SA/V se torna a redução do diâmetro de partícula de NLC. Alternativa ou adicionalmente à descrição das composições exemplificativas de NLC em termos das porcentagens em p/v de vários componentes, estas podem ser descritas pelas razões molares de vários componentes. Em alguns aspectos, os NLCs exemplificativo da presente invenção têm uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,05 a cerca de 12 ou de cerca de 0,05 a cerca de 9 ou de cerca de,05 a cerca de 8 ou de cerca de 0,05 a cerca de 1 ou de cerca de 0,1

a cerca de 1. Os presentes inventores demonstraram que, reduzindo-se a razão molar entre óleo e tensoativo, NLCs menores podem ser sintetizados. Além disso, reduzindo-se a quantidade de óleo nos NLCs, a toxicidade potencial das formulações podem ser reduzidas. Em outros aspectos, os NLCs exemplificativos da presente invenção têm uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, de cerca de 0,5 a cerca de 9, de 1 a cerca de 9, de cerca de 2 a cerca de 9, de cerca de 3 a cerca de 9, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 4,5 a cerca de 9, ou de cerca de 4,5 ou cerca de 5 a cerca de 7. As formulações exemplificativas têm uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5, cerca de 1, cerca de 1,5, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 4,5, cerca de 5, cerca de 5,5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, ou cerca de 12. Conforme usado no presente documento, a razão molar entre óleo e tensoativo é determinada por meio de (i) adição dos moles de lipídeo que formam o núcleo de óleo (lipídeo em fase sólida e lipídeo em fase líquida) para chegar a um valor para moles do núcleo de óleo lipídeo (ii) adição dos moles do componente catiônico (por exemplo, DOTAP), tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) e do tensoativo hidrofílico (tween 80) para chegar a um valor para moles de tensoativo e (iii) divisão de núcleo de óleo lipídeo por moles de tensoativo.

F. TENSOATIVO HIDROFÍLICO: RAZÕES DE COMPONENTE CATIÔNICO

[0146] Os presentes inventores constataram que a razão entre o tensoativo hidrofílico e o componente catiônico podem impactar a capacidade do NLC de modo que tenha um efeito de proteção da degradação de RNAase e podem impactar a imunogenicidade das formulações. Em particular, os inventores constataram que as razões Tween:DOTAP a cerca de 0,6 são ideais para obter resultados consistentes para entrega e expressão de agentes bioativos de RNA o passo que as razões de Tween:DOTAP a cerca de 2,0 e superior não são tão ideais para obter tais consistências. De modo

correspondente, os NLCs exemplificativos da presente invenção têm um uma razão de componente Catiônico:Tensoativo hidrofílico (por exemplo, lipídeo catiônico) razão de cerca de 0,2 a cerca de 1,5, de cerca de 0,2 a cerca de 1 ou de cerca de 0,5 a cerca de 1. Quando o Tween e DOTAP estão na composição, os NLCs exemplificativos da presente invenção têm uma razão tween:DOTAP de cerca de 0,2 a cerca de 1,5, de cerca de 0,2 a cerca de 1 ou de cerca de 0,5 a cerca de 1. Conforme usado no presente documento, a razão componente catiônico:tensoativo hidrofílico é determinada por meio da (i) adição dos moles de tensoativo hidrofílico para chegar a um valor para valor para moles de tensoativo hidrofílico (ii) adição dos moles do componente catiônico para chegar um valor para moles do componente catiônico e (iii) pela divisão de moles do tensoativo hidrofílico por moles de componente catiônico.

G. CAPACIDADES DE CARREGAMENTO.

[0147] Os presentes inventores constataram que a capacidade de carregamento das formulações de NLC podem ser manipuladas modulando-se a razão entre o tensoativo hidrofílico e o componente catiônico e a quantidade do óleo presente nas formulações, desse modo, reduzindo-se o tamanho médio de partícula de NLC médio. As formulações de NLC exemplificativas têm capacidade de carregamento para RNA de pelo menos cerca de 10 μg/ml de RNA, pelo menos cerca de 20 μg/ml de RNA, pelo menos cerca de 50 μg/ml de RNA, pelo menos cerca de 100 μg/ml de RNA, pelo menos cerca de 200 μg/ml de RNA, pelo menos cerca de 300 μg/ml ou pelo menos cerca de 400 μg/ml de RNA. As formulações de NLC que têm um tamanho médio de partícula de 20 nm a cerca de 110 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 70 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 60 nm têm tipicamente capacidade de carregamento aumentada.

H. CARREADORES NANOESTRUTURADO EXEMPLIFICATIVOS E SUAS PORCENTAGENS EM P/V

[0148] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de

lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,02% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 10 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano), e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v, de cerca de 0,2% a cerca de 5%) p/v, de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação A. Em qualquer aspecto da formulação A, o tensoativo hidrofílico pode estar presente a 0,2% a cerca de 10% em p/v, 0,2% a cerca de 5% em p/v, 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v.

[0149] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 10 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano), e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v, de cerca de 0,2% a cerca de 5%) p/v, de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação B. Em qualquer aspecto da formulação B, o tensoativo hidrofílico pode estar presente a 0,2% a cerca de 10% em p/v, 0,2% a cerca de 5% em p/v, 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v.

[0150] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 0,2% a cerca de 1%) p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,02% a cerca de 1% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 2% a cerca de 10% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 2% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 2% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação C.

[0151] Nas modalidades exemplificativas seletas, a

composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 40% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 10 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano), e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v, de cerca de 0,2% a cerca de 5%) p/v, de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico. A composição de NLC é denominada no presente documento como formulação D. Em qualquer aspecto da formulação D, o tensoativo hidrofílico pode estar presente a 0,2% a cerca de 10% em p/v, 0,2%) a cerca de 5%) em p/v, cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico

[0152] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 10 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 10 % ou de cerca de 0,2% a cerca de 5 % em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação E. Em qualquer aspecto da formulação E, o tensoativo hidrofílico pode estar presenta a 0,2% a cerca de 10% ou de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v.

[0153] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 10% a cerca de 3%) p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 1% a cerca de 5 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 1% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 1% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação F.

[0154] Nas modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 5%) p/v de lipídeo

em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 2% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 2% a cerca de 5 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 2% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 2% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação G.

[0155] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 10%) p/v em lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 3% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 2% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 2% em p/v em éster de sorbitano e de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação H. Em qualquer aspecto da formulação H, o tensoativo hidrofílico estar presente a cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5%) a cerca de 5% em p/v.

[0156] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 6%) p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2%) a cerca de 1 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação I. Em qualquer aspecto da formulação I, o tensoativo hidrofílico pode estar presente a cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v.

[0157] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 1% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 0,2% a cerca

de 2% em p/v ou de cerca de 0,2% a cerca de 1% de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação J.

[0158] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídeo em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 1% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 0,5% ou de 0,2% a cerca de 1% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação K. Em qualquer aspecto da formulação K, o tensoativo hidrofílico pode estar presente em cerca de 0,2% a cerca de 0,5% ou de 0,2% a cerca de 1% em p/v.

[0159] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 10% a cerca de 40% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 1% a cerca de 2 % lipídeo em fase sólida, de cerca de 2 % a cerca de 5% lipídeo catiônico, de cerca de 3 a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 3% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação L.

[0160] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 10% a cerca de 20% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,5 a cerca de 1,5 % lipídeo em fase sólida, de cerca de 3% a cerca de 4% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 3 a cerca de 4% em p/v de éster de sorbitano e de cerca de 3% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação M.

[0161] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 15% em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 1% de lipídeo em fase sólida, cerca de 3% de lipídeo catiônico, cerca de 3,7% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 3,7% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de

formulação N.

[0162] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 30% em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 1,8% de lipídeo em fase sólida, cerca de 3% de lipídeo catiônico, cerca de 3,7% em p/v éster de sorbitano e cerca de 3,7% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação O.

[0163] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende entre cerca de 3 a cerca de 4% em p/v de lipídeo em fase líquida, entre cerca de 0,2% a cerca de 1% lipídeo em fase sólida, entre cerca de 3% a cerca de 5% de lipídeo catiônico, entre cerca de 3% a cerca de 5% de éster de sorbitano e entre cerca de 3 a cerca de 5% de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação P.

[0164] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídeo em fase sólida de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 15% em p/v monoéster de sorbitano e de cerca de 0,5% a cerca de 15% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação Q.

[0165] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 4% em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 0,4% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 0,5% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 2% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação R.

[0166] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 4% em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 0,4% em p/v de lipídeo

catiônico, cerca de 0,5% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 0,5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação S.

[0167] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 3,75 % em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 3% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 3,7% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 3,7% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação T.

[0168] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 3,75 % em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 1,5% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 3,7% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 1,5% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação U.

[0169] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende cerca de 4,75 % em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 0,5% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 0,5% em p/v de éster de sorbitano e cerca de 0,4% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação V.

[0170] Em modalidades exemplificativas seletas, a composição de NLC compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de lipídeo em fase líquida, de cerca de 0,2% a cerca de 10 % em p/v de lipídeo catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) e de cerca de 0,2% a cerca de 10%) p/v, de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v, de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico. Essa composição de NLC é denominada no presente documento de formulação W. Em qualquer aspecto da formulação W, o tensoativo hidrofílico pode estar

presente a 0,2% a cerca de 10% em p/v, 0,2% a cerca de 5% em p/v, 0,5% a cerca de 5% em p/v ou de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v.

[0171] O técnico versado na técnica entenderá que qualquer uma das composições/formulações de NLC descritas no presente documento, incluindo as formulações A a W podem ser diluídas ou concentradas para uso na presente invenção. Por exemplo, quando misturada com um agente bioativo para entrega, a formulação pode ser diluída no processo de mistura. As composições/formulações de NLC podem ser diluídas, por exemplo, 1:2. Todas as composições/formulações de NLC descritas no presente documento podem ser diluídas, por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 500 vezes, de preferência, de cerca de 2 a cerca de 100 vezes. Tipicamente, porém não sempre, a diluição ocorre durante a mistura da formulação com um agente bioativo (por exemplo, RNA ou DNA) para entrega. Estes podem ser diluídos, por exemplo, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 7 vezes, cerca de 8 vezes, cerca de 9 vezes, cerca de 10 vezes, cerca de 15 vezes, cerca de 20 vezes, cerca de 25 vezes, cerca de 30 vezes, cerca de 100 vezes ou cerca de 500 vezes. Conforme será entendido pela pessoa versada na técnica, uma formulação diluída da presente invenção terá uma concentração diminuída do lipídeo em fase líquida, lipídeo em fase sólida, componente catiônico, tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) e tensoativo (por exemplo, tensoativo hidrofílico), no entanto, a razão entre lipídeo em fase líquida e lipídeo em fase sólida entre componente catiônico entre tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) entre tensoativo permanecerá igual. A presente invenção fornece não apenas formulações A a W, porém versões diluídas das formulações A a W. Em alguns casos, são as formulações diluídas que estão associadas (por exemplo, complexadas) ao agente bioativo. Por exemplo, uma formulação particularmente preferencial é formulação S ou formulação T diluída 2 vezes. Tal formulação S diluída compreende cerca de 2% em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,13% em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 0,2% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 0,25% em p/v de

éster de sorbitano, e cerca de 0,25% em p/v de tensoativo hidrofílico. Tal formulação T diluída compreende cerca de 1,88 % em p/v de lipídeo em fase líquida, cerca de 0,13 % em p/v de lipídeo em fase sólida, cerca de 1,5% em p/v de lipídeo catiônico, cerca de 1,85% em p/v de éster de sorbitano, e cerca de 1,85% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0172] Alternativamente, as composições/formulações, podem ser concentradas, por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 30 vezes, de preferência, de cerca de 2 a cerca de 20 vezes. Podem estar concentradas, por exemplo, cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 6 vezes, cerca de 7 vezes, cerca de 8 vezes, cerca de 9 vezes, cerca de 10 vezes, cerca de 15 vezes, cerca de 20 vezes, cerca de 25 vezes ou cerca de 30 vezes. De modo correspondente, a presente invenção fornece não apenas formulações A a W, porém as versões concentradas das formulações A a U.

[0173] Para qualquer uma das formulações de NLC da presente invenção incluindo formulações A a V, e incluindo as formulações diluídas e concentradas dentre as formulações A a V, o seguinte e qualquer combinação do seguinte pode se aplicar: (i) o éster de sorbitano é um monoéster de sorbitano, diéster ou triéster; (ii) o éster de sorbitano é um monoéster de sorbitano selecionado a partir de monoestearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou monolaurato de sorbitano ou um triéster de sorbitano selecionado a partir de trioleato de sorbitano ou triestearato de sorbitano; (iii) o lipídeo em fase líquida é esqualeno; (iv) o lipídeo em fase sólida é um glicerolipídeo; (v) o lipídeo em fase sólida é triglicerídeo microcristalino; (vi) O lipídeo em fase sólida é trimiristina; (vii) O lipídeo catiônico é DOTAP; (viii) o tensoativo hidrofílico é polisorbato 80 (também denominado de Tween 80); (ix) o éster de sorbitano é um monoéster, o lipídeo em fase líquida é esqualeno; e o lipídeo em fase sólida é um glicerolipídeo; (x) o éster de sorbitano é um monoéster, o lipídeo em fase líquida é esqualeno; o lipídeo em fase sólida é um glicerolipídeo; o lipídeo catiônico é DOTAP e o tensoativo hidrofílico é polisorbato 80; (xi) o éster de

sorbitano é monoestearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou monolaurato de sorbitano, o lipídeo em fase líquida é esqualeno; o lipídeo em fase sólida é trimiristina; o lipídeo catiônico É DOTAP e O tensoativo hidrofílico é polisorbato 80; (xii) O éster de sorbitano é um triéster, o lipídeo em fase líquida É esqualeno; e o lipídeo em fase sólida é um glicerolipídeo; (xiii) o éster de sorbitano é um triéster, o lipídeo em fase líquida é esqualeno; o lipídeo em fase sólida é um glicerolipídeo; o lipídeo catiônico é DOTAP e o tensoativo hidrofílico é polisorbato 80; (xiv) o éster de sorbitano é trioleato de sorbitano ou triestearato de sorbitano, o lipídeo em fase líquida é esqualeno; o lipídeo em fase sólida é trimiristina; o lipídeo catiônico é DOTAP e o tensoativo hidrofílico é polisorbato 80.

[0174] A presente invenção também fornece formulações A a Q, incluindo aquelas indicadas no parágrafo [00173], em que a razão entre óleo tensoativo é de cerca de 0,05 a cerca de 12 ou de cerca de 0,05 a cerca de 9 ou de cerca de 0,05 a cerca de 8 ou de cerca de 0,05 a cerca de 1 ou de cerca de 0,1 a cerca de 1. São fornecidas nas formulações A a Q, incluindo aqueles indicados no parágrafo [00173], em que a razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, de cerca de 1 a cerca de 9, de cerca de 2 a cerca de 9, de cerca de 3 a cerca de 9, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 4,5 a cerca de 9, ou de cerca de 4,5 ou cerca de 5 a cerca de 7.

[0175] A presente invenção fornece formulações A a Q, incluindo aquelas indicadas acima, em que a razão entre tensoativo hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) é de cerca de 0,2 a cerca de 1 ou de cerca de 0,5 a cerca de 1.

[0176] De modo correspondente, algumas composições de NLC exemplificativas são formulações A, B ou Q diluídas ou concentradas, com uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, de cerca de 1 a cerca de 9, de cerca de 2 a cerca de 9, de cerca de 3 a cerca de 9, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 4,5 a cerca de 9, ou de cerca de 4,5 ou cerca de 5 a cerca de 7 e uma razão entre tensoativo

hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) de cerca de 0,2 a cerca de 1,5.

[0177] De modo correspondente, algumas composições de NLC exemplificativas são formulações A, B ou Q diluídas ou concentradas, com uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, de cerca de 1 a cerca de 9, de cerca de 2 a cerca de 9, de cerca de 3 a cerca de 9, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 4,5 a cerca de 9, ou de cerca de 4,5 ou cerca de 5 a cerca de 7 e uma razão entre tensoativo hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) de cerca de 0,2 a cerca de 1.

[0178] Algumas composições de NLC exemplificativas são formulações A, B ou Q diluídas ou concentradas, com uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, de cerca de 1 a cerca de 9, de cerca de 2 a cerca de 9, de cerca de 3 a cerca de 9, de cerca de 4 a cerca de 9, de cerca de 4,5 a cerca de 9, ou de cerca de 4,5 ou cerca de 5 a cerca de 7 e uma razão entre tensoativo hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) de cerca de 0,5 a cerca de 1.

[0179] Algumas composições exemplificativas de NLC são formulações A, B ou Q, diluídas ou concentradas, com uma razão molar entre óleo e tensoativo de 0,05 a cerca de 12 ou de cerca de 0,05 a cerca de 9 ou de cerca de 0,05 a cerca de 8 ou de cerca de 0,05 a cerca de 1 ou de cerca de 0,1 a cerca de 1 e um razão entre tensoativo hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) de cerca de 0,5 a cerca de 1,5.

[0180] Algumas composições exemplificativas de NLC são formulações A, B ou Q, diluídas ou concentradas, com uma razão molar entre óleo e tensoativo de 0,05 a cerca de 12 ou de cerca de 0,05 a cerca de 9 ou de cerca de 0,05 a cerca de 8 ou de cerca de 0,05 a cerca de 1 ou de cerca de 0,1 a cerca de 1 e um razão entre tensoativo hidrofílico:componente catiônico (por exemplo, lipídeo catiônico) de cerca de 0,5 a cerca de 1.

[0181] A presente invenção fornece formulações A a

W que incluem todas as formulações descritas nos parágrafos [00180] a [00187] em que o diâmetro médio das partículas de NLC é de cerca de 40 nm ou 50 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 40 nm ou 50 nm a cerca de 70 nm, de cerca de 40 nm ou 50 nm a cerca de 60 nm.

III. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DOS CARREADORES DE LIPÍDEO NANOESTRUTURADOS

A. TAMANHO

[0182] O tamanho do NLC pode ser avaliado por técnicas conhecidas na técnica, incluindo, porém sem limitação, difração por raio laser e raio x, a difusão de luz dinâmica (DLS), CryoEM ou Malvern Zetasize. Em algumas modalidades, o tamanho do NLC se refere ao diâmetro médio Z.

[0183] Os NLCs têm um diâmetro médio (isto é, o diâmetro de número médio) de 1 micrômetro ou menos. É particularmente desejável que o tamanho médio de partícula (isto é, o diâmetro de número médio) do NLC é cerca de 900 nm ou menos, cerca de 800 nm ou menos, cerca de 700 nm ou menos, cerca de 600 nm ou menos, cerca de 500 nm ou menos, cerca de 400 nm ou menos, 300 nm ou menos, 200 nm ou menos, 100 nm ou menos ou 80 nm ou menos, por exemplo, de cerca de 50 nm a cerca de 900 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 800 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 700 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 600 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 500 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 400 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 300 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 200 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 175 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 125 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 100 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 40 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 40 nm a cerca de 80 nm, ou de cerca de 40 nm a cerca de 60 nm. Será entendido pelo técnico versado que um NLC é formado por partículas de NLC. O tamanho médio de partícula se refere ao diâmetro médio das partículas que formam o NLC. O diâmetro médio das partículas de NLC é tipicamente cerca de 40 nm, é cerca de 60 nm, é cerca de 80 nm, é cerca de 85 nm, é cerca de 90

nm, é cerca de 95 nm, é cerca de 100 nm, é cerca de 105 nm, é cerca de 110 nm, é cerca de 115 nm, é cerca de 120 nm, é cerca de 125 nm, é cerca de 130 nm, é cerca de 135 nm, é cerca de 140 nm, é cerca de 145 nm, é cerca de 150 nm, é cerca de 155 nm, é cerca de 160 nm, é cerca de 165 nm, é cerca de 170 nm, é cerca de 175 nm, é cerca de 180 nm, é cerca de 185 nm, é cerca de 190 nm, é cerca de 195 nm, ou é cerca de 200 nm.

[0184] Em alguns aspectos, o diâmetro médio das partículas de NLC é de cerca de 20 nm a cerca de 200 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 150 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 110 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 70 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 60 nm.

[0185] Em alguns aspectos, o diâmetro médio das partículas de NLC é de cerca de 50 nm a cerca de 200 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 110 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 80 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 70 nm, de cerca de 50 nm a cerca de 60 nm.

[0186] Em alguns aspectos, o diâmetro médio das partículas de NLC é de cerca de 40 nm a cerca de 80 ou de cerca de 40 nm a cerca de 60 nm.

[0187] Um NLC exemplificativo da presente invenção pode ser filtrado por um filtro de pelo menos 0,45 mícron. Em uma modalidade exemplificativa, o NLC pode ser filtrado por um filtro de pelo menos 0,20 a 0,22 mícron.

B. ESTABILIDADE

[0188] Os NLCs exemplificativos fornecidos no presente documento são estáveis, o que permite facilidade de uso, capacidade de fabricação, capacidade de transporte e armazenamento. As características físico-químicas do NLC, incluindo, porém sem limitação, seu tamanho, são mentidas ao longo do tempo, a várias temperaturas e sob várias condições.

[0189] A evolução do tamanho de partícula em

relação a uma função de períodos de tempo fornece informações de estabilidade coloidal. Uma composição de NLC estável exemplificativa é uma cujas partículas mantêm substancialmente o mesmo tamanho de diâmetro médio Z ao longo de um período de tempo (por exemplo, um período de tempo de 30 ou 7 dias) em diferentes temperaturas tipicamente, porém sem limitação 37, 25 ou 5 graus Celsius. Por manter substancialmente o mesmo tamanho de diâmetro médio Z, significa que uma partícula permanece dentro de 20%, 15%, 10%), 5%), de seu tamanho original em um período de tempo de 30 dias. Uma composição de NLC particularmente estável é uma cujas partículas retêm substancialmente o mesmo tamanho de diâmetro médio Z durante um período de 30 dias a 4 graus Celsius, 25 graus Celsius ou até mesmo 37 graus Celsius.

[0190] A estabilidade do NLC pode ser medida por técnicas familiares às pessoas de versadas na técnica. Em algumas modalidades, a estabilidade é observada visualmente. A inspeção visual pode incluir inspeção em busca de particulados, floculência ou agregados. Tipicamente, a estabilidade é determinada pelo tamanho de partícula do NLC, tal como medindo-se o diâmetro médio Z e opcionalmente expresso com uma mudança no tamanho ao longo do tempo ou a várias temperaturas ou sob determinadas condições. Em algumas modalidades, a estabilidade é determinada avaliando-se o aumentado de tamanho da partícula. Em algumas modalidades, a estabilidade é determinada por medição do índice de polidispersidade (PDI), por exemplo, com o uso da técnica de difusão de luz dinâmica (DLS). Em outras modalidades, a estabilidade é determinada pela medição do potencial zeta com o uso da técnica de DLS.

[0191] Em algumas modalidades, o diâmetro médio Z do NLC aumenta em menos que 50%, menos que 40%, menos que 30%, menos que 25%, menos que 20%, menos que 15%, menos que 12%, menos que 10%), menos que 7%, menos que 5%, menos que 3%, menos que 1% durante o período de tempo do ensaio.

[0192] Em algumas modalidades, o índice

polidispersidade do NLC é mentido a cerca de 0,5, a cerca de 0,4, a cerca de 0,3, a cerca de 0,2, a cerca de 0,1 ou de cerca de 0,1 a cerca de 0,5, de cerca de 0,1 a cerca de 0,4, de cerca de 0,1 a cerca de 0,3, de cerca de 0,1 a cerca de 0,2, de cerca de 0,2 a cerca de 0,4 ou de cerca de 0,2 a cerca de 0,3. Em alguns aspectos preferenciais, o índice polidispersidade é maior que 0,1, maior que 0,15, ou maior que 0,2.

[0193] As composições à base de NLC exemplificativas da presente invenção são adequadas por meses de 6 meses a 25 graus Celsius (por exemplo, mantêm substancialmente o mesmo tamanho de diâmetro médio Z).

IV. AGENTES BIOATIVOS

[0194] Em algumas modalidades exemplificativas, a fim de entregar um agente bioativo, as formulações da presente invenção são misturadas ou, de outro modo, formuladas com um ou mais agentes bioativos. O termo "agente bioativo", conforme usado no presente documento, se refere a qualquer material a ser entregue pelas formulações da presente revelação e pode incluir sem limitação macromoléculas, peptídeos, proteínas, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos, DNA plasmidial, DNA circular, DNA linear, DNA fita simples, DNA modificado, DNA antissenso, ribonucleotídeos, mRNA, RNA quimicamente modificado, RNA de não codificação, miRNA, siRNA, tRNA, RNA reibossômico, ribozimas de RNA, RNA de replicon, aptâmeros de RNA, aptâmeros de DNA, RNA dupla fita, RNA de base substituída, RNA que contém isosina, adjuvantes incluindo agonistas de TLR (por exemplo, agonistas TLR2, TLR3, TLR4, TLR 7, TLR8 e TLR9), agonistas Rig-I, saponinas, carbo-hidratos, polímeros de carbo-hidrato, carbo-hidratos conjugados, partículas virais inteiras, partículas do tipo vírus, fragmentos virais e fragmentos celulares. Os adjuvantes exemplificativos não limitativos incluem RNA de dupla fita, RIBOXXOL, poli(I:C) e Hiltonol® (poli-ICLC). Hiltonol® (poli-ICLC) é um complexo sintético de carboximetilcelulose, RNA de fita dupla de ácido poli-inossínico-policitidílico e poli-L- lisina. RIBOXXOL

é uma duplicação de RNA de 50 bp (Riboxx GmbH). Qualquer agente que pode ser entregue com segurança a uma célula pode ser misturada com um NLC da presente invenção. Quando as moléculas carregadas negativamente devem ser entregues, em algumas modalidades, a superfície de NLC catiônico pode interagir com agentes bioativos negativamente mudados, desse modo, ancorando as moléculas ao NLC.

[0195] As moléculas carregadas negativamente exemplificativas devem ser usadas como agentes bioativos incluem, por exemplo, antígenos que contêm peptídeo, moléculas de ácido nucleico (por exemplo, RNA ou DNA) que codificam um ou mais antígenos que contêm peptídeo, polissacarídeos carregados negativamente, moléculas pequenas carregadas negativamente e adjuvantes imunológicos carregados negativamente. Os adjuvantes imunológicos carregados negativamente incluem, por exemplo, oligonucleotídeos imunoestimuladores (por exemplo, oligonucleotídeos de CpG), RNAs de fita simples, potencializadores imunológicos de molécula pequena (SMIPs) e semelhantes. As moléculas pequenas carregadas negativamente incluem, por exemplo, fosfonato, fluorofosfonato e semelhantes.

[0196] Os adjuvantes atuais são muito influenciados por Th2, tais como alume. Em algumas modalidades, para vacinas contra câncer e alvos de doenças infecciosas (por exemplo, tuberculose, diversas doenças virais etc.) assim como alergia, adjuvantes que promovem uma influência de Th1 são uma necessidade não atendida. Nesse sentido, conforme descrito no presente documento, os presentes inventores demonstraram formulações que promovem uma influência de Th1 para agonistas de TLR3, por exemplo. Tais formulações promovem produção de gama de IFN e regulam de maneira descendente o IL-5 e são adequadas para vários usos nos quais uma influência de Th1 é desejada.

[0197] Um ou mais agentes bioativos podem ser associados às formulações da presente invenção. Uma pessoa versada na

técnica entenderá que várias combinações de agentes bioativos podem ser associadas às formulações tais como, porém, sem limitação, múltiplos RNAs, múltiplos DNAs, um ou mais RNAs de uma sequência definida e uma ou mais proteínas, um ou mais DNAs e uma ou mais proteínas e um ou mais RNAs e um ou mais DNAs. Em alguns aspectos, um agente bioativo pode estar presente no núcleo de óleo de um NLC ao passo que o outro está associado à sua superfície do NLC. Por exemplo, um ácido nucleico pode ser associado à superfície de NLC ao passo que uma molécula pequena biologicamente ativa pode estar presente dentro do núcleo de óleo do NLC.

[0198] Em uma modalidade exemplificativa, o agente bioativo negativamente carregado é complexado com um NLC por associação à superfície catiônica. A associação do agente bioativo negativamente carregado com a superfície de NLC pode ser uma interação covalente reversível ou não covalente.

[0199] Em outra modalidade, um agente bioativo hidrofóbico, tal como um ligante de receptor tipo Toll (por exemplo, ligante TLR4) pode ser incorporado no núcleo oleoso ou na interface da partícula NLC.

A. MOLÉCULAS DE RNA

[0200] Em modalidades em que o agente bioativo é uma molécula de RNA, a molécula de RNA pode codificar proteínas de vários tipos, incluindo, sem limitação, antígenos, anticorpos, toxinas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios. As moléculas de RNA usadas no presente documento também podem representar RNAs de não codificação, incluindo, sem limitação, siRNA, miRNA, RNA-guia de CRISPR, RNA de ribozima, grampos, aptâmeros de RNA, agonistas de RNA e RNAs imunomoduladores.

[0201] Em uma modalidade exemplificativa, a molécula de RNA carregada negativamente é complexada com o NLC por associação com a superfície catiônica. A associação da molécula de RNA com a superfície de NLC pode ser uma interação não covalente ou covalente reversível.

[0202] Em modalidades exemplificativas, o agente bioativo é uma molécula de RNA de autorreplicação. As moléculas de RNA de autorreplicação são bem conhecidas na técnica e podem ser produzidas com o uso de elementos de replicação derivados de vírus por exemplo, alfavírus, flavivírus, picornavírus) e pela substituição das proteínas virais estruturais com uma sequência de nucleotídeos que codificam uma proteína de interesse. Uma molécula de RNA de autorreplicação é tipicamente uma molécula de fita(+)- que pode ser traduzida diretamente após a entrega a uma célula, e essa tradução fornece uma RNA polimerase dependente de RNA que, em seguida, produz transcrições tanto antissenso quanto senso a partir do RNA entregue. Desse modo, o RNA entregue causa a produção de múltiplos RNAs-filho. Esses RNA-filho, assim como transcrições subgenômicas colineares, podem ser traduzidos por si só para fornecer expressão *in situ* de um antígeno codificado ou podem ser transcritas para fornecer transcrições adicionais com o mesmo senso que o RNA entregue que são traduzidos para fornecer expressão *in situ* do antígeno. Os resultados gerais dessa sequência de transcrições são uma amplificação do número dos RNAs de replicon introduzidos e, desse modo, o antígeno codificado se torna um produto de polipeptídeo maior das células.

[0203] De modo vantajoso, o maquinário de tradução da célula é usado por moléculas de RNA de autorreplicação para gerar um aumento significativo de produtos de gene codificado, tais como proteínas ou antígenos, que podem se acumular nas células ou podem ser selecionados a partir das células. As moléculas de RNA de autorreplicação podem estimular, por exemplo, receptores do tipo toll (TLR) 3, 7 e 8 e trajetórias de não TLR (por exemplo, RIG-I, MD-5) pelos produtos de replicação de amplificação de RNA, e tradução que podem induzir apoptose da célula submetida à transfecção.

[0204] O RNA de autorreplicação pode conter, por exemplo, pelo menos um ou mais genes selecionados a partir do grupo que consiste em replicases virais, proteases virais, helicases virais e outras proteínas virais não estruturais e compreendem também sequências de replicação cis-

ativas de extremidade 5' e 3', e caso desejado, sequência heterólogas que codificam uma sequência de aminoácidos desejada (por exemplo, um antígeno de interesse). Um promotor subgenômico que direciona a expressão da sequência heteróloga pode estar incluído no RNA de autorreplicação. Caso desejado, a sequência heteróloga (por exemplo, um antígeno de interesse) pode ser fundida em um quatro a outras regiões de codificação, com ou sem uma sequência de peptídeo que ignora o ribossoma no RNA de autorreplicação e/ou pode estar sob o controle de um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES)

[0205] Em determinadas modalidades, a molécula de RNA de autorreplicação não é encapsulada em uma partícula do tipo vírus. As moléculas de RNA de autorreplicação da invenção podem ser projetadas de modo que a molécula de RNA de autorreplicação não possa induzir a produção de partículas virais infecciosas. Isso pode ser obtido, por exemplo, omitindo-se um ou mais genes virais que codificam proteínas estruturais que são necessários para a produção de partículas virais no RNA de autorreplicação. Por exemplo, quando a molécula de RNA de autorreplicação se baseia em um alfavírus, tal como o vírus síndbis (SIN), o vírus da Floresta de Semliki e vírus da encefalite equina venezuelano (VEE), um ou mais genes que codificam proteínas estruturais virais, tais como glicoproteínas capsidiais (C) e/ou de envelope (E), podem ser omitidos.

[0206] Caso desejado, as moléculas de RNA de autorreplicação da invenção também podem ser projetadas para induzir a produção de partículas virais infecciosas que são atenuadas ou virulentas ou para produzir partículas virais que têm capacidade para único ciclo de um único ciclo de infeção subsequente

[0207] Um sistema adequado para obter autorreplicação dessa maneira para usar um replicion à base de alfavírus. Os alfavírus compreendem um conjunto de vírus transportados por artrópodes genética, estrutural e sorologicamente relacionados da família Togaviridae. Trinta e uma espécies foram classificadas dentro do gênero alfavírus, incluindo,

vírus síndbis, vírus da floresta de Semliki, vírus Ross River, vírus da chikungunya e vírus da encefalite equina venezuelano. Desse modo, o RNA da invenção de autorreplicação pode incorporar uma RNA replicase derivada do vírus da floresta de Semliki (SFV), vírus Síndbis (SIN), vírus da encefalite equina venezuelano (VEE), vírus Ross-River (RRV), vírus da encefalite equina do leste, vírus da chikungunya ou outros vírus que pertencem ao gênero alfavírus.

[0208] Um vetor de expressão "replicon" à base de alfavírus pode ser usado na invenção. Os vetores de replicon podem ser utilizadas em diversos formatos, incluindo DNA, RNA e partículas de replicon recombinantes. Tais vetores de replicon derivaram do alfavírus que inclui, por exemplo, vírus Síndbis (Xiong et al. (1989) Science 243: 1.188 a 1.191; Dubensky et al., (1996) J. Virol. 70:508 a 519; Hariharan et al. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo et al. (1999) PNAS 96:4.598 a 4.603), vírus da floresta de Semliki (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9: 1.356 a 1.361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech. 16:562 a 565) e vírus da encefalite equina venezuelano (Pushko et al. (1997) Virology 239:389 a 401). Os replicons derivados de alfavírus têm geralmente características muito semelhantes (por exemplo, estrutura, replicação), alfavírus individual podem exibir alguma propriedade particular (por exemplo, sensibilidade de interferon e perfil de doença) que é exclusivo. Portanto, os replicons de alfavírus quimérico produzidos a partir de famílias divergentes de também podem ser úteis.

[0209] Os replicons de RNA à base de alfavírus são tipicamente RNAs de fita (+)- que causam a tradução de uma replicase (ou replicase-transcriptase) após entrega a uma a célula. A replicase é traduzida como uma poliproteína que se autosubmete à clivagem para fornecer um complexo de replicação que gera as cópias genômicas de fita (-)- do RNA de fita (+)- entregue. Essas transcrições de fita (-)- podem, por si só, ser transcritas para fornecer cópias adicionais do RNA parental de fita (+)- e também para fornecer uma transcrição subgenômica que codifica o antígeno. A tradução da transcrição subgenômica causa, então, expressão *in situ* do antígeno pela célula infectada.

Os replicons de alfavírus podem usar uma replicase de um vírus Síndbis, um vírus da floresta de Semliki, um vírus da encefalite equina do leste, um vírus da encefalite equina venezuelano, etc.

[0210] Um replicon de RNA pode compreender, por exemplo, um genoma de RNA de um picornavírus, togavírus (por exemplo, alfavírus, tal como, por exemplo, vírus Síndbis, vírus da floresta de Semliki, vírus da encefalite equina venezuelano ou vírus Ross River), flavivírus (por exemplo, vírus de febre amarela), coronavírus, paramixovírus que foi modificado pela substituição de um ou mais genes de proteína estrutural com uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga que codifica um produto de interesse.

[0211] Em alguns aspectos, um replicon codificará (i) uma RNA polimerase dependente de RNA que pode transcrever o RNA do replicon e (ii) um antígeno. A polimerase pode ser, por exemplo, uma alfavírus replicase, por exemplo, que compreende uma ou mais proteínas de alfavírus nsPl, nsP2, nsP3 e nsP4. Embora os genomas de alfavírus natural codifiquem as proteínas de vírion além da poliproteína replicase não estrutural, é preferencial que o replicon não codifique as proteínas estruturais de alfavírus. Desse modo, um replicon pode causar a produção de cópias de RNA genômico de si mesmo em uma célula, porém não a produção de vírions que contêm RNA. A incapacidade de produzir esses vírions significou que, diferentemente de um alfavírus do tipo selvagem, o replicon preferencial não podem perpetuar, por si só, em forma infecciosa. As proteínas estruturas de alfavírus que são necessárias para a perpetuação no vírus do tipo selvagem estão ausentes do replicon preferencial e seu lugar é ocupado pelo gene (ou genes) que codifica o antígeno de interesse, de modo que a transcrição subgenômica codifique o antígeno diferente das proteínas de vírion de alfavírus estrutural

[0212] Um replicon útil com a invenção pode ter, por exemplo, dois quadros abertos de leitura. Em um exemplo, o primeiro (5') quadro aberto de leitura codifica uma replicase; o segundo (3') quadro aberto de leitura codifica um antígeno. Em algumas modalidades, o RNA pode ter (por exemplo,

montante) quadros abertos de leitura adicionais, por exemplo, para codificar antígenos adicionais ou codificar polipeptídeos de acessório.

[0213] Um replicon pode ter, por exemplo, um cap 5’ (por exemplo, uma 7-metilguanosina), que muitas vezes pode intensificar a tradução *in vivo* do RNA. Em algumas modalidades, a sequência 5' do replicon pode precisar ser selecionada para garantir a compatibilidade com a replicase codificada.

[0214] Um replicon pode ter uma cauda 3' poli-A. Pode incluir também uma sequência de reconhecimento de a poli-A polimerase (por exemplo, AAUAAA) próxima de sua extremidade 3'.

[0215] Os replicons podem ter vários comprimentos, porém têm tipicamente um comprimento de 5.000 a 25.000 nucleotídeos, por exemplo, 8.000 a 15.000 nucleotídeos ou 9.000 a 12.000 nucleotídeos.

[0216] O replicon pode ser preparado convenientemente por transcrição *in vitro* (IVT). A IVT pode usar um molde (cDNA) criado o propagado e em forma de plasmídeo nas bactérias ou criado sinteticamente (por exemplo, por métodos de modificação de síntese de gene e/ou de reação em cadeia da polimerase (PCR)). Por exemplo, um RNA polimerase dependente de DNA (tal como o bacteriógrafo T7, T3 ou polimerases SP6 de RNA) pode ser usada para transcrever o replicon de um molde de DNA. As reações de capeamento e de adição de poli-A podem ser usadas conforme necessário (embora o poli-A do replicon seja normalmente codificado dentro do molde do DNA). Essas RNA polimerases podem ter exigências rígidas para o nucleotídeo 5' transcrito (ou nucleotídeos 5' transcritos) e, em algumas modalidades, essas exigências precisam ser compatibilizadas com as exigências da replicase codificada, a fim de garantir que o RNA de IVT pode funcionar com eficiência como um substrato para sua replicase autocontida. Os exemplos específicos incluem plasmídeos à base de vírus síndbis (pSIN), tais como pSINCP, descrito, por exemplo, na Patente nº U.S. 5.814.482 e 6.015.686, assim como nas Publicações Internacionais nº U.S. 97/38087, WO 99/18226 e

WO 02/26209. A construção de tais replicons, em geral, é descrita na Patente nº U.S. 5.814.482 e nº U.S. 6.015.686.

[0217] Em outros aspectos, a molécula de RNA de autorreplicação é derivada ou se baseia em um vírus diferente de um alfavírus, de preferência, um vírus RNA de fita positiva, um picornavírus, flavivírus, rubivírus, pestivírus, hepacivírus, calicivírus ou coronavírus. As sequências de alfavírus do tipo selvagem são bem conhecidas e estão disponíveis a partir de depositórios de sequências, tais como a Coleta de Cultura do Tipo Americana, Rockville, Md. Os exemplos representativos de alfavírus adequado incluem Aura (ATCC VR-368), vírus Bebaru ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), vírus da chikungunya (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), vírus da encefalomielite equina do leste (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), vírus Fort Morgan (ATCC VR-924), vírus Getah (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), vírus Mayaro (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), vírus de Mucambo (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), vírus Pixuna (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), vírus Ross River (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Floresta de Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), vírus Síndbis (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), vírus do Tomate (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), encefalomielite equina venezuelana (ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250 ATCC VR-1249, ATCC VR-532), encefalomielite equina do leste (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926), e Y-62-33 (ATCC VR-375).

[0218] Em outros aspectos, a molécula de RNA de autorreplicação é derivada ou se baseia em um vírus competente de replicação (por exemplo, um vírus oncolítico). Um vírus oncolítico infecta, de preferência, e lisa (rompe) células cancerosas. Uma vez que as células infectadas por câncer são destruídas, novas partículas de vírus infecciosas ou vírions são liberados, o que pode infectar e destruir células cancerosas adicionais. Desse modo, o vírus não apenas causa destruição direta e células cancerosas, porém também

estimulam respostas imunológicas anticâncer hospedeiras. Em algumas modalidades, o vírus oncolítico pode codificar um antígeno, neoantígeno e/ou peptídeos associados a tumor ou virais. Os vírus oncolíticos adequados são conhecidos na técnica e estão disponíveis a partir de depositórios de sequência, tais como a Coleta de Cultura do Tipo Americana, Rockville, Md. Os exemplos representativos de vírus oncolíticos adequados incluem, porém sem limitação poxvírus, adenovírus, vírus adenoassociado, reovírus, retrovírus, senecavírus, sarampo, vírus do herpes simples, vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da estomatite vesicular (VSV), caxumba, influenza, Parvovírus, hantavírus humano, vírus do mixoma, citomegalovírus (CMV), lentivírus, vírus de coxsackie, ecovírus, vírus Seneca Valley, vírus Síndbis, JX-594, vírus que expressa p53, ONYX- 15, Delta24, Telemelysin, Telomelysin-GFP e vaccinia e semelhantes e variantes recombinantes dos mesmos. Em algumas modalidades, os vírus oncolíticos são modificados geneticamente para seletividade de tumor. Em outras modalidades, os vírus oncolíticos são de ocorrência natural. Os vírus oncolíticos de ocorrências natural incluem, porém sem limitação reovírus e senecavírus.

[0219] As moléculas de RNA de autorreplicação da invenção são tipicamente maiores que outros tipos de RNA (por exemplo, mRNA) que foram preparados com o uso dos nucleotídeos modificados. Tipicamente, as moléculas de RNA de autorreplicação da invenção contêm pelo menos cerca de 3 kb. Por exemplo, o RNA de autorreplicação pode conter pelo menos cerca de 4 kb, pelo menos cerca de 5 kb, pelo menos cerca de 6 kb, pelo menos cerca de 7 kb, pelo menos cerca de 8 kb, pelo menos cerca de 9 kb, pelo menos cerca de 10 kb, pelo menos cerca de 11 kb, pelo menos cerca de 12 kb ou mais que 12 kb. Em determinados exemplos, o RNA de autorreplicação é cerca de 4 kb a cerca de 12 kb, cerca de 5 kb a cerca de 12 kb, cerca de 6 kb a cerca de 12 kb, cerca de 7 kb a cerca de 12 kb, cerca de 8 kb a cerca de 12 kb, cerca de 9 kb a cerca de 12 kb, cerca de 10 kb a cerca de 12 kb, cerca de 11 kb a cerca de 12 kb, cerca de 5 kb a cerca de 11 kb, cerca de 5 kb a cerca de 10

kb, cerca de 5 kb a cerca de 9 kb, cerca de 5 kb a cerca de 8 kb, cerca de 5 kb a cerca de 7 kb, cerca de 5 kb a cerca de 6 kb, cerca de 6 kb a cerca de 12 kb, cerca de 6 kb a cerca de 11 kb, cerca de 6 kb a cerca de 10 kb, cerca de 6 kb a cerca de 9 kb, cerca de 6 kb a cerca de 8 kb, cerca de 6 kb a cerca de 7 kb, cerca de 7 kb a cerca de 11 kb, cerca de 7 kb a cerca de 10 kb, cerca de 7 kb a cerca de 9 kb, cerca de 7 kb a cerca de 8 kb, cerca de 8 kb a cerca de 11 kb, cerca de 8 kb a cerca de 10 kb, cerca de 8 kb a cerca de 9 kb, cerca de 9 kb a cerca de 11 kb, cerca de 9 kb a cerca de 10 kb, ou cerca de 10 kb a cerca de 11 kb.

[0220] As moléculas de RNA de autorreplicação da invenção podem compreender um ou mais tipos de nucleotídeos modificados (por exemplo, pseudouridina, N6-metiladenosina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina).

[0221] A molécula de RNA de autorreplicação pode codificar um único antígeno de polipeptídeo heterólogo ou, opcionalmente, dois ou mais antígenos de polipeptídeo heterólogos ligados entre si de modo que cada uma das sequências retenha sua identidade (por exemplo, ligada em série) quando expressa como uma sequência de aminoácido. Os polipeptídeos heterólogos gerados a partir do RNA de autorreplicação podem ser, então, produzidos como um polipeptídeo de fusão ou modificado de modo que resulte em sequências separadas de polipeptídeo ou de peptídeo.

[0222] O RNA de autorreplicação da invenção pode codificar um ou mais polipeptídeos. Esses polipeptídeos podem consistir na ligação de proteínas, enzimas, citocinas, quimiocinas, hormônios ou outras proteínas funcionais. Alternativamente, esses polipeptídeos podem consistir em antígenos que contêm uma faixa de epítopos, de preferência, epítopos com capacidade para elicitar ou uma resposta de célula T auxiliar ou uma resposta de célula T citotóxica ou as duas.

[0223] As moléculas de RNA de autorreplicação descritas no presente documento podem ser modificadas para expressa as múltiplas sequências de nucleotídeos, de dois ou mais quadros abertos de leitura, desse modo, permitindo a coexpressão de proteínas, tais como duas ou

mais sequências de anticorpo ou dois ou mais antígenos junto de citocinas ou outros imunomoduladores, que podem intensificar a geração de uma resposta imunológica. Tal molécula de RNA de autorreplicação precisa ser particularmente útil, por exemplo, na produção de vários produtos de gene (por exemplo, proteínas) ao mesmo tempo, por exemplo, como duas sequências diferentes de anticorpos de cadeia única, sequências de anticorpo de cadeia pesada e leve ou múltiplos antígenos para criar uma vacina bivalente ou multivalente.

[0224] As moléculas de RNA de autorreplicação da invenção podem ser preparadas com o uso de qualquer método. Diversos métodos adequados são conhecidos na técnica para produzir moléculas de RNA que contêm nucleotídeos modificados. Por exemplo, a molécula de RNA de autorreplicação que contém nucleotídeos modificados pode ser preparada transcrevendo-se (por exemplo, transcrição *in vitro*) um DNA que codifica a molécula de RNA de autorreplicação com o uso de uma RNA polimerase dependente de DNA adequada, tal como RNA polimerase de fago T7, RNA polimerase de fago SP6, RNA polimerase de fago T3 e semelhantes, ou mutantes dessas polimerases que permitem a incorporação eficiente de nucleotídeos modificados nas moléculas de RNA. A reação de transcrição conterá nucleotídeos e nucleotídeos modificados, e outros componentes que suportam a atividade da polimerase selecionada, tal como um tampão adequado e sais adequados. A incorporação de nucleotídeo análogos em RNA de autorreplicação podem ser modificadas, por exemplo, para alterar a estabilidade de tais moléculas de RNA, a fim de aumentar a resistência contra RNases, estabelecer a replicação após introdução em células hospedeiras apropriadas ("infectividade" do RNA) e/ou induzir ou reduzir respostas imunológicas inatas e adaptativas.

[0225] Os métodos sintéticos adequados podem ser usados sozinhos ou em combinação com um ou mais outros métodos (por exemplo, tecnologia de DNA ou RNA recombinante) para produzir uma molécula

de RNA de autorreplicação da invenção. Os métodos adequados para síntese de novo são bem conhecidos na técnica e podem ser adaptados para aplicações particulares. Os métodos exemplificativos incluem, por exemplo, síntese química com o uso de grupos de proteção adequados, tais como CEM, o método de β-cyinoetil fosforamidita; e o método de H-fosfanato de nucleosídeo. Esses produtos químicos podem ser realizados ou adaptados para uso com sintetizadores de ácido nucleico automatizados que estão comercialmente disponíveis.

[0226] Os métodos sintéticos adequados adicionais são revelados no documento Uhlmann et al. (1990) Chem Rev 90:544 a 84, e Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165. A síntese de ácido nucleico também pode ser realizada com o uso de métodos recombinantes adequados que são bem conhecidos e convencionais na técnica, incluindo clonagem, processamento e/ou expressão de polinucleotídeos e produtos de gene codificados por tais polinucleotídeos. O embaralhamento do DNA por fragmentação aleatória e remontagem de PCR de fragmentos de gene e polinucleotídeos sintéticos são exemplos de técnicas conhecidas que podem ser usadas para projetar as sequências de polinucleotídeos. A mutagênese sítio-direcionada pode ser usada para alterar ácidos nucleicos e as proteínas codificadas, por exemplo, para inserir novos sítios de inserção, após os padrões de glicosilação, mudar preferência de códon, produzir splice de variantes, introduzir mutações e semelhantes. Os métodos adequados para transcrição, tradução e expressão de sequências de ácido nucleicos são conhecidos e são convencionais na técnica.

[0227] A presença e/ou quantidade de um ou mais nucleotídeos modificados em uma molécula de RNA de autorreplicação pode ser determinada com o uso de qualquer método adequado. Por exemplo, um RNA de autorreplicação pode ser digerido a monofosfatos (por exemplo, com o uso do PI da nuclease) e desfosforilado (por exemplo, com o uso de uma fosfatase adequada, tal como CIAP), e os nucleotídeos resultantes são analisados por

HPLC de fase reversa.

[0228] De modo opcional, as moléculas de RNA de autorreplicação da invenção podem incluir um ou mais nucleotídeos modificados de modo que a molécula de RNA de autorreplicação tenha menos atividade imunomoduladora mediante a introdução ou entrada em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula humana) em comparação à molécula de RNA de autorreplicação correspondente que não contém nucleotídeos modificados.

[0229] Caso desejado, as moléculas de RNA de autorreplicação podem ser triadas ou analisadas para confirmar suas propriedades terapêuticas e profiláticas com o uso de vários métodos de teste *in vitro* ou *in vivo* que são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Por exemplo, as vacinas que compreendem molécula de RNA de autorreplicação podem ser testadas quanto seu efeito na indução de proliferação ou função efetora do tipo de linfócito particular de interesse, por exemplo, células B, células T, linhagens de célula T e clones de célula T. Por exemplo, as células do baço de camundongos isolados podem ser isoladas, e uma capacidade de linfócitos T citotóxicos para lisar células-alvo autólogas que contêm uma molécula de RNA de autorreplicação que codifica um antígeno de polipeptídeo. Além disso, a diferenciação de célula T auxiliar pode ser analisada medindo-se a proliferação ou produção das citocinas TH1 (IL-2 e IFN-γ) e/ou TH2 (IL-4 e IL-5) por ELISA ou diretamente em células T CD4+ por marcação de citocina citoplasmática e citometria de fluxo após estímulo de antígeno.

[0230] As moléculas de RNA de autorreplicação que codificam um antígeno de polipeptídeo também podem ser testadas quanto à capacidade de induzir respostas imunológicas de humorais, conforme evidenciado, por exemplo, pela indução de produção de células B de anticorpos específicos para um antígeno de interesse. Esses ensaios podem ser conduzidos com o uso de ensaios, por exemplo, linfócitos B periféricos de indivíduos imunizados. Tais métodos de ensaio são conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Outros ensaios que podem ser usados para caracterizar as

moléculas de RNA de autorreplicação da invenção podem envolver a detecção da expressão do antígeno codificado pelas células-alvo. Por exemplo, os FACS podem ser usados para detectar a expressão de antígeno na superfície celular ou por via intracelular. Outra vantagem da seleção de FACS é o fato de que se pode classificar diferentes níveis de expressão; às vezes uma expressão inferior pode ser desejada. Outros métodos adequados para identificar células que expressam um antígeno particular envolvem panning com o uso de anticorpos monoclonais em uma placa ou captura com o uso de microesferas magnéticas revestidas com anticorpos monoclonais.

B. MOLÉCULAS DE DNA

[0231] Em modalidades em que o agente bioativo é uma molécula de DNA, a molécula de DNA pode codificar proteínas de vários tipos, incluindo, sem limitação, antígenos, anticorpos, toxinas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios. O DNA pode incluir, sem limitação, DNA plasmidial, DNA circular, DNA linear, DNA de fita simples, DNA modificado, DNA antissenso e DNA de aptâmero.

C. ANTÍGENOS

[0232] O agente bioativo descrito no presente documento pode ser uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, DNA ou RNA) que codifica um antígeno. Os antígenos adequados incluem, porém sem limitação, um antígeno bacteriano, um antígeno viral, um antígeno fúngico, um antígeno de protozoário, um antígeno de câncer ou uma combinação dos mesmos. O antígeno pode ser envolvido, ou derivado, por exemplo, de uma alergia, câncer, doença infecciosa ou doença autoimune.

[0233] Um antígeno pode ser qualquer epítopo-alvo, molécula (incluindo uma biomolécula), complexo molecular (incluindo complexos moleculares que contêm biomoléculas), montagem subcelular, célula ou tecido contra o qual a elicitação ou intensificação de imunorreatividade em um indivíduo é desejada. Frequentemente, o termo antígeno se referirá a um antígeno de polipeptídeo de interesse. Em determinadas modalidades, o antígeno pode ser,

ou pode ser derivado de, ou pode ser de reação cruzada imunologicamente com, um patógeno infeccioso e/ou um epítopo, biomolécula, célula ou tecido que é associado à infecção, câncer, doença autoimune, alergia, asma ou qualquer outra afecção em que o estímulo de uma resposta imunológica antígeno-específica é desejável ou benéfico.

[0234] Determinadas modalidades contemplam um antígeno que é derivado pelo menos um patógeno infeccioso, tal como uma bactéria, a vírus ou um fungo, incluindo uma Actinobacteria, tal como *M tuberculosis* ou *M leprae* ou outro mycobacterium; uma bactéria, tal como um membro do gênero Escherichia, Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia, Clostridium ou Bordetella; um vírus, tal como um vírus do herpes simples, um vírus imunodeficiência humana (HIV, tal como HIV-1 ou HIV-2), um vírus influenza, um vírus parainfluenza, um vírus do sarampo, um vírus de caxumba, um vírus da rubéola, um coronavírus (tal como, SARS ou MERS), um rotavírus, um norovírus, um vírus picorna (tal como um poliovírus, um enterovírus ou um vírus de coxsacchie), um patógeno veterinário, por exemplo, um vírus imunodeficiência felina (FIV), citomegalovírus, vírus Varicela-Zóster, vírus da hepatite, vírus Epstein Barr (EBV), um vírus flavivírus (tal como vírus do dengue, vírus da encefalite janponesa, vírus de febre amarela, Zika vírus, vírus Powassan ou vírus da encefalite transportado por carrapato), um vírus henipah (tal como, vírus hendra ou nipah), um buniavírus (tal como, Hantavírus ou vírus da Febre do Vale do Rift), um arenavírus (tal como, vírus de lassa, vírus junín, vírus machupo ou vírus guanarito), um filovírus (tal como vírus Ebola ou vírus de Marburgo), um lissavírus (tal como, vírus da Raiva), vírus sincial respiratório, vírus do papiloma humano (HPV) e a citomegalovírus; um fungo, tal como Aspergillus, Blastomyces, Coccidioides e Pneumocysti ou uma levedura, incluindo a espécie Candida, tal como C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C lusitaniae, C tropicalis e C parapsilosis; um parasita, tal como um protzoário, por exemplo, uma espécie de Plasmódio incluindo P. falciparum, P. vivax, P. malariae e P. ovale; ou outro parasita, tal como um ou mais dentre

Acanthamoeba, Entamoeba histolytica, Angiostrongylus, Schistosoma mansonii, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Cryptosporidium, Ancylostoma, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba polecki, Wuchereria bancrofti, Giardia, Toxoplasma gondii e Leishmania. Em modalidades específicas, o antígeno pode ser de ou relacionadas a antígenos envolvidos em tuberculose, influenza, amebíase, HIV, hepatite ou Leishmaníase.

[0235] Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno relacionada à influenza. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno causador de influenza. Em algumas modalidades, o antígeno é de um vírus causador de influenza. Em uma modalidade, o antígeno compreende hemaglutinina (HA) da H5N1. Em uma modalidade, o antígeno compreende neuraminidase de H5N1.

[0236] Por exemplo, em determinadas modalidades, os antígenos foram derivados de Borrelia sp., os antígenos podem incluir ácido nucleico, antígeno derivado de patógeno ou preparações antigênicas, proteína ou peptídeos produzidos de maneira recombinante e proteínas de fusão quimérica. Tal antígeno é OspA. O OspA pode ser uma proteína em uma forma lipidada devido à biossíntese em uma célula hospedeira (Lipo-OspA) ou pode ser alternativamente um derivado não lipidado. Tais derivados não lipidados incluem a proteína de fusão NSl-OspA não lipidada que tem os primeiros 81 N terminais de aminoácido da proteína não estrutural (NS1) do vírus influenza, e a proteína OspA completa, e outra, MDP-OspA é uma forma não lipidada de OspA que porta 3 N terminais de aminoácido adicionais.

[0237] Em determinadas modalidades, o antígeno é derivado de um vírus, tal como de HIV-1, (tal como tat, nef, gp120 ou gp160), vírus do herpes humano, tal como gD ou derivados dos mesmos ou proteína Precoce Imediata, tal como ICP27 de HSV1 ou HSV2, citomegalovírus ((esp. Humana)(tais como gB ou derivados dos mesmo), Rotavírus (incluindo vírus atenuado), vírus Epstein Barr (tal como gp350 ou derivados do mesmo), vírus

Varicela-Zóster (tal como gpl, II e IE63) ou de um vírus da hepatite, tal como vírus da hepatite B (por exemplo, antígeno de Superfície Hepatite B ou um derivado do mesmo), vírus da hepatite A, vírus da hepatite C e vírus da hepatite E ou de outros patógenos virais, tais como paramixovírus: vírus Sincial Respiratório (tal como, proteínas F e G ou derivados das mesmas), vírus parainfluenza, vírus do sarampo, vírus de caxumba, vírus do papiloma humano (por exemplo HPV6, 11, 16, 18, etc.), flavivírus (por exemplo, vírus do dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus de febre amarela, Zika vírus, vírus Poswanan, vírus da encefalite transportado por carrapato) ou vírus influenza (vírus inteiro vivo ou inativado, vírus influenza dividido, cultivado em ovos ou células MDCK ou virossomas da gripe inteiros (conforme descrito por Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) ou proteínas purificadas ou recombinantes dos mesmos, tais como HA, NP, NA, PBl, PB2, PA, NS1 ou M proteínas, ou combinações dos mesmos).

[0238] Em determinadas outras modalidades, o antígeno é derivado de um ou mais patógenos bactericidas, tais como Neisseria spp, incluindo N. gonorreia e N. meningitidis (por exemplo polissacarídeos capsulares e conjugados dos mesmos, proteínas de ligação de transferrina, proteínas de ligação de lactoferrina, PilC, adesinas); S. piogenes (por exemplo, M proteínas ou fragmentos das mesmas, C5 A protease, ácidos lipoteicoicos), S. agalactiae, S. mutans: H. ducreyi; Moraxella spp, incluindo M. catarrhalis, tambpen conhecida como Branhamella catarrhalis (por exemplo, adesinas e invasinas de alto e baixo peso molecular); Bordetella spp, incluindo B. pertussis (por exemplo, pertactina, toxina pertússis ou derivados da mesma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbriae), B. parapertussis e B. bronchiseptica; Mycobacterium spp., incluindo *M. tuberculosis* (por exemplo, ESAT6, antígeno 85 A, -B ou -C), *M. bovis, M. leprae, M. avium, M. paratuberculosis, M. smegmatis; Legionella spp,* incluindo *L. pneumophila; Escherichia spp,* incluindo *E. coli* enterotóxica (por exemplo, fatores de colonização, toxina lábil ao calor ou derivados da mesma, toxina estável ao calor ou derivados dos mesmos), *E. coli* entero-hemorrágica, *E. coli* enteropatogênica (por exemplo, toxina tipo toxina

shinga ou derivados da mesma); *Vibrio spp,* incluindo *V. cholera* (por exemplo, toxina cólera ou derivados da mesma); *Shigella spp,* incluindo *S. sonnei, S. dysenteriae, S. flexnerii; Yersinia spp,* incluindo *Y. enter ocolitica* (por exemplo, uma Yop proteína), *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis; Campylobacter spp,* incluindo *C. jejuni* (por exemplo, toxinas, adesinas e invasinas) e *C. coli; Salmonella spp*, incluindo *S. typhi, S. paratyphi, S. choleraesuis, S. enteritidis; Listeria spp.,* incluindo *L. monocitogenes*; *Helicobacter spp*, incluindo *H. pilori* (por exemplo, urease, catalase, toxina de vacuolização); *Pseudomonas spp,* incluindo *P. aeruginosa; Staphylococcus spp.*, incluindo *S. aureus, S. epidermidis; Enter ococcus spp.*, incluindo *E. faecalis, E. faecium; Clostridium spp.*, incluindo *C. tetani* (por exemplo, toxina do tétano e derivado da mesma), *C. botulinum* (por exemplo, toxina de botulinum e derivado do mesmo), *C. difficile* (por exemplo, toxinas do Clostridium A ou B e derivados da mesma); *Bacillus spp.,* incluindo *B. anthracis* (por exemplo, toxina do botulinum e derivados da mesma); *Corynebacterium spp*., incluindo *C. diphtheriae* (por exemplo, toxina de difteria e derivados dos mesmos); *Borrelia spp.,* incluindo *B. burgdorferi* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por exemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por exemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii; Ehrlichia spp.,* incluindo *E. equi* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana; *Rickettsia spp,* incluindo *R. rickettsii; Chlamydia spp*. incluindo *C. trachomatis* (por exemplo MOMP, proteínas de ligação a heparina), *C. pneumoniae* (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação a heparina), *C. psittaci; Leptospira spp.,* incluindo *J. interrogans; Treponema spp., incluindo T. pallidum* (por exemplo, as proteínas de membrana externa rara), *T. denticola, T. hyodysenteriae;* ou outros patógenos bactericidas.

[0239] Em determinadas outras modalidades, o antígeno é derivado de um ou mais parasitas (Consultar, por exemplo, John, D.T. e Petri, W.A., Markell e Voge's Medical Parasitology- 9ª Edição., 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis ' Parasitology for Veterinarians-

8ª Edição., 2002, WB Saunders, Philadelphia) tal como Plasmodium spp., incluindo P. falciparum; Toxoplasma spp., incluindo T. gondii (por exemplo SAG2, SAG3, Tg34); Entamoeba spp., incluindo E. histolytica; Babesia spp., incluindo B. microti; Trypanosoma spp., incluindo T. cruzi; Giardia spp., incluindo G. lamblia; Leshmania spp., incluindo L. major; Pneumocystis spp., incluindo P. carinii; Trichomonas spp., incluindo T. vaginalis; ou de um verme capacidade para infectar um mamífero, tal como: (i) infecções de nemátodo (incluindo, porém sem limitação, Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichuria, Necator americanus, Ancylostoma duodenale, Wuchereria bancrofti, Br µgia malayi, Onchocerca volvulus, Dracanculus medinensis, Trichinella spiralis, e Strongyloides stercoralis); (ii) infecções de tremátodo (incluindo, porém sem limitação, Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongi, Opisthorchis sinensis, Paragonimus sp, Fasciola hepatica, Fasciola magna, Fasciola giganticd); e (iii) infecções de cestodo (incluindo, porém sem limitação, Taenia saginata e Taenia solium). Em determinadas modalidades, o antígeno é derivado da Schisostoma spp., Schistosoma mansonii, Schistosoma haematobium e/ou Schistosoma japonicum ou derivado de levedura, tal como Candida spp., incluindo C. albicans; Cryptococcus spp., incluindo C. neoformans.

[0240] Outros antígenos específicos são derivados de *M tuberculosis*, por exemplo, Th Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Edição 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 e hTCCl (WO 99/51748). As proteínas para *M. tuberculosis* também incluem proteínas de fusão e variantes das mesmas em que pelo menos dois, três ou quatro ou mais polipeptídeos de M. tuberculose são fundidos em uma proteína maior. Determinadas fusões incluem Ral2-TbH9-Ra35, Erdl4-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erdl4DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erdl4-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (WO 99151748). Outros antígenos que podem ser usados incluem antígenos, combinações de antígenos, e proteínas de fusão descritas no documento US 2010/0129391 e WO 2008/124647. Em uma modalidade exemplificativa, a proteína de fusão é ID93. Em uma

modalidade exemplificativa, a proteína de fusão é ID91 (SEQ ID NO: 1).

[0241] A proteína de fusão ID91 inclui uma fusão de quatro proteínas Mtb: Rv3619 (um fator de virulência, faília EsX, SEQ ID NO: 2), Rv2389 (produzida sob condições hipóxicas, fator de ressuscitação D SEQ ID NO: 3), Rv3478 (um membro da família PE/PPE, SEQ ID NO: 4) e Rv1886 (Ag85A, proteína/ membrana secretada; micoltransferase, SEQ ID NO: 5) (Figura 29). Os antígenos Mtb incluídos em ID91 foram priorizados com base na falta de homologia de sequência humana e secreção de IFN-g de PBMC humana de doadores PPD+ (e doadores de não PPD-) após estímulo com antígeno para garantir a imunogenicidade na população humana (Bertholet et al., J Immunol. 181(11):7.948 a 57 (2008)). A proteína ID91 combinada com o adjuvante de lipídeo glucopiranosila de agonista receptor tipo Toll sintética 4 (TLR4) em uma emulsão estável (GLA-SE) demonstra proteção contra Mtb H37Rv quatro semanas após uma imunização em um modelo de camundongo pré-clínico (Orr et al., J Immunol. 193(6): 2.911 a 2.918 (2014)). Com essa vacina subunitária, uma resposta a TH1 robusto (IFN-g, TNF e IL-2) a ID91 foi observada. Id.

[0242] Em algumas modalidades, o ID91 pode incluir as enzimas de restrição bem conhecidas pelas pessoas versadas na técnica. As enzimas de restrição exemplificativas incluem, porém sem limitação Ndel, Kpnl, BamHI, EcoRI e/ou Hindlll. Consultar, por exemplo, o vetor pET29 na Figura 38A e SEQ ID NOs: 6 e 12, e o vetor pET28 na Figura 38B.

[0243] Outros antígenos específicos são derivados da Clamídia e incluem, por exemplo, a Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412) e proteínas de membranas putativas (Pmps). Outros antígenos de Chlamydia podem ser selecionados a partir do grupo descrito no documento WO 99128475. Determinados antígenos podem ser derivados da Streptococcus spp, incluindo S. pneumoniae (por exemplo, polissacarídeos e capsular conjugados dos mesmos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de ligação colina) e o antígeno de proteína Pneumolysin (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337 a

342) e derivados detoxificados mutantes dos mesmos (WO 90/06951; WO 99/03884). Outras vacinas bacterianas compreendem antígenos derivados de Haemophilus spp., incluindo H. influenzae tipo B (por exemplo, PRP e conjugados dos mesmos), H. influenzae não tipáveis, por exemplo, OMP26, adesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D e lipoproteína D e peptídeos derivados de fimbrina e fimbrina (Patente nº U.S. 5.843.464) ou múltiplas variantes de cópia ou proteínas de fusão dos mesmos.

[0244] Outros antígenos específicos são derivados de Hepatite B. Os derivados do antígeno de Superfície de Hepatite B são bem conhecidos na técnica e incluem, entre outros, aqueles antígenos PreSl, PreS2, S apresentados descritos nos Pedidos de Patente EP-A414 374; EP-A-0304 578 e EP 198474.

[0245] Em outras modalidades, o antígeno é derivado do Vírus do Papiloma Humano (HPV) considerados como responsável por verrugas genitais (HPV 6 ou HPV 11 e outros), e o vírus HPV responsável por câncer cervical (HPV16, HPV18 e outros). Os antígenos particulares incluem partículas de LI ou capsômeros e proteínas de fusão que compreendem um ou mais antígenos selecionados a partir das proteínas HPV 6 e HPV 11 E6, E7, LI e L_2. Determinadas formas de proteína de fusão incluem L2E7, conforme revelado no documento WO 96/26277 e da proteína D(l/3)-E7 revelada no documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285). Os possíveis antígenos adicionais incluem os antígenos HPV 16,18, 33, 58. Por exemplo, os monômeros de antígeno LI ou L_2 ou antígenos LI ou L_2 apresentados juntos como uma partícula do tipo vírus (VLP) ou a proteína de LI sozinha proteína sozinha em uma estrutura de capsômero de VLP ou de capsômero. Tais antígenos, vírus do tipo partículas e capsômero são conhecidos, por si só. Consultar, por exemplo, o documento nº WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 e WO93/02184.

[0246] Em outras modalidades, o antígeno é uma proteína de fusão. As proteínas de fusão podem estar incluídas sozinhas ou como proteínas de fusão, tais como E7, E2 ou F5, por exemplo; modalidades

particulares incluem um VLP que compreende proteínas de fusão L1E7 (WO 96/11272). Os 16 antígenos de HPV particular compreendem as proteínas E6 ou F7 precoces na fusão com o carreador de proteína D para formar as fusões de proteína D-E6 ou E7 do HPV 16 ou combinações dos mesmos; ou combinações de E6 ou E7 com L_2 (WO 96/26277). Alternativamente, as 16 ou 18 proteínas precoces E6 e E7 de HPV podem estar presentes em uma única molécula, por exemplo, uma fusão de proteína D-E6/E7. As composições podem conter opcionalmente uma dentre ou ambas as proteínas E6 e E7 em frente ao HPV 18, por exemplo, na forma de uma proteína D-E6 ou proteína D-E7 proteína de fusão ou proteína D E6/E7 proteína de fusão. As composições podem compreender adicionalmente antígenos de outras cepas de HPV, por exemplo, das cepas HPV 31 ou 33.

[0247] Os antígenos também podem ser derivados de parasitas que causam malária. Por exemplo, os antígenos de Plasmodia falciparum incluem RTS, S e TRAP. RTS é uma proteína híbrida que compreende substancialmente toda a porção C-terminal DA proteína circunsporozoíta (CS) de P. falciparum ligado por meio de quatro aminoácidos da porção preS2 do antígeno de superfície de Hepatite B ao antígeno de superfície (S) de vírus da hepatite B. Sua estrutura completa é revelada no Pedido de Patente Internacional nº U.S. PCT/EP92/02591, publicado como o documento WO 93/10152 que reivindica prioridade do Pedido de Patente nº U.K. 9124390.7. Quando expresso na levedura, RTS é produzia como uma partícula de lipoproteína, e quando é coexpressa com o antígeno S de HBV, produz uma partícula misturada conhecida como RTS,S.

[0248] Os antígenos TRAP são descritos no Pedido de Patente Internacional nº PCT/GB89/00895 publicado como WO 90/01496. Uma modalidade da presente invenção é uma vacina contra malária em que a preparação antigênica compreende uma combinação dos antígenos RTS,S e TRAP. Outros antígenos plasmodia que são prováveis candidatos como componentes de uma vacina contra malária são P. faciparum MSP1, AMA1,

MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMPl, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPl, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfsl6, Pfs48/45, Pfs230 e seus análogos em Plasmodium spp.

[0249] Em uma modalidade, o antígeno é derivado de uma célula cancerosa, conforme pode ser útil para oi tratamento imunoterapêutico. Por exemplo, o antígeno pode ser um antígeno de rejeição tumoral, tal como aqueles para próstata, seios, colorretal, pulmonar, pancreático, renal ou cânceres. Os antígenos exemplificativos de câncer ou derivados de célula cancerosa incluem MAGE 1, 3 e MAGE 4 ou outros antígenos MAGE, tais como aqueles revelados no documento WO99/40188, PRAME, BAGE, Lage (também denominados e NY Eos 1) SAGE e HAGE (WO 99/53061) ou GAGE (Robbins e Kawakami, 1996 Current Opinions in Immunology 8, páginas 628 a 636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 & 1998); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, página 293. Esses exemplos não limitativos de antígenos de câncer são expressos em uma ampla faixa de tipos de tumor, tais como melanoma, carcinoma de pulmão, sarcoma e carcinoma de bexiga. Consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 6.544.518.

[0250] Outros antígenos tumor-específicos incluem, porém sem limitação, glicosídeos associados a tumor ou tumor-específico, tal como GM2, e GM3 ou conjugados dos mesmos para proteínas carreadoras; ou um hormônio de peptídeo próprio, tal como hormônio de liberação de Gonadotrofina de comprimento inteiro (GnRH, WO 95/20600), um peptídeo curto de 10 aminoácidos de comprimento, útil no tratamento de muitos cânceres. Em outra modalidade, os antígenos de proposta são usados, tais como antígeno prostata-específico (PSA), PAP, PSCA (por exemplo, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95(4) 1.735 a 1.740 1998), PSMA ou, em uma modalidade um antígeno conhecido como Prostase. (por exemplo, Nelson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1999) 96: 3.114 a 3.119; Ferguson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1999. 96, 3.114 a 3.119; WO 98/12302; Patente nº U.S. 5.955.306, WO 98/20117,

Patentes nºs U.S. nº 5.840.871 e 5.786, 148; o documento WO 00/04149. Outros antígenos prostata-específicos são conhecidos a partir do documento WO 98/137418, e WO/004149. Outro é STEAP (PNAS 96 14523 14528 7-12 1999).

[0251] Outros antígenos associados a tumor úteis no contexto da presente invenção incluem: Plu -1 (J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999), HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon et al Bioessays 199, 21:61-70, Patente nº U.S. nº 5.654, 140) e Criptin (Patente nº U.S. 5.981.215). Adicionalmente, os antígenos particularmente relevantes para vacinas na terapia contra câncer também compreendem tirosinase e survivina.

[0252] Em outras modalidades, os agentes usados nas composições da invenção incluem antígenos associados a doenças respiratórias, tais como aquelas causada ou exacerbadas por infecção bacteriana (por exemplo, pneumococcal), para a profilaxia e terapia de afecções, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD). A COPD é definida fisiologicamente pela presença de obstrução de vias aéreas parcialmente reversíveis ou irreversíveis em pacientes com bronquite crônica e/ou enfisema (Am J Respir Crit Care Med. novembro de 1995; 152(5 Pt 2):S77 a 121). As exacerbações de COPD são, muitas vezes, causadas por infecção bacteriana (por exemplo, pneumococcal) (Clin Microbiol Rev. abril de 2001; 14(2):336-63).

D. ÁCIDO NUCLEICO DE CODIFICAÇÃO DE ANTICORPO

[0253] Os agentes bioativos descritos no presente documento (por exemplo, RNA) podem codificar um anticorpo e/ou fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo, operacional ligado de maneira operacional a um ou menos elementos de controle de expressão, de modo que a entrega a um indivíduo resulte na produção do dito anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno no indivíduo. Em algumas modalidades, o agente bioativo pode conter a sequência de codificação da cadeia pesada e cadeia leve em um único quadro aberto de leitura. Em outras modalidades, um NLC da presente invenção pode compreender dois agentes bioativos em que um dentre os agentes bioativos

codifica uma cadeia pesada em que a oura codifica uma cadeia leve. Em outras modalidades, o agente bioativo pode conter a sequência de codificação das regiões variáveis das cadeias pesada e leve ligada por uma sequência de polipeptídeos flexíveis curtos de modo que a biomolécula expressa se ligue ao antígeno de interesse. Em algumas modalidades particulares, o anticorpo produzido tem capacidade para elicitar uma resposta imunológica em um indivíduo.

E. INTERFERÊNCIA DE RNA

[0254] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo bioativo associado ao NLC é um RNA de não codificação, tal como um polinucleotídeo de interferência de RNA (RNAi). O RNAi é uma molécula com capacidade para induzir a interferência de RNA através da interação com a interferência do maquinário de via de RNA das células mamíferas para degradar ou inibir a tradução das transcrições de RNA mensageiro (mRNA) de um transgene de maneira sequência-específica. Dois polinucleotídeos de RNAi primários são RNAs de interferência pequenos (ou curtos) (siRNAs) e microRNAs (miRNAs). Os polinucleotídeos de RNAi podem ser selecionados a partir do grupo que compreende: siRNA, microRNA, RNA dupla fita (dsRNA), RNA de grampo curto (shRNA) e cassetes de expressão que codificam o RNA com capacidade para induzir a interferência de RNA. O siRNA compreende uma estrutura de dupla fita que contém tipicamente 15 a 50 pares de base e, de preferência, 21 a 25 pares de base e que têm uma sequência de nucleotídeo idêntica (perfeitamente complementar) ou quase idêntica (parcialmente complementar) a uma sequência de codificação em um gene-alvo expresso ou RNA dentro da célula. Um siRNA pode ter suspensões de dinucleotídeo 3'. Um siRNA pode ser composto de dois polinucleotídeos anelados ou de um único polinucleotídeo que forma uma estrutura de grampo.

[0255] Os MicroRNAs (miRNAs) são produtos de gene de RNA de não codificação pequeno cerca de 22 nucleotídeos de comprimento que direcionam a destruição ou repressão de tradução de seus

alvos de mRNA. Caso a complementaridade entre o miRNA e o mRNA-alvo seja parcial, a tradução do mRNA-alvo é reprimida. Caso a complementaridade seja extensa, o mRNA-alvo é clivado. Para miRNAs, o complexo se liga aos sítios-alvo normalmente localizados na 3' UTR dos mRNAs que compartilham tipicamente uma homologia apenas parcial com o miRNA. Uma "região de semente"— um estiramento de cerca de sete (7) nucleotídeos na extremidade 5' do miRNA que forma pareamento de base perfeito com seu alvo — exerce uma função principal na especificidade de miRNA. A ligação do complexo RISC/miRNA ao mRNA pode causar uma repressão da tradução da proteína ou clivagem e degradação do mRNA.

F. RNAS DE CRISPR

[0256] Em algumas modalidades, a formulação e NLC compreende um RNA-guia curto sintético (sgRNA) do genoma CRISPR/Cas9, desse modo, editando um gene de interesse. As CRISPRs (Repetições Palindrômicas Regularmente Interespaçadas Agrupadas) são loci que contêm múltiplas repetições diretas curtas que são encontradas nos genomas de aproximadamente 40% de bactérias sequenciadas e 90% das arqueas sequenciadas. As CRISPR funcionam como um sistema imunológico procariótico, pelo fato de que conferem resistência a elementos genômicos, tias como plasmídeos e fagos. O sistema de CRISPR fornece uma forma de imunidade obtida. Os segmentos curtos de DNA estranho, denominados de espaçadores, são incorporados no genoma entre as repetições CRISPR e servem como uma memória de exposições passadas. Em seguida, os espaçadores CRISPR são usados para reconhecer e silenciar elementos genéticos exógenos de maneira análoga a RNAi em organismos eucarióticos. Cas9, um componente de proteína essencial no sistema de CRISPR/Cas9 Tipo II, forma uma endonuclease ativa quando complexado com dois RNAs denominado CRISPR RNA (crRNA) e crRNA (tracrRNA) de transativação, desse modo, fatiando os elementos genéticos estranhos em fagos ou plasmídeos invasores para proteger as células hospedeiras.

[0257] A endonuclease guiada por RNA com base no sistema CRISPR/Cas9 foi empregada para edição de genoma eucariótico. Em determinadas modalidades da presente invenção, o agente bioativo é RNA que codifica as endonucleases de sgRNAs e/ou Cas9. Em algumas modalidades, o RNA compreende um ou mais polinucleotídeos que codificam Cas9 e dois RNAs guia, o primeiro RNA-guia que compreende uma sequência espaçadora que é complementar a um segmento do locus de ruptura dupla fita (DSB) 5', e o segundo RNA-guia que compreende uma sequência espaçadora que é complementar a um segmento do locus de DSB 3'. Ambos os RNAs-guia podem ser fornecidos como RNAs-guia de molécula única (que compreende tracrRNA e crRNA) ou um ou os dois podem ser fornecidos como RNAs-guia de molécula dupla que compreende uma crRNA e uma tracrRNA que não são unidas entre si, porém são moléculas separadas.

G. POLIPEPTÍDEOS

[0258] Em algumas modalidades, o um ou mais agentes bioativos é um polipeptídeo. O polipeptídeo pode ser uma proteína de comprimento completo ou um fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um peptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é uma proteína de fusão. Em algumas modalidades particulares, a proteína de fusão tem capacidade para elicitar uma resposta imunológica mediante administração a um indivíduo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um antígeno, conforme descrito acima. Os polipeptídeos podem ser produzidos por qualquer método conhecido por uma pessoa versada na técnica, incluindo, por exemplo, expressão recombinante.

H. MOLÉCULAS PEQUENAS

[0259] Em determinadas modalidades, a presente revelação se refere geralmente a uma composição de NLC em que o um ou mais agentes bioativos é uma molécula pequena ou agente terapêutico para entrega fármaco. Uma associação próxima de molécula de fármaco e o NLC pode ser influenciada pelas propriedades físico-químicas de fármaco, o tipo e

concentração do tensoativo, tipo de lipídeo e método de produção. Em determinadas modalidades, o fármaco de molécula pequena é encapsulado pelo NLC, que é habilitado pelo componente de fase de lipídeo líquido do núcleo de óleo que fornece alta solubilidade de fármaco (Beloqui, A., et al. Nanomedicine 2016; 12(1): 143 a 161).

[0260] As composições de NLC fornecidas no presente documento podem ser adequadas para entrega de fármaco através de várias rotas de administração, incluindo, sem limitação, rotas de administração dérmica, transdérmica, oral, intranasal, pulmonar ou oftalmológica.

I. HORMÔNIOS

[0261] Em algumas modalidades, o um ou mais agentes bioativos associados ao NLC é um polinucleotídeo ou polipeptídeo que codifica um hormônio ou análogo de um hormônio. Em algumas modalidades, o NLC compreende um lipídeo que é conjugado a um hormônio. O hormônio pode ser selecionado a partir do grupo que compreende hormônio de crescimento humano, adrenocorticotropina, hormônio de liberação de gonadotropina, oxitocina, hormônio-de-leutinização-hormônio-de-liberação, hormônio de estímulo folicular, insulina, fator de crescimento tipo insulina, leptina, hormônio paratiroide, hormônio estimulador da tiroide ou alguma combinação dos mesmos. Em determinadas modalidades, a formulação e NLC compreende um hormônio ou análogo de um hormônio em combinação com um composto terapêutico de molécula pequena, conforme descrito acima.

J. ADJUVANTES

[0262] Em algumas modalidades, a NLC é para entrega de vacina e um ou mais dentre os agentes bioativos é um adjuvante ou alternativamente, as composições de NLC fornecidas no presente documento podem ser administradas com um adjuvante. Conforme usado no presente documento, o termo adjuvante se refere a uma substância que aperfeiçoa ou potencializa uma resposta imunológica. A resposta imunológica pode ser, por exemplo, uma resposta imunológica antígeno-específica, por exemplo, a um

antígeno exógeno.

[0263] Muitos adjuvantes contêm uma substância projetada para proteger o antígeno de catabolismo rápido, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral, e um estimulador de resposta imunológicas, tais como lipídeo A (natural ou sintético). Os adjuvantes sintéticos são comercialmente disponíveis como, por exemplo, Freund's Incomplete Adjuvant e Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Merck Adjuvant 65 (Merck e Company, Inc., Rahway, N. J.); AS-2 e derivados dos mesmos (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); CWS, TDM, Leif, sais de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alume) ou fosfato de alumínio; sais de cálcio, ferro ou zinco; uma suspensão insolúvel de tirosina acetilada; açúcares acetilados; polissacarídeos derivados cationicamente ou anionicamente; polifosfazenos; microesferas biodegradáveis; lipídeo A e quil A de monofosforila. As citocinas, tais como GM-CSF ou interleucina-2, -7 ou -12, também podem ser usadas como adjuvantes.

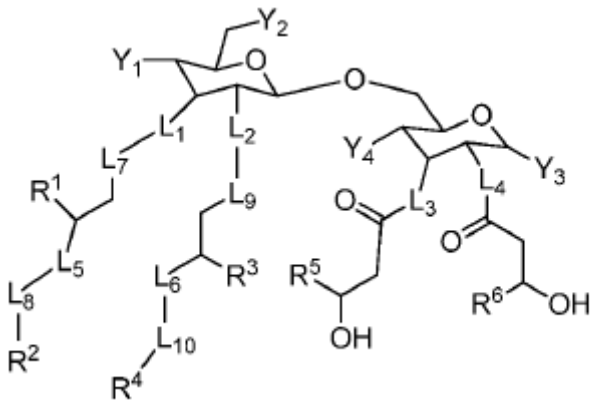
[0264] Determinadas composições exemplificativas empregam sistemas projetados para induzir uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th1. Altos níveis de citocinas do tipo Th1 (por exemplo, IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-12) tendem a favorecer a indução de respostas imunológicas mediadas a m antígeno administrado. Em contrapartida, altos níveis das citocinas tipo Th2 (por exemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tendem a favorecer a indução de respostas imunológicas humoral. Seguindo a aplicação de uma composição conforme fornecido no presente documento, um paciente pode suportar uma resposta imunológica que inclui resposta Th1- e tipo Th2. Dentro de uma modalidade exemplificativa, na qual uma resposta é predominante do tipo Th1, o nível das citocinas do tipo Th1 aumentarão mais que o nível das citocinas tipo Th2. Os níveis dessas citocinas podem ser prontamente avaliados com o uso de ensaios padrão. Para uma revisão dessas famílias de citocinas, consultar Mossman & Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145 a 173 (1989).

[0265] Determinados adjuvantes para uso na elicitação de uma resposta predominantemente de do tipo Th1 incluem, por exemplo, uma combinação de monofosforil lipídeo A, por exemplo, lipídeo monofosforil 3-de-O-acilado A (3D-MPLTM), junto de um sal de alumínio (Patente nº U.S. 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034; e 4.912.094). Os oligonucleotídeos que contêm CpG (nos quais o dinucleotídeo de CpG é não metilado) também incluem uma resposta predominante de Th1. Tais oligonucleotídeos são bem conhecidos e são descritos, por exemplo, no documento WO 96/02555, WO 99/33488 e na Patente nº U.S. 6.008.200 e nº U.S. 5.856.462. As sequências de DNA imunoestimuladoras também são descritas, por exemplo, por Sato et al., Science 273:352 (1996). Outro adjuvante ilustrativo compreende uma saponina, tal como Quil A, ou derivados dos mesmos, incluindo QS21 e QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); Escin; Digitonin; ou Gypsophila ou Chenopodium quinoa saponins. Outras formulações ilustrativas incluem mais que uma saponina nas combinações adjuvantes da presente revelação, por exemplo, combinações de pelo menos dois dentre o grupo a seguir que compreende QS21, QS7, Quil A, 0-escina ou digitonina.

[0266] Outros adjuvantes ilustrativos úteis no contexto da revelação incluem agonistas de receptor do tipo Toll, tais como TLR[1], TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR7/8, TLR9 agonistas e semelhantes. Ainda outros adjuvantes ilustrativos incluem imiquimod, gardiquimod, resiquimod e compostos relacionados.

[0267] Em outras modalidades, o adjuvante é um adjuvante de glucopiranosil lipídeo A (GLA), conforme descrito na Patente nº U.S. 8.609, 114 ou 8.722.064 cuja revelação é incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0268] Por exemplo, em determinadas modalidades, o agonista de TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura da Fórmula (VII):



(VII)

[0269] ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo caracterizado pelo fato de que:

[0270] L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 e L_6 são iguais ou diferentes e independentemente -0-, -NH- ou - (CH2)-;

[0271] L_7, L_8, L_9 e L_{10} são iguais ou diferentes e independentemente ausentes ou -C(=0)-;

[0272] Y_1 é um grupo funcional ácido;

[0273] Y_2 e Y_3 são iguais ou diferentes e independentemente -OH, -SH ou um grupo funcional ácido;

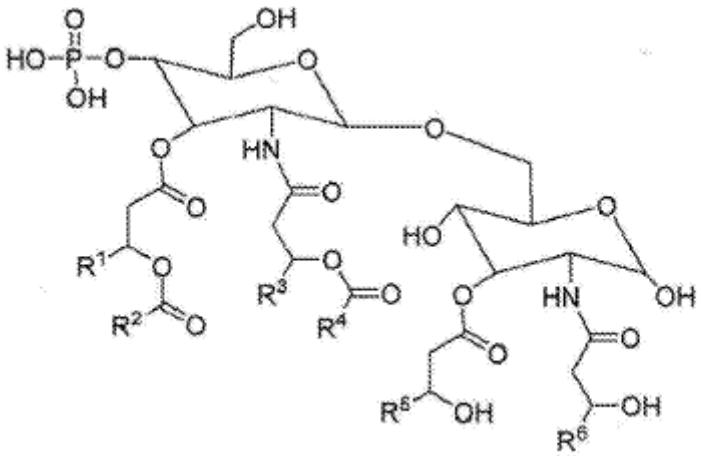
[0274] Y_4 é -OH ou -SH;

[0275] R_1, R_3, R_5 e R_6 são iguais ou diferentes e independentemente C_{8-13} alquila; e

[0276] R_2 e R_4 são iguais ou diferentes e independentemente C_{6-11} alquila.

[0277] Em algumas modalidades da estrutura de GLA sintética, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{10} alquila; e R^2 e R^4 são C_8 alquila. Em determinadas modalidades, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_9 alquila.

[0278] Por exemplo, em determinadas modalidades, o agonista TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura da Fórmula (VIII) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:

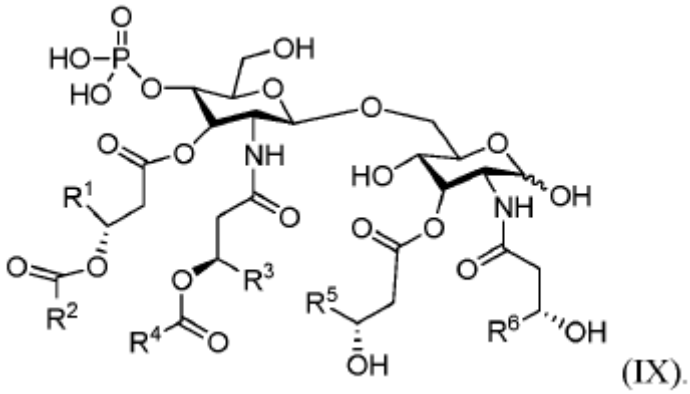


(VIII).

[0279] Em determinadas modalidades da estrutura GLA ACIMA, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11}-C_{20} alquila; e R^2 e R^4 são C_{12}-C_{20} alquila. Em outra modalidade específica, o GLA tem a fórmula apresentada acima em que R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_{13} alquila. Em outra modalidade específica, o GLA tem a fórmula apresentada acima em que R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{10} alquila; e R^2 e R^4 são C_8 alquila.

[0280] Em outra modalidade específica, o GLA tem a fórmula apresentada acima em que R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11}-C_{20} alquila; e R^2 e R^4 são C_9-C_{20} alquila. Em determinadas modalidades, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_9 alquila.

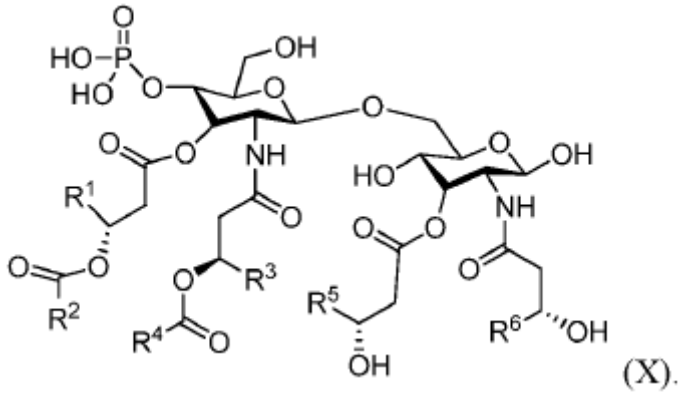
[0281] Em determinadas modalidades, o agonista TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura de Fórmula (IX) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



(IX).

[0282] Em determinadas modalidades da estrutura GLA ACIMA, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11}-C_{20} alquila; e R^2 e R^4 são C_9-C_{20} alquila. Em determinadas modalidades, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_9 alquila.

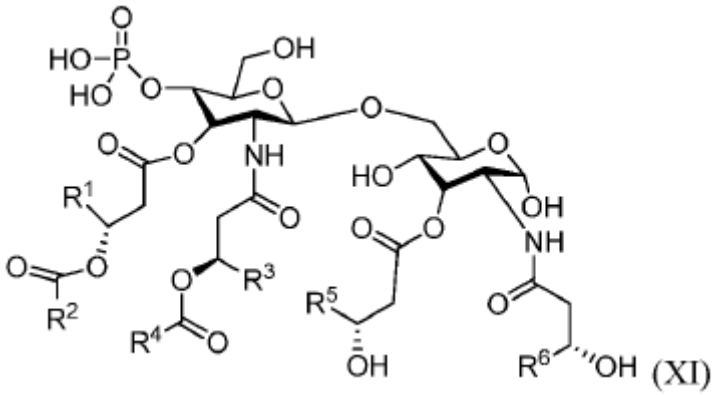
[0283] Em determinadas modalidades, o agonista TLR4 é um adjuvante de GLA que tem a seguinte estrutura de Fórmula (X):



(X).

[0284] Em determinadas modalidades da estrutura GLA ACIMA, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11}-C_{20} alquila; e R^2 e R^4 são C_9-C_{20} alquila. Em determinadas modalidades, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_9 alquila.

[0285] Em determinadas modalidades, o agonista TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura de Fórmula (XI) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:

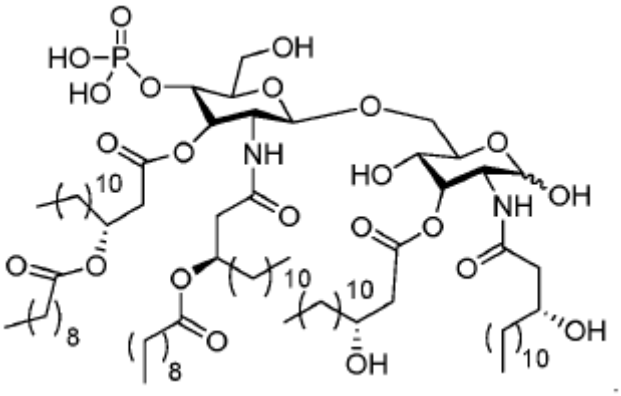


(XI)

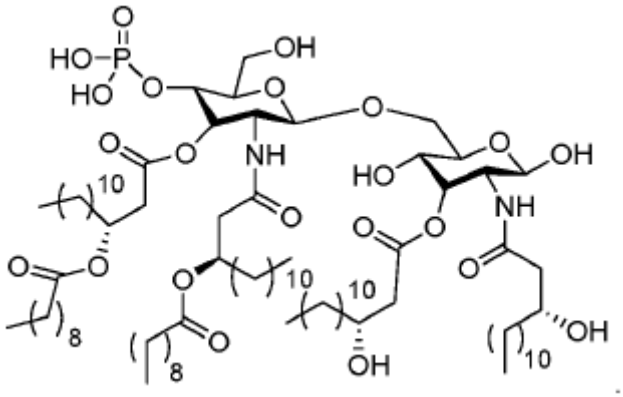
[0286] Em determinadas modalidades da estrutura GLA ACIMA, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11}-C_{20} alquila; e R^2 e R^4 são C_9-C_{20} alquila. Em

determinadas modalidades, R^1, R^3, R^5 e R^6 são C_{11} alquila; e R^2 e R^4 são C_9 alquila.

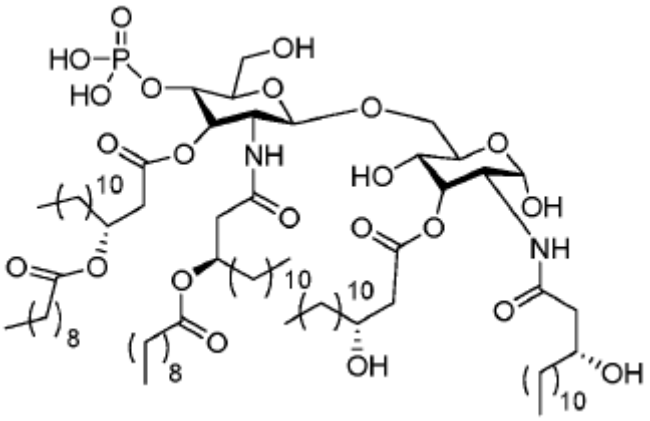
[0287] Em determinadas modalidades, o agonista de TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



[0288] Em determinadas modalidades, o agonista de TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



[0289] Em determinadas modalidades, o agonista de TLR4 é um adjuvante de GLA sintético que tem a seguinte estrutura ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



[0290] Em outra modalidade, um derivado de lipídeo A atenuado (ALD) é incorporado nas composições descritas no presente documento. Os ALDs são moléculas do lipídeo tipo A que foram alteradas ou construídas de modo que a molécula exiba efeitos menores ou diferentes dos efeitos adversos do lipídeo A. Esses efeitos adversos incluem pirogenicidade, reatividade de Shwarzman local e toxicidade, conforme avaliado no embrião galinha 50% de ensaio de dose letal ($CELD_{50}$). Os ALDs úteis de acordo com a presente revelação incluem monofosforil lipídeo A (MLA ou MPL) e monofosforil 3-deacilado lipídeo A (3D-MLA ou 3D-MPL). MLA (MPL) e 3D-MLA (3D-MPL) são conhecidos e não precisam ser descritos detalhadamente no presente documento.

[0291] Nos compostos agonistas de TLR4 acima, a carga geral pode ser determinada de acordo com os grupos funcionais na molécula. Por exemplo, um grupo fosfato pode ser carregado negativamente ou neutro, dependendo do estado de ionização do grupo fosfato.

[0292] V. Métodos para Produzir as Composições Exemplificativas que Compreendem Agentes Bioativos e Carreadores de Lipídeo Nanoestruturados

[0293] Conforme fornecido no presente documento, um método para produzir os NLCs descritos no presente documento compreende (a) misturar o lipídeo em fase sólida, o lipídeo em fase líquida, o lipídeo catiônico e o tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) para

formar uma mistura em fase de óleo; (b) misturar o tensoativo hidrofílico e água para formar uma fase aquosa; e (c) misturar a mistura em fase de óleo com a mistura em fase aquosa para formar o NLC. Em algumas modalidades, uma etapa adicional compreende combinar o agente bioativo com o NLC de modo que o agente bioativo se associe à superfície do NLC por interações não covalentes ou por interações covalentes reversíveis. Essas modalidades são preferenciais quando o agente bioativo carregado negativamente, tal como uma molécula de RNA ou uma molécula de DNA. As cargas negativas no agente bioativo interagem com o lipídeo catiônico no NLC, desse modo, associando o agente bioativo negativamente carregado com o NLC. Em outras modalidades, em que o agente bioativo é hidrofóbico, este é combinado com os componentes na etapa (a) para formar parte da mistura em fase de óleo. Em algumas modalidades, i agente bioativo pode ser fixado a um componente da superfície do NLC por meio de interações covalentes.

[0294] A mistura do lipídeo em fase sólida, o lipídeo em fase líquida, o lipídeo catiônico e o tensoativo hidrofóbico (por exemplo, éster de sorbitano) para formar uma mistura em fase de óleo pode ser obtida, por exemplo, por meio de aquecimento e de sonicação. A misturarão da mistura em fase de óleo com a mistura em fase aquosa pode ser obtida, por exemplo, por vários métodos de emulsificação, incluindo, sem limitação, emulsificação e microfluidização de alto cisalhamento.

[0295] VI. Composições que Compreendem os Carreadores de Lipídeo de Lipídeo

[0296] No presente documento são fornecidas formulações, composições e composições farmacêuticas que compreende as composições de NLC descritas no presente documento.

[0297] As composições que compreendem o NLC e o agente bioativo podem compreender adicionalmente um carreador, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0298] As composições descritas no presente

documento podem ser administradas a um indivíduo para qualquer fim de vacinação, terapêutico ou diagnóstico.

[0299] No presente documento, são fornecidas no presente documento composições farmacêuticas que compreende as composições reveladas aqui m combinação com um carreador, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0300] Em modalidades particularmente preferenciais fornecidas no presente documento, o NLC e as composições farmacêuticas fornecidas no presente documento com capacidade para serem filtradas por um filtro de 0,45 mícron. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica tem capacidade para ser filtrada por um filtro de 0,20 mícron. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica tem capacidade para ser filtrada por um filtro de 0,22 mícron.

[0301] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende um NLC e um agente bioativo associado. Tal composição pode ser administrada a um indivíduo a fim de estimular uma resposta imunológica, por exemplo, uma resposta imunológica não específica ou uma resposta imunológica antígeno-específica, com fim de diagnóstico, tratar ou impedir uma doença ou outra afecção, tal como uma infecção por um organismo.

[0302] Em algumas outras modalidades, a composição farmacêutica é uma composição de vacina que compreende as composições descritas no presente documento em combinação com um carreador, excipiente ou diluente farmaceuticamente aceitável. Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis são normalmente não tóxicos a recipientes nas dosagens e concentrações empregadas.

[0303] Em alguns aspectos, as composições farmacêuticas fornecidas no presente documento são administradas a um indivíduo para gerar uma resposta no indivíduo, por exemplo, para gerar uma resposta imunológica no indivíduo. Tipicamente, uma quantidade

terapeuticamente eficaz é administrada ao indivíduo.

[0304] O termo "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade que é suficiente para obter ou obter pelo menos parcialmente o efeito desejado, por exemplo, suficiente para gerar a resposta imunológica desejada. Uma quantidade eficaz de uma NLC ou composição farmacêutica é administrada em um “regime eficaz”. O termo "regime eficaz" se refere a uma combinação da quantidade da composição que é administrada e frequência de dosagem para obter o efeito desejado.

[0305] Os níveis de dosagem reais podem ser variados de modo a obter uma quantidade que é eficaz para obter uma resposta para um paciente particular, composição e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, afecção, saúde geral e histórico médico anterior do indivíduo que é tratado e fatores semelhantes bem conhecidos na técnica de medicina.

[0306] Em modalidades terapêuticas exemplificativas fornecidas no presente documento, uma dosagem de cerca de 1 μg/kg a cerca de 10 mg/kg de uma composição farmacêutica terapêutica é administrada. Ficará evidente para as pessoas versadas na técnica que o número e frequência de administrações dependerão da resposta do indivíduo.

[0307] Em modalidades com base em vacina exemplificativa fornecidas no presente documento, cerca de 1 μg a 100 μg do antígeno ou 0,1 μg a 10 mg do ácido nucleico que codifica o antígeno será administrado por administração. As formulações exemplificativas da presente invenção permitem uma dose humana de cerca de 0,1 μg, cerca de 1 μg, cerca de 5 μg ou cerca de 10 μg a cerca de 500 μg do RNA de replicon. As formulações exemplificativas da presente invenção permitem uma dose humana de cerca de 5 μg a cerca de 20 μg de RNA de replicon.

[0308] Ficará evidente para as pessoas versadas na

técnica que o número e frequência de administrações dependerão da resposta do indivíduo. As formulações exemplificativas permitem uma eficácia terapêutica tão baixa quanto uma imunização.

[0309] Os "carreadores farmaceuticamente aceitáveis" para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Por exemplo, a solução salina estéril e solução salina tamponada por fosfato em pH fisiológico pode ser usada. Os conservantes, estabilizantes, corantes e, até mesmo, agentes flavorizantes podem ser fornecidos na composição farmacêutica. Por exemplo, bonzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico podem ser adicionados como conservantes. *Id*. em 1.449. Além disso, os antioxidantes e agentes de suspensão podem ser usados. *Id*.

[0310] As composições farmacêuticas podem estar na fora que permite que a composição seja administrada a um paciente. Por exemplo, a composição pode estar na forma de um sólido, líquido ou gás (aerossol). As rotas típicas de administração incluem, sem limitação, oral, tópica, parenteral, sublingual, bucal, retal, vaginal, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intramucosa, pulmonar ou subcutânea. O termo parenteral, conforme usado no presente documento, inclui administração iontoforética, sonoforética, térmica, transdérmica e, também, injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares, intraesternas, intracavernosas, intratecais intrauretral ou técnicas de infusão. Em algumas modalidades, uma composição, conforme descrito no presente documento, (incluindo vacina e composições farmacêuticas) é administrada por via interdérmica por uma técnica selecionada a partir de iontoforese, microcavitação, sonoforese, injeção de jato ou microagulhas. Em uma modalidade preferencial, uma composição, conforme descrito no presente documento, é administrada por via intradérmica com o uso do dispositivo de microagulha fabricado por NanoPass Technologies Ltd., Nes Ziona, Israel, por exemplo, MicronJet600 (consultar, por exemplo, a Patente nº

U.S. 6.533.949 e 7.998.119 e Yotam, et al., Human vacinas & immunotherapeutics 11(4): 991 a 997 (2015), dentre os quais cada um é incorporado no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0311] A composição farmacêutica pode ser formulada de modo a permitir que os ingredientes ativos contidos no presente documento como biodisponíveis. As composições que serão administradas a um indivíduo assumem a forma de uma ou mais unidades de dosagem, em que, por exemplo, um comprimido pode ser uma unidade de dosagem única, e um recipiente de um ou mais compostos da invenção em forma de aerossol pode reter uma pluralidade de unidades de dosagem.

[0312] Para administração oral, um excipiente e/ou ligante pode estar presente. Os exemplos são sacarose, caolina, glicerina, dextrinas de sódio, alginato de sódio, carboximetilcelulose e etilcellulose. Pode haver agente colorantes e/ou flavorizantes. Um envoltório de revestimento pode ser empregado.

[0313] A composição pode estar na forma de um líquido, por exemplo, um elixir, xarope, solução, emulsão ou suspensão. O líquido pode ser para administração oral ou para entrega por injeção, como dois exemplos. Quando destinado para administração oral, as composições podem conter um ou mais agentes adoçantes, conservantes, corante/colorante e intensificador de sabor. Em uma composição destinada para ser administrada por injeção por meio de injeção com agulha ou seringa ou injeção a jato livre de agulha, um ou mais dentre um tensoativo, conservante, agente de molhamento, agente dispersante, agente de suspensão, tampão, estabilizante e agente isotônico podem ser incluídos.

[0314] Uma composição farmacêutica líquida, conforme usado no presente documento, seja na forma de uma solução, suspensão ou outra forma semelhante, pode incluir um ou mais dentre os seguintes carreadores ou excipientes: diluentes estéreis, tais como água para injeção, solução salina, de preferência, solução salina fisiológica, solução de

Ringer, cloreto de sódio isotônico, óleos fixos, tais como esqualeno, esqualano, óleo mineral, um mono-oelato de manida, colesterol e/ou mono sintético ou diglicerídeos que podem servir como o solvente ou meio de suspensão, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabeno; antoxidantes, tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminatetra-acético; tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatases e agentes para o ajuste de tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose.

[0315] Em outra modalidade, uma composição da presente revelação é formulada de maneira que possa se tornar aerossol.

[0316] Pode ser desejável, também, incluir outros componentes em uma composição farmacêutica, tais como veículos de entrega incluindo, porém sem limitação sais de alumínio, emulsões de água m óleo, veículos de óleo biodegradáveis, emulsões de óleo em água, microcápsulas biodegradáveis e lipossomas. Os exemplos de substâncias imunoestimuladoras (coadjuvantes) para uso em tais veículos também são descritos acima e podem incluir N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, interferon gama e IL-12.

[0317] Embora o carreador adequado conhecido pelas pessoas de habilidade comum na técnica possa ser empregado nas composições farmacêuticas da presente revelação, o tipo de carreador variará dependendo do modo de administração e da possibilidade de a liberação prolongada ser desejada. Para administração parenteral, tal injeção subcutânea, o carreador pode compreender água, solução salina, álcool, uma gordura ou um tampão. Para administração oral, qualquer um dos carreadores acima ou um carreador sólido, tal como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, talco, celulose, glicose, sacarose e carbonato de magnésio podem ser empregados. As microesferas biodegradáveis (por exemplo, galactose poliláctica) também podem ser empregadas para as composições farmacêuticas da presente invenção. Os microesferas biodegradáveis

adequadas são reveladas, por exemplo, na Patente nº U.S. 4.897.268 e 5.075.109. Nesse sentido, é desejável que a microesfera é maior que aproximadamente 25 mícrons.

[0318] As composições farmacêuticas também podem conter diluentes, tais como tampões, antioxidantes, tais como ácido ascórbico, polipeptídeos, proteínas, aminoácidos, carbo-hidratos incluindo glicose, sacarose ou dextrinas, agentes quelantes, tais como EDTA, glutatona e outros estabilizantes e excipientes. A solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumisquilna sérica não específica são diluentes apropriados exemplificativos. Por exemplo, um produto pode ser formado como um liofilizado com o uso de soluções excipientes apropriadas (por exemplo, sacarose) como diluentes.

[0319] A composição farmacêutica pode ser, de fato, para administração tópica, nesse caso o carreador pode compreender adequadamente uma solução, emulsão, pomada ou base de gel. A base, por exemplo, pode compreender um ou mais dentre o seguinte: petrolato, lanolina, polietileno glicóis, cera de abelha, óleo mineral, diluentes, tais como água e álcool e emulsificantes e estabilizantes. Pode haver agentes espessantes em uma composição farmacêutica para administração tópica. Caso destinado para administração transdérmica, a composição pode incluir um emplastro transdérmico ou dispositivo de iontoforese. As formulações tópicas podem conter uma concentração do antígeno (por exemplo, composição de vacina GLA-antígeno) ou GLA (por exemplo, composição de adjuvante imunológico; GLA está disponível junto à Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL; por exemplo, número de produto 699800) de cerca de 0,1 a cerca de 10% em p/v (peso por volume unitário).

[0320] A composição pode ser destinada a administração retal, na forma, por exemplo, de um supositório que pode se fundir no reto e liberar o fármaco. A composição para administração retal pode conter uma base oleaginosa como um excipiente de não irritação adequado. Tais bases

incluem, sem limitação, lanolina, manteiga de cacau e polietileno glicol. Nos métodos da invenção, as composições farmacêuticas/adjuvantes podem ser administradas com o uso de inserto (ou insertos), microesfera (ou microesferas), formulação de liberação temporizada (ou formulações de liberação temporizada), emplastro (ou emplastros) ou formulação de liberação rápida (ou formulações de liberação rápida).

[0321] De modo opcional, a fim de controlar a tonicidade, o NLC pode compreender um sal fisiológico, tal como um sal de sódio. O cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, pode ser usado a cerca de 0,9% (em p/v) (solução salina fisiológica). Outros sais que podem estar presentes incluem cloreto de potássio, fosfato de di-hidrogênio de potássio, fosfato de dissódio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio etc. Os agentes tonificantes não iônicos também podem ser usados para controlar a tonicidade. Os monossacarídeos classificados como aldoses, tais como glicose, manose, arabinose e ribose, assim como aqueles classificados como cetoses, tais como frutose, sorbose, e xilulose podem ser usados como agentes de não tonificação não iônicas nas composições reveladas no presente documento. Os dissacarídeos, tais como sacarose, maltose, trealose e lactose também podem ser usados. Além disso, os alditóis (álcoois poli-hidroxi acílicos, também denominados de álcoois de açúcar), tais como glicerol, manitol, xilitol e sorbitol são agentes de não tonificação não iônicas úteis nas composições reveladas no presente documento. Os agentes de modificação de tonicidade não iônicos podem estar presentes em uma concentração de cerca de 0,1% a cerca de 10% ou cerca de 1% a cerca de 10%, dependendo do agente que é usado. Caso os NLCs sejam formulados para administração parenteral, é preferencial fazer com que a osmolaridade da composição de NLC seja igual a fluidos fisiológicos normais, prevenindo consequências pós-administração, tais como inchaço pós-administração ou absorção rápida da composição.

[0322] De modo opcional, os NLCs podem ser formados com crioprotetores que compreendem trealose, sacarose, manitol,

sorbitol, Avicel PHI 02 (celulose microcristalina), Avicel RC591 (mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose de sódio), Mircrocelac® (mistura de lactose e Avicel) ou uma combinação dos mesmos. De modo opcional, os NLCs podem ser formados com um agente conservante tais como, por exemplo, Hidrólito 5.

VII. EMULSÕES ESTÁVEIS

[0323] Em algumas modalidades, emulsões estáveis são fornecidas, sendo que as emulsões estáveis compreendem um pelo menos um adjuvante. Os adjuvantes exemplificativos não limitativos que podem ser formulados com uma emulsão estável incluem agonistas de TLR3 e agonistas Rig-I. Os exemplos não limitativos de tais adjuvantes incluem RNA de dupla fita, RIBOXXOL, poli(I:C) e Hiltonol®.

[0324] Em algumas modalidades, a emulsão estável (SE) é uma emulsão de óleo em água. Em algumas dessas modalidades, a emulsão de óleo em água é uma emulsão de esqualeno em água. Em algumas modalidades, uma emulsão compreende um antioxidante, tal como alfa-tocoferol (vitamina E, consultar, por exemplo, EP 0 382 271 B1). O documento nº WO 95/17210 e WO 99/11241 discute emulsões com base em esqualeno, alfa-tocoferol e TWEEN® 80. O documento nº WO 99/12565 discute um aprimoramento a essas emulsões de esquelano com adição de um esterol na fase de óleo.

[0325] O documento nº WO08/153541 discute emulsões de óleo em água como tendo convencionalmente quantidades dos componentes presentes na faixa de 2 a 10% de óleo, tal como esqualeno; e quando presente, de 0,01 a 0,1% de alfa-tocoferol; e de 0,3 a 3 % de um tensoativo, tal como mono-oleato de sorbitano de poli oxi etileno ou Poloxâmero 188 (copolímero de poli oxi etileno e polioxipropileno). A razão entre óleo:tensoativo pode igual ou inferior a 1 para aprimorara a estabilidade da emulsão. O Span 85 também pode estar presente a um nível de cerca de 1 %. Em alguns casos, pode ser vantajoso que as vacinas contenham adicionalmente

um estabilizante. Em uma modalidade, o estabilizante pode ser um triglicerídeo, tal como tricaprilna ($C_{27}H_{50}O_6$) (consultar, por exemplo, o documento nº WO 98/56414). Em algumas modalidades, uma emulsão de óleo em água compreende 0,5% a 5% ou 0,5% a 5% ou 0,5% a 3% ou 1% a 3% de glicerol. Em algumas modalidades, uma emulsão de óleo em água compreende 0,5% a 5%, ou 0,5% a 5%, ou 0,5% a 3%, ou 1% a 3% 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC). Uma emulsão de óleo em água exemplificativa não limitativa é discutida nos exemplos no presente documento.

[0326] Os tamanhos das gotículas de óleo encontradas dentro da emulsão de óleo em água estável são, de preferência, inferiores a 1 mícron, podem ter o diâmetro substancialmente de 30 a 600 nm, de preferência, substancialmente aproximadamente 30 a 500 nm, e com máxima de preferência, substancialmente 150 a 500 nm de diâmetro e, em particular, cerca de 150 nm de diâmetro, conforme medido por espectroscopia de correlação de fótons. Nesse sentido 80% das gotículas de óleo, em número, devem ser abrangidas pelas faixas preferenciais, com mais preferência, mais de 90% e, com máxima preferência, mais de 95% das gotículas de óleo em número são abrangidas pelas faixas de tamanho definidas. As quantidades dos componentes presentes nas emulsões de óleo da presente invenção estão convencionalmente na faixa de 2 a 10% óleo, tal como esqualeno; e quando presente, de 2 a 10% alfa-tocoferol; e de 0,3 a 3% de tensoativo, tais como polioxietileno mono-oleato de sorbitano. De preferência, a razão entre óleo:alfa-tocoferol é maior que 1, uma vez que isso fornece uma emulsão mais estável. O Span 85 também pode estar presente a um nível de cerca de 1 %. Em alguns casos, pode ser vantajoso que as vacinas da presente invenção conterão adicionalmente um estabilizante.

[0327] Os métodos para produzir emulsões de óleo em água são bem conhecidos pela pessoa versada na técnica. Comumente, o método compreende a mistura da fase de óleo com um tensoativo, tal como uma solução de PBS/TWEEN80®, seguida por homogeneização com o uso de um

homogeneizador. Por exemplo, um método que compreende passar a mistura uma vez, duas ou vezes ou mais vezes através de uma agulha de seringa é adequado para homogeneizar pequenos volumes de líquido. De igual modo, o processo de emulsificação em um microfluidizador (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 passagens, por um período de 2 minutos em uma entrada de pressão máxima de 6 bar (pressão de saída de cerca de 850 bar)) pode ser adaptado para produzir volumes menores ou maiores de emulsão. Essa adaptação pode ser obtida por experimentos comuns que compreendem a medição da emulsão resultante até que uma preparação tenha sido obtida com gotículas de óleo do diâmetro exigido.

VIII. MÉTODOS PARA USAR AS COMPOSIÇÕES DA PRESENTE REVELAÇÃO

A. TERAPÊUTICOS

[0328] Em algumas modalidades, o agente é útil para fins terapêuticos. Desse modo, em algumas modalidades, as composições descritas compreendem os NLCs fornecidos no presente documento e compreendem adicionalmente um agente bioativo para o tratamento de uma doença, afecção ou transtorno.

[0329] Em algumas modalidades, o agente é útil para o tratamento ou prevenção de alergia, câncer, doença infecciosa, autoimunidade ou adição. Em algumas modalidades, o agente é útil para estimular, intensificar e/ou modular uma resposta imunológica.

[0330] Em alguns aspectos das modalidades reveladas, as composições compreendem câncer antígenos ou ácidos nucleicos que codificam o antígeno de câncer. Em algumas modalidades, uma composição de vacina compreende um antígeno de câncer será útil contra qualquer câncer caracterizado por expressão de antígeno associada a tumor, tal como a expressão HER-2/neu ou outros antígenos câncer-específicos ou associados a câncer.

[0331] As composições e métodos, de acordo com

determinadas modalidades da presente revelação também podem ser usadas para a profilaxia ou terapia de doenças autoimunes, o que inclui doenças, afecções ou transtornos em que um sistema imunológico do hospedeiro ou do indivíduo medida de maneira prejudicial uma resposta imunológica que é direcionada contra “tecidos próprios, células, biomoléculas (por exemplo, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, proteolipídeos, lipídeos, glicolipídeos, ácidos nucleicos, tais como RNA e DNA, oligossacarídeos, polissacarídeos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos ou semelhantes, e outros componentes moleculares das células e tecidos dos indivíduos) ou epítopos (por exemplo, estruturas de reconhecimento definidas imunologicamente específicas, tais como reconhecidas por uma região de determinação da complementaridade variável de anticorpo (CDR) ou por um receptor de célula de T CDR.

[0332] As doenças autoimunes são, então, caracterizadas por uma resposta imunológica anormal que envolve ou células ou anticorpos que, em todo caso, são direcionados contra tecidos autólogos normais. As doenças autoimunes em mamíferos podem ser classificadas de modo geral em uma das dentre duas categorias: doenças mediadas por célula (isto é, célula T) ou transtornos mediados por anticorpo. Os exemplos não limitativos de doenças autoimunes mediadas por célula incluem esclerose múltipla, artrite reumatoide, tiroidite de Hashimoto, diabetes mellitus do tipo I (diabetes com início na infância) e uvoretinite autoimune. Os transtornos autoimunes medidos por anticorpo incluem, porém sem limitação miastenia grave, lúpus sistêmico eritematoso (ou SLE), doença de Graves, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune, asma autoimune, crioglobulinemia, púrpura trombocitopênica trômbica, esclerose biliar primária e anemia perniciosa. O antígeno (ou antígenos) associados a lúpus sistêmico eritematoso é uma proteína de ácido ribonucleico nuclear pequena (snRNP); a doença de Graves é o receptor tirotipoina, tiroglobulina e outros componentes de células epitelial tiroide; pênfigo é antígenos de pênfigo tipo caderina, tais como

desmogleína-3 e outras moléculas de adesão; e Púrpura trombocitopênica trômbica são antígenos de plaquetas.

[0333] As composições fornecidas no presente documento podem ser usadas para induzir imunidade protetora, por exemplo, contra tuberculose, incluem o uso de polipeptídeos que contêm pelo menos uma porção imunogênica de uma ou mais de proteínas de Micobactéria e moléculas de DNA e de RNA que codificam polipeptídeos. Além disso, tais compostos podem ser formulados em vacinas e/ou composições farmacêuticas para imunização contra infecção por Micobactéria.

[0334] Em outras modalidades, as composições da presente revelação incluem antígenos associados a doenças respiratórias, tais como aquelas causadas ou exacerbadas por infecção bacteriana (por exemplo, pneumocócia), para a profilaxia e terapia de afecções, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD).

[0335] Além dos procedimentos diretos *in vivo*, procedimentos *ex vivo* podem ser usados nos quais as células são removidas de um hospedeiro, modificadas e colocadas no mesmo ou em outro animal hospedeiro. Ficará evidente que é possível utilizar quaisquer uma das composições observadas acima para a introdução de moléculas de ácido nucleico que codificam antígeno em células de tecido em um contexto *ex vivo*. Os protocolos para métodos virais, físicos e químicos de absorção são bem conhecidos na técnica.

[0336] Em algumas modalidades, as composições da presente revelação são usadas para reforçar ou intensificar uma resposta imunológica em um indivíduo. Em algumas dessas modalidades, o agente bioativo é um adjuvante. Os adjuvantes exemplificativos não limitativos incluem agonistas de TLR (incluindo agonistas de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9), agonistas de Rig-I, saponinas, carbo-hidratos, polímeros de carbo-hidrato, carbo-hidratos conjugados, partículas virais inteiras, partículas tipo vírus, fragmentos virais e fragmentos celulares. Os exemplos de tais adjuvantes

incluem, porém sem limitação RNA de dupla fita, RIBOXXOL, poli(I:C) e Hiltonol®. Em algumas modalidades, a composição compreende uma emulsão estável e/ou um carreador de lipídeo nanoestruturado. Em algumas modalidades, a composição compreende uma emulsão estável e/ou um carreador de lipídeo nanoestruturado que compreende esqualeno. Os presentes inventores constataram que as formulações com base em esqualeno potencializam inesperadamente, por exemplo, os agonistas de TLR3.

[0337] Em alguns aspectos preferenciais, as composições da presente revelação são úteis para intensificar ou elicitar, em um hospedeiro, um paciente ou na cultura celular, uma resposta imunológica. Conforme usado no presente documento, o termo "indivíduo" se refere a qualquer mamífero. Um paciente pode estar sofrendo com uma doença infecciosa, câncer, tal como câncer de mama ou uma doença autoimune ou pode ser normal (isto é, livre de doença detectável e/ou infecção). A "cultura celular" é qualquer preparação contém células T imunocompetentes ou células isoladas do sistema imunológico (incluindo, porém sem limitação, células T, macrófagos, monócitos, células B e células dendríticas). Tais células podem ser isoladas por qualquer uma dentre uma variedade de técnicas bem conhecidas pelas pessoas versadas na técnica (por exemplo, centrifugação de densidade Ficoll-hypaque). As células podem (porém não necessariamente) ter sido isoladas de um paciente que sofre com câncer e podem ser reintroduzidas em um paciente após o tratamento.

B. VACINA

[0338] A presente revelação fornece, então, composições para alterar (isto é, aumentar ou diminuir de maneira significativamente estatística, por exemplo, em relação a um controle apropriado conforme será familiar para as pessoas versadas na técnica) respostas imunológicas em um hospedeiro com capacidade para montar uma resposta imunológica. Conforme será observado pelas pessoas de habilidade comum na técnica, uma resposta imunológica pode ser qualquer alteração ativa da situação

imunológica de um hospedeiro, o que pode incluir qualquer alteração na estrutura ou função de um ou mais tecidos, órgãos, células ou moléculas que participam da manutenção e/ou regulação da situação imunológica de hospedeiro. Tipicamente, as respostas imunológicas podem ser detectadas por vários parâmetros bem conhecidos, incluindo porém sem limitação determinação *in vivo* ou *in vitro* de: imunoglobulinas ou anticorpos solúveis; mediadores solúveis, tais como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormônios, fatores de crescimento e semelhantes assim como outro peptídeo pequeno solúvel, carbo-hidrato, mediadores de nucleotídeo e/ou lipídeo; mudanças de estado de ativação celular, conforme determinado por propriedades estruturais ou funcionais alteradas de células do sistema imunológico, por exemplo, proliferação celular, motilidade alterada, indução de atividades especializadas, tias como expressão de gene específico ou comportamento citolítico; diferenciação celular por células do sistema imunológico, incluindo perfis alterados de expressão de antígeno de superfície ou o início de apoptose (morte celular programada); ou qualquer outro critério pelo qual a presença de uma resposta imunológica pode ser detectada.

[0339] A determinação da indução de uma resposta imunológica pelas composições da presente revelação pode ser estabelecida por qualquer um dentre vários ensaios imunológicos bem conhecidos com os quais as pessoas de habilidade comum na técnica estarão prontamente familiarizadas. Tais ensaios incluem, porém sem limitação, determinação *in vivo* ou *in vitro* de: imunoglobulinas ou anticorpos solúveis; mediadores solúveis, tais como citocinas, linfocinas, quimiocinas, hormônios, fatores de crescimento e semelhantes assim como outro pequeno peptídeo solúvel, carbo-hidrato, mediadores de nucleotídeo e/ou lipídeo; mudanças de estado de ativação celular, conforme determinado por propriedades estruturais ou funcionais alteradas de células do sistema imunológico, por exemplo, proliferação celular, motilidade alterada, indução de atividades especializadas, tias como expressão de gene específico ou comportamento citolítico; diferenciação celular por células

do sistema imunológico, incluindo perfis alterados de expressão de antígeno de superfície ou o início de apoptose (morte celular programada). Os procedimentos para realizar esses ensaios e ensaios semelhantes são amplamente conhecidos e podem ser encontrados, por exemplo, em Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998; consultar, também, Current Protocols in Immunology; consultar também, por exemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986 Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell e Shigii (edições) Selected Methods in Cellular Immunology, 1979 Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green and Reed, 1998 Science 281:1309 e referências citadas no mesmo.).

[0340] A detecção da proliferação de células T antígeno-reativas pode ser realizada por várias técnicas conhecidas. Por exemplo, a proliferação de célula T pode ser detectada medindo-se a taxa de síntese de DNA, e a especificidade de antígeno pode ser determinada controlando-se os estímulos (tais como, por exemplo, células específicas que apresentam antígeno pulsado por controle de antígeno ou de antígeno desejado) aos quais as células T antígeno-reativas canditadas são expostas. As células T que foram estimuladas para proliferar exibem uma taxa aumentada de síntese de DNA. Um modo típico de medir a taxa de síntese de DNA é, por exemplo, por culturas de marcação de pulso de células T com timidina tritiada, um precursor de nucleotídeo que é incorporado em um DNA sintetizado recentemente. A quantidade de timidina tritiada incorporada pode ser determinada com o uso de um espectrofotômetro de cintilação líquida. Outros modos de detectar a proliferação de célula T incluem medir os aumentos na produção de interleucina-2 (IL-2), Ca2+ fluxo ou absorção de corante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazpólio. Alternativamente, a síntese de linfocinas (tais como interferon-gama) pode ser medida ou o número relativo de células T que pode responder a um antígeno particular pode ser quantificada.

[0341] A detecção da produção de anticorpo antígeno-específico pode ser obtida, por exemplo, submetendo-se a ensaio uma

amostra (por exemplo, uma amostra que contém imunoglobulina, tal como soro, plasma ou sangue) de um hospedeiro tratado com uma vacina de acordo com a presente revelação com o uso de metodologias *in vitro*, tais como radioimunoensaio (RIA), ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), diálise de equilíbrio ou imunoblotting de fase sólida incluindo Western blotting. Nas modalidades, os ELISA podem incluir adicionalmente imobilização por captura de antígeno do antígeno-alvo com um anticorpo monoclonal em fase sólida específico para o antígeno, por exemplo, a fim de intensificar a sensibilidade do ensaio. A elaboração de mediadores solúveis (por exemplo, citocinas, quimiocinas, linfocinas, prostaglandinas etc.) também pode ser prontamente determinada por ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), por exemplo, com o uso de métodos, aparelho e reagentes que estão prontamente disponíveis das fontes comerciais (por exemplo, Sigma, St. Louis, MO; consultar também R & D Systems 2006 Catalog, R & D Systems, Minneapolis, MN).

[0342] Qualquer número de parâmetros imunológicos pode ser monitorado com o uso dos ensaios costumeiros que são bem conhecidos na técnica. Estes incluem, por exemplo, ensaios de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), respostas de anticorpo *in vitro* secundárias, análise imunocitofluorimétrica de fluxo de várias subpopulações de células mononucleares de sangue periférico ou linfoides com o uso de sistema de antígeno de marcador bem estabelecido, imunoistoquínica ou outros ensaios relevantes. Esses e outros ensaios podem ser encontrados, por exemplo, em Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunol og, 5ª Edição, 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC.

[0343] De modo correspondente, contempla-se que as composições fornecidas no presente documento poderão elicitar ou intensificar em um hospedeiro pelo menos uma resposta imunológica que é selecionada a partir da resposta de linfócito T do tipo Th1, uma resposta de linfócito T do TH2, uma resposta de linfócito T (CTL) citotóxica, uma resposta de

anticorpo, uma resposta de citocina, uma resposta de linfocina, uma resposta de quimiocina e uma resposta inflamatória. Em determinadas modalidades, a resposta imunológica pode compreender pelo menos um dentre produção citocinas em que a citocina é selecionada a partir de interferon-gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), produção de uma dentre uma pluralidade de interleucinas em que a interleucina é selecionada a partir de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e IL-23, produção uma dentre uma pluralidade de quimiocinas em que a quimiocina é selecionada a partir de MIP-Iα, MIP-1β, RANTES, CCL2,CCL4, CCL5, CXCL1 e CXCL5 e uma resposta de linfócito que é selecionada a partir de uma resposta de célula T de memória, uma resposta de célula B de memória, uma resposta de célula T efetora, uma resposta de célula T citotóxica e uma resposta de célula B efetora.

C. AGENTES DE DIAGNÓSTICO

[0344] Em algumas modalidades, o agente bioativo é um agente de diagnóstico. Desse modo, nessas modalidades, as composições descritas compreendem o NLC fornecido no presente documento e compreende adicionalmente um agente diagnóstico e são úteis para o diagnóstico de qualquer doença, afecção ou transtorno.

[0345] Em algumas modalidades, os agentes diagnósticos são úteis para a detecção de câncer. No presente documento são descritas as composições e métodos são conhecidas na técnica para identificar os indivíduos que têm ou que suspeitam de que correm o risco de desenvolver câncer. O diagnóstico de câncer em um indivíduo que tem, ou que suspeita de que corre risco de ter câncer, pode ser realizado por qualquer uma dentre a ampla faixa de metolodias aceitas na técnica, o que pode variar dependendo da variedade de fatores incluindo apresentação clínica, grau de progressão do câncer, o tipo de câncer e outros fatores.

[0346] Os exemplos de diagnósticos de câncer incluem exame histopatológico, histocitocquímico, imuno-histocitoquímico e

imuno-histopatológico de amostras de pacientes (por exemplo, sangue, biópsia da pele, outra biópsia de tecido, espécies cirúrgicos etc.), testes de PCR para marcadores genéticos definidos (por exemplo, ácido nucleico), testes sorológicos para circular antígenos ou células que portam tais antígenos ou para anticorpos de especificidade, ou outras metodologias com as quais as pessoas versadas na técnica estarão familiarizadas.

[0347] Em algumas modalidades, os agentes de diagnóstico são úteis para a detecção de uma doença autoimune. A detecção de um autoanticorpo permite, então, a descoberta ou reconhecimento precoce da presença ou risco para desenvolver uma doença autoimune. Com base nessas constatações, uma variedade de autoanticorpos contra autoantígenos foram descobertas, e os autoanticorpos contra autoantígenos foram medidos em testes clínicos.

[0348] Em uma modalidade, os agentes diagnósticos são úteis para a detecção de doenças infecciosas. As composições e métodos são conhecidas na técnica para identificar indivíduos que têm, ou que suspeitem de correr o risco de ter, uma infecção com um patógeno infeccioso, conforme descrito no presente documento.

[0349] Por exemplo, um caso de tuberculose pela bactéria Micobactéria (TB). Desse modo, em algumas modalidades, as composições que compreendem qualquer dentre os NLCs descritos no presente documento compreendem adicionalmente um agente para diagnosticar tuberculose.

[0350] Em algumas modalidades, as composições que compreendem qualquer um dentre os NLCs descritos no presente documento compreendem adicionalmente um agente para diagnosticar malária.

[0351] Foram descritos os polinucleotídeos na técnica que codificam antígenos de peptídeo malárico de P. vivax espécie-específico que são proteínas ou fragmentos de proteínas secretadas no plasma de um hospedeiro mamífero suscetível após infecção, como tendo anticorpos

monoclonais ou policlonais direcionados para esses antígenos. Os antígenos, anticorpos monoclonais, e/ou anticorpos policlonais de peptídeo são utilizados nos ensaios usados para diagnosticar malária, assim como determinar se Plasmodium vivax é a espécie responsável pela infecção. Forma relatados, também, os antígenos de peptídeo malárico de P. vivax espécie-específico que são proteínas ou fragmentos de proteínas secretadas no plasma de um hospedeiro mamífero suscetível após infecção, como tendo anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados para esses antígenos. Os antígenos, anticorpos monoclonais, e/ou anticorpos policlonais de peptídeo são utilizados nos ensaios usados para diagnosticar malária, assim como determinar se Plasmodium vivax é a espécie responsável pela infecção.

[0352] Um ectodomínio de Plasmodium falciparum (3D7) AMA-1 recombinante também foi expresso por um método que produz uma proteína altamente purificada que retém dobra e ligação em ponte de bissulfeto da molécula nativa. O AMA-1 recombinante é útil como um reagente diagnóstico, para uso na produção de anticorpo, e como uma vacina. Conhecidos semelhantemente são a expressão e purificação de um Plasmodium falciparum (3D7) MSP-142 recombinante que retém dobra e ligação em ponte de bissulfeto da molécula nativa. O MSP-142 recombinante é útil como um reagente diagnóstico, para uso na produção de anticorpo, e como uma vacina.

[0353] Em algumas modalidades, as composições que compreendem qualquer um dentre os NLCs descritos no presente documento compreendem adicionalmente um agente útil para diagnóstica Leishmaniasis.

[0354] Em algumas modalidades, as composições que compreendem qualquer um dentre os NLCs descritos no presente documento compreendem adicionalmente um agente útil para diagnosticar HIV.

IX. MÉTODOS PARA GERAR UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

[0355] No presente documento são fornecidos

métodos para gerar uma resposta imunológica em um indivíduo, incluindo a etapa de administrar a um indivíduo com necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição descrita no presente documento, em que o agente bioativo é um antígeno de proteína ou uma molécula de ácido nucleico que codifica um antígeno de proteína. Em modalidades exemplificativas, o agente bioativo é um RNA (por exemplo, mRNA) ou uma molécula de DNA que codifica um antígeno de proteína. Em algumas modalidades, os métodos para reforçar ou intensificar uma resposta imunológica são fornecidos, em que o agente bioativo é um adjuvante.

[0356] Rotas típicas de administração da quantidade terapeuticamente eficaz da composição incluem, sem limitação, oral, tópica, parenteral, sublingual, bocal, retal, vaginal, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intramucosa ou subcutânea. Em algumas modalidades exemplificativas, a administração da composição é intramuscular, ocular, parenteral ou pulmonar.

[0357] Em modalidades exemplificativas, as composições reveladas no presente documento são composições de vacina e são usadas como vacinas. As composições descritas no presente documento podem ser usadas para gerar uma resposta imunológica no indivíduo (incluindo uma resposta não específica e uma resposta antígeno-específica). Em algumas modalidades, a resposta imunológica compreende uma resposta imunológica sistêmica. Em algumas modalidades, a resposta imunológica compreende uma resposta imunológica mucosa. A geração de uma resposta imunológica inclui estimular uma resposta imunológica, reforçar uma resposta imunológica ou intensificar uma resposta imunológica.

[0358] As composições descritas no presente documento podem ser usadas para intensificar a imunidade protetora contra um vírus. Tais vírus e antígenos virais incluem, por exemplo, HIV-1, (tais como tat, nef, gp120 ou gp160), vírus do herpes humano (tais como, gD ou derivados dos mesmos ou proteína precoce imediata, tais como ICP27 de HSV1 ou HSV2),

citomegalovírus ((esp. Humano)(tais como gB ou derivados dos mesmo), Rotavírus (incluindo vírus atenuado), vírus Epstein Barr (tal como gp350 ou derivados do mesmo), vírus Varicela-Zóster (tal como gpl, II e IE63) ou de um vírus da hepatite, tal como vírus da hepatite B (por exemplo, antígeno de Superfície Hepatite B ou um derivado do mesmo), vírus da hepatite A, vírus da hepatite C e vírus da hepatite E ou de outros patógenos virais, tais como paramixovírus: vírus Sincial Respiratório (tal como proteínas F e G ou derivados das mesmas), vírus parainfluenza, vírus do sarampo, vírus de caxumba, vírus do papiloma humano (por exemplo HPV6, 11, 16, 18, etc.), flavivírus (por exemplo, vírus do dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus de febre amarela, Zika vírus, vírus Poswanan, vírus da encefalite transportado por carrapato) ou vírus influenza (vírus inteiro vivo ou inativado, vírus influenza dividido, cultivado em ovos ou células MDCK ou virossomas da gripe inteiros (conforme descrito por Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920) ou proteínas purificadas ou recombinantes dos mesmos, tais como HA,P ou M proteínas, ou combinações dos mesmos).

[0359] As composições descritas no presente documento podem ser usadas para intensificar a imunidade protetora contra um ou mais patógenos bactericidas, tais como *Neisseria spp,* incluindo *N. geneorreia* e *N. meningitidis* (por exemplo, polissacarídeos capsulares e conjugados dos mesmos, proteínas de ligação de transferrina, proteínas de ligação a lactoferrina, PilC, adesinas); *S. pyogenes* (por exemplo, *M proteínas* ou fragmentos dos mesmos, C5A protease, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae, S. mutans: H. ducreyi; Moraxella spp,* incluindo *M. catarrhalis*, também conhecido como Branhamella catarrhalis (por exemplo adesinas e invasinas de alto e baixo peso molecular); *Bordetella spp,* incluindo *B. pertussis* (por exemplo, pertactina, toxina pertíssis ou derivados da mesma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbriae), *B. parapertussis e B. bronchiseptica; Mycobacterium spp.*, incluindo *M. tuberculosis* (por exemplo, ESAT6, antígeno 85 A, -B ou -C), *M. bovis, M. leprae, M. avium, M. paratuberculosis, M. smegmatis; Legionella spp,* incluindo *L. pneumophila; Escherichia spp,* incluindo *E. coli* enterotóxica (por exemplo,

fatores de colonização, toxina lábil a calor ou derivados da mesma, toxina estável ao calor ou derivados da mesma), *E. coli* entero-hemorrágica, *E. coli* enteropatogênica (por exemplo, toxina tipo shiga ou derivados da mesma); *Vibrio spp*, incluindo *V. cholera* (por exemplo, toxina colera ou derivados da mesma); *Shigella spp*, incluindo *S. sonnei, S. dysenteriae, S. flexnerii; Yersinia spp*, incluindo *Y. enter ocolitica* (por exemplo, uma proteína Yop), *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis; Campylobacter spp,* incluindo *C. jejuni* (por exemplo, toxinas, adesinas e invasinas) e *C. coli; Salmonella spp,* incluindo *S. typhi, S. paratyphi, S. choleraesuis, S. enteritidis; Listeria spp.*, incluindo *L. monocitogenes*; *Helicobacter spp*, incluindo *H. pylori* (por exemplo, urease, catalase, toxina de vacuolização); *Pseudomonas spp,* incluindo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp*., incluindo *S. aureus, S. epidermidis*; *Enter ococcus spp*., incluindo *E. faecalis, E.faecium; Clostridium spp.,* incluindo *C. tetani* (por exemplo, toxina do tétano e derivados da mesmo), C. botulinum (por exemplo, toxina do botulinum e derivado da mesma), C. difficile (por exemplo, toxinas Clostridium A ou B e derivados da mesma); Bacillus spp., incluindo B. anthracis (por exemplo, toxina do botulinum e derivados da mesma); *Corynebacterium spp.,* incluindo *C. diphtheriae* (por exemplo, toxina da difteria e derivados da mesma); *Borrelia spp.,* incluindo *B. burgdorferi* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por exemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. afzelii (por exemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. hermsii; *Ehrlichia spp*., incluindo *E. equi* e o agente da Erliciose Granulocítica Humana; *Rickettsia spp,* incluindo *R. rickettsii; Chlamydia spp.* incluindo *C. trachomatis* (por exemplo MOMP, proteínas de ligação a heparina), *C. pneumoniae* (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação a heparina), *C. psittaci; Leptospira spp.*, incluindo *L. interrogans; Treponema spp., incluindo T. pallidum* (por exemplo, as proteínas de membrana externas raras), T. denticola, T. hyodysenteriae; ou outros patógenos bactericidas.

[0360] As composições descritas no presente documento podem ser usadas para intensificar a imunidade de proteção contra

um ou mais parasitas (Consultar, por exemplo, John, D.T. e Petri, W.A., Markell e Voge's Medical Parasitology 9ª Edição, 2006, WB Saunders, Philadelphia; Bowman, D.D., Georgis' Parasitology for Veterinarians 8ª Edição, 2002, WB Saunders, Philadelphia), tais como *Plasmodium spp*., incluindo *P. falciparum; Toxoplasma spp., incluindo T. gondii* (por exemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.,* incluindo E. *histolytica; Babesia spp.,* incluindo *B. microti; Trypanosoma spp.*, incluindo T. cruzi; Giardia spp., incluindo G. lamblia; *Leshmania spp.*, incluindo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluindo P. carinii; *Trichomonas spp.*, incluindo *T. vaginalis*; ou de um verme com capacidade para infectar um mamífero, tal como: (i) infecções por nemátodo (incluindo, porém sem limitação, *Enterobius vermicularis, Ascaris lumbricoides, Trichuris trichuria, Necator americanus, Ancylostoma duodenale, Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Onchocerca volvulus, Dracanculus medinensis, Trichinella spiralis* e *Strongyloides stercoralis*); (ii) infecções por tremátodo (incluindo, porém sem limitação, *Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongi, Opisthorchis sinensis, Paragonimus sp, Fasciola hepatica, Fasciola magna, Fasciola gigantica*); e (iii) infecções por cestoda (incluindo, porém sem limitação, *Taenia saginata* e *Taenia solium*). Em determinadas modalidades, o antígeno é derivado da *Schisostoma spp.*, *Schistosoma mansonii, Schistosoma haematobium* e/*ou Schistosoma japonicum* ou derivado de levedura, tal como *Candida spp*., incluindo *C. albicans; Cryptococcus spp., incluindo C. neoformans*. de um patógeno infeccioso, tal como uma bactéria, um vírus ou um fungo, incluindo uma Actinobactária, tal como *M. tuberculosis* ou *M. leprae* ou outra Micobactéria; uma bactéria, tal como um membro do gênero *Salmonella, Neisseria, Borrelia, Chlamydia ou Bordetella*; um vírus, tal como um vírus do herpes simples, um vírus da imunodeficiência humana (HIV), um vírus imunodeficiência felina (FIV), citomegalovírus, vírus Varicela-Zóster, vírus da hepatite, vírus Epstein Barr (EBV), Zika vírus (ZIKV) vírus sincial respiratório, vírus do papiloma humano (HPV) e a citomegalovírus; HIV tal como HIV-1 ou HIV-2; um fungo, tal como *Aspergillus, Blastomyces,*

Coccidioides e Pneumocysti ou uma levedura, incluindo espécie *Candida*, tal como *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. lusitaniae, C. tropicalis e C. parapsilosis*; um parasita como um protozoário, por exemplo, um espécie de Plasmódio incluindo P*. falciparum, P. vivax, P. malariae e P. ovale*; ou outro parasita, tal como um ou mais dentre Acanthamoeba, *Entamoeba histolytica, Angiostrongylus, Schistosoma mansonii, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Cryptosporidium, Ancylostoma, Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba polecki, Wuchereria bancrofti, Giardia* e *Leishmania*.

[0361] Os métodos para determinar se uma composição da presente invenção pode entregar com eficácia o agente bioativo e/ou se tem efeito desejado em um indivíduo são conhecidos na técnica e não são descritos detalhadamente no presente documento. Em um aspecto, as respostas imunológicas contra um antígeno podem ser determinadas monitorando-se o nível do anticorpo antígeno-específico antes e após administração (por exemplo, IgM, IgG sistêmico (IgG1, IgG2a, et al.) ou IgA) em amostras de sangue ou de sítios mucosos. As respostas celulares imunológicas também podem ser monitoradas após a administração avaliando-se a função de célula T e B após o estímulo do antígeno.

[0362] Outra maneira de avaliar o imunogeneicidade das composições ou vacinas reveladas no presente documento em que a molécula de ácido nucleico (por exemplo, o RNA) codifica um antígeno de proteína é expressar o antígeno de proteína recombinante para triar soros de paciente ou secreções mucosas por immunoblot e/ou micrarranjos. Uma reação positiva entre a proteína e a amostra de paciente indica que o paciente tem montado uma resposta imunológica à proteína em questão. Esse método também pode ser usado para identificar antígenos imunodominantes e/ou epítopos dentro de antígenos.

[0363] A eficácia das composições também pode ser determinada *in vivo* desafiando-se modelos animais adequados da infecção por

patógeno de interesse.

[0364] Nas modalidades fornecidas no presente documento, o indivíduo é um mamífero (por exemplo, um animal incluindo animais de fazendo (vacas, porcos, cabras, cavalos etc.), animais de estimação (gatos, cachorros etc.) e roedores (ratos, camundongos etc.), ou um ser humano). Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano. Em outra modalidade, o indivíduo é um mamífero não humano. Em outra modalidade, o mamífero não humano é um cachorro, vaca ou cavalo.

X. MÉTODOS PARA ENTREGAR UM AGENTE BIOATIVO A UMA CÉLULA

[0365] No presente documento são fornecidos métodos para entregar um agente bioativo a uma célula, incluindo a etapa de entrar em contato com a célula com uma composição descrita no presente documento. Em algumas modalidades, o agente bioativo é um ácido nucleico. Em algumas modalidades, o contato da célula com a composição inclui uma etapa de administrar a composição a um indivíduo em que a célula está no indivíduo. Tais métodos são úteis na entrega do antígeno ou de ácidos nucleicos que codificam antígenos para geração de uma resposta imunológica. Tais métodos são úteis para a entre de ácidos nucleicos que codificam anticorpo, proteína ou fármacos de molécula pequena, hormônios, moléculas de RNA de não codificação e outros agentes bioativos para tratamento de doença e condições de saúde.

[0366] Os métodos descritos no presente documento para entregar um agente bioativo a uma célula podem ser úteis no tratamento de doenças e condições de saúde, incluindo, sem limitação, câncer, tais como meningiomas, carcinoma de célula hepática, tumores pancreáticos; alergia; doenças infecciosas doenças fúngicas, bacterianas ou parasíticas; doenças inflamatórias incluindo psoríase e artrite e malformação atrial-ventricular; doenças autoimunes; e doenças neurológicas.

[0367] Em modalidades dos métodos para entregar

uma composição a una célula incluindo a etapa de administrar a composição a um indivíduo em que a célula está no indivíduo, rotas típicas de administração da quantidade terapeuticamente eficaz da composição incluem, sem limitação, oral, topical, parenteral, sublingual, bucal, retal, vaginal, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intramucosa ou subcutânea. Em modalidades preferenciais, a administração da composição é intramuscular, parenteral ou intradérmica. Em tais modalidades, o indivíduo é um mamífero (por exemplo, um animal incluindo animais de fazendo (vacas, porcos, cabras, cavalos etc.), animais de estimação (gatos, cachorros etc.) e roedores (ratos, camundongos etc.), ou um ser humano). Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano. Em outra modalidade, o indivíduo é um mamífero não humano. Em outra modalidade, o mamífero não humano é um cachorro, vaca ou cavalo.

[0368] Em algumas modalidades, múltiplos modos de entrega podem ser usados para obter melhor resposta imunológica. Por exemplo, a composição pode ser administrada 1, 2, 3 ou 4 vezes. Em algumas modalidades, a uma ou mais administrações podem ocorrer como parte de um então chamado protocolo de “reforço inicial”. Em algumas modalidades, a abordagem "reforço inicial" compreende administração em diversos estágios que apresentam o mesmo antígeno através de diferentes vetores ou múltiplas doses. Em algumas modalidades, a administração pode ocorrer mais de duas vezes, por exemplo, três vezes, quatro vezes etc., de modo que a primeira administração de iniciação seja seguida por mais de uma administração de reforço. Quando múltiplos vetores ou doses são administrados, estes podem ser separados um do outro, por exemplo, por uma semana, duas semanas, três semanas, um mês, dois meses, três meses, seis meses, um ano ou mais. Em algumas modalidades, uma abordagem de reforço inicial compreende um estágio de RNA e um estágio de proteína. O estágio de RNA pode incluir, por exemplo, administração de RNA que porta uma codificação de gene para a proteína antigênica, tradução do RNA no antígeno e produção dos anticorpos correspondentes no indivíduo. O estágio de proteína pode incluir, por exemplo,

administração do antígeno diretamente na forma de uma proteína. Em algumas modalidades, o indivíduo é administrado (por exemplo, iniciado com) um vírus oncolítico (que pode ser formulado com um NLC ou sem um NLC) que codifica um neoantígeno e, em seguida, administrado subsequentemente (por exemplo, reforçado com) um NLC que compreende um construto de RNA que codifica o neoantígeno.

XI. ENTREGA INTRADÉRMICA DE RNA (OPCIONALMENTE POR MEIO DE MICRONJET600™)

[0369] O MicronJet600® é um dispositivo de plástico pequeno equipado com 3 microagulhas, cada uma com 600 micrômetros (0,6 mm) de comprimento. Esse dispositivo pode ser montado em qualquer seringa em vez de uma agulha padrão. As microagulhas, por si só, são produzidas a partir de cristal de silicone e são integradas (ligadas) após cortar em fileiras sua base de policarbonato com o uso de cola curada por UV biocompatível.

[0370] A entrega intradérmica pode ser conduzida pelo uso de microagulhas, com altura menor que 1 mm ou 1.000 mícrons; e com mais preferência, com altura de 500 a 750 mícrons.

[0371] O dispositivo de injeção por microagulhas tem, de preferência, múltiplas agulhas, tipicamente 3 microagulhas

[0372] O dispositivo de injeção de microagulhas está voltado "para baixo" (chanfro para baixo) isto é, a abertura de injeção é inserida mais afundo na pele e não com chanfro para cima. Isso possibilita uma injeção confiável sem vazamento. A orientação de injeção é definida, de preferência, por recursos visíveis mecânicos da base/adaptador.

[0373] A injeção de microagulhas é feita em na derme rasa, e na epiderme. Isso permite a expressão e imunização eficaz.

[0374] A profundidade de injeção com uma microagulha é tipicamente cerca de 100 a 750 mícrons, e, com mais preferência, cerca de 300 a 400 mícrons. Isso é contrário a agulhas regulares ou outras mini ou microagulhas que entrega tipicamente a uma camada mais profunda da pele

ou abaixo da pele.

[0375] O ângulo de injeção é, de preferência, cerca de 45 graus (tipicamente ±20º e, com mais preferência, ±10º), o que permite o ponto de injeção raso, em relação uma agulha padrão e outras microagulhas perpendiculares.

[0376] No presente documento é fornecido um sistema e método para entregar RNA incluindo rvRNA (RNA de replicon) em um animal ou paciente humano (por exemplo, um indivíduo) que compreende administrar o RNA (por exemplo, rvRNA) à epiderme ou à derme da pele a uma profundidade de entre cerca de 100 e cerca de 700 mícrons da superfície da pele. Uma quantidade eficaz de RNA será entregue para permitir a expressão de uma proteína codificada pelo RNA. A proteína pode ser um antígeno, conforme descrito no presente documento, e pode ser, por exemplo, um componente de vacina.

[0377] O RNA pode ser administrado com um dispositivo de entrega intradérmico que compreende uma ou mais microagulhas; em que o dispositivo de entrega intradérmico pé projetado para entrega intradérmica rasa.

[0378] O RNA pode ser administrado com um dispositivo de entrega intradérmico, de acordo com os ensinamentos dos documentos US6533949 e/ou US7998119, incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0379] Qualquer uma das que formulações e/ou composições que contêm RNA descritas no presente documento podem ser administradas por via interdérmica por meio de um dispositivo de microagulha, conforme descrito no presente documento. Outros dispositivos intradérmicos para entregar RNA também podem ser usados, incluindo, por exemplo, dispositivos de entrega eletroporação intradérmica. Em algumas modalidades preferenciais, a entrega do RNA gerará uma resposta imunológica em um indivíduo.

XII. MÉTODOS PARA OTIMIZAR A ENTREGA DE RNA A UMA CÉLULA

[0380] No presente documento são fornecidos métodos para otimizar a entrega de RNA a uma célula que compreende uma etapa de selecionar uma razão molar entre nitrogênio (N) e fosfato (P) que otimiza as titulações de anticorpo produzidas em um indivíduo que compreende a célula. Em uma modalidade exemplificativa, a real razão entre N e P é usada para fornecer uma interpretação da ligação de RNA-NLC e expressão *in vitro* correspondente da proteína codificada por RNA. A razão molar exemplificativa entre N a P pode ser 1 a 200, de 1 a 100, de preferência, de 1 a 50, com mais preferência, de cerca de 5 a cerca de 50 ou de cerca de 5 a cerca de 40. Em algumas modalidades exemplificativas, a molar razão entre N a P podem ser de 1 a 15 ou de 1 a 7.

XIII. KITS E ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

[0381] Em determinadas modalidades também são contemplados kits que compreende os carreadores de lipídeo (NLCs) nanoestruturados e composições descritos no presente documento, que podem ser fornecidos em uma ou mais recipientes. Em uma modalidade, todos os componentes das composições estão presentes juntos em um único recipiente. Em outras modalidades, os componentes das composições podem estar em dois ou mais recipientes. Em uma modalidade preferencial, o NLC é fornecido em um recipiente, e o agente bioativo é fornecido é outro recipiente.

[0382] Em algumas modalidades, um frasco do kit compreende um NLC fornecido no presente documento, e um segundo frasco do kit contém uma molécula de RNA. Em algumas modalidades, o kit compreende um terceiro frasco que contém um componente opcional.

[0383] Os kits da invenção podem compreender adicional instruções para uso conforme descrito no presente documento ou instruções para misturar os materiais contidos nos frascos. Em algumas modalidades, o material no frasco é seco ou liofilizado. Em algumas

modalidades, o material no frasco é líquido.

[0384] Um recipiente, de acordo com tais modalidades de kit, pode ser qualquer recipiente, vaso, frasco, ampola, tubo, xícara, caixa, garrafa, frasco, jarro, placa, poço de um aparelho de poço único ou de múltiplos poços, tanque de reservatório, tanque ou semelhantes ou outro dispositivo adequado no qual as composições descritas no presente documento podem ser colocadas, armazenadas e/ou transportadas e avaliadas para remover o conteúdo. Tipicamente, tal recipiente pode ser produzido a partir de um material que é compatível com o uso destinado e do qual a recuperação do conteúdo contido pode ser prontamente obtida. Os exemplos não limitativos de tais recipientes incluem tubos e ampolas de vidro e/ou vedado de plástico ou vedado novamente, incluindo aqueles que têm um septo de borracha ou outros meios de vedação que são compatíveis com a retirada do conteúdo com o uso de uma agulha ou seringa. Tais recipientes podem ser produzidos, por exemplo, a partir de vidro ou de um plástico ou resina quimicamente compatível que pode ser produzido ou revestido com um material que permite a recuperação eficiente do material do recipiente e/ou proteger o material, por exemplo, contra condições degradantes, tais como luz ultravioleta ou temperaturas extremas ou contra a introdução de contaminantes indesejados incluindo contaminantes microbianos. Os recipientes são, de preferência, estéreis ou esterilizáveis e produzidos a partir de materiais que serão compatíveis com qualquer carreador, excipiente, solvente, veículo ou semelhantes, tais como podem ser usados para suspender ou dissolver as composições de vacina e/ou composições adjuvantes imunológicas e/ou antígenos e/ou construtos de expressão recombinante etc., descritos no presente documento.

XIV. MODALIDADES EXEMPLIFICATIVAS

[0385] Modalidade 1. Uma composição que compreende partículas de carreador lipídico nanoestruturado (NLC) para entrega de um agente bioativo a uma célula, em que as partículas de NLC compreendem:

[0386] (a) um núcleo de óleo que compreende uma

mistura de um lipídio em fase líquida e um lipídio em fase sólida,

[0387] (b) um componente catiônico, preferencialmente um lipídio catiônico,

[0388] (c) um tensoativo hidrofóbico, preferencialmente um éster de sorbitano, e

[0389] (d) um tensoativo, preferencialmente um tensoativo hidrofílico.

[0390] Modalidade 2. A composição, de acordo com a modalidade 1 em que o agente bioativo é associado às partículas de NLC.

[0391] Modalidade 3. A composição, de acordo com a modalidade 1 ou modalidade 2, em que a composição entrega o agente bioativo à célula.

[0392] Modalidade 4. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 3, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o mesmo está presente em uma quantidade suficiente para aumentar a capacidade da composição de entregar o agente bioativo à célula conforme comparado a uma composição comparável sem o éster de sorbitano.

[0393] Modalidade 5. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 4, em que o agente bioativo é uma proteína ou o agente bioativo codifica uma proteína.

[0394] Modalidade 6. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 4, em que o agente bioativo é um antígeno de proteína ou o agente bioativo codifica um antígeno de proteína.

[0395] Modalidade 7. A composição, de acordo com a modalidade 6, em que a célula está em um sujeito e em que a composição elicita uma resposta imunológica no sujeito contra o antígeno.

[0396] Modalidade 8. A composição, de acordo com a modalidade 6 ou 7, em que o antígeno é derivado ou tem reatividade imunológica cruzada com um patógeno infeccioso e/ou um epítopo, biomolécula, célula ou tecido que é associado à infecção, câncer ou doença autoimune.

[0397] Modalidade 9. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 6 a 8, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano está presente em uma quantidade suficiente para aumentar a capacidade da composição para elicitar uma resposta imunológica ao antígeno conforme comparado a uma composição comparável sem o éster de sorbitano.

[0398] Modalidade 10. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 6 a 9, em que, quando administrada em uma quantidade eficaz ao sujeito, a composição elicita uma resposta imunológica ao antígeno igual ou maior do que a resposta imunológica elicitada quando o agente bioativo é administrado ao sujeito sem o NLC.

[0399] Modalidade 11. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 6 a 10, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e, quando administrado em uma quantidade eficaz ao sujeito, a composição elicita titulações de anticorpo ao antígeno em um nível maior do que as titulações de anticorpo elicitadas quando uma composição comparável desprovida do éster de sorbitano é administrada ao sujeito.

[0400] Modalidade 12. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 6 a 11, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e a composição induz anticorpo neutralizante titulações no sujeito em um nível maior do que o anticorpo neutralizante titulações induzidas no sujeito por uma composição comparável desprovida do éster de sorbitano.

[0401] Modalidade 13. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 12, em que o agente bioativo é RNA ou DNA.

[0402] Modalidade 14. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 12, em que o agente bioativo é mRNA.

[0403] Modalidade 15. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 12, em que o agente bioativo é RNA viral oncolítico.

[0404] Modalidade 16. A composição, de acordo com

a modalidade 13 ou 14, em que o RNA é um replicon.

[0405] Modalidade 17. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 13 a 16, em que o RNA codifica um antígeno.

[0406] Modalidade 18. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 13 a 16, em que o RNA codifica um anticorpo.

[0407] Modalidade 19. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 13 a 16, em que o RNA é um RNA não codificante.

[0408] Modalidade 20. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 19, em que o lipídio em fase líquida é metabolizável.

[0409] Modalidade 21. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20, em que o lipídio em fase líquida é um óleo vegetal, óleo animal ou óleo preparado sinteticamente.

[0410] Modalidade 22. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 21, em que o lipídio em fase líquida é um óleo de peixe.

[0411] Modalidade 23. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20 em que o lipídio em fase líquida é triglicerídeo cáprico/caprílico, vitamina E, polioxilglicerídeo de lauroíla, monoacilglicerol, lecitina de soja, esqualeno ou esqualano, ou uma combinação dos mesmos.

[0412] Modalidade 24. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 21, em que o lipídio em fase líquida é esqualeno, óleo de girassol, óleo de soja, azeite de oliva, óleo de caroço de uva, esqualano, triglicerídeo cáprico/caprílico ou uma combinação dos mesmos.

[0413] Modalidade 25. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 21, em que o lipídio em fase líquida é um tarpenoide de ocorrência natural ou sintético.

[0414] Modalidade 26. A composição, de acordo com

qualquer uma das modalidades 1 a 21, em que o lipídio em fase líquida é esqualeno.

[0415] Modalidade 27. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 26, em que o lipídio em fase sólida é um glicerolipídio.

[0416] Modalidade 28. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 26, em que o lipídio em fase sólida é um triglicerídeo microcristalino.

[0417] Modalidade 29. A composição, de acordo com a modalidade 28, em que o triglicerídeo microcristalino é trimiristina.

[0418] Modalidade 30. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 29, em que o componente catiônico é um lipídio catiônico selecionado dentre: 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), 3β-[N—(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (colesterol DC), dimetildioctadecilamônio (DDA), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamoniopropano (DMTAP), dipalmitoil(C16:0)trimetilamonio-propano (DPTAP), distearoiltrimetilamonio-propano (DSTAP), cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), cloreto de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamônio (DODAC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (DOEPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP) e 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), e combinações dos mesmos.

[0419] Modalidade 31. A composição, de acordo com a modalidade 30, em que o lipídio catiônico é 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP).

[0420] Modalidade 32. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 31, em que o tensoativo hidrofílico é um polietilenoglicol.

[0421] Modalidade 33. A composição, de acordo com a modalidade 32, em que o tensoativo hidrofílico é um éster de sorbitano de polioxietileno.

[0422] Modalidade 34. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 33, em que o índice médio de polidispersibilidade das partículas de NLC é de 0,1 a cerca de 0,5

[0423] Modalidade 35. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 33, em que o índice médio de polidispersibilidade das partículas de NLC é de cerca de 0,2 a cerca de 0,5.

[0424] Modalidade 36. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 33, em que o índice médio de polidispersibilidade das partículas de NLC é de cerca de 0,2 a cerca de 0,4 ou de cerca de 0,1 a cerca de 0,4.

[0425] Modalidade 37. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 33, em que o índice médio de polidispersibilidade das partículas de NLC é de cerca de 0,2 a cerca de 0,3, ou de cerca de 0,1 a cerca de 0,3.

[0426] Modalidade 38. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 37, em que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de cerca de 40 nm a cerca de 60 nm.

[0427] Modalidade 39. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 37, em que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de cerca de 20 nm a cerca de 200 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 150 de cerca de 20 nm a cerca de 100 nm, de cerca de 20 nm a cerca de 80 nm, ou de cerca de 20 nm a cerca de 60 nm ou de cerca de 40 nm a cerca de 200 nm, de cerca de 40 nm a cerca de 150 de cerca de 40 nm a cerca de 100 nm, de cerca de 40 nm a cerca de 80 nm, ou de cerca de 40 nm a cerca de 60 nm.

[0428] Modalidade 40. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 39, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano que tem a valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) de 1 a 5.

[0429] Modalidade 41. A composição, de acordo com a modalidade 40, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano que

tem um valor de HLB de 4 a 5.

[0430] Modalidade 42. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano é um monoéster de sorbitano.

[0431] Modalidade 43. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano.

[0432] Modalidade 44. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano é mono-oleato de sorbitano.

[0433] Modalidade 45. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 44, em que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de cerca de 40 nm a cerca de 80 nm.

[0434] Modalidade 46. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 44, em que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de cerca de 40 nm a cerca de 60 nm.

[0435] Modalidade 47. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 46, que tem uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 12, mais preferencialmente, de cerca de 0,5 a cerca de 9.

[0436] Modalidade 48. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 46, que tem uma razão molar entre óleo e tensoativo de cerca de 0,5 a cerca de 1.

[0437] Modalidade 49. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 48, que tem uma razão entre o tensoativo hidrofílico e componente catiônico de cerca de 0,2 a cerca de 1,5.

[0438] Modalidade 50. A composição de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 48, que tem uma razão entre o tensoativo hidrofílico e componente catiônico de cerca de 0,2 a cerca de 1.

[0439] Modalidade 51. A composição, de acordo com

qualquer uma das modalidades 1 a 50, que tem uma capacidade de carregamento for RNA de pelo menos cerca de 100 µg/ml de RNA.

[0440] Modalidade 52. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 51, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano um triéster de sorbitano.

[0441] Modalidade 53. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 51, em que o tensoativo hidrofóbico é um éster de sorbitano e o éster de sorbitano é trioleato de sorbitano.

[0442] Modalidade 54. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 51, que compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de monoéster de sorbitano, e de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0443] Modalidade 55. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 51, que compreende de cerca de 2% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de monoéster de sorbitano, e de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0444] Modalidade 56. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 10% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 1% a cerca de 2% de lipídio em fase sólida, de cerca de 2% a cerca de 5% de lipídio catiônico, de cerca de 3 a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 3% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0445] Modalidade 57. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende cerca de 15% em p/v de lipídio em fase líquida e cerca de 1% de lipídio em fase sólida, ou cerca de 30% em p/v de lipídio em fase líquida e cerca de 1,8% de lipídio em fase sólida,

e cerca de 3% de lipídio catiônico, cerca de 3,7% em p/v de éster de sorbitano, e cerca de 3,7% em p/v de tensoativo hidrofílico

[0446] Modalidade 58. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 1% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de monoéster de sorbitano, e de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0447] Modalidade 59. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende cerca de 3,75% em p/v de lipídio em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídio em fase sólida, cerca de 3% em p/v de lipídio catiônico, cerca de 3,7% em p/v de éster de sorbitano, e cerca de 3,7% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0448] Modalidade 60. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0449] Modalidade 61. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 0,2% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 15% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% ou cerca de 0,5% a cerca de 15% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0450] Modalidade 62. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 2% a cerca de 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 10 % em p/v de lipídio

catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de éster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0451] Modalidade 63. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de lipídio em fase líquida, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de lipídio em fase sólida, de cerca de 0,2% a cerca de 1% em p/v de lipídio catiônico, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de monoéster de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0452] Modalidade 64. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 53, que compreende cerca de 4 % em p/v de lipídio em fase líquida, cerca de 0,25% em p/v de lipídio em fase sólida, cerca de 0,4% em p/v de lipídio catiônico, cerca de 0,5% em p/v de éster de sorbitano, e cerca de 0,5% em p/v de tensoativo hidrofílico.

[0453] Modalidade 65. Uma composição que compreende uma forma diluída ou concentrada da composição de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 64.

[0454] Modalidade 66. A composição, de acordo com a modalidade 65 em que a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 64 é diluída 2 a 30 vezes.

[0455] Modalidade 67. A composição de acordo com a modalidade 65 em que a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 64 é diluída 2 a 20 vezes.

[0456] Modalidade 68. A composição, de acordo com a modalidade 65 em que a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 64 é diluída 2 vezes.

[0457] Modalidade 69. A composição, de acordo com a modalidade 65 em que a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 64 é concentrada 2 a 30 vezes.

[0458] Modalidade 70. A composição de acordo com a modalidade 65 em que a composição de acordo com qualquer uma das

modalidades 54 a 64 é concentrada 2 a 10 vezes.

[0459] Modalidade 71. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 70 em que o lipídio em fase líquida é tarpenoide de ocorrência natural ou sintético.

[0460] Modalidade 72. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 70 em que o lipídio em fase líquida é esqualeno de ocorrência natural ou sintético.

[0461] Modalidade 73. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 72, em que o lipídio em fase sólida é um glicerolipídio.

[0462] Modalidade 74. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 72, em que o lipídio em fase sólida é um triglicerídeo microcristalino.

[0463] Modalidade 75. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 72, em que o lipídio em fase sólida é trimiristina.

[0464] Modalidade 76. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 75, em que o lipídio catiônico é DOTAP.

[0465] Modalidade 77. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 76, em que o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano.

[0466] Modalidade 78. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 76, em que o éster de sorbitano é mono-oleato de sorbitano.

[0467] Modalidade 79. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 76, em que o éster de sorbitano é trioleato de sorbitano.

[0468] Modalidade 80. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 77, em que o tensoativo hidrofílico é um polissorbato.

[0469] Modalidade 81. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 54 a 77, em que o tensoativo hidrofílico é polissorbato 80.

[0470] Modalidade 82. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20, 34 a 41, 45 a 51, e 54 a 70, em que o núcleo de óleo compreende esqualeno de ocorrência natural ou sintético e um glicerolipídio, em que o lipídio catiônico é DOTAP, em que o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano, e em que o tensoativo hidrofílico é um polissorbato.

[0471] Modalidade 83. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20, 34 a 41, 45 a 51, e 54 a 70, em que o núcleo de óleo compreende esqualeno e trimiristina, em que o lipídio catiônico é DOTAP, em que o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano, e em que o tensoativo hidrofílico é polissorbato 80.

[0472] Modalidade 84. A composição, de acordo com a modalidade 83, em que o NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 40% em p/v de esqualeno, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de trimiristina, de cerca de 0,2% a cerca de 10 % em p/v de DOTAP, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de monostearato de sorbitano, e de cerca de 0,5% a cerca de 10% em p/v de polissorbato 80.

[0473] Modalidade 85. A composição, de acordo com a modalidade 83, em que o NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de esqualeno, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de trimiristina, de cerca de 0,2% a cerca de 1 % em p/v de DOTAP, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de monostearato de sorbitano, e de cerca de 0,5% a cerca de 5% em p/v de polissorbato 80.

[0474] Modalidade 86. A composição, de acordo com a modalidade 85, em que o NLC compreende cerca de 3,75 % em p/v de esqualeno, cerca de 0,25% em p/v de trimiristina, cerca de p/v 3% de DOTAP, cerca de 3,7% em p/v de monostearato de sorbitano, e cerca de 3,7% em p/v de

polissorbato 80.

[0475] Modalidade 87. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20, 34 a 41, 45 a 51, e 54 a 70, em que o núcleo de óleo compreende esqualeno de ocorrência natural ou sintético e um glicerolipídio, em que o lipídio catiônico é DOTAP, em que o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano, e em que o tensoativo hidrofílico é um polissorbato.

[0476] Modalidade 88. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 20, 34 a 41, 45 a 51, e 54 a 70, em que o núcleo de óleo compreende esqualeno e trimiristina, em que o lipídio catiônico é DOTAP, em que o éster de sorbitano é monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano, e em que o tensoativo hidrofílico é polissorbato 80.

[0477] Modalidade 89. A composição, de acordo com a modalidade 87 ou modalidade 88, em que o NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 40% em p/v de esqualeno, de cerca de 0,1% a cerca de 10% em p/v de trimiristina, de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de DOTAP, de cerca de 0,25% a cerca de 5% em p/v de monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 10% em p/v de polissorbato 80.

[0478] Modalidade 90. A composição, de acordo com a modalidade 87 ou modalidade 88, em que o NLC compreende de cerca de 2% a cerca de 6% em p/v de esqualeno, de cerca de 0,1% a cerca de 1% em p/v de trimiristina, de cerca de 0,2% a cerca de 1% em p/v de DOTAP, de cerca de 0,25% a cerca de 1% em p/v de monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano, e de cerca de 0,2% a cerca de 5% em p/v de polissorbato 80.

[0479] Modalidade 91. A composição, de acordo com a modalidade 87 ou modalidade 88, em que o NLC compreende cerca de 4% em p/v de esqualeno, cerca de 0,25% em p/v de trimiristina, cerca de p/v 0,4% de

DOTAP, cerca de 0,5% em p/v de monostearato de sorbitano ou mono-oleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano e cerca de 0,5% em p/v de polissorbato 80.

[0480] Modalidade 92. Um método para gerar uma resposta imunológica em um sujeito, que compreende administrar a um sujeito que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91, em que o agente bioativo é um antígeno de proteína ou uma molécula de ácido nucleico que codifica um antígeno de proteína.

[0481] Modalidade 93. O método, de acordo com a modalidade 92 em que o agente bioativo é RNA.

[0482] Modalidade 94. O método, de acordo com a modalidade 92 ou 93, em que a administração da composição é intramuscular, parenteral ou intradérmica.

[0483] Modalidade 95. Um método para gerar uma resposta imunológica em um sujeito, que compreende (a) administrar a um sujeito que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vírus oncolítico que codifica um antígeno de proteína, e (b) administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91, em que o agente bioativo é a antígeno de proteína ou uma molécula de ácido nucleico que codifica o antígeno de proteína.

[0484] Modalidade 96. O método, de acordo com a modalidade 95, em que a administração de (a) e a administração de (b) ocorrem com pelo menos 1 semana, pelo menos 2 semanas, pelo menos 3 semanas, pelo menos 1 mês, pelo menos 6 semanas, pelo menos dois meses, pelo menos três meses, pelo menos 6 meses, ou pelo menos 1 ano de intervalo.

[0485] Modalidade 97. Um método para entregar um agente bioativo a uma célula, que compreende colocar a célula em contato com a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91.

[0486] Modalidade 98. O método, de acordo com a

modalidade 97 em que o agente bioativo é um ácido nucleico.

[0487] Modalidade 99. O método, de acordo com a modalidade 97 ou modalidade 98, em que colocar a célula em contato com a composição compreende administrar a composição a um sujeito em que a célula está no sujeito.

[0488] Modalidade 100. Um método para otimizar a entrega de um agente bioativo a uma célula que compreende selecionar uma razão molar entre agente bioativo e NLC que otimiza titulações de anticorpo produzidas em um sujeito que compreende a célula.

[0489] Modalidade 101. O método, de acordo com a modalidade 100, em que o NLC é uma partícula de NLC de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91.

[0490] Modalidade 102. Um método para produzir a composição de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91, que compreende:

[0491] (a) misturar o lipídio em fase sólida, o lipídio em fase líquida, o lipídio catiônico e o tensoativo hidrofóbico para formar uma mistura em fase oleosa;

[0492] (b) misturar o tensoativo hidrofílico e água para formar uma mistura em fase aquosa;

[0493] (c) misturar a mistura em fase oleosa com a mistura em fase aquosa para formar as partículas de NLC; e

[0494] (d) combinar, opcionalmente, o agente bioativo com as partículas de NLC de modo que o agente bioativo se associe à superfície das partículas de NLC por interações não covalentes ou por interações covalentes reversíveis.

[0495] Modalidade 103. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91, em que o agente bioativo é RNA, e em que o RNA codifica um ou mais antígenos de TB.

[0496] Modalidade 104. A composição, de acordo

com a modalidade 103, em que o RNA codifica um ou mais antígenos de TB selecionados dentre Rv3619, Rv2389, Rv3478 e Rv1886.

[0497] Modalidade 105. A composição, de acordo com a modalidade 104, em que o RNA codifica antígenos de TB Rv3619, Rv 2389, Rv3478, e Rv1886.

[0498] Modalidade 106. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 92 a 99, em que o agente bioativo é RNA, e em que o RNA codifica um ou mais antígenos de TB.

[0499] Modalidade 107. O método, de acordo com a modalidade 106, em que o RNA codifica um ou mais antígenos de TB selecionado dentre Rv3619, Rv 2389, Rv3478, e Rv1886.

[0500] Modalidade 108. O método, de acordo com a modalidade 107, em que o RNA codifica antígenos de TB Rv3619, Rv 2389, Rv3478, e Rv1886.

[0501] Modalidade 109. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 1 a 91, em que o agente bioativo é um adjuvante.

[0502] Modalidade 110. A composição, de acordo com a modalidade 109, em que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR, um agonista de Rig-I, uma saponina, um carboidrato, um polímero de carboidrato, um carboidrato conjugado, uma partícula totalmente viral, uma partícula semelhante a vírus, fragmentos virais, e fragmentos celulares.

[0503] Modalidade 111. A composição, de acordo com a modalidade 110, em que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR e um agonista de Rig-I.

[0504] Modalidade 112. A composição, de acordo com a modalidade 111, em que o agonista de TLR é um agonista de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ou TLR9.

[0505] Modalidade 113. A composição, de acordo com a modalidade 111, em que o agonista de TLR é um agonista de TLR3.

[0506] Modalidade 114. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 112, em que o agente bioativo é selecionado dentre RNA de fita dupla, RIBOXXOL, poli(I:C) e Hiltonol®.

[0507] Modalidade 115. Uma composição que compreende um adjuvante em uma emulsão estática, em que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR3 e um agonista de Rig-I, e em que a emulsão estática é uma emulsão de óleo em água.

[0508] Modalidade 116. A composição, de acordo com a modalidade 115, em que a emulsão compreende 2 a 10% de óleo.

[0509] Modalidade 117. A composição, de acordo com a modalidade 115 ou 116, em que o óleo é esqualeno.

[0510] Modalidade 118. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 115 a 117, em que a emulsão de óleo em água compreende 0,01% a 0,1% de alfa-tocoferol.

[0511] Modalidade 119. A composição, de acordo com a modalidade 118, em que a razão entre óleo e alfa-tocoferol é maior do que 1.

[0512] Modalidade 120. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 115 a 118, em que a emulsão de óleo em água compreende 0,3 a 3% de tensoativo.

[0513] Modalidade 121. A composição, de acordo com a modalidade 120, em que o tensoativo é mono-oleato de sorbitano de polioxietileno ou poloxâmero 188 (copolímero de polioxietileno e polioxipropileno).

[0514] Modalidade 122. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 115 a 121, em que a emulsão de óleo em água compreende cerca de 1% de Span 85.

[0515] Modalidade 123. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 115 a 121, em que a emulsão de óleo em água compreende 0,5% a 5%, ou 0,5% a 5%, ou 0,5% a 3% ou 1% a 3% de 1,2-

dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC).

[0516] Modalidade 124. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 115 a 123, em que a emulsão de óleo em água compreende 0,5% a 5%, ou 0,5% a 5%, ou 0,5% a 3%, ou 1% a 3% de glicerol.

[0517] Modalidade 125. Um método para gerar ou intensificar uma resposta imunológica que compreende administrar a um sujeito que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com qualquer uma das modalidades 109 a 124.

[0518] Modalidade 126. O método, de acordo com a modalidade 125, em que a resposta imunológica é maior do que a resposta imunológica quando o sujeito é administrado apenas com o adjuvante.

[0519] Modalidade 127. O método, de acordo com a modalidade 125 ou modalidade 126, em que a administração da composição é intramuscular, parenteral ou intradérmica.

[0520] Modalidade 128. Uma composição que compreende (a) um adjuvante e (b) uma emulsão de óleo em água ou partículas de carreador de partícula nanoparticulado (NLC), em que a emulsão de óleo em água ou partículas de NLC compreende esqualeno.

[0521] Modalidade 129. A composição, de acordo com a modalidade 128, em que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR, um agonista de Rig-I, uma saponina, um carboidrato, um polímero de carboidrato, um carboidrato conjugado, uma partícula totalmente viral, uma partícula semelhante a vírus, fragmentos virais, e fragmentos celulares.

[0522] Modalidade 130. A composição, de acordo com a modalidade 129, em que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR e um agonista de Rig-I.

[0523] Modalidade 131. A composição, de acordo com a modalidade 130, em que o agonista de TLR é um agonista de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ou TLR9.

[0524] Modalidade 132. A composição, de acordo com a modalidade 131, em que o agonista de TLR é um agonista de TLR3.

[0525] Modalidade 133. A composição, de acordo com qualquer uma das modalidades 128 a 132, em que o agente bioativo é selecionado dentre RNA de fita dupla, RIBOXXOL, poli(I:C) e Hiltonol®.

[0526] Modalidade 134. Um método para gerar ou intensificar uma resposta imunológica que compreende administrar a um sujeito que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição de acordo com qualquer uma das modalidades 128 a 133.

[0527] Modalidade 135. O método, de acordo com a modalidade 134, em que a resposta imunológica é maior do que a resposta imunológica quando o sujeito é administrado apenas com o adjuvante.

[0528] Modalidade 136. O método, de acordo com a modalidade 134 ou modalidade 135, em que a administração da composição é intramuscular, parenteral ou intradérmica.

[0529] Os exemplos a seguir são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE NLC

[0530] Composições de carreador lipídico nanoestruturado (NLC) foram preparadas com uso de uma combinação de agentes de emulsificação, e a estabilidade de composições resultantes foi avaliada com uso de medições de tamanho de partícula sob condições de armazenamento (5 °C). A fase oleosa foi composta de esqualeno - a fase líquida do núcleo de óleo - um tensoativo de éster de sorbitano não iônico, tanto trioleato de sorbitano (Span® 85) ou monostearato de sorbitano (Span® 60), o DOTAP lipídico catiônico (cloreto de N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio), e no caso de formulações de NLC, o lipídio sólido (trimiristato de glicerila - Dynasan® 114). A fase aquosa foi um tampão de tri-hidrato de citrato de sódio a

10 mM que contém o tensoativo PEGlatado não iônico Tween® 80.

[0531] A formação de formulações retratadas nos exemplos é mostrada na Tabela 2 abaixo:

A TABELA 2: COMPOSIÇÕES DE FORMULAÇÕES REPRESENTATIVAS

ID							
	Líquido Óleo % (P/V)	**Óleo sólido % (P/V)**	**Tensoativo hidrofílico % (P/V)**	**Éster de sorbitano**	**Lipídio catiônico % (P/V)**	**Razão molar de óleo para tensoativo**	**Razão molar de Tween 80:DOTAP**
QG386 (CNE)	4,3% de esqualeno		0,5% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP	6,9	
QG711	4,08% de Esqualeno	0. 25% de Dynasan 114	2% de Tween 80		0,4% DOTAP	4,8	
QG752	4,08% Esqualeno	0,25 % de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP	3,9	
QG762	4,08% de Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,25% Span 85	0,4% DOTAP	4,3	
QG766	5% Esqualeno	-	2% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP	4,6	2,53
QG868	5% Esqualeno	-	2% de Tween 80	0,5% Span 60	0,4% DOTAP	3,7	2,53
QG767	4,08% Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 80	0,4% DOTAP	3,1	

QG768 ou QG863	4,08% Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span60	0,4% DOTAP	3,1	2,53
QG769	4,37% de óleo de uva	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP		
QG866	4,37% de óleo de uva	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 60	0,4% DOTAP		
QG770	4,49% de Myglyol 810	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP		
QG865	4,49% de Myglyol 810	0,25% de Dynasan 114	2% de Tween 80	0,5% Span 60	0,4% DOTAP		
QG807	4,08% Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% Span60	0,4% DOTAP	5,5	0,63
QG808	4,08% de Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% Span 85	0,4% DOTAP	6,8	
QG906	4,08% de Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% Span 80	0,4% DOTAP	4,7	
QG925	15 % de Esqualeno	0,9% Dynasan 114	3,7% de Tween 80	3,7% Span60	3% DOTAP	2,4	0,63
QG912	2,03 % de Esqualeno	0,125% de Dynasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% Span60	0,4% DOTAP	2,4	
QG924	30% Esqualeno	1,85% de Dynasan 114	3,7% de Tween 80	3,7% Span 60	3% DOTAP	4,8	0,63

QG911	4,05% de Esqualeno	0,25% Dyanasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% de Span 60	0,4 % DOTAP	4,8	
QG941	7,50% Esqualeno	0,24% de Dynasan 114	3,7% de Tween 80	3,7% Span 60	3% DOTAP	1,2	0,63
QG942 (NCL_{v2})	3,75% de Esqualeno	0,24% de Dynasan 114	3,7% de Tween 80	3,7% Span 60	3% DOTAP	0,6	0,63
QG963	3,75% de Esqualeno	0,24% de Dynasan 114	1,5% de Tween 80	3,7% Span 60	1,5% DOTAP	0,8	
NCL_{v1}	4,75% Esqualeno	0,25% de Dynasan 114	0,5% de Tween 80	0,5% Span 60	0,4% DOTAP		

*QG386 é uma nanoemulsão de técnica anterior (também denominada no presente documento como CNE); as formulações foram opcionalmente tamponadas com citrato de 10 mM.

[0532] De modo a sintetizar formulações de NLC, a fase oleosa foi primeiro preparada misturando-se o lipídio em fase líquida, lipídio em fase sólida, lipídio positivamente carregado, e tensoativo hidrofóbico em um Vaso Blend, que foi colocado em uma batelada de água de sonicação (70 ± 5 °C) para facilitar a solubilização. A preparação da fase aquosa envolveu diluição de um tensoativo hidrofílico, preferencialmente Tween 80, em água ultrapura para injeção (WFI) ou um tampão aquoso, tal como 10 mM de tri-hidrato de citrato de sódio, seguido por agitação para dissolução completa. A composição aquosa foi aquecida a 60 a 70 °C, por exemplo, em um sonicador ideal, antes de mesclar com a fase oleosa. Em alguns casos, ambas as duas fases foram aquecidas separadamente a 60 °C em um sonicador de batelada. Um misturador de alto cisalhamento foi usado para combinar as fases oleosas e aquosas por alto

cisalhamento da mistura compósita. A velocidade de mesclagem foi gradualmente aumentada para 5.000 RPM, ou um máximo de 10.000 RPM, em um emulsificante de laboratório de alta velocidade (Silverson Machines, Inc.), e a mistura então ocorreu por um período de dez minutos a uma hora para produzir uma mistura bruta que contém gotas de óleo dimensionadas em mícron. O posicionamento da sonda de mistura Silverson foi ajustada conforme necessário para dispersão uniforme de óleo e emulsificação completa. A redução adicional de tamanho de partícula foi alcançada por homogeneização de alto cisalhamento em um microfluidificante de M-110P (Microfluidics, Corp.). Partículas de NLC foram obtidas da emulsão bruta com uso de um Processador de Materiais Microfuidizador M-110P (Microfluidics, Corp.). Cada emulsão foi processada por aproximadamente 5 passos no microfluidificante a 45 °C a 206,84 MPa (30.000 psi). O pH final foi entre 6,5 a 6,8. A suspensão de partícula de NLC resultante foi coada com uso de um filtro estéril de 0,2 μm (por exemplo, filtro de seringa de membrana de polieterssulfona de 0,2 μm) de modo a coletar a formulação de NLC final e armazenar em 2 a 8 °C, que foi subsequentemente analisada para tamanho de partícula.

[0533] Para analisar a estabilização dos NLCs (NLCs não complexados), o diâmetro hidrodinâmico médio (média Z) e índice de polidispersibilidade (PDI) para cada formulação foi medida com uso de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) após tempos variados de armazenamento a 5 °C (Tabela 3).

TABELA 3:TAMANHO DE PARTÍCULA E MEDIÇÕES DE ÍNDICE DE POLIDISPERSIBILIDADE DE FORMULAÇÕES REPRESENTATIVAS

ID	Temperatura de estabilidade e tempo para colunas (b), (c) e (d)	(b)média Z [nm]	(c) Índice de polidispersibilidade (PDI)	(d) potencial Zeta (mV)	Temperatura de estabilidade e tempo para colunas (e) e (f)	(e)média Z [nm]	(f) Índice de polidispersibilidade (PDI)
QG770	@síntese	92,1	0,241		5 °C em t= 2 semanas	100,3	0,224
QG769	@síntese	105,8	0,223			Não testado	Não testado
QG768	@síntese	105,4	0,27		5 °C em t= 1 mês	105,4	0,271
QG767	@síntese	106,9	0,261		5 °C em t= 1 mês	108,3	0,264
QG762	@síntese	110,7	0,258			Não testado	Não testado
QG752	@síntese	79,4	0,284		5 °C em t= 1 mês	75,7	0,27
QG808	@síntese	111,5	0,228		5 °C em t= 1 mês	108,5	0,218
QG807	@síntese	107,0	0,248		5 °C em t= 1 mês	106,9	0,234
QG906	@síntese	105,0	0,068		5 °C em t= 1 mês	105,0	0,067
QG386 (CNE)	@síntese	97,23	0,056	13,1 ±3,25	5 °C em t= 1 mês	103,1	0,095
QG912	@síntese	63,06	0,117		5 °C em t= 1 mês		
QG925	@síntese	58,57	0,149		5 °C em t= 1 mês	48,53	0,221
QG942 (NLC_{V2})	@síntese	40,6	0,198	28,4 ±1,27			
$NNLC_{v1}$	@síntese	91,90	0,17	15,6 ±0,12			

[0534] As Figuras 1A a 1E comparam o diâmetro médio z, medido com uso de Dispersão de Luz Dinâmica (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Ltd.), de formulações incubadas em diferentes temperaturas. As formulações foram diluídas em 1:100 com água em preparações de triplicata e medidas em uma cubeta de poliestireno descartável (parâmetros de SOP: RI de material = 1,59, dispersante RI (água) = 1,33, T = 25 °C, viscosidade (água) = 0,887 cP, ângulo de medição = 173º de retrodifusão, posição de medição = 4,65 mm, atenuação automática). Para medição potencial zeta, formulações foram diluídas em 1:100 em triplicatas e carregadas em uma célula capilar dobrada DTS1070 descartável (Malvern instruments, Ltd.). Os seguintes parâmetros de SOP foram usados: RI de material = 1,59, RI dispersante (água) = 1,33, viscosidade (água) = 0,887 cP, T = 25 °C, atenuação automática e seleção de tensão. O diâmetro médio Z de intensidade ponderada, PDI e valores potenciais zeta para cada formulação, medido de três medições/réplica (9 medições totais), são relatados na Tabela 3. O tamanho de partícula de RNA formulado (complexo de NLC±RNA ou CNE±RNA) em valores de N:P diferentes foi medido em triplicata com uso do Zetasizer Auto Plate Sampler (APS, Malvern Instruments, Ltd.) em uma configuração de placa de 384 poços. O potencial Zeta de RNA formulado em valores de N:P diferentes foi medido em triplicata seguindo o mesmo método descrito acima para formulação por si só. A capacidade de ligação de NLC foi determinada com uso de um ensaio de retardamento de gel. Brevemente, complexos de NLC e rvRNA foram preparados em vários valores de N:P e submetido a eletroforese conforme é em 1% de gel de agarose. Concentrações padrão foram usadas para quantificar rvRNA não ligada ou excessivo que migra no gel.

[0535] A Figura 16B compara a distribuição de tamanho de partícula, medida com uso de dispersão de luz dinâmica (DLS), entre uma formulação de NLC e CNE no tempo de fabricação. Visto que a estabilidade coloidal a longo prazo foi um pré-requisito para o desenvolvimento de formulações que eram adequados para armazenamento em uma situação de

resposta rápida, foi monitorado o diâmetro de partícula médio de formulações armazenadas em 25 °C. O diâmetro de partícula de NLCs foi quase inalterado (<3% de mudança) por pelo menos nove meses em comparação a CNE, que aumentou em 30% após três meses e 350% após nove meses de armazenamento (Figura 16C). Os tensoativos não iônicos, que incluem o éster de sorbitano hidrofóbico (Span), o éster de sorbitano etoxilado hidrofílico (Tween), e o DOTAP lipídico catiônico, são cruciais para preservar a estabilidade coloidal, e devido a sua presença interfacial, desempenham uma função em regular interações biofísicas. Como resultado, procurou-se elucidar empiricamente a função de tensoativos em mediar proteção de rvRNA, expressão de proteína e imunogenicidade. NLCs de propriedades fisicoquímicas variadas foram sintetizadas com uso de um processo de fluidização de alta pressão (consultar métodos). Composições de formulações de NLC exemplificadoras e uma formulação de CNE, de fabricação doméstica de acordo com um método anteriormente publicado, consultar Brito et al. Mol. Ther. 22(12):2.118 a 2.129 (2014), são resumidas na Tabela 2. Aumentar a razão molar de tensoativo para óleo (S:O) reduziu o tamanho de partícula (Figura 35), o que permitiu gerar NLCs unimodais com diâmetro médio Z variando de 40 nm a 100 nm conforme medido por DLS. O potencial Zeta é correlacionado com a quantidade de DOTAP, aumentando de aproximadamente +15 mV com 0,4% em p/v de DOTAP a +28 mV com 3,0% em p/v de DOTAP.

[0536] A evolução de tamanho de partícula como uma função de tempo fornece informações de estabilidade coloidal. A incubação a 5 °C e 25 °C simula condições típicas de armazenamento (Figuras 1 A e IB), 37 °C simula temperatura fisiológica (Figura 1C), 60ºC e 80ºC expõe formulações a alto estresse térmico de modo a acelerar estabilidade coloidal e ajudar na diferenciação entre formulações (Figuras 1D e 1E). As formulações de NLC QG807 são estáveis por pelo menos um mês a 60ºC, com base nos dados mais recentes disponíveis no tempo. Por outro lado, tamanho de partícula da nanoemulsão catiônica (CNE) QG386 aumentou em 3 vezes após somente 7

dias de incubação a 60 °C. Os dados de tamanho de partícula a 60 °C sugere NLCs têm estabilidade coloidal significativamente aprimorada em comparação a CNE. Consultar a Figura 1D.

EXEMPLO 2: AVALIAÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DE NLC E A RAZÃO DE ÓLEO:TENSOATIVO

[0537] NLCs são compostos por um núcleo hidrofóbico que contém o óleo líquido e lipídio sólido, e tensoativos (também conhecido como emulsificantes ou agentes de emulsificação) que compõem a interface que separa a fase hidrofóbica - óleo líquido e lipídio sólido, coletivamente denominado aqui como óleo - da fase aquosa. Visto que tensoativos residem na superfície das nanopartículas de NLC, sua quantidade indica a área de superfície total disponível. Por outro lado, o óleo permanece no núcleo e contribui primariamente para o volume total disponível. O aumento da razão entre tensoativo e óleo aumenta consequentemente a razão entre área de superfície (SA) e volume (V); logo, para um volume fixo do material, aumentando o aumento da razão SA/V se torna a redução do diâmetro de partícula de NLC. O último é demonstrado empiricamente nas Figuras 2A e 2B - NLCs fabricados sob condições de processamento idênticas, mas diferentes razões de óleo/tensoativo, resultaram em um crescente tamanho de partícula com crescente óleo/tensoativo. O tamanho de partícula é relacionado de modo linear a óleo/tensoativo (R^2 = 0,97); alternativamente, tamanho de partícula é inversamente relacionado à razão de tensoativo/óleo (R^2 = 0,97).

EXEMPLO 3:DETERMINAÇÃO DA RAZÃO DE N/P

[0538] A razão de Nitrogênio para Fosfato (N/P) é uma representação teórica da estequiometria molar de nitrogênios catiônicos (carga positiva) e grupos fosfato aniônico (carga negativa) disponível para formar o complexo de RNA-NLC. O cloreto de lipídico catiônico de DOTAP (cloreto de N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimethilamônio) usado em NLCs contém um grupo de cabeça de trimethilamônio quaternário e transporta uma carga positiva que é independente de pH. Visto que cada molécula de DOTAP contém um

grupo de cabeça de trimethilamônio, a concentração de nitrogênio (ou a quantidade de carga positiva) é essencialmente igual à concentração de DOTAP. Por outro lado, cada monofosfato de ribonucleotídeo em uma cópia de RNA consiste em um 1 único aproximadamente proporcional à concentração de RNA normalizada ao peso molecular médio de monofosfatos de ribonucleotídeos (339,5 g/mol). Desse modo, $N/P = \frac{[DOTAP]}{[RNA]/339.5}$, em que [DOTAP] e [RNA] são concentrações molares de DOTAP e RNA, respectivamente.

[0539] Além disso, RNA que se liga à NLC como uma função do N/P teórico é caracterizado com uso de um ensaio de retardamento de gel (GRA). RNA a 20 µg/ml foi misturado em 1:1 (v/v) com formulação não diluída ou formulação diluída. O fator de diluição de formulação variou de 1/2 a 1/1600. Dependendo da concentração de DOTAP inicial, a razão de N/P variou de 0,12 - por exemplo, ao complexar 20 µg/ml de RNA com QG807 (0,4% em p/v de DOTAP) diluído 800 vezes para aproximadamente 750 - ao complexar 20 µg/ml de RNA com QG942 não diluído (3% em p/v de DOTAP). As misturas de RNA-NLC foram permitidas a complexar por 30 minutos em gelo e então submetidas a eletroforese a 120 V por cerca de uma hora em um 1% de gel de agarose. A análise de densitometria óptica de bandas de RNA foi realizada para determinar a quantidade de RNA relativa ligada à formulação de NLC como uma função de N/P (Figura 3A). Exceto para QG807 e QG911, a % de RNA ligada a NLC passa por uma rápida transição de 0% abaixo de N/P de 1 a quase 100% acima de 1. Em N/P de 1, que é teoricamente um positivo equimolar e cargas negativas, aproximadamente 50% de RNA é ligado a NLC. O último sugere que a reação de ligação RNA-NLC está em equilíbrio cerca de N/P de 1 - uma condição na qual há aproximadamente uma quantidade igual de RNA ligado versus RNA não ligado.

[0540] De modo a consultar como a ligação RNA-NLC se correlaciona com a entrega e expressão, foi realizado um experimento *in vitro* com uso de um replicon que expressa SEAP. O replicon SEAP foi complexado

com formulação QG807, QG843, QG942 ou QG963. A razão de N/P para cada formulação foi variada da mesma maneira que a mostrada na Figura 3A. Os dados de SEAP nas Figuras 3B a 3E, especificamente para QG942, QG963 e QG843, mostra que a expressão de pico para cada formulação é diferente apesar de as curvas de ligação de RNA-NLC serem quase idênticas.

[0541] Foi também realizado um experimento *in vitro* em que várias diluições de NLC_{V2} foram complexadas com 20 µg/ml de rvRNA de SEAP, resultando em uma faixa de razões molares de N:P. Esses complexos de RNA/formulação foram então física e biologicamente caracterizados, para medir a expressão de SEAP *in vitro*, tamanho de partícula, potencial Zeta e ligação de RNA (Figuras 22A a 22D). Os resultados indicam que há são razões de N:P que resultam em níveis de expressão de SEAP ideal correspondente com ligação de RNA máxima, e um potencial Zeta positivo constante, mas aumento mínimo em tamanho de partícula. Dado que, para a mesma formulação, há uma correlação entre expressão de antígeno e imunogenicidade (consultar Pepini et al., J. Immunol. 1601877 (2017)), existe a hipótese de que se pode esperar titulações de nAb similares em razões de N:P (região sombreada em cinza na Figura 22) que correspondeu à expressão de SEAP de pico.

[0542] Para caracterizar NLC_{V2} *in vivo* em termos de expressão de proteína, reatogenicidade, e imunogenicidade, optou-se por testar 4 a 5 razões de N:P, incluindo aquelas que se correlacionam com atividade de SEAP *in vitro* ≥ 5,8 Log_{10} RLU (100, 37, 15, 5,6), e uma N:P de 3, fora da zona ideal hipotética. Para caracterizar a expressão de proteína, camundongos C57BL/6 foram injetadas em IM com doses de 1000, 100, e 10 ng de rvRNA de SEAP em cada razão de N:P. Para caracterizar a reatogenicidade, 50 µg de rvRNA complexado com NLC_{V2} em cada N:P foram também injetados por meio de rota ID em porquinhos-da-índia e diâmetro de expansão foi medido. Vinte e quatro horas após injeção, camundongos foram sangrados para medir a atividade de soro SEAP e sítios de injeção de porquinhos-da-índia foram medidos (Figuras 22E a 22H). Para caracterizar a imunogenicidade, ZIKV rvRNA

foi complexado com NLC_{V2} em cada N:P, e 1.000 ng ou 100 ng foi entregue por meio da rota EVI em camundongos. Camundongos foram então sangrados 14 dias depois para quantificar as titulações de nAb (Figuras 22F e 22G).

[0543] Começando com a expressão de SEAP *in vivo*, razões de N:P ideais foram dependentes de dose, com N:P ideal de 15 para a dose de 1.000 ng, 37 para a dose de 100 ng, e 100 para a dose de 10 ng (Figura 22E). Conforme esperado, imunogenicidade apareceu para se correlacionar com a expressão de SEAP nas duas doses que foram comparadas (Figuras 22F e 22G). Na dose de 1.000ng, não foi detectada nenhuma diferença significativa em titulações de nAb com qualquer uma das razões de N:P testadas, similares a atividade de SEAP naquelas razões de N:P (Figura 22F). Na dose de 100 ng, não foi observada nenhuma diferença significativa in titulações de nAb entre razões de N:P de 37 e 15 e diferenças ligeiras, mas insignificativas em atividade de SEAP, no entanto, uma redução significativa de titulação ocorreu entre razões de N:P de 15 e 5,6 de maneira similar à atividade de SEAP (Figura 22G). Em termos de reatogenicidade, foi observada uma redução significativa em diâmetro de expansão quando a razão de N:P foi reduzida 2,5 vezes de 37 para 15 (Figura 22H). De modo importante, esses dados sugerem que reduzir a N:P 2,5 vezes de 37 para 15 reduziria significativamente a reatogenicidade, mas causaria impacto mínimo em níveis de expressão de antígeno e imunogenicidade subsequente, especialmente em níveis maiores de doses de rvRNA. De fato, em valores de N:P de 15 e 37, um efeito de economia de dose foi observado visto que não houve uma diferença significativa de atividade de SEAP entre doses de 1000 e 100ng (Figura 22E). As maiores diferenças de atividade de SEAP entre doses foram observadas em baixas razões de N:P (Figura 22E).

[0544] De modo a avaliar se a razão de RNA/partícula teórica é preditiva do estado físico do complexo de formulação de RNA, o diâmetro hidrodinâmico (média Z; nm) de três formulações, QG752, QG768 e QG386, misturadas em quantidades variadas com uma quantidade variada (1 µg) de um modelo de 10 kb de RNA foi comparado. O tamanho hidrodinâmico

para todas as formulações exibiu um perfil em formato de curva de sino aproximado com crescente diluição de formulação, isto é, decrescente N/P (Figura 4A) ou crescente RNA/partícula (Figura 4B) ou decrescente DOTAP/RNA (Figura 4C). Apesar de todas as formulações que contém quantidades idênticas de DOTAP (0,4% em p/v), o pico de tamanho de partícula, que indica potencialmente partículas de NLC agrupadas reticuladas com RNA, é observado em diferentes razões de N/P (Figura 4A) - ~3 para QG768 e QG386 (40 vezes a diluição de formulação ou 0,01% em p/v de DOTAP) e ~1 para QG752 (100 vezes a diluição de formulação ou 0,004% em p/v de DOTAP). Essa discrepância é, no entanto, reconciliada depois de considerar diferenças no tamanho de partícula inicial e representar média Z como uma função de razão de RNA/partícula (Figura 4B) - o tamanho de partícula de pico para todas as formulações é observado em aproximadamente 1-2 RNA cópias por partícula de NLC. Visto que o tamanho de partícula médio inicial de QG752 (75 nm) é menor do que tanto QG386 quanto QG768 (~100 nm), o mesmo tem uma maior razão de área de superfície/volume, e desse modo, necessita de mais diluição (menor N/P) para obter uma razão de RNA/partícula similar a QG386 e QG768. Em geral, se a composição química for mantida constante, diminuir o tamanho de partícula aumentaria a razão de área de superfície/volume e consequentemente aumentaria a concentração de partícula. De modo aritmético, o último princípio é resumido conforme a seguir: se formulações *A* e *B* compartilharem composição química e geometria esférica idênticas, mas diâmetros diferentes d_A e d_B, respectivamente, e em que $d_A > d_B$, então a formulação *B* tem uma concentração de partícula maior do que formulação *A* por um fator de $(d_A/d_B)^3$.

[0545] Além disso, esses dados de tamanho de partícula de formulação de RNA se correlacionam com uma capacidade de formulação de se ligar a RNA conforme determinado em um ensaio de retardamento de gel (GRA). GRA é baseado no princípio de que qualquer RNA não ligado ou livre migrará e coincidirá com o controle não formulado ou RNA puro quando separado em um gel sob uma tensão aplicada; desse modo, o

mesmo avalia a capacidade de formulação para ligar e imobilizar RNA em condições de eletroforese de gel padrão. GRA foi executado em um gel de agarose a 1,2% pré-fundido autocontido manchado com brometo de etídio (EtBr) (E-gel®, agarose de propósito geral a 1,2%, ThermoFisher Scientific). Quando RNA foi complexado com formulação de NLC QG768, o mesmo permaneceu imobilizado em todas as razões de N/P maiores do que 2,3, que corresponde à região ascendente (indo da esquerda para a direita) incluindo o máximo do perfil de tamanho de partícula de formulação de RNA para QG768 (Figura 4A). A quantidade de RNA não ligado gradualmente aumentado conforme a razão de N/P foi 0,9 e menor, que corresponde à região descendente (indo da esquerda para a direita) na Figura 2A. Desse modo, o tamanho de partícula correlates com capacidade de ligação, e pode ser usado como um método para otimizar a complexação de RNA e entrega com uso de dose de formulação mínima. De modo a investigar como a razão de RNA/partícula causa impacto de imunogenicidade, camundongos (n=5/grupo) foram injetados IM com ZIKV rvRNA complexado com QG768 em diferentes razões e anticorpos neutralizantes de ZIKV (titulações $PRNT_{80}$) foram medidas 14 dias depois.

EXEMPLO 4: AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES DE NLC COMO CANDIDATOS DE VACINA DE ZIKA

[0546] Formulações de NLC candidatas principais que demonstraram estabilidade física foram combinadas com RNA viral replicante sintético (rvRNA) derivado de uma cepa de vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV, cepa TC83) em que os genes estruturais de VEEV foram substituídos por um cassete de PrM-E de ZIKV. Sistemas de replicon de RNA foram desenvolvidos para facilitar estratégias de intensificação de iniciação heteróloga. O rvRNA formulado pode ter sido administrado por meio da rota intramuscular com uso de uma agulha convencional. Várias formulações de NLC promoveram respostas *in vivo* robustas imunes.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA CELULAR

[0547] Células C6/36 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD), derivadas de mosquitos *A. albopictus*, foram mantidos em 29ºC com 5% de CO_2 em meio essencial mínimo por Dulbecco (DMEM) que contém 10% (V/V) de soro bovino fetal inativado por calor (FBS), piruvato de sódio (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), e 1% (v/v) de caldo de fosfato de triptose (Sigma, St. Louis, MO). Células Vero, BHK-21, e 293T (ATCC, Manassas, VA) foram propagados em 37ºC com 5% de CO_2 em DMEM que contém 10% (V/V) FBS inativado com calor, piruvato de sódio (1 mM), penicillina (100U/ml), e estreptomicina (100 µg/ml). Todas as linhagens celulares foram também testadas para contaminação de micoplasma.

CONSTRUTOS DE PLASMÍDEO

[0548] Um plasmídeo que codifica um promotor de SP6 seguido pelas regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs) e genes não estruturais de cepa TC-83 de vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV) (Figura 21 A) assim como GFP acentuado sob o controle do promotor subgenômico de VEEV, considerado pSP6-VEE-Rep-GFP, foi gentilmente fornecido pelo Dr. Scott Weaver. Um rvRNA repórter de controle, que codifica a fosfatase alcalina embriônica humana secretada (SEAP) também foi projetada (Figura 21B).

[0549] O promotor de SP6 foi então substituído por um promotor de T7 que usa técnicas de clonagem padrão, denominado pT7-VEE-Rep-GFP. Um fragmento que codifica genes prM e E otimizados por códon da French Polynesian Zika vírus (ZIKV) cepa H/PF/2013 foi sintetizado e clonado em pUC57 (Genscript). Com uso de um kit de mutangênese Q5 (New England Biolabs), uma sequência de kozak foi então inserida e seguida tanto pelo vírus de encefalite Japonesa heterotípica (JEV) como por sequência de sinais ZIKV homotípica a montante (ss) com uso dos seguintes iniciadores: JEVss-FWD (gctggcctccctggctgtggtcattgcctgcgctggagcaGCCGAGGTGACCAGGAGAGG; SEQ ID NO: 13), e JEVss-REV (cacatgattgatccggcactcctcttgcccatggcggcggcGTGAGCTGGCGGCGGGTG; SEQ ID NO: 14), ou ZIKVss-FWD

(ggaatcgtgggcctgctgctgaccacagcaatggcaGCCGAGGTGACCAGGAGAGG; SEQ ID NO: 15), e ZIKVss-REV (cacggatgtgtctgctcctctccgcatggcggcggcGTGAGCTGGCGGCGGGTG; SEQ ID NO: 16). Esse fragmento combinado que codifica tanto o JEVss como ZIKVss seguido por genes ZIKV prM e E foi então PCR amplificado com os iniciadores ZIKV-prM-E-FWD (AATGGACTACgacatagtcgccgccgccatg; SEQ ID NO: 17) e ZIKV-prM-E-REV (GCGGTTTTTGACAccgcggTCAGGCAGACACGGCG; SEQ ID NO: 18) e clonados entre sítios PflFI e SacII em pT7-VEE-Rep-GFP, com uso de mistura de enzima de infusão (Clontech), resultando em plasmídeos pT7-VEE-Rep-JEVss-ZIKV-prM-E ou pT7-VEE-Rep-ZIKVss-ZIKV-prM-E. pT7- VEE-Rep-SEAP foi construído por amplificação de PCR e clonado entre sítios PflFI e SacII em pT7-VEE-Rep-GFP conforme descrito acima (Figura 21B). Todos os plasmídeos foram confirmados por sequenciamento de Sanger.

PRODUÇÃO DE RNA

[0550] Seguindo a transformação e amplificação em células Top 10 (Invitrogen) e isolamento com uso de kits de maxi-prep (Qiagen), plasmídeos foram linearizados por digestão de restrição com enzima NotI (New England Biolabs) e purificado com uso de clorofórmio de fenol. RNA foi então transcrito *in vitro* com uso de kit T7 megascript (Invitrogen), seguido por precipitação de cloreto de lítio e uso de cap com um kit de capping de Vaccinia (New England Biolabs). Transcritos com cap foram então precipitados em cloreto de lítio e ressuspensos em água livre de nuclease a uma concentração final de 1µg/µ1 e analisado por eletroforese de gel de agarose. Todo o RNA foi separado em alíquotas e armazenado a -80 °C.

ENSAIO DE DESAFIO DE RNASE

[0551] ZIKV-rvRNA foi complexado com NLC_{v1} e NLC_{V2} em razões de N:P de 50 e 15 respectivamente e colocado em gelo por 30 minutos. Depois de diluir o complexo de NLC_{V2} com uso de água livre de nuclease, complexos que contém 1 µg de rvRNA em 20 µg/ml foram tratados com 50 ng de RNase A (Thermo Scientific) por 30 minutos em temperatura

ambiente, seguido por uma incubação com 5 µg de Proteinase K recombinante (Thermo Scientific) por 10 minutos a 55ºC. RNA foi então extraído com uso de um volume igual de 25:24:1 fenol:clorofórmio:álcool de isoamila (Invitrogen). Após mistura em vórtice, amostras foram centrifugadas a 17.000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e misturados 1:1 com corante de carga Glyoxal (Invitrogen) e aquecido a 50 °C por 15 minutos. O equivalente de 200 ng de RNA foram carregados e executados em 150 ml gel de agarose a 1% desnaturado em tampão de execução de Northern Max Gly (Invitrogen) em 120 V por 45 minutos. Géis foram imageados com uso de um sistema de imageamento ChemiDocTM MP (BioRad). A intensidade da banda de rvRNA intacto foi comparada a fenol:clorofórmio:isoamil RNA extraído de complexos que não foram submetidos a tratamento de RNase e Proteinase K. Controles adicionais incluíram rvRNA por si só com e sem tratamento de RNase e proteínase K em uma carga de 200 ng de rvRNA.

CONDIÇÕES DE COMPLEXAÇÃO PARA EXPERIMENTOS IN VITRO E IN VIVO

[0552] Em experimentos de otimização de N:P, NLC_{v1} ou NLC_{V2} foi diluído em série em tampão de citrato de 10 mM e complexado 1:1 com rvRNA diluído a 20 µg/ml em uma sacarose livre de nuclease a 10% de solução (para manter a isotonicidade sem o uso de um agente iônico tal como solução salina). rvRNA foi adicionado à formulação e gentilmente pipetado para cima e para baixo para garantir a mistura completa. O complexo foi incubado por 30 min em gelo, resultando em uma faixa de razões molares de N:P. Esses complexes foram então adicionalmente diluídos em sacarose a 10% para alcançar as doses desejadas. Para estimulação *in vitro* de PBMCs humanos, formulações complexadas foram diluídas em 1:125. Para estudos de vacinação utilizando NLC_{v1} ou CNE em uma N:P de 50, rvRNA foi diluído para 40 µg/ml em sacarose a 10% e complexado em 1:1 com formulação. Para o estudo com porquinho-da-índia em que NLC_{V2} foi utilizado em uma N:P de 37, rvRNA foi diluído para 400 µg/ml em sacarose a 10% e complexado 1:1 com formulação.

Para estudos de vacina que utilizaram NLC_{V2} em uma N:P de 15, rvRNA foi diluído para 1.000 µg/ml em sacarose a 10% e complexado em 1:1 com formulação. Complexos foram então utilizados puros ou diluídos em sacarose a 10% para as doses desejadas.

CARACTERIZAÇÃO DE VLP DE ZIKV

[0553] ZIKV-rvRNA foi complexado com NLC_{v1} em uma N:P de 50 e 100 ng foi incubado em uma monocamada de células 293T em uma placa de 6 poços em mídia Optimem por 4 horas, seguido por substituição por mídia completa e uma incubação final de 20 horas. Sobrenadantes foram então coletados e sobrepostos em uma solução de sacarose a 20% e peletizado por ultracentrifugação a 100.000 xg por 2 horas a 10 °C (OPTIMA MAX-XP, Beckman, Indianapolis, IN). Péletes foram então ressuspensos em PBS e analisados por SDS-PAGE e western blot. Para detectar proteínas de ZIKV seguindo a transferência para a membrana de nitrocelulose, fluidos ascíticos imunes de camundongo anti-ZIKV (WRCEVA, UTMB) foram utilizados em uma diluição de 1:5.000 e uma diluição de 1:4.000 do reagente secundário, o IgG-URP anticamundongo de cabra (Southern Biotech), foi utilizado para visualizar bandas de proteína. Para a avaliação de microscopia de elétron de transmissão (TEM), os sobrenadantes 293T acima foram peletizados através de uma solução de sacarose a 20% em uma almofada de sacarose a 70% por ultracentrifugação a 100.000 xg por 2 horas a 10 °C. A interfase foi então coletada e sacarose substituída por PBS por filtração através de um filtro de 100-kDa Amicon (Millipore, Billerica, MA). Para confirmar que os rvRNAs que codificam ZIKV prM/E eram funcionais e induziram a secreção de partículas do tipo vírus ZIKV (VLPs), uma gota de filtrado não diluído foi seca em uma grade de carbono furada com 300 mesh, manchada com acetato de uranila e examinada em um 200 kV FEI TEM para a presença de VLPs de ZIKV por Western blot (Figura 21C) e microscopia de elétron (Figura 2 ID).

ENSAIO SEAP

[0554] Para caracterizar a expressão de proteína de

rvRNA formulado, foi utilizado um sistema repórter de SEAP. Vinte e quatro horas depois que as células de BHK foram incubadas com rvRNA formulado com SEAP, sobrenadantes foram coletados e a atividade de SEAP foi medida por ensaio NovaBright™ Phospha-Light™, por instruções do fabricante (ThermoFisher). Consultar a Figura 23D.

TITULAÇÃO DE ANTICORPO NEUTRALIZANTE

[0555] Testes de neutralização de redução de placa ($PRNT_{80}$) a oitenta por cento foram realizados em células Vero conforme descrito anteriormente (Beaty et al., Arboviruses, Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Schmidt NJJ, Emmons RWW, Eds., Am. Public Health Assoc., Washington, DC, pp. 797 a 855 (1989)) com uso de cepa de ZIKV FSS 13025 como o vírus de controle. Brevemente, um estoque de ZIKV FSS 13025 foi diluído para ~$1x10^3$ unidades de formação de placa por milímetro (PFU/ml) e a titulação foi confirmada por ensaio de placa em células Vero. Amostras foram inativadas por calor a 56 °C por 30 min então diluídas em série em DMEM que contém 1% de FBS. Todas as amostras diluídas foram então diluídas mais 2 vezes pela adição de ~200 PFU de ZIKV, misturada, e incubada a 37ºC por 1 hora, então transferida para 90% de monocamadas confluentes de células Vero em placas de 6 poços (Costar) e incubadas a 37ºC por 1 hora. A sobreposição que contém 1% de agarose em DMEM com 1% de aminoácidos não-essenciais, L-glutamina a 1%, e gentamicina a 1%, foi então pipetada em cada poço e placas foram incubadas por 3 dias a 37 °C. Células foram então fixadas em 10% de formaldeído e placas visualizadas seguindo manchamento de cristal violeta.

[0556] Para seleção descendente de um único construto de rvRNA de ZIKV para desenvolvimento continuado, foram comparadas as respostas de anticorpo neutralizante (nAb) entre rvRNAs que codifica ZIKV prM/E com nativo assim como sequências de sinais JEV. O construto de sequência de sinal de ZIKV nativo induziu 100% de seroconversão após uma dose única e titulações significativamente maiores de nAb após duas

doses em comparação ao rvRNA que codifica a sequência de sinais JEV (Figuras 34A e 34B).

ENSAIO DE CÉLULA MONONUCLEAR SANGUÍNEA PERIFÉRICA HUMANA

[0557] Estudos que envolvem doadores humanos foram aprovados pelo Comitê de Revisão Institucional Ocidental. Sangue total heparinizado foi obtido de 6 doadores normais mediante consentimento informado e células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram isoladas conforme descrito anteriormente. Consultar Seubert et al., *J Immunol*. 180(8):5.402 a 5.412 (2008). Um milhão de células por 150 µl de volume de RPMI livre de soro foram plaqueadas em placas de 96 poços de grau TC de fundo em U e complexos de formulação/rvRNA foram adicionados às células em um volume de 50 µl e incubados a 37 °C. Vinte e quatro horas depois, placas foram centrifugadas por 10 min a 1,8K de rpm, e sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C. ELISA de Mip-1β foi realizado conforme descrito anteriormente. Consultar Seubert et al., J Immunol. 180(8):5.402 a 5.412 (2008).

ESTUDOS DE ANIMAIS

[0558] Todos os estudos de animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animal Institucional de Pesquisa de Doença. A instalação em que os estudos de animais foram conduzidos é credenciada pela Associação de Avaliação e Credenciamento de Laboratório Internacional de Cuidados de Animais e segue a diretriz apresentada pelo Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, Conselho de Pesquisa Internacional, 2011. Todos os tamanhos de amostras foram determinados com base em análise de força assumindo doses de desafio de LD100 e taxas de sobrevivência subsequentes de 0,99 versus 0,01 com $\alpha=0.05$ com uso de a teste exato de Fisher unilateral. Camundongos foram não especificamente e cegamente distribuídos em seus respectivos grupos. Nenhum critério de exclusão foi estabelecido antes de começar os estudos.

[0559] Para analisar imunogenicidade e a tolerância

em porquinhos-da-índia, porquinhos da Índia de Hartley de 400 a 450 g (Charles River) foram vacinados IM ou de modo intradérmico (ID) utilizando agulhas Nanopass Micronjet600 (Nanopass Technologies, Ltd.) com uma mistura de 1:1 que contém NLC e rvRNA que codifica prM/E de ZIKV no músculo de quadríceps traseiro em um volume total de 250 µl. Vinte e quatro horas depois, o diâmetro da expansão de sítio de injeção de ID foi medido. Sangue foi coletado nos pontos de tempo indicado nas Figuras por meio da veia femoral e soro foi coletado seguindo centrifugação em baixa velocidade e armazenado em -20ºC até que titulações de $PRNT_{80}$ tenham sido determinadas conforme descrito acima.

ESTATÍSTICAS

[0560] Análise estatística foi realizada com uso de software GraphPad Prism (versão 7.0c) e RStudio (versão 0.99.491). A distribuição e variância de dados foram avaliadas para normalidade e similaridade com ou sem transformação por análises qqplot e boxplot. ANOVAs unidirecional e bidirecional com teste de múltipla comparação de Tukey foram usadas.

EXEMPLO 5: ANÁLISE DE SANGUE TOTAL

[0561] De modo a analisar a capacidade das formulações de NLC de estimular células de sangue total humanas para liberar quimiocinas, ensaios de sangue total humano foram realizados. Sangue total heparinizado foi obtido de oito doadores normais. As formulações indicadas (estoque a 5% de óleo) foram adicionadas a sangue total (0,4% de óleo final). Sangue total foi incubado a 37 °C a CO_2 por 24 horas. O sobrenadante de plasma foi aspirado e analisado para beta-quimiocinas CCL2 e CCL4 e quimiocinas de recrutamento de neutrofila CXCL1, CXCL5 e CXCL8. Q386 foi considerado instável na presença de sangue total resultando em nenhum dado sendo coletado. Células de sangue total humanas liberou níveis maiores de quimiocinas em resposta a QG768 conforme comparado às outras formulações testadas. (Figuras 7A a 7E).

EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE

COMPLEXOS DE NLC-RVRNA IN VITRO.

[0562] Foi incubado rvRNA com NLCs de composições variadas na presença ou ausência de RNase A e a integridade do RNA extraído foi avaliada com uso de eletroforese de gel de agarose de desnaturação. Foi estabelecido que determinados requisitos composicionais foram essenciais para proteção de RNA; especificamente, NLCs com um teor de Tween 80 relativamente alto (70% de tensoativo total e massa lipídica catiônica) não protegeu contra degradação de RNase (Figura 36A) e não poderia entregar rvRNA *in vivo* (Figura 36B). Em contrapartida, NLCs com fração de Tween 80 relativamente inferior na fase de tensoativo (35% de tensoativo total e massa lipídica catiônica) protegeram rvRNA da degradação (Figura 2D). Como resultado, estudos subsequentes foram conduzidos com NLCs que contém Tween 80 não maiores do que 35% da fração de tensoativo total, subsequentemente denominado como NLC_{v1}. Em seguida, procurou-se otimizar as condições de complexação, conforme medido pela razão molar de nitrogênio (N) para fosfato (P) (N:P), para maximizar a transfecção *in vitro*. Formulações CNE ou NLC_{v1} foram complexadas com rvRNA que codifica SEAP em uma faixa de valores de N:P e 100 ng de cada complexo de rvRNA tendo sido incubado com células de BHK de um dia para o outro. Foi comparada a expressão de SEAP como uma função de N:P entre NLC_{v1} e CNE (Figura 2E). Visto que N:P aumentou, foram observados níveis progressivos de SEAP com expressão significativamente maior com CNE em comparação a NLC_{v1} em N:P < 50. No entanto, em N:P ~ 50, a expressão de SEAP com CNE teve pico, diminuindo em N:P > 50, potencialmente devido a citotoxidade evidenciada por destacamento celular significativo. De modo interessante, em N:P ~ 50, a expressão de SEAP no grupo NLC_{v1} foi similar a CNE e continuou a aumentar. Para estudos de comparação a jusante entre NLC_{v1} e CNE, foi utilizada uma N:P de 50, o que resultou em níveis de expressão de SEAP similares *in vitro*.

EXEMPLO 7: AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES SELECIONADAS PARA SUA CAPACIDADE DE ENTREGAR RVRNA E

RESULTADO EM EXPRESSÃO DE PROTEÍNA

[0563] Em dados não mostrados, foi determinado que formulações QG767 e QG768 poderiam ser aprimoradas para diminuir a concentração de Tween. Titulações de anticorpo observadas ao usar essas formulações foram variáveis com vários camundongos não responsivos. A redução de Tween nessas formulações (pra chegar em formulações QG807, 808 e 906) resultou em titulações de $PRNT_{80}$ aumentadas, e 100% de seroconversão.

[0564] No trabalho de caracterização de NLC_{v1} e NLC_{V2} foi observada uma redução de N:P ideal de > 50 a 15 (Figura 23D). Concomitante com essa redução foi o aumento da razão molar S:O de 0,18 a 1,68, o que reduziu o tamanho de partícula de ~100 nm a ~40 nm (Tabela 2). Visto que o teor de óleo total entre NLC_{v1} e NLC_{V2} difere somente ligeiramente (~20%), em teoria, reduzir o tamanho de partícula em aproximadamente 2,5 vezes as quantidades para aumentar aproximadamente 12 vezes no número de nanopartículas, assumindo geometria esférica. É provável que o tamanho menor e número teoricamente maior de nanopartículas em NLC_{V2} permite a distribuição de cópias de rvRNA ligadas em superfície a um número maior de células.

[0565] Para avaliar as várias composições de formulação para sua capacidade de entregar rvRNA *in vitro*, rvRNA repórter que codifica fosfatase alcalina secretada (SEAP) foi gerado. Células 293 T ou BHK-21 foram transfectadas com tanto com 10 como com 100 ng de rvRNA que codifica SEAP, formuladas com CNE, QG807, QG808, QG906, ou com sacarose a 10% ou lipofectamina 2000 como controles positivo e negativo, respectivamente, e sobrenadante foi coletado 24 horas após transfecção e analisado para atividade de SEAP (Figuras 8A a 8B). Um efeito mediado por dose e célula na expressão de SEAP foi observado através das várias formulações com células 293T sendo mais refratário para expressão de SEAP mediada por transfecção. Em células BUK, 100 ng de rvRNA formulado com QG807, QG808, ou QG906 resultou em níveis maiores de expressão de SEAP

em comparação a CNE enquanto na dose inferior de RNA, formulações de CNE e QG906 resultaram em maior expressão de SEAP. A atividade de SEAP foi medida por ensaio NovaBright™ Phospha-Light™, por instruções do fabricante (ThermoFisher).

[0566] Em seguida, a cinética de expressão de proteína *in vivo* foi avaliada, seguindo uma injeção intramuscular com rvRNA que codifica SEAP formulada em CNE, QG807, QG808, ou 10% de sacarose e níveis de expressão de SEAP comparados a camundongos com injeção simulada em vários pontos de tempo após a injeção (Figura 9). RNA formulado em CNE, QG807, e QG808 demonstrou perfis de expressão muito similares ao longo do tempo com atividade de SEAP 33 a 36 vezes maior em comparação ao RNA formulado com sacarose a 10% no pico de 6 dias seguindo a injeção. No dia 21, todos os grupos retornaram aos níveis de base de atividade de SEAP.

[0567] Finalmente, a capacidade de carregamento de RNA de QG807 foi avaliada para complexar a formulação em 1:1 com concentrações de rvRNA variadas. Seguindo uma reação de complexação, RNA formulado foi então diluído a uma concentração final de 20 ou 2 µg/ml e 50 µl de cada foi injetado por meio da rota intramuscular em camundongos C57BL/6 para doses finais de 1 e 0,1 µg, respectivamente. Soro foi então coletado nos dias 3 e 8 após a injeção e analisado para atividade de SEAP (Figura 10). Para a dose de 1 µg, a menor concentração de RNA testada (40 µg/ml) resultou no maior nível de atividade de SEAP. Concentrações inferiores não poderiam ser testados nessa dose devido a restrições de volume de injeção. O efeito de concentrações inferiores, no entanto, poderia ser observado para doses de 0,1 µg. A partir desses dados, pode-se concluir que a capacidade de carregamento ideal é entre 40 e 4 µg/ml de RNA.

EXEMPLO 8: FORMULAÇÕES PODEM SER MODIFICADAS PARA INTENSIFICAR A IMUNOGENICIDADE INDEPENDENTE DE ENTREGA

[0568] Formulações podem ser modificadas para

intensificar a imunogenicidade independente de entrega e aquelas acentuações são dependentes da presença de lipídio sólido. Com base nos dados dos ensaios de liberação de quimiocina de sangue total *in vitro* seguindo estimulação com vários NLCs que contém tensoativo hidrofílico de alta porcentagem foi hipotetizado que diferentes tensoativos hidrofóbicos presentes em NLCs, com uma composição de tensoativo hidrofílico de baixa porcentagem, poderia modular de modo diferente respostas imunes *in vivo*. Para testar essa hipótese, um NLC com uma alta razão de tensoativo hidrofílico (2% de tween 80), e três NLCs com uma baixa razão de tensoativo hidrofílico (0,5% de tween 80) e diferentes tipos de tensoativos hidrofóbicos (Span 85, Span 80, e Span 60), foram complexados tanto com RNA que codifica fosfatase alcalina secretada (SEAP) como com RNA que codifica genes ZIKV prM e E. Não foi observado nenhum efeito prejudicial na estabilidade coloidal como resultado. Uma única dose de 100 ng de EVI foi administrada a camundongos C57B1/6 e comparada com ou RNA formulado ou não formulado com CNE (Figura 11A). Expressão de proteína, conforme medido por ensaio de SEAP em soro coletado 3 dias após injeção, foi acentuado em 25 vezes em NLCs formulados com RNA que contêm tensoativo hidrofílico de baixa porcentagem (0,5% de tween 80), mas níveis de expressão em soro não foram diferentes entre NLCs formulados com RNA que contêm diferentes tensoativos hidrofóbicos ou RNA formulado com CNE (Figura 11A).

[0569] Em contraste, foi observada diferença significativa em respostas de anticorpo neutralizante entre cada RNA formulado com NLC (Figura 11B). Embora as baixas respostas de anticorpo neutralizante observadas em camundongos imunizados com RNA formulado com QG768 (que contém 2% de tween 80) pudessem ser provavelmente atribuídas a baixos níveis de expressão de antígeno, as diferenças observadas entre CNE e QG906, QG808, ou QG807 são provavelmente não devido a diferenças de expressão de antígeno. Visto que QG906, QG808, e QG807 diferem somente na composição de tensoativo hidrofóbico, que contém tanto Span 80, Span 85, como Span 60,

respectivamente, as diferenças de imunogenicidade observadas poderiam ser atribuídas a esse componente. De modo interessante, CNE, que difere de NLCs em composição de óleo, em que o primeiro é somente composto de esqualeno enquanto o último é composto tanto por esqualeno quanto por dynasan, um lipídio sólido, não foi significativamente diferente de QG808, que contém o mesmo tensoativo hidrofóbico que CNE (Span 85). Visto que CNE e QG808 diferem somente em sua composição de óleo com o último tendo a adição do lipídio sólido, dynasan, foi testado em seguida o efeito de substituir Span 85 em CNE com Span 60, em imunogenicidade de RNA formulado. CNEs tanto com Span 85 como com Span 60 foram complexados com RNA que codifica genes ZIKV prM e E e em comparação a RNA formulado com NLCs compostos tanto por Span 85 como por Span 60, e administrados a camundongos C57B1/6 por uma única injeção de 100 ng de EVI. Por 14 dias após a imunização, aumentos significativos de titulações de anticorpo neutralizante (nAb) foram somente observados entre NLCs quando Span 85 foi substituído por Span 60, indicando a importância do componente de óleo sólido (Figura 11C). Visto que níveis de expressão de SEAP entre os diferentes grupos de formulação foram idênticos (Figuras 11A), diferenças de titulações de nAb foram prováveis devido a diferenças na identidade de tensoativo hidrofóbico. Para confirmar que os níveis de expressão de proteína entre CNE e NLC_{v1} não mudaram ao longo do tempo, C57BL/6 foram imunizados com 100 ng de rvRNA de SEAP formulado ou não formulado e a atividade de SEAP medida em soro coletado nos dias 3, 7, 14, 21, e 28 após a injeção (Figura 25) - nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos CNE e NLC_{v1}.

EXEMPLO 9: RNA FORMULADO COM NLC FORNECE IMUNOGENICIDADE DE DOSE ÚNICA E EFICÁCIA

[0570] Com base nos dados acima, foram realizados todos os experimentos a jusante com QG807 (Span60). Para testar a eficácia de respostas imunes elicitadas por uma dose única de RNA formulado com NLC, camundongos com 1 µg de RNA formulado com tanto com NCE como com NLC

foram imunizados e imunogenicidade e eficácia foram comparadas a 10 μg ou 1 μg de RNA não formulado. Conforme observado nos experimentos anteriores. Foi visto uma resposta de anticorpo neutralizante significativamente maior em 14 dias após a imunização única em grupos formulados com NLC em comparação a grupos formulados com CNE ou RNA puro (Figura 2A). No entanto, a dose de 1 μg reduziu as titulações de anticorpo neutralizante gerais em comparação a doses de 0,1 μg vistas em experimentos anteriores (Figura 11B). Essas constatações foram subsequentemente repetidas em experimentos de acompanhamento.

[0571] Por exemplo, C57BL/6 foram imunizados com 1 ou 0,1 μg de rvRNA formulado com NLC_{v1} (utilizando Span 60 como o tensoativo hidrofóbico) e em comparação a doses 10 vezes maiores não formuladas em dois experimentos separados em que um experimento analisou titulações de nAb pós iniciação enquanto o outro incluiu uma vacinação de intensificação no dia 28. Camundongos foram periodicamente sangrados e titulações de nAb foram analisadas por $PRNT_{80}$ (Figuras 18A a 18B). Em ambos os experimentos, foram observadas titulações de nAb de pico no dia 14, com as doses formuladas de 0,1 μg induzindo titulações significativamente maiores do que as doses formuladas de 1 μg. No entanto, no dia 88 e 156 após uma administração única, o grupo formulado com 0,1 μg exibiu uma queda significativa em titulações de nAb, em comparação a titulações de pico no dia 14, de maneira similar aos grupos não formulados com 10 μg, enquanto o grupo formulado com 1 μg não mostrou mudança significativa de titulação (Figura 18A). Após imunização de intensificação, foi observada queda de titulação de nAb significativa entre os dias 14, 126, e 209 mesmo com uma imunização intensificadora no dia 28 no grupo formulado com 0,1 μg enquanto o grupo formulado com 1 μg não mostrou mudança significativa de titulação (Figura 18B).

[0572] Para analisar as respostas de célula T pós-contração após imunização intensificadora, foi intensificado um subconjunto de cada grupo de camundongos com suas respectivas formulações de vacina e

baços coletados 46 dias depois e esplentócitos estimulados com um pool de peptídeos correspondentes a epítopos CD8 em ZIKV prM e E (Muthumani *et al*, 2016; Elong Ngono *et al*, 2017) (Figuras 12B a 12F). Embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada para células T CD4 ativadas (Figura 12B, 12C), RNA formulado com NLC induziu níveis significativamente maiores de células T $CD8^+$ $IFN\gamma^+$ e $Cd107a^+$ em comparação a RNA formulado com CNE ou não formulado (Figuras 12D, 12E). Embora RNA formulado com NLC não tenha induzido níveis significativamente maiores de células T de $CD8^+$ TNF-α^+ em comparação a RNA formulado com CNE, níveis dessas células T de $CD8^+$ ativadas foram significativamente maiores do que grupos de RNA não formulado (Figura 12F). Os camundongos restantes que não foram intensificados foram então desafiados em 30 dias após a imunização única. O modelo de desafio utilizado foi anteriormente descrito (Smith *et al*, 2017) e envolve a administração de um receptor de interferon alfa (IFNAR) que bloqueia o anticorpo monoclonal 1 dia antes e 1 e 4 dias após o desafio de modo a aumentar a suscetibilidade desses camundongos imunocompetentes a cepa 41525 de ZIKV Dakar.

[0573] Para analisar imunogenicidade e eficácia da plataforma de vacina otimizada, NLC_{V2} foi complexado com rvRNA em uma razão de N:P minimamente reativa, mas imunogênica, e usada para imunizar camundongos C57BL/6 por meio da rota IM com 100, 30, 10, e 3 ng complexado com NLC_{V2} em uma N:P de 15 (n=14/grupo) e as respostas foram comparadas a camundongos imunizados com 100 ng de rvRNA formulado com NLC_{v1}- (n=14) ou CNE- (n=4) na mesma N:P, que é subideal para suas composições. Um estudo separado que compara NLC_{v1} e CNE em sua N:Ps ideal é resumido na Figura 28. Doses não formuladas de 100 e 10 ng foram administradas junto com vacinação simulada como controles (n=14/grupo). Duas semanas após uma administração única, camundongos foram sangrados para quantificar titulações de nAb por $PRNT_{80}$ e 4 camundongos por grupo foram eutanizados e esplentócitos foram isolados, estimulados com um pool de peptídeos correspondente a epítopos de célula T CD8+ de murina em prM/E de ZIKV

(34,50), e respostas de célula T medidas por citometria de fluxo (Figuras 20A a 20B).

[0574] Foi observada 100% de seroconversão somente em grupos formulados com NLC_{V2} que recebem doses de 100, 30, e 10 ng com titulações $PRNT_{80}$ médias de 1:604, 1:302, e 1:113, respectivamente. Foi observado 25% de seroconversão no grupo com dose de 3 ng, similar ao 100 ng de grupo formulado com NLCY em uma razão de N:P subideal. O grupo formulado com CNE funcionou significativamente melhor do que NLCvl em uma N:P de 15, se correlacionando com expressão de SEAP *in vitro* acentuada em níveis de N:P inferiores (Figura 3C), no entanto, a mesma dose formulada com NLC_{V2} na mesma N:P resultou em aumento de ~13 vezes em titulações de nAb ($PRNT_{80}$ médio de 1:604 vs 1:48, $p<0,0001$).

[0575] Em termos de respostas de célula T CD8+, foram observadas porcentagens significativas de células T $B220_{10}$CD8+IFNγ+, em comparação a vacinação simulada, em camundongos que recebem uma dose única de 100 e 30 ng formulada com NLC_{V2}. Essas respostas foram significativamente reduzidas em comparação a 2 doses de 1 µg formuladas com NLC_{v1} em N:P de 50 (Figura 28E), confirmando que um formato de acentuação de iniciação pode intensificar respostas celulares imunes, conforme anteriormente demonstrado. Consultar Knudsen et al., J Virol. 88(21): 12.438 a 12.451 (2014).

[0576] Finalmente, os 10 camundongos restantes por grupo foram desafiados 30 dias após uma administração única, conforme descrito acima, e sangrados 4 dias depois para quantificar viremia por ensaio de placa (Figura 20C). Camundongos foram monitorados diariamente para sinais de doenças e perda de peso (Figuras 20D a 20E). Quaisquer camundongos que perderam mais do que 20% de seu peso pré-desafio, ou apareceram moribundos, foram eutanizados nos pontos de tempo indicados (Figura 20D). Todos os camundongos com vacinação simulada e não formulada a 100 ng experimentaram altos níveis de viremia (entre 2,6 e 5,8 Log_{10} PFU/ml) enquanto

1 de 10 camundongos no grupo com 10 ng não formulado foi protegido de viremia detectável (limite de detecção = 50 PFU/ml). Nos grupos NLC_{V2}, as doses de 100, 30, e 10 ng foram 100% protegidas de viremia detectável e a dose de 3 ng protegeu 6 de 10 camundongos. Um animal de 10 no 100 ng formulado com NLC_{v1} no grupo N:P subideal não foi protegido de viremia. Todos os grupos NLC_{v1} e NLC_{V2} foram protegidos de perda de peso significativa e morte, incluindo a dose de 3 ng formulada com NLC_{V2}. Grupos não formulados experimentaram perda de peso significativa com somente 10% e 20% sobrevivendo ao desafio até 30 dias após o desafio nos grupos de 100 e 10 ng de dose, respectivamente, em comparação a 100% de morte no grupo de vacinação simulada após 10 dias após o desafio.

[0577] Embora RNA não formulado em ambas as doses tenha sido incapaz de proteger totalmente todos os camundongos de viremia, RNA formulado tanto com CNE quanto com NLC demonstraram proteção completa contra viremia detectável (limite de detecção = 50 unidades de formação de placa/ml) (Figura 12G). Em termos de sobrevivência, todas as doses de 1 µg (não formulado, CNE, ou formulado com NLC) protegeu 100% dos camundongos da morte enquanto 80% dos camundongos vacinados com 10 µg de RNA não-formulado sobreviveram, em comparação a 17% de sobrevivência nos camundongos com vacinação simulada.

IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES

[0578] Para analisar a expressão de proteína ou imunogenicidade em um modelo de camundongo imunocompetente, cinco camundongos C57B1/6 fêmeas com 4 semanas de idade (Charles River) por grupo foram vacinados por formulação intramuscular (IM) no músculo de quadríceps traseiro com uma mistura de 1:1 que contém RNA e em um volume total de 50 µl. Em vários pontos de tempo, sangue foi coletado por meio da rota retro-orbital e soro foi coletado seguindo centrifugação em baixa velocidade e armazenados em -20 °C até que titulações de $PRNT_{80}$ tenham sido determinadas

conforme descrito acima. Seguindo uma única imunização intramuscular, camundongos injetados com as formulações (/QG767 e /QG768) mostraram anticorpo neutralizante com ZIKV de titulação 14 dias seguindo imunização conforme medido por ensaios de teste de neutralização de redução de placa ($PRNT_{80}$) como em comparação a camundongos imunizados com controle ou as outras formulações que carecem de monoéster de sorbitano (por exemplo, Span).

EXEMPLO 10: MODIFICAÇÕES ADICIONAIS PARA NLCS PARA INTENSIFICAR A CAPACIDADE DE CARREGAMENTO E ENTREGA.

[0579] Foi demonstrado anteriormente que esqualeno, o componente de óleo líquido de NLCs, ativa vias inflamatórias incluindo ativação de inflamossomo de dependente de caspase e Il-18 (Desbien *et al*., 2015; dados não publicados). Visto que a replicação viral é negativamente impactada por esses eventos (Chen *et al*., 2015), procurou-se reduzir o teor de esqualeno enquanto aumenta concentrações de DOTAP de modo a intensificar a capacidade de carregamento de RNA dos NLCs. Para testar isso *in vivo*, foi gerado 4 formulações de alta carga de RNA adicionais, QG924, QG925, QG941, e QG942 que contêm, todos a mesma alta concentração de DOTAP, mas maior do que de QG807 e reduzindo concentrações de esqualeno entre cada formulação. Foi então complexado o replicon que expressa SEAP com QG807 a 40 µg/ml e expressão comparada de SEAP no dia 3 seguindo uma dose de 1 µg IM a QG807, QG924, QG925, QG941, e QG942 complexados em uma concentração de RNA 10 vezes maior, 400 µg/ml, e entregue na mesma dose de 1 µg de EVI (Figura 13 A). Embora QG807 complexado com RNA a 400 µg/ml foi incapaz de entregar uma dose de 1 µg eficaz, como em comparação a QG807 complexado com RNA a 40 µg/ml, QG942 complexado com 400 µg/ml de RNA produziu níveis de expressão de SEAP similares seguindo uma dose de 1 µg em comparação à mesma dose entregue com QG807 complexado a 40 µg/ml.

[0580] Nos experimentos acima, NLC_{v1} ou CNE foi

misturado 1:1 com 40 µg/ml de RNA (N:P = 50), que foi a menor concentração que 1) permitiu que uma dose de 1 µg de RNA em um volume de injeção de 50 µl, e 2) resultou em expressão de SEAP ideal *in vitro* (Figura 3C) e *in vivo* (Figura 26). No entanto, um valor de N:P de 50 se traduz para um excesso relativamente grande de formulação, que tem riscos de capacidade de tolerância associada à formulação com crescentes requisitos de dose; esqualeno emulsificado e DOTAP (lipídios catiônicos em geral) são imunoestimulantes, e altas quantidades podem induzir reatogenicidade local e inflamatória. Consultar Lv et al. J Control Release. 114(1): 100 a 109 (2006); Desbien et al., Eur J Immunol. 45(2):407 a 417 (2015). Como resultado, procurou-se projetar e sintetizar uma formulação de NLC que pode entregar alta dose de RNA em valores de N:P significativamente inferiores. A formulação resultante foi uma versão derivada ainda que fisicoquimicamente distinta de NLC_{v1}, subsequentemente denominada como NLC_{V2}; propriedades fisicoquímicas são resumidas na Tabela 2. Antes da inserção de NLC_{V2}, foi fabricada versões altamente concentradas de NLC_{v1} para aumentar a capacidade de carregamento de RNA - some que contém tanto quanto 30% em p/v de esqualeno e 1,8% em p/v de dynasan 114, mas com razão de S:O idêntica. No último caso, foi permitido manter o tamanho de nanopartícula e composição química constante enquanto aumenta a capacidade de carregamento de RNA em virtude de concentração de nanopartícula aumentada. Embora essa abordagem tenha superado a limitação prática de carregar altas quantidades de RNA, isso não evito o uso de formulação excessiva. Como resultado, em versões subsequentes, foi reduzida a quantidade de esqualeno e Dynasan 114 para tão baixo quanto 3,75% em p/v de esqualeno e 0,24% de dynasan 114, respectivamente, enquanto mantém a composição de tensoativo total ([DOTAP]+[Span 60]+[Tween 80]) e razão ([DOTAP]:[Span 60]:[Tween 80]) constante, aumentando de modo eficaz a razão de S:O 9 vezes (de 0,18 a 1,68) em NLC_{V2} em relação a NLC_{v1}. De modo interessante, quando essas formulações complexadas foram triadas com rvRNA de SEAP *in vivo*, foi observada crescente expressão de SEAP com reduzida concentração de

esqualeno (Figura 27). Devido a essa razão de S:O relativamente alta, NLC_{V2} exibiu um diâmetro médio de ~40 nm, uma redução de quase 2 vezes em tamanho de partícula em comparação a NLC_{v1} (Figura 23 A), conforme medido por DLS. De modo similar a NLC_{v1}, NLC_{V2} protegeu rvRNA de degradação de RNase (Figura 23B). Para confirmar a capacidade de carregamento aumentada de NLC_{V2}, foram complexadas concentrações progressivas de rvRNA com NLC_{v1} ou NLC_{V2} (1:1 em volume), e RNA não ligado quantificado por ensaio de retardamento com gel eletrofórético (Figura 23 C). Embora 100% de RNA tenha sido ligado a NLC_{v1} em concentrações de rvRNA menores do que 100 µg/ml (N:P > 20), NLC_{V2} exibiram 100% de ligação de RNA em concentrações de rvRNA em até 10 mg/ml.

[0581] Para testar o efeito de reduzir esqualeno na morte celular, foram incubadas células de BHK de um dia para o outro com uma diluição de 1:20 de cada formulação de alta carga de RNA por 4 horas então analisadas para morte celular por iodeto de propídio (PI) e manchamento de anexina para quantificar células vivas, por citometria de fluxo, que não sofreram apoptose (Figura 13B). Foi observada a maior quantidade de células vivas nas células tratadas com QG942, que se correlaciona com a menor concentração de esqualeno enquanto todos os outros componentes entre cada formulação permaneceram idênticos.

[0582] Para avaliar o N:P ideal que resultaria em expressão de SEAP máxima *in vitro*, foi complexado NLC_{V2} com rvRNA de SEAP em várias razões de N:P e incubadas doses de 100 ng de rvRNA com células de BHK de um dia para o outro, conforme descrito acima. Foi observado pelo menos uma redução de 5 vezes em N:P ideal para NLC_{V2} em comparação a NLC_{v1}, de >100 para NLC_{v1} entre 15 e 37 para NLC_{V2} (Figura 23D). De modo interessante, o nível máximo de expressão de SEAP para NLC_{V2} também foi acentuado -2,5 vezes, em comparação a NLC_{v1}. Finalmente, em relação a CNE (Figura 3C), NLC_{V2} forneceu aumento de quase 10 vezes de expressão de SEAP máxima em cerca de 1/3 do valor de N:P.

[0583] Em seguida QG942 foi movido adiante em estudos de imunogenicidade com uso de 400 a 450 g em porquinhos da Índia de Hartley (Charles River) para observar se é possível induzir anticorpos neutralizantes anti-ZIKV em um modelo de grande roedor. Nesse estudo, foi carregado QG942 (NLC_{V2}) com RNA em uma concentração de 400 µg/ml (uma concentração 10 vezes mais alta) e doses de 50, 5, e 0,5 µg comparadas por meio de EVI ou de modo intradérmico (ID) com uso de agulhas Nanopass Micronjet 600 (Nanopass Technologies, Ltd.) se direcionam a agulhas de 5 e 0,5 µg de RNA carregados com QG807 a 40 µg/ml de RNA com a mistura de 1:1 que contém NLC e rvRNA que codifica ZIKV prM/E no músculo de quadríceps traseiro em um volume total de 250 µl. Foi também incluído 50 µg de RNA não formulado como controle. Vinte e quatro horas depois, o diâmetro da expansão de sítio de injeção de IM/ID foi medido. Sangue foi coletado nos pontos de tempo indicado nas legendas de Figura por meio da veia femoral e soro foi coletado seguindo centrifugação em baixa velocidade e armazenado em -20ºC até que titulações de $PRNT_{80}$ tenham sido determinadas conforme descrito acima. Por 14 dias após uma imunização única, foi observada uma resposta de anticorpo neutralizante dependente de dose indicando que houve sucesso em entregar a maior dose de 50 µg dose de RNA que não poderia ser alcançada com QG807. Adicionalmente, não foi observada nenhuma diferença significativa entre as agulhas de 5 e 0,5 µg entregues por QG942 ou QG807 quando analisadas 28 dias depois, embora uma ligeira tendência a favor de QG942 pode sugerir que reduzir esqualeno poderia ser vantajoso. Foi observada uma tendência de resposta de dose, embora não houvesse diferença significativa entre doses, com as doses de 50, 5, e 0,5 µg de IM resultando em titulações de $PRNT_{80}$ médias de 1:761, 1:452, e 1:226, respectivamente, enquanto doses de ID resultaram em titulações de $PRNT_{80}$ médio de 1:905, 1:380, e 1:269, respectivamente. Consultar a Figura 23E. De modo interessante, diferenças significativas foram observadas entre grupos formulados com NLC_{v1}- e NLC_{V2} em dose de 5 µg de rvRNA, com rvRNA formulado com NLC_{V2} induziu titulações ~4 ou ~8 vezes

maiores de nAb em rotas de administração ID ou IM, respectivamente. Para preferência, a expressão de SEAP *in vitro* nessas razões de N:P foi acentuada ~8,4 vezes (Figura 23D) em NLC_{V2} em comparação a NLC_{v1}. Para caracterizar NLC_{V2} *in vivo* em termos de expressão de proteína, reatogenicidade, e imunogenicidade, optou-se por testar 4 a 5 razões de N:P, incluindo aquelas que se correlacionam com atividade de SEAP *in vitro* ≥ 5,8 Log_{10} RLU (100, 37, 15, 5,6), e uma N:P de 3, fora da zona ideal hipotetizada. Para caracterizar a expressão de proteína, camundongos C57BL/6 foram injetados com FM com doses de 1000, 100, e 10 ng de rvRNA de SEAP em cada razão de N:P. Para caracterizar a reatogenicidade, 50 µg de rvRNA complexado com NLC_{V2} em cada N:P foram também injetados por meio de rota ID em porquinhos-da-índia e diâmetro de expansão foi medido. Vinte e quatro horas após injeção, camundongos foram sangrados para medir a atividade de soro SEAP e sítios de injeção de porquinhos-da-índia foram medidos (Figuras 22E a 22H). Para caracterizar a imunogenicidade, ZIKV rvRNA foi complexado com NLC_{V2} em cada N:P, e 1.000 ng ou 100 ng foi entregue por meio da rota FM em camundongos. Camundongos foram então sangrados 14 dias depois para quantificar as titulações de nAb (Figuras 22F a 22G).

[0584] Começando com a expressão de SEAP *in vivo*, razões de N:P ideais foram dependentes de dose, com N:P ideal de 15 para a dose de 1.000 ng, 37 para a dose de 100 ng, e 100 para a dose de 10 ng (Figura 22E). Conforme esperado, imunogenicidade apareceu para se correlacionar com a expressão de SEAP nas duas doses que foram comparadas (Figuras 22F a 22G). Na dose de 1000 ng, não foi detectada nenhuma diferença significativa em titulações de nAb com qualquer uma das razões de N:P testadas, similares a atividade de SEAP naquelas razões de N:P (Figura 22F). Na dose de 100 ng, não foi observada nenhuma diferença significativa in titulações de nAb entre razões de N:P de 37 e 15 e diferenças ligeiras, mas insignificativas em atividade de SEAP, no entanto, uma redução significativa de titulação ocorreu entre razões de N:P de 15 e 5,6 de maneira similar à atividade de SEAP (Figura 22G). Em

termos de reatogenicidade, foi observada uma redução significativa em diâmetro de expansão quando a razão de N:P foi reduzida 2,5 vezes de 37 para 15 (Figura 22H). De modo importante, esses dados sugerem que reduzir a N:P 2,5 vezes de 37 para 15 reduziria significativamente a reatogenicidade, mas causaria impacto mínimo em níveis de expressão de antígeno e imunogenicidade subsequente, especialmente em níveis maiores de doses de rvRNA. De fato, em valores de N:P de 15 e 37, um efeito de economia de dose foi observado visto que não houve uma diferença significativa de atividade de SEAP entre doses de 1.000 e 100 ng (Figura 22E). As maiores diferenças de atividade de SEAP entre doses foram observadas em baixas razões de N:P (Figura 22E).

EXEMPLO 11 CAPACIDADE DE CARREGAMENTO E ENTREGA DE RNA

[0585] De modo a entregar 10 µg de RNA em um volume de injeção de 50 µl (200 µg/ml de concentração de RNA), foram criados NLCs com capacidade de carregamento aumentada conforme comparado a QG807. A Figura 14 mostra que complexar 400 µg/ml de RNA em 1:1 (v/v) com QG807 (N/P ~ 4,8) não aprimorou significativamente a expressão de SEAP *in vivo* em relação a RNA puro ou não formulado. Por outro lado, QG807 fornece boa expressão de SEAP quando complexada com 1:1 (v/v) com 40 µg/ml de RNA (N/P ~ 48) em 1 ou 0,1 µg de dose de 10 µg de RNA. Isso sugere que, de modo a entregar 10 µg RNA foi preciso aumentar a capacidade de carregamento de NLCs.

[0586] Para aumentar a capacidade de carregamento, foi hipotetizado que reduzir o tamanho de partícula de NLC médio enquanto manter o volume total constante deve aumentar teoricamente o número total de partículas de NLC, traduzindo desse modo para aumentar em sítios de ligação de RNA. Como resultado, QG911 foi fabricado, que compartilha uma composição relativamente similar com QG807, exceto que 10 mM de citrato foi adicionado durante a fabricação e o mesmo foi microfluidizado para 10 passos a 206,84 MPa (30.000 psi) (em comparação a 5 passos a 206,84 MPa (30.000 psi) para

QG807) para obter um diâmetro de partícula médio menor. O diâmetro de partícula de média Z final de QG911 foi 87 nm, ou seja, ~17% menor do que QG807 (média Z = 105 nm).

[0587] Para diminuir mais o tamanho de partícula, QG912 foi fabricado com metade da razão de óleo/tensoativo do que QG911. Reduzir a quantidade de óleo em relação ao número total de tensoativo aumenta a razão de área de superfície (SA) para volume (V) de partículas de NLC e reduz assim o tamanho de partícula. Esse princípio é confirmado empiricamente nas Figuras 2A-B - NLCs com diferentes razões de óleo/tensoativo foram microfluidizados para 10 passos a 206,84 MPa (30.000 psi). A razão inferior de óleo/tensoativo de QG912 ajudou a reduzir o diâmetro médio Z para 63 nm.

[0588] Os dados de expressão de SEAP *in vitro* (dados não mostrados) mostraram que tanto QG911 quanto QG912 promoveram capacidade de carregamento de RNA maior do que QG807 - expressão de SEAP ideal para QG911 e QG912 foi cerca de 100 µg/ml de RNA em comparação a 40 µg/ml para QG807. De modo a carregar mais do que 100 µg/ml de RNA, a concentração de NLC total foi aumentada e QG924 (média Z = 110,6 nm) e QG925 (média Z = 58,6 nm) foram fabricados. Tanto QG924 quanto QG925 compartilham a mesma razão de óleo/tensoativo que QG911 e QG912, respectivamente, mas são aproximadamente 7,4 vezes mais concentrados. A expressão de SEAP *in vitro* mostrou que aumentar a concentração de NLC 7,4 vezes causou aumento adicional da capacidade de carregamento de RNA (estudo N1006-214) - a capacidade de carregamento ideal para QG924 foi cerca de 200 µg/ml e QG925 foi cerca de 400 µg/ml ou superior. Visto que QG925 tem metade do esqualeno e o tamanho de partícula médio menor do que QG924, foi hipotetizado que a redução tanto do teor de esqualeno como do tamanho de partícula ou sua combinação promoveu maior expressão. Para corroborar mais essa hipótese, foi fabricado QG941 e QG942, que têm 7,5% em p/v de esqualeno (óleo/tensoativo = 1,2) e 3,75% em p/v de esqualeno (óleo/tensoativo = 0,6), respectivamente. O experimento de expressão de SEAP *in vivo* com QG924,

QG925, QG941 e QG942 mostrou que a redução de óleo/tensoativo se correlaciona com o aumento de expressão em dose de 1 µg de RNA.

EXEMPLO 12 ENSAIO DE SANGUE TOTAL COM VÁRIOS SPANS

Materiais:		
Nome	**Comentários**	**Tipo**
QG752	4,75% de Esqualeno, 0,25% de Dynasan 114, 0,5% de Span 85, 2% de Tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio
QG766	5% de Esqualeno, 0,4% de DOTAP, 0,5% de Span 85, 2% de Tween 80	Emulsão
QG767	4,75% de Esqualeno, de 0,25% de Dynasan 114,0,4% de DOTAP, 0,5% de Span 80, 2% de Tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio
QG863	4,05% em p/v de esqualeno, 0,25% em p/v de Dynasan 114, 0,43% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 60, 2% de tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio
QG868	5% de Esqualeno, 0,4% de DOTAP, 0,5% de Span 60, 2% de Tween 80 SLN	Emulsão
QG983	4,05% em p/v de esqualeno, 0,25% em p/v de dynasan 114, 0,4% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 65, 2% em p/v de tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio
QG984	4,05% p/v de esqualeno, 0,25% p/v de dynasan 114, 0,4% p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 40, 2% em p/v de tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio

QG985	4,05% em p/v de esqualeno, 0,25% em p/v de dynasan 114, 0,4% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 20, 2% em p/v de tween 80	Nanoestruturado Carreador de lipídio
QG986	4,05% em p/v de esqualeno, 0,4% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 80, 2% em p/v de Tween 80	Emulsão
QG987	4,05% em p/v de esqualeno, 0,4% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 65, 2% em p/v de Tween 80	Emulsão
QG988	4,05% em p/v de esqualeno, 0,4% em p/v de DOTAP, 0,5% em p/v de span 40, 2% em p/v de tween 80	Emulsão
QG989	4,05% em p/v de esqualeno, 0,4% de DOTAP, 0,5% de span 20, 2% de tween 80	Emulsão

[0589] Formulações foram diluídas em 1:10 em solução salina de grau de irrigação. 50 µl x 16 de cada diluição foi plaqueado em placas de cultura de grau de tecido com fundo em U de 96 poços. 200 µl de sangue total heparinizado de 8 doadores, em duplicata, foi adicionado a cada formulação. Após incubação por 24h a 37ºC, CO_2, sobrenadantes de plasma foram removidos e analisados para IL-6, IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), e Mip-1b (CCL4).

[0590] A formulação de NLC que contém span 60 (monostearato de sorbitano) - QG863 - elicita quimimocinas significativamente maiores do que todos os grupos exceto QG983 (NLC com Span 65) e QG987 (CNE com Span 65) ($p < 0,0001$; ANOVA Unidirecional e teste de múltiplas comparações de Tukey). Span 65 é tristearato de sorbitano, que é a versão triacilatada de Span 60. Os resultados sugerem que ésteres de sorbitano que contém cadeias de C18 acila totalmente saturadas (grupos estearato) são os mais preferenciais, especificamente a versão monoacetilada (Span 60) em uma composição de NLC, para promover a liberação de múltiplas quimiocinas (consultar as Figuras 15A a 15D).

EXEMPLO 13: AVALIAÇÃO DE IMUNIZAÇÃO ÚNICA

[0591] RNA de replicon VEEV que expressa ZIKV PrM-E foi formulado com QG807 (1:1 de mistura, concentração de RNA

400ng/µl), e usado para imunizar camundongos C57B1/6 (n=5/grupo) por meio da rota intramuscular (50 µl de RNA formulado/injeção/camundongo). Soro foi coletado em pontos de tempo indicados após a injeção, e analisados para titulação de neutralização de ZIKV por ensaio de PRNT.

[0592] Seguindo a injeção única, animais imunizados com rvRNA por si só (em dose tanto de 10 µg como de 1 µg) tiveram titulações de pico em D14 após a injeção, que regrediram em seguida, e eram indetectáveis em D85. Em contraste, animais imunizados com rvRNA formulados com QG807 tiveram titulações persistentes, que foram mensuráveis em D85, e no caso de animais que recebem 1 µg de rvRNA, não regrediram em relação à titulação medida em D14. Um padrão similar foi observado em animais que recebem duas injeções de RNA; aqueles que recebem rvRNA por si só (em sacarose a 10%) mostrou acentuação de titulações, que tiveram pico em D42 e regrediram a níveis indetectáveis por D120. Em contraste, animais que recebem rvRNA formulados com QG807 tiveram titulações persistentes, em relação a aqueles observados em D42 (Figuras 18A a 18B).

EXEMPLO 14 INDUÇÃO DE CÉLULAS T CD8

[0593] Camundongos foram imunizados com RNA VEEV-TC83 formulado com QG807 que expressam vacina ZIKV PrM-E duas vezes (D0,D28) por meio da rota intramuscular. Camundongos (n=3/grupo) foram eutanizados 14 ou 49 dias após a acentuação, e esplentócitos manchados para células T CD8+ específicas de ZIKV com uso de citometria de fluxo. A indução de células T $B220_{10}CD8^{+}$ que expressam interferon γ (IFNγ+) ou CD 107a foi observada 14 dias após acentuação em todos os animais injetados com rvRNA. No dia 49, animais imunizados com RNA formulado com QG807 tiveram níveis significativamente altos de células T CD8+ em comparação com imunização somente de RNA. (**** $p<0,0001$, ANOVA unidirecional, Figuras 19A e 19B).

EXEMPLO 15 PROTEÇÃO DE RNA DE BAIXA DOSE

[0594] Camundongos C57B1/6 foram imunizados

com (rvRNA) replicante que expressa ZIKV-PrM-E. RNA foi injetado combinado com QG942 ou em Sacarose a 10% em doses indicadas. Vinte e oito dias pós-injeção, soro periférico foi analisado para titulações de anticorpo que neutralizam ZIKV, e esplentócitos foram analisados para a presença de células T CD8+ específicas de antígeno seguindo reestimulação. Aumentos de titulação significativos dependentes de formulação poderiam ser observados em 100 ng de RNA (ANOVA Unidirecional); RNA formulado induziu neutralização significativamente maior de anticorpo e titulações de célula T CD8+ do que RNA por si só na mesma dose. Aumentos significativos em relação a animais de controle imunizados com simulado também poderiam ser observados em 30 ng de RNA. A indução de anticorpos também foi observada em 10 ng, mas esses não foram significativos em relação ao controle (Figuras 20A a 20B).

EXEMPLO 16. ENTREGA DE ANTICORPO

[0595] Clones de entrega de anticorpo em uma coluna de replicon foram gerados pela inserção de sequências de anticorpo a jusante de um promotor. IgVH e IgVL variáveis e regiões constantes podem ser separadas tanto por uma sequência 2A como por um sítio de entrada de ribossoma interno (IRES). A transfecção de RNA com cap que contém cadeias leves e pesadas de anticorpo resultou em anticorpo de ligação funcional. Essas concentrações foram observadas com doses de RNA/poço entre 10 µg e 100 µg.

[0596] Seguindo a detecção de anticorpos *in vitro*, um experimento em camundongos foi realizado. Brevemente, um construto de anticorpo em que os genes IgVH e IgVL foram separados por um IRES foi complexado com QG942 em e razão de N:P de 15. Uma dose de 5 µg ou 50 µg foi injetada por meio de injeção intramuscular em um volume total de 100 ul (50 µl/leg). Soro foi coletado 7 dias pós-injeção e analisado para anticorpos específicos de antígeno com uso de uma ELISA quantitativa. A injeção de 50 µg de rvRNA formulado com QG942 resultou em maiores titulações de anticorpo do que injeção de 5 µg de RNA puro.

EXEMPLO 17: ANTICORPOS DE NEUTRALIZAÇÃO E

INDUÇÃO DE CÉLULA T CD4+

[0597] O replicon ID91 (Figura 29) combinado com uma formulação de NLC de protótipo, QG807, foi combinado a uma vacina de subunidade de ID91+GLA-SE em camundongos dada uma baixa dose de aerosol de Mycobacterium tuberculosis (mtb) H37Rv. Coortes de camundongos C57BL/6 (n=3/grupo) foram imunizadas duas vezes i.m., com três semanas de diferença (iniciação/acentuação), tanto com uma vacina de 0,5 µg de proteína ID91 quanto com 5 µg de GLA-SE ou uma vacina de 1 µg de ID91-RNA em uma estrutura de vírus Alpha e QG807. Esplenócitos foram isolados duas semanas após a última imunização e re-estimulados *in vitro* por 6 horas com uso de meio somente, proteína total de ID91, um de dez diferentes peptídeos de ID91-peptídeos de sobreposição ID91 agrupados, ou P + I (total = 16) para uma placa de 96 poços inteira. Consulte a Tabela 4 abaixo. ICS foi então realizado.

TABELA 4

	1	***2***	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
	1-1	**1-2**	**1-3**	**1-1**	**1-2**	**1-3**	**2-1**	**2-2**	**2-3**	**2-1**	**2-2**	**2-3**
A	Médio			Pool de peptídeo nº6			Médio			Pool de peptídeo nº6		
B	P+I			Pool de peptídeo nº7			P+I			Pool de peptídeo nº7		
C	Proteína ID91			Pool de peptídeo nº8			Proteína ID91			Pool de peptídeo nº8		
D	Pool de peptídeo nº1			Pool de peptídeo *nº9*			Pool de peptídeo nº1			Pool de peptídeo nº9		
E	Pool de peptídeo nº2			Pool de peptídeo nº10			Pool de peptídeo nº2			Pool de peptídeo nº10		
F	Pool de peptídeo nº3			Pool de peptídeo nº11			Pool de peptídeo nº3			Pool de peptídeo nº11		
G	Pool de peptídeo nº4			Pool de peptídeo nº12			Pool de peptídeo nº4			Pool de peptídeo nº12		
H	Pool de peptídeo nº5			Pool de peptídeo nº13			Pool de peptídeo nº5			Pool de peptídeo nº13		

[0598] Camundongos imunizados com vacinas de rvRNA e proteína ID91 induziram respostas de célula T CD8+ ou CD4+ (Figuras 30A e 30B, 31A a 31D e 32A a 32D). Expressão de antígeno robusto com reconhecimento de epítopos ID91 dominantes diferenciais foi demonstrada dependendo de imunização com proteína ID91/GLA-SE adjuvante ou rvRNA de ID91. *Id*. Para a vacina de proteína ID91/GLA-SE, ambos os epítopos CD4 e CD8 foram identificados. Os pools de peptídeos nº 2, 4, 10, 12, e 13 induziram proliferação satisfatória e produção de citocina de células T CD4+ em camundongos C57BL/6 imunizados com proteína ID91/GLA-SE. Todavia, os pools de peptídeos nº 3, 4, 10, 11, e 12 induziram proliferação satisfatória e produção de citocina de células T CD8+ em camundongos C57BL/6 imunizados com proteína ID91/GLA-SE. A subunidade de ID91 Rv3478 pode conter epítopos dominantes para ambas as células T de CD4 e CD8. A vacina RNA + QG807 de ID91 elicitou principalmente epítopos CD8, em vez de epítopos CD4. Os pools de peptídeos nº 8, 9, 10, 12, 13 induziram a proliferação satisfatória e produção de citocina células T de CD8+ em camundongos C57BL/6 imunizados com RNA + QG807 de ID91. A subunidade de ID91 Rv1886 contém a maioria dos epítopos dominantes para as células T de CD8+.

[0599] A Tabela 5 retrata o mapeamento de epítopo de ID91 de 15mer com 8 sequências de aminoácidos se que sobrepõem (os epítopos de SEQ ID NOs. 19 a 133, respectivamente).

TABELA 5 (CONSULTAR A TABELA 1 PARA SEQ ID NOS).

1	HMTINYQFGDVDAHG	51	AMYGYAATAATATEA	101	LSANRAVKPTGSAAI
2	FGDVDAHGAMIRAQA	52	TAATATEALLPFEDA	102	KPTGSAAIGLSMAGS
3	GAMIRAQAGSLEAEH	53	ALLPFEDAPLITNPG	103	IGLSMAGSSAMILAA
4	AGSLEAEHQAIISDV	54	APLITNPGGLLEQAV	104	SSAMILAAYHPQQFI

5	HQAIISDVLTASDFW	55	GGLLEQAVAVEEAID	105	AYHPQQFIYAGSLSA
6	VLTASDFWGGAGSAA	56	VAVEEAIDTAAANQL	106	IYAGSLSALLDPSQG
7	WGGAGSAACQGFITQ	57	DTAAANQLMNNVPQA	107	ALLDPSQGMGPSLIG
8	ACQGFITQLGRNFQV	58	LMNNVPQALQQLAQP	108	GMGPSLIGLAMGDAG
9	QLGRNFQVIYEQANA	59	ALQQLAQPAQGVVPS	109	GLAMGDAGGYKAADM
10	VIYEQANAHGQKVQA	60	PAQGVVPSSKLGGLW	110	GGYKAADMWGPSSDP
11	AHGQKVQAAGNNMAQ	61	SSKLGGLWTAVSPHL	111	MWGPSSDPAWERNDP
12	AAGNNMAQTDSAVGS	62	WTAVSPHLSPLSNVS	112	PAWERNDPTQQIPKL
13	QTDSAVGSSWADDID	63	LSPLSNVSSIANNHM	113	PTQQIPKLVANNTRL
14	SSWADDIDWDAIAQC	64	SSIANNHMSMMGTGV	114	LVANNTRLWVYCGNG
15	DWDAIAQCESGGNWA	65	MSMMGTGVSMTNTLH	115	LWVYCGNGTPNELGG
16	CESGGNWAANTGNGL	66	VSMTNTLHSMLKGLA	116	GTPNELGGANIPAEF
17	AANTGNGLYGGLQIS	67	HSMLKGLAPAAAQAVE	117	GANIPAEFLENFVRS
18	LYGGLQISQATWDSN	68	PAAAQAVETAAENGV	118	FLENFVRSSNLKFQD
19	SQATWDSNGGVGSPA	69	ETAAENGVWAMSSLG	119	SSNLKFQDAYNAAGG
20	NGGVGSPAAASPQQQ	70	VWAMSSLGSQLGSSL	120	DAYNAAGGHNAVFNF
21	AAASPQQQIEVADNI	71	GSQLGSSLGSSGLGA	121	GHNAVFNFPPNGTHS
22	QIEVADNIMKTQGPG	72	LGSSGLGAGVAANLG	122	FPPNGTHSWEYWGAQ

23	IMKTQGPGAWPKCSS	73	AGVAANLGRAASVGS	123	SWEYWGAQLNAMKGD
24	GAWPKCSSCSQGDAP	74	GRAASVGSLSVPPAW	124	QLNAMKGDLQSSLGA
25	SCSQGDAPLGSLTHI	75	SLSVPPAWAAANQAV	125	AMKGDLQSSLGAGKL
26	PLGSLTHILTFLAAE	76	WAAANQAVTPAARAL		
27	ILTFLAAETGGCSGS	77	VTPAARALPLTSLTS		
28	ETGGCSGSRDDVVDF	78	LPLTSLTSAAQTAPG		
29	SRDDVVDFGALPPEI	79	SAAQTAPGHMLGGLP		
30	FGALPPEINSARMYA	80	GHMLGGLPLGHSVNA		
31	INSARMYAGPGSASL	81	PLGHSVNAGSGINNA		
32	AGPGSASLVAAAKMW	82	AGSGINNALRVPARA		
33	LVAAAKMWDSVASDL	83	ALRVPARAYAIPRTP		
34	WDSVASDLFSAASAF	84	AYAIPRTPAAGFSRP		
35	LFSAASAFQSVVWGL	85	PAAGFSRPGLPVEYL		
36	FQSVVWGLTVGSWIG	86	PGLPVEYLQVPSPSM		
37	LTVGSWIGSSAGLMA	87	LQVPSPSMGRDIKVQ		
38	GSSAGLMAAAASPYV	88	MGRDIKVQFQSGGNN		
39	AAAASPYVAWMSVTA	89	QFQSGGNNSPAVYLL		
40	VAWMSVTAGQAQLTA	90	NSPAVYLLDGLRAQD		

41	AGQAQLTAAQVRVAA	91	LDGLRAQDDYN GWDI		
42	AAQVRVAAAAYETAY	92	DDYNGWDINTP AFEW		
43	AAAYETAYRLTVPPP	93	INTPAFEWYYQS GLS		
44	YRLTVPPPVIAENRT	94	WYYQSGLSIVM PVGG		
45	PVIAENRTELMTLTA	95	SIVMPVGGQSSF YSD		
46	TELMTLTATNLLGQN	96	GQSSFYSDWYS PACG		
47	ATNLLGQNTPAIEAN	97	DWYSPACGKAG CQTY		
48	NTPAIEANQAAYSQM	98	GKAGCQTYKWE TFLT		
49	NQAAYSQMWGQDAE A	99	YKWETFLTSELP QWL		
50	MWGQDAEAMYGYAA T	10 0	TSELPQWLSAN RAVK		

[0600] Coortes de camundongos fêmea C57BL/6 (n=4/grupo) foram imunizados por rota i.m. uma vez com solução salina, ID91+GLA-SE, ou uma vacina de ID91-RNA, e baços foram coletados 3 semanas posteriormente para avaliação de fenótipos de célula T. Os resultados são representados como a porcentagem de CD4+/CD44+, ou a porcentagem de células T de CD8+ que expressam IFNg, IL-2, e TNF (Figuras 33A). A significância estatística de $p<0,05$ foi analisada com uso de ANOVA bidirecional e é retratada por um asterisco. Seguindo uma imunização, a vacina ID91+GLA-SE (proteína) induziu uma resposta de célula T de CD4 de THI, caracterizada pela indução de IFNα, TNF e IL-2, enquanto a vacina de ID91-RNA teve capacidade de induzir uma resposta de CD4+ IL-2 significativa. Nem a vacina elicitou uma resposta de célula T de CD8+ significativa após uma imunização

nesse experimento.

[0601] A eficácia contra Mtb H37Rv também foi demonstrada *in vivo*. Coortes de camundongos fêmea C57BL/6 (n=7/grupo) foram imunizados uma vez com ^g de construto de ID91+GLA-SE, ID91-RNA em uma estrutura de vírus Alpha, ou solução salina, 3 semanas antes do desafio com Mtb H37Rv. A carga bacteriana foi analisada a partir de homogenatos pulmonares 3 semanas após o desafio com Mtb H37Rv (Figura 33B). Resultados representam as contagens bacterianas de Log 10 (unidades de formação de colônia; CFU) dentro dos pulmões de camundongos 3 semanas após o desafio. A significância de $p<0,05$ em comparação à Solução salina foi analisada com uso de ANOVA unidirecional com teste de múltiplas comparações Dunnetts e é retratada por um asterisco. Tanto ID91+GLA-SE quanto a vacina de ID91-RNA foram eficazes após uma imunização contra infecção com Mtb H37Rv, conforme medido por uma redução em carga bacteriana dentro do pulmão três semanas após a infecção.

EXEMPLO 18 ESTÍMULO IN VITRO COM LIGANTES FORMULADOS DE NLC DE RECEPTORES DE ÁCIDO NUCLEICO

[0602] Agonista de ácido nucleico manipulados para simular material genético viral são estimulantes imunes inatos potentes e pode acionar uma resposta imunológica adaptativa desviada com TH1 contra câncer e doenças infecciosas. Consultar Temizoz et al., Curr Opin Pharmacol 41:104-113 (2018); lurescia et al., Front Immunol 9:711 (2018); Reed et al., Nat Med 19(12): 1597-608 (2013). Dependendo da estrutura e localização, agonistas de ácido nucleico se ligam tanto com sensores endosomais (TLR3, TLR7/8, TLR9) como com sensores citossólicos (RLRs, STING-I) e estimulam interferon e a produção de outra citocina quimotática. Sensores de TLR3 e RIG-I são também conhecidos por promover a apresentação cruzada de antígenos em proteínas MHC I, ativando assim células T de CD8+ que amadurecem para formar línfócitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTLs). Consultar Jelinek et al., J Immunol 186(4):2.422 a 2.429 (2011); Hochheiser et al., J Immunol 196(6):2.439

a 2.443 (2016); Schmidt et al., Front Immunol 9:898 (2018). Aqui, foi demonstrado que agonistas de TLR3 (dsRNA) e RIG-I (dsRNA com um trifosfato na terminação 5') formulados com carreadores lipíticos nanoestruturados (NLCs) intensificam significativamente indução de quimiocina *in vitro* relativa um agonista puro em ambas as células dentríticas dericadas de PBMC humanas primárias, e a linhagem celular mono-mac-6 (MM6).

[0603] **Materiais:** poli(I:C):HMW é um análogo de dsRNA sintético que pode ativar as vias de TLR3 e RIG-I/MDA5 e foi adquirido a partir de Invivogen. Riboxxol é um agonista de dsRNA de TLR3 sintético de 50 bp adquirido a partir de Riboxx GmBH. SEVDI (interferente defeituoso de vírus Sendai) é um agononista de RIG-I de dsRNA com a grupo terminal de 5'-trifosfato e foi sintetizado de acordo com um protocolo anteriormente publicado. Martinez-Gil et al., J Virol 87(3): 1.290 a 1.300 (2013). A formulação de NLC foi fabricada por IDRI com uso de reagentes comercialmente disponíveis, incluindo DOTAP (cloreto de N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimethilamônio) da Corden Pharma, Dynasan® 114 (trimiristato de glicerila) da Sasol Limited, e o seguinte da Sigma-Aldrich: esqualeno, Span® 60 (monostearato de sorbitano), Tween® 80 (monooleato de sorbitano etoxilado) e di-hidrato de citrato de sódio.

[0604] **Método de fabricação de NLC:** Uma fase oleosa que consiste em esqualeno, o trimiristato de glicerila de lipídio sólido (Dynasan® 114), o monostearato de sorbitano tensoativo não iônico (Span® 60), e o DOTAP lipídico catiônico, foi preparado em um béquer de 100 ml e aquecido a 60ºC em uma batelada d'água preaquecida. A fase aquosa que consiste em 10 mM de di-hidrato de citrato de sódio e o tensoativo não iônico Tween® 80 foi preparado em um béquer de 100 ml separado e equilibrado para 60ºC. Seguindo a dissolução completa dos componentes sólidos, as fases oleosas e aquosas foram combinadas adicionando-se a fase aquosa à fase oleosa. A mistura bifásica foi homogeneizada com um emulsificante de laboratório de alta velocidade (Silverson Machines, Inc.) para produzir gotas de NLC microdimensionadas. A mistura de NLC bruta foi adicionalmente processada em

um M-l 10P microfluidificante (Microfluidics, Corp.) para 10 passos distintos a 206,84 MPa (30.000 psi). O tamanho de partícula final, conforme medido por Dispersão de Luz Dinâmica (DLS), foi entre 40 a 50 nm (diâmetro médio z) com um índice de polidispersibilidade (PDI) entre 0,1 a 0,2. A formulação microfluidizada foi terminalmente filtrado com uma 0,2 µm filtro de seringa de membrana de polieterssulfona e armazenada em 2 a 8 °C. Propriedades psicoquímicas de uma formulação de NLC (QG942) exemplificadora são fornecidos na Tabela 6.

TABELA 6.

Lote de NLC nº	DOTAP [% p/v]	Span 60 [% p/v]	Tween 80 [% p/v]	Esqualeno [% p/v]	Dynasan 114 [% p/v]	Média Z [nm] (PDI)	Potencial Zeta [mV]	pH
QG942	3,0	3,7	3,7	3,75	0,25	40,55 (0,20)	28,4 ±1,27	5,78

[0605] **Método de estimulação de PBMC-DCs:** adjuvantes de RNA foram misturados com NLC em várias razões de nitrogênio: fosfato (N:P) e permitidos a formar um complexo associado de modo eletroestático por incubação por 30 minutos em gelo. Células plaqueadas foram estimuladas com material complexado em várias doses de RNA para gerar uma curva de resposta de dose. Nas Figuras 39A a 39E, PBMC-DCs de seis doadores humanos foram estimulados com poliIC:HMW, Riboxxol ou SEVDI, tanto formulados com NLC ("formulados com QG942") ou nus ("não formulados"). O controle somente de formulação é rotulado "Ctrl de meios". Após incubação de 24 horas a 37 ºC e 5% de CO_2 de atmosfera, os sobrenadantes foram submetidos a ensaio para concentração de marcadores imunes inatos com o uso de kits ELISA disponíveis comercialmente. A análise estatística foi realizada por ANOVA dupla (2-way) com teste de múltiplas comparações de Sidak. Valores P: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

[0606] **Triagem de formulação em células de MM6:**

Riboxxol e pIC:HMW foram complexados com formulações catiônicas exemplificadoras da Tabela 7 em N:P de 15 e incubados de um dia para o outro com células de MM6 depois das quais os sobrenadantes foram coletados e analisados para IFNα/β (Figura 40). Células de MM6 estimuladas com Riboxxol formulado com NLC induzidos 20 a 30 vezes secreção de IFNα/β maior em relação a controle não estimulado. Uma análise detalhada de indução de IFNα/β por riboxxol formulado com NLC é resumido em um mapa de calor (Figura 41).

TABELA 7

Nome	**Descrição**	**Média Z [nm] (PDI) na data de fabricação**
QG942	Carreador lipídico nano estruturado	40,55 (0,198)
QG843	Nanoemulsão catiônica (CNE) fabricada de acordo com Brito et al	95,04 (0,092)
QH007	4 mgCa/ml de nanopartírculas de hidroxiapatita (nº de catálogo Sigma-Aldrich 900194) estabilizado com 2 mg/ml de quitosana (nº de Catálogo Sigma 448877)	101,3 (0,164)
QH005	4 mgCa/ml de nanopartírculas de hidroxiapatita (nº de catálogo Sigma-Aldrich 900194) estabilizado com 2 mg/ml de quitosana (nº de catálogo Polysciences 21161)	91,8 (0,177)
QH006	4 mgCa/ml de nanopartírculas de hidroxiapatita (nº de catálogo Sigma-Aldrich 900194) estabilizado com 2 mg/ml de quitosana (nº de Catálogo Sigma 448869)	77,93 (0,184)
QH008	4 mgCa/ml de nanopartírculas de hidroxiapatita (nº de catálogo Sigma-Aldrich 900194) estabilizado com 2 mg/ml de quitosana (nº de Catálogo Sigma 419419)	93,69 (0,186)
QH009	2 mgAl/ml de Alhidrogel tratado com tampão de fosfato, então estabilizado com 1 mg/ml de quitosana (nº de catálogo Polysciences 21161)	294,1 (0,217)
QH142	2 mgAl/ml de Alhidrogel tratado com tampão de fosfato, então estabilizado com 1 mg/ml de quitosana	304,8 (0,291)

Nome	Descrição	Média Z [nm] (PDI) na data de fabricação
	(nº de catálogo Sigma 419419)	
QH141	2 mgAl/ml de Alhidrogel tratado com tampão de fosfato, então estabilizado com 1 mg/ml de quitosana (nº de catálogo Sigma 448877)	318,3 (0,288)
QH140	2 mgAl/ml de Alhidrogel tratado com tampão de fosfato, então estabilizado com 1 mg/ml de quitosana (nº de catálogo Sigma 448869)	347,4 (0,307)
QH115	9 mgAl/ml Alhidrogel estabilizado com 7,5 mg/ml de ácido poliacrílico (nº de catálogo Polysciences 06519)	72,2 (0,200)
QH011	9 mgAl/ml Alhidrogel estabilizado com 30 mg/ml de ácido hidroacrílico (nº de catálogo Sigma 535931)	77,28 (0,144)

[0607] Adjuvantes de RNA de fita dupla (dsRNA) são acentuados por formulação com NLCs (WG942). RNA de replicon (ssRNA) que codifica SEAP foi coformulado com dsRNA (dsRNA testado incluiu ligantes de receptor do tipo Toll 3 (TLR3), tais como Poli(IC) (análogo de 1,5 a 1,8 kb sintético de dsRNA da Invivogen), Riboxxol (50 bp de dsRNA sintético da Riboxx, SEVDI (*in vitro* transcrito aproximadamente 550 bp de RNA interferente defeituoso de vírus Sendai) ou controle de meios para avaliar o efeito de estimulação de adjuvante em expressão de proteína (Figuras 35A a 35E e 36A a 36D).

[0608] Foi constatado que os adjuvantes de dsRNA realizam knock down de expressão de SEAP em células HEK293. Consultar, por exemplo, a Figura 37 (replicon (VEErep) de vírus de encefalite equina venezuelana (VEE) que codifica ligante de SEAP + TLR3+ NLC). Além disso, a tradução de VEErep em DCs humanas transfectadas *in vitro* em soro a 10% reduzido que contém mídia demonstrou expressão aumentada de SEAP e IP- 10 (Figuras 38A a 38B).

EXEMPLO 19: ACENTUAÇÃO DE RESPOSTAS

IMUNOGÊNICAS

[0609] Respostas imunogênicas a adjuvantes, tais como ligantes de TLR3, também pode ser acentuado, separadamente ou adicionalmente ao uso de NLC, por formulação com emulsões de água em óleo estáveis, tais como emulsões que compreendem esqualeno. Os seguintes experimentos examinam o impacto de formulação nas respostas imunogênicas suportadas por Hiltonol®. Hiltonol® (poli-ICLC) é um complexo sintético de carboximetilcelulose, RNA de fita dupla de ácido policitidílico polinosínico, e poli-L-lisina.

[0610] 5 camundongos per grupo de formulação na Tabela 8 foram usados para gerar respostas de anticorpo específico de antígeno (expresso como titulação de ponto final) e chamada específica de antígeno de células de baço (determinado por 4 dias de incubação com antígeno então citocina ELISA). Um derivado de lipídio-A sintético (SLA) relacionado um lipídio A de glucopiranosila (GLA), foi anteriormente descrito em Coler et al., PloS one 6(l):el6333 (2011). SLA foi combinado com uma emulsão de óleo em água estável (SE), consultar Van Hoeven et al., PLoS One. 11(2): e0149610 (2016), para formar SLA-SE que contém esqualeno.

TABELA 8

Grupo	**Proteína F2**	**dose de Hiltonol®**	**Formulação (mistura por adição)**
1 (controle de proteína)	1 µg	—	Solução salina
2 (controle de Hiltonol® de linha de base)	1 µg	10	Solução salina
3(100 µg de alumínio/camundongo)	1 µg	—	nanoAlum 2/PEG
4(100 µg de alumínio/camundongo)	1 µg	10	nanoAlum 2/PEG
5	1 µg	—	SE
6	1 µg	10	SE
7 (controle positivo)	1 µg	—	SLA-SE

Grupo	Proteína F2	dose de Hiltonol®	Formulação (mistura por adição)
8 (controle negativo)	—	—	—

SLA = lipídio A sintético; SE = emulsão estática; nanoAlum2/PEG = nAlum PEG200-DSPE

[0611] A emulsão estática (SE) da Tabela 8 acima e Tabelas 10 a 13 abaixo compreendeu a formulação exemplificadora na Tabela 9 abaixo, e foi preparada conforme a seguir. SE consiste em óleo metabolizável (esqualeno) emulsificado com fosfatidilcolina de dimiristoila e poloxâmero. Gotas de emulsão são ~100 nm de diâmetro e monodispersas. Preparar um concentrado 5x permite a mistura com vacina antígeno imediatamente antes da imunização. Para fabricar SE, fases oleosas e aquosas foram preparadas separadamente. Para a fase oleosa, 0,76 g de pó de fosfatidilcolina de dimiristoila (DMPC) foi adicionado a 3,4 g de esqualeno. A garrafa que contém DMPC e óleo foi colocado em uma batelada de água de sonicação aquecida a 70 °C até que o DMPC fosse disperso no óleo. Para a fase aquosa, fosfato de amônio monobásico, fosfato de amônio dibásico, poloxâmero 188, e glicerol foram adicionados a água ultrapura e sonicada para criar uma fase aquosa que contém 27 mM de tampão de fosfato de amônio, 25 mg/ml de glicerol, e 0,4 mg/ml de poloxâmero 188 com pH 6,25. As fases oleosas (10% em volume) e aquosas (90% em volume) foram então combinadas e processadas por mistura de alto cisalhamento por 10 min a 7.000 a 10.000 rpm (com uso de um Silverson L5M-A com uma montagem de mistura tubular de 1,90 cm (3/4 polegada) e cabeça de mistura de triagem de alto cisalhamento de furo quadrado) para criar uma emulsão bruta. A emulsão bruta foi então processada por homogeneização de alta pressão por 16 ciclos a 206,84 MPa (30.000 psi) (por exemplo, com uso de um processador de Microfluidics® M-l 10P) e resfriado com água com um circulador de recirculação ajustado para 10 °C. A final formulação foi filtrada sob fluxo constante por meio de uma bomba peristáltica através de uma membrana

de PVDF de 0,2-µm e preenchida em frascos. A caracterização incluiu quantização de esqualeno por cromatografia de gás, quantificação de DMPC por FIPLC com detecção de aerossol carregado, medição de tamanho de partícula por dispersão de luz dinâmica, medição de pH, e avaliação de aparência visual. Todos os valores estavam dentro das faixas esperadas. A formulação foi diluída de 10% a 2% para injeção.

TABELA 9

Ingrediente	**Concentração**
Fase aquosa	90,0% de v/vol
Glicerol	1,8% de v/vol
Fosfato de amônio monobásico	23,67 mM
Fosfato de amônio dibásico	1,296 mM
Esqualeno	10,0% de v/vol
Oxâmero pol 188 (copolímero de polioxietileno e polioxipropileno)	0,09% de p/vol
1,2-dimiristoil-sn-glicero-3 -fosfocolina (DMPC)	1,9% de p/vol

[0612] Camundongos foram imunizados com proteína LEISH-F2 recombinante mais formulação de adjuvante em um volume total de 0,1 ml. Os camundongos foram imunizados de modo subcutâneo duas vezes com um intervalo de três semanas entre injeções. A injeção estava na base da cauda de um total de 1 µg/dose de proteína e 10 µg/dose de Hiltonol®. Após as imunizações, sangue foi coletado, soro preparado e analisado para respostas de anticorpo específico de antígeno para determinar se imunização elicitou uma resposta. Soro de camundongos imunizados foi titulado para encontrar titulação de ponto final (último valor de densidade óptica (OD) maior do que um limiar determinado por soro de camundongos imunizados). A resposta de anticorpo específico de antígeno foi analisada para IgG total contra o antígeno específico, e também isótipos de IgG2 e IgG1 para revelar qualquer desvio imune (dado que IFNγ estimula respostas de IgG2a/c enquanto IL-4/5 estimulam respostas de

IgG1) (Figura 45).

[0613] Vinte e um dias após a imunização final, animais foram eliminados e seus baços removidos. Suspensões de célula única são preparadas e 2 x 10^5 células/poço incubados com 10 mg/ml de antígeno recombinante (antígeno LEISH-F2) para analisar as respostas de chamada específica de antígeno. A secreção de citocinas no sobrenadante de cultura após 4 dias foi determinado por citocina ELISA de acordo com as instruções do fabricante (eBioScience)). Consultar JL-5 na Figura 46A e Figura 47A. O perfil de $T_{helper}1$ é caracterizado por secreção de IFNγ (Figura 46B e Figura 47B). Consultar também IFNγ+TNFa+ na Figura 47C, CD 154+ na Figura 47C, e Granzima B+ na Figura 47E.

[0614] Após uma iniciação, diferente de Hiltonol® por si só, a formulação de mistura por adição de Hiltonol® in SE ou nanoalum elicitou anticorpos específicos de antígeno. Após uma acentuação, Hiltonol®/ SE forneceu as respostas de IgG2c específicas de antígeno mais fortes. Além disso, a formulação de mistura por adição de Hiltonol® em SE ou nanoalum elicitou respostas de chamada de IFNγ específicas de antígeno.

[0615] Resultados similares foram demonstrados em outro estudo com 7 camundongos fêmea per grupo de formulação na Tabela 13 usada para gerar respostas de anticorpo específico de antígeno (expresso como titulação de ponto final) e chamada específica de antígeno de células de baço (determinada por incubação de 4 dias com antígeno então citocina ELISA). (dados não mostrados)

TABELA 13

Grupo	**Proteína F2 (pl)**	**dose de Hiltonol® (µl)**	**Formulação (µl)**	**Solução salina (µl)**
1 (controle de proteína)	14	0	0	686
2 (controle de Hiltonol® de linha de base)	14	35	0	651

Grupo	Proteína F2 (pl)	dose de Hiltonol® (µl)	Formulação (µl)	Solução salina (µl)
3	14	0	350 Alum	336
4	14	35	350 Alum	301
5	14	0	175 nan0Alum	511
6	14	35	175 nanoAlum	476
7	14	0	140 SE	546
8	14	35	140 SE	511
9	14	0	140 SLA-SE	546
10 (controle negativo)	0	0	0	700

● Hiltonol® (10 µg) 2 mg/ml, Alum = (100 µg) AL007 2 mg/ml, nanoAlum = (100 µg) nAlum PEG2000-DSPE 4 mg/ml.

[0616] Camundongos C75BL/6 (5 por grupo) foram também imunizados com proteína LEISH-F3+ recombinante mais formulação de adjuvante em um volume total de 0,1 ml. Os camundongos foram imunizados de modo subcutâneo uma vez por injeção de 100 µl do pescoço com um total de 1 mg/dose proteína e tanto 50, 10 ou 2 mg/dose de Hiltonol® em várias formulações na Tabela 9.

[0617] TABELA 10

Grupo	Proteína F3+ (NSDC)	dose de Hiltonol®	Formulação (mistura por adição)
1 (controle negativo)	—	—	—
2 (controle de proteína)	1 µg	—	Solução salina
3 (controle de Hiltonol® superior)	1 µg	50	Solução salina
4 (controle de Hiltonol® intermediário)	1 µg	10	Solução salina

Grupo	**Proteína F3+ (NSDC)**	**dose de Hiltonol®**	**Formulação (mistura por adição)**
5 (baixo controle de Hiltonol®)	1 µg	2	Solução salina
6	1 µg	10	nanoAlum 2, PEG
7	1 µg	2	nanoAlum 2, PEG
8 (controle de formulação)	1 µg	—	nanoAlum 2, PEG
9	1 µg	10	SE
10	1 µg	2	SE
11 (controle de formulação)	1 µg	—	SE

[0618] Após a imunização, sangue foi coletado, soro preparado e analisado para respostas de anticorpo específico de antígeno para determinar se imunização tiver elicitado uma resposta. Soro de camundongos imunizados foi titulado para encontrar titulação de ponto final (último valor de densidade óptica (OD) maior do que um limiar determinado por soro de camundongos imunizados). A resposta de anticorpo específico de antígeno é analisada para IgG total contra o antígeno LEISH-F3+ (Figuras 48 a 49).

[0619] Após uma iniciação, a formulação de mistura por adição de Hiltonol® in SE ou nanoalum elicitou uma resposta de anticorpo específico de antígeno maior do que Ag Hiltonol® por si só, e a formulação de mistura por adição de Hiltonol® em SE acentuou as respostas de chamada de IFNg específicas de antígeno sobre ag em Hiltonol® e Ag/ Hiltonol®/nanoalum. O estudo também demonstrou que células T de CD8 podem ser gerados por iniciação com Ag/Hiltonol®/SE, economia de dose aparece >25 vezes, e 2 µg Hiltonol® em SE elicita respostas > 50 µg de Hiltonol® não formulado (Figuras 48 a 51).

[0620] Em outro estudo, o impacto de entrega de

vacina de antígeno em respostas imunogênicas foi examinado com uma administração única (prime) de uma formulação da Tabela 10 a camundongos C75BL/6. Consultar a Figura 50.

TABELA 11

Grupo	**Proteína F3+ (NSDC)**	**Agonista TLR3**	**Dose de agonista TLR3 (µg)**	**Formulação (mistura por adição)**
1 (controle negativo)	--	--	--	--
2 (controle de proteína)	1 µg	—	—	Solução salina
3	1 µg	Polil:CLMW	10	Solução salina
4	1 µg	Polil:CLMW	10	SE
5 (poli:C controle HMW)	1 µg	Polil:CHMW	10	Solução salina
6	1 µg	Polil:CHMW	10	SE
7 (poli I:C baixa dose)	1 µg	Polil:CLMW	2	SE
8 (poli I:C baixa dose)	1 µg	Polil:CHMW	2	SE
9 (controle de formulação)	1 µg	--	--	SE

[0621] Em outro estudo, camundongos C75BL/6 (5 por grupo, 5 para respostas imunes após iniciação, 5 para após acentuação) foram administrados um após as formulações da Tabela 11 para examinar o impacto da entrega de vacina de antígeno nas respostas imunogênicas.

TABELA 12

Número	**Proteína F3+ (NSDC)**	**Agonista TLR3**	**Dose de agonista TLR3 (µg)**	**Formulação (mistura por adição)**
1 (controle negativo)	—	—	--	—
2 (controle de proteína)	1 µg	—	—	Solução Salina
3 (controle de Hiltonol® superior)	1 µg	Hiltonol®	50	Solução salina

Número	**Proteína F3+ (NSDC)**	**Agonista TLR3**	**Dose de agonista TLR3 (µg)**	**Formulação (mistura por adição)**
4 (controle de Hiltonol® intermediário)	1 µg	Hiltonol®	10	Solução salina
5 (baixo controle de Hiltonol®)	1 µg	Hiltonol®	2	Solução salina
6	1 µg	Hiltonol®	10	SE
7	1 µg	Hiltonol®	2	SE
8 (controle de LMW poli:C)	1 µg	Polil:CLMW	10	Solução salina
9	1 µg	Polil:CLMW	10	SE
10	1 µg	Polil:CLMW	2	SE
11 (controle de HMW poli:C)	1 µg	Polil:CHMW	10	Solução salina
12	1 µg	Polil:CHMW	10	SE
13	1 µg	Polil:CHMW	2	SE
14 (controle de formulação)	1 µg	—	—	SE

[0622] A formulação de SE de Hiltonol® causou economia de dose para indução de IFNγ específica de antígeno, com supressão de resposta de IL-5 (Figuras 51 a 52). Respostas a peptídeos restringidos por MHC I (C+B) não foram observados (Figura 52B).

REIVINDICAÇÕES

1. Composição que compreende partículas de carreador lipídico nanoestruturado (NLC) para entrega de um agente bioativo a uma célula, caracterizada pelo fato de que as partículas de NLC compreendem:

(a) um núcleo de óleo que compreende uma mistura de um lipídeo em fase líquida e um lipídeo em fase sólida, em que o lipídeo da fase líquida é esqualeno e o lipídeo da fase sólida é trimiristina;

(b) um componente catiônico, em que o componente catiônico é 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamônio)propano (DOTAP);

(c) um tensoativo hidrofóbico, em que o tensoativo hidrofóbico é monoestearato de sorbitano;

(d) um tensoativo hidrofílico, em que o tensoativo hidrofílico é polissorbato 80 e em que uma razão molar de um tensoativo hidrofílico para componente catiônico é de 0,2 a 1,5, e

(e) o agente bioativo , em que o agente bioativo é RNA, mRNA, RNA viral oncolítico, RNA não codificante ou DNA e em que o agente bioativo está associado à superfície das partículas de NLC por interações não covalentes ou por interações covalentes reversíveis.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o índice médio de polidispersibilidade das partículas de NLC é de 0,1 a 0,5.

3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada pelo fato de que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de 20 nm a 200 nm, de 20 nm a 150, de 20 nm a 100 nm, de 20 nm a 80 nm, ou de 20 nm a 60 nm ou de 40 nm a 200 nm, de 40 nm a 150 de 40 nm a 100 nm, de 40 nm a 80 nm ou de 40 nm a 60 nm.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o diâmetro médio z das partículas de NLC é de 40 nm a 80 nm.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que tem uma razão molar entre o óleo e o tensoativo de 0,05 a 12.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a razão molar de óleo para tensoativo é de cerca de 0,5 a cerca de 8.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a razão molar de óleo para tensoativo é de cerca de 0,5.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que tem uma razão molar entre o tensoativo hidrofílico e o componente catiônico é 0,5 para 1.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a razão molar de tensoativo hidrofílico para componente catiônico é de cerca de 0,6.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que compreende de 0,2% a 40% em p/v de lipídio em fase líquida, de 0,1% a 10% em p/v de lipídio em fase sólida, de 0,2% a 10% em p/v de lipídio catiônico, de 0,25% a 15% em p/v de éster de sorbitano e de 0,2% a 15% em p/v de tensoativo hidrofílico.

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o agente bioativo codifica um antígeno de proteína.

12. Método para produzir a composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) misturar o lipídio em fase sólida, o lipídio em fase líquida, o lipídio catiônico e o tensoativo hidrofóbico para formar uma mistura em fase oleosa;

(b) misturar o tensoativo hidrofílico e água para formar uma mistura em fase aquosa;

(c) misturar a mistura em fase oleosa com a mistura em fase aquosa para formar as partículas de NLC; e

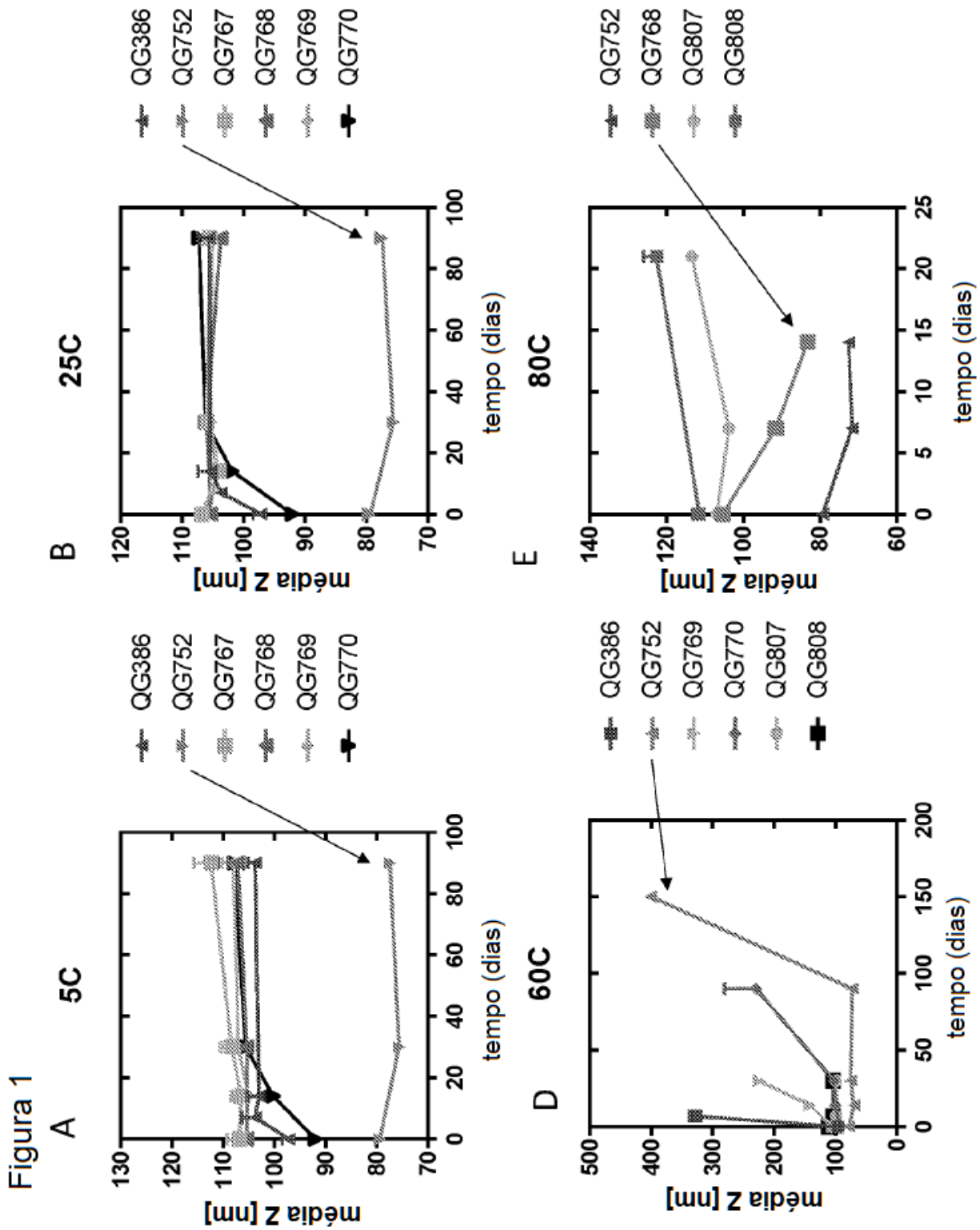
(d) combinar o agente bioativo com as partículas de NLC de modo que o agente bioativo se associe à superfície das partículas de NLC por meio de interações não covalentes ou por meio de interações covalentes reversíveis.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o agente bioativo é RNA, e em que o RNA codifica um ou mais antígenos de Zika.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um adjuvante.

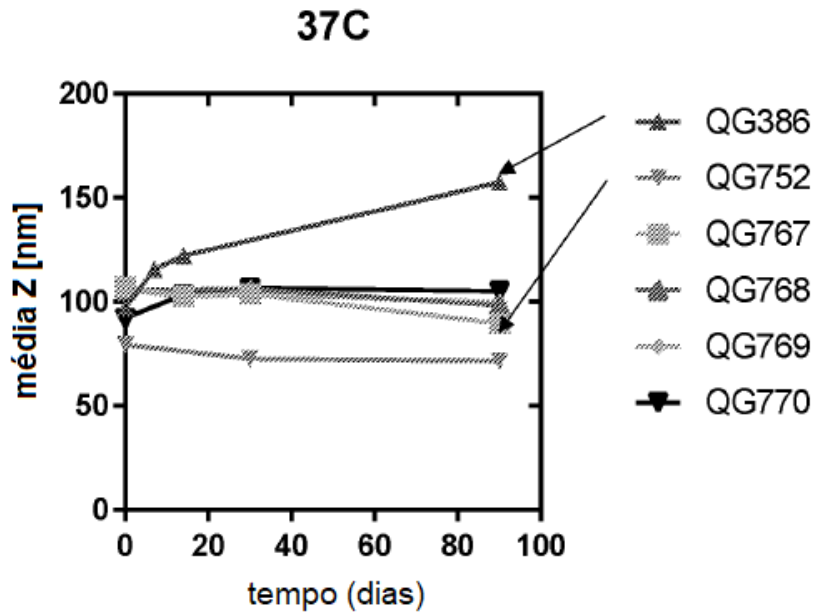
15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o adjuvante é selecionado dentre um agonista de TLR, um agonista de Rig-I, uma saponina, um carboidrato, um polímero de carboidrato, um carboidrato conjugado, uma partícula viral inteira, uma partícula semelhante a vírus, fragmentos virais e fragmentos celulares.

Figura 1

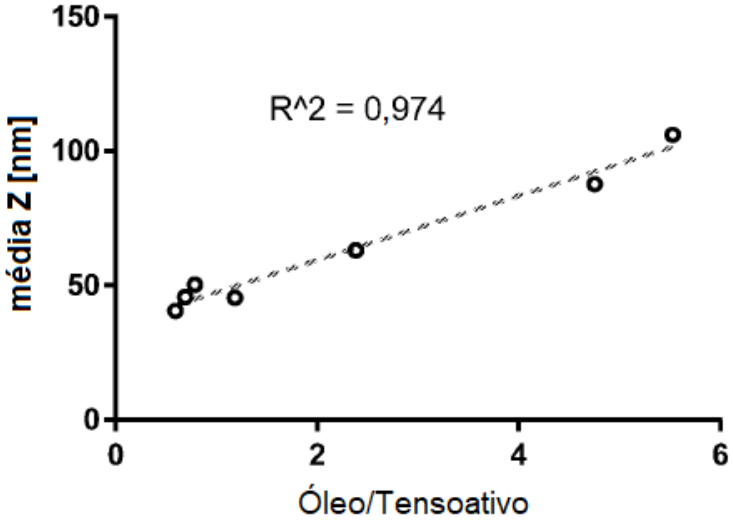

A
5C
B
25C
D
60C
E
80C
média Z [nm]
tempo (dias)
QG386
QG752
QG767
QG768
QG769
QG770
QG769
QG807
QG808

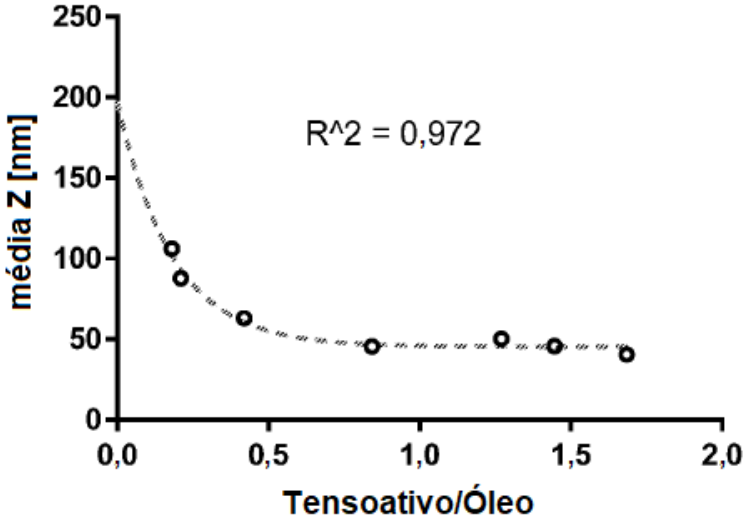
Petição 870200012108, de 26/01/2020, pág. 236/320

Figura 1C



Figuras 2A-B





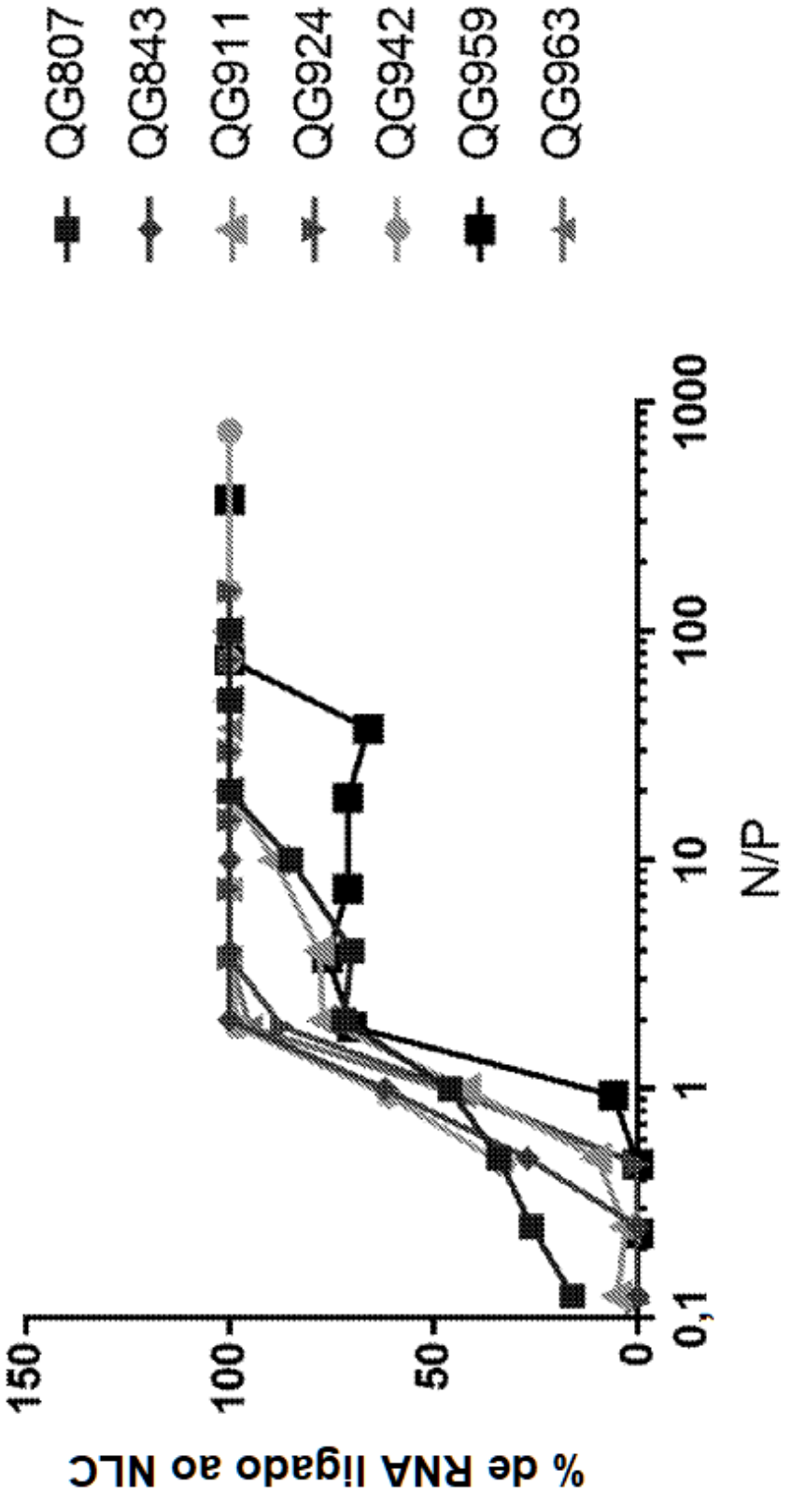
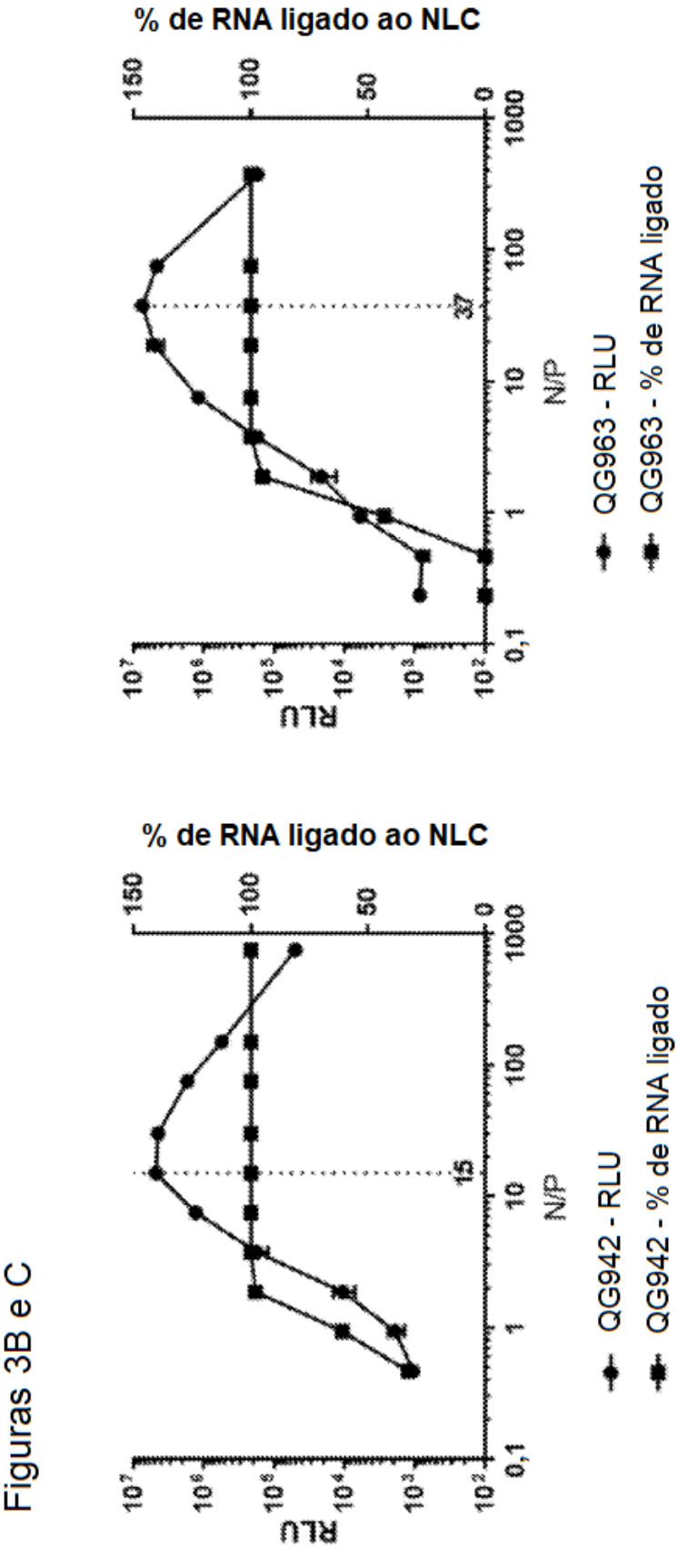
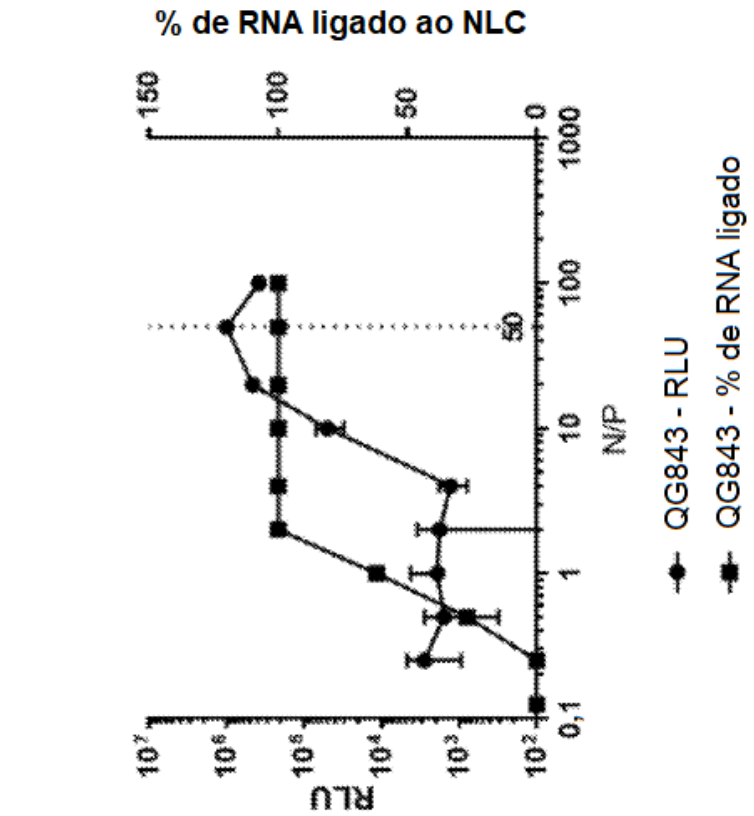
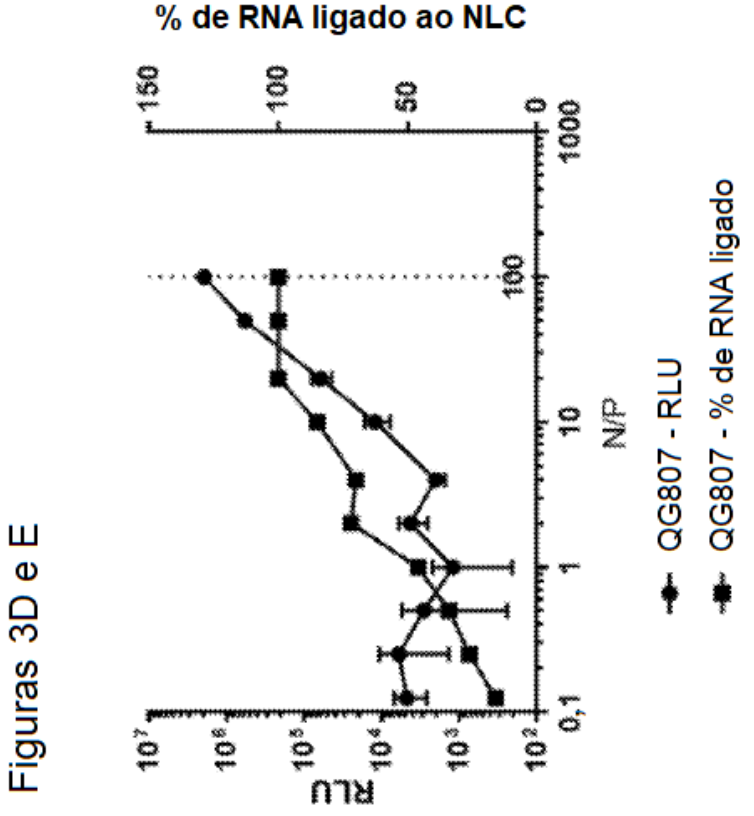

QG807
QG843
QG911
QG924
QG942
QG959
QG963
% de RNA ligado ao NLC
150
100
50
0
0,1
1
10
100
1000
N/P

Figura 3A

Figuras 3B e C



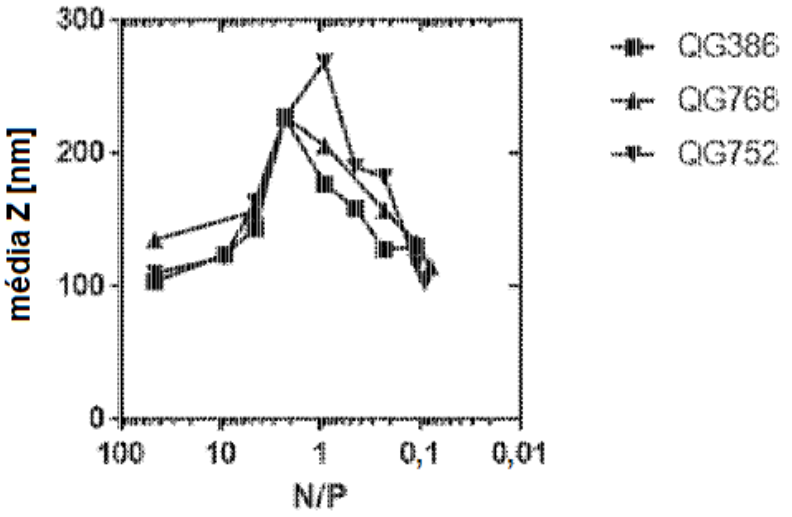




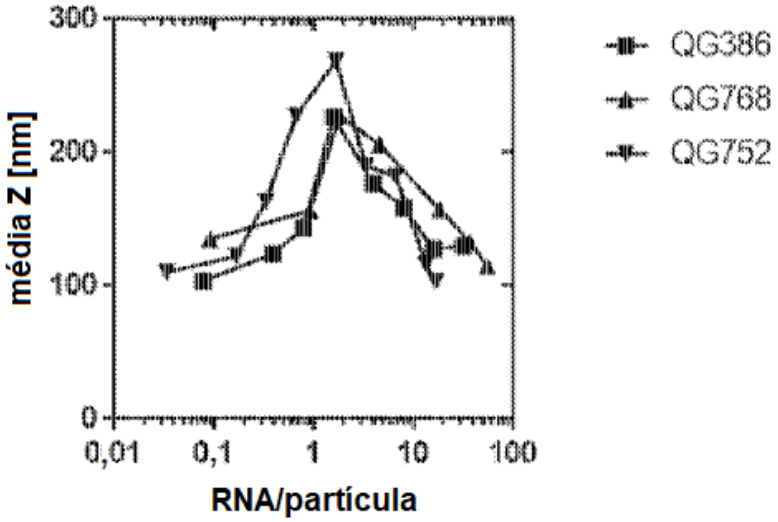
Figuras 3D e E

Figura 4

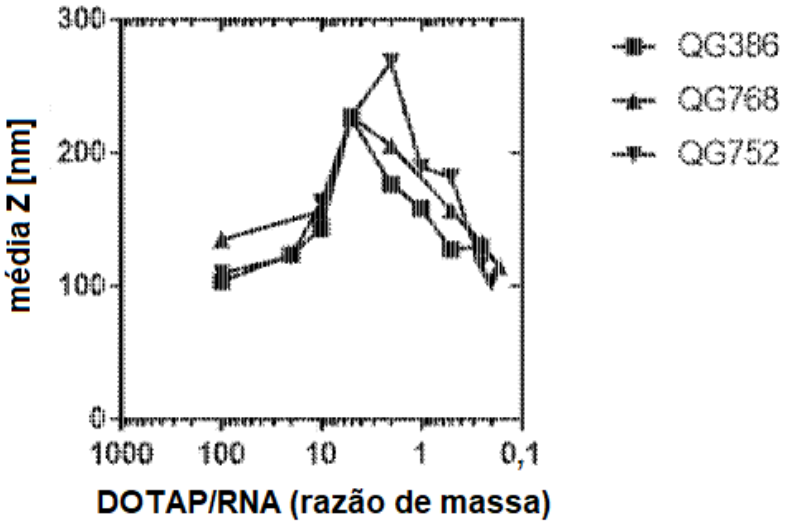
A


300
200
100
0
média Z [nm]
100
10
1
0,1
0,01
N/P
QG386
QG768
QG752

B


300
200
100
0
média Z [nm]
0,01
0,1
1
10
100
RNA/partícula
QG386
QG768
QG752

C


300
200
100
0
média Z [nm]
1000
100
10
1
0,1
DOTAP/RNA (razão de massa)
QG386
QG768
QG752

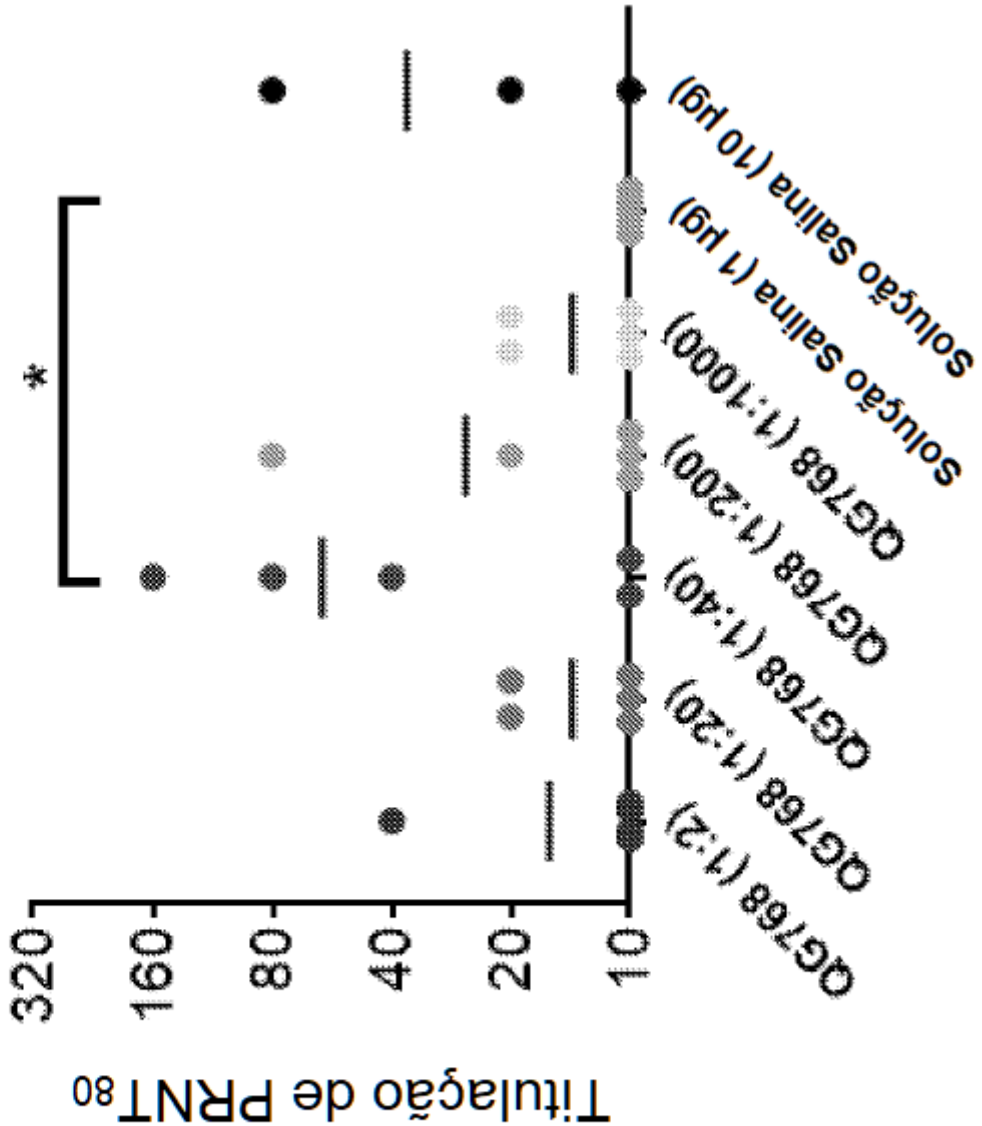

Titulação de PRNT80
320
160
80
40
20
10
*
QG768 (1:2)
QG768 (1:20)
QG768 (1:40)
QG768 (1:200)
QG768 (1:1000)
Solução salina (1 µg)
Solução salina (10 µg)

Figura 5

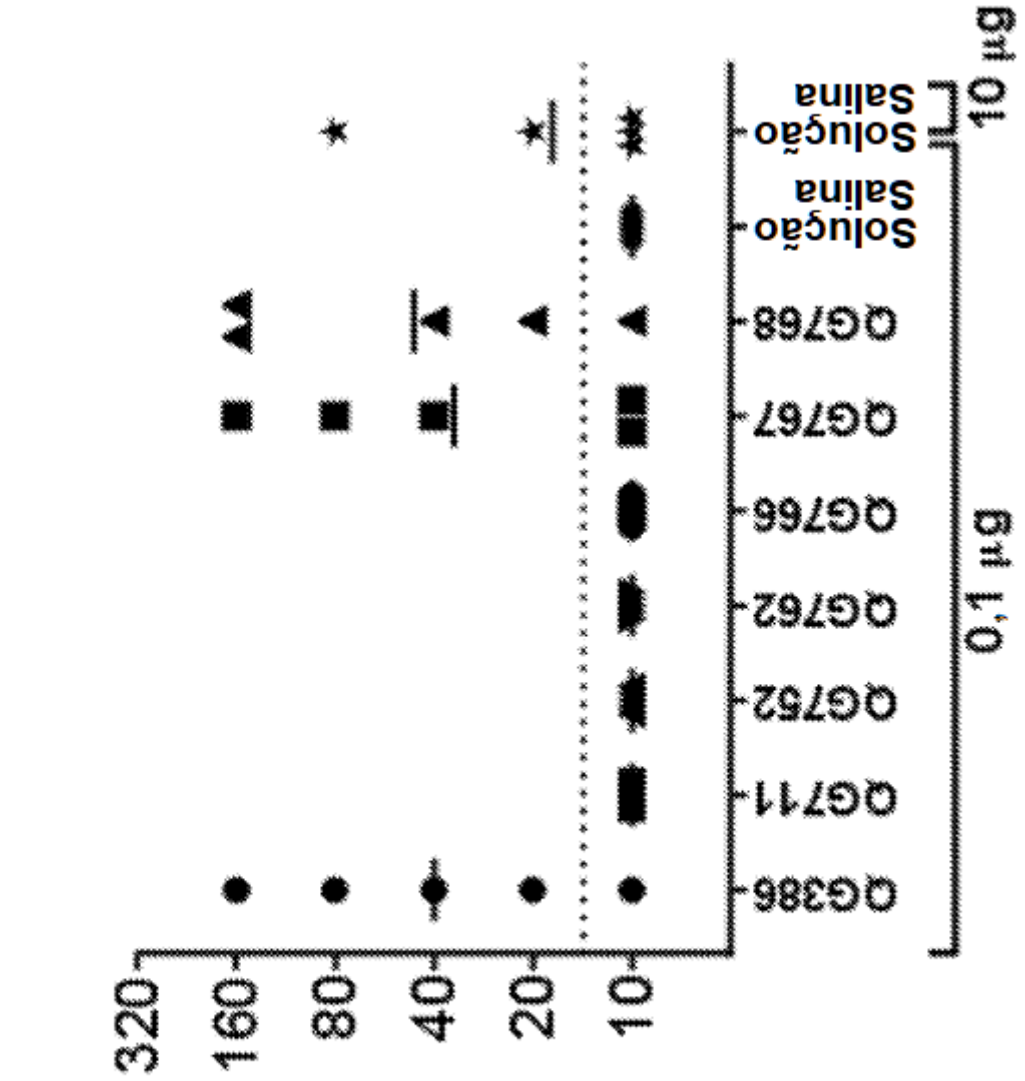

Titulação de Ab Neutralizante
320
160
80
40
20
10
QG386
QG711
QG752
QG762
QG766
QG767
QG768
Solução Salina
Solução Salina
0,1 µg
10 µg

Figura 6

Figura 7A

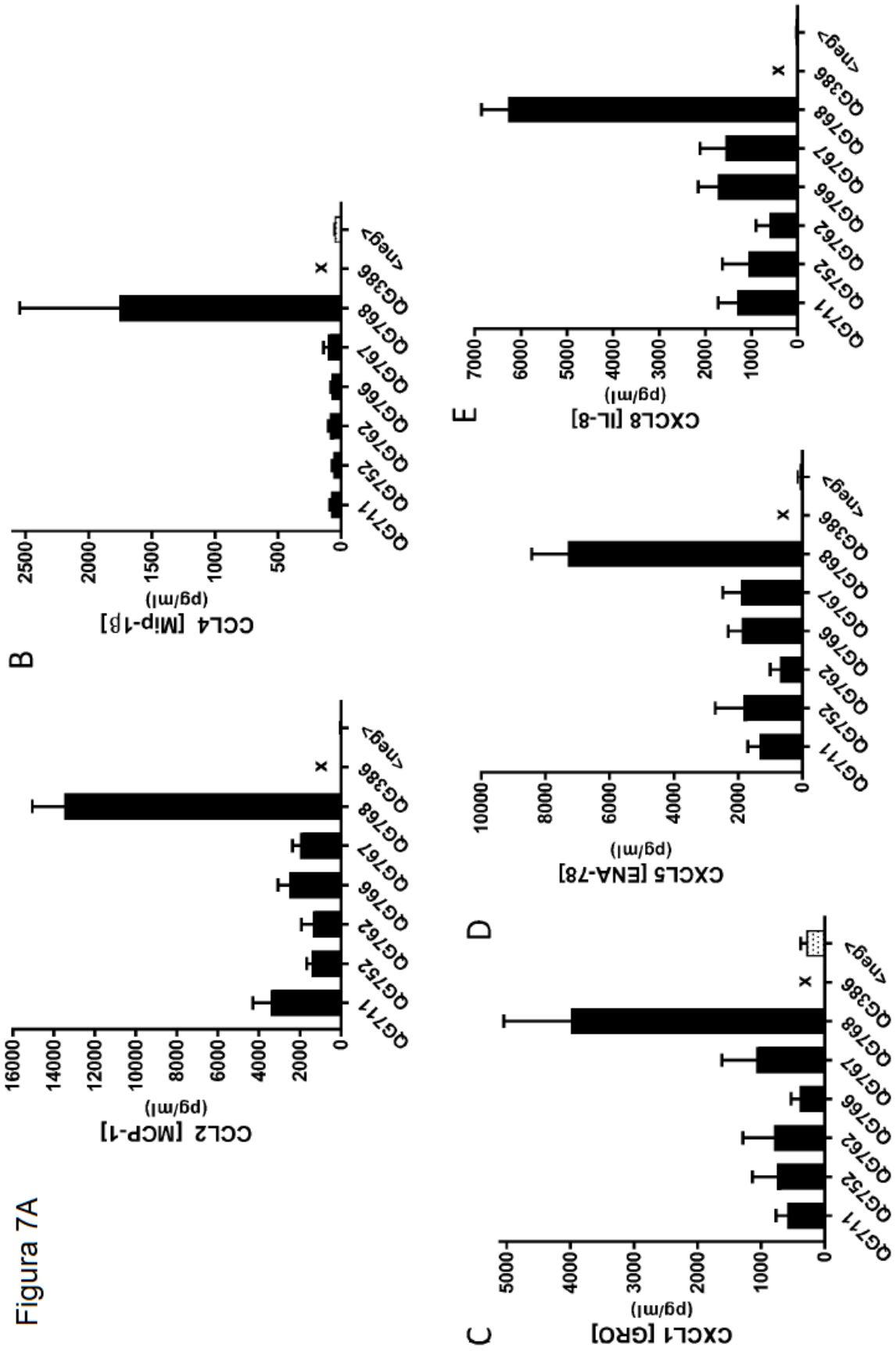

A
CCL2 [MCP-1]
(pg/ml)
B
CCL4 [Mip-1β]
(pg/ml)
C
CXCL1 [GRO]
(pg/ml)
D
CXCL5 [ENA-78]
(pg/ml)
E
CXCL8 [IL-8]
(pg/ml)
QG711
QG752
QG762
QG766
QG767
QG768
QG386
x
<neg>

Figura 8A

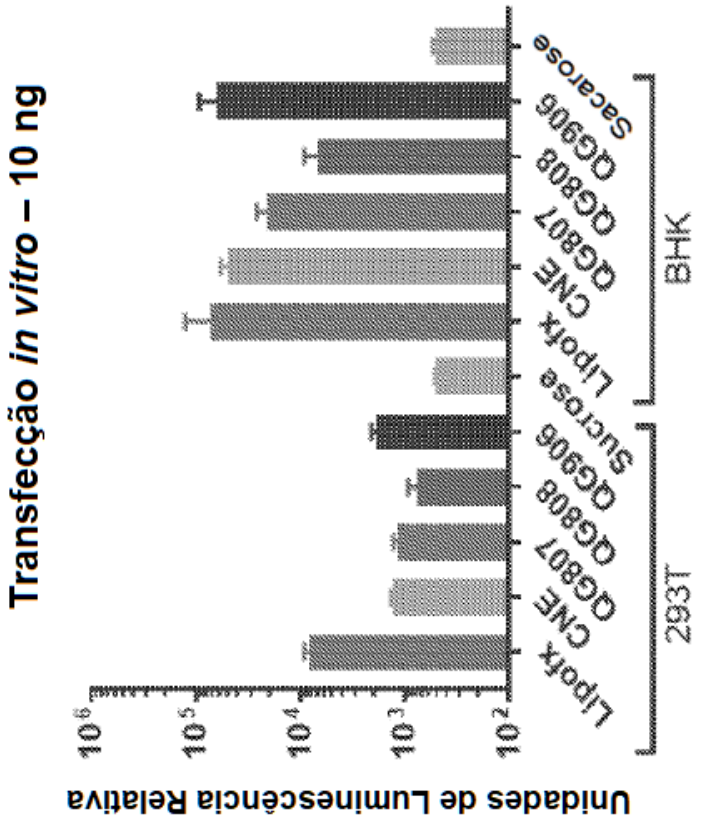


Figura 8B

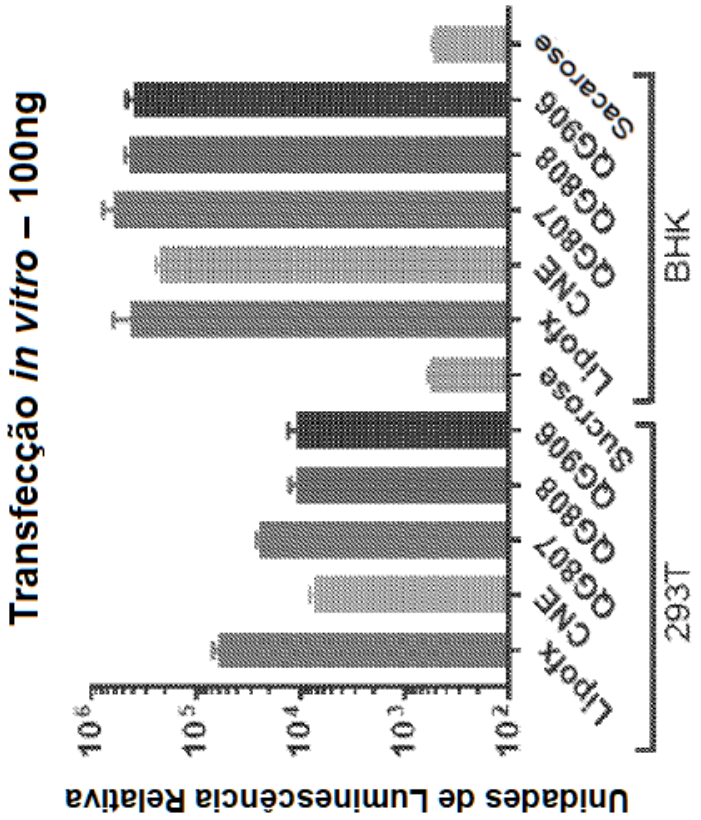


Figura 9

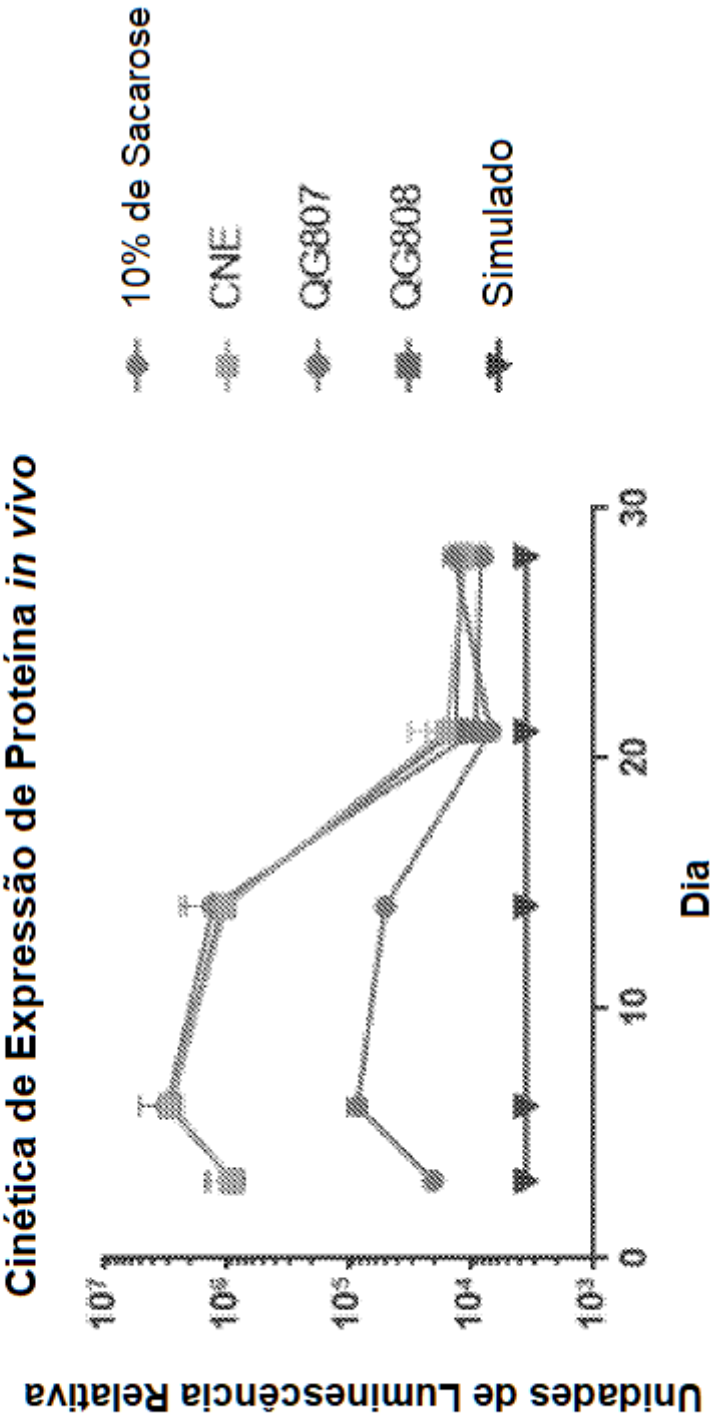

Cinética de Expressão de Proteína *in vivo*
10% de Sacarose
CNE
QG807
QG808
Simulado
Unidades de Luminescência Relativa
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
10
20
30
Dia

Figura 10

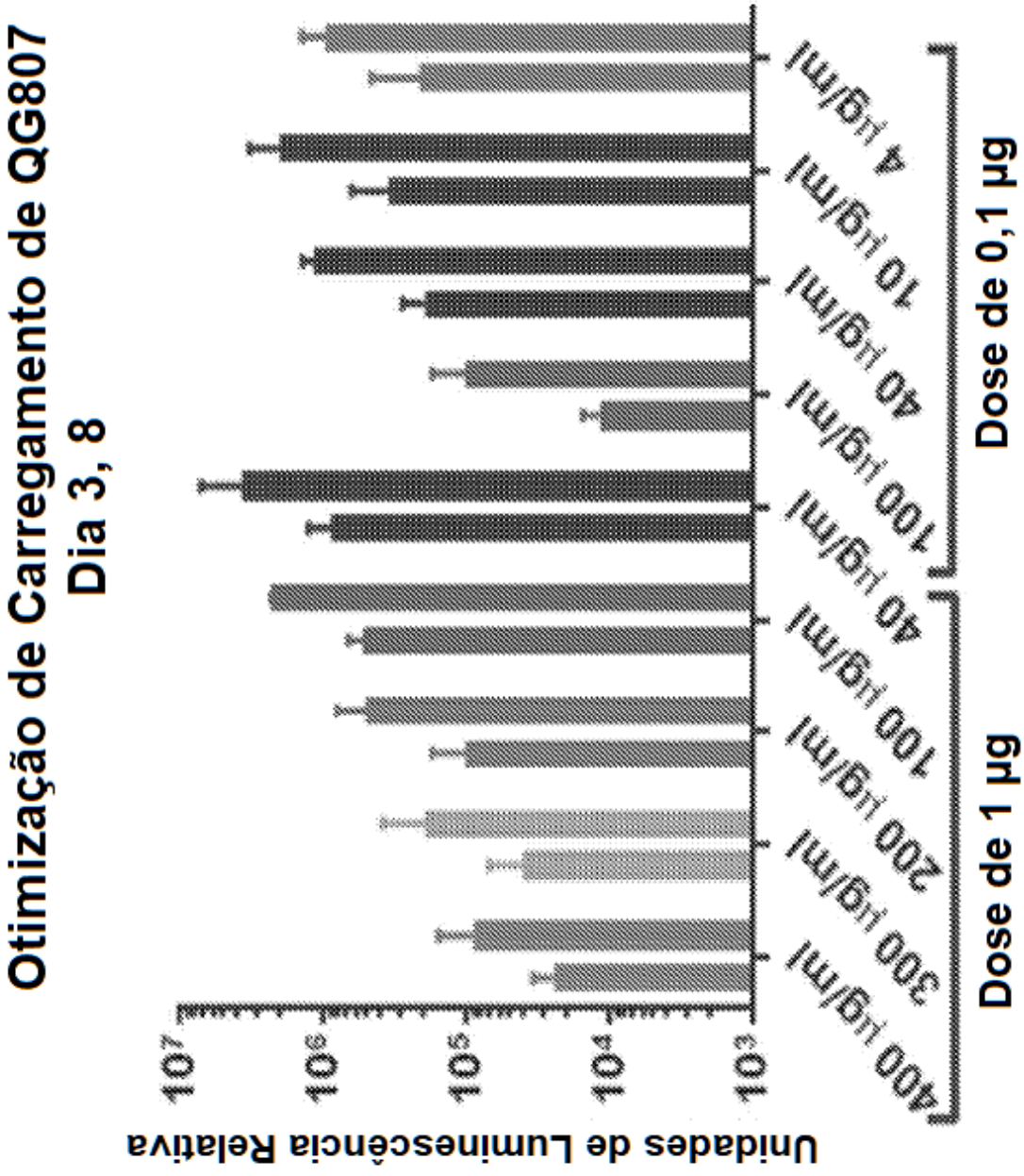

Otimização de Carregamento de QG807
Dia 3, 8
Unidades de Luminescência Relativa
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
400 µg/ml
300 µg/ml
200 µg/ml
100 µg/ml
40 µg/ml
100 µg/ml
40 µg/ml
10 µg/ml
4 µg/ml
Dose de 1 µg
Dose de 0,1 µg

Figura 11

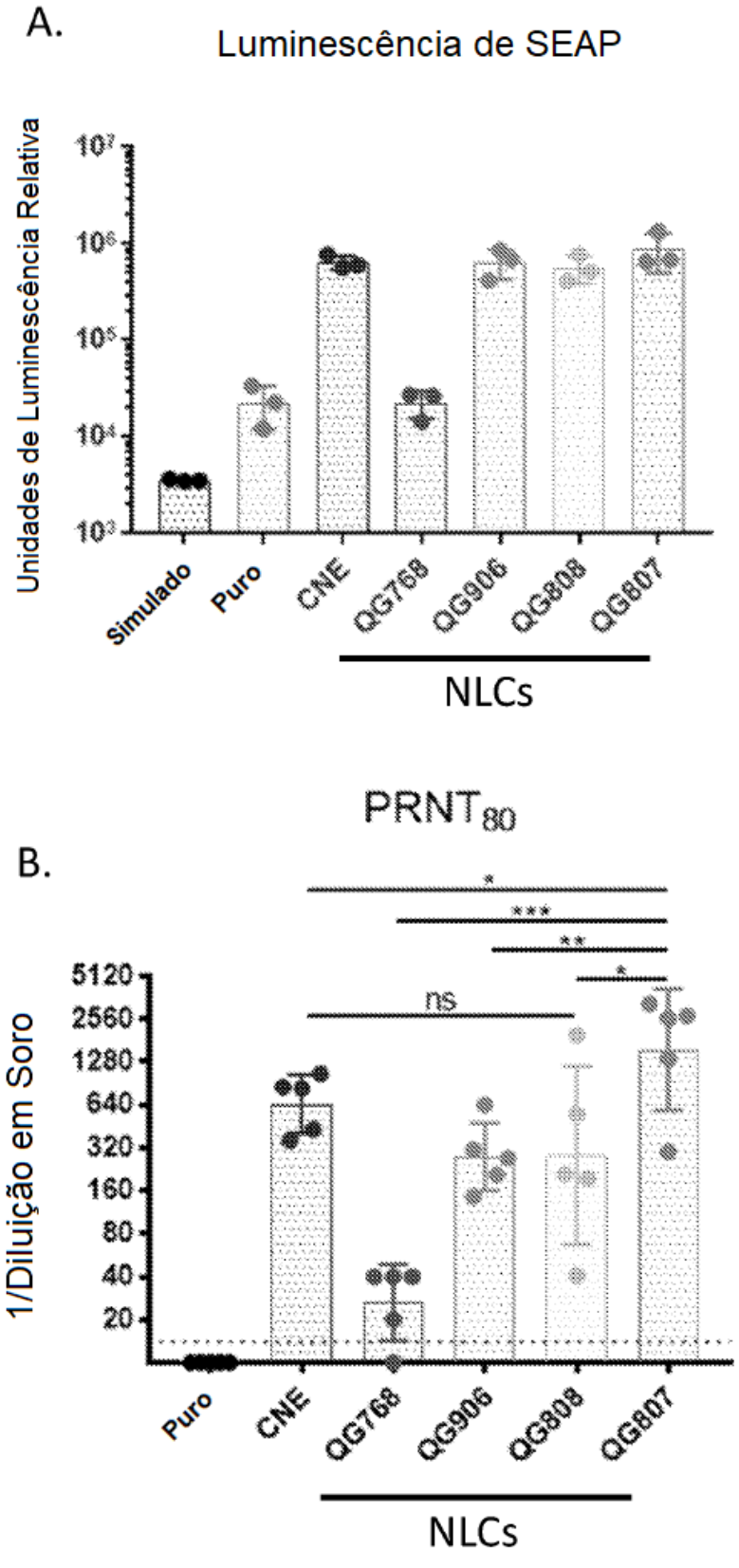

A.
Luminescência de SEAP
Unidades de Luminescência Relativa
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Simulado
Puro
CNE
QG768
QG906
QG808
QG807
NLCs
B.
PRNT80
1/Diluição em Soro
5120
2560
1280
640
320
160
80
40
20
*
***
**
*
ns
Puro
CNE
QG768
QG906
QG808
QG807
NLCs

Figura 11

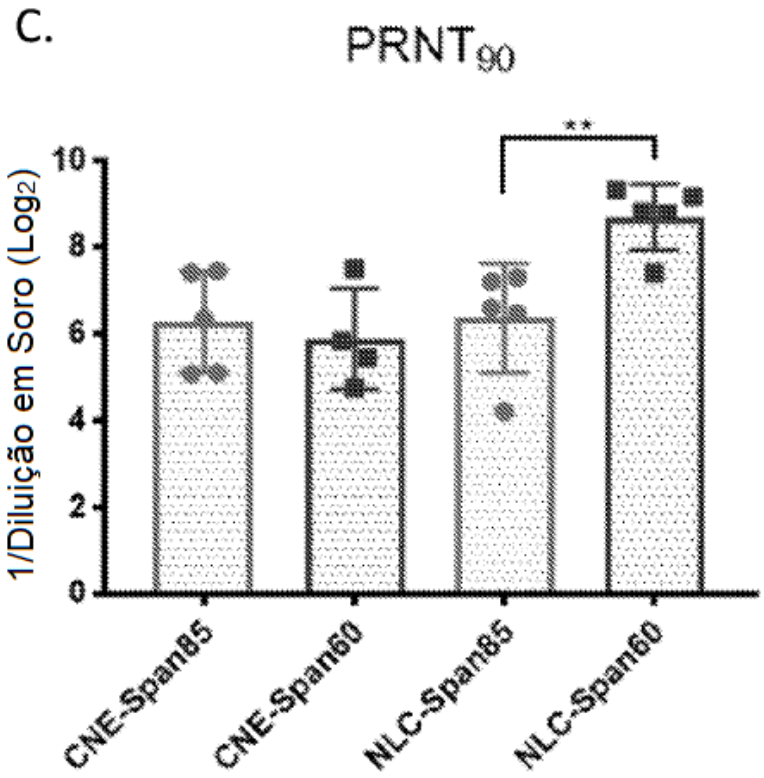


Figura 12

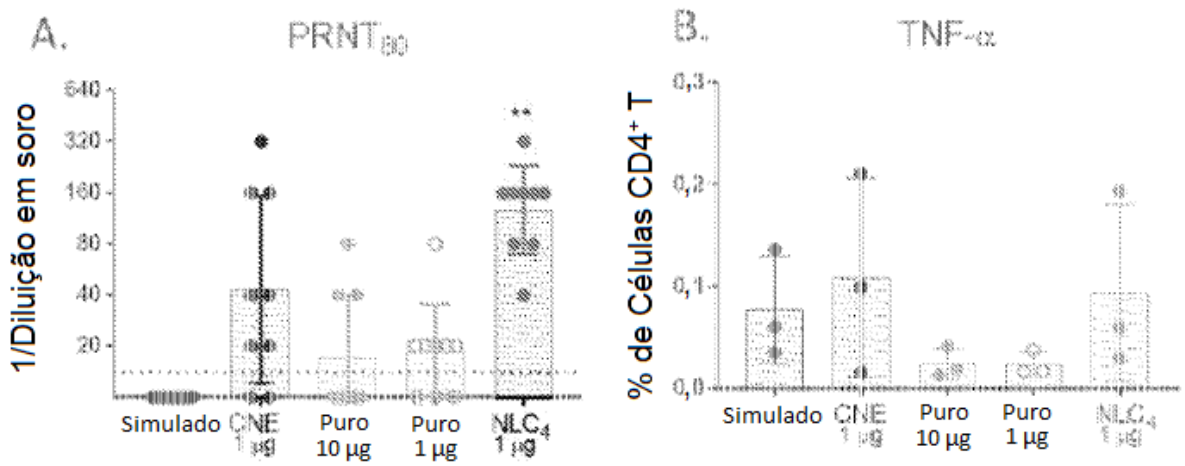


Figura 12

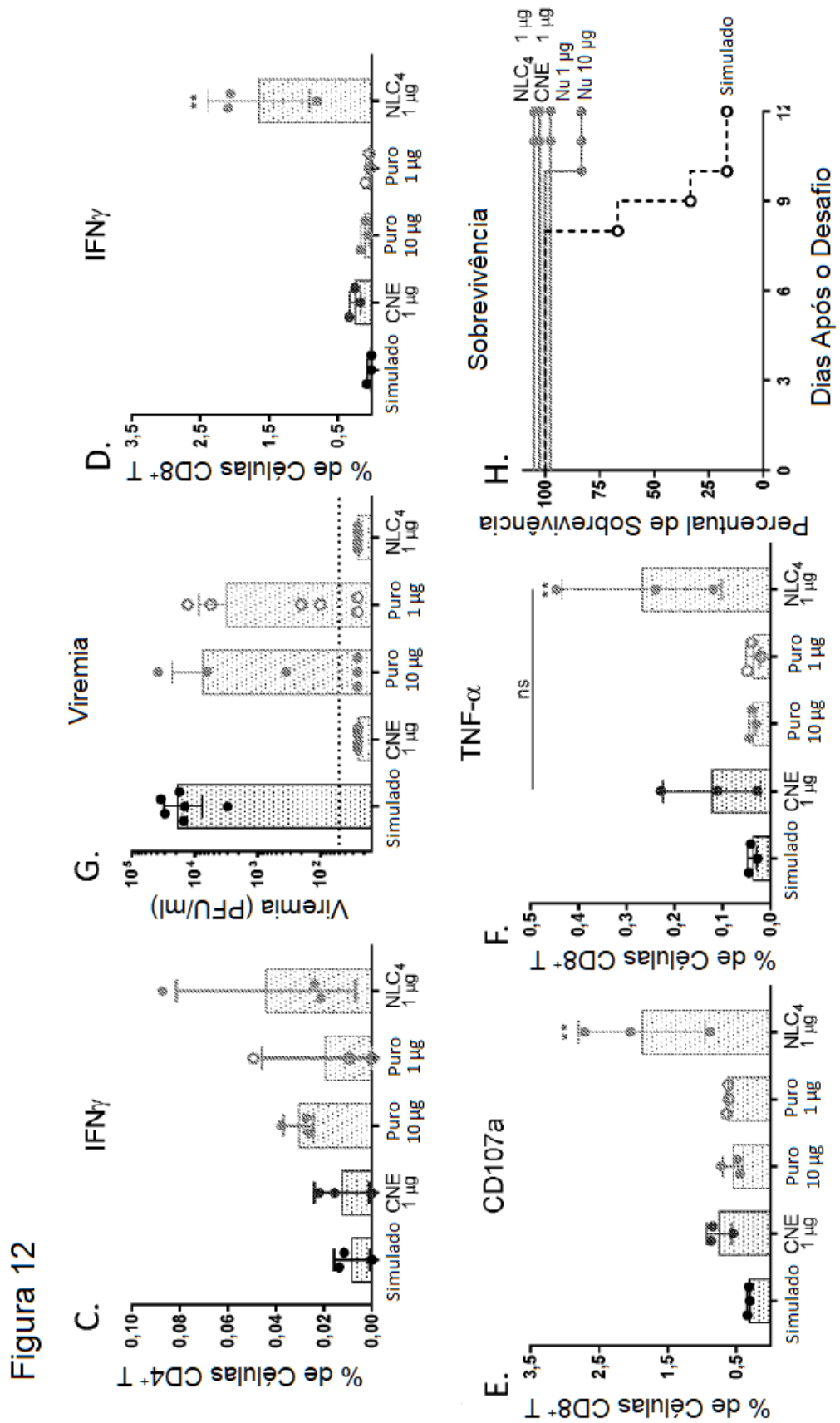

C.
IFNγ
% de Células CD4+ T
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC4 1 µg
G.
Viremia
Viremia (PFU/ml)
D.
IFNγ
% de Células CD8+ T
E.
CD107a
% de Células CD8+ T
F.
TNF-α
ns
% de Células CD8+ T
H.
Sobrevivência
Percentual de Sobrevivência
Dias Após o Desafio
NLC4 1 µg
CNE 1 µg
Nu 1 µg
Nu 10 µg
Simulado

Figura 13

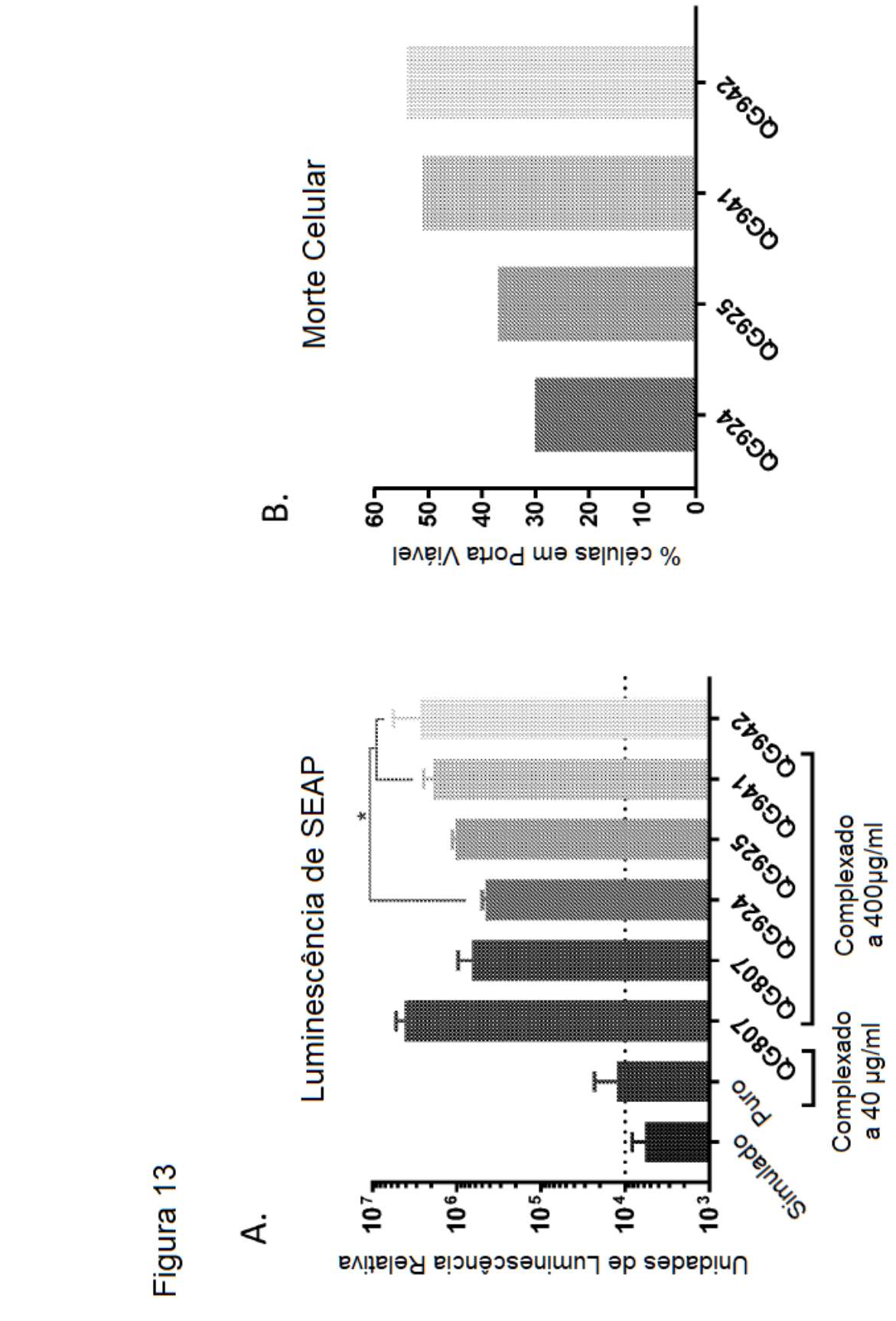
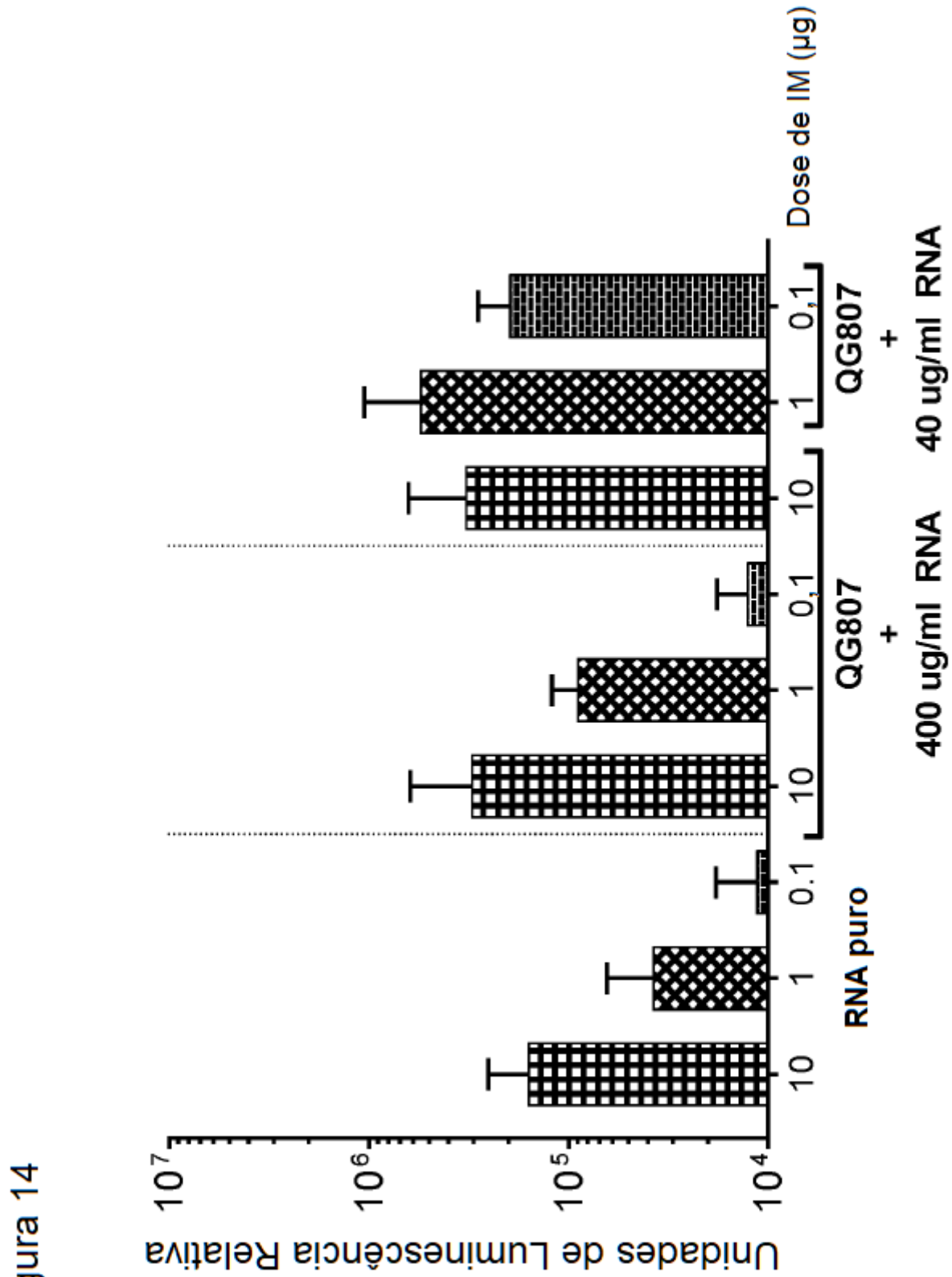
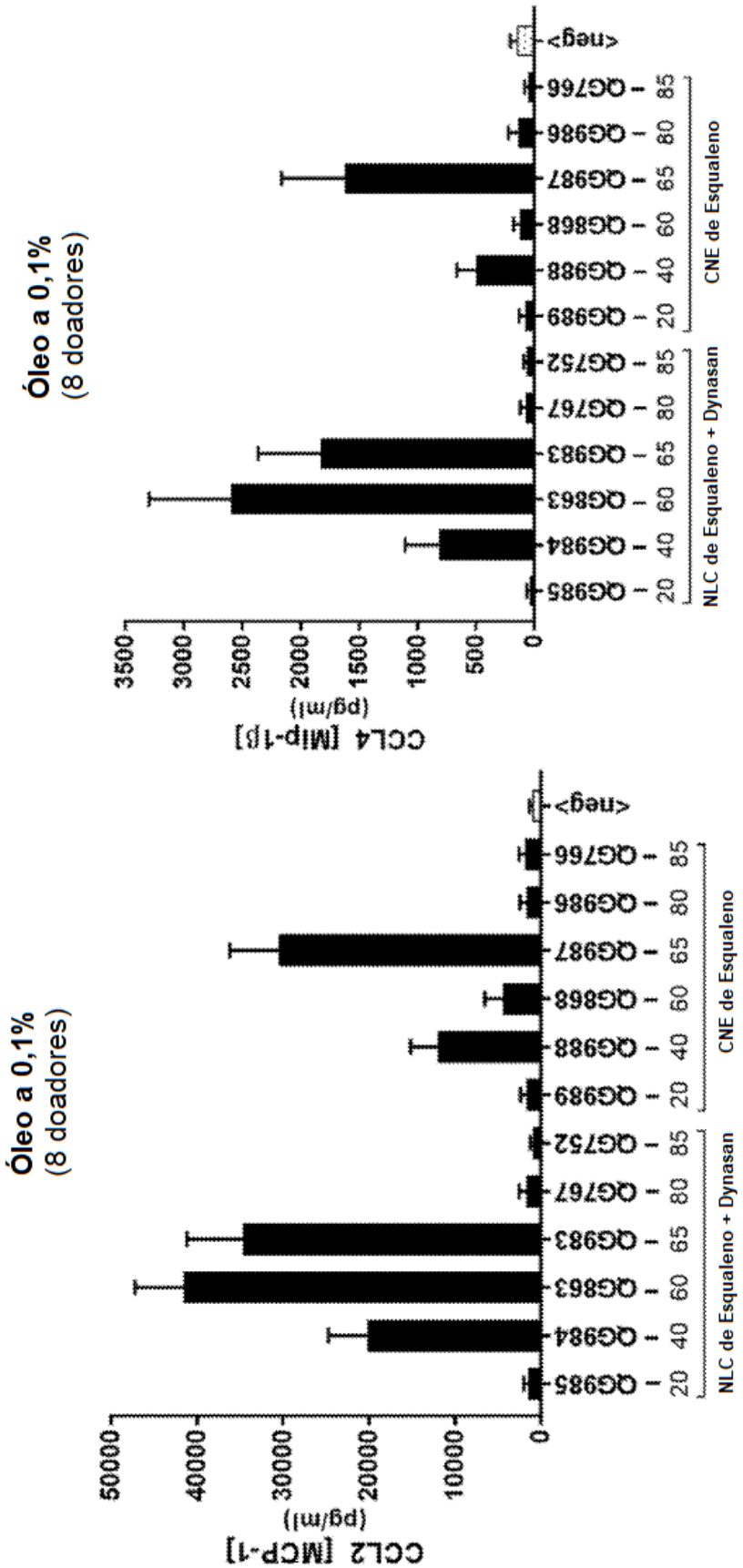

A.
Luminescência de SEAP
Unidades de Luminescência Relativa
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
*
Simulado
Puro
QG807
QG807
QG924
QG925
QG941
QG942
Complexado a 40 µg/ml
Complexado a 400µg/ml
B.
Morte Celular
% células em Porta Viável
60
50
40
30
20
10
0
QG924
QG925
QG941
QG942

Figura 14


Unidades de Luminescência Relativa
10^7
10^6
10^5
10^4
10
1
0.1
10
1
0,1
10
1
0,1
1
0,1
Dose de IM (µg)
RNA puro
QG807
+
400 ug/ml RNA
QG807
+
40 ug/ml RNA

Figuras 15A e B



Figuras 15C e D

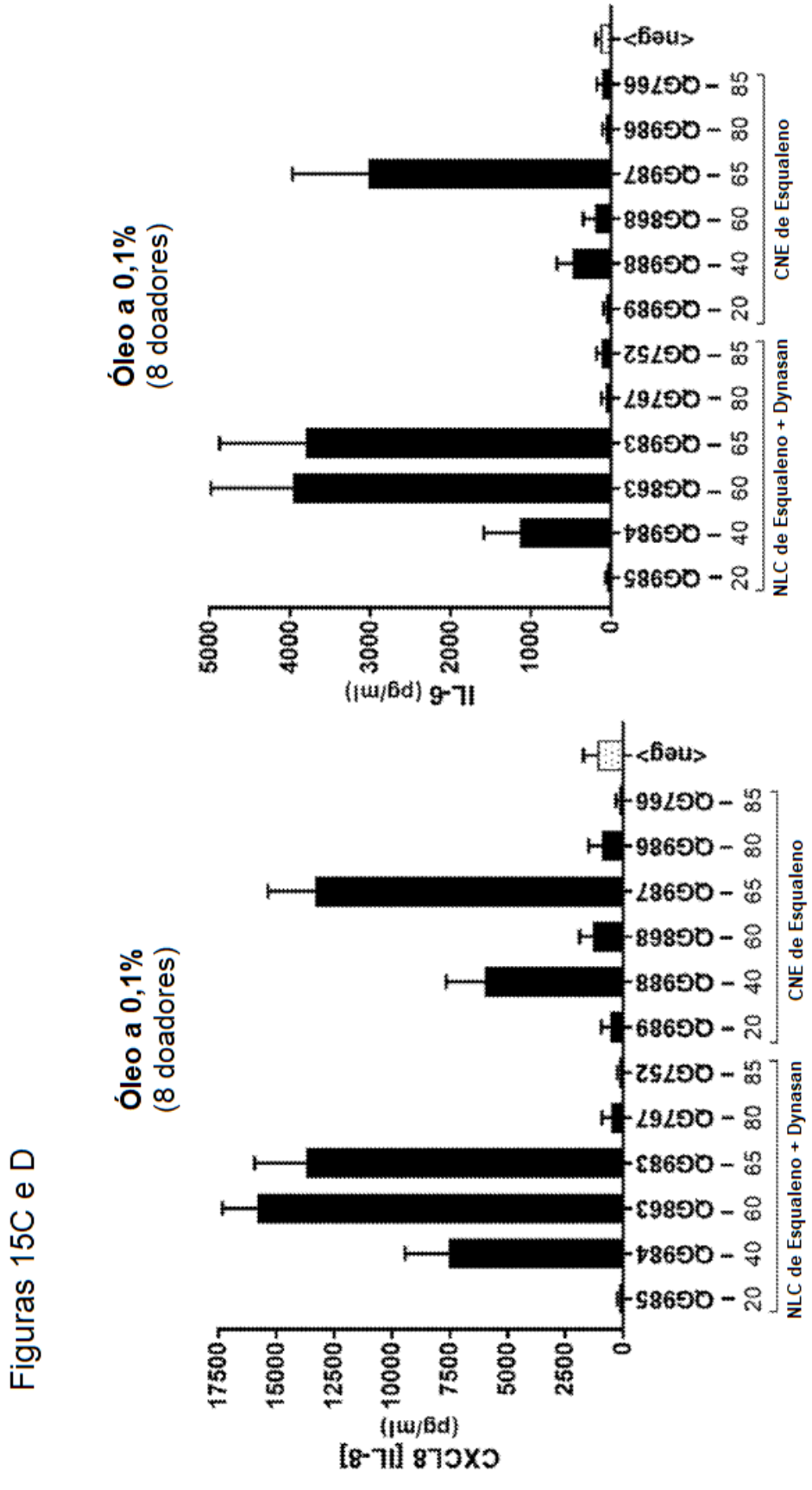
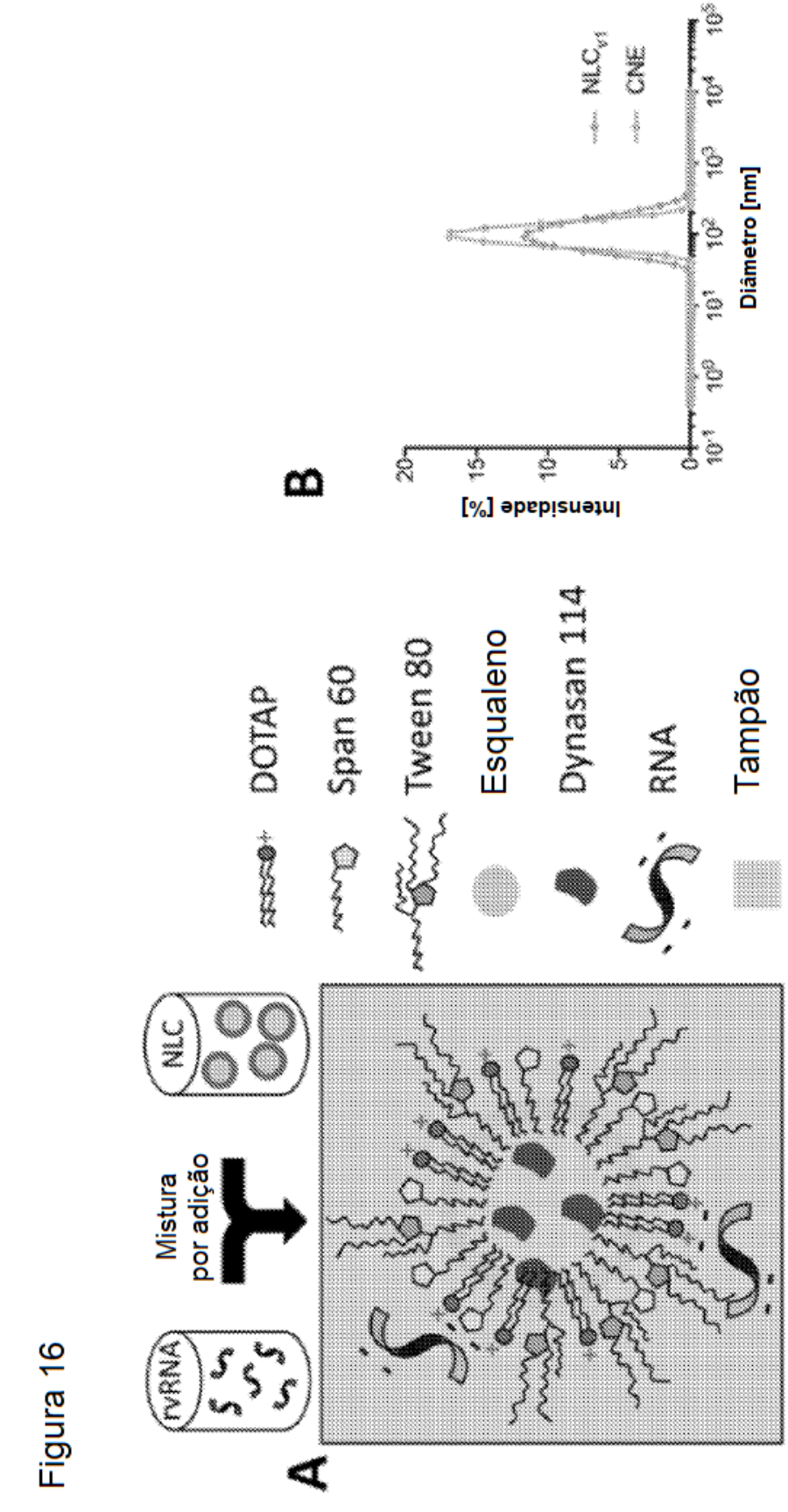


Figura 16


A
tvRNA
Mistura por adição
NLC
DOTAP
Span 60
Tween 80
Esqualeno
Dynasan 114
RNA
Tampão
B
Intensidade [%]
Diâmetro [nm]
NLC$_{v1}$
CNE

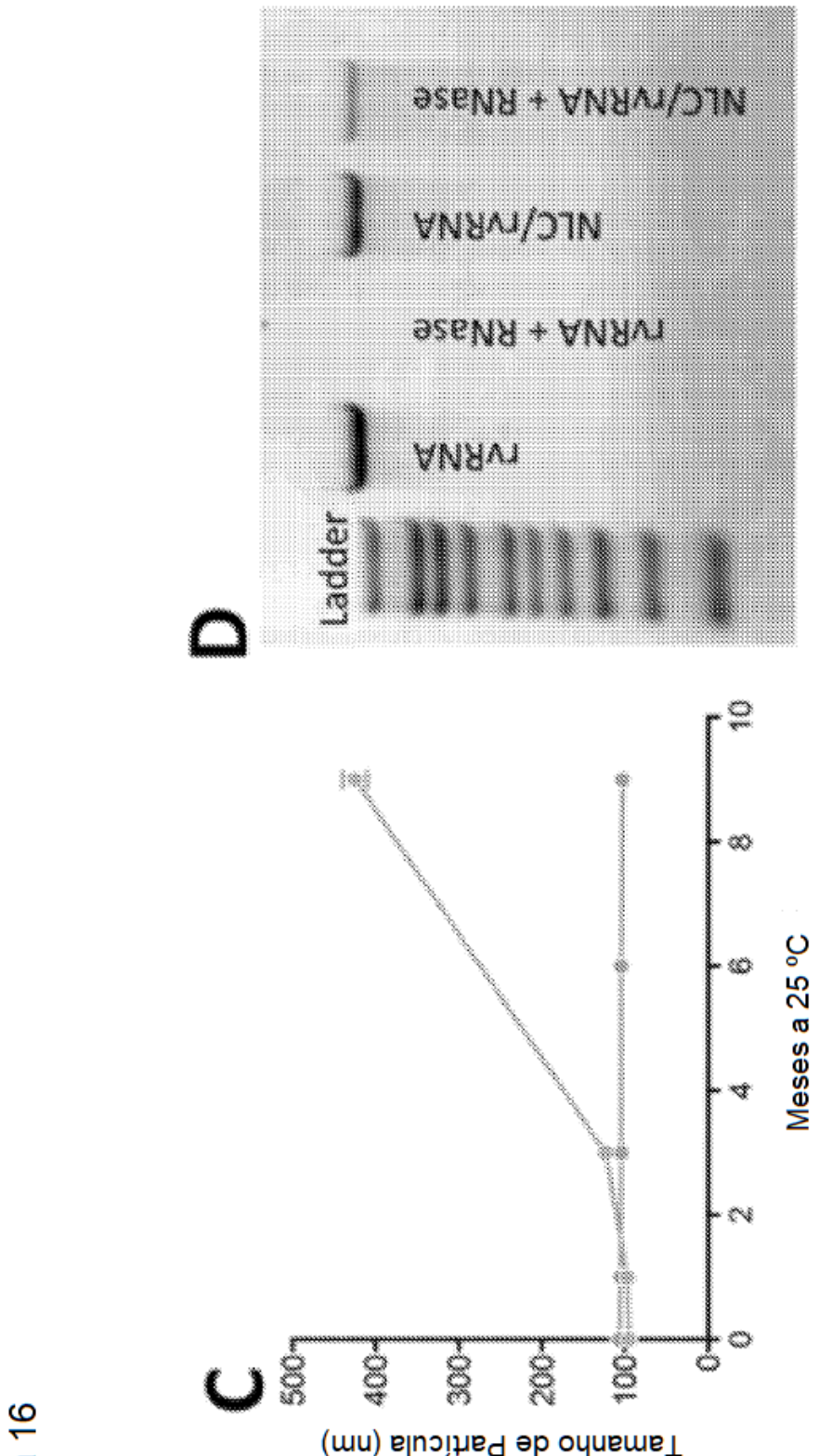

D
Ladder
rvRNA
rvRNA + RNase
NLC/rvRNA
NLC/rvRNA + RNase
C
Tamanho de Partícula (nm)
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
Meses a 25 °C

Figura 16

Figura 17

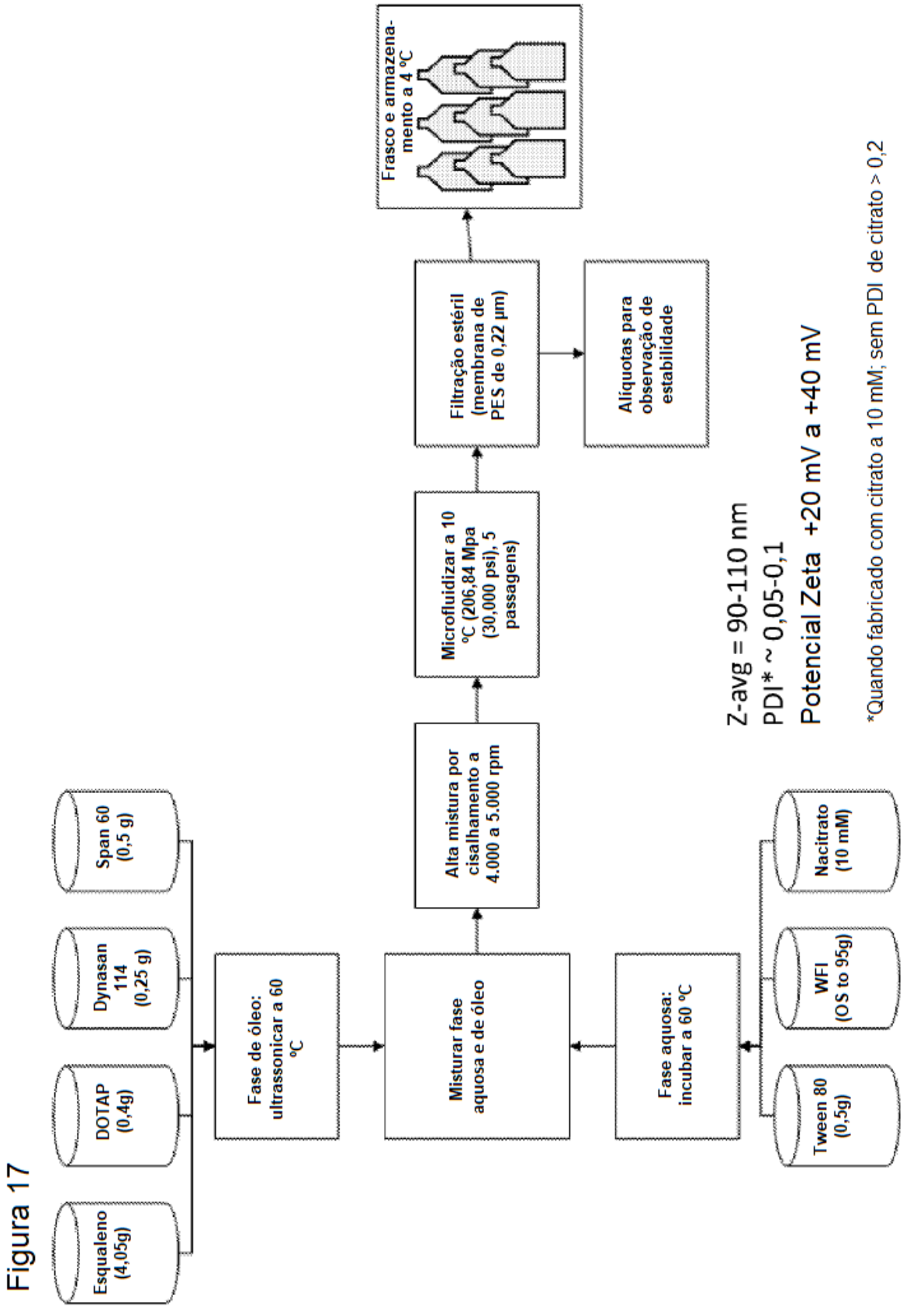
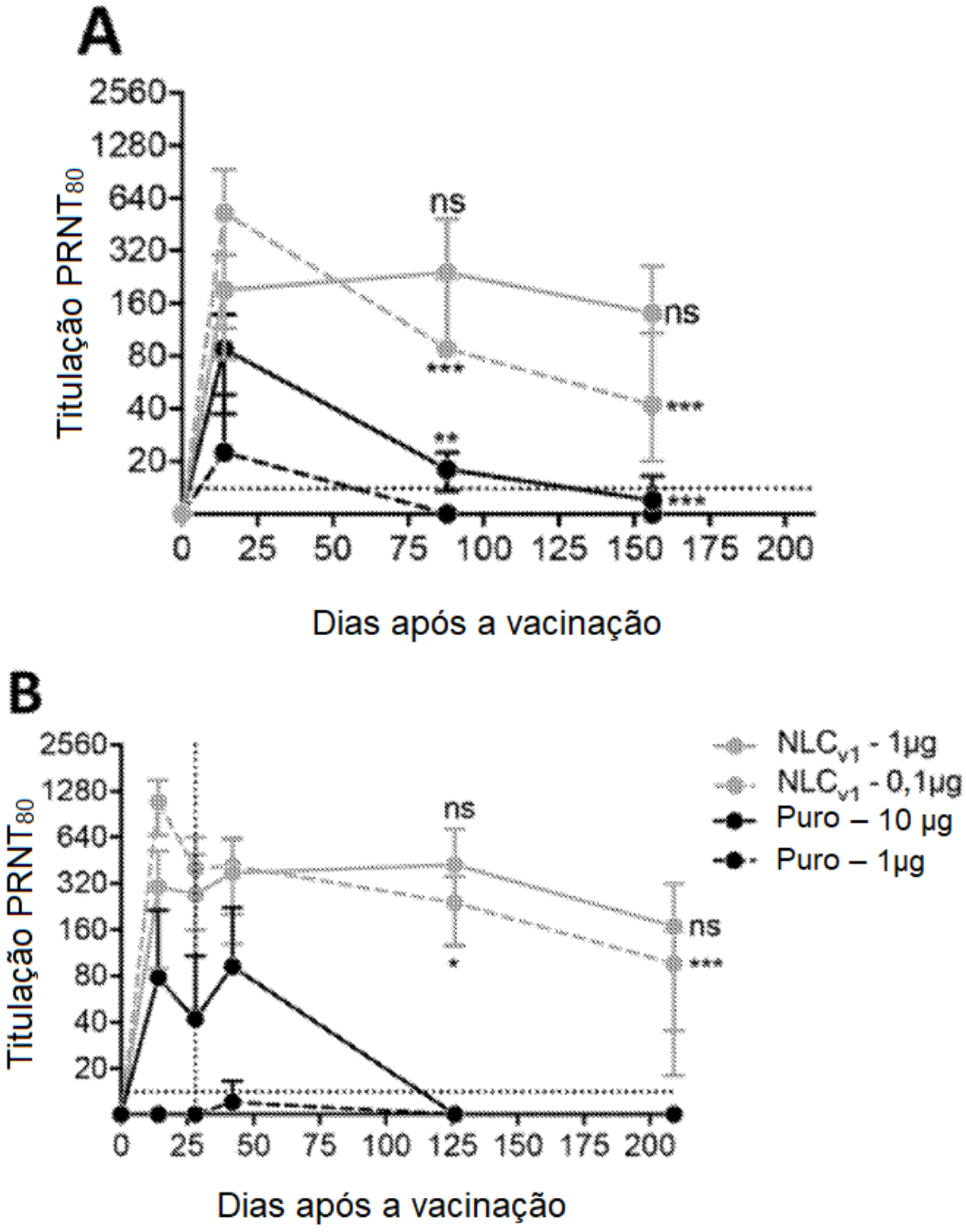

Esqualeno (4,05g)
DOTAP (0,4g)
Dynasan 114 (0,25 g)
Span 60 (0,5 g)
Fase de óleo: ultrassonicar a 60 °C
Tween 80 (0,5g)
WFI (OS to 95g)
Nacitrato (10 mM)
Fase aquosa: incubar a 60 °C
Misturar fase aquosa e de óleo
Alta mistura por cisalhamento a 4.000 a 5.000 rpm
Microfluidizar a 10 °C (206,84 Mpa (30,000 psi), 5 passagens)
Filtração estéril (membrana de PES de 0,22 µm)
Alíquotas para observação de estabilidade
Frasco e armazena-mento a 4 °C
Z-avg = 90-110 nm
PDI* ~ 0,05-0,1
Potencial Zeta +20 mV a +40 mV
*Quando fabricado com citrato a 10 mM; sem PDI de citrato > 0,2

Figura 18


A
Titulação PRNT80
2560
1280
640
320
160
80
40
20
0
25
50
75
100
125
150
175
200
ns
ns
***
***
**
***
Dias após a vacinação
B
Titulação PRNT80
2560
1280
640
320
160
80
40
20
0
25
50
75
100
125
150
175
200
ns
ns
*
***
NLCv1 - 1µg
NLCv1 - 0,1µg
Puro – 10 µg
Puro – 1µg
Dias após a vacinação

Figuras 19A e B

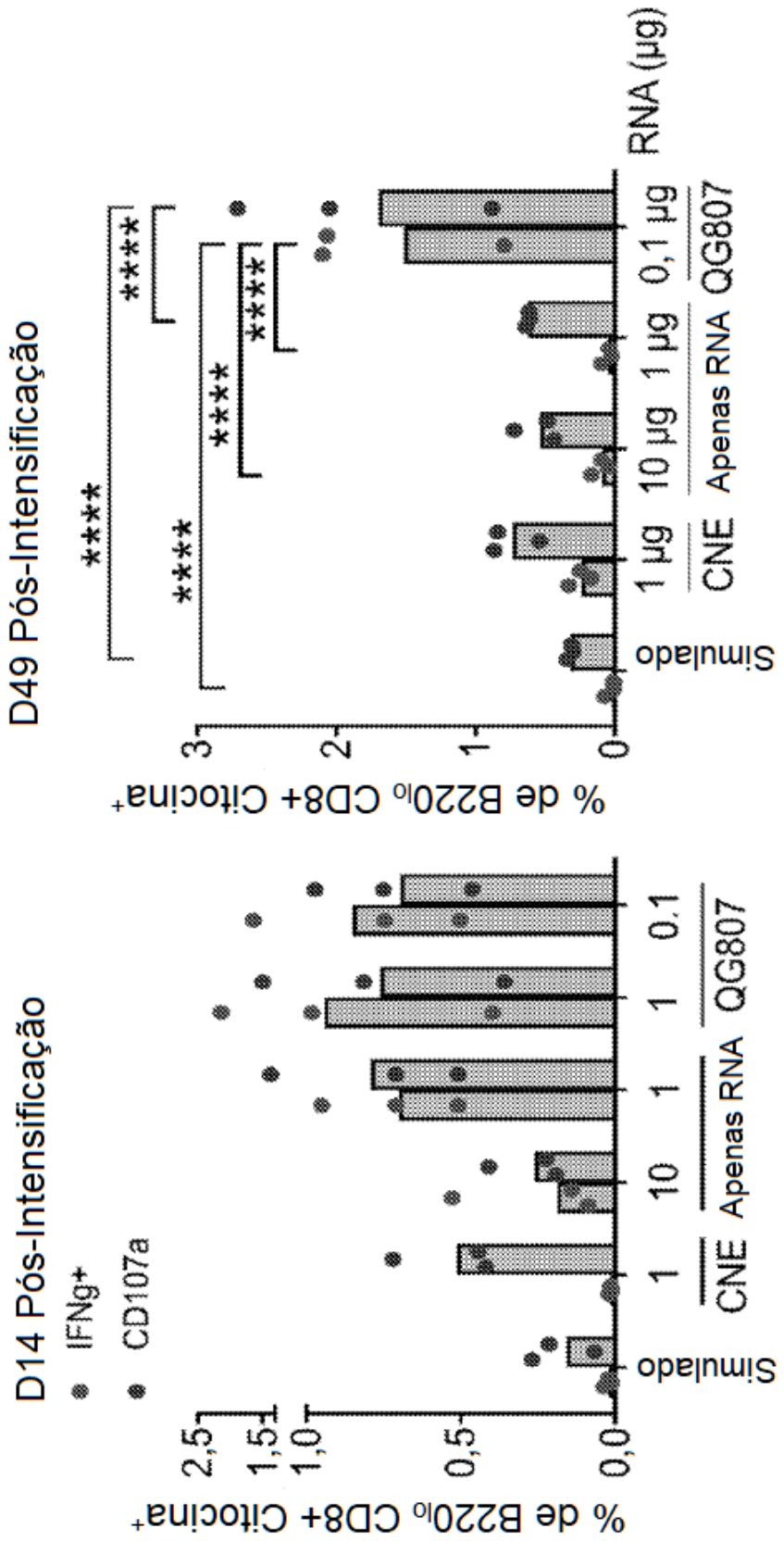


Figura 20

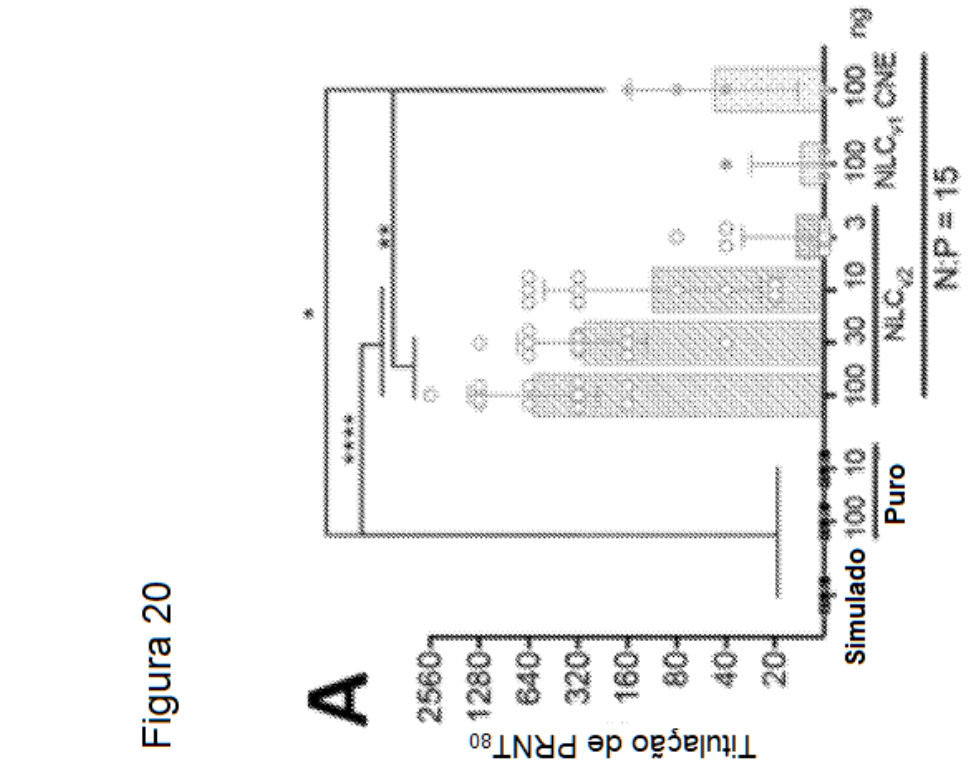
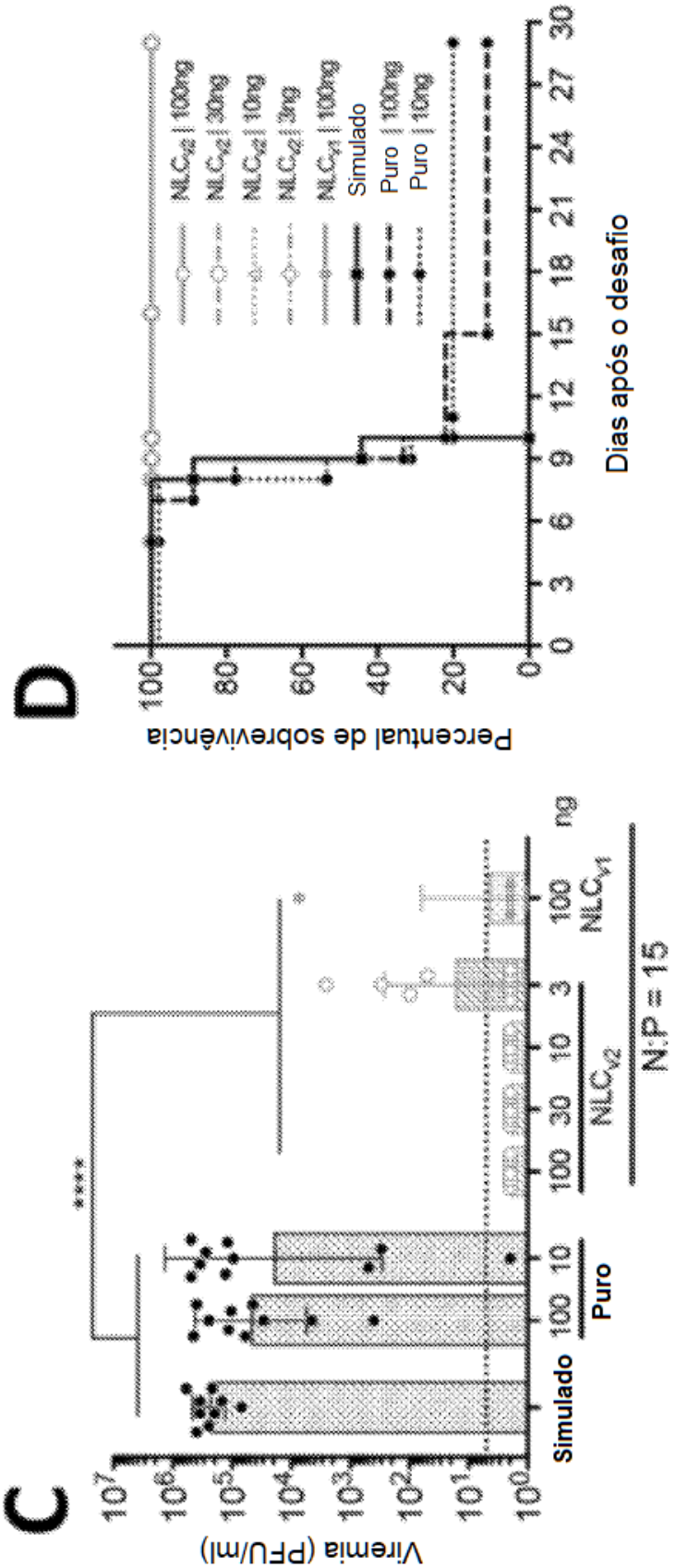

A
Titulação de PRNT80
2560
1280
640
320
160
80
40
20
****
*
**
Simulado
100
10
Puro
100
30
10
3
100
100
ng
NLCV2
NLCV1 CNE
N:P = 15
B
% de Células T B220loCD8+IFNγ+
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
ns
ns
Simulado
100
10
Puro
100
30
10
3
100
100
ng
NLCV2
NLCV1 CNE
N:P = 15

Figura 20


C
Viremia (PFU/ml)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
****
Simulado
100
10
Puro
100
30
10
3
NLC_{V2}
100
NLC_{V1}
ng
N:P = 15
D
Percentual de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
Dias após o desafio
NLC_{V2} | 100ng
NLC_{V2} | 30ng
NLC_{V2} | 10ng
NLC_{V2} | 3ng
NLC_{V1} | 100ng
Simulado
Puro | 100ng
Puro | 10ng

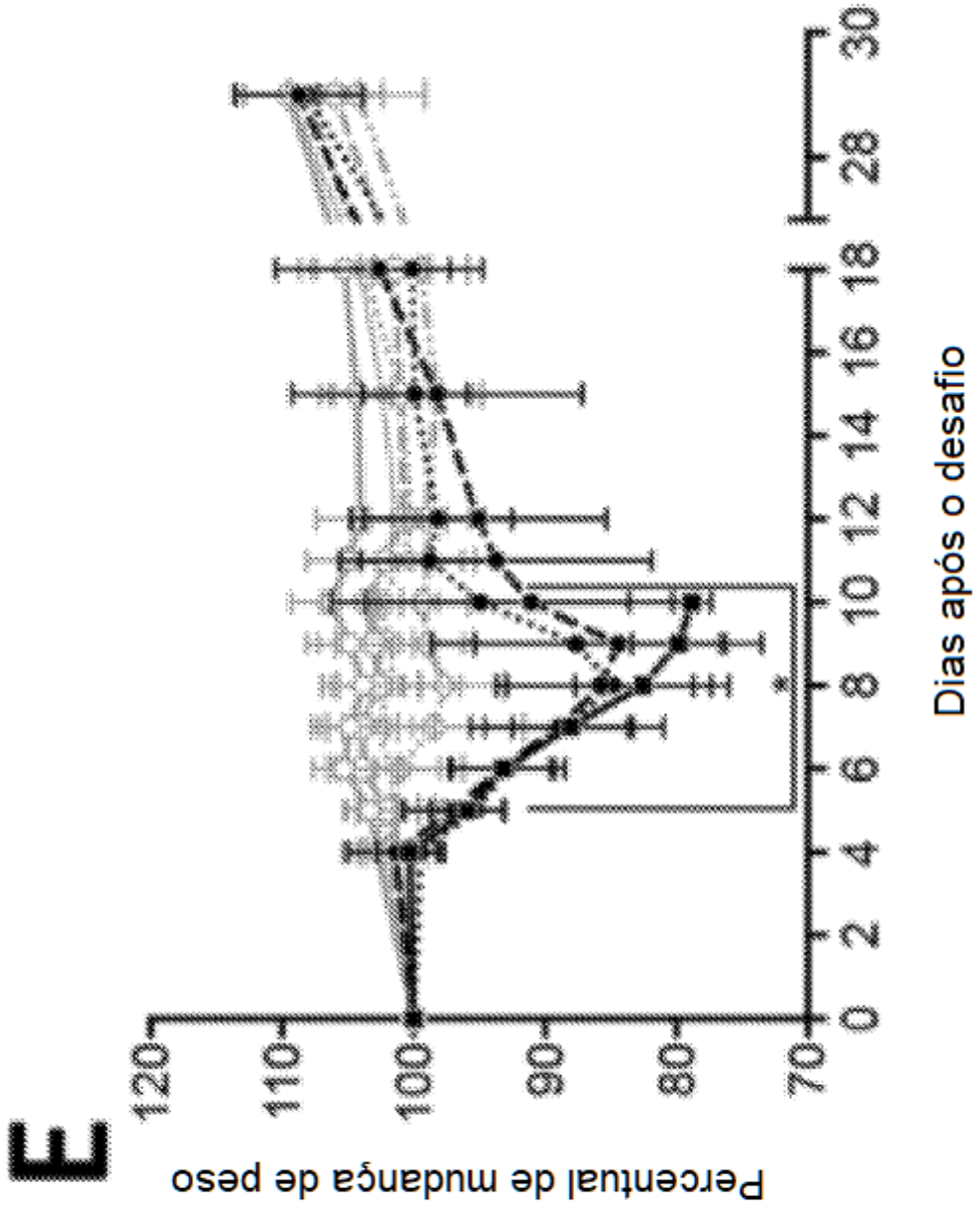

E
Percentual de mudança de peso
120
110
100
90
80
70
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 28 30
Dias após o desafio

Figura 20

Figura 21

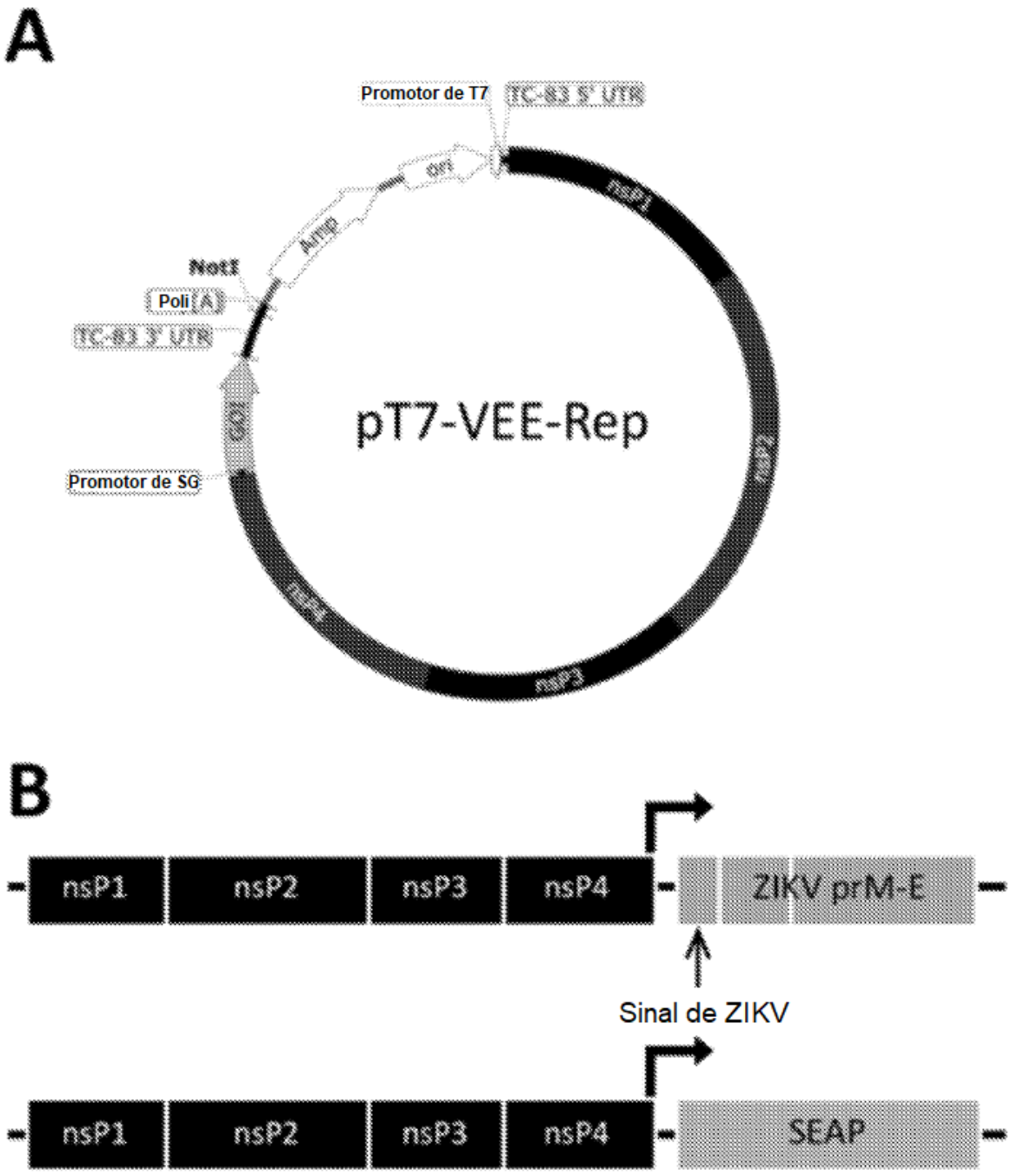

A
Promotor de T7
TC-83 5' UTR
ori
AmpR
NotI
Poli (A)
TC-83 3' UTR
pT7-VEE-Rep
Promotor de SG
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
B
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
ZIKV prM-E
Sinal de ZIKV
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
SEAP

Figura 21

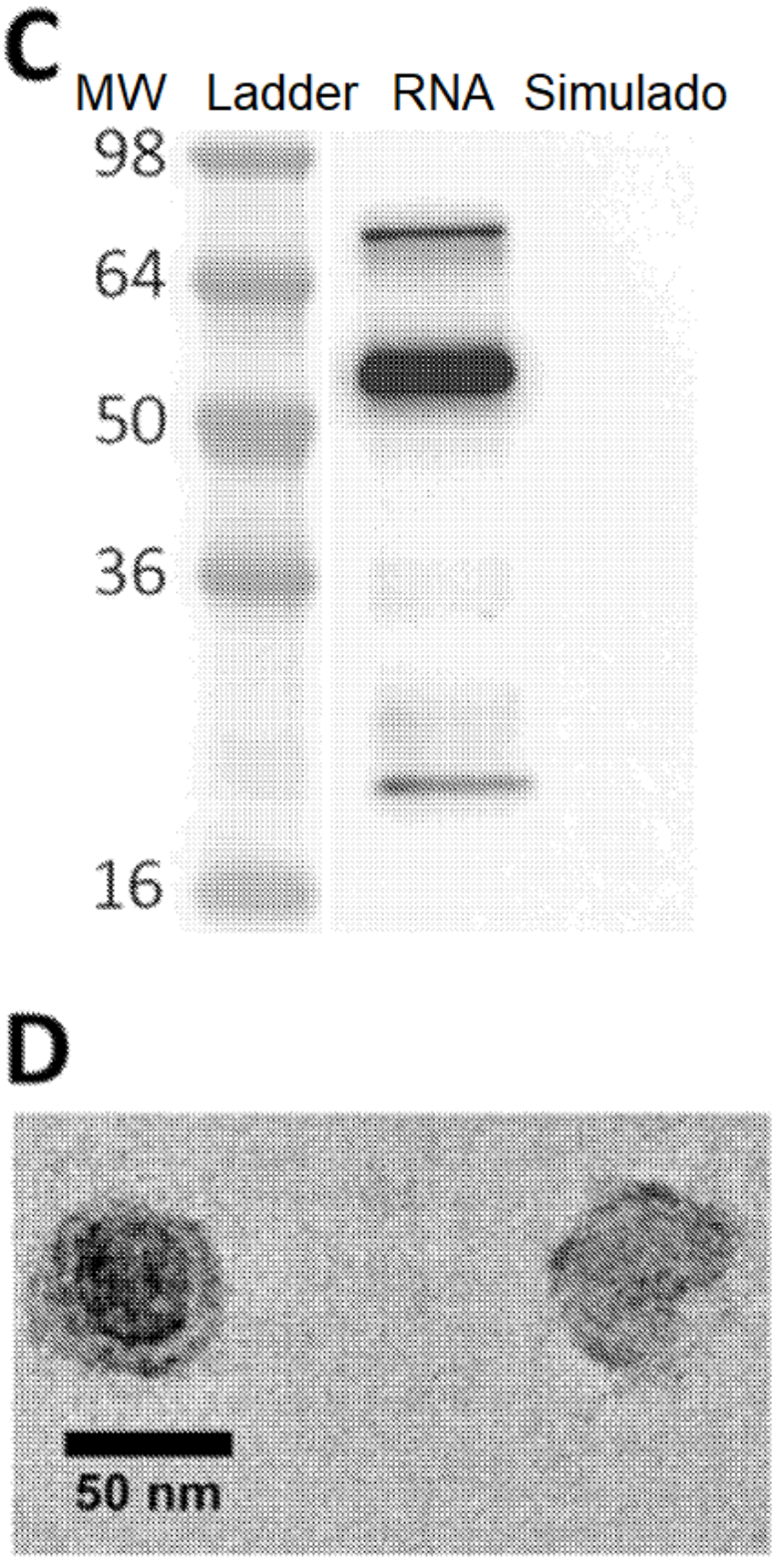


Figura 22

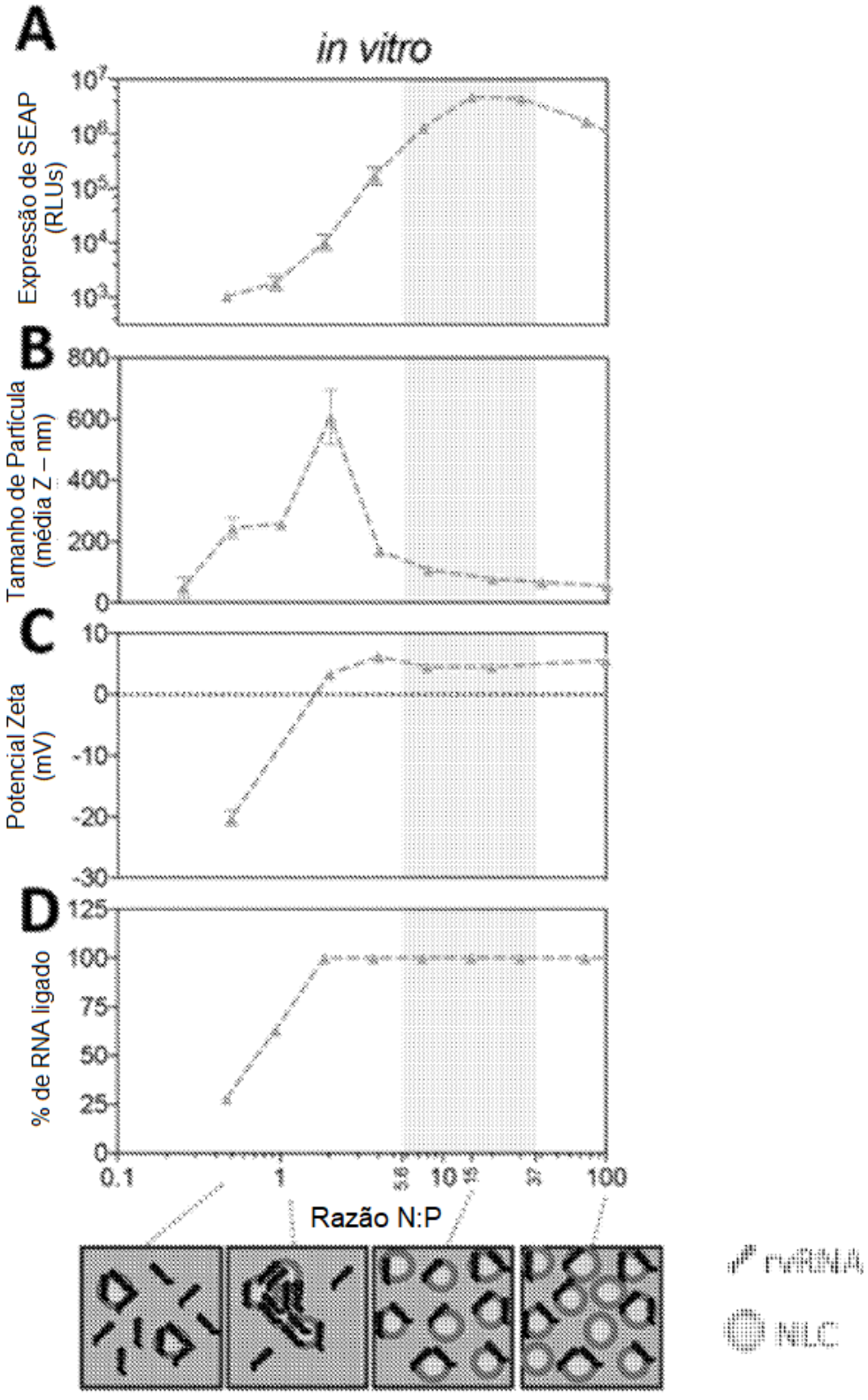
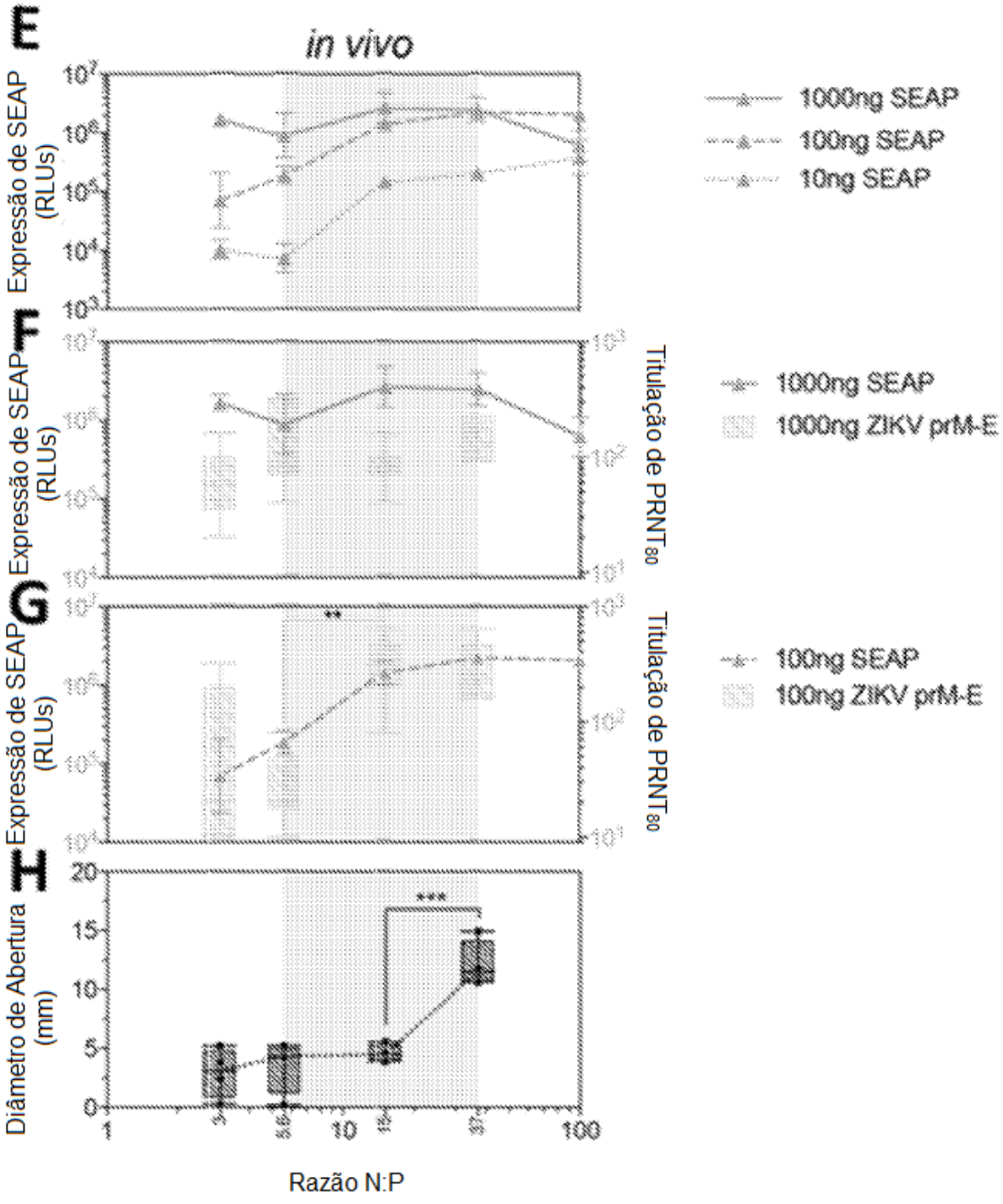

A
in vitro
Expressão de SEAP (RLUs)
B
Tamanho de Partícula (média Z – nm)
C
Potencial Zeta (mV)
D
% de RNA ligado
Razão N:P
mRNA
NLC

Figura 22


E
in vivo
Expressão de SEAP (RLUs)
1000ng SEAP
100ng SEAP
10ng SEAP
F
Expressão de SEAP (RLUs)
Titulação de PRNT80
1000ng SEAP
1000ng ZIKV prM-E
G
Expressão de SEAP (RLUs)
Titulação de PRNT80
100ng SEAP
100ng ZIKV prM-E
H
Diâmetro de Abertura (mm)
Razão N:P

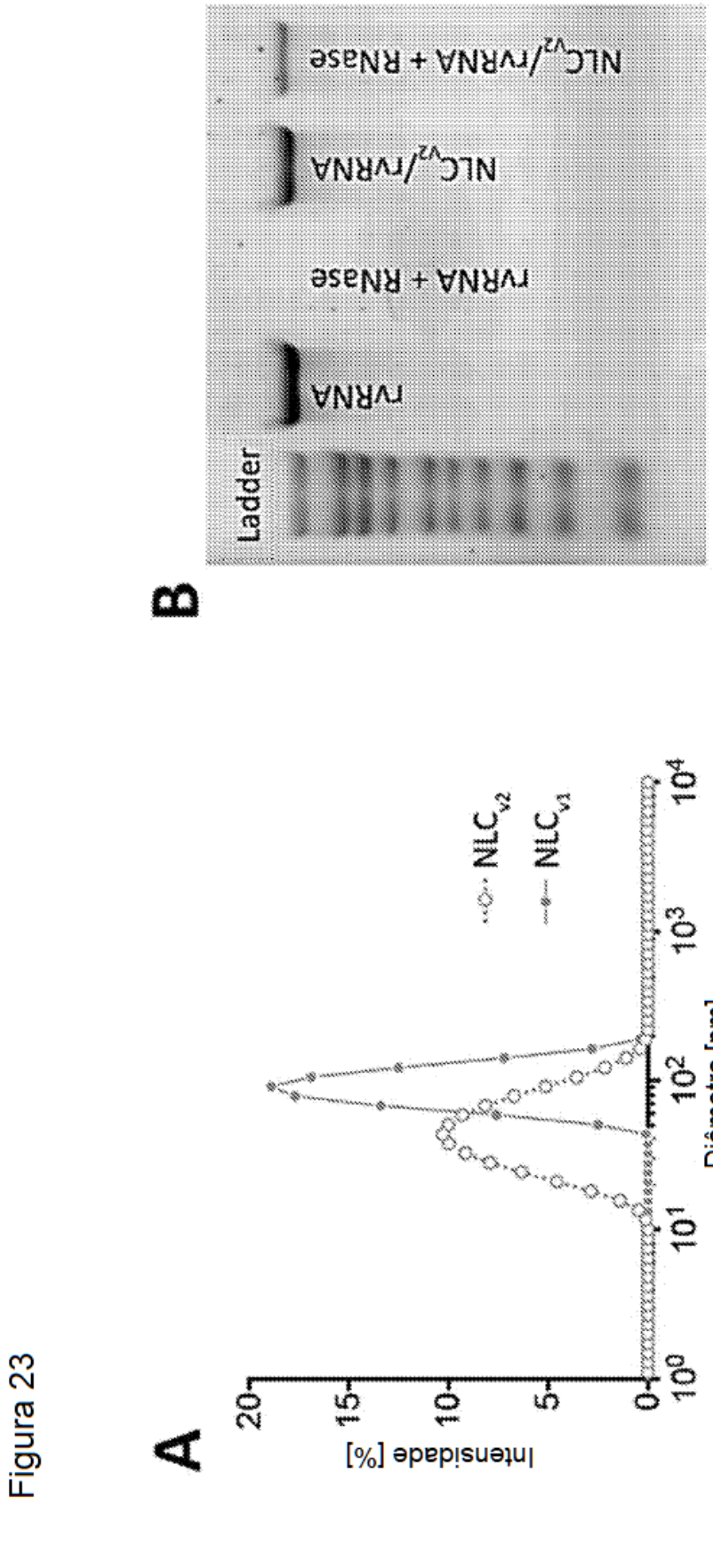

A
Intensidade [%]
20
15
10
5
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Diâmetro [nm]
NLC_{v2}
NLC_{v1}
B
Ladder
rvRNA
rvRNA + RNase
NLC_{v2}/rvRNA
NLC_{v2}/rvRNA + RNase

Figura 23

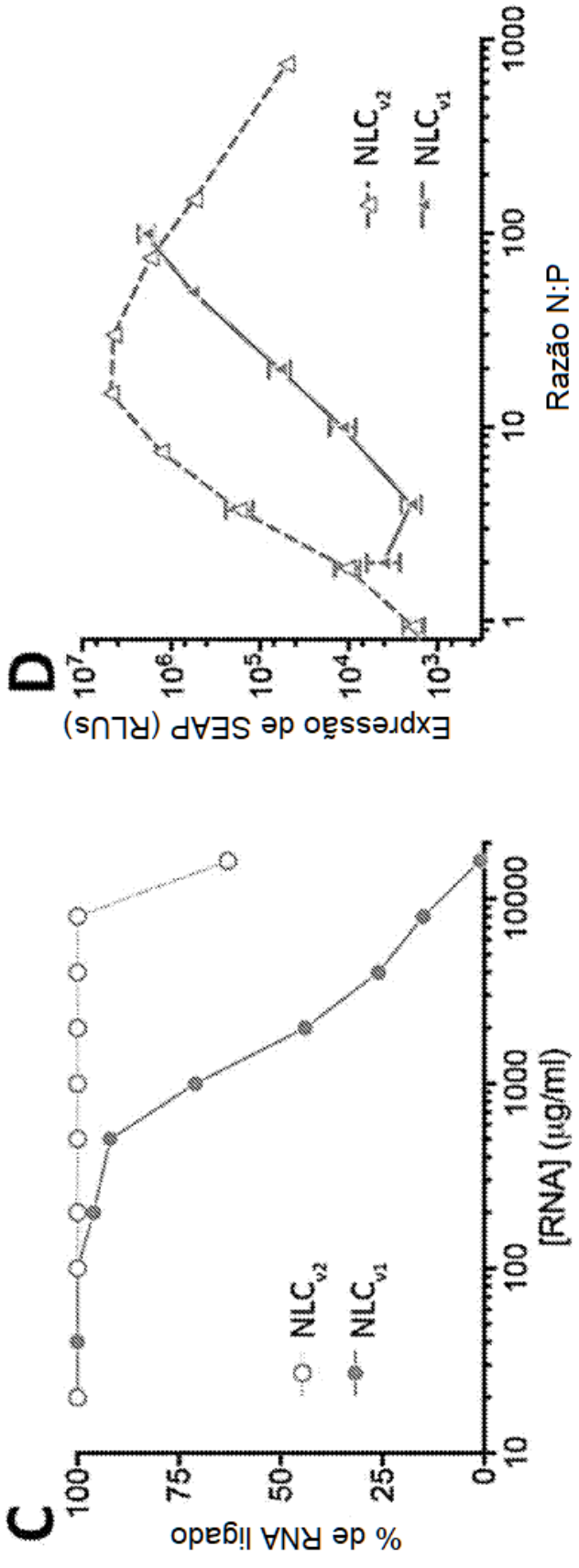

C
% de RNA ligado
100
75
50
25
0
10
100
1000
10000
[RNA] (µg/ml)
NLC$_{v2}$
NLC$_{v1}$
D
Expressão de SEAP (RLUs)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
1
10
100
1000
Razão N:P
NLC$_{v2}$
NLC$_{v1}$

Figura 23

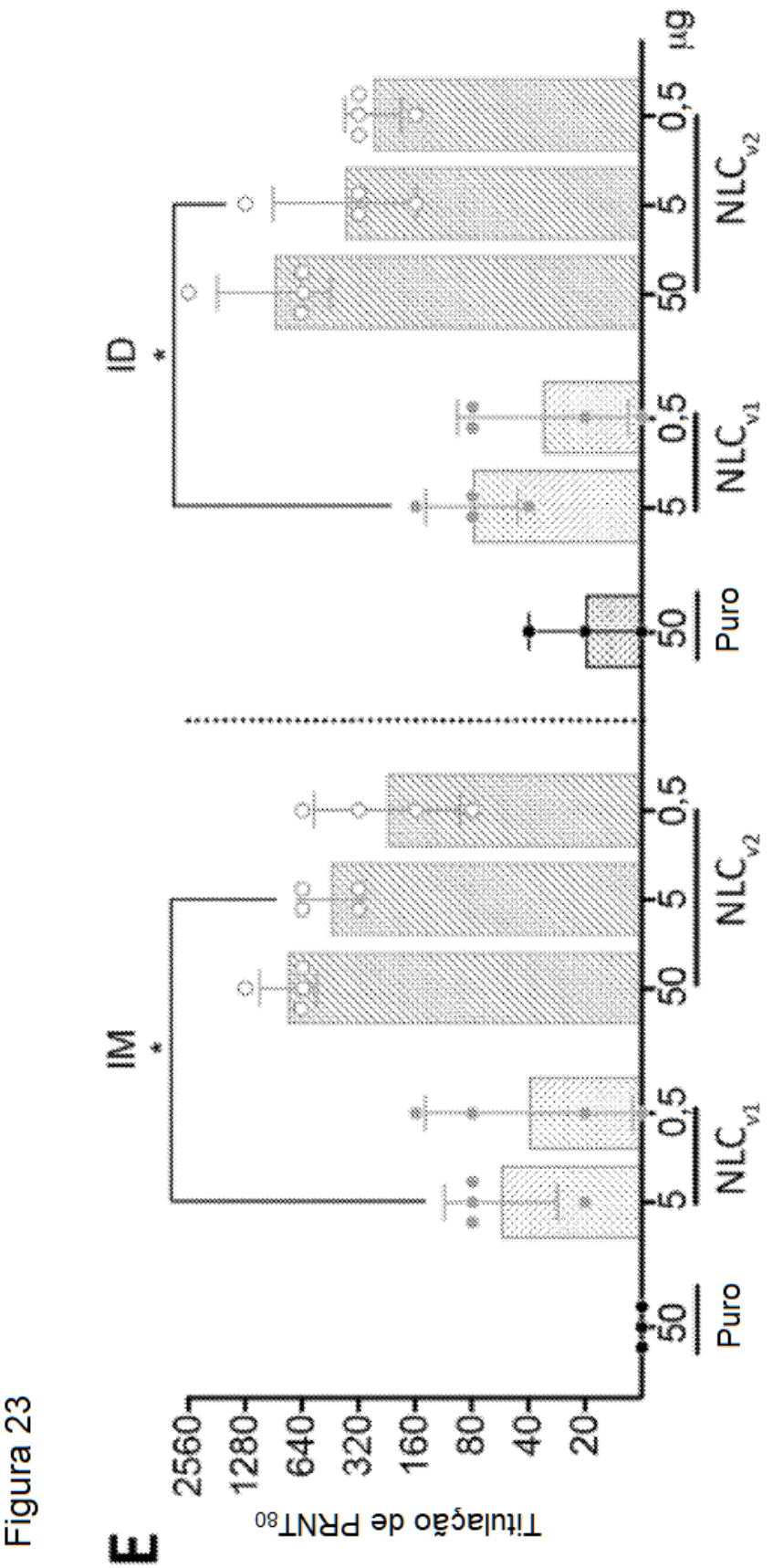
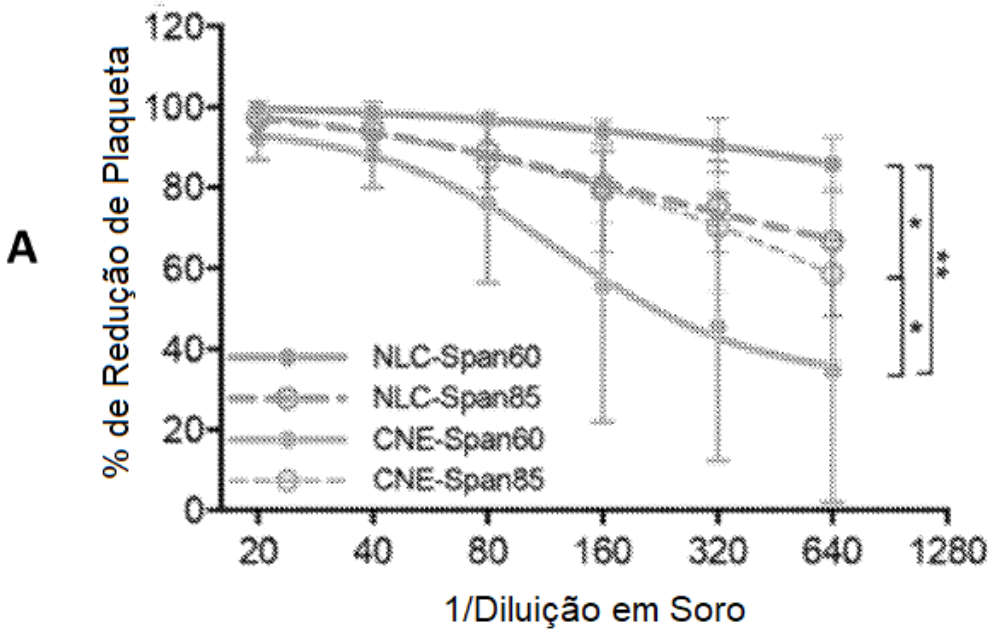
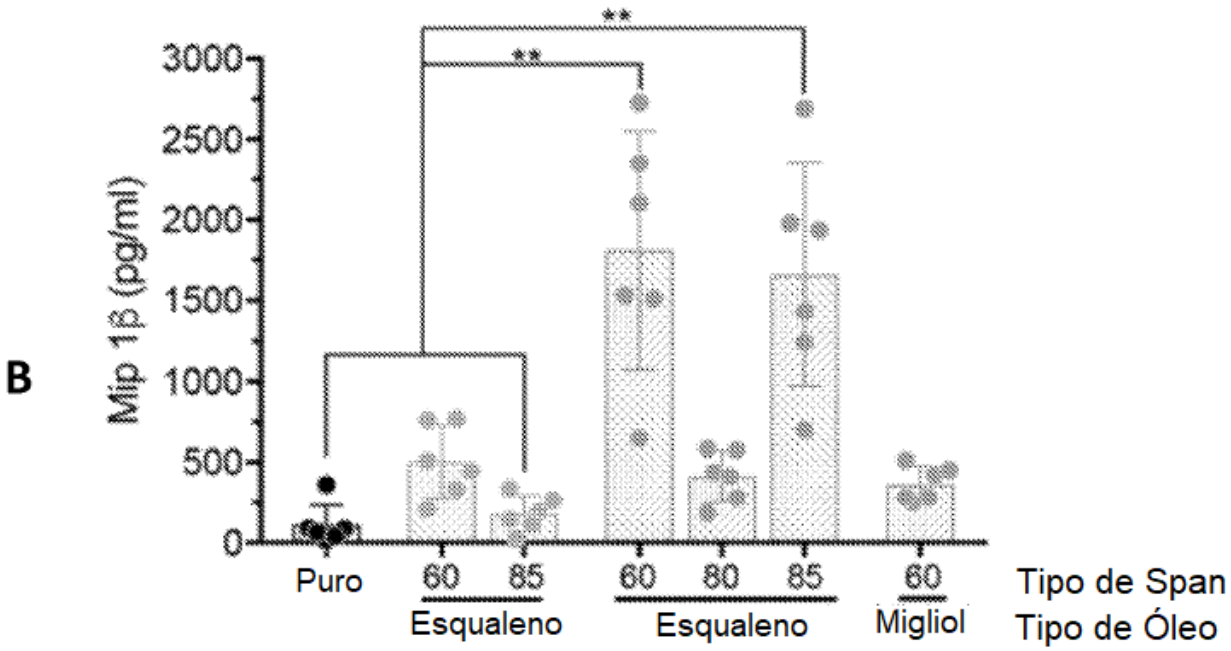

E
Titulação de PRNT80
2560
1280
640
320
160
80
40
20
IM
ID
Puro
NLCv1
NLCv2
50
5
0,5
µg

Figura 23

Figura 24


A
% de Redução de Plaqueta
120
100
80
60
40
20
0
NLC-Span60
NLC-Span85
CNE-Span60
CNE-Span85
*
**
*
20
40
80
160
320
640
1280
1/Diluição em Soro


B
Mip 1β (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
**
**
Puro
60
85
60
80
85
60
Esqualeno
Esqualeno
Migliol
Tipo de Span
Tipo de Óleo

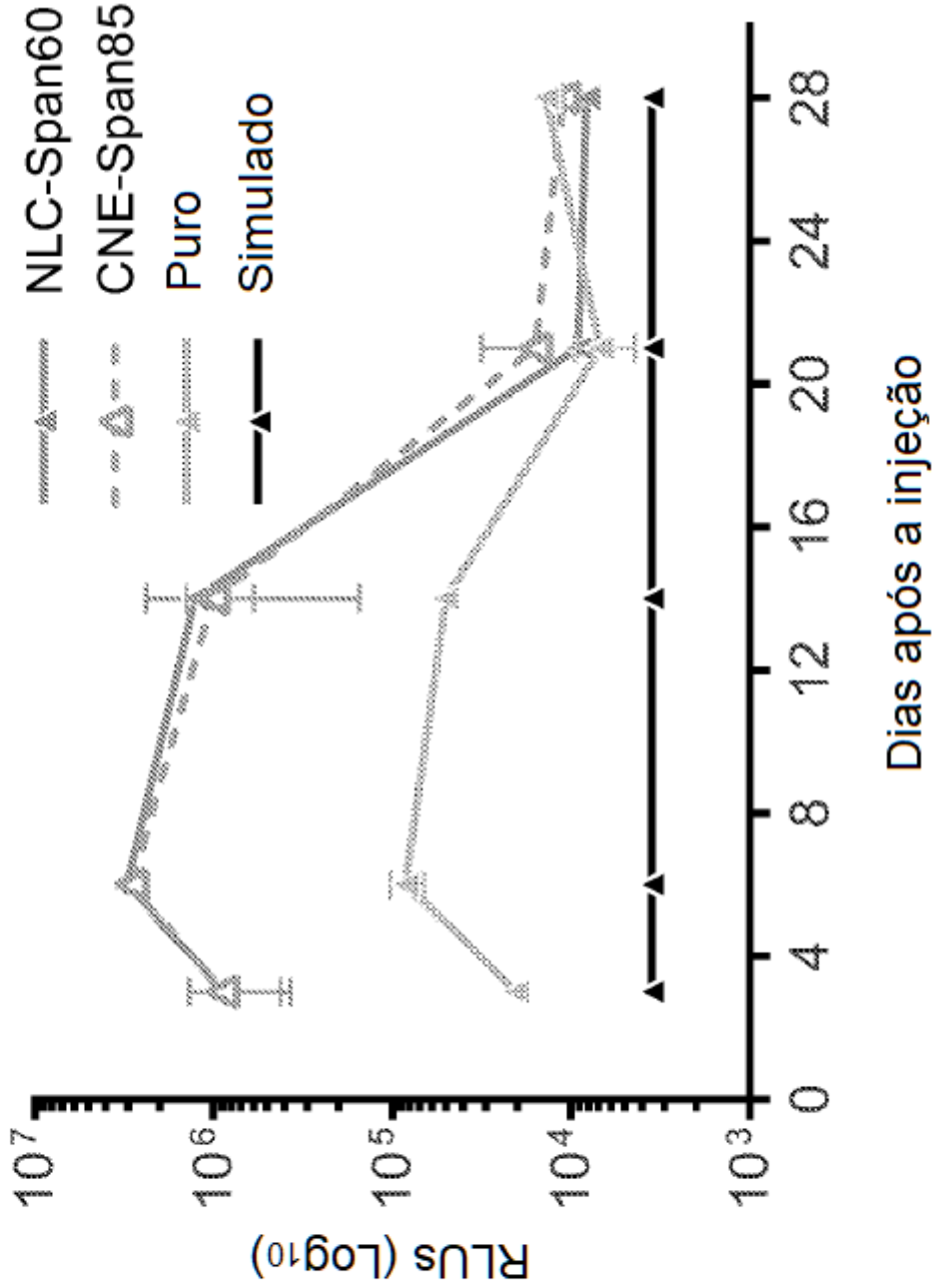

NLC-Span60
CNE-Span85
Puro
Simulado
RLUs (Log10)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
4
8
12
16
20
24
28
Dias após a injeção

Figura 25

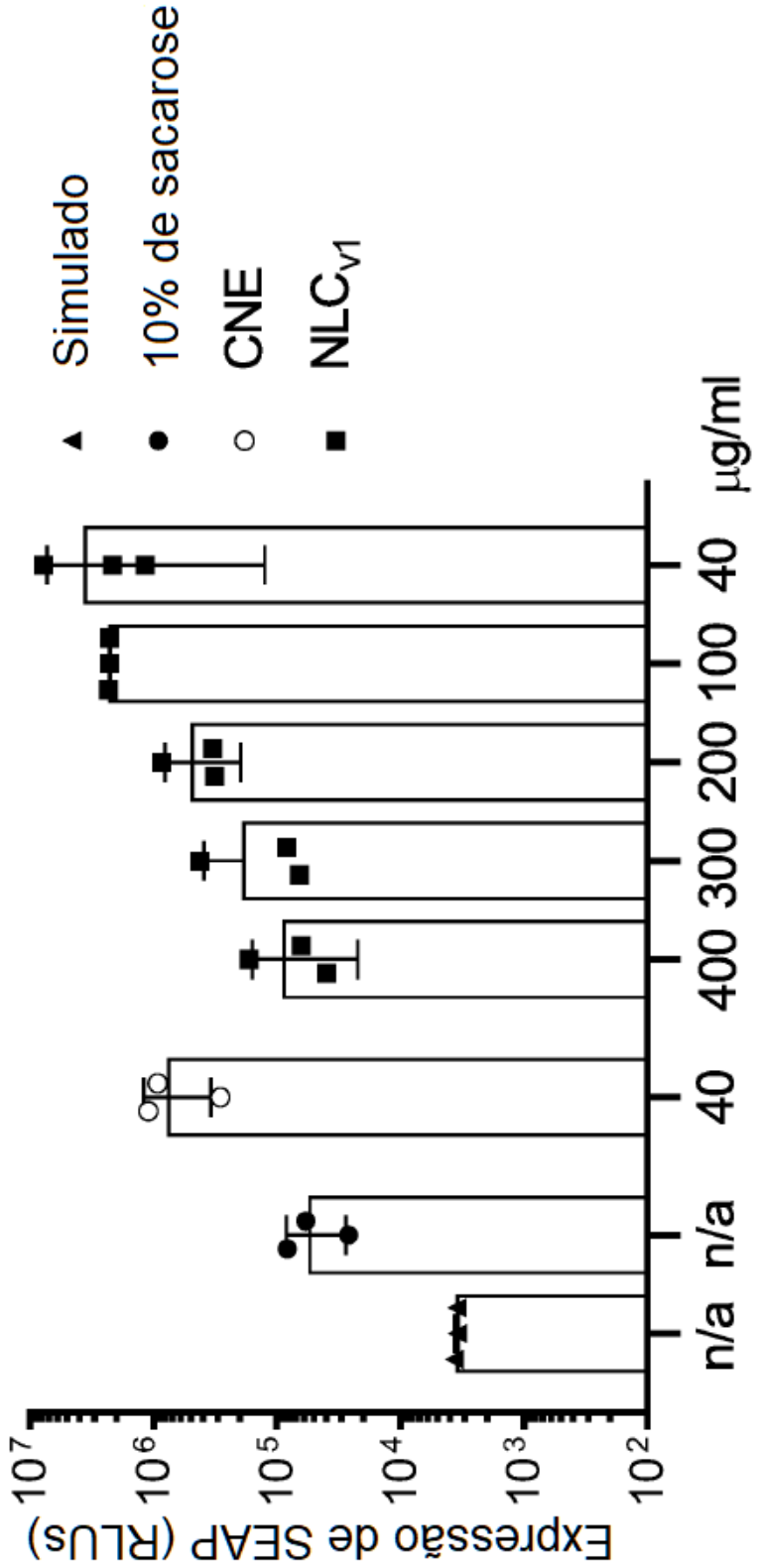

Simulado
10% de sacarose
CNE
NLC$_{v1}$
Expressão de SEAP (RLUs)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
n/a
n/a
40
400
300
200
100
40
µg/ml

Figura 26

Figura 27

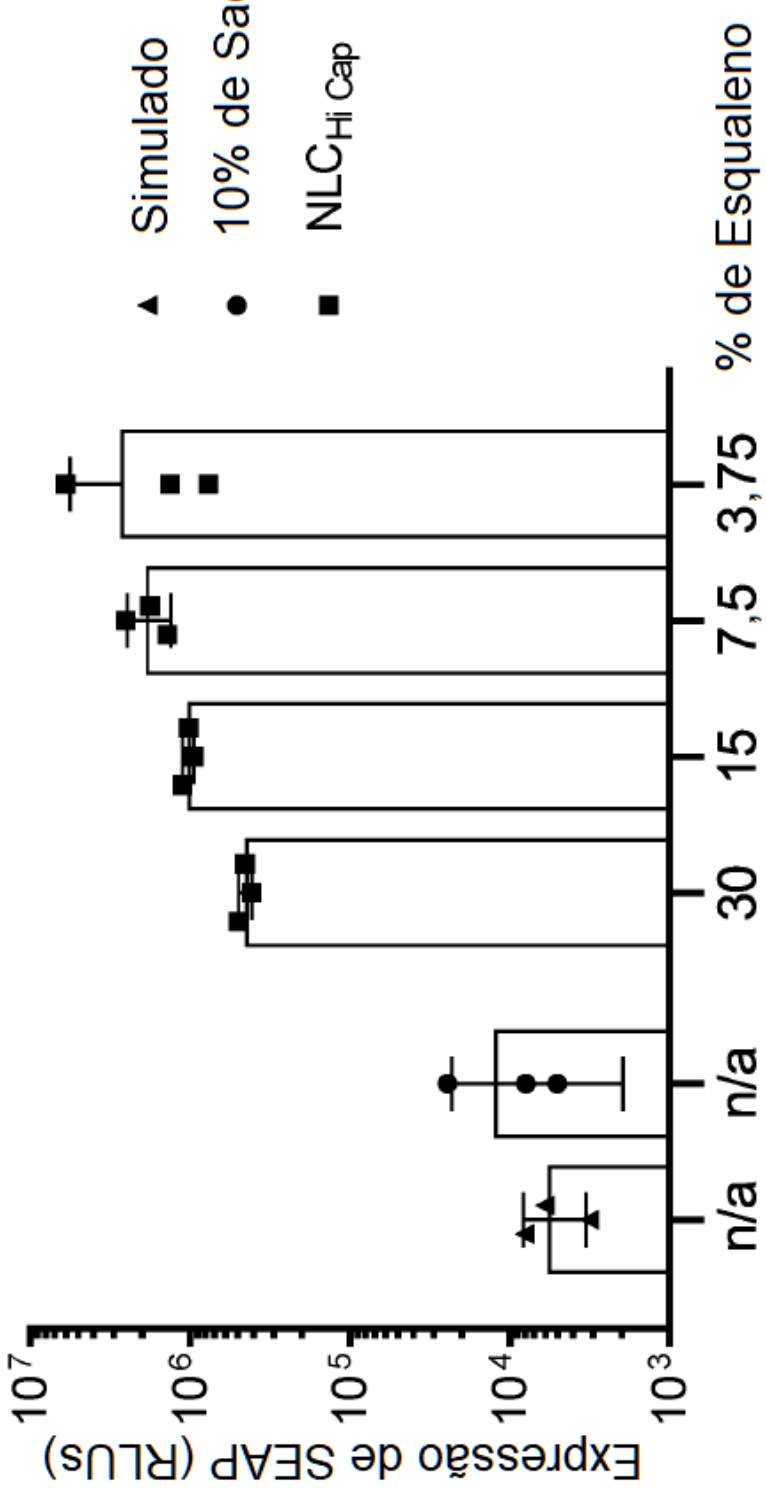

Expressão de SEAP (RLUs)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
n/a
n/a
30
15
7,5
3,75
% de Esqualeno
Simulado
10% de Sacarose
NLC Hi Cap

Figura 28

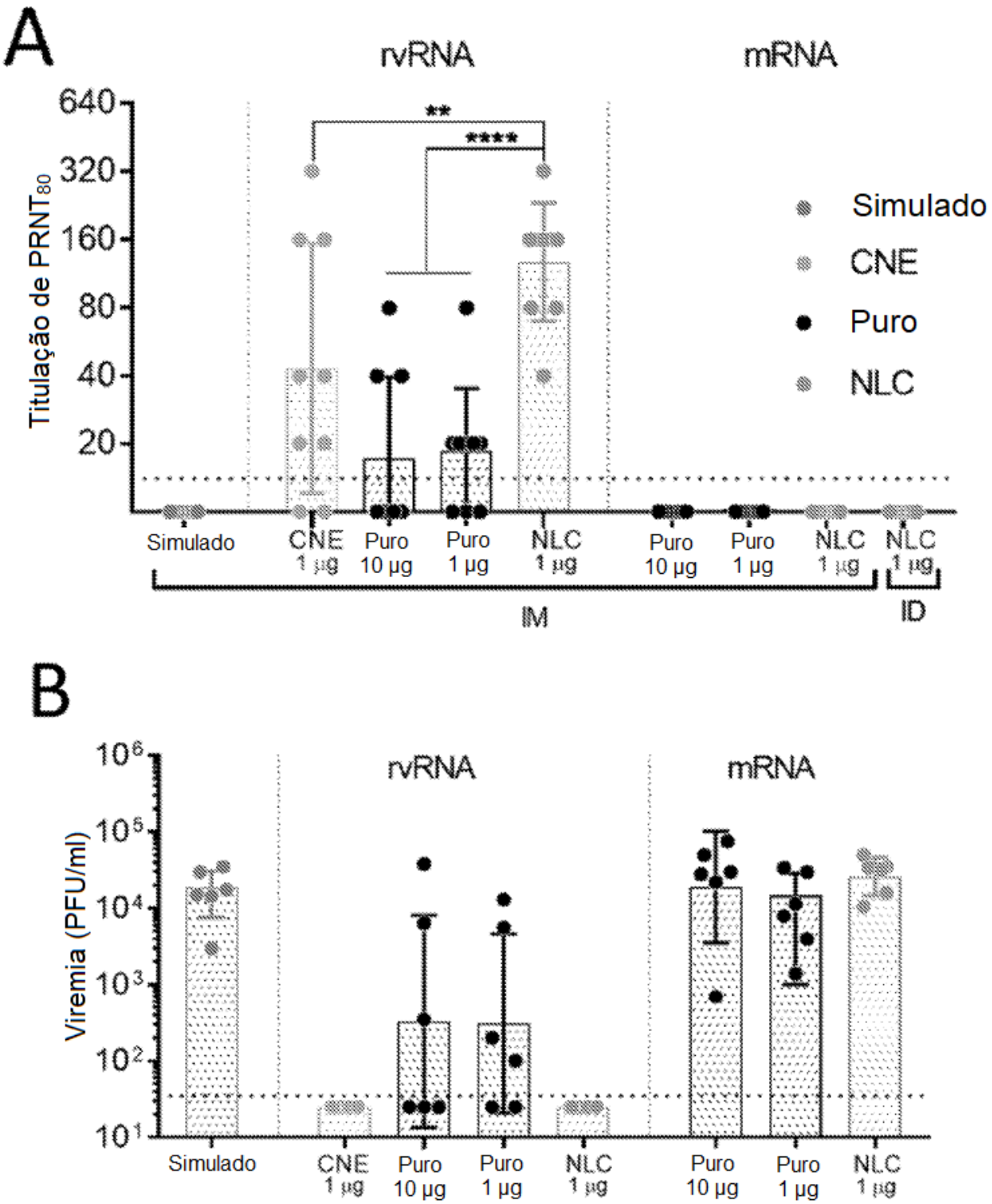
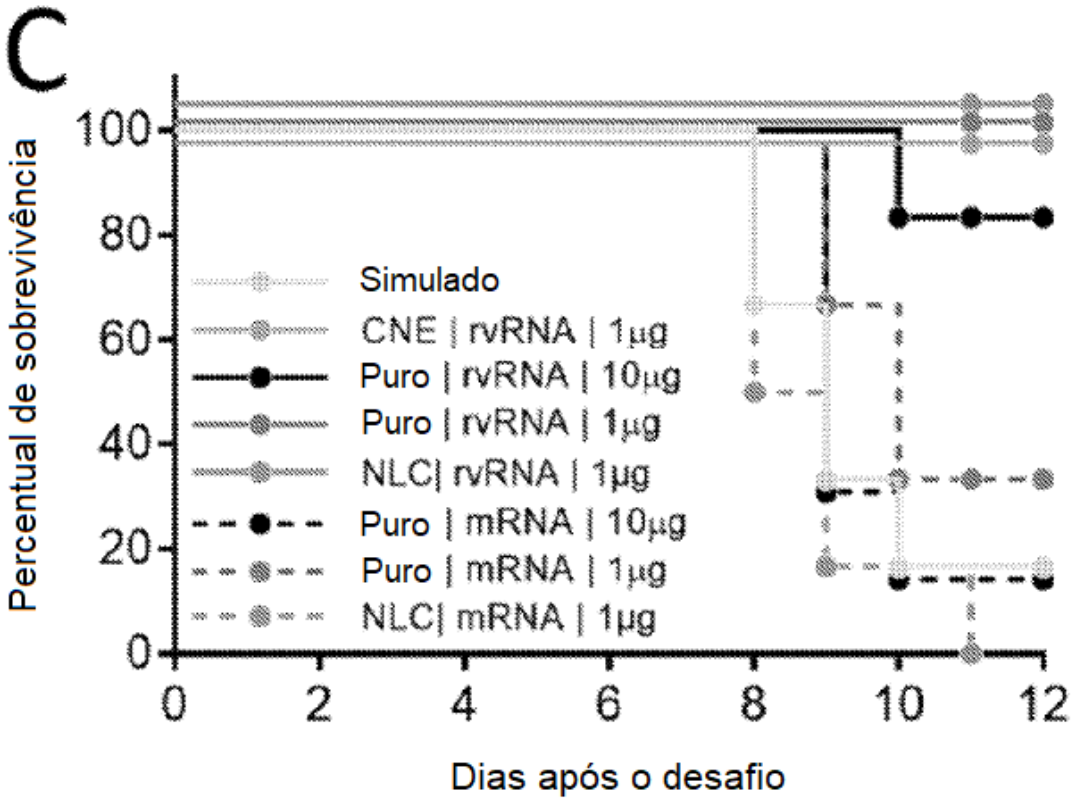

A
rvRNA
mRNA
640
320
160
80
40
20
Titulação de PRNT80
**
****
Simulado
CNE
Puro
NLC
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
NLC 1 µg
IM
ID
B
rvRNA
mRNA
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
Viremia (PFU/ml)
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg

Figura 28


C
Percentual de sobrevivência
100
80
60
40
20
0
Simulado
CNE | rvRNA | 1µg
Puro | rvRNA | 10µg
Puro | rvRNA | 1µg
NLC| rvRNA | 1µg
Puro | mRNA | 10µg
Puro | mRNA | 1µg
NLC| mRNA | 1µg
0
2
4
6
8
10
12
Dias após o desafio

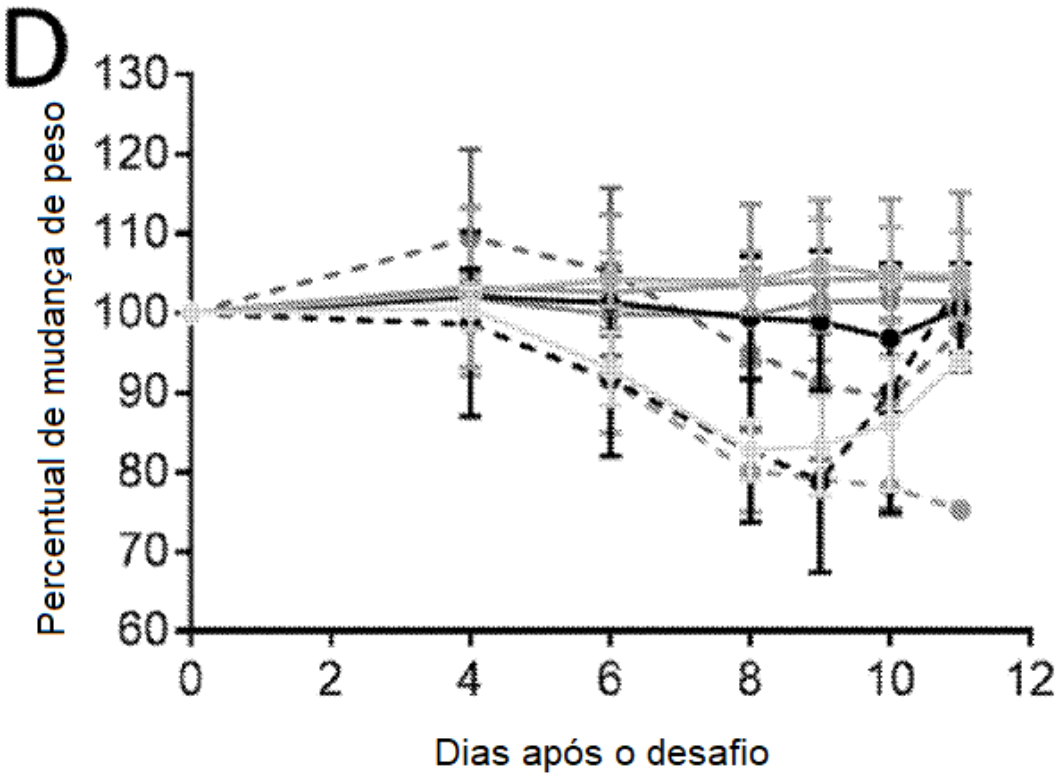

D
Percentual de mudança de peso
130
120
110
100
90
80
70
60
0
2
4
6
8
10
12
Dias após o desafio

Figura 28

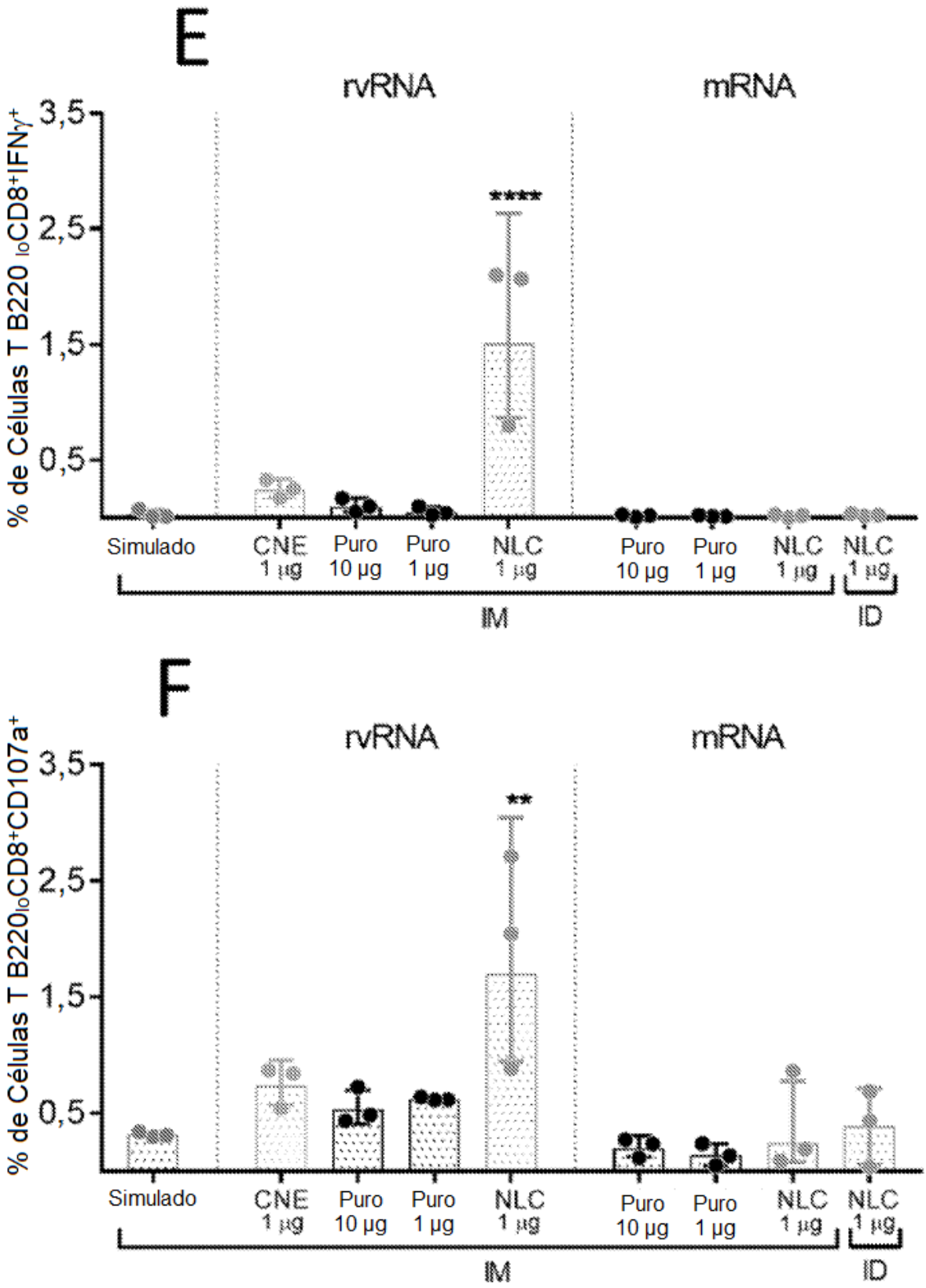
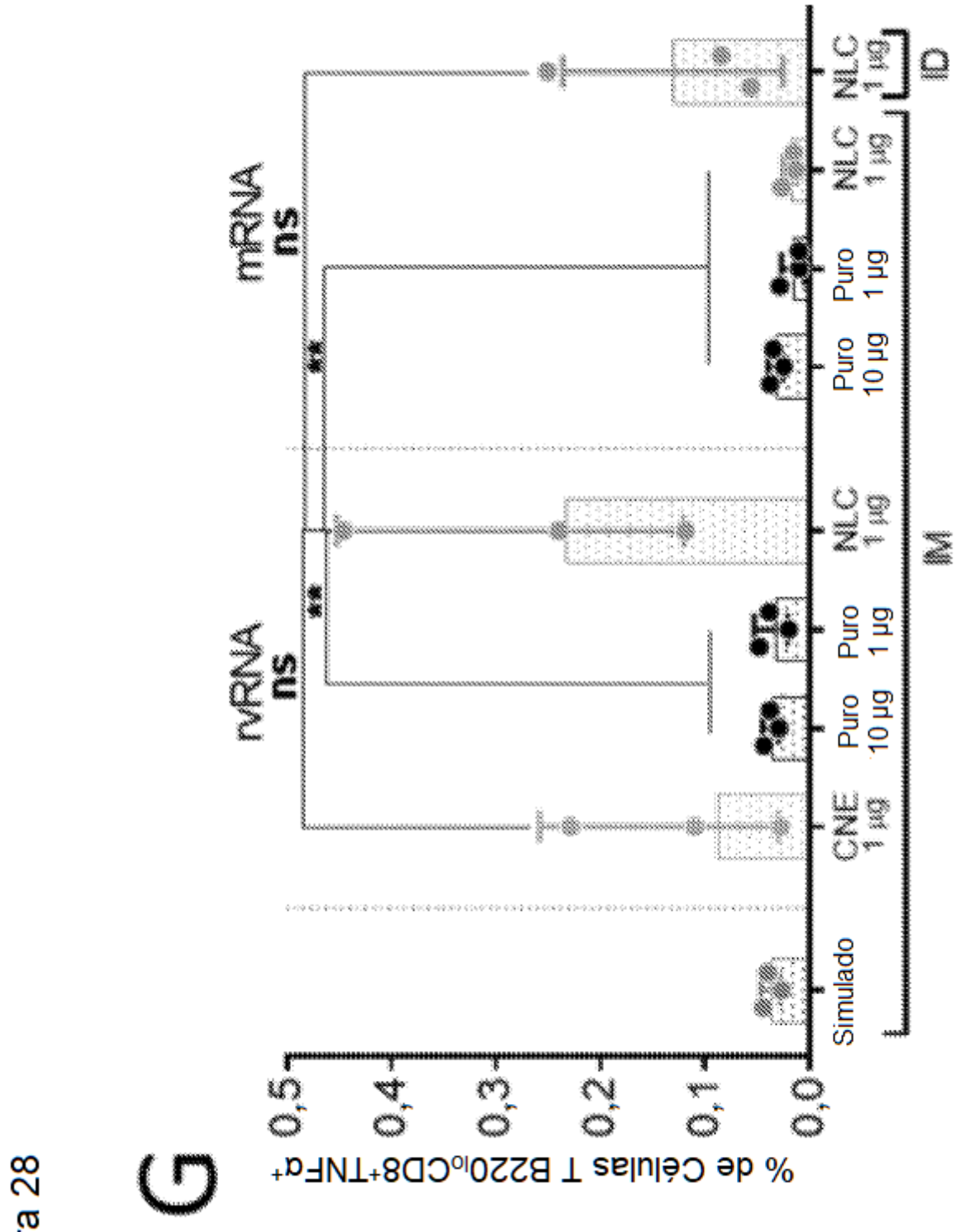

E
rvRNA
mRNA
% de Células T B220 loCD8+IFNγ+
3,5
2,5
1,5
0,5
****
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
NLC 1 µg
IM
ID
F
rvRNA
mRNA
% de Células T B220loCD8+CD107a+
3,5
2,5
1,5
0,5
**
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
NLC 1 µg
IM
ID

Figura 28


G
% de Células T B220loCD8+TNFα+
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
mRNA
ns
mRNA
ns
**
**
Simulado
CNE 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
Puro 10 µg
Puro 1 µg
NLC 1 µg
NLC 1 µg
M
ID

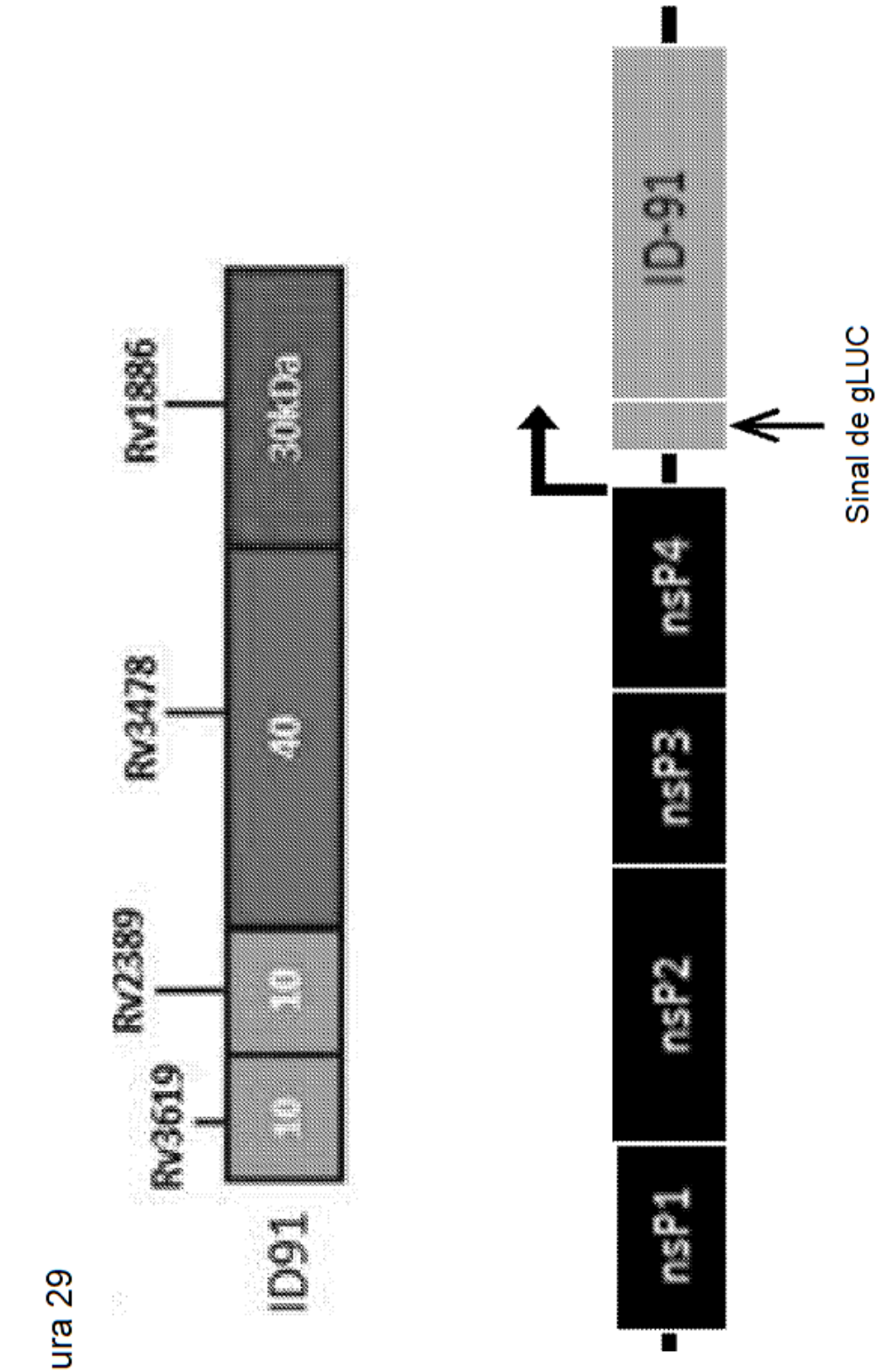

ID91
Rv3619
Rv2389
Rv3478
Rv1886
10
10
40
30kDa
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
ID-91
Sinal de gLUC

Figura 29

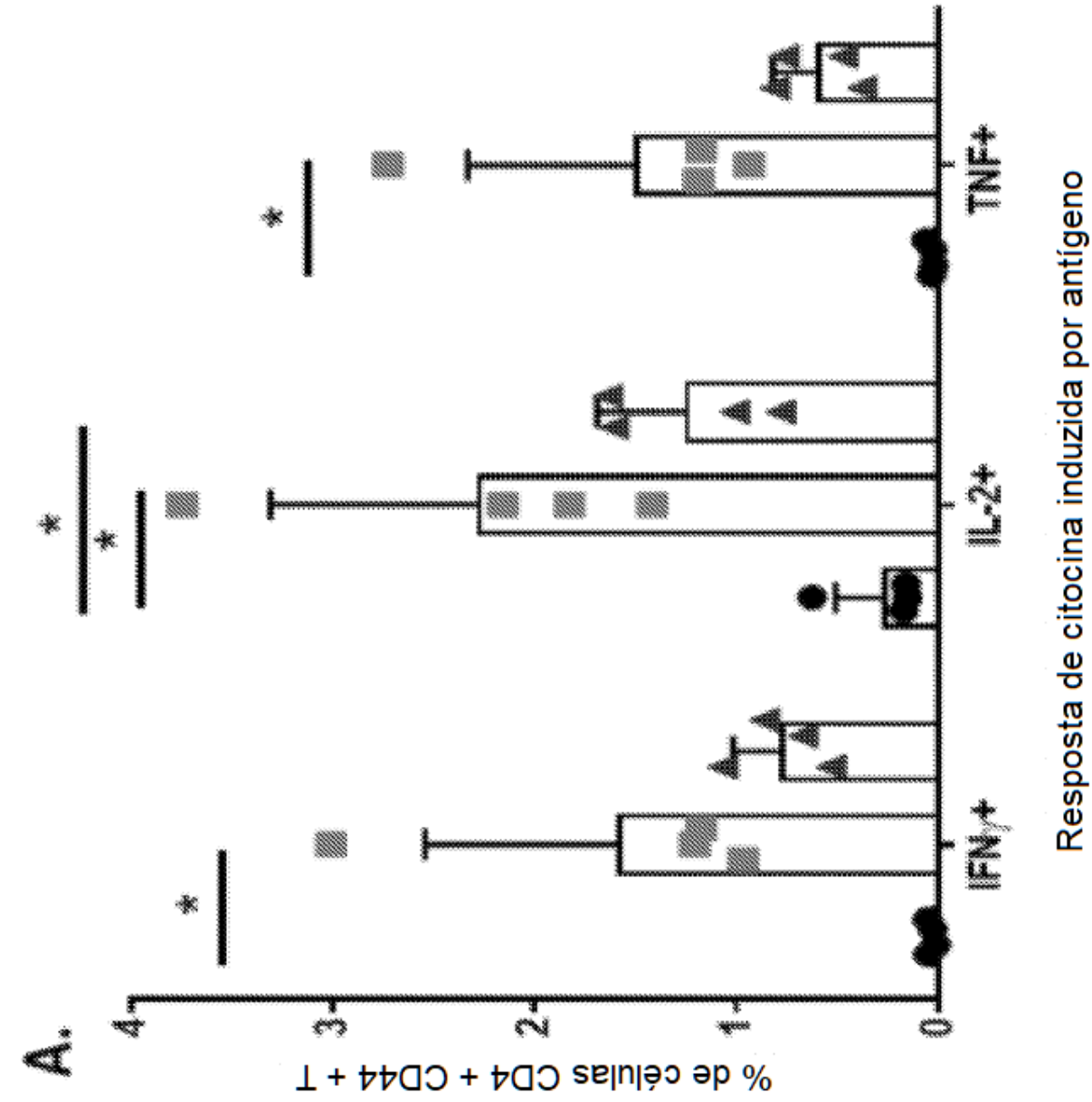

A.
% de células CD4 + CD44 + T
0
1
2
3
4
IFNγ+
IL-2+
TNF+
Resposta de citocina induzida por antígeno

Figura 30

Figura 30

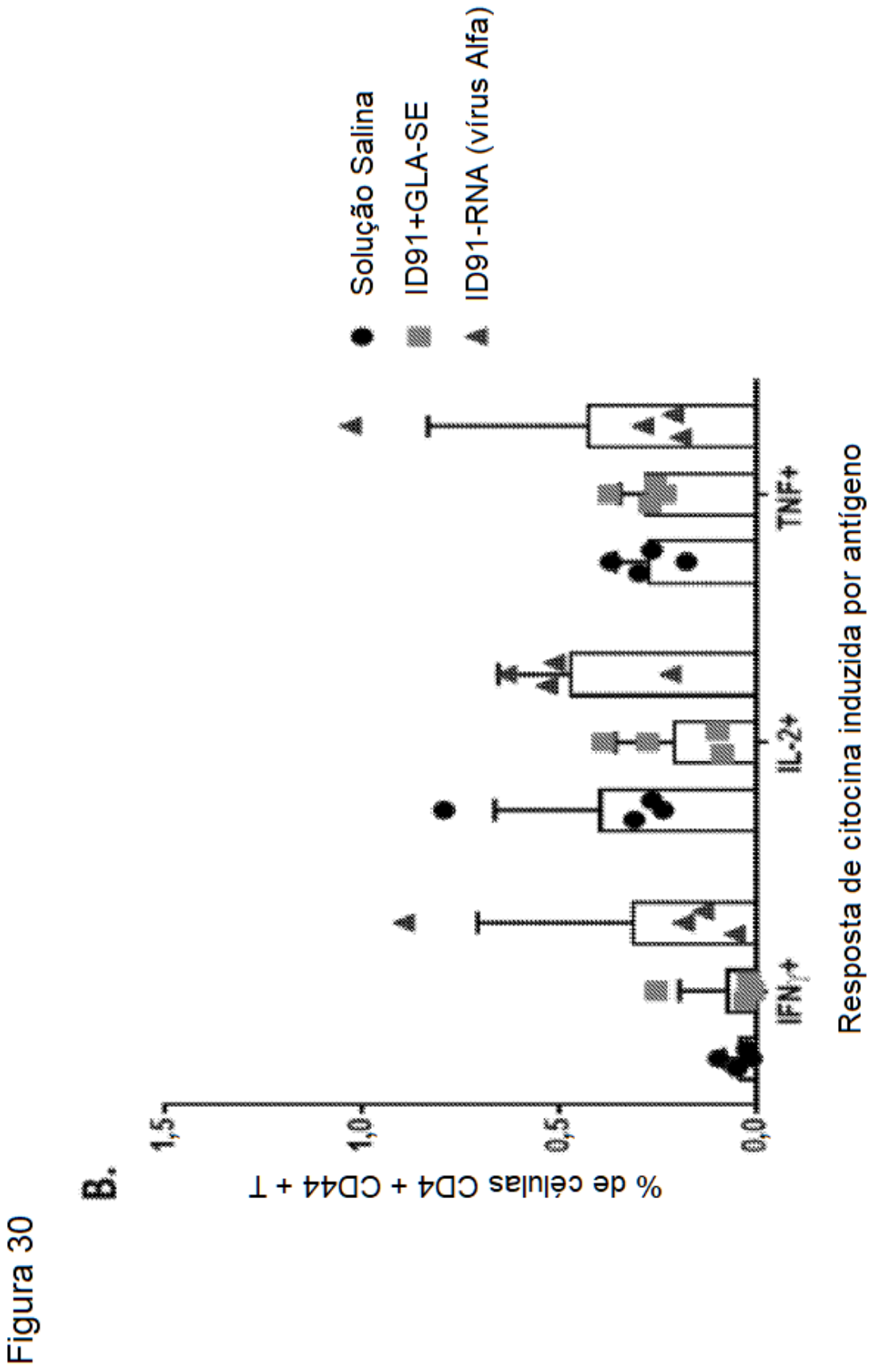

B.
% de células CD4 + CD44 + T
1,5
1,0
0,5
0,0
IFN-γ+
IL-2+
TNF+
Resposta de citocina induzida por antígeno
Solução Salina
ID91+GLA-SE
ID91-RNA (vírus Alfa)

Figura 31

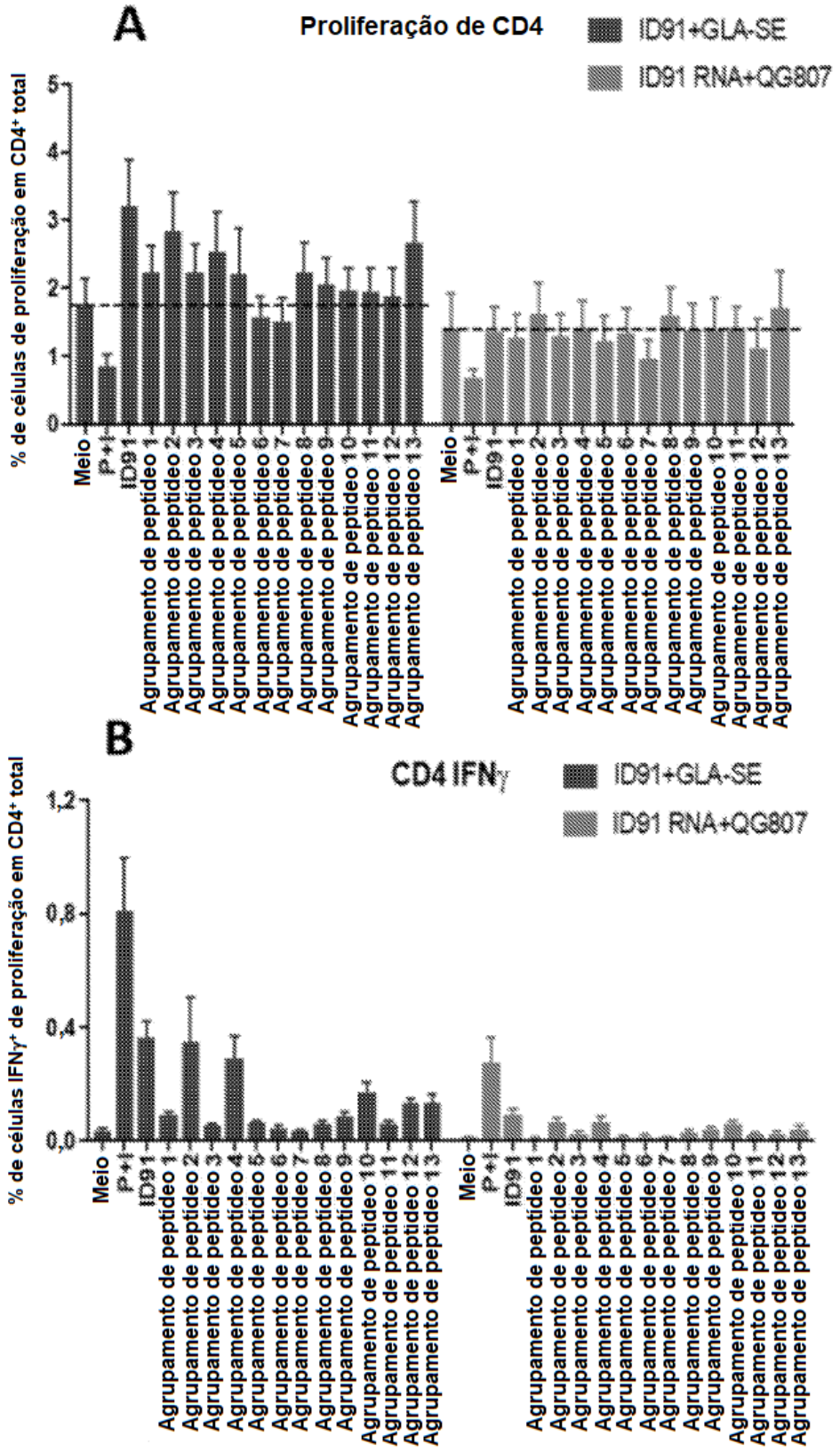

A
Proliferação de CD4
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células de proliferação em CD4+ total
0
1
2
3
4
5
Meio
P+I
ID91
Agrupamento de peptídeo 1
Agrupamento de peptídeo 2
Agrupamento de peptídeo 3
Agrupamento de peptídeo 4
Agrupamento de peptídeo 5
Agrupamento de peptídeo 6
Agrupamento de peptídeo 7
Agrupamento de peptídeo 8
Agrupamento de peptídeo 9
Agrupamento de peptídeo 10
Agrupamento de peptídeo 11
Agrupamento de peptídeo 12
Agrupamento de peptídeo 13
B
CD4 IFNγ
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células IFNγ+ de proliferação em CD4+ total
0,0
0,4
0,8
1,2

Figura 31

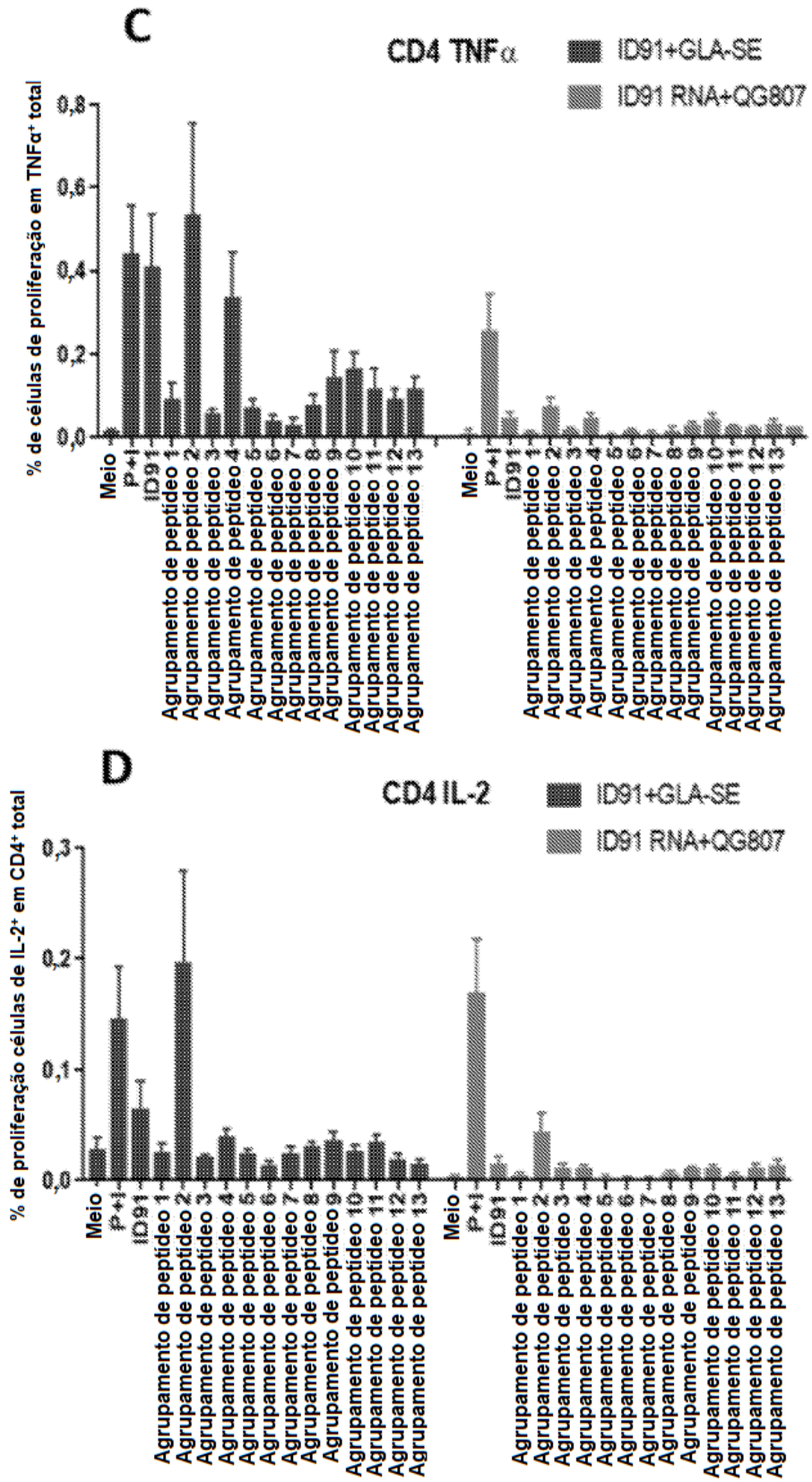

C
CD4 TNFα
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células de proliferação em TNFα+ total
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
Meio
P+I
ID91
Agrupamento de peptídeo 1
Agrupamento de peptídeo 2
Agrupamento de peptídeo 3
Agrupamento de peptídeo 4
Agrupamento de peptídeo 5
Agrupamento de peptídeo 6
Agrupamento de peptídeo 7
Agrupamento de peptídeo 8
Agrupamento de peptídeo 9
Agrupamento de peptídeo 10
Agrupamento de peptídeo 11
Agrupamento de peptídeo 12
Agrupamento de peptídeo 13
D
CD4 IL-2
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de proliferação células de IL-2+ em CD4+ total
0,0
0,1
0,2
0,3

Figura 32

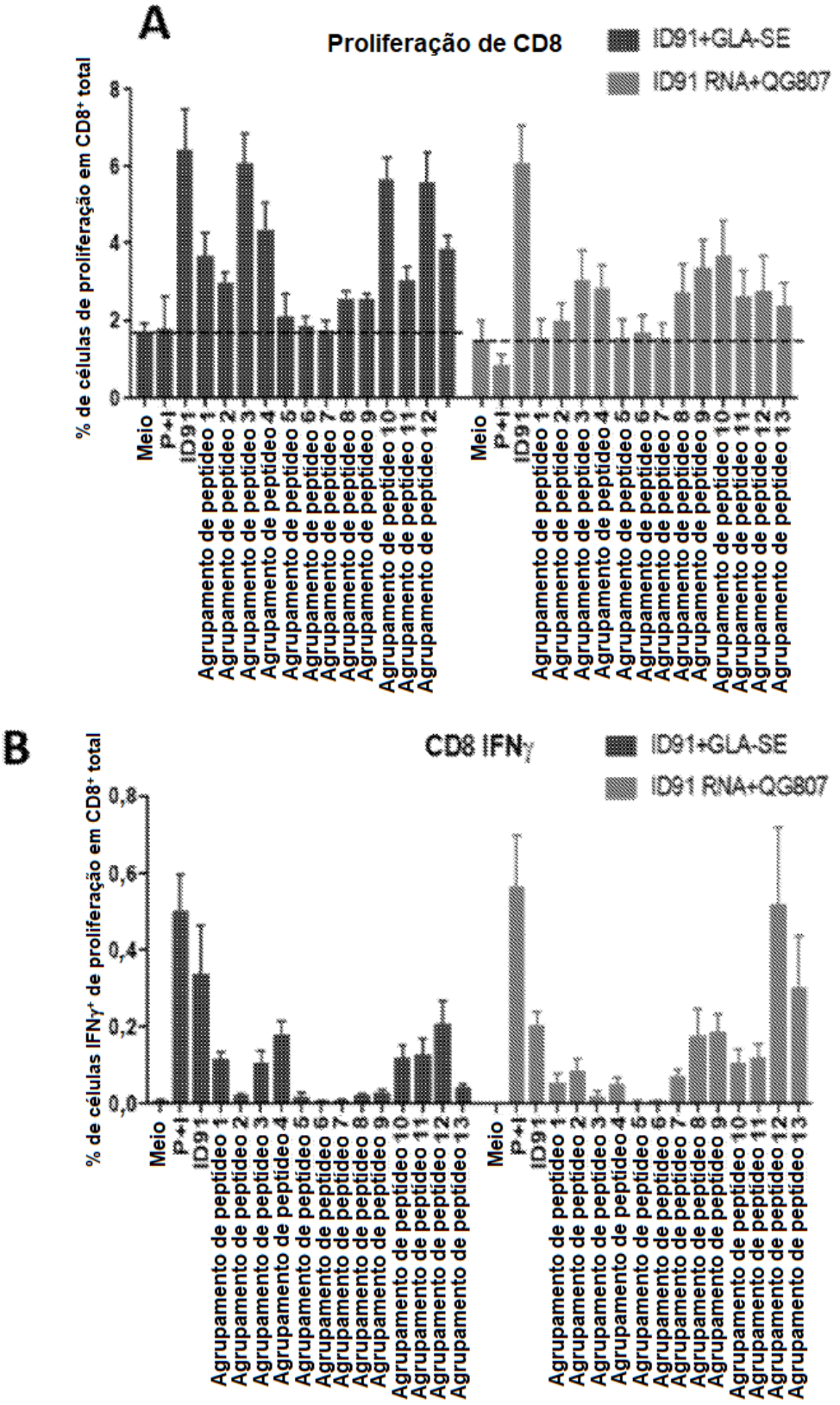

A
Proliferação de CD8
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células de proliferação em CD8+ total
0
2
4
6
8
Meio
P+I
ID91
Agrupamento de peptídeo 1
Agrupamento de peptídeo 2
Agrupamento de peptídeo 3
Agrupamento de peptídeo 4
Agrupamento de peptídeo 5
Agrupamento de peptídeo 6
Agrupamento de peptídeo 7
Agrupamento de peptídeo 8
Agrupamento de peptídeo 9
Agrupamento de peptídeo 10
Agrupamento de peptídeo 11
Agrupamento de peptídeo 12
Agrupamento de peptídeo 13
B
CD8 IFNγ
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células IFNγ+ de proliferação em CD8+ total
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8

Figura 32

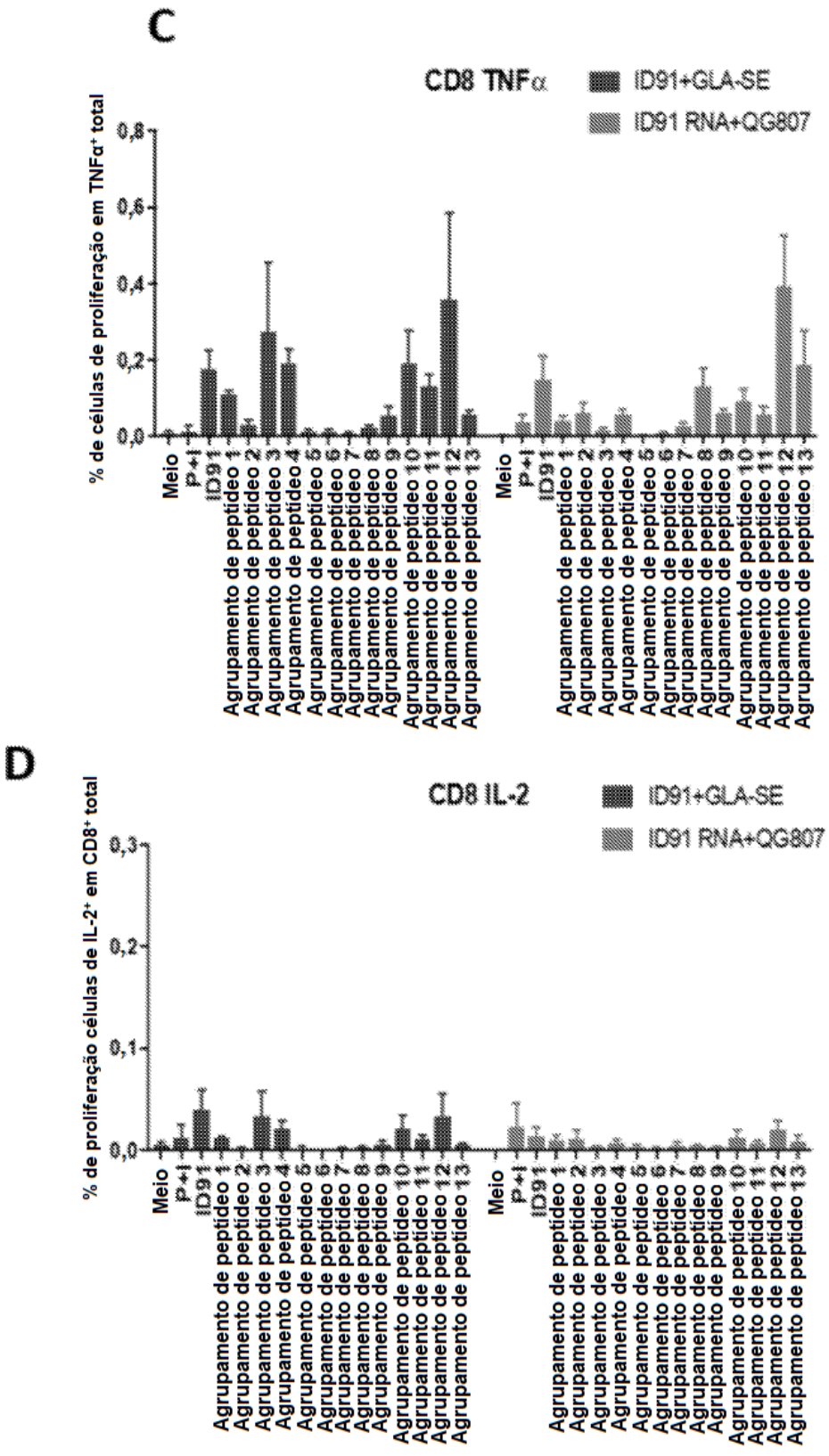

C
CD8 TNFα
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de células de proliferação em TNFα+ total
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
Meio
P+I
ID91
Agrupamento de peptídeo 1
Agrupamento de peptídeo 2
Agrupamento de peptídeo 3
Agrupamento de peptídeo 4
Agrupamento de peptídeo 5
Agrupamento de peptídeo 6
Agrupamento de peptídeo 7
Agrupamento de peptídeo 8
Agrupamento de peptídeo 9
Agrupamento de peptídeo 10
Agrupamento de peptídeo 11
Agrupamento de peptídeo 12
Agrupamento de peptídeo 13
D
CD8 IL-2
ID91+GLA-SE
ID91 RNA+QG807
% de proliferação células de IL-2+ em CD8+ total
0,0
0,1
0,2
0,3

Figura 33

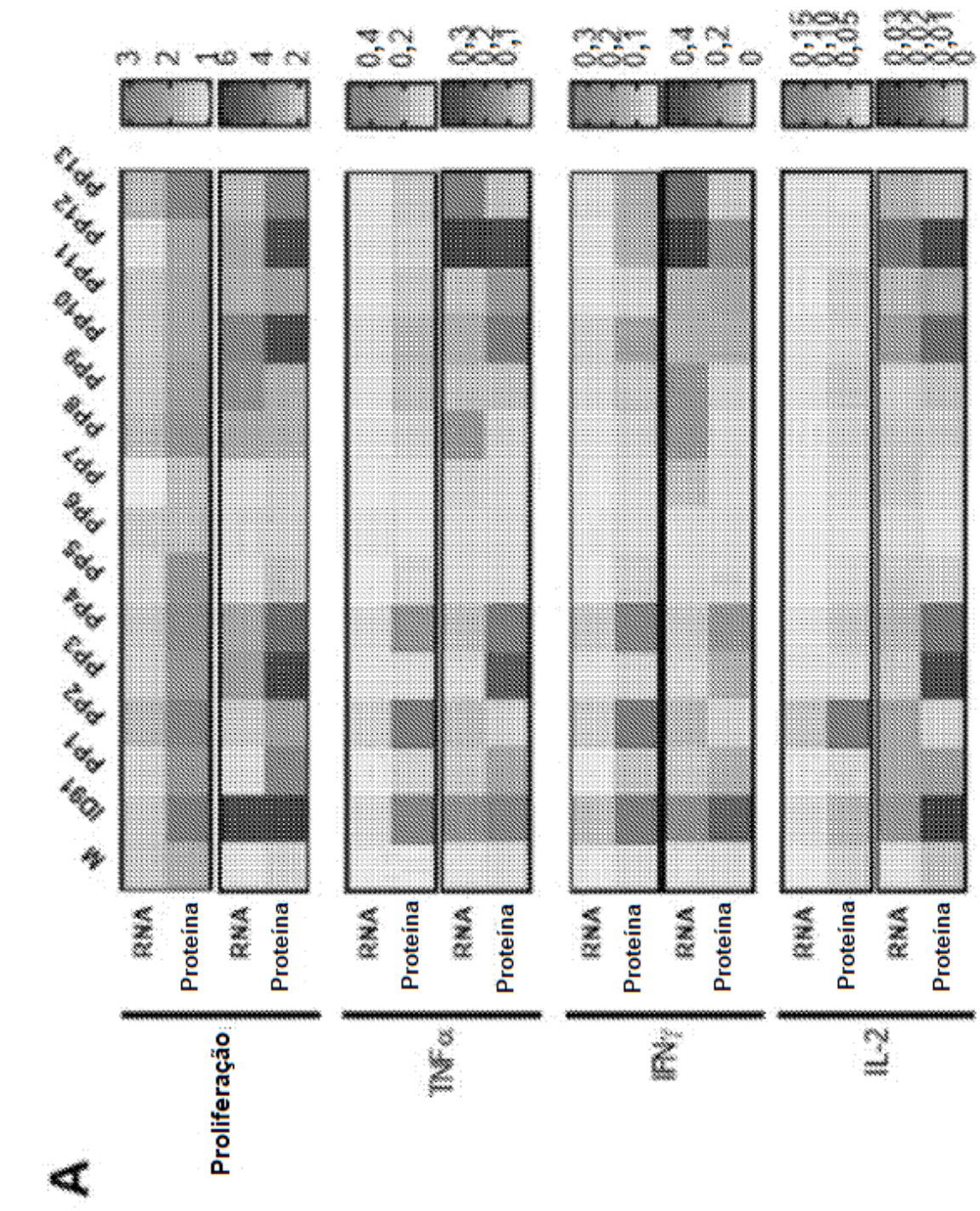

A
Proliferação
TNFα
IFNγ
IL-2
RNA
Proteína
M
IDO1
PPI
PPI2
PPI3
PPI4
PPI5
PPI6
PPI7
PPI8
PPI9
PPI10
PPI11
PPI12
PPI13

Figura 33

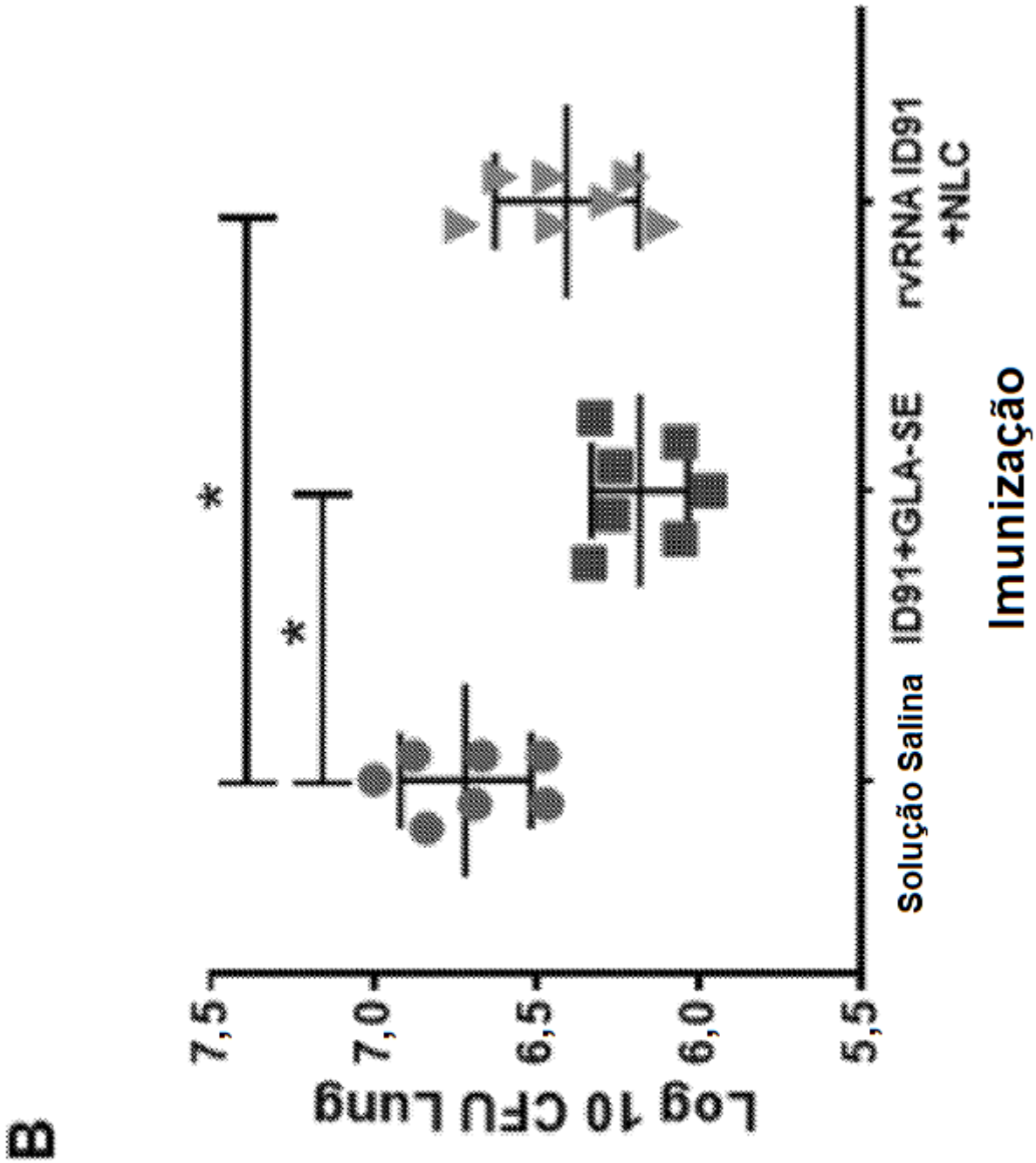

B
Log 10 CFU Lung
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
*
*
Solução Salina
ID91+GLA-SE
rvRNA ID91 +NLC
Imunização

Figura 34

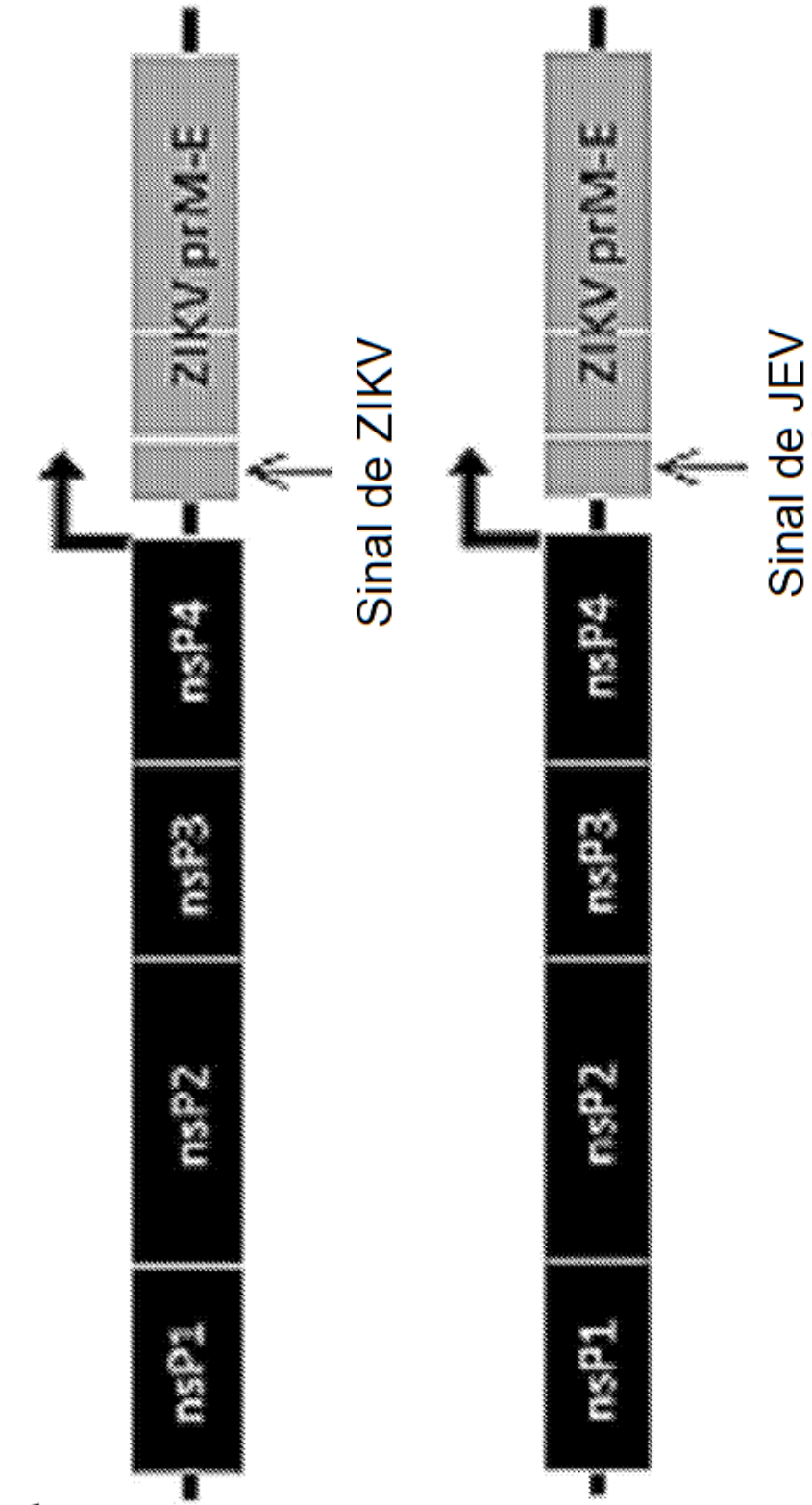
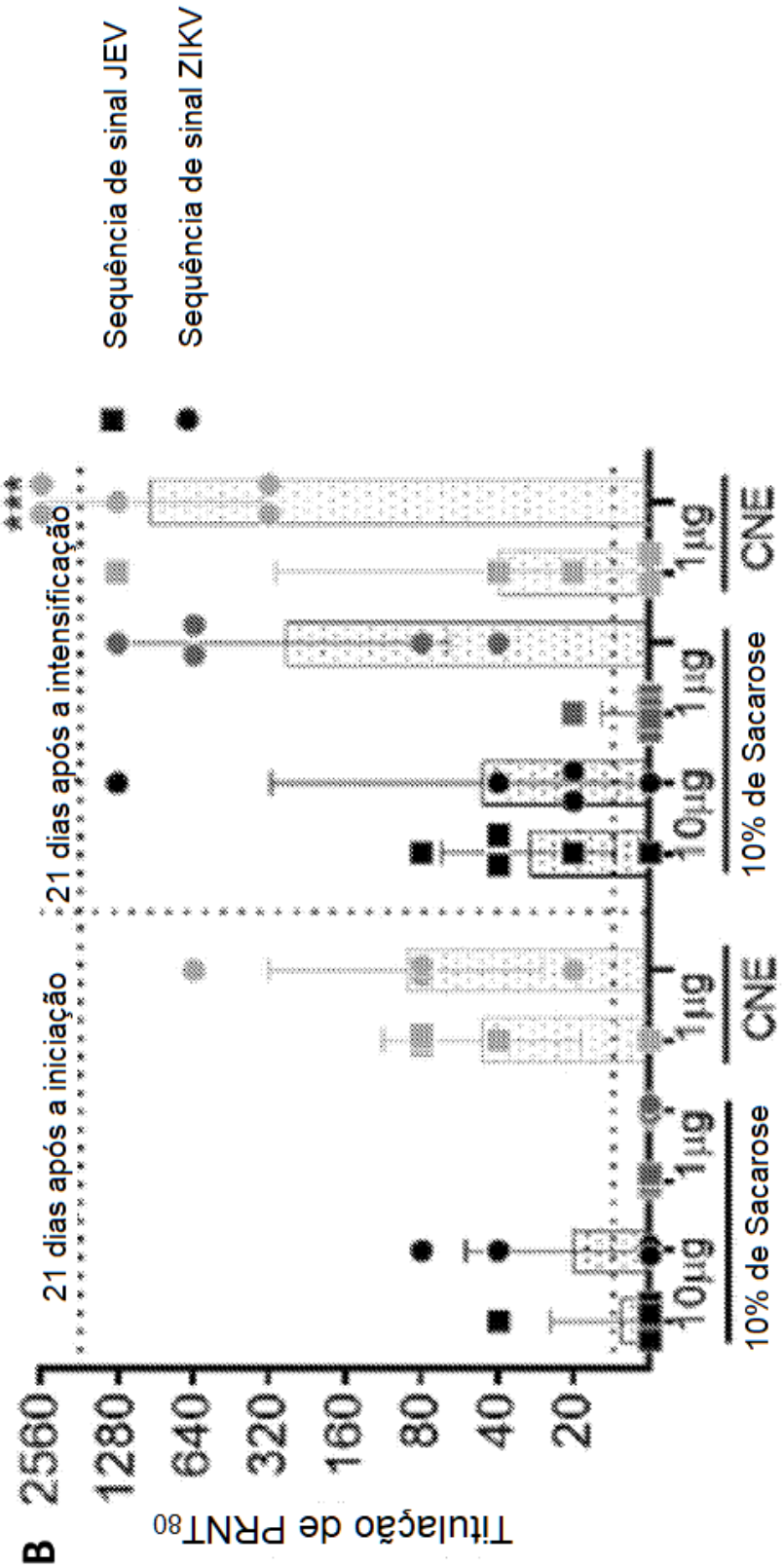

A
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
ZIKV prM-E
Sinal de ZIKV
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
ZIKV prM-E
Sinal de JEV

Figura 34


B
Titulação de PRNT80
2560
1280
640
320
160
80
40
20
21 dias após a iniciação
21 dias após a intensificação
***
Sequência de sinal JEV
Sequência de sinal ZIKV
10µg
1µg
1µg
CNE
10% de Sacarose
10µg
1µg
1µg
CNE
10% de Sacarose

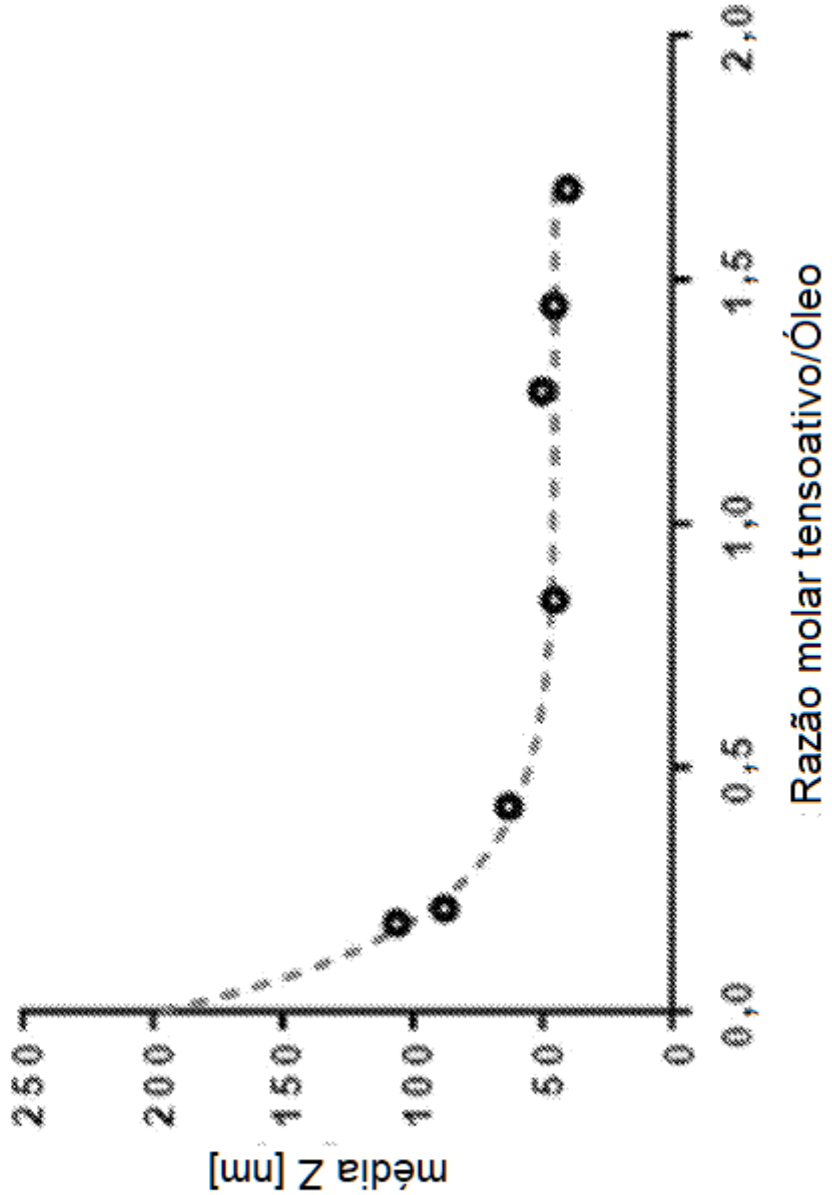

média Z [nm]
250
200
150
100
50
0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
Razão molar tensoativo/Óleo

Figura 35

Figura 36

A

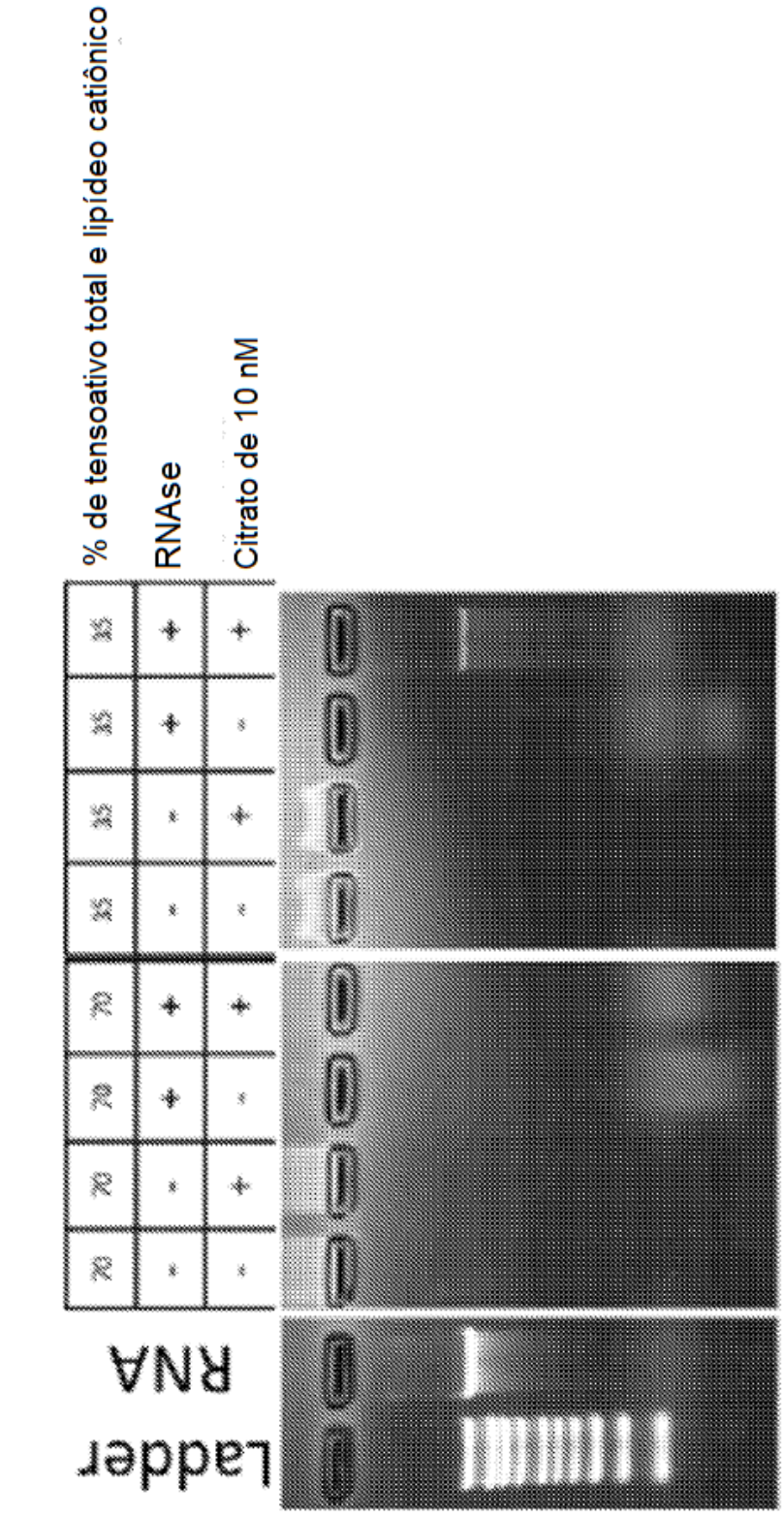
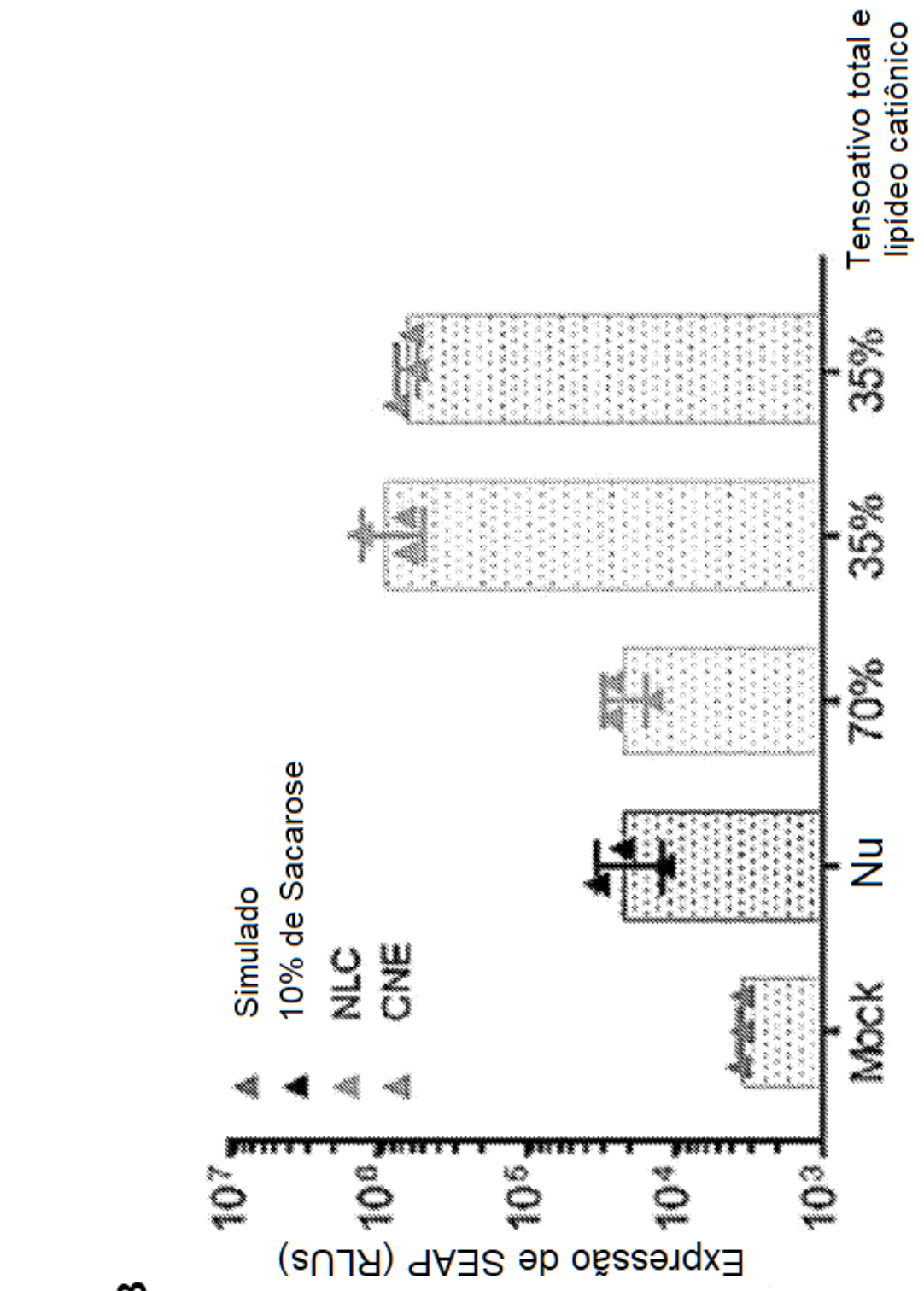

Ladder
RNA
% de tensoativo total e lipídeo catiônico
RNAse
Citrato de 10 nM

Figura 36


B
Expressão de SEAP (RLUs)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
Simulado
10% de Sacarose
NLC
CNE
Mock
Nu
70%
35%
35%
Tensoativo total e lipídeo catiônico

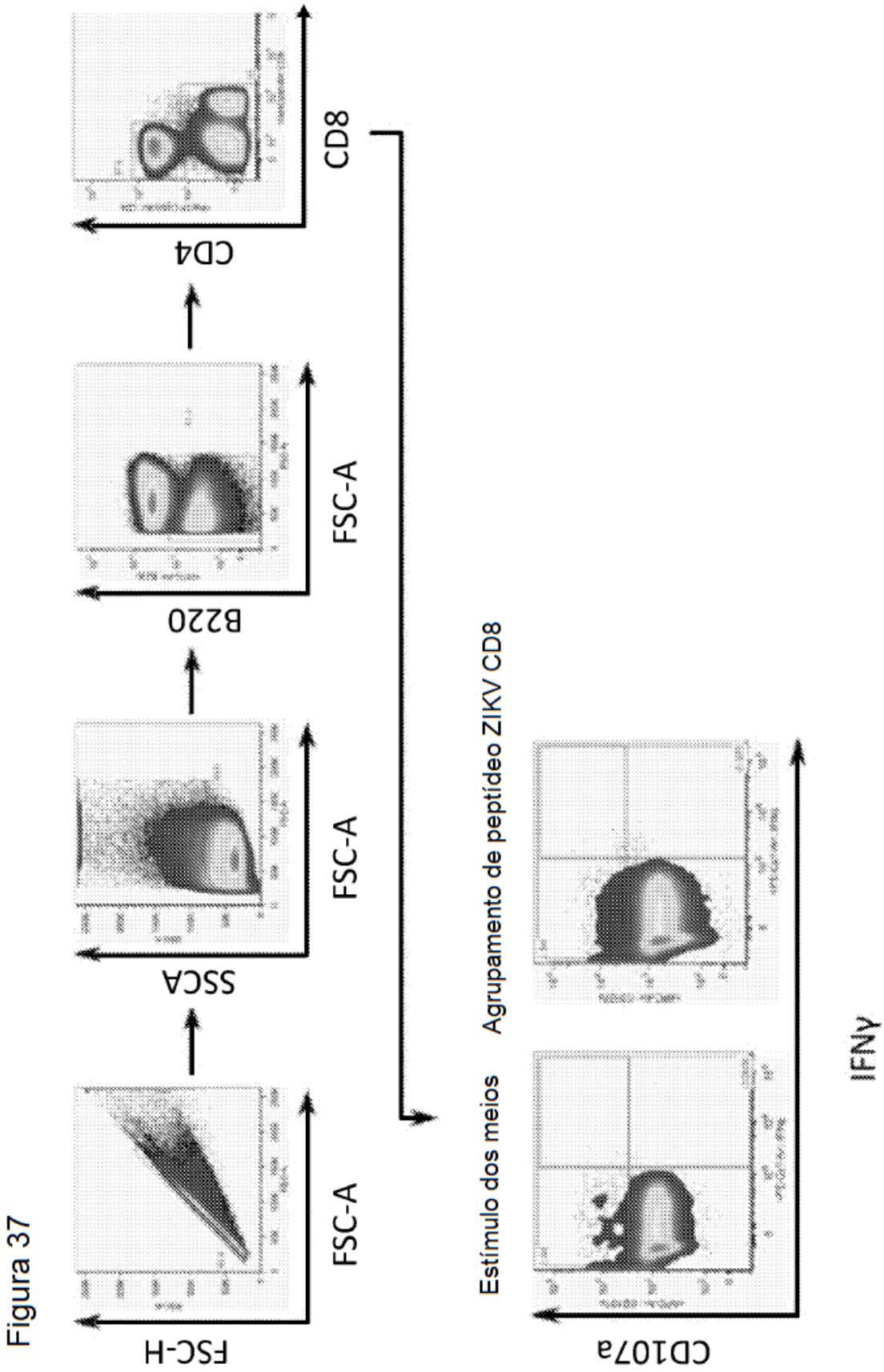

FSC-H
FSC-A
SSCA
FSC-A
B220
FSC-A
CD4
CD8
Estímulo dos meios
Agrupamento de peptídeo ZIKV CD8
CD107a
IFNγ

Figura 37

Figura 38

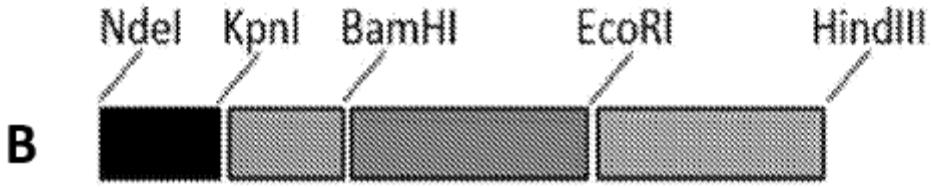


Figura 39

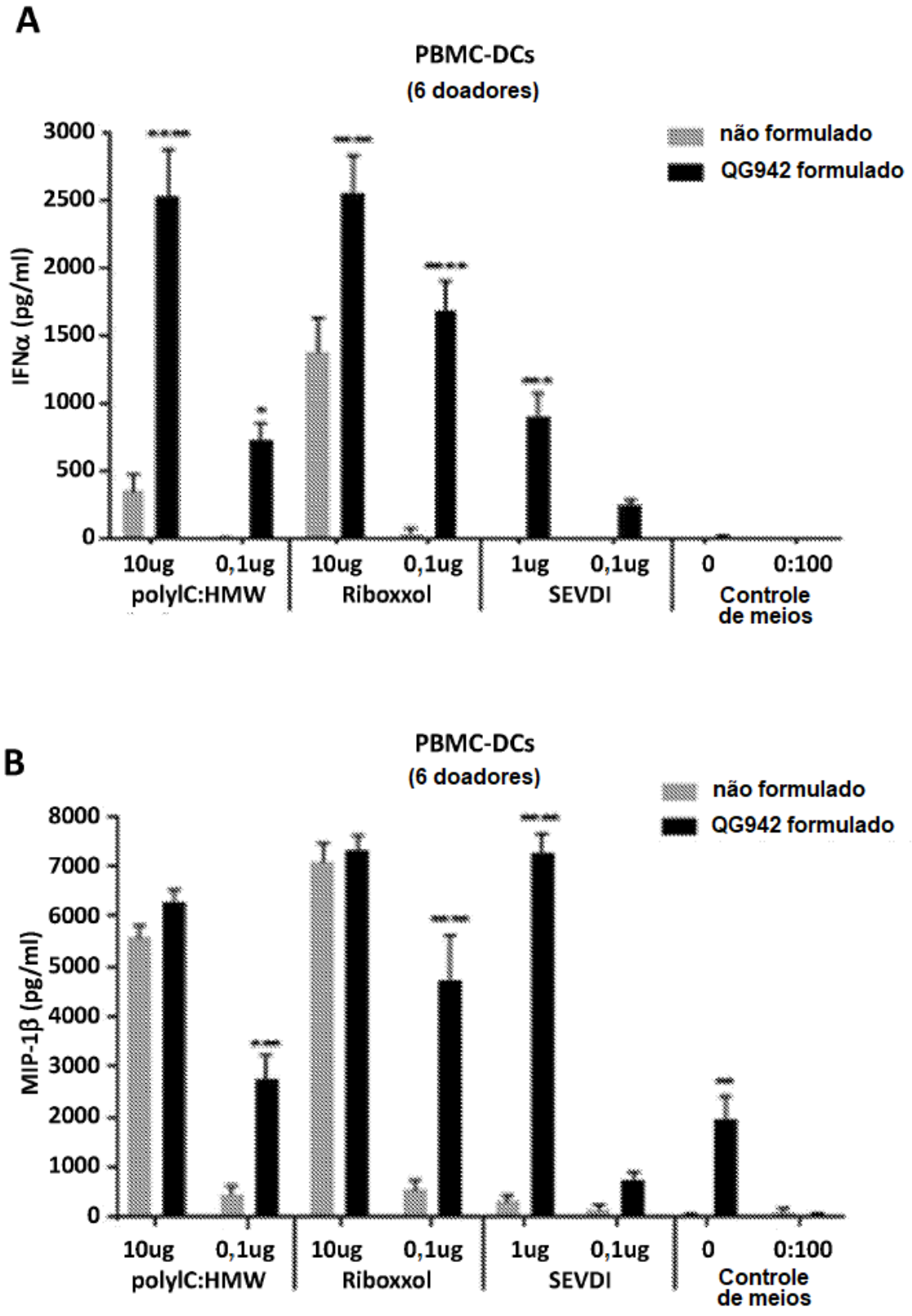

A
PBMC-DCs
(6 doadores)
não formulado
QG942 formulado
IFNα (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10ug
0,1ug
10ug
0,1ug
1ug
0,1ug
0
0:100
polylC:HMW
Riboxxol
SEVDI
Controle
de meios
B
PBMC-DCs
(6 doadores)
não formulado
QG942 formulado
MIP-1β (pg/ml)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
10ug
0,1ug
10ug
0,1ug
1ug
0,1ug
0
0:100
polylC:HMW
Riboxxol
SEVDI
Controle
de meios

Figura 39

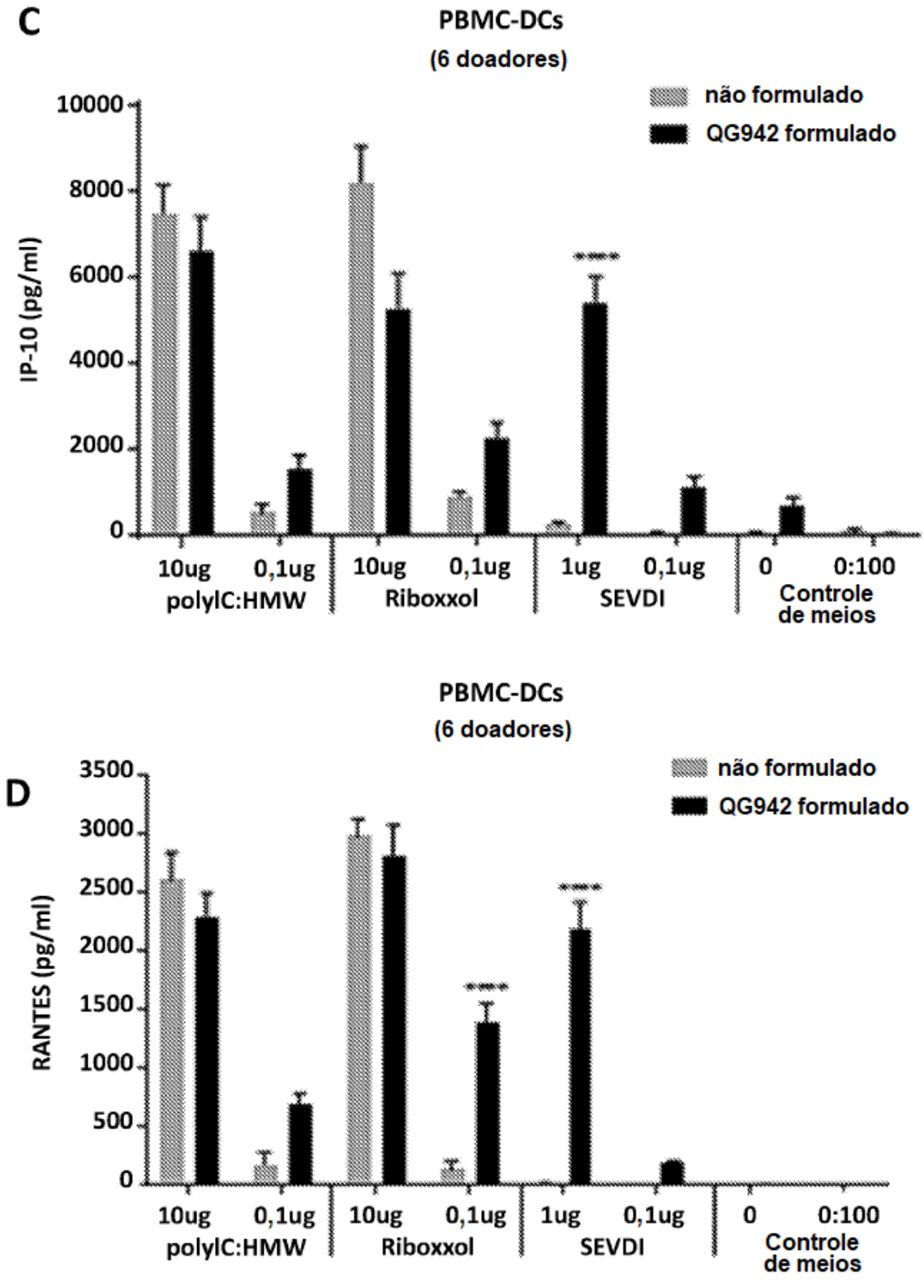

C
PBMC-DCs
(6 doadores)
não formulado
QG942 formulado
IP-10 (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
10ug
0,1ug
polylC:HMW
10ug
0,1ug
Riboxxol
1ug
0,1ug
SEVDI
0
0:100
Controle
de meios
D
PBMC-DCs
(6 doadores)
não formulado
QG942 formulado
RANTES (pg/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10ug
0,1ug
polylC:HMW
10ug
0,1ug
Riboxxol
1ug
0,1ug
SEVDI
0
0:100
Controle
de meios

Figura 39

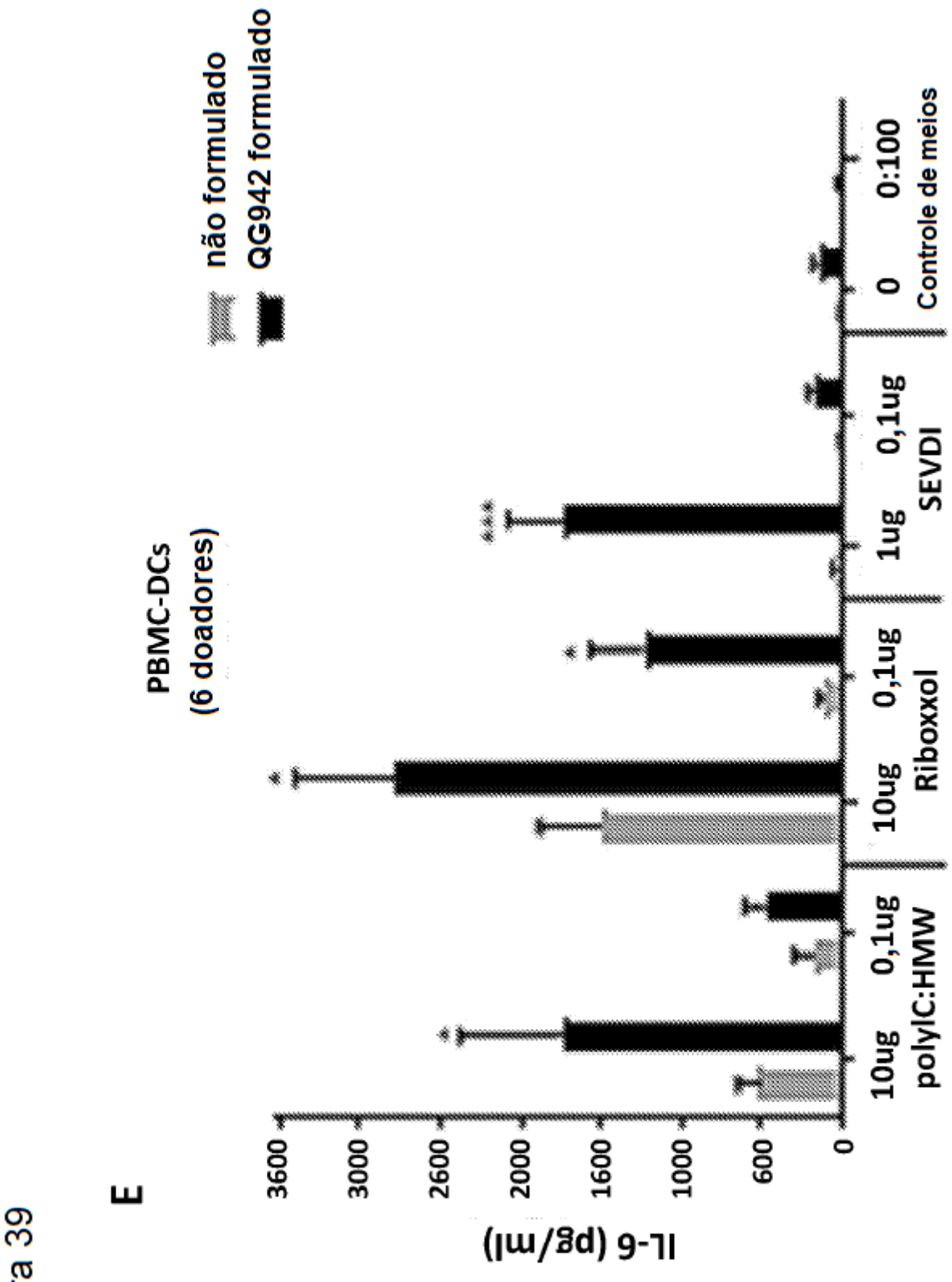
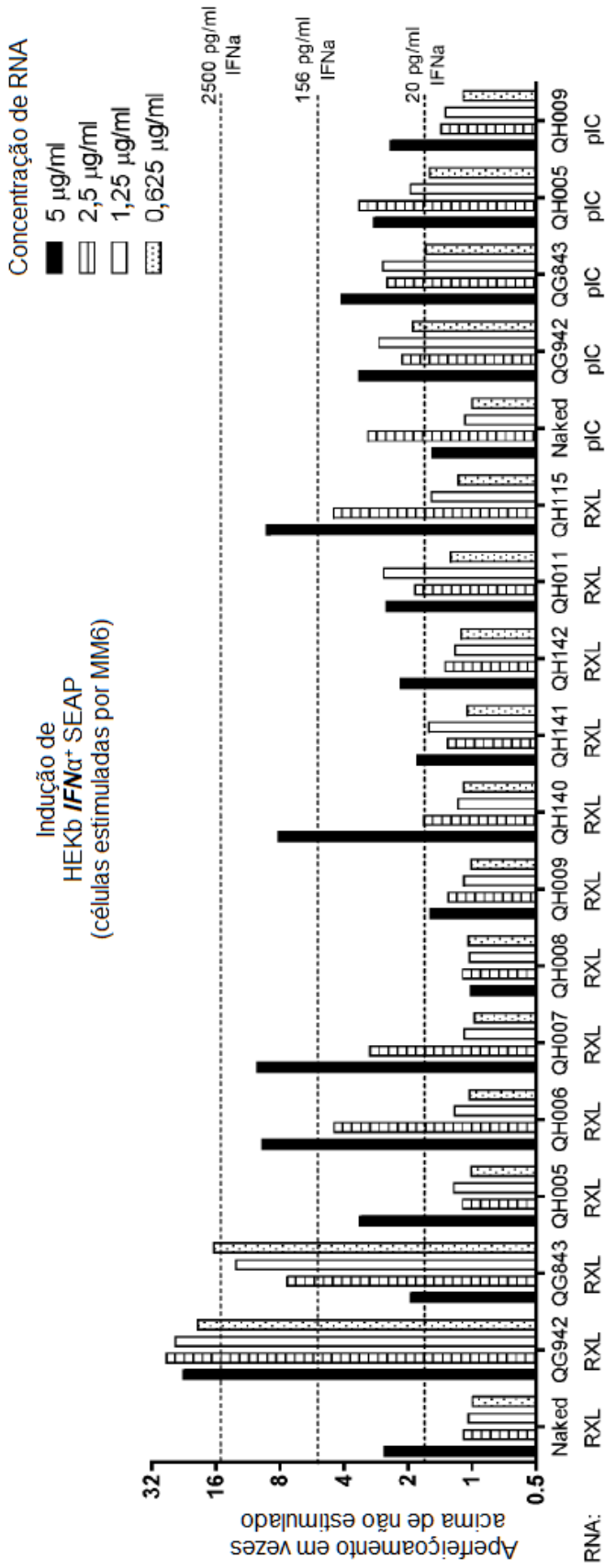

E
PBMC-DCs
(6 doadores)
não formulado
QG942 formulado
IL-6 (pg/ml)
3600
3000
2600
2000
1600
1000
600
0
10ug
0,1ug
polyIC:HMW
10ug
0,1ug
Riboxxol
1ug
0,1ug
SEVDI
0
0:100
Controle de meios

Figura 40


Indução de
HEKb IFNα+ SEAP
(células estimuladas por MM6)
Concentração de RNA
5 µg/ml
2,5 µg/ml
1,25 µg/ml
0,625 µg/ml
2500 pg/ml IFNa
156 pg/ml IFNa
20 pg/ml IFNa
Aperfeiçoamento em vezes acima de não estimulado
32
16
8
4
2
1
0.5
RNA:
Naked RXL QG942 RXL QG843 RXL QH005 RXL QH006 RXL QH007 RXL QH008 RXL QH009 RXL QH140 RXL QH141 RXL QH142 RXL QH011 RXL QH115 Naked pIC QG942 pIC QG843 pIC QH005 pIC QH009 pIC

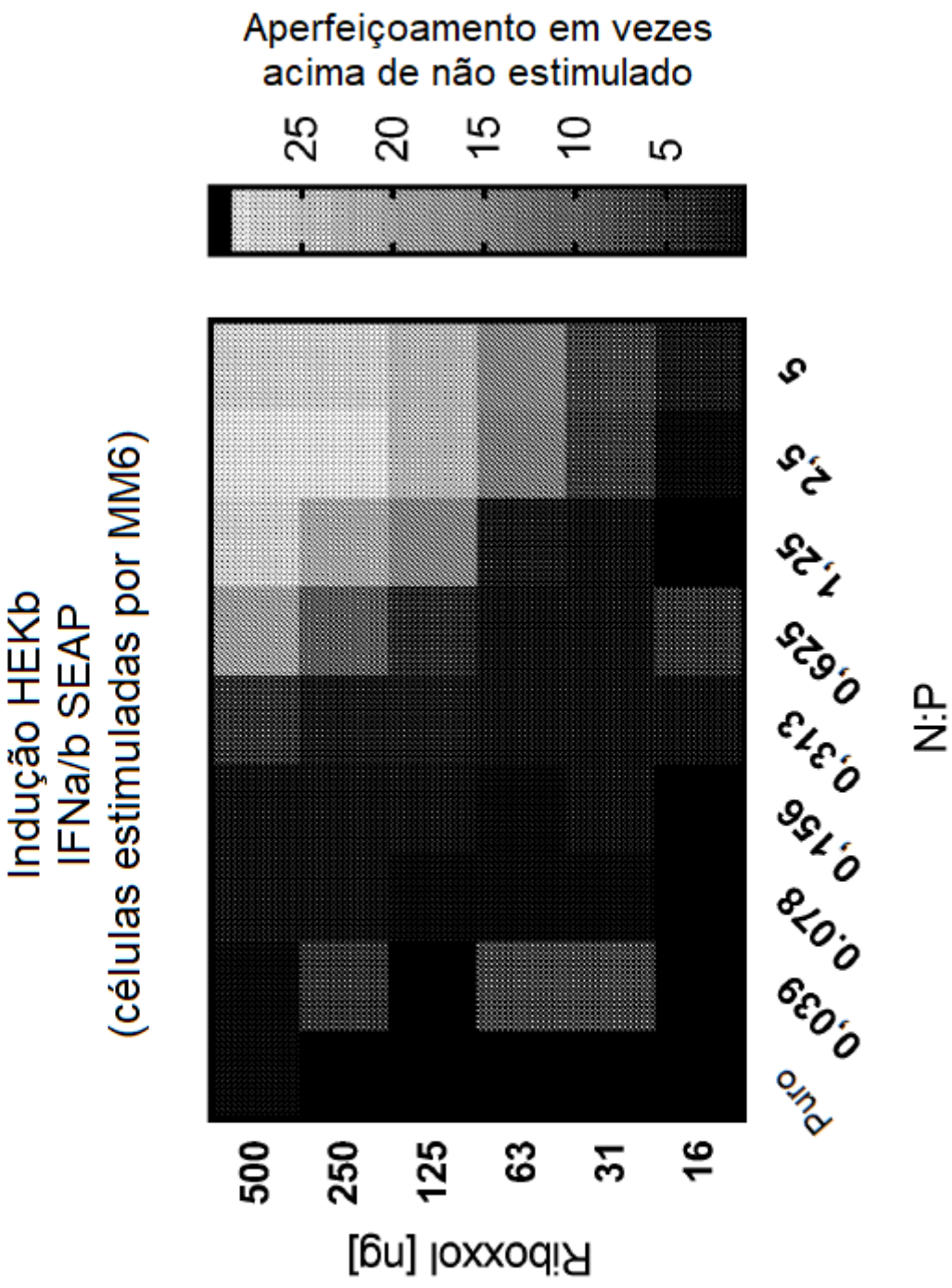

Indução HEKb
IFNa/b SEAP
(células estimuladas por MM6)
Aperfeiçoamento em vezes
acima de não estimulado
25
20
15
10
5
Riboxxol [ng]
500
250
125
63
31
16
puro
0,039
0,078
0,156
0,313
0,625
1,25
2,5
5
N:P

Figura 41

Figura 42

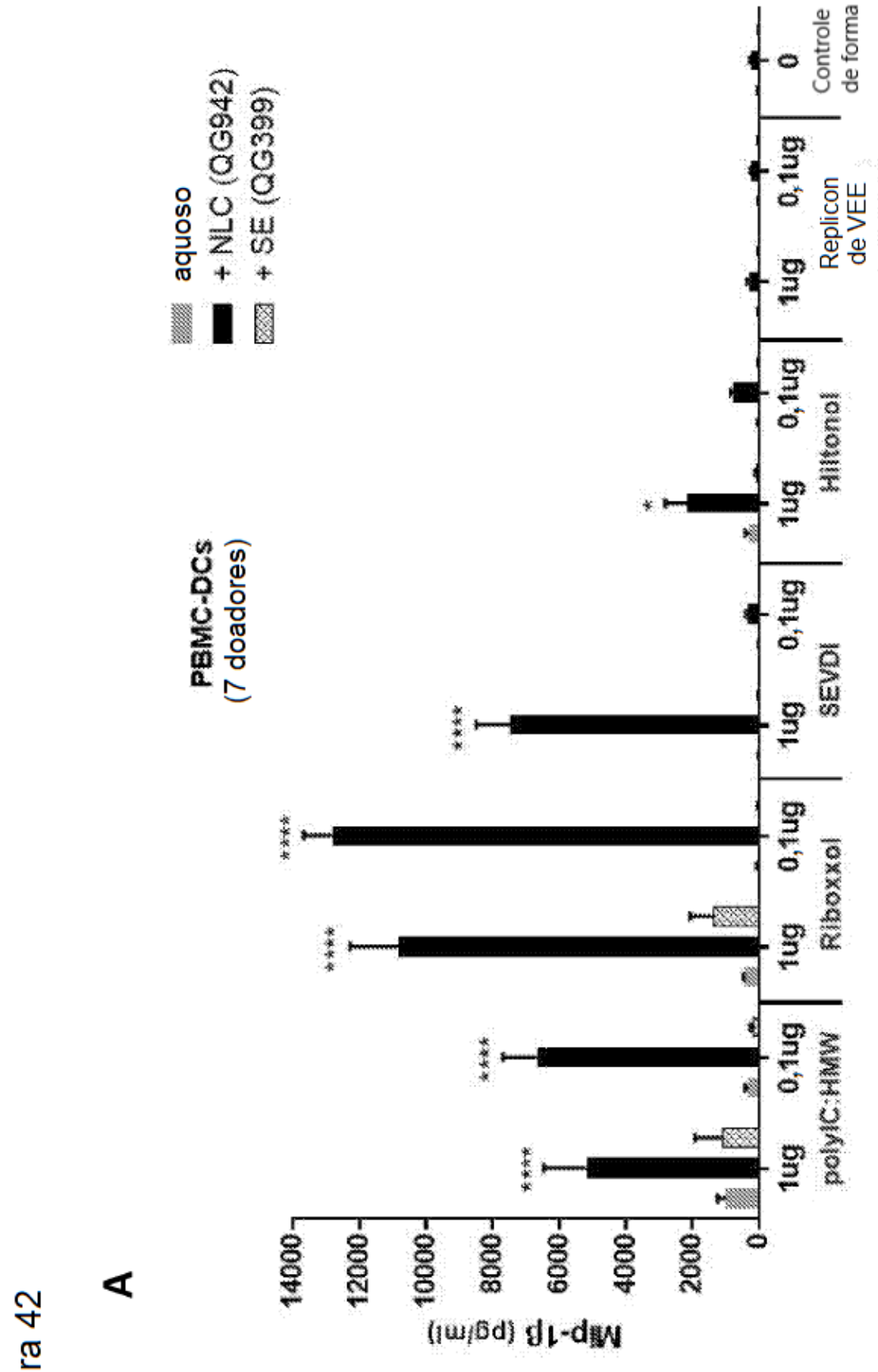

A
PBMC-DCs
(7 doadores)
aquoso
+ NLC (QG942)
+ SE (QG399)
Mip-1β (pg/ml)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
1ug
0,1ug
polyIC:HMW
Riboxxol
SEVDI
Hiltonol
Replicon de VEE
Controle de forma
****
*

Figura 42

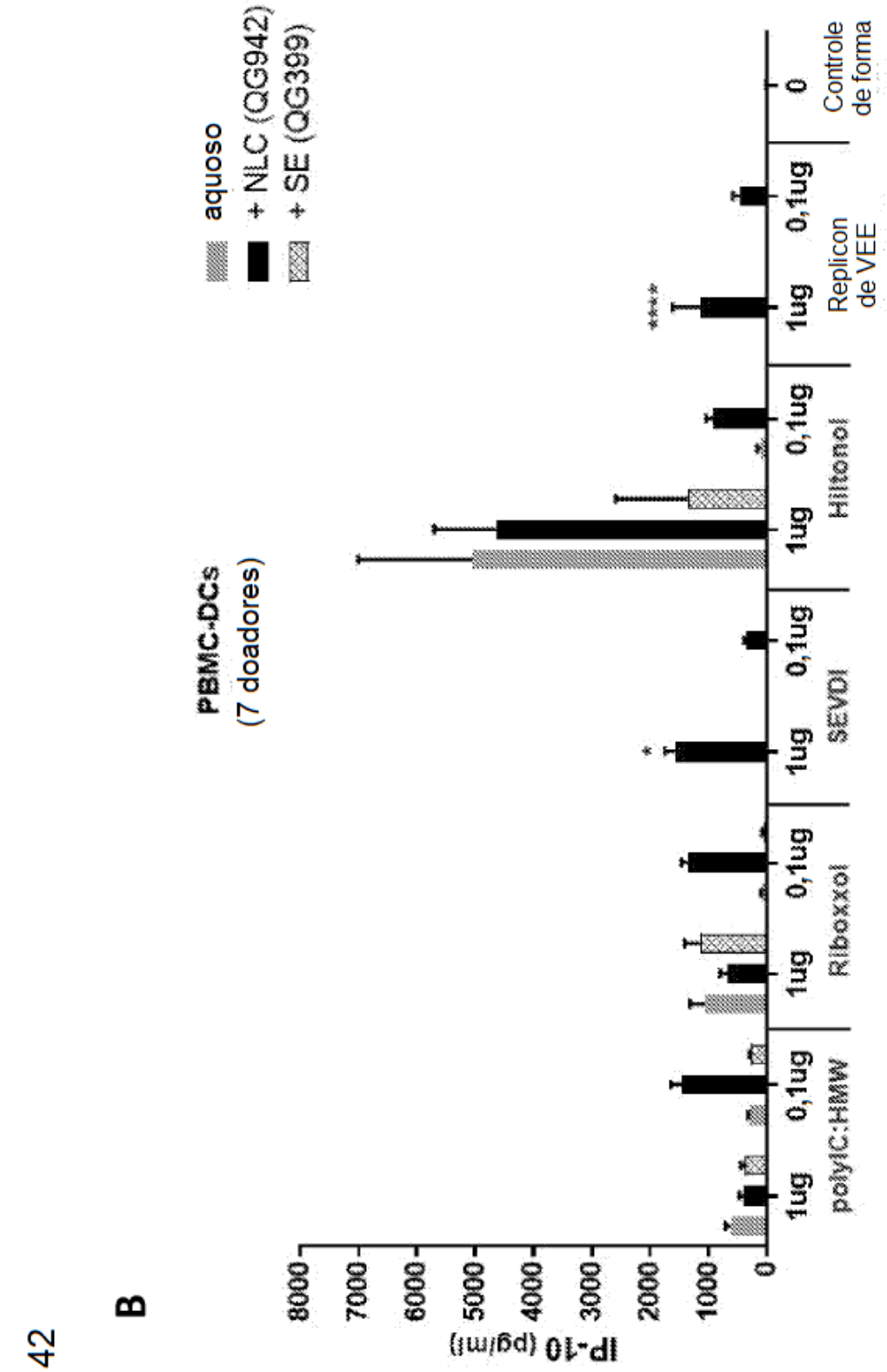
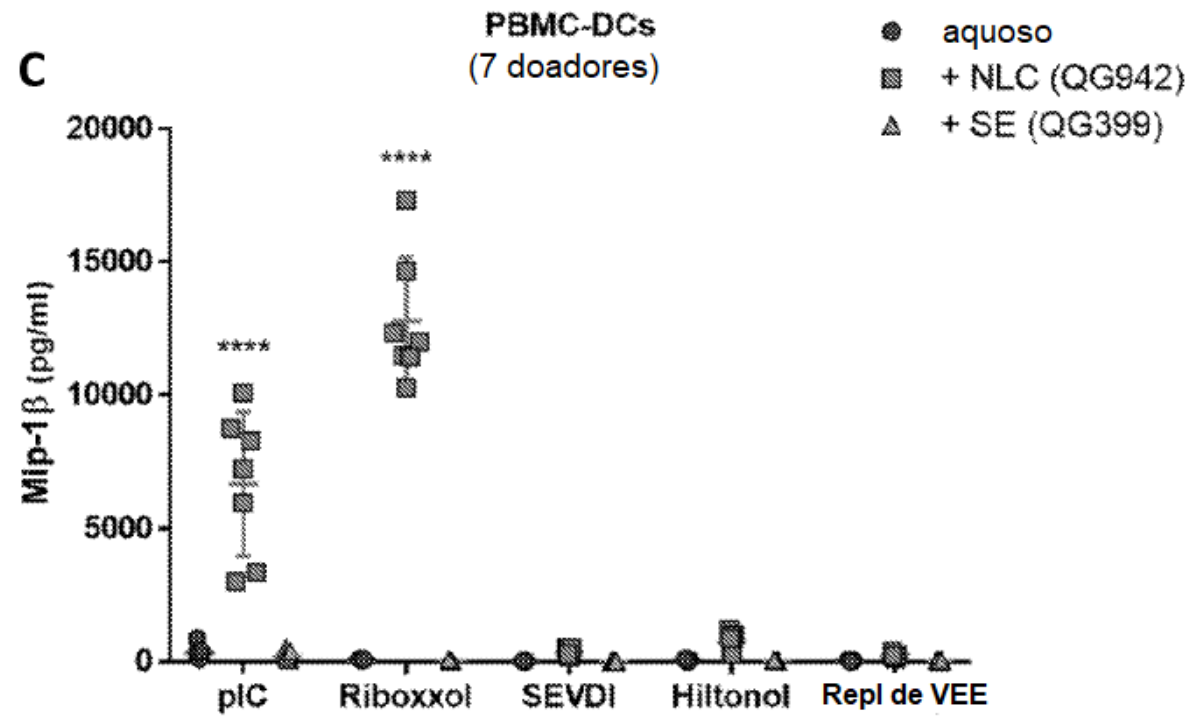
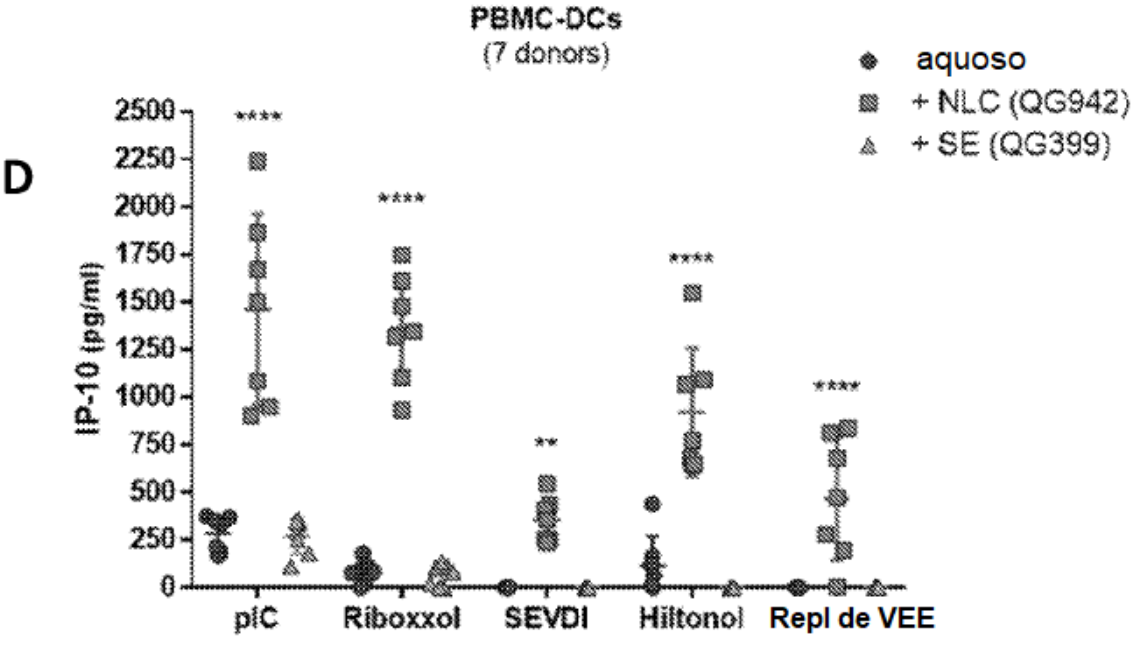

B
PBMC-DCs
(7 doadores)
aquoso
+ NLC (QG942)
+ SE (QG399)
IP-10 (pg/ml)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1ug
0,1ug
1ug
0,1ug
1ug
0,1ug
1ug
0,1ug
1ug
0,1ug
0
polyIC:HMW
Riboxxol
SEVDI
Hiltonol
Replicon de VEE
Controle de forma
*
*
*
****

Figura 42



Formulação a 0,1 µg



dsRNA a 0,1µg + formulação

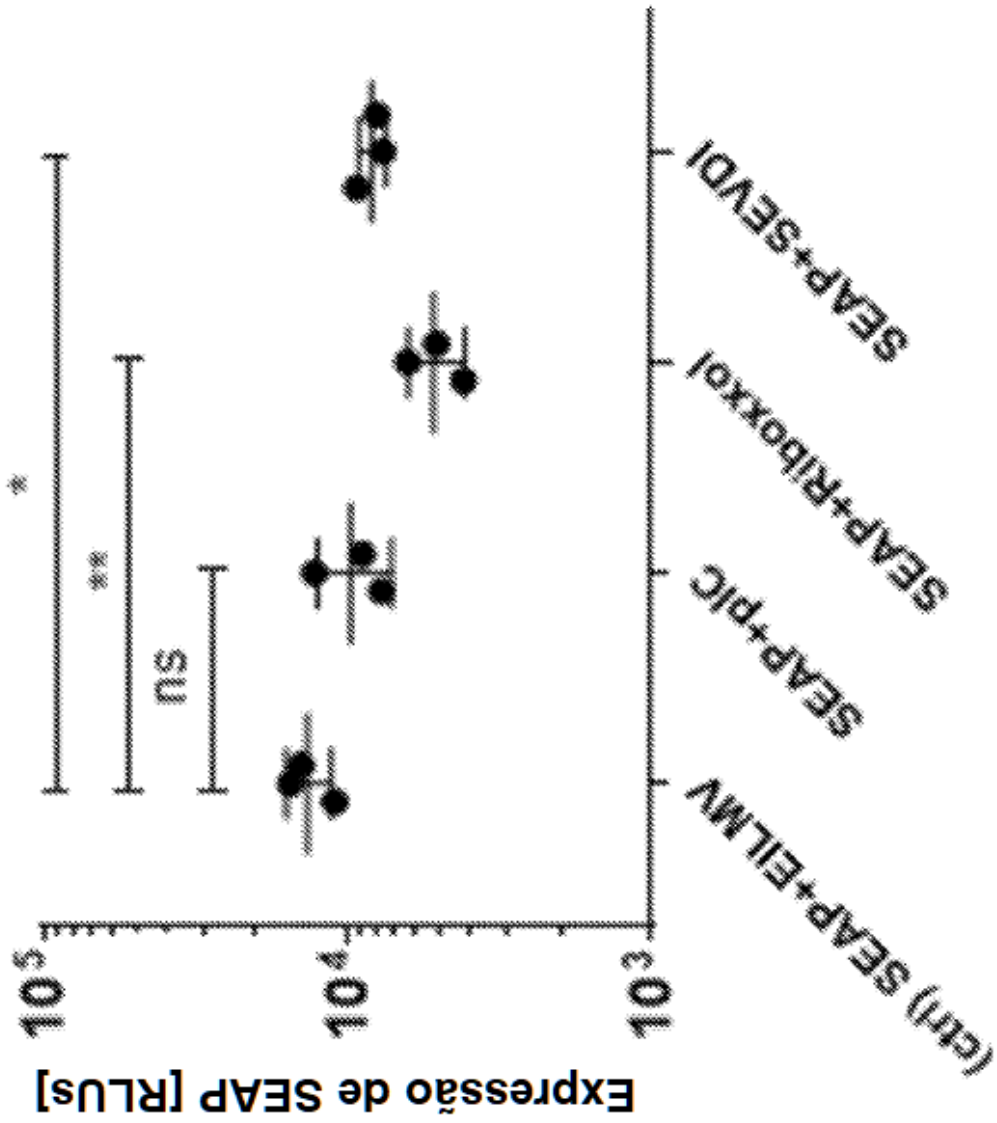
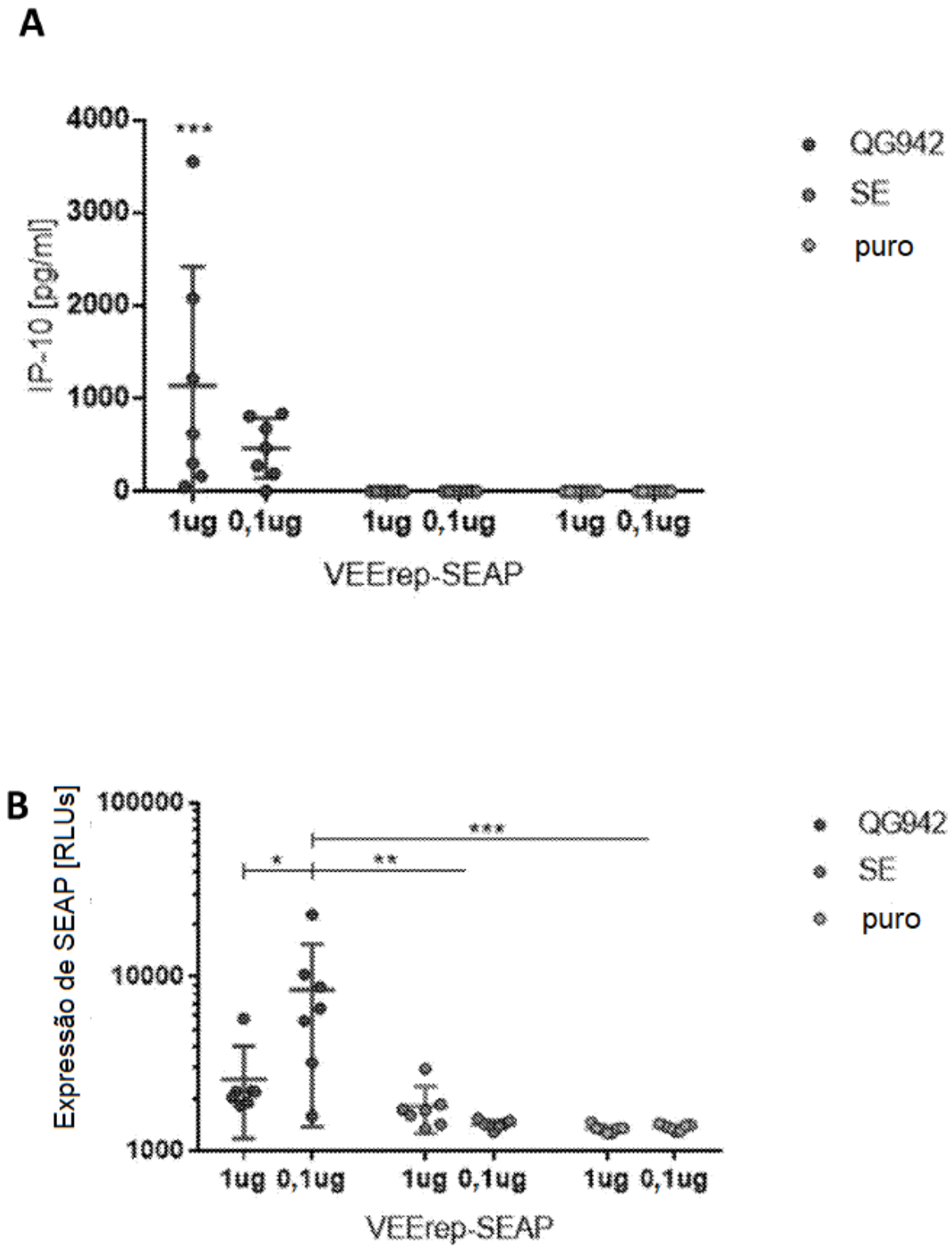

Expressão de SEAP [RLUs]
10^5
10^4
10^3
*
***
ns
(ctrl) SEAP+ELLMV
SEAP+pIC
SEAP+Riboxxol
SEAP+SEVDI

Figura 43

Figura 44


A
4000
3000
2000
1000
0
IP-10 [pg/ml]
***
1ug 0,1ug
1ug 0,1ug
1ug 0,1ug
VEErep-SEAP
QG942
SE
puro
B
100000
10000
1000
Expressão de SEAP [RLUs]
*
**
***
1ug 0,1ug
1ug 0,1ug
1ug 0,1ug
VEErep-SEAP
QG942
SE
puro

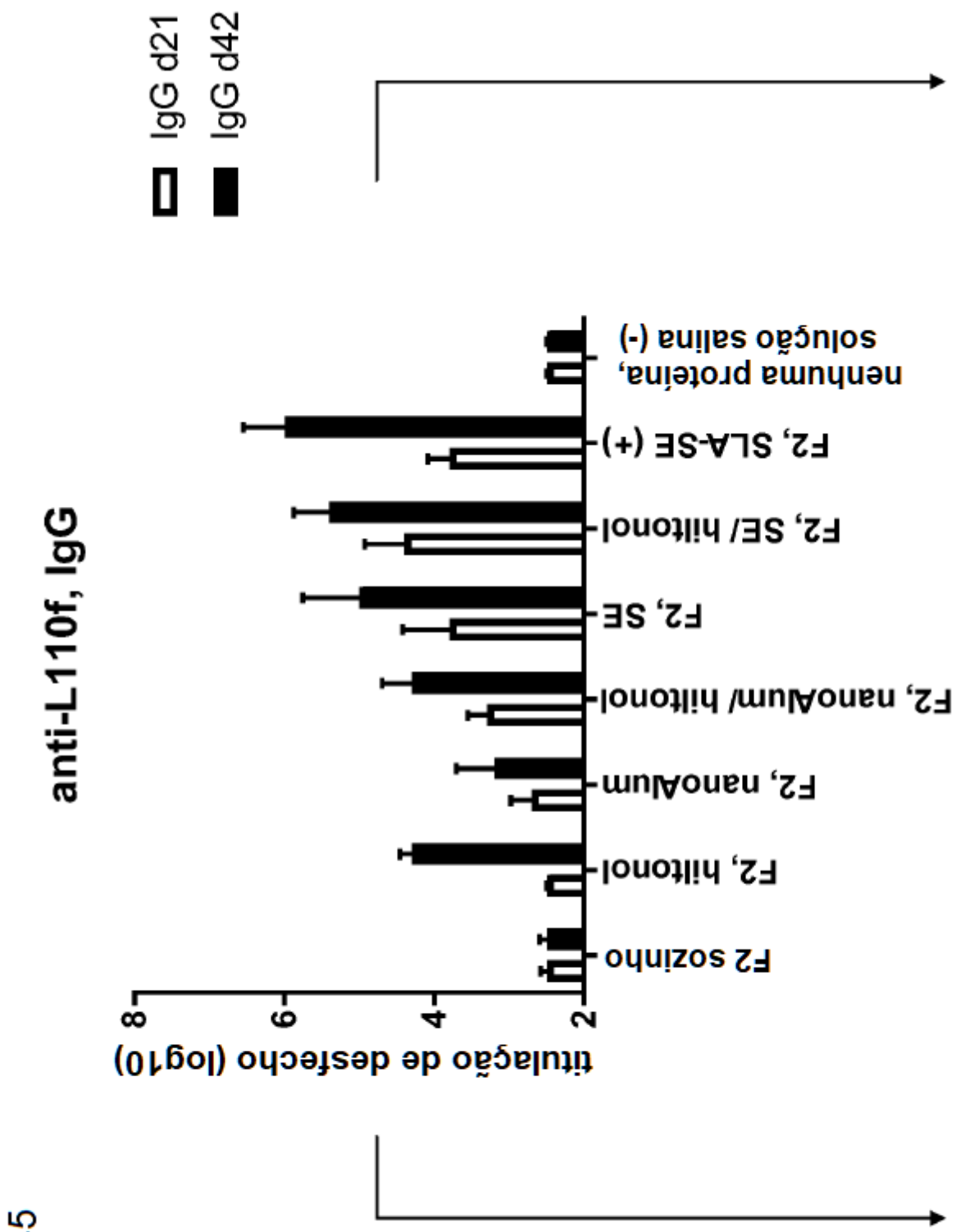
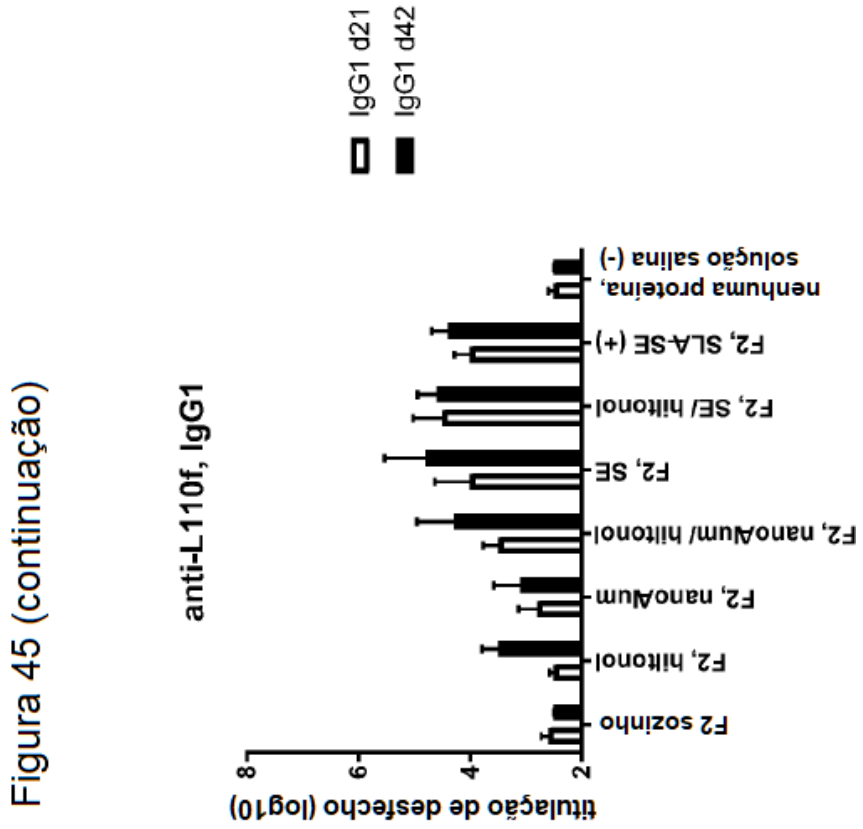

IgG d21
IgG d42
anti-L110f, IgG
titulação de desfecho (log10)
8
6
4
2
F2 sozinho
F2, hilttonol
F2, nanoAlum
F2, nanoAlum/ hilttonol
F2, SE
F2, SE/ hilttonol
F2, SLA-SE (+)
nenhuma proteína, solução salina (-)

Figura 45

Figura 45 (continuação)



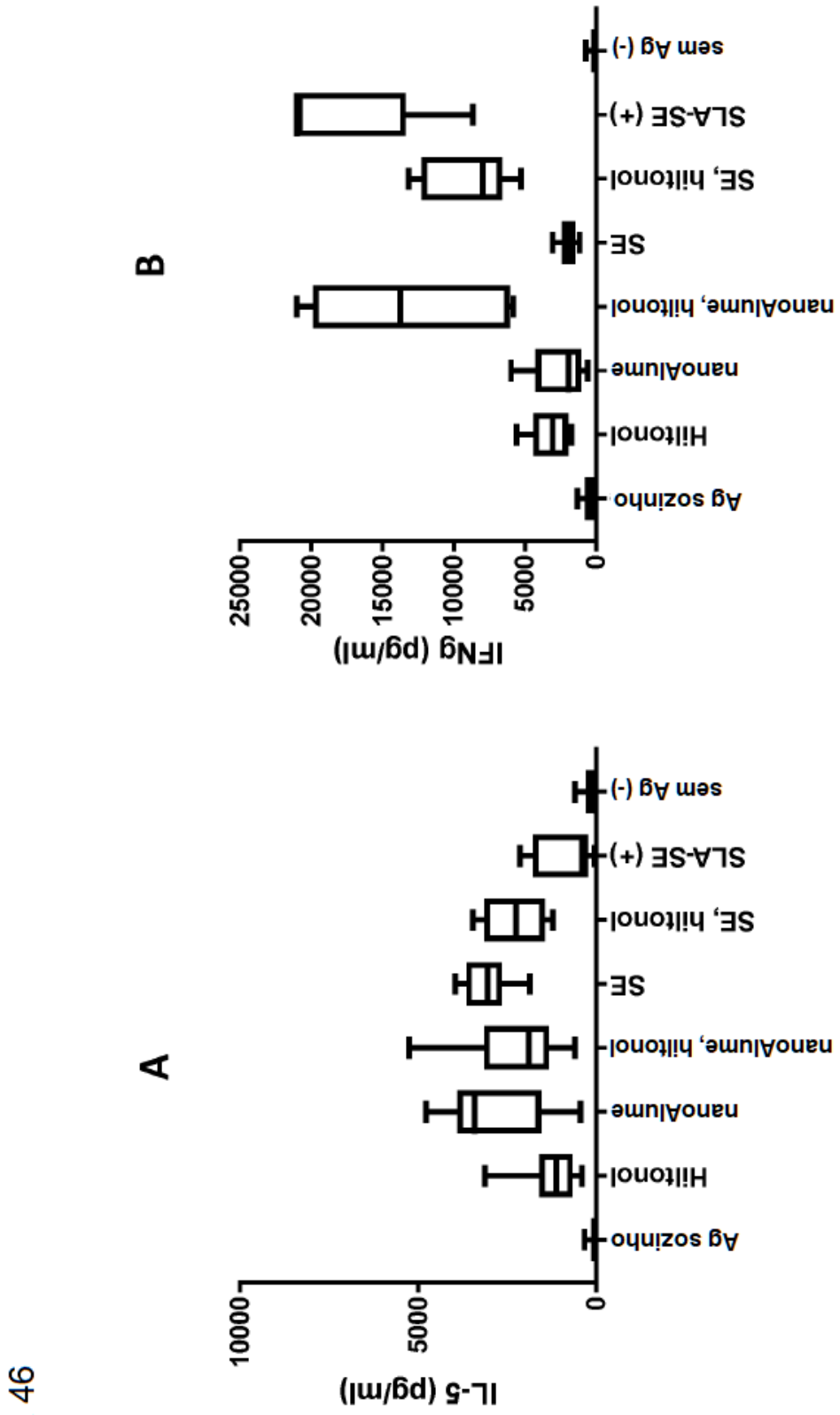

A
IL-5 (pg/ml)
10000
5000
0
Ag sozinho
Hilttonol
nanoAlume
nanoAlume, hilttonol
SE
SE, hilttonol
SLA-SE (+)
sem Ag (-)
B
IFNg (pg/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
Ag sozinho
Hilttonol
nanoAlume
nanoAlume, hilttonol
SE
SE, hilttonol
SLA-SE (+)
sem Ag (-)

Figura 46

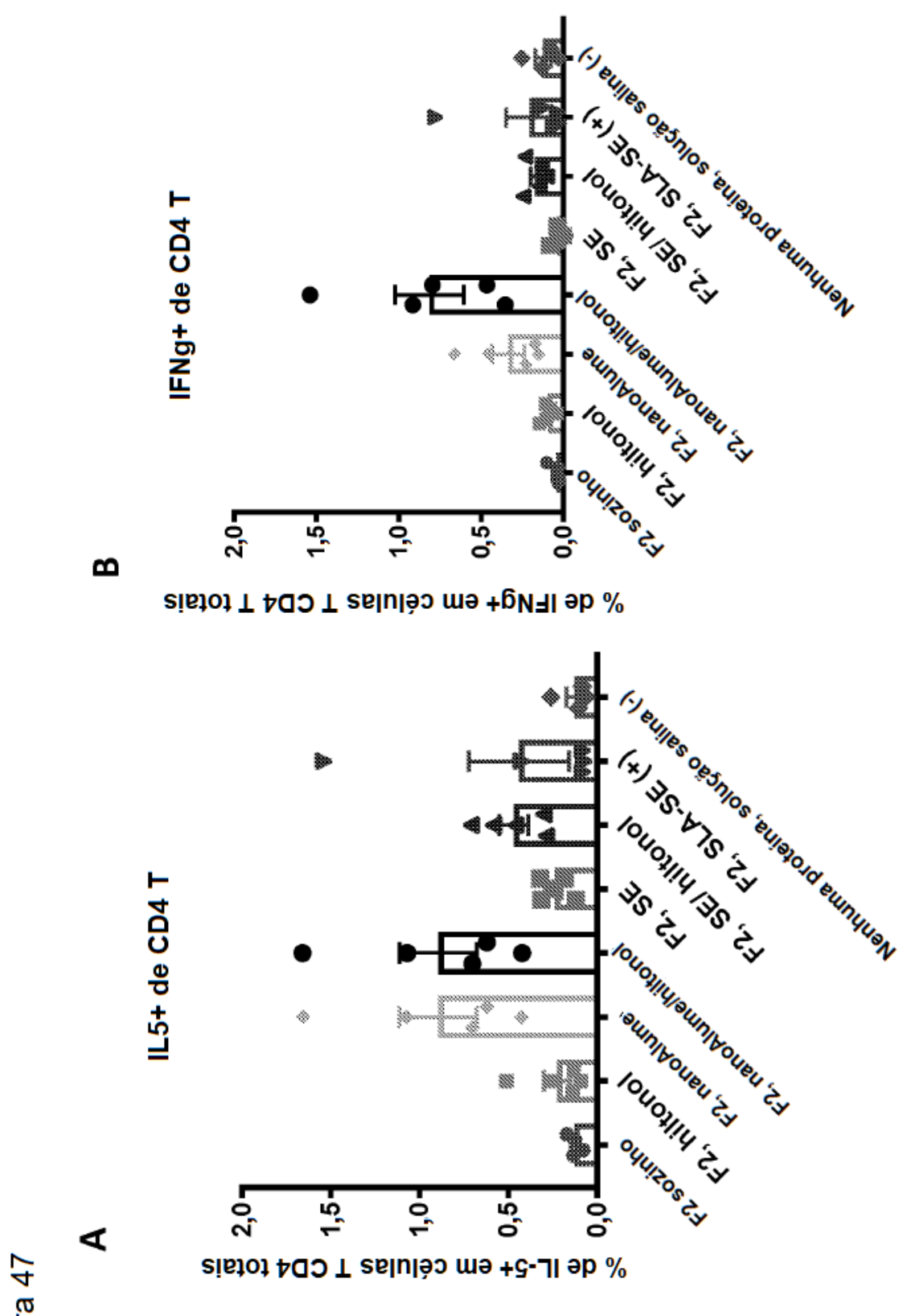

A
IL5+ de CD4 T
% de IL-5+ em células T CD4 totais
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
F2 sozinho
F2, hilitonol
F2, nanoAlume
F2, nanoAlume/hilitonol
F2, SE
F2, SE/ hilitonol
F2, SLA-SE (+)
Nenhuma proteína, solução salina (-)
B
IFNg+ de CD4 T
% de IFNg+ em células T CD4 T totais
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
F2 sozinho
F2, hilitonol
F2, nanoAlume
F2, nanoAlume/hilitonol
F2, SE
F2, SE/ hilitonol
F2, SLA-SE (+)
Nenhuma proteína, solução salina (-)

Figura 47

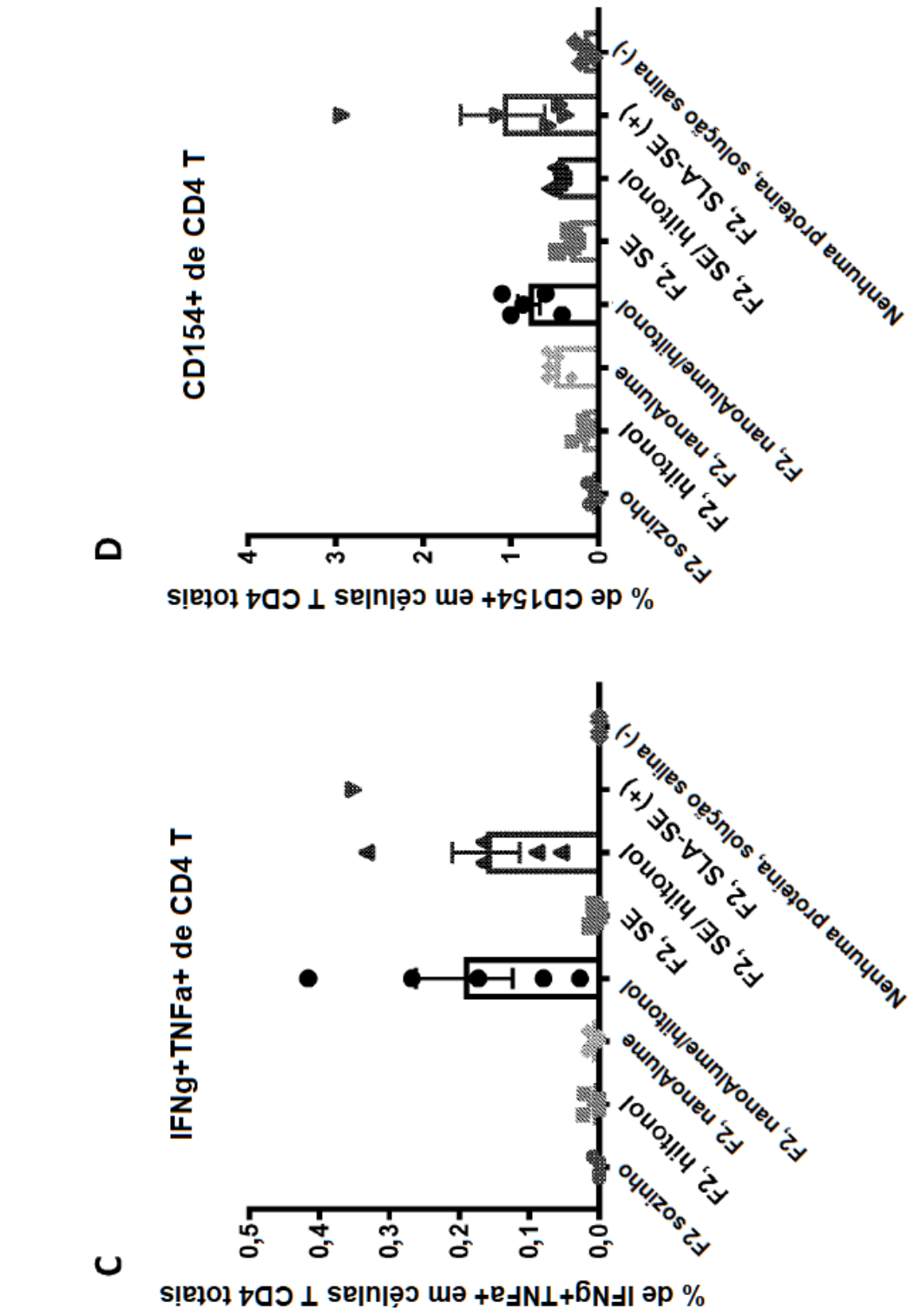

C
IFNg+TNFa+ de CD4 T
% de IFNg+TNFa+ em células T CD4 totais
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
F2 sozinho
F2, hiltonol
F2, nanoAlume
F2, nanoAlume/hiltonol
F2, SE
F2, SE/ hiltonol
F2, SLA-SE (+)
Nenhuma proteína, solução salina (-)
D
CD154+ de CD4 T
% de CD154+ em células T CD4 totais
0
1
2
3
4
F2 sozinho
F2, hiltonol
F2, nanoAlume
F2, nanoAlume/hiltonol
F2, SE
F2, SE/ hiltonol
F2, SLA-SE (+)
Nenhuma proteína, solução salina (-)

Figura 47

Figura 47

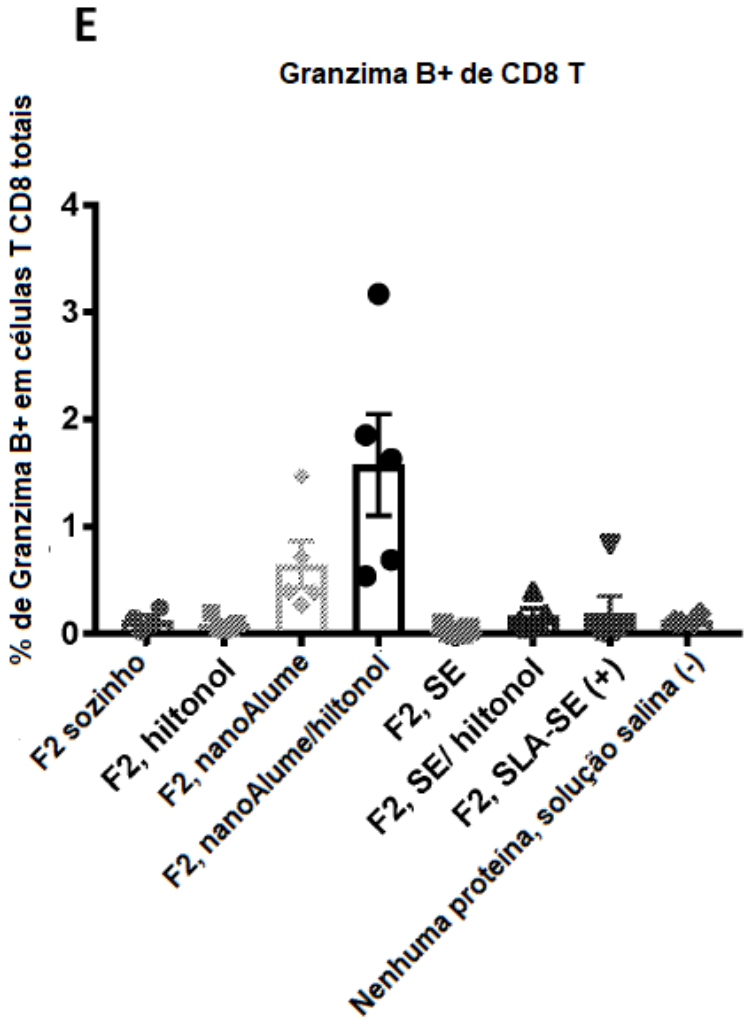


Figura 48

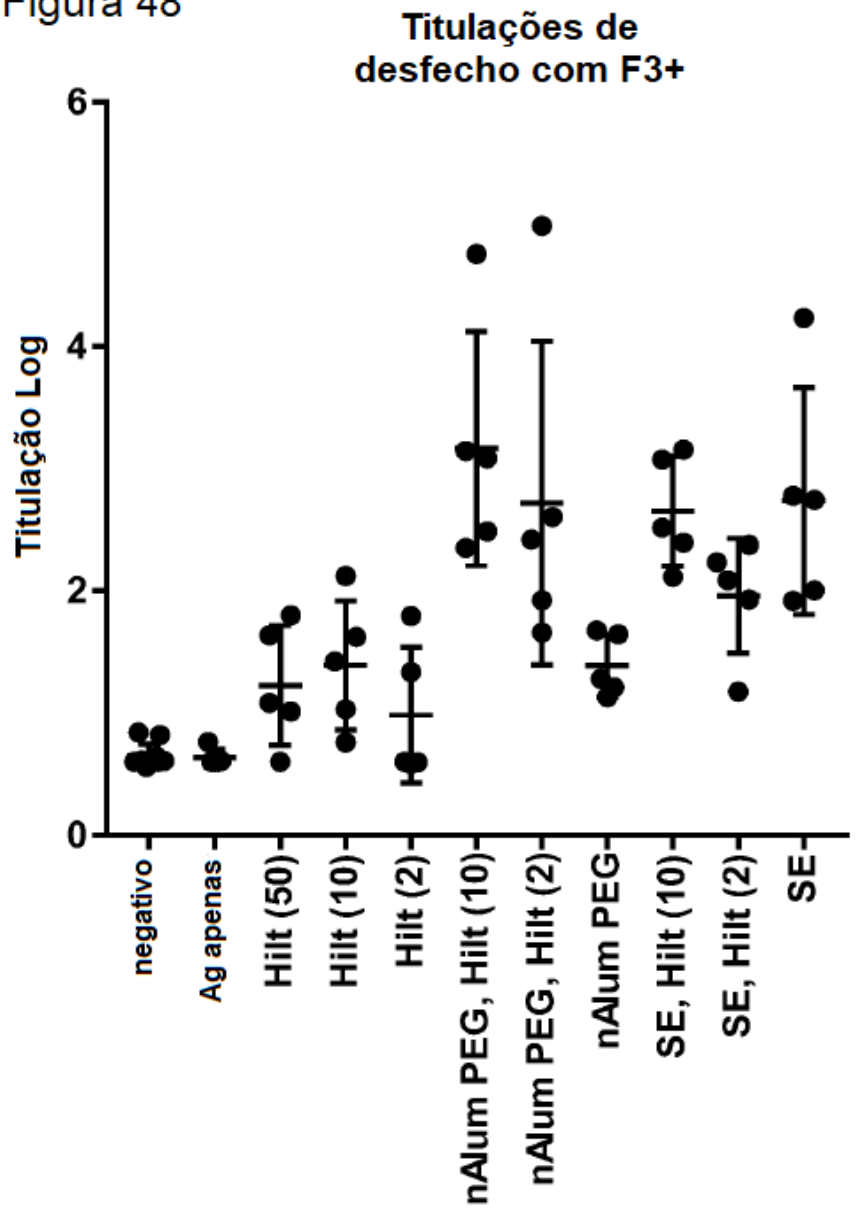
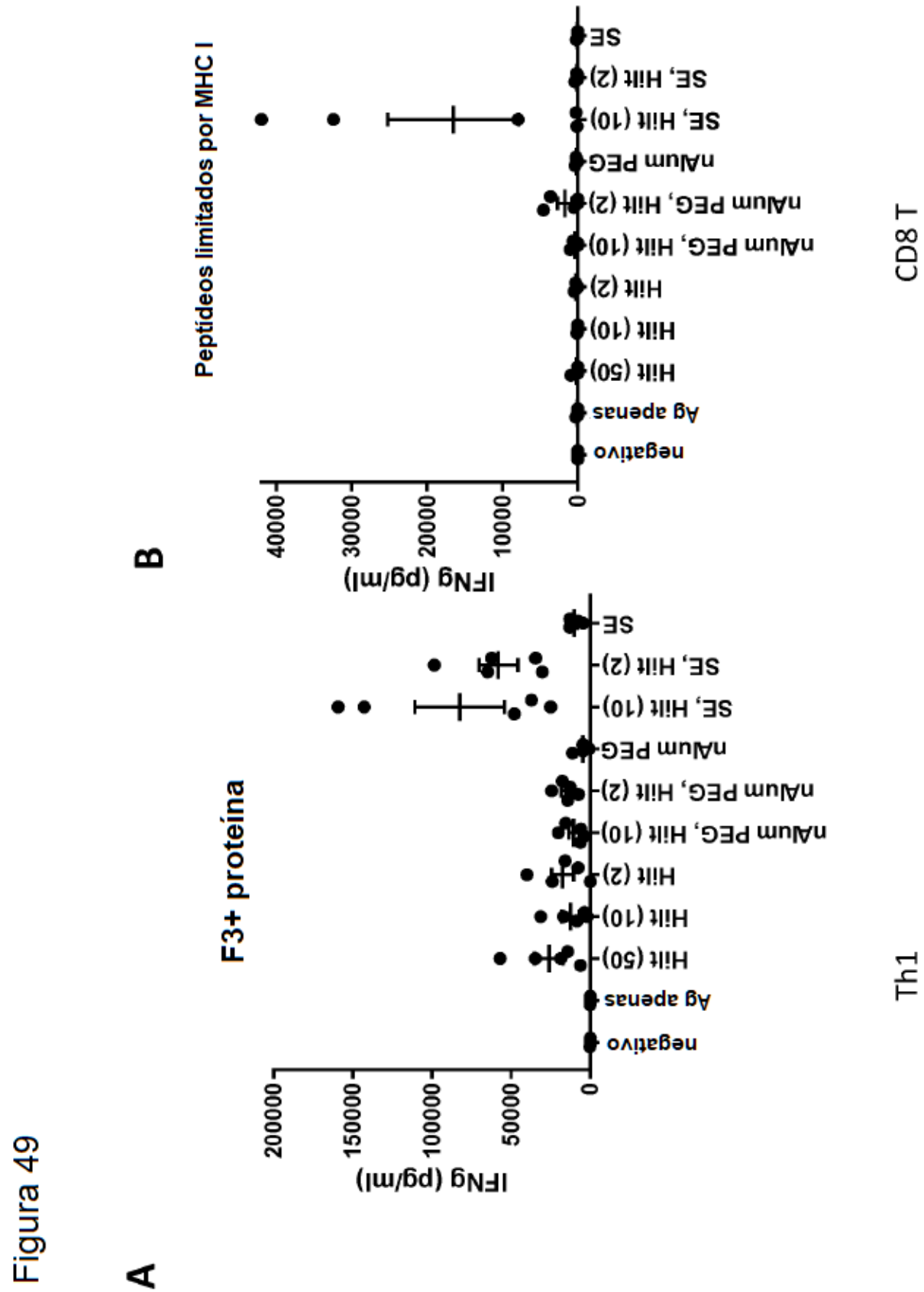


Figura 49


A
F3+ proteína
IFNg (pg/ml)
200000
150000
100000
50000
0
negativo
Ag apenas
Hilt (50)
Hilt (10)
Hilt (2)
nAlum PEG, Hilt (10)
nAlum PEG, Hilt (2)
nAlum PEG
SE, Hilt (10)
SE, Hilt (2)
SE
Th1
B
Peptídeos limitados por MHC I
IFNg (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
negativo
Ag apenas
Hilt (50)
Hilt (10)
Hilt (2)
nAlum PEG, Hilt (10)
nAlum PEG, Hilt (2)
nAlum PEG
SE, Hilt (10)
SE, Hilt (2)
SE
CD8 T

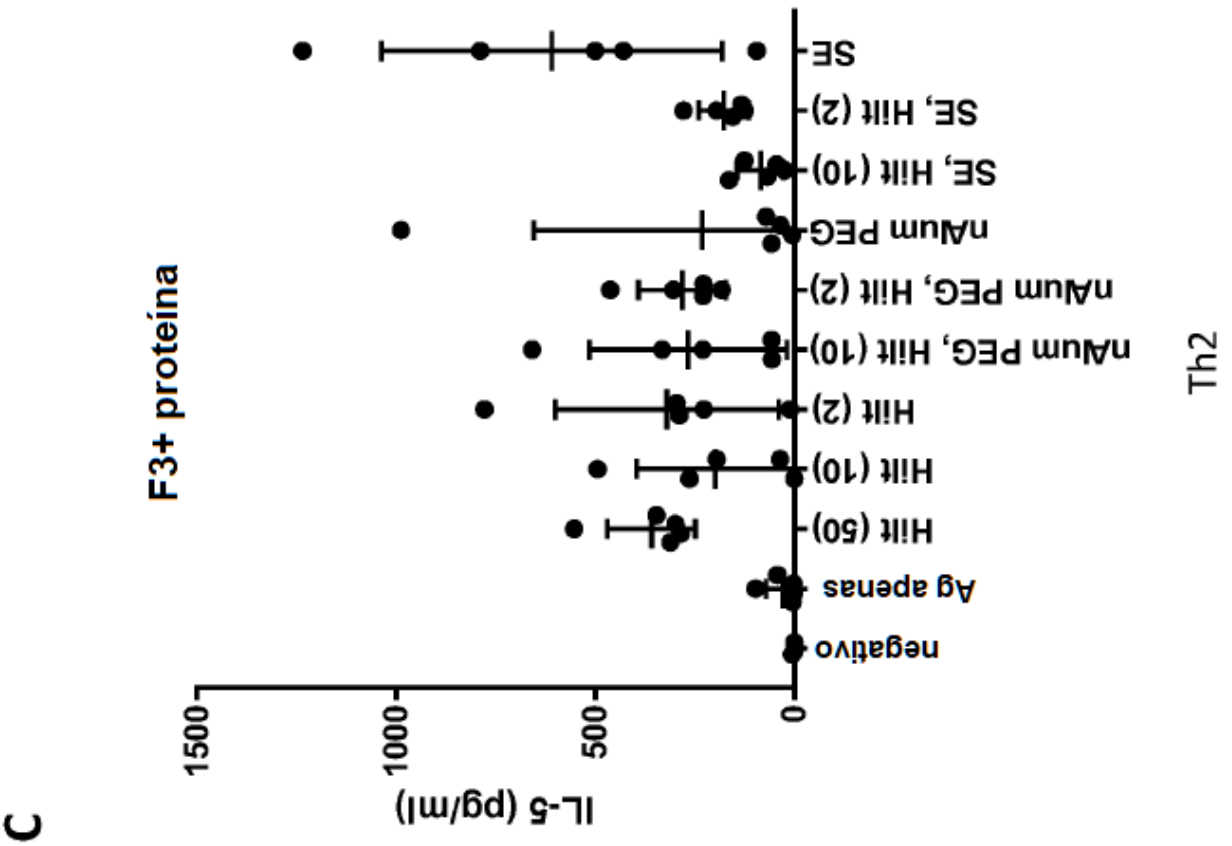

C
F3+ proteína
IL-5 (pg/ml)
1500
1000
500
0
negativo
Ag apenas
Hilt (50)
Hilt (10)
Hilt (2)
nAlum PEG, Hilt (10)
nAlum PEG, Hilt (2)
nAlum PEG
SE, Hilt (10)
SE, Hilt (2)
SE
Th2

Figura 49

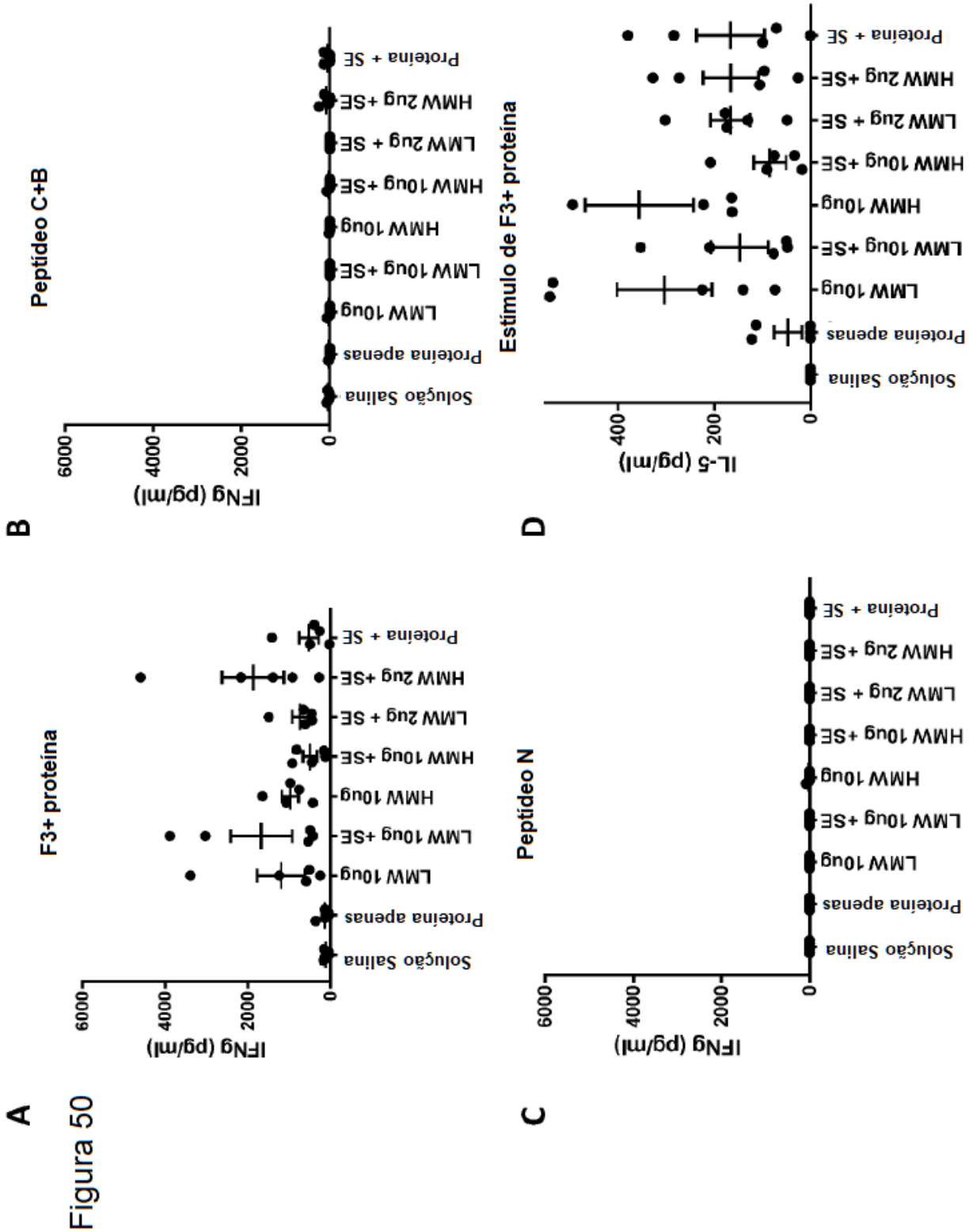

A
F3+ proteína
IFNg (pg/ml)
0
2000
4000
6000
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE
B
Peptideo C+B
IFNg (pg/ml)
0
2000
4000
6000
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE
C
Peptideo N
IFNg (pg/ml)
0
2000
4000
6000
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE
D
Estímulo de F3+ proteína
IL-5 (pg/ml)
0
200
400
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE

Figura 50

Figura 50

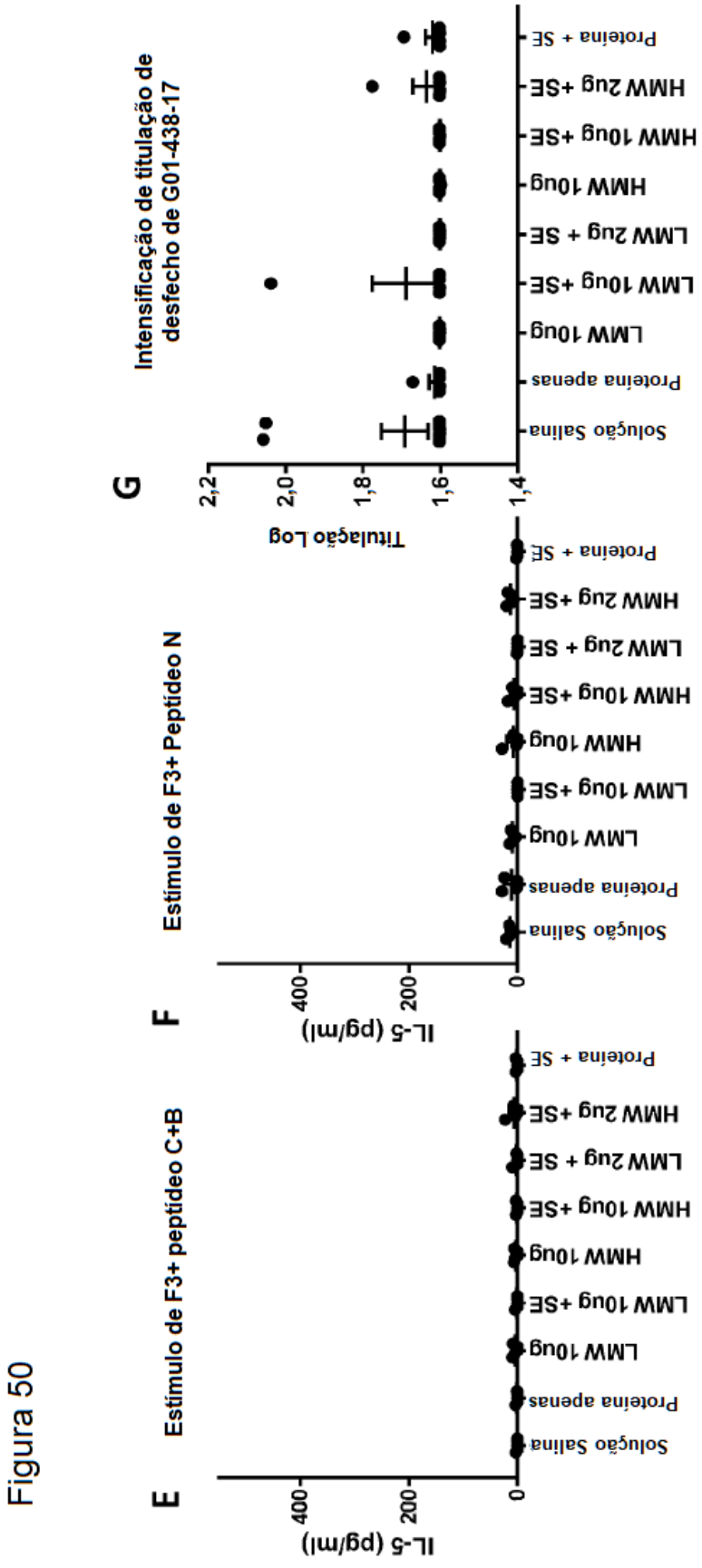

E
Estímulo de F3+ peptídeo C+B
IL-5 (pg/ml)
0
200
400
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE
F
Estímulo de F3+ Peptídeo N
IL-5 (pg/ml)
0
200
400
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE
G
Intensificação de titulação de desfecho de G01-438-17
Titulação Log
1,4
1,6
1,8
2,0
2,2
Solução Salina
Proteína apenas
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug + SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
Proteína + SE

Figura 51

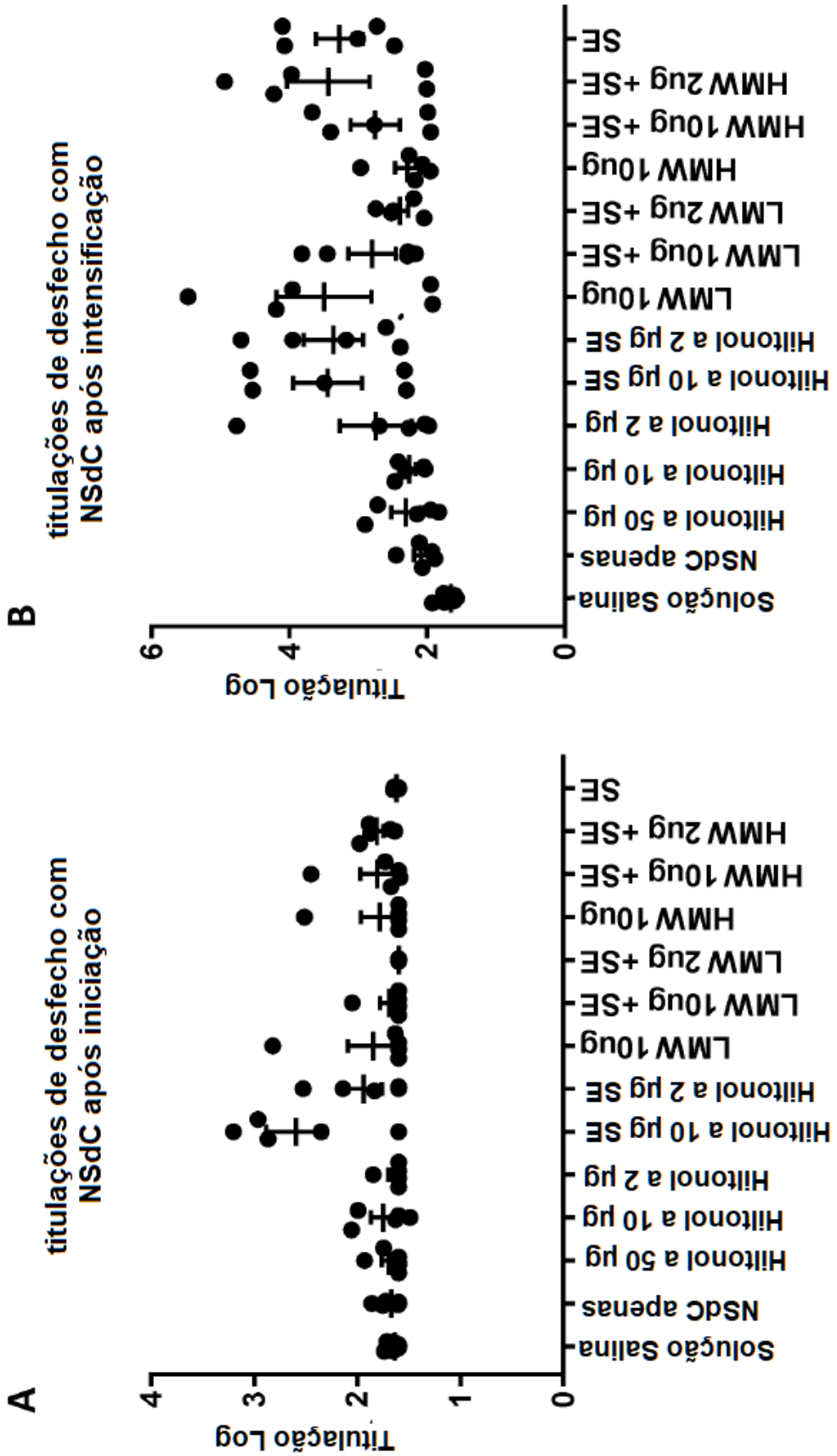

A
titulações de desfecho com
NSdC após iniciação
Titulação Log
0
1
2
3
4
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE
B
titulações de desfecho com
NSdC após intensificação
Titulação Log
0
2
4
6
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE

Figura 52

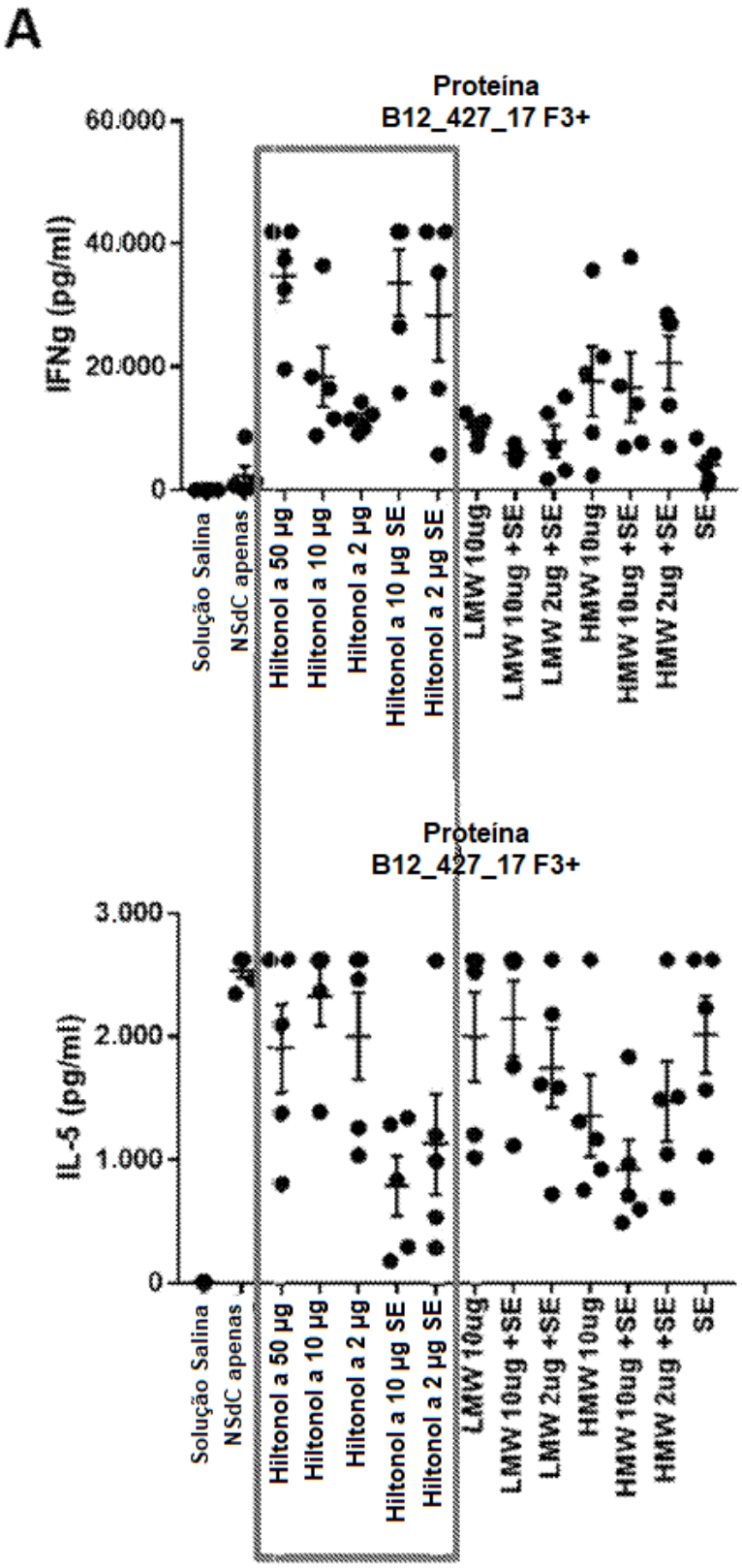

A
Proteína
B12_427_17 F3+
IFNg (pg/ml)
60.000
40.000
20.000
0
Proteína
B12_427_17 F3+
IL-5 (pg/ml)
3.000
2.000
1.000
0
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE

Figura 52

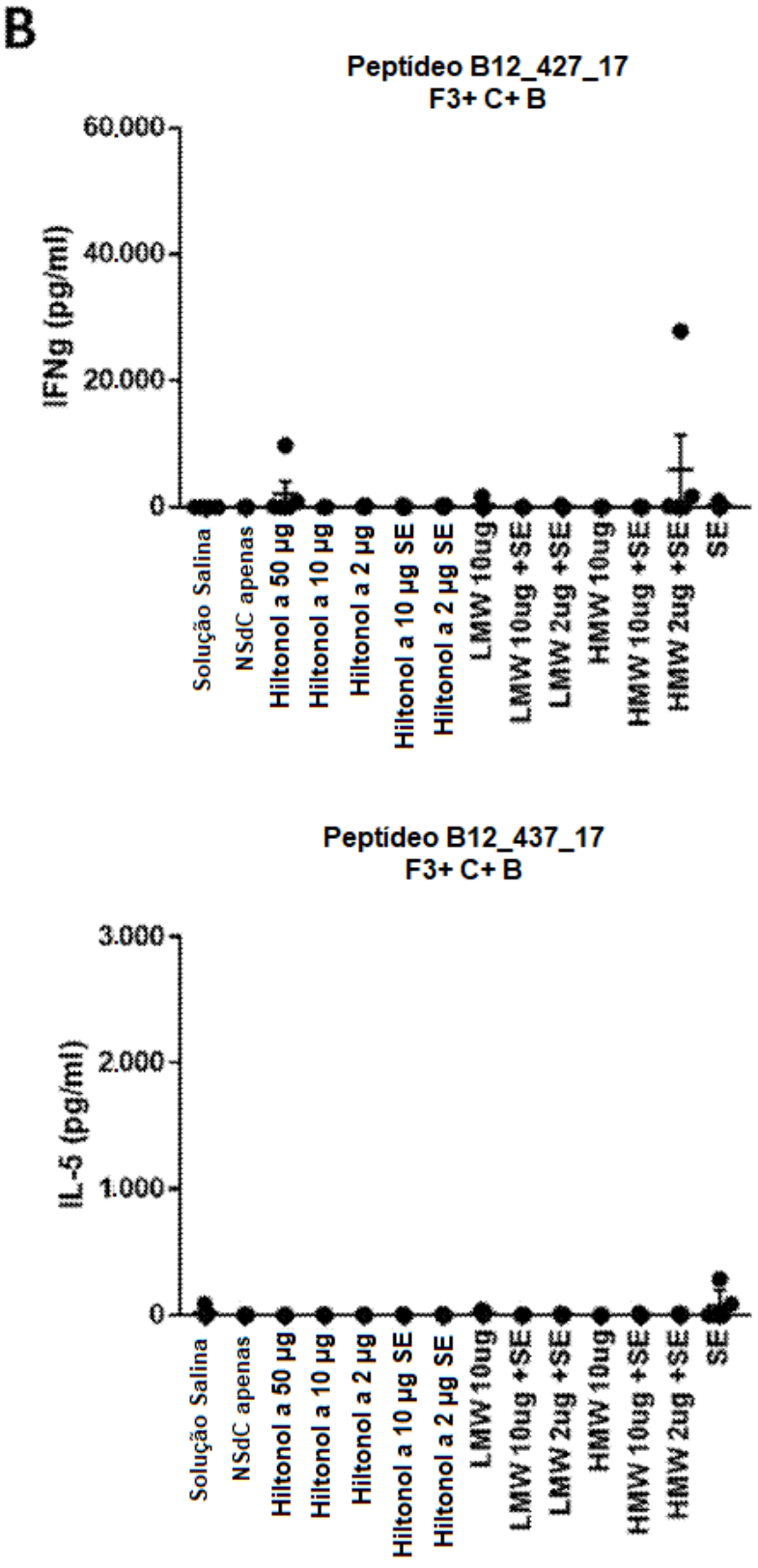
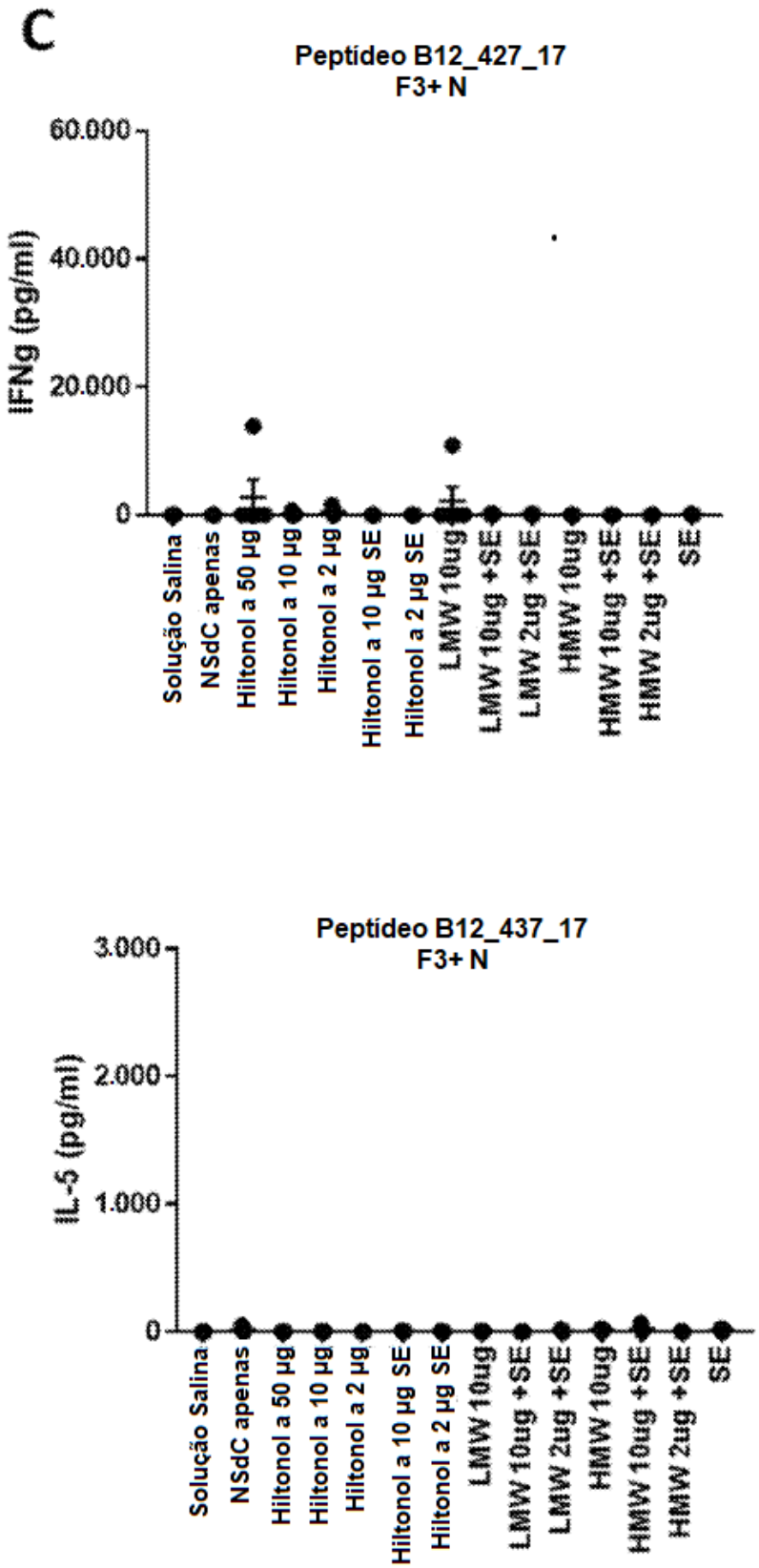

B
Peptídeo B12_427_17
F3+ C+ B
IFNg (pg/ml)
60.000
40.000
20.000
0
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE
Peptídeo B12_437_17
F3+ C+ B
IL-5 (pg/ml)
3.000
2.000
1.000
0
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE

Figura 52


C
Peptídeo B12_427_17
F3+ N
IFNg (pg/ml)
60.000
40.000
20.000
0
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE
Peptídeo B12_437_17
F3+ N
IL-5 (pg/ml)
3.000
2.000
1.000
0
Solução Salina
NSdC apenas
Hiltonol a 50 µg
Hiltonol a 10 µg
Hiltonol a 2 µg
Hiltonol a 10 µg SE
Hiltonol a 2 µg SE
LMW 10ug
LMW 10ug +SE
LMW 2ug +SE
HMW 10ug
HMW 10ug +SE
HMW 2ug +SE
SE