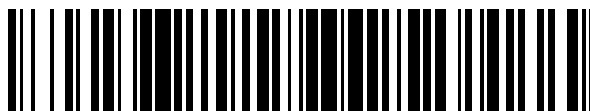


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 994**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2007** **E 07764627 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2032592**

54 Título: **Procesos para empaquetar oligonucleótidos en partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN**

30 Prioridad:

12.06.2006 US 812592 P

14.12.2006 WO PCT/EP2006/069734

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.11.2013

73 Titular/es:

CYTOS BIOTECHNOLOGY AG (100.0%)

WAGISTRASSE 25

8952 ZÜRICH-SCHLIEREN, CH

72 Inventor/es:

KINZLER, MATTHIAS y

PROBA, KARL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 427 994 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procesos para empaquetar oligonucleótidos en partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer procesos para producir composiciones que comprenden (i) una partícula de tipo viral, en las que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en las que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral. La presente invención da a conocer además procesos para producir composiciones de nucleótidos que comprenden oligonucleótidos adecuados para utilizar en los procesos mencionados anteriormente. El presente documento da a conocer además composiciones de nucleótidos obtenibles por los procesos de la presente invención y utilidades de las mismas. El presente documento da a conocer además composiciones que comprenden (i) una partícula de tipo viral, en las que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en las que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en las que dichas composiciones son obtenibles mediante los procesos de la presente invención y en las que dichas composiciones comprenden, de manera preferente, una pureza, como mínimo, del 98%, de la manera más preferente, como mínimo, del 99%.

20 TÉCNICA RELACIONADA

Las partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN empaquetados con oligonucleótidos son potentes estimuladores del sistema inmunitario (documento WO2003/024481A2) y se utilizan ampliamente en los modernos tratamientos de vacunación. Se han dado a conocer, por ejemplo, en los documentos WO2003/024481A2, WO2004/000351A1, WO2004/084940A1 y WO2004/007538A2, procesos para producir composiciones que comprenden (i) una partícula de tipo viral, en las que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en las que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral. De la forma más habitual, se utilizan procesos que se basan en el desensamblaje de una partícula de tipo viral recombinante, la purificación de la proteína de cubierta y el reensamblaje de dicha proteína de cubierta en presencia de ácido nucleico. Los procesos eficaces y escalables para la producción de partículas de tipo viral recombinantes de bacteriófagos de ARN se dan a conocer en el documento WO2005/117963A1. Los procesos para la purificación a gran escala de partículas de tipo viral intactas sin endotoxinas se dan a conocer en el documento WO2007/039552A1. Los procesos para la preparación de proteína de cubierta a partir de partículas de tipo viral producidas de manera recombinante ("desensamblaje") se dan a conocer, entre otros, en el documento WO2003/024481A2, y en la sección de ejemplos de la presente solicitud. Los procesos para el ensamblaje de la proteína de cubierta en presencia de ácido nucleico ("reensamblaje") dados a conocer en el estado de la técnica no están optimizados con respecto a la eficacia, escalabilidad y pureza del producto ensamblado. En particular, el estado de la técnica no divulga que la eficacia del proceso de "reensamblaje" se pueda mejorar de manera considerable mediante la utilización de oligonucleótidos agregados que comprendan un cierto tamaño de partícula (caracterizado en presente documento por el tiempo de inicio del pico relativo, véase a continuación). La presente solicitud da a conocer un proceso de "reensamblaje" con una eficacia aumentada de manera considerable que conduce a un producto empaquetado de una pureza muy elevada. De manera habitual y preferente, el proceso de "reensamblaje" dado a conocer en el presente documento comprende un rendimiento de proteínas y un rendimiento de oligonucleótidos, como mínimo, aproximadamente del 75% y da lugar a un producto (composición que comprende una partícula de tipo viral empaquetada con oligonucleótido) que de manera habitual y preferente es, como mínimo, del 99% de pureza.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

50 El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente como información.

La presente invención se refiere a un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral. Durante dicho proceso, dicha partícula de tipo viral se forma mediante un autoensamblaje de la proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN en presencia de un oligonucleótido. De manera sorprendente, se ha descubierto que la eficacia del proceso se puede mejorar de manera significativa cuando el autoensamblaje de la proteína de cubierta se realiza en presencia de oligonucleótido agregado. De manera general, los oligonucleótidos que comprenden, como mínimo, un tramo de poli G son capaces de la agregación. El estado de agregación de un oligonucleótido se puede caracterizar mediante el tiempo de inicio del pico relativo en HPLC de exclusión por tamaño utilizando la cápside de dicho bacteriófago de ARN como patrón. Se ha descubierto que el oligonucleótido que comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, de manera preferente del 80 al 95%, es óptimo. Esto corresponde a agregados de oligonucleótidos que comprenden un peso molecular aparente que está en el intervalo del peso molecular aparente de la cápside de dicho bacteriófago de ARN o ligeramente inferior. Se ha descubierto que el oligonucleótido que comprende el tiempo de inicio del pico relativo deseado se puede obtener sometiendo dicho

oligonucleótido a un proceso de agregación.

De este modo, un primer aspecto de la presente invención es un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer un oligonucleótido en una solución II, en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y en el que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8; y en el que dicha solución II comprende un catión, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, en el que dicho catión se selecciona, de manera preferente, del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (b) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en el que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; y (c) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en el que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (d) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en el que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en el que dichas etapas se realizan, de manera preferente, en el orden indicado.

El autoensamblaje de dicha proteína de cubierta es más eficaz cuando la preparación de oligonucleótidos comprende agregados que comprenden el tamaño óptimo de partícula y una distribución estrecha de tamaños. Adicionalmente, de manera sorprendente, se ha descubierto que el estado de agregación del oligonucleótido se puede controlar de manera más eficaz y que se obtienen preparaciones de oligonucleótidos con una distribución más estrecha de tamaños, cuando el oligonucleótido se somete a una etapa de disgregación previa a la etapa de agregación. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

De este modo, un segundo aspecto de la presente invención es un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer un oligonucleótido en la solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino; (b) disgregar dicho oligonucleótido, en el que dicha disgregación comprende las etapas de: (i) ajustar la temperatura de la solución I a la temperatura I, en la que dicha temperatura I es de 4 a 70°C; (ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo por encima del 110%; y (iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70°C; (c) ajustar el pH de dicha solución I al pH de 5 a 8; y (d) agregar dicho oligonucleótido, en el que dicha agregación comprende las etapas de: (i) disponer dicho oligonucleótido en la solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y un catión, en la que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, y en la que, de manera preferente, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (ii) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en la que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; (iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (iv) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en la que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en el que dichas etapas se realizan, de manera preferente, en el orden indicado. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Se da a conocer una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicha composición de nucleótidos es obtenible mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente, en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende un tiempo inicial del pico relativo del 50 al 110%. Dicha composición de nucleótidos puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Además, se da a conocer un proceso para producir una composición, en el que dicha composición comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicha composición de nucleótidos es una composición de nucleótidos obtenible mediante cualquiera de los procesos del primer y el segundo aspecto de la presente invención; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Un quinto aspecto de la presente invención es un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer de un oligonucleótido, (i) en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G;

y (ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Un sexto aspecto de la presente invención es un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer de un oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicha disposición las etapas de: (i) disponer un oligonucleótido en la solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y un catión, en la que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, y en la que, de manera preferente, dicho catión se selecciona del grupo que comprende Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (ii) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en la que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; y (iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (iv) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en la que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en la que las etapas (i) a (iv) se realizan, de manera preferente, en el orden indicado; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Un séptimo aspecto de la presente invención es un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer de un oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicha disposición las etapas de: (i) disponer un oligonucleótido en la solución I, en la que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y en la que dicha solución I comprende un pH alcalino; (ii) disgregar dicho oligonucleótido, en la que dicha disgregación comprende las etapas de: (1) ajustar la temperatura de la solución I a la temperatura I, en la que dicha temperatura I es de 4 a 70°C; (2) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo por encima del 110%; y (3) ajustar la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70°C; (iii) ajustar el pH de dicha solución I al pH de 5 a 8; y (iv) agregar dicho oligonucleótido, en la que dicha agregación comprende las etapas de: (1) disponer dicho oligonucleótido en la solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y un catión, en la que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, y en la que, de manera preferente, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (2) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en la que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; (3) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (4) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en la que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en la que dichas etapas se realizan, de manera preferente, en el orden indicado; (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

Además, se da a conocer la utilización de una composición de nucleótidos, en la que dicha composición de nucleótidos es obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención, en un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral.

Además, se da a conocer una composición obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención, comprendiendo dicha composición (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN es Q β , y en la que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G8-8 (SEC ID NO:6) o G10 (SEC ID NO:8), de manera preferente, G10 (SEC ID NO:8), y en la que, de manera aún más preferente, la pureza de dicha composición es, como mínimo, del 98%, de manera más preferente, como mínimo, del 99%, y de la manera más preferente, como mínimo, del 99,2%.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Cromatograma de HPLC de exclusión por tamaño del patrón de la cápside de Q β (parte superior) y G10 agregado (parte inferior). Se realizó una HPLC tal como se describe en el ejemplo 4. El tiempo de retención del patrón fue de 8,532 minutos, el tiempo de inicio del pico del G10 agregado fue de 7,510 minutos. De este modo, el tiempo de inicio del pico relativo del G10 agregado fue del 88% (7,510 minutos/8,532 min * 100).

Figura 2: Cromatograma de HPLC de exclusión por tamaño de G10 no tratado, oligonucleótido G10 agregado y patrón de cápside de Q β . Se realizó una HPLC tal como se describe en el ejemplo 4. (A) El G10 agregado que no se sometió a un tratamiento de disgregación antes de la agregación mostró un peso molecular aparente equivalente o superior al de la cápside de Q β (A, recuadro 2). El tiempo de inicio del pico relativo fue aproximadamente del 75%. (B) El G10 agregado que antes de la agregación se sometió a un tratamiento de disgregación, tal como se describe en el ejemplo 1, mostró un peso molecular aparente inferior al de la cápside de Q β (B, recuadro 2). El tiempo de inicio del pico relativo fue aproximadamente del 88%.

Figura 3: Espectros CD de oligonucleótido no tratado, disgregado y agregado y VLP reensamblada empaquetada con G10. Se registraron los espectros utilizando concentraciones de oligonucleótido de 22,5 μ M y posteriormente se normalizaron. Para la normalización, se calculan las elipcidades según $\Theta = 100 \times \text{señal de CD} [\text{mdeg}]/L [\text{cm}] \times c [\text{mM}]$.

Figura 4: Caracterización de proteína de cubierta de Q β purificada mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño. (A) Muestra de VLP de Q β purificada. El pico observado (proporción A260/A280 = 2) está dominado por el núcleo de ARN de la VLP, ya que el coeficiente de absorción de ARN a 260 nm es aproximadamente 100 veces superior al coeficiente de absorción de la proteína de cubierta. (B) Muestra del sobrenadante de la reacción de desensamblaje. La proteína de cubierta liberada se indica mediante la presencia del pico de tipo proteína a aproximadamente 12 minutos. Además, están presentes varias especies de moléculas de ARN no precipitadas en el intervalo de 6,8 a 11 minutos. (C) Muestra de la proteína de cubierta de Q β purificada. El análisis se realizó en PBS en una columna TSK G5000PWx1 (Tosoh Bioscience).

Figura 5: Cromatografía analítica de exclusión por tamaño de (A) VLP de Q β nativa, (D) VLP de Q β G10 y los componentes de empaquetamiento (B) oligonucleótido G10 y (C) proteína de cubierta de Q β . El pico observado para VLP de Q β G10 (D) (proporción A260/A280 = 1,74) está dominado por el núcleo de G10 de la VLP, ya que el coeficiente de absorción de G10 a 260 nm es aproximadamente 130 veces superior al coeficiente de absorción de la proteína de cubierta. El análisis se realizó en PBS en una columna TSK G5000PWx1 (Tosoh Bioscience).

Figura 6: Análisis SDS-PAGE no redactor de VLP de Q β y Q β G10 ensamblado in vitro. Se indica la posición de los pentámeros y hexámeros de la proteína de cubierta ((a) marcador de peso molecular, (b) VLP de Q β , (c) Q β G10).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las definiciones y realizaciones descritas a continuación son aplicables, a menos que se indique explícitamente lo contrario, a cualquiera de los aspectos, y realizaciones, en particular procesos, composiciones, composiciones de nucleótidos y utilizaciones de la presente invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que lo entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

"oligonucleótido": El término oligonucleótido, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un desoxirribonucleótido de cadena sencilla. Un oligonucleótido preferente comprende, como mínimo, un tramo de poli G tal como se define a continuación. Los oligonucleótidos más preferentes comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de dichos tramos de poli G. Los oligonucleótidos muy preferentes comprenden exactamente dos tramos de poli G, en los que, de manera preferente, uno de dichos dos tramos de poli G se localiza en el extremo 5' o en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. Los oligonucleótidos incluso más preferentes comprenden exactamente dos tramos de poli G, en los que uno de dichos dos tramos de poli G se localiza en el extremo 5' de dicho oligonucleótido y uno de dichos dos tramos de poli G se localiza en el extremo 3' de dicho oligonucleótido. De manera habitual y preferente, un oligonucleótido, tal como se utiliza en el presente documento, consiste en 6 a 1000, de manera preferente, de 10 a 1000, de manera más preferente, de 10 a 200, de manera aún más preferente, de 10 a 100, de manera aún más preferente, de 20 a 40, y de la manera más preferente 30 nucleótidos. Los oligonucleótidos más preferentes consisten en 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 nucleótidos. Los oligonucleótidos aún más preferentes consisten en de 24 a 32 nucleótidos, de manera más preferente aproximadamente 30 nucleótidos.

El término oligonucleótido también se refiere a moléculas que comprenden, como mínimo, un nucleótido modificado, en las que, de manera preferente, dicho nucleótido modificado se selecciona entre (a) un análogo de nucleótido o (b)

un nucleótido que comprende una modificación del esqueleto. En una realización, el oligonucleótido comprende, como mínimo, un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en (a) ácido nucleico para péptido, (b) inosina, (c) bases tritiladas, (d) fosforotioatos, (e) alquilfosforotioatos, (f) 5-nitroindol desoxirribofuranosilo, (g) 5-metildesoxicitosina y (h) 5,6-dihidro-5,6-dihidrodesoxitimidina. En una realización adicional, el oligonucleótido comprende o, de manera alternativa, consiste en nucleótidos fosfotiolados. Los nucleótidos fosfotiolados protegen contra la degradación en una célula o un organismo y, por lo tanto, son modificaciones preferentes de nucleótidos. Las formas de polinucleótidos más preferentes son formas de polinucleótidos modificadas de forma química, enzimática o metabólica, tal como se encuentran habitualmente en la naturaleza. Sin embargo, los oligonucleótidos preferentes consisten, de manera exclusiva, en nucleótidos no modificados, es decir, de adenosina, timidina, guanosina y/o citidina. Los oligonucleótidos aún más preferentes consisten, de manera exclusiva, en nucleótidos unidos a fosfodiéster.

Los oligonucleótidos muy preferentes son oligonucleótidos que contienen CpG no metilados que comprenden, como mínimo, uno, de manera preferente uno, dos, tres o cuatro motivos de CpG. Los oligonucleótidos aún más preferentes comprenden una secuencia palindrómica, en los que, de manera preferente, dicha secuencia palindrómica comprende, como mínimo, uno, de manera preferente, uno, dos, tres o cuatro motivos de CpG. Los oligonucleótidos aún más preferentes comprenden una secuencia palindrómica, en los que, de manera preferente, dicha secuencia palindrómica comprende o, de manera preferente, consiste en la secuencia GACGATCGTC (SEC ID NO:1). Los oligonucleótidos aún más preferentes comprenden una secuencia palindrómica, en los que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5' por un tramo de poli G y en los que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3' por un tramo de poli G, en los que, de manera preferente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1). Los oligonucleótidos muy preferentes comprenden una secuencia palindrómica, en los que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5', como mínimo, por 3 a 10, de manera preferente, por 4 a 10 grupos guanosina y en los que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3', como mínimo, por 3 a 10, de manera preferente, por 4 a 10 grupos guanosina, en los que, de manera preferente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1).

"tramo de poli G": El término tramo de poli G se refiere a un segmento de un oligonucleótido, en el que dicho segmento consiste, como mínimo, en 3 residuos de guanosina consecutivos. Los tramos de poli G preferentes consisten de 3 a 25, de manera preferente de 4 a 20, de manera más preferente de 4 a 15 y de la manera más preferente de 4 a 10 grupos guanosina consecutivos. Los tramos de poli G más preferentes consisten en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 grupos guanosina consecutivos.

"motivo de CpG": Tal como se utiliza en el presente documento, el término "motivo de CpG" se refiere a una secuencia corta de ADN, de manera preferente una secuencia de ADN de cadena sencilla, que comprende un dinucleótido de citosina (C) – guanosina (G), en el que C no está metilado y en el que, de manera preferente, dicho dinucleótido está unido a fosfodiéster. De manera preferente, un motivo de CpG comprende, como mínimo, uno, de manera preferente, uno, dos o tres nucleótidos 5' y/o 3' adicionales de dicho dinucleótido de CG, en el que, de manera más preferente, dichos nucleótidos adicionales no comprenden un dinucleótido de CG.

"tiempo de inicio del pico relativo": El término "tiempo de inicio del pico relativo" es un parámetro que es indicativo del estado de agregación de un oligonucleótido. El tiempo de inicio del pico relativo de un oligonucleótido se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño analítica con los siguientes parámetros:

Columna:	TSKgel 5000 PWXL 7,8 mm * 30,0 cm (Lote: 5PWX06GNMH3304, Artículo: 08023, Tosoh Bioscience)
Eluyente:	PBS (NaCl 150 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2)
Volumen de inyección:	40,0 µl (de manera preferente, que comprende una concentración de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 500 µM)
Caudal:	0,8 ml/min
Gradiente:	Isocrático
Tiempo de desarrollo:	20 min
Longitud de onda:	215, 260 y 280 nm, evaluación de los datos a 260 nm
Temperatura del horno de la columna:	25°C
Temperatura de automuestreo:	8°C;

y en la que la cápside de dicho bacteriófago de ARN se utiliza como patrón. El tiempo de inicio del pico relativo X% de dicho oligonucleótido en relación con la cápside de dicho bacteriófago de ARN se calcula de la siguiente manera: $X\% = \text{tiempo de inicio del pico [min]} \text{ del oligonucleótido dividido por el tiempo de retención del patrón [min]} \times 100\%$, en el que el tiempo de inicio del pico del oligonucleótido se determina como el tiempo cuando la elución del oligonucleótido es detectable y en el que el tiempo de retención del patrón se determina como el tiempo de aparición del pico máximo de dicho patrón. De este modo, en una realización en la que dicho bacteriófago de ARN es, por ejemplo, el bacteriófago AP205, se utiliza la cápside de AP205 como patrón en dicha HPLC y el tiempo de inicio de pico relativo se calcula en relación a dicho patrón de AP205. De manera destacada, en realizaciones que no se refieren a un bacteriófago de ARN, el tiempo de inicio del pico relativo siempre se determina mediante la utilización de la cápside del bacteriófago Qβ como patrón. Además, en caso de cualquier duda con respecto a la elección del

patrón apropiado en dicha HPLC, se utiliza la cápside del bacteriófago Q β como patrón y se determina el tiempo de inicio del pico relativo en relación a dicha cápside del bacteriófago Q β . De este modo, en una realización muy preferente, dicho tiempo de inicio del pico relativo se determina mediante dicha HPLC, en la que, de manera preferente, dicho patrón es la cápside del bacteriófago Q β , y en la que, de manera más preferente, dicho tiempo de inicio del pico relativo se determina en relación con dicha cápside del bacteriófago Q β .

"empaquetado": El término "empaquetado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al estado de un oligonucleótido, en relación con la partícula de tipo viral. La utilización de los términos "oligonucleótido empaquetado en VLP" o "VLP empaquetada con el oligonucleótido" es equivalente. El término "empaquetado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una unión no covalente, de manera preferente, a interacciones iónicas, interacciones hidrófobas o enlaces de hidrógeno. De manera muy preferente, el término "empaquetado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inclusión, o inclusión parcial, de dicho oligonucleótido en la VLP. Por ejemplo, el oligonucleótido, de manera preferente, el oligonucleótido que comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, puede estar incluido por la VLP sin la existencia de una unión real, ni covalente ni no covalente, o con una unión no covalente. De manera habitual y preferente, una VLP empaquetada con un oligonucleótido protege dicho oligonucleótido de la degradación, de manera preferente, de la hidrólisis con ADNasa. Por lo tanto, en el significado preferente, el término "empaquetado" indica que el oligonucleótido en un estado empaquetado no es accesible a la hidrólisis con ADNasa. De manera más preferente, el término "empaquetado" indica que el oligonucleótido no es accesible a la hidrólisis con ADNasa, en la que, de manera más preferente, la ADNasa es ADNasa o Benzonasa. De manera aún más preferente, el término "empaquetado" indica que el oligonucleótido no es accesible a la hidrólisis con Benzonasa.

La accesibilidad del oligonucleótido para la ADNasa (por ejemplo, ADNasa o Benzonasa) se analiza, de manera preferente, tal como se describe en los ejemplos 11-17 del documento W02003/024481A2 (véase pág. 111 en el mismo). En un significado preferente, una VLP se considera empaquetada con un oligonucleótido, cuando después del tratamiento con Benzonasa (190 U Benzonasa/mg de proteína de cubierta en un tampón que comprende MgCl₂ 2 mM, pH 7,2, 20-25°C, 18 h), como mínimo, el 90%, de manera preferente, como mínimo, el 95%, de la manera más preferente, como mínimo, el 98% de dicho oligonucleótido se puede recuperar de dicha VLP (por ejemplo, en gel teñido con bromuro de etidio). Es evidente para el experto que dichos ensayos requieren controles apropiados y pueden necesitar adaptarse a la combinación específica de VLP y oligonucleótido. En un significado más preferente, un oligonucleótido se considera empaquetado en una VLP de un bacteriófago de ARN, cuando después del tratamiento con Benzonasa (190 U Benzonasa/mg de proteína de cubierta en un tampón que comprende MgCl₂ 2 mM, pH 7,2, 20-25°C, 18 h), como mínimo, el 90%, de manera preferente, como mínimo, el 95%, de la manera más preferente, como mínimo, el 98% de dicho oligonucleótido se puede recuperar de dicha VLP de un bacteriófago de ARN. En un significado muy preferente, el oligonucleótido G10 (SEC ID NO:8) se considera empaquetado en una VLP de un bacteriófago de ARN, cuando después del tratamiento con Benzonasa (190 U Benzonasa/mg de proteína de cubierta en un tampón que comprende MgCl₂ 2 mM, pH 7,2, 20-25°C, 18 h), como mínimo, el 90%, de manera preferente, como mínimo, el 95%, de la manera más preferente, como mínimo, el 98% de dicho G10 se puede recuperar de dicha VLP. En un significado más específico, el oligonucleótido G10 (SEC ID NO:8) se considera empaquetado en una VLP de un bacteriófago de ARN Q β , AP205, GA o fr, cuando después del tratamiento con Benzonasa (190 U Benzonasa/mg de proteína de cubierta en un tampón que comprende MgCl₂ 2 mM, pH 7,2, 20-25°C, 18 h), como mínimo, el 90%, de manera preferente, como mínimo, el 95%, de la manera más preferente, como mínimo, el 98% de dicho G10 se puede recuperar de dicha VLP de un bacteriófago de ARN. En un significado muy específico, el oligonucleótido G10 (SEC ID NO:8) se considera empaquetado en una VLP de un bacteriófago de ARN Q β , cuando después del tratamiento con Benzonasa (190 U Benzonasa/mg de proteína de cubierta en un tampón que comprende MgCl₂ 2 mM, pH 7,2, 20-25°C, 18 h), como mínimo, el 90%, de manera preferente, como mínimo, el 95%, de la manera más preferente, como mínimo, el 98% de dicho oligonucleótido que contiene CpG no metilado se puede recuperar de dicha VLP del bacteriófago de ARN Q β .

"proteína de cubierta": Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína de cubierta" se refiere a la proteína o proteínas de un bacteriófago de ARN capaz de incorporarse en el ensamblaje de la cápside del bacteriófago o el bacteriófago de ARN. De este modo, el término proteína de cubierta se refiere a la proteína que forma la cápside de un bacteriófago de ARN o una VLP de un bacteriófago de ARN. De manera habitual y preferente, la proteína de cubierta de bacteriófagos de ARN tiene una estructura dimérica.

"fragmento de una proteína de cubierta (recombinante)", en particular un fragmento de una proteína de cubierta recombinante, tal como se utiliza en el presente documento, se define como un polipéptido, que tiene, como mínimo, el 70%, de manera preferente, como mínimo, el 80%, de manera más preferente, como mínimo, el 90%, incluso de manera más preferente, como mínimo, el 95% de la longitud de la proteína de cubierta de tipo salvaje, o la proteína recombinante de tipo salvaje, respectivamente, y que, de manera preferente, mantiene la capacidad de formar la VLP. De manera preferente, el fragmento se obtiene mediante, como mínimo, una eliminación interna, como mínimo, un truncamiento o, como mínimo, una combinación de los mismos. El término "fragmento de una proteína de cubierta recombinante" o "fragmento de una proteína de cubierta" comprenderá además un polipéptido, que tiene, como mínimo, el 80%, de manera preferente, el 90%, incluso de manera más preferente, el 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la proteína de cubierta de tipo salvaje, respectivamente, y que, de manera preferente,

es capaz de ensamblarse en una partícula de tipo viral. El término "proteína de cubierta mutante" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la proteína recombinante de tipo salvaje, o la proteína de cubierta, en el que la secuencia de aminoácidos es idéntica, como mínimo, en el 80%, de manera preferente, como mínimo, el 85%, 90%, 95%, 97% o 99% con la secuencia de tipo salvaje y, de manera preferente, mantiene la capacidad de ensamblarse en una VLP.

"partícula de tipo viral (VLP)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una partícula de virus no replicativa o no infecciosa, de manera preferente una partícula de virus no replicativa y no infecciosa, o se refiere a una estructura parecida a una partícula de virus no replicativa o no infecciosa, de manera preferente una estructura parecida a una partícula de virus no replicativa y no infecciosa, de manera preferente, una cápside de un virus. El término "no replicativa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a ser incapaz de replicar el genoma comprendido por la VLP. El término "no infecciosa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a ser incapaz de entrar en la célula huésped. De manera preferente, una partícula de tipo viral, según la presente invención, es no replicativa y/o no infecciosa, ya que carece de todo o parte del genoma viral o función del genoma. En una realización, una partícula de tipo viral es una partícula de virus, en la que el genoma viral se ha desactivado de manera física o química, se ha extraído mediante desensamblaje y reensamblaje, o mediante el ensamblaje de proteínas purificadas en una VLP. De manera habitual y más preferente, una partícula de tipo viral carece de todos o parte de los componentes replicativos e infecciosos del genoma viral. Una partícula de tipo viral, según la presente invención, puede contener ácido nucleico distinto de su genoma. Una realización habitual y preferente de una partícula de tipo viral, según la presente invención, es una cápside viral, tal como la cápside viral del correspondiente virus, bacteriófago, de manera preferente, bacteriófago de ARN. El término "cápside" se refiere a un ensamblaje macromolecular compuesto de subunidades de proteína viral. De manera habitual, existen 60, 120, 180, 240, 300, 360 y más de 360 subunidades de proteína viral. De manera habitual y preferente, las interacciones de estas subunidades conducen a la formación de cápside viral con una organización repetitiva inherente, en la que dicha estructura, de manera habitual y preferente, es esférica. Por ejemplo, las cápsides de bacteriófagos de ARN tienen una forma esférica de simetría icosaédrica.

"partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN": Tal como se utiliza en el presente documento, el término "partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN" se refiere a una partícula de tipo viral que comprende, o de manera preferente, consiste esencialmente o consiste en proteínas de cubierta, mutantes o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN. Además, la partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN se parece a la estructura de un bacteriófago de ARN, es replicativa y/o no infecciosa, y carece, como mínimo, del gen o genes que codifican la maquinaria de replicación del bacteriófago de ARN, y, de manera habitual, también carece del gen o genes que codifican la proteína o proteínas responsables de la unión viral al huésped o la entrada en el mismo. Las VLP preferentes derivadas de bacteriófagos de ARN muestran simetría icosaédrica y consisten en 180 subunidades. En el contexto de la presente invención, el término partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, de manera preferente, se refiere a una estructura macromolecular obtenida mediante el autoensamblaje de proteína de cubierta recombinante de un bacteriófago de ARN, o fragmentos o mutantes de la misma, en la que, de manera preferente, dicho autoensamblaje tuvo lugar en presencia de un oligonucleótido.

"agente capaz de evitar el autoensamblaje de proteína de cubierta": Un agente capaz de evitar el autoensamblaje de proteína de cubierta es un agente que evita la formación espontánea de partículas de tipo viral en dicha mezcla. El experto es capaz de determinar de manera experimental la naturaleza química y la concentración apropiada de dicho agente, por ejemplo, mediante el análisis de dicha mezcla mediante cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describe en el ejemplo 9. Un agente es capaz de evitar el autoensamblaje de proteína de cubierta cuando después de la incubación de dicha mezcla durante, como mínimo, 1 hora a temperatura ambiente, de manera preferente, a 22°C, no se detectan partículas de tipo viral mediante la cromatografía de exclusión por tamaño descrita en el ejemplo 9. Sin embargo, un agente que es capaz de evitar el autoensamblaje de la proteína de cubierta, no modifica de manera irreversible dicha proteína de cubierta y la eliminación de dicho agente de dicha mezcla dará lugar a la formación espontánea de partículas de tipo viral. Los agentes preferentes capaces de evitar el autoensamblaje de la proteína de cubierta comprenden detergentes, clorhidrato de guanidinio y urea, de la manera más preferente urea. Los detergente preferentes son dodecilsulfato sódico, Tween 20, TritonX 100 y similares. De manera habitual y preferente, los agentes capaces de evitar el autoensamblaje de la proteína de cubierta comprenden además un agente reductor que mantiene enlaces disulfuro intermoleculares formados por los residuos de cisteína de dicha proteína de cubierta en un estado reducido.

"rendimiento de proteína": El rendimiento de proteína de un proceso de la presente invención se determina como la cantidad de proteína de cubierta recuperada como partícula de tipo viral después de la última etapa de dicho proceso en relación con la cantidad de proteína de cubierta contenida en dicha mezcla, en el que, de manera preferente, la cantidad de dicha proteína de cubierta se determina mediante en el ensayo de proteínas de Bradford. De manera habitual y preferente, como mínimo, el 70%, de manera preferente, como mínimo, el 75%, de la proteína de cubierta contenida en dicha mezcla se recupera como partícula de tipo viral después de la etapa final de dicho proceso, en el que, de manera preferente, dicha etapa final es dicha filtración de forma estéril.

"rendimiento de oligonucleótido": El rendimiento de oligonucleótido de un proceso de la presente invención se determina como la cantidad de oligonucleótido que se puede recuperar de dicha partícula de tipo viral después de la

última etapa de dicho proceso en relación con la cantidad de dicho oligonucleótido contenido en dicha mezcla, en el que, de manera preferente, la cantidad de dicho oligonucleótido recuperado de dicha partícula de tipo viral se determina, de manera esencial o preferente, exactamente tal como se describe en el ejemplo 9. De manera habitual y preferente, como mínimo, el 70%, de manera preferente, como mínimo, el 75%, del oligonucleótido contenido en dicha mezcla se recupera de dicha partícula de tipo viral después de la etapa final de dicho proceso, en el que, de manera preferente, dicha etapa final es dicha filtración de forma estéril.

"pureza": La pureza de una composición de la presente invención que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño analítica, en la que dicha HPLC se realiza bajo condiciones esencialmente, de manera preferente, exactamente tal como se describe en el ejemplo 4. La pureza de dicha composición se determina como el porcentaje del área del pico de dicha partícula de tipo viral contenida en dicha composición en relación con el área total de los picos del mismo cromatograma. De manera habitual y preferente, la pureza de una composición de la presente invención es, como mínimo, del 98%, de manera preferente, como mínimo, del 99%.

"uno/a", "un/una": Cuando los términos "uno/a" "un" o "una" se utilizan en este documento, significan "como mínimo uno/a" o "uno/a o más", a menos que se indique lo contrario.

"aproximadamente": en el significado de la presente solicitud, la expresión "aproximadamente" tendrá el significado de +/- 10%. Por ejemplo, aproximadamente 100 significará de 90 a 110.

La presente invención da a conocer procesos para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido agregado. Con más detalle, la presente invención da a conocer un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer un oligonucleótido en una solución II, en el que dicho oligonucleótido comprende, de manera preferente, en su extremo 5', como mínimo, 3 grupos guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 3 grupos guanosina; y en el que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8; y en el que dicha solución II comprende un catión, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, en el que dicho catión se selecciona, de manera preferente, del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (b) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en el que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; y (c) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en el que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (d) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en el que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en el que dichas etapas se realizan, de manera preferente, en el orden indicado. Todas las realizaciones descritas a continuación son aplicables a este proceso en cualquier combinación.

Tal como se ha mencionado anteriormente, se descubrió que es ventajoso someter dicho oligonucleótido a una etapa de disgregación antes de dicha etapa de agregación, en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido está completamente disgregado. La disgregación completa del oligonucleótido significa que el peso molecular aparente del oligonucleótido en la HPLC de exclusión por tamaño, de manera preferente, llevada a cabo, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 4, corresponde al peso molecular que se puede derivar de la secuencia de dicho oligonucleótido. De este modo, la presente invención da a conocer además un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer un oligonucleótido en la solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino; (b) disgregar dicho oligonucleótido, en el que dicha disgregación comprende las etapas de: (i) ajustar la temperatura de la solución I a la temperatura I, en la que dicha temperatura I es de 4 a 70°C; (ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo por encima del 110%; y (iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70°C; (c) ajustar el pH de dicha solución I al pH de 5 a 8; y (d) agregar dicho oligonucleótido, en el que dicha agregación comprende las etapas de: (i) disponer dicho oligonucleótido en la solución II, en el que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y un catión, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho catión en dicha solución II es, como mínimo, 20 mM, y en el que, de manera preferente, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; (ii) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en el que dicha temperatura III es de 50 a 99°C; (iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en el que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y (iv) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en el que dicha temperatura IV es inferior a 50°C; en el que dichas etapas se realizan, de manera preferente, en el orden indicado.

La disgregación del oligonucleótido no tratado que puede comprender oligonucleótido agregado de manera parcial tiene lugar a pH alcalino. El proceso de disgregación se puede facilitar mediante temperatura elevada.

De este modo, en una realización, la solución I comprende un pH de 8 a 13, de manera preferente de 10 a 13, de la

manera más preferente 12. La solución I puede comprender cualquier tampón o agente conocido en la técnica que permita ajustar el pH ente 8 y 13. En una realización preferente, la solución I comprende hidróxido, de manera preferente, un hidróxido metálico, de la manera más preferente un hidróxido de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, de manera preferente, un hidróxido de un metal alcalino. En una realización preferente, dicho

5 hidróxido es hidróxido de potasio o hidróxido de sodio, de la manera más preferente, hidróxido de sodio. En una realización, la concentración de dicho hidróxido, de manera preferente, de dicho hidróxido de sodio, en dicha solución I es de 10 mM a 200 mM, de manera más preferente, aproximadamente 25 mM, de la manera más preferente, 25 mM.

10 Para evitar la degradación del oligonucleótido, la temperatura I, de manera preferente, no supera los 90°C, la temperatura I no supera los 70°C. En una realización, la temperatura I es temperatura ambiente, de manera preferente, de 19 a 25°C. En otra realización, la temperatura I es de 4 a 70°C, de manera preferente, de 20 a 70°C, de manera más preferente, 45 a 70°C, de manera preferente, aproximadamente 50°C, y de la manera más preferente, 50°C. En una realización preferente, dicha incubación de dicho oligonucleótido en dicha solución I a

15 dicha temperatura I se realiza hasta que dicho oligonucleótido está completamente disgregado. En otra realización, dicha incubación de dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I se realiza hasta que el tiempo de inicio del pico relativo de dicho oligonucleótido es superior al 110%, de manera preferente, superior al 130% y de la manera más preferente, superior al 135%. En una realización adicional, dicha incubación de dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I se realiza durante 30 a 190 minutos, de manera preferente, durante 50 a 90

20 minutos, de la manera más preferente, durante 70 minutos.

En una realización más preferente, la concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución I es de 50 μ M a 2 mM, de manera preferente, de 50 a 500 μ M, de manera más preferente, de 200 a 300 μ M, y de la manera más preferente, 260 μ M.

25 La disgregación del oligonucleótido se puede terminar mediante la neutralización o la acidificación de la solución I y/o la reducción de la temperatura. De este modo, dicho proceso comprende además la etapa de ajustar el pH de dicha solución I a pH 8 o inferior, de manera preferente, a pH de 5 a 8. En una realización preferente, dicho ajuste del pH se realiza hasta que dicho pH es de 6 a 7, de la manera más preferente, hasta que dicho pH es

30 aproximadamente 6. En una realización adicional, dicho ajuste del pH de dicha solución I se realiza mediante la adición de ácido a dicha solución I. Para este objetivo se puede utilizar cualquier ácido mineral u orgánico conocido en la técnica. En una realización preferente, dicho ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico; ácido clorhídrico; y ácidos orgánicos, en el que dichos ácidos orgánicos se seleccionan, de manera preferente, entre ácido fórmico, ácido acético y ácido cítrico. En una realización preferente, dicho ácido es un ácido mineral. De

35 manera preferente, dicho ácido es ácido fosfórico o ácido clorhídrico, de la manera más preferente, ácido fosfórico.

Dicho proceso comprende además ajustar la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, en el que, de manera preferente, dicha temperatura II es de 0 a 70 °C y, en el que, de manera preferente, dicha temperatura II es inferior a la temperatura I. En una realización preferente, dicha temperatura II es de 0 a 25°C, de manera preferente,

40 de 0 a 10°C y de la manera más preferente, de 0 a 2°C.

El proceso comprende además la etapa de agregar dicho oligonucleótido. La agregación del oligonucleótido se consigue mediante la incubación de dicho oligonucleótido a aproximadamente pH neutro en una solución que comprende cationes capaces de ayudar en la formación de estructuras de ADN de G-cuádruplex (véase, Simonsson

45 T., BioL Chem. 382: 621-628) y a una temperatura por encima de 50°C. De este modo, en una realización, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Li^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Mg^{2+} . En una realización preferente, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} , y Mg^{2+} , de manera más preferente, dicho catión es Na^+ o K^+ , de la manera más preferente, dicho catión es Na^+ . En una

50 realización muy preferente, la concentración

En una realización preferente, la solución II que comprende dicho oligonucleótido se obtiene mediante la adición de dicho catión a dicha solución I, en la que, de manera preferente, dicha adición se realiza después de dicho ajuste del pH de la solución I.

55 En una realización adicional, dicha solución II es una mezcla de cualquier catión seleccionado del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Li^+ , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Mg^{2+} . En una realización adicional, dicha solución II es una mezcla de cualquier catión seleccionado del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En una realización muy preferente, dicha mezcla comprende o, de manera preferente, consiste en Na^+ y K^+ .

60 En una realización preferente, dicha solución II comprende, como mínimo, 20 mM, de manera preferente, como mínimo, 100 mM, de manera más preferente, de 200 a 275 mM, y de la manera más preferente, 250 mM de dicho catión o de dicha mezcla de cationes. En una realización muy preferente, dicha solución II comprende 250 mM de Na^+ y K^+ , de la manera más preferente, 250 mM de Na^+ . En una realización aún más preferente, dicha solución II comprende 250 mM de cloruro de sodio o cloruro de potasio, de la manera más preferente, 250 mM de cloruro de

65 sodio. Sin embargo, para este objetivo, se puede utilizar cualquier sal de sodio, potasio, amonio, litio, calcio o magnesio conocida en la técnica.

En una realización adicional, la concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución II es de 50 μ M a 2 mM, de manera preferente, de 100 a 300 μ M, de la manera más preferente, 175 μ M.

- 5 En una realización adicional, dicho proceso comprende además ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en el que dicha temperatura III es de 50 a 99°C, de manera preferente, de 80 a 90°C, de manera más preferente, aproximadamente 85°C, y de la manera más preferente, 85°C.

- 10 En una realización adicional, dicho proceso comprende incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en el que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, de manera preferente, del 80 al 95%, de manera más preferente, del 80 al 90%, de manera aún más preferente, del 83 al 90%, de manera aún más preferente, del 85 al 90%, y de la manera más preferente, del 88%. En una realización muy preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8) y dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%,
15 de manera preferente, del 80 al 95%, de manera más preferente, del 80 al 90%, de manera aún más preferente, del 83 al 90%, de manera aún más preferente, del 85 al 90%, y de la manera más preferente, del 88%.

- El tiempo de incubación requerido para obtener un oligonucleótido que comprende el tiempo de inicio del pico relativo depende de la secuencia y de la pureza del oligonucleótido y varía, de manera habitual y preferente, desde
20 aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En una realización preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO: 8) y dicha incubación de dicho oligonucleótido en dicha solución II a dicha temperatura III se realiza durante 9 a 24 minutos.

- El proceso de agregación se detiene mediante el enfriamiento de la solución II por debajo de 50°C. En una
25 realización preferente, dicho proceso comprende ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en el que dicha temperatura IV es inferior a 50°C, y en el que, de manera preferente, dicha temperatura IV es de 0 a 25°C, de manera más preferente, de 0 a 10°C, y de la manera más preferente, de 0 a 2°C.

- Se ha descubierto que las velocidades de calentamiento y/o enfriamiento aplicadas en el proceso de la presente invención presentan un impacto en el rendimiento y la distribución del tamaño de partícula del oligonucleótido
30 agregado obtenido. En particular, se descubrió en el transcurso del escalado del proceso a volúmenes de lotes más grandes, que el rendimiento y la distribución del tamaño de partícula se pueden mejorar adicionalmente mediante la utilización de rampas de temperaturas (es decir, velocidades de calentamiento o enfriamiento), como mínimo, de 3,6°C/min. El experto puede conseguir una rampa de temperaturas definida mediante la estandarización de las
35 condiciones del proceso con respecto al volumen de reacción, la geometría y la conductividad térmica del recipiente de reacción y la diferencia de temperatura escogida. En una realización preferente, dicho ajuste de la temperatura de la solución I a la temperatura I, dicho ajuste de la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura III, y/o dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura IV, se realizan con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6°C/min. En una realización más
40 preferente, dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura III se realiza con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6°C/min, en el que, de manera preferente, dicha rampa de temperaturas es aproximadamente de 7°C/min. En una realización más preferente, dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura IV se realiza con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6°C/min, en el que, de manera preferente, dicha rampa de temperaturas es aproximadamente de 7°C/min.

- A efectos de poder formar agregados, dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, uno, de manera preferente, dos tramos de poli G. En una realización preferente, dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como
45 mínimo, 3, de manera preferente, como mínimo, 4 grupos guanosina y en su extremo 3', como mínimo 3, de manera preferente, como mínimo, 4 grupos guanosina. En una realización más preferente, dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como mínimo, 4 grupos guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 4 grupos guanosina. En una
50 realización preferente, dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como mínimo, 3 y, como máximo, 20, de manera preferente, como máximo, 15 grupos guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 3 y, como máximo, 20, de manera preferente, como máximo, 15 grupos guanosina. En una realización más preferente, dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como mínimo, 3, de manera preferente, como mínimo, 4, y, como máximo, 11 grupos
55 guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 3, de manera preferente, como mínimo, 4 y, como máximo, 10 grupos guanosina. En una realización más preferente, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido que contiene CpG no metilado, de manera preferente, en el que dicho oligonucleótido que contiene CpG no metilado comprende dos tramos de poli G, en el que, de manera preferente, cada uno de dichos tramos de poli G consiste en, como mínimo 4 grupos guanosina, y, en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido que contiene CpG no metilado
60 comprende una secuencia palindrómica, en la que dicha secuencia palindrómica se localiza entre dichos tramos de poli G. En una realización más preferente, dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como mínimo, 3, de manera preferente, como mínimo, 4 residuos de guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 3, de manera preferente, como mínimo, 4 grupos guanosina, en el que dicho oligonucleótido comprende además una secuencia palindrómica, en la que, de manera preferente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1).

- 65 En una realización más preferente, dicho oligonucleótido comprende una secuencia palindrómica, en el que, de

manera preferente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1), y en el que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5', como mínimo, por 3, de manera preferente, como mínimo, 4, y como máximo, 1 grupo guanosina y en la que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3', como mínimo, por 3, de manera preferente, como mínimo 4, y como máximo, 15 grupos guanosina.

En una realización más preferente, dicho oligonucleótido comprende de 10 a 1000 nucleótidos, de manera preferente, de 10 a 200 nucleótidos, de manera más preferente, de 10 a 100 nucleótidos, de manera aún más preferente, de 20 a 40 nucleótidos, de la manera más preferente, 30 nucleótidos.

En una realización muy preferente, dicho oligonucleótido comprende o, de manera preferente, consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en: (a) "G4-4"GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEC ID NO:2); (b) "G5-5" GGGGGGACGA TCGTCGGGGG (SEC ID NO:3); (c) "G6-6"GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEC ID NO:4); (d) "G7-7" GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEC ID NO:5); (e) "G8-8" GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEC ID NO:6); (f) "G9-9" GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEC ID NO:7); (g) "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO:8); (h) "G11" GGGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEC ID NO:9), en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos unidos a fosfodiéster. En una realización aún más preferente, dicho oligonucleótido comprende o, de manera preferente, consiste en la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8), en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos unidos a fosfodiéster.

El presente documento se refiere además a una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en el que dicha composición de nucleótidos es obtenible mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente, implementado cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, solas o en cualquier combinación. En particular, la presente invención se refiere a una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicha composición de nucleótidos es obtenible mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente, en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, de manera preferente, del 80 al 95%, de manera más preferente, del 80 al 90%, de manera aún más preferente, del 83 al 90%, de manera aún más preferente, del 85 al 90%, y, de la manera más preferente, del 88%.

En una realización preferente, dicha composición de nucleótidos comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido comprende o, de manera preferente, consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en: (a) "G4-4"GGGGGACGAT CGTCGGGG (SEC ID NO:2); (b) "G5-5" GGGGGGACGA TCGTCGGGGG (SEC ID NO:3); (c) "G6-6"GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEC ID NO:4); (d) "G7-7" GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEC ID NO:5); (e) "G8-8" GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEC ID NO:6); (f) "G9-9" GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEC ID NO:7); (g) "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO:8); (h) "G11" GGGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGGG GG (SEC ID NO:9), en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos unidos a fosfodiéster. En una realización aún más preferente, dicha composición de oligonucleótidos comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido comprende o, de manera preferente, consiste en la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8), en la que, de manera preferente, dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos unidos a fosfodiéster. En una realización muy preferente, dicha composición de nucleótidos comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido consiste en la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8), en la que dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos unidos a fosfodiéster y, en la que, dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, de manera preferente, del 80 al 95%, de manera más preferente, del 80 al 90%, de manera aún más preferente, del 83 al 90%, de manera aún más preferente, del 85 al 90%, y, de la manera más preferente, del 88%.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de nucleótidos son útiles en un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, porque el oligonucleótido agregado contenido en las composiciones de nucleótidos de la presente invención facilita el autoensamblaje de la proteína de cubierta de bacteriófagos de ARN y, de este modo, la formación de partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN, en el que dicho oligonucleótidos se empaqueta en dichas partículas de tipo viral. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicha composición de nucleótidos es una composición de nucleótidos obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

El oligonucleótido que comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110% es el más útil para el objetivo de la presente invención, mientras que el oligonucleótido que comprende un tiempo de inicio del pico relativo superior o inferior puede dar lugar a un rendimiento bajo. De este modo, la presente invención da a conocer además un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer un oligonucleótido, (i) en el que dicho oligonucleótido, de manera preferente, comprende, como mínimo, sólo un tramo de poli G; y (ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral. Dicho proceso puede comprender cualquiera de las características y realizaciones descritas en el presente documento en cualquier combinación.

El experto es capaz de producir y purificar la proteína de cubierta de bacteriófagos de ARN mediante la purificación de dicha proteína de cubierta a partir de bacteriófagos de ARN mediante la aplicación de métodos estándar. Sin embargo, en una realización preferente, dicha proteína de cubierta se produce de manera recombinante, de manera preferente, mediante la expresión de dicha proteína de cubierta en *E. coli*. Los métodos para obtener la proteína de cubierta de los bacteriófagos de ARN se dan a conocer en la sección de ejemplos. En una realización preferente, dicha proteína de cubierta comprende o, de manera alternativa, consiste esencialmente, o de manera alternativa, consiste en proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas, de un bacteriófago de ARN, en el que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste en: (a) el bacteriófago Q β ; (b) el bacteriófago R17; (c) el bacteriófago fr; (d) el bacteriófago GA; (e) el bacteriófago SP; (f) el bacteriófago MS2; (g) el bacteriófago M11; (h) el bacteriófago MX1; (i) el bacteriófago NL95; (j) el bacteriófago f2; (k) el bacteriófago PP7; y el bacteriófago AP205. En una realización preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago Q β . Los procesos y métodos para expresar y purificar las partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN, en particular del bacteriófago Q β , se dan a conocer en los documentos WO2006/125821A2 y WO2007/039552A1, que se incorporan en el presente documento a modo de referencia. La proteína de cubierta de bacteriófago de ARN se puede obtener mediante el desensamblaje de partículas de tipo viral, por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos del presente documento.

En una realización más preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago AP205. Las formas mutantes competentes con el ensamblaje de las VLP de AP205, incluyendo la proteína de cubierta de AP205 con la sustitución de prolina en el aminoácido 5 por treonina, también se puede utilizar en la práctica de la presente invención. El documento WO 2004/007538 da a conocer, en particular en el ejemplo 1 y el ejemplo 2, cómo obtener VLP que comprenden proteínas de cubierta de AP205, y, por tanto, en particular su expresión y purificación. El documento WO 2004/007538 se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

En una realización más preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago fr. La proteína de cubierta de fr en forma de VLP recombinante se puede obtener tal como describen Pushko P y otros ((1993) Prot Engin 6: 883-891). En una realización más preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago GA. La VLP de GA se puede obtener mediante la clonación del ADNc aislado de la proteína de cubierta de GA mediante transcripción inversa a partir del fago de GA en pQb185, que se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO2004/007538. El desensamblaje de las VLP de Fr y GA se puede realizar fácilmente mediante la incubación de las VLP en urea 7 M, de manera opcional complementada con ácido acético a una concentración de 0,1 M. El ácido nucleico se purifica adicionalmente a partir de la proteína de cubierta mediante cromatografía de intercambio iónico, ya sea a un pH en el que una cantidad significativa de la proteína de cubierta fluye mientras el ácido nucleico se retiene, o a un pH en el que la proteína de cubierta también es adsorbida en la columna y posteriormente eluida con un gradiente de sal.

En una realización preferente, dicha proteína de cubierta comprende o, de manera preferente, consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEC ID NO:10 (Q β CP); (b) una mezcla de SEC ID NO:10 y SEC ID NO:11 (proteína Q β A1); (c) SEC ID NO:12 (proteína de cubierta de R17); (d) SEC ID NO:13 (proteína de cubierta de fr); (e) SEC ID NO:14 (proteína de cubierta de GA); (f) SEC ID NO:15 (proteína de cubierta de SP); (g) una mezcla de SEC ID NO:15 y SEC ID NO:16; (h) SEC ID NO:17 (proteína de cubierta de MS2); (i) SEC ID NO:18 (proteína de cubierta de M11); (j) SEC ID NO:19 (proteína de cubierta de MX1); (k) SEC ID NO:20 (proteína de cubierta de NL95); (l) SEC ID NO:21 (proteína de cubierta de f2); (m) SEC ID NO:22 (proteína de cubierta de PP7); y (n) SEC ID NO:23 (proteína de cubierta de AP205). En una realización más preferente, la proteína de cubierta de aid comprende o, de manera preferente, consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEC ID NO:10; (b) una mezcla de SEC ID NO:11 y SEC ID NO: 11; (c) SEC ID NO:13; (d) SEC ID NO:14; (e) SEC ID NO:23. En una realización muy preferente adicional, dicha proteína de cubierta de aid comprende o, de manera preferente, consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) SEC ID NO:10; y (b) una mezcla de SEC ID NO:10 y SEC ID NO:11.

Además, la proteína de cubierta mutante del bacteriófago Q β , en la que los residuos de lisina expuestos están

sustituídos por argininas, se puede utilizar para la presente invención. De este modo, en una realización más preferente, dicha proteína de cubierta comprende, consiste de manera esencial o, de manera alternativa, consiste en proteínas de cubierta de Q β , tal como se describen en el documento WO02/056905 (véase el ejemplo 18 en el mismo).

También se ha observado que proteínas de cubierta de bacteriófagos de ARN adicionales se autoensamblan después de la expresión en un huésped bacteriano (Kastelein, RA. y otros, Gene 23: 245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. y otros, Dokl. Akad. Nauk SSSR 287: 452-455 (1986), Adhin, MR. y otros, Virology 170: 238-242 (1989), Priano, C. y otros, J. Mol. Biol. 249: 283-297 (1995)). En particular, se han dado a conocer las propiedades biológicas y bioquímicas de GA (Ni, CZ., y otros, Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996), Tars, K y otros, J. Mol. Biol. 271: 759-773 (1997)) y de fr (Pushko P. y otros, Prot. Eng. 6: 883-891 (1993), Liljas, L y otros J Mol. Biol. 244: 279-290, (1994)). Se ha determinado la estructura cristalina de varios bacteriófagos de ARN (Golmohammadi, R. y otros, Structure 4: 543-554 (1996)).

De manera habitual y preferente, los procesos dados a conocer en el presente documento para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, se llevan a cabo a temperatura ambiente. En una realización preferente, dichos procesos se realizan a una temperatura de 15 a 30°C, de manera preferente, a una temperatura de 19 a 25°C, de la manera más preferente, a 22°C. En una realización más preferente, dicha generación de dicha mezcla, dicha extracción de dicho agente de dicha mezcla y/o dicha permisión de que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral se realizan a una temperatura de 15 a 30°C, de manera preferente, a una temperatura de 19 a 25°C, de la manera más preferente, a 22°C.

Dicho proceso comprende generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido. En una realización preferente, la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 0,5 a 10 mg/ml, de manera preferente, de 1 a 4 mg/ml, y, de la manera más preferente, 2,5 mg/ml, en la que, de manera preferente, dicha concentración se determina en un ensayo de Bradford. En una realización más preferente, la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es de 12,5 a 250 μ M, de manera más preferente, de 25 a 100 μ M, y, de la manera más preferente, 62,5 μ M.

A efectos de obtener un rendimiento óptimo del proceso de empaquetamiento, la proporción molar de dicho oligonucleótido y de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 0,5 a 1,2, de manera preferente, de 0,6 a 0,8 y, de la manera más preferente, 0,7. La utilización de menos oligonucleótido por proteína de cubierta conducirá a un menor rendimiento, mientras que la utilización de un exceso de oligonucleótido incrementa los costes y puede dar lugar a un producto con una pureza baja. En una realización muy preferente, la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es 2,5 mg/ml, y la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es 62,5 μ M.

Las proteínas de cubierta de virus y, en particular, de bacteriófagos de ARN presentan, en general, una fuerte tendencia a autoensamblarse en una estructura de cápside, por ejemplo, en una partícula de tipo viral. Aunque no en cada caso, esta tendencia está en muchos casos aumentada en presencia de ácidos nucleicos, tales como ARN o ADN. A efectos de obtener una mezcla óptima de dicha proteína de cubierta y dicho oligonucleótido antes de que tenga lugar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, dicha mezcla comprende un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta. De manera habitual y preferente, dicho agente comprende un compuesto desnaturalizante. En bioquímica se conocen numerosos compuestos desnaturalizantes e incluyen detergentes, urea o clorhidrato de guanidinio. Los detergentes preferentes son dodecilsulfato sódico, Tween 20, TritonX 100, y similares. En una realización preferente, dicho compuesto desnaturalizante es urea o clorhidrato de guanidinio, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho compuesto desnaturalizante, de manera preferente, de dicha urea, en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, de manera preferente, 1 M. En una realización muy preferente, dicho compuesto desnaturalizante es urea, y la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,5 a 2 M, de manera preferente, de 0,7 a 1,5 M, de manera más preferente, de 0,8 a 1,2 M, y, de la manera más preferente, 1 M.

En una realización más preferente, el pH de dicha mezcla es aproximadamente neutro, de manera preferente, dicho pH es de 6 a 8, de manera más preferente, de 6,8 a 7,5, y, de la manera más preferente, dicho pH es 7,2. En una realización muy preferente, dicha mezcla comprende un tampón fosfato, de manera preferente, un tampón de fosfato de sodio, en el que de manera más preferente, la concentración final de dicho tampón fosfato en dicha mezcla es de 2 a 100 mM, de manera más preferente, de 10 a 50 mM y, de la manera más preferente, aproximadamente 20 mM.

En una realización adicional, dicha mezcla comprende además una sal, en la que, de manera preferente, dicha sal es un haluro, de manera preferente, un cloruro de un metal alcalino, de manera más preferente, dicha sal es cloruro de potasio o cloruro de sodio o una combinación de los mismos, y, de la manera más preferente, dicha sal es cloruro de sodio. En una realización preferente, la concentración de dicha sal o de dicha combinación de sales, de manera preferente, la concentración de dicho cloruro de sodio en dicha mezcla es de 0 a 1 M, de manera preferente, de 0 a 550 mM, de manera más preferente, de 0 a 350 mM, de manera aún más preferente, de 50 a 350 mM, y, de la

manera más preferente, 250 mM.

La cápside y/o partículas de tipo viral de ciertos bacteriófagos de ARN, en particular del bacteriófago Q β , el bacteriófago AP205 y el bacteriófago fr, se estabilizan mediante enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades de proteína que forman dicha cápside o partícula de tipo viral. La adición de un agente reductor a dicha mezcla mantiene dichos enlaces disulfuro en un estado reducido y, de este modo, ayuda a prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta. En una realización preferente, por lo tanto, dicho agente comprende además un agente reductor, en el que dicho agente reductor se selecciona, de manera preferente, entre DTT (ditioeritol), β -mercaptoetanol, TCEP y otros agentes reductores conocidos en general en la técnica. En una realización preferente, dicho agente reductor es DTT, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho DTT en dicha mezcla es de 1 a 25 mM, de manera preferente, 2,5 mM. En una realización muy preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago Q β , el bacteriófago AP205 o el bacteriófago fr, y dicho agente comprende además un agente reductor, en el que, de manera preferente, dicho agente reductor es DTT, y, en el que, de manera más preferente, la concentración de dicho DTT en dicha mezcla es de 1 a 25 mM, de manera preferente, 2,5 mM. En una realización más preferente, dicha proteína de cubierta comprende residuos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro intermoleculares en dicha partícula de tipo viral, y dicho agente comprende además un agente reductor, en el que, de manera preferente, dicho agente reductor es DTT, y en el que, de manera más preferente, la concentración de dicho DTT en dicha mezcla es de 1 a 25 mM, de manera preferente, 2,5 mM.

En una realización preferente, dicha generación de dicha mezcla comprende añadir (i) dicha proteína de cubierta; (ii) dicho agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta y (iii) dicho oligonucleótido a dicha mezcla, en la que, de manera preferente, dicha adición se realiza en el orden indicado y en la que, de manera más preferente, dicha mezcla se mezcla antes de dicha adición de dicho oligonucleótido.

En una realización más preferente, dicho proceso comprende además la etapa de incubar dicha mezcla antes de dicha extracción de dicho agente, en la que, de manera preferente, dicha incubación se realiza durante, aproximadamente, 50 a 70, de manera preferente, aproximadamente 60 minutos. En una realización más preferente, la incubación de dicha mezcla se realiza a una temperatura de 15 a 30°C, de manera más preferente, a una temperatura de 19 a 25°C, y, de la manera más preferente, a 22°C. En una realización más preferente, dicha incubación de dicha mezcla comprende agitar dicha mezcla, en la que, de manera preferente, dicha agitación se realiza a aproximadamente de 50 a 200 rpm, de la manera más preferente, a aproximadamente 100 rpm. En una realización muy preferente, dicha incubación de dicha mezcla se realiza durante aproximadamente 60 minutos, y dicha incubación de dicha mezcla comprende agitar dicha mezcla, en la que, de manera preferente, dicha agitación se realiza a aproximadamente 100 rpm.

En una realización, dicha extracción de dicho agente de dicha mezcla se realiza mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en el que, de manera preferente, dicho primer intercambio de tampón se realiza mediante diálisis o mediante filtración de flujo continuo, de manera preferente, mediante filtración de flujo continuo. Dicho primer intercambio de tampón se realiza a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular que permite la retención de dicha proteína de cubierta y de la VLP autoensamblada. En una realización preferente, dicho primer intercambio de tampón se realiza a través de una membrana, en la que dicha membrana comprende un corte de peso molecular de 1 a 50 kD, de manera preferente, de 5 a 30 kD, de la manera más preferente, de 30 kD. En una realización muy preferente, dicho primer intercambio de tampón se realiza mediante filtración de flujo continuo a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular de 1 a 50 kD, de manera preferente, de 30 kD, en el que, de manera más preferente, el volumen de dicho primer tampón es aproximadamente 6 veces el volumen de dicha mezcla. En una realización muy preferente, dicha membrana es Biomax-5 (PES) que comprende un corte de peso molecular de 30 kD. En una realización muy preferente, dicho primer intercambio de tampón se realiza mediante filtración de flujo continuo a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular de 1 a 50 kD, de manera preferente, de 30 kD, en la que el flujo de permeado se ajusta a aproximadamente 96 l/(m²*h).

En una realización más preferente, dicho primer tampón comprende una sal, en la que, de manera preferente, la composición de la sal de dicho primer tampón es idéntica a la composición de la sal de dicha mezcla. En una realización preferente, dicha sal en dicho primer tampón es un haluro, de manera preferente, un cloruro de un metal alcalino, de manera más preferente, dicha sal es cloruro de potasio o cloruro de sodio o una combinación de los mismos, y, de la manera más preferente, dicha sal es cloruro de sodio. En una realización preferente, la concentración de dicha sal o dicha combinación de sales, de manera preferente, la concentración de dicho cloruro de sodio, en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, de manera preferente, de 0 a 550 mM, de manera más preferente, de 0 a 350 mM, de manera aún más preferente, de 50 a 350 mM, y, de la manera más preferente, 250 mM. En una realización más preferente, el pH de dicho primer tampón es de 6 a 8, de manera más preferente, de 6,8 a 7,5, y, de la manera más preferente, dicho pH es 7,2. En una realización más preferente, dicho primer tampón comprende un tampón fosfato, de manera preferente, un tampón de fosfato de sodio, en el que, de manera más preferente, la concentración final de dicho tampón fosfato en dicho primer tampón es de 2 a 100 mM, de manera más preferente, de 10 a 50 mM y, de la manera más preferente, aproximadamente 20 mM.

A efectos de estabilizar dicha partícula de tipo viral formada en la reacción de autoensamblaje, dicha partícula de

tipo viral, de manera preferente, se pone en contacto con un agente oxidante capaz de formar enlaces disulfuro intermoleculares en dicha partícula de tipo viral. De este modo, en una realización preferente, dicho proceso comprende además la etapa de poner en contacto dicha partícula de tipo viral con un agente oxidante, en el que, de manera preferente, dicho agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en (a) peróxido de hidrógeno, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM; (b) oxígeno; (c) glutatión; (d) ascorbato; (e) Cu^{2+} ; y (f) Fe^{3+} . En una realización muy preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago Q β , el bacteriófago AP205 o el bacteriófago fr, y dicho proceso comprende además la etapa de poner en contacto dicha partícula de tipo viral con un agente oxidante, en el que, de manera preferente, dicho agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en (a) peróxido de hidrógeno, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM; (b) oxígeno; (c) glutatión; (d) Cu^{2+} ; y (e) Fe^{3+} , y, en el que, de la manera más preferente, dicho agente oxidante es peróxido de hidrógeno, en el que, de manera más preferente, la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM. En una realización preferente, dicha proteína de cubierta comprende residuos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro intermoleculares en dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, dicha proteína de cubierta es una proteína de cubierta del bacteriófago Q β , el bacteriófago AP205 o el bacteriófago fr, y dicho proceso comprende además la etapa de poner en contacto dicha partícula de tipo viral con un agente oxidante, en el que, de manera preferente, dicho agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en (a) peróxido de hidrógeno, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM; (b) oxígeno; (c) glutatión; (d) Cu^{2+} ; y (e) Fe^{3+} , y, en el que, de la manera más preferente, dicho agente oxidante es peróxido de hidrógeno, en el que, de manera más preferente, la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM

En una realización más preferente, dicho proceso comprende además la etapa de purificar dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, dicha purificación comprende un segundo intercambio de tampón con un segundo tampón, en el que, de manera más preferente, dicho segundo tampón es un tampón farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, dicho segundo intercambio de tampón se realiza con un segundo tampón, en el que, de manera preferente, dicho segundo intercambio de tampón se realiza mediante diálisis o mediante filtración de flujo continuo, de manera preferente, mediante filtración de flujo continuo. Dicho segundo intercambio de tampón se realiza a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular que permite la retención de dicha partícula de tipo viral y que, de manera preferente, permite la permeación de dicha proteína de cubierta y/o de dicho oligonucleótido. De este modo, en una realización preferente, dicho segundo intercambio de tampón se realiza a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular de 100 a 1000 kD, de manera preferente, de 300 kD, en el que, de manera preferente, dicho segundo intercambio de tampón se realiza mediante filtración de flujo continuo. En una realización muy preferente, dicha membrana es PLCKM-300 que comprende un corte de peso molecular de 300 kD. En una realización muy preferente adicional, dicho segundo intercambio de tampón se realiza mediante filtración de flujo continuo a través de una membrana que comprende un corte de peso molecular de 100 a 1000 kD, de manera preferente, de 300 kD, en la que, de manera preferente, se intercambian aproximadamente 10 veces el volumen de dicha mezcla y, en la que, de manera más preferente, el flujo de permeado se ajusta a aproximadamente 100 l/(m²*h).

En una realización adicional, dicho proceso comprende concentrar dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, dicha concentración se realiza hasta una concentración final de dicha partícula de tipo viral en dicha composición de 1 a 5 mg de proteína/ml, de manera preferente, de aproximadamente 2,5 mg proteína/ml, en la que, de manera preferente, dicha concentración se determina mediante el ensayo de proteína de Bradford y en la que, de manera más preferente, dicha partícula de tipo viral se disuelve en dicho segundo tampón. En una realización muy preferente, dicha concentración se realiza a través de una membrana capaz de retener dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, el corte de peso molecular de dicha membrana es de 100 a 1000 kD, de manera preferente, aproximadamente 300 kD, y, en la que, de manera más preferente, dicha concentración se realiza con un flujo de permeado a través de dicha membrana inferior a 100 l/(h*m²), de manera preferente, aproximadamente 30 l/(h*m²). Caudales bajos durante la etapa de concentración evitan la precipitación del producto.

En una realización más preferente, dicho proceso comprende además la etapa de filtración estéril de dicha partícula de tipo viral, en la que, de manera preferente, dicha partícula de tipo viral está contenida en dicho segundo tampón, en la que, de manera más preferente, dicha filtración estéril se realiza a través de un filtro de membrana que comprende de 0,1 a 0,45 μm , de manera preferente, aproximadamente 0,22 μm

En una realización más preferente, los procesos, según la presente invención, para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprenden un rendimiento de proteína y un rendimiento de nucleótido, en la que dicho rendimiento de proteína es, como mínimo, del 50%, de manera preferente, como mínimo, del 60%, de manera más preferente, como mínimo, del 70%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 75%, y, de la manera más preferente, como mínimo, del 80%.

En una realización más preferente, los procesos, según la presente invención, para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un

bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprenden un rendimiento de oligonucleótido, en el que dicho rendimiento de oligonucleótido es, como mínimo, del 50%, de manera preferente, como mínimo, del 60%, de manera más preferente, como mínimo, del 70%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 75%, y, de la manera más preferente, como mínimo, del 80%.

En una realización más preferente, dicha composición que comprende dicha partícula de tipo viral, comprende una pureza, como mínimo, del 80%, de manera preferente, como mínimo, del 90%, de manera más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98%, y, de la manera más preferente, como mínimo, del 99%.

En una realización más preferente, los procesos, según la presente invención, para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprenden un rendimiento de oligonucleótido, en el que dicho rendimiento de oligonucleótido es, como mínimo, del 50%, de manera preferente, como mínimo, del 60%, de manera más preferente, como mínimo, del 70%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 75%, y, de la manera más preferente, como mínimo, del 80%.

En una realización más preferente, los procesos, según la presente invención, para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprenden un rendimiento de proteína y un rendimiento de nucleótido, en el que dicho rendimiento de proteína es, como mínimo, del 50%, de manera preferente, como mínimo, del 60%, de manera más preferente, como mínimo, del 70%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 75%, y, de la manera más preferente, como mínimo, del 80%.

En una realización más preferente, dicha composición que comprende dicha partícula de tipo viral, comprende de 15 a 30 µg, de manera preferente, de 20 a 25 µg, y, de la manera más preferente, aproximadamente 20 µg de dicho oligonucleótido por 100 µg de proteína de cubierta, en la que, de manera preferente, dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral del bacteriófago Qβ, y, en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8), en la que, de manera aún más preferente, dicha composición que comprende dicha partícula de tipo viral, comprende una pureza, como mínimo, del 98%, de manera preferente, como mínimo, del 99%, en la que, de manera aún más preferente, la cuantificación de dicha proteína de cubierta se realiza mediante el ensayo de proteína de Bradford, y, en la que, de manera aún más preferente, la cuantificación de dicho oligonucleótido se realiza esencialmente, de manera preferente, exactamente tal como se describe en el ejemplo 9.

El presente documento también se refiere a la utilización de una composición de nucleótidos obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención, en un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en el que, de manera preferente, dicho proceso comprende las etapas de (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer dicha composición de nucleótidos; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral; en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido contenido en dicha composición de nucleótidos comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%, en el que, de manera más preferente, dicho bacteriófago de ARN es Qβ, y en el que, de manera aún más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8).

El presente documento se refiere además a la utilización de un oligonucleótido que comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110% en un proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en el que, de manera preferente, dicho proceso comprende las etapas de (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN; (b) disponer dicho nucleótido; (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende: (i) dicha proteína de cubierta; (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta; (iii) dicho oligonucleótido; (d) extraer dicho agente de dicha mezcla; y (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral; en el que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN es Qβ, y en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8).

El presente documento se refiere además a una composición obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención, comprendiendo dicha composición (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en el que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN es Qβ, y en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8), y, en el que de manera aún más preferente, la pureza de dicha composición es, como mínimo, del 80%, de manera

preferente, como mínimo, del 90%, de manera más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98% y, de la manera más preferente, como mínimo, del 99%, y en la que, de manera aún más preferente, dicha composición que comprende dicha partícula de tipo viral, comprende de 15 a 30 µg, de manera preferente, de 20 a 25 µg, y, de la manera más preferente, aproximadamente 20 µg de dicho oligonucleótido por 100 µg de proteína de cubierta.

El presente documento se refiere además a una composición obtenible mediante cualquiera de los procesos de la presente invención, comprendiendo dicha composición (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en el que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN es Qβ, y en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO:8), en el que de manera aún más preferente, la pureza de dicha composición es, como mínimo, del 80%, de manera preferente, como mínimo, del 90%, de manera más preferente, como mínimo, del 95%, de manera aún más preferente, como mínimo, del 98% y, de la manera más preferente, como mínimo, del 99%, y en el que oligonucleótido no es accesible a la hidrólisis por la ADNasa.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Disgregación y agregación del oligonucleótido G10 (SEC ID NO:8)

Cuantificación de G10: Se cuantificó G10 mediante absorción UV a 260 nm corregida por la absorción a 340 nm, en la que $1 A_{260-340}$ corresponde a una concentración de 27,8 µg/ml a 1 cm de longitud de paso.

Disgregación (escala de 10,0 ml, G10 260 µM, NaOH 25 mM, 50°C, 70 min): Se pesaron 45,91 mg de G10 en un tubo de 15 ml. Se disolvió el polvo en 11,0 ml de agua purificada ($c = 325,3 \mu\text{M}$, determinada mediante espectrometría). Se mezclaron 8,0 ml de la solución de oligonucleótido con 250 µl de NaOH 1 M y 1,75 ml de agua purificada en un tubo de 15 ml (G10 260 µM, NaOH 25 mM). La mezcla se disgregó durante 70 minutos a 50°C en un baño de agua. Después de enfriar la solución en hielo, el pH se ajustó con HCl 0,5 M hasta pH 5,31; se añadieron 540 µl de HCl 0,5 M y 5 µl de NaOH 1 M.

Agregación (escala de 10,0 ml, G10 175 µM, Na⁺ 250 mM, 85°C, 9-24 min): Se mezclaron 7,1 ml de solución de G10 disgregado, 2,13 ml de agua purificada y 770 µl de NaCl 3M en un tubo de 15 ml (oligonucleótido 175 µM, Na⁺ 250 mM). La mezcla se incubó durante 9 minutos a 85°C en un baño de agua. La solución se enfrió en un baño de hielo/agua y se almacenó en hielo hasta su utilización. Las soluciones de oligonucleótido agregado deben utilizarse dentro de las 3 horas después de la preparación.

Ejemplo 2

Disgregación y agregación de los oligonucleótidos G4-4

Disgregación: Se preparó una solución de oligonucleótido G4-4 (SEC ID NO:2) 260 µM y NaOH 25 mM en agua purificada. La solución se calentó hasta 50°C durante 70 minutos y, a continuación, se enfrió en hielo, se ajustó el pH de la solución hasta un pH entre 5 y 8 utilizando HCl 0,5 M.

Agregación: La solución que comprendía el G4-4 disgregado se diluyó con agua purificada y NaCl 3 M hasta una concentración final de G4-4 230 µM y Na⁺ 250 mM. La mezcla se calentó hasta 80°C utilizando una rampa de temperaturas de 6,8°C/min durante varios minutos (2 a 70 minutos). Después de la incubación, la mezcla se enfrió hasta 0-2°C con una rampa de temperaturas de 6,8°C/min.

El análisis del producto mediante HPLC de exclusión por tamaño (véase el ejemplo 4) reveló que se obtuvo el oligonucleótido agregado. (Tiempo de inicio del pico relativo: 88%).

Ejemplo 3

Disgregación y agregación de oligonucleótidos

Disgregación: Se prepara una solución de G5-5 (SEC ID NO:3), G6-6 (SEC ID NO:4), G7-7 (SEC ID NO:5), G8-8 (SEC ID NO:6), G9-9 (SEC ID NO:7) y G11 (SEC ID NO:9), respectivamente, 260 µM y NaOH 25 mM en agua purificada. La solución se calienta hasta 50°C durante 70 minutos y, a continuación, se enfría en hielo, se ajusta el pH de la solución hasta un pH entre 5 y 8 utilizando HCl 0,5 M.

Agregación: La solución que comprende el oligonucleótido disgregado se diluye con agua purificada y NaCl 3 M hasta una concentración final de oligonucleótido 230 µM y Na⁺ 250 mM. La mezcla se calienta hasta 80°C utilizando

una rampa de temperaturas de 6,8°C/min durante varios minutos (2 a 70 minutos). Después de la incubación, la mezcla se enfrió hasta 0-2°C con una rampa de temperaturas de 6,8°C/min.

El producto del proceso de agregación se analiza mediante HPLC de exclusión por tamaño (véase el ejemplo 4).

Ejemplo 4

Análisis del estado de agregación del oligonucleótido G10 mediante HPLC de exclusión por tamaño

El estado de agregación de G10 se analizó mediante HPLC analítica de exclusión por tamaño utilizando las siguientes condiciones:

Columna:	TSKgel 5000 PWXL 7,8 mm * 30,0 cm (Lote: 5PWX06GNMH3304, Artículo: 08023, Tosoh Bioscience)
Eluyente:	PBS (NaCl 150 mM en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2)
Volumen de inyección:	40,0 µl (de manera preferente, que comprende una concentración de aproximadamente 20 µM a aproximadamente 500 µM)
Caudal:	0,8 ml/min
Gradiente:	Isocrático
Tiempo de desarrollo:	20 min
Longitud de onda:	215, 260 y 280 nm, evaluación de los datos a 260 nm
Temperatura del horno de la columna:	25°C
Temperatura de automuestreo:	8°C

Como patrón se utilizó la cápside del bacteriófago Qβ.

El tiempo de inicio del pico X% de G10 en relación con la cápside de Qβ (tiempo de inicio del pico relativo de Qβ) se calculó de la siguiente manera:

$X\% = \text{tiempo de inicio del pico [min] del oligonucleótido dividido por el tiempo de retención del patrón de la cápside de Qβ [min]} \times 100\%$,

en la que el tiempo de inicio del pico del oligonucleótido se determinó como el tiempo cuando la elución del oligonucleótido era detectable y, en la que el tiempo de retención del patrón de la cápside de Qβ se determinó como el tiempo de la aparición del pico máximo del patrón. Un ejemplo de un perfil de elución de oligonucleótido G10 y la cápside de bacteriófago Qβ como patrón se representa en la figura 1. En base a los cromatogramas representados en la figura 1, se calculó un tiempo de inicio del pico relativo del 88% para el oligonucleótido agregado.

Ejemplo 5

Comparación de los tiempos de inicio del pico relativo del oligonucleótido G10 no tratado, disgregado y agregado

Se determinó el tiempo de inicio del pico relativo de G10 disgregado y agregado preparado, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 1, y se comparó con el tiempo de inicio del pico relativo de G10 no tratado obtenido de un proveedor comercial. El G10 disgregado mostró un tiempo de inicio del pico relativo del 138% (136,9 – 140,3%; n = 5). Las preparaciones de G10 que no se han sometido al tratamiento de disgregación/agregación descrito en el ejemplo 1 muestran un tiempo de inicio del pico relativo en el mismo intervalo que G10 disgregado. Después de la disgregación y agregación, se observó que el tiempo de inicio del pico de G10 era del 88%.

Ejemplo 6

El impacto de la etapa de disgregación

Se sometieron el oligonucleótido G10 no tratado y el oligonucleótido G10 disgregado, tal como se describe en el ejemplo 1, a agregación, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 1, en la que se escogieron las siguientes condiciones de agregación: G10 175 µM, Na⁺ 250 mM (mediante la adición de NaCl 3M), incubación a 85°C durante 16 minutos, a continuación, enfriamiento en hielo. Se analizaron ambas preparaciones mediante HPLC de exclusión por tamaño (véase el ejemplo 4) utilizando cápside de Qβ y G10 no tratado como patrón. Los cromatogramas de HPLC resultantes se representan en la figura 2.

El G10 no tratado contenía G10 agregado (véanse las figuras 2A y 2B, recuadro 1). El G10 agregado que no estaba disgregado antes de la agregación mostró un peso molecular aparente equivalente o superior al de la cápside de Qβ (figura 2A, recuadro 2). El tiempo de inicio del pico relativo fue aproximadamente del 75%. El G10 agregado que estaba disgregado antes de la agregación mostró un peso molecular aparente inferior al de la cápside de Qβ (figura 2B, recuadro 2). El tiempo de inicio del pico relativo fue aproximadamente del 88%.

Ejemplo 7

Análisis del estado de agregación del oligonucleótido G10 mediante dicroísmo circular

5 Se registraron los espectros CD de G10 no tratado, disgregado y agregado (preparado, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 1), así como de la cápside de Q β empaquetada con G10 (Q β G10 obtenida tal como se describe en el ejemplo 10), entre 200 nm y 300 nm en un espectrofotómetro JASCO J-715 (figura 3). El espectro de G10 agregado se caracteriza por una banda positiva intensa (elíptica elevada) con un máximo a 262 nm y un mínimo a 240 nm. Está descrito que estas señales corresponden al espectro típico de los tetraplexos de ADN con una orientación paralela de cadenas (Lu y otros, Biochemistry 31, pág. 2455, 1992). De manera destacada, la forma del espectro de CD en la región de 250 nm - 300 nm no cambia en los espectros de VLP reensambladas en presencia de G10 agregado. De este modo, el G10 no parece experimentar un cambio conformacional tras el empaquetamiento. El ligero incremento de la amplitud a 262 nm posiblemente refleja el empaquetamiento selectivo de G10 agregado en cápsides de Q β que da lugar a una mayor proporción de tetraplexos después del empaquetamiento en comparación con el G10 agregado que aún contiene una fracción de moléculas no agregadas. En cambio, el espectro de G10 no tratado se caracteriza por bajas elipticidades sin máximos definidos indicando una falta de elementos definidos de estructura secundaria y terciaria. También se observan señales de CD bajas para G10 disgregado, aún cuando la aparición de un máximo a 295 nm y un mínimo a 262 nm podría reflejar la presencia de algunos conformeros del tetraplexo antiparalelos (P. Balagurumorthy y otros, Nucleic Acids Research 20, pág. 4061, 1992).

Ejemplo 8

Empaquetamiento de VLP de Q β con G10 mediante desensamblaje/reensamblaje

25 Desensamblaje de VLP de Q β : Se redujeron 45 mg de VLP de Q β (2,5 mg/ml, determinada mediante el análisis de Bradford) en PBS (fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), con DTT 10 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de agitación. A continuación, se añadió cloruro de magnesio hasta una concentración final de 0,7 M y se continuó la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de agitación, conduciendo a la precipitación del ARN encapsulado de la célula huésped y la disgregación simultánea de las VLP. La solución se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm a 4°C (Eppendorf 5810 R, en un rotor A-4-62 de ángulo fijo utilizado en todas las etapas posteriores) a efectos de extraer el ARN precipitado de la solución. Se utilizó el sobrenadante, que contenía la proteína de cubierta dimérica de Q β liberada, para las etapas de purificación cromatográfica.

35 Purificación de la proteína de cubierta de Q β mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño: Se cargó el sobrenadante de la reacción de desensamblaje, que contenía la proteína de cubierta dimérica, proteínas de la célula huésped y ARN residual de la célula huésped, en una columna SP Sepharose FF (xk16/20, 6 ml, Amersham Bioscience). La columna se equilibró con tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7, y la muestra se diluyó 1:15 en agua para ajustar la conductividad por debajo de 10 mS/cm a efectos de conseguir una unión correcta de la proteína de cubierta a la columna. La elusión de la proteína de cubierta unida se realizó mediante un gradiente por etapas hasta fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 500 mM y la proteína se recogió en un volumen de fracción de aproximadamente 25 ml. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente con un caudal de 5 ml/min durante todas las etapas y la absorbancia se monitorizó a 260 nm y 280 nm. En una segunda etapa, la proteína de cubierta de Q β aislada (la fracción eluida de la columna de intercambio catiónico) se cargó en una columna Sephacryl S-100 HR (xk26/60, 320 ml, Amersham Bioscience) equilibrada con fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 250 mM; pH 7,2. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente con un caudal de 2,5 ml/min y la absorbancia se monitorizó a 260 nm y 280 nm. Se recogieron fracciones de 5 ml.

50 Caracterización de la proteína de cubierta de Q β purificada mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño: Se analizó una muestra de proteína de cubierta de Q β purificada mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (figura 1C) y se comparó con i) VLP de Q β intacta (figura 4A), que se había purificado a partir de lisado de *E. coli* y que se utilizó como material de partida para el procedimiento de purificación, y ii) el sobrenadante de la reacción de desensamblaje (figura 4B). La separación eficaz de moléculas de ARN de la proteína de cubierta se indica por la ausencia de cualquier pico de tipo ARN (proporción habitual de A280/A260 = 0,5) en la figura 4C y por la presencia de un único pico de tipo proteína (proporción habitual de A280/A260 = 1,7).

60 Ensamblaje de Q β G10 mediante diafiltración: Se mezcló la proteína de cubierta purificada (en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2, NaCl 250 mM) con agua y soluciones madre de urea, NaCl, DTT y oligonucleótido G10 agregado (preparado, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 1). El volumen de la mezcla fue de 50 ml y las concentraciones finales de los componentes fueron 1 mg/ml de proteína de cubierta, urea 1,0 M, NaCl 250 mM, DTT 2,5 mM y G10 0,24 mg/ml. A continuación, la solución se diafiltró a temperatura ambiente contra 300 ml de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 250 mM, pH 7,2, utilizando un cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon XL, Millipore) y un caudal transversal de 10 ml/min y un caudal de permeado de 2,5 ml/min. Se añadió H₂O₂ hasta una concentración final de 7 mM y la solución se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente a efectos de inducir la formación de enlaces disulfuro. A continuación, la solución se diafiltró contra 500 ml de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2,

utilizando un cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon XL, Millipore) y un caudal transversal de 10 ml/min y un caudal de permeado de 2,5 ml/min, a efectos de eliminar el exceso de H_2O_2 y los oligonucleótidos G10 no empaquetados del producto Q β G10 ensamblado.

5 Ejemplo 9

Análisis del producto de empaquetamiento Q β G10 y determinación del rendimiento del proceso de empaquetamiento

- 10 Caracterización de VLP de Q β G10 empaquetada mediante cromatografía de exclusión por tamaño: Se analizó una muestra de VLP de Q β G10 empaquetada mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (figura 5) y se comparó con VLP de Q β intacta, que se había purificado a partir de lisado de E. coli. Dicha cromatografía analítica de exclusión por tamaño se realizó utilizando los siguientes parámetros:

Columna:	Bio-Sil SEC 250,7,8 x 300 mm, No. de catálogo 125-0062
Eluyente:	Fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM
Gradiente:	Isocrático
Temperatura de columna:	25°C
Temperatura del automuestreador:	8°C
Caudal:	1,0 ml/min
Concentración de muestra:	1,0 mg/ml de proteína
Volumen de inyección:	40 μ l
Longitud de onda de evaluación:	280 nm
Ancho de banda:	4 nm
Tiempo de la operación:	20 minutos

Preparación de la muestra:

La muestra se diluyó hasta 1,0 mg/ml utilizando eluyente, la muestra se agitó con intensidad durante poco tiempo y se centrifugó a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C.

- 15 La presencia de VLP correctamente ensamblada en el producto se confirmó mediante la migración del pico a un tiempo de retención idéntico al pico que representaba la VLP de Q β nativo. El pico observado para VLP de Q β G10 (figura 5D) está dominado por el contenido de ácido nucleico de la VLP, ya que el coeficiente de absorción de los ácidos nucleicos a 260 nm es más de 100 veces superior al coeficiente de absorción de la proteína de cubierta. Se observó que la proporción A260/A280 de VLP de Q β G10 purificada era 1,70 (1,65 – 1,76; n = 5), que es característica para G10 (A260/A280 = 1,74), en la que se observó que la proporción A260/A280 de VLP de Q β era 1,87 (1,85 – 1,90; n = 10) que es característica para ARN.

- 25 Caracterización de VLP de Q β G10 empaquetado mediante análisis por SDS-PAGE: Se analizó una muestra de Q β G10 empaquetado mediante SDS-PAGE no reductor (figura 6) y se comparó con VLP de Q β intacta que se había purificado a partir de un lisado de E. coli. La presencia de VLP correctamente ensamblada en el producto se confirmó mediante la formación de bandas de formas pentaméricas y hexaméricas unidas por puentes disulfuro de la proteína de cubierta, similar a las VLP de Q β intactas, indicando la disposición estructural correcta de las unidades de proteína de cubierta en la VLP de Q β G10 ensamblada in vitro.

- 30 Cuantificación de oligonucleótido G10 empaquetado: Se trataron muestras de VLP de Q β G10 (0,25 mg/ml en PBS) por TCEP (tris(2-cloroetil)fosfato) 0,1 mM (15 minutos a temperatura ambiente) a efectos de reducir los enlaces disulfuro. Se añadió NaCl a las muestras reducidas (concentración final 1 M) y las mezclas se incubaron durante 15 minutos a 60°C a efectos de precipitar el componente de proteína. Después de la centrifugación, se incubaron los sobrenadantes resultantes durante 5 minutos a 95°C, se enfriaron en hielo durante 1 minuto y, a continuación, se midió el valor de A260. Se calculó la concentración de oligonucleótido G10 en los sobrenadantes según la fórmula:

$$c(G10) \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{260} \times 1,12 \times 9600}{344580}, \text{ en la que:}$$

1,12 = factor de corrección para el contenido de sal en la muestra

9600 = peso molecular del oligonucleótido G 10

344580 = coeficiente de absorción molar específico del oligonucleótido G10.

De manera habitual, la cantidad de oligonucleótido G10 empaquetado fue de 0,2 mg por mg de proteína de cubierta de Q β .

- 45 Contenido de G10 de VLP de Q β G10 y cálculo del rendimiento para la reacción de empaquetamiento: El G10 agregado se empaquetó en VLP de Q β mediante el ensamblaje/reensamblaje de la VLP tal como se describe en el ejemplo 8. Se introdujeron 953 mg de oligonucleótido G10 para el reensamblaje con 400 mg de dímero Q β purificado. La reacción produjo Q β G10 que comprendía 20 μ g de oligonucleótido G10 por 100 μ g de proteína (contenido de proteína determinado mediante el análisis de Bradford o HPLC). El rendimiento de G10 de la reacción

de empaquetamiento fue del 63% a un rendimiento de proteína del 75%.

Ejemplo 10

5 **Ensamblaje de Q β G10 mediante diafiltración y determinación del rendimiento**

Se obtuvo, de manera esencial, la proteína de cubierta de Q β tal como se describe en el ejemplo 8. Se mezcló la proteína de cubierta en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2, NaCl 250 mM con agua y soluciones madre de urea, NaCl, DTT y oligonucleótido G10 agregado (preparado, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 1; el tiempo de inicio del pico relativo de G10 disgregado fue del 135%, el tiempo de inicio del pico relativo del G10 agregado fue del 88%). El volumen de la mezcla fue de 1,6 l y las concentraciones finales de los componentes fueron 2,5 mg/ml de proteína de cubierta, urea 1,0 M, NaCl 250 mM, DTT 2,5 mM y G10 0,6 mg/ml. A continuación, la solución se diafiltró a temperatura ambiente contra 9,6 l de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 250 mM, pH 7,2, utilizando un cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon Mini2, área de filtración de 0,1 m², Millipore) y un caudal transversal de 384 l/(h*m²) y un caudal de permeado de 96 l/(h*m²). Se añadió H₂O₂ hasta una concentración final de 2 mM y la solución se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente a efectos de inducir la formación de enlaces disulfuro. A continuación, la solución se diafiltró contra 16 l de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, utilizando un cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon Mini2, área de filtración de 0,1 m², Millipore) y un caudal transversal de 300 l/(h*m²) y un caudal de permeado de 100 l/(h*m²), a efectos de eliminar el exceso de H₂O₂ y los oligonucleótidos G10 no empaquetados del producto Q β G10 ensamblado. El producto se concentró hasta 2,5 mg/ml mediante una filtración de flujo tangencial y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. Las etapas principales del proceso se resumen en la tabla 1.

25

(Continúa en página siguiente)

Tabla 1: Resumen de las etapas del proceso para el ensamblaje y purificación de Q β G10

Etapas del proceso	Parámetros	Resultado de la etapa del proceso
Disgregación de G10	Concentración de G10: 260 μ M Concentración de NaOH: 25 mM Temperatura: 50°C Tiempo de calentamiento: 70 minutos Escala: 1,1 g G10, V = 440 ml (en alícuotas de 10 ml)	tiempo de inicio del pico relativo de G10: 138%
Neutralización de la solución de G10 disgregada	Ácido utilizado: H ₃ PO ₄ 0,5 M	pH 7,2
Reagregación de la solución de G10	Concentración de G10: 175 μ M Concentración de Na ⁺ : 250 mM Temperatura: 85°C Tiempo de calentamiento: 10 minutos Escala: 1,1 g G10, V = 654 ml (en alícuotas de 10 ml)	tiempo de inicio del pico relativo de G10: 88%
Descongelación del material de partida	Temperatura: 22°C	Solución de dímero Q β
Preparación de la mezcla de reensamblaje	Concentración de dímero: 2,5 mg/ml Concentración de urea: 1 M Concentración de DTT: 2,5 mM Concentración de G10: 62,5 μ M Tiempo de mezclado: 60 $\pm$ 10 minutos	Solución para la diafiltración 1
	Temperatura: 22 $\pm$ 3°C Escala: 4 g dímero Q β , V = 1,61	
Diafiltración continua 1	Membrana: 30 kDa MWCO Área: 0,1 m ² Volúmenes de diafiltración: 6 (9,6 l de permeado recogido) Tampón: NaP 250 pH 7,2 Duración del objetivo: 60 minutos Temperatura: 22°C Flujo: 96 l/(h*m ²) V = 1,61	El dímero Q β forma VLP alrededor del material central de G10 debido a la eliminación de urea y DTT
Oxidación con peróxido de hidrógeno	Concentración de H ₂ O ₂ : 2 mM Temperatura: 22°C Tiempo de reacción: 60 $\pm$ 10 minutos V = 1,61	Formación de puentes disulfuro y, por tanto, estabilización de la VLP
Diafiltración continua 2	Membrana: 300 kDa MWCO Área: 0,1 m ² Volúmenes de diafiltración: 10 (16 l) Tampón: tampón farmacéuticamente aceptable Temperatura: 22 $\pm$ 3°C Flujo: 100 l/(h*m ²) V = 1,61	Eliminación de peróxido de hidrógeno residual y G10 no empaquetado residual
Concentración de Q β G10	Membrana: 300 kDa MWCO Área: 0,1 m ² Temperatura: 22 $\pm$ 3°C Flujo de permeado: < 100 l/(h*m ²) V = 1,21	Concentración = 2,5 mg/ml
Filtración de Q β G10	Filtro de membrana PES de 0,22 μ m	Reducción de la carga biológica

Se observó que la pureza del producto analizada mediante cromatografía de exclusión por tamaño fue del 99,28%, es decir, el pico de Q β G10 suponía el 99,28% del área del pico completo en un perfil cromatográfico tal como se describe en el ejemplo 4. El rendimiento de proteína y el rendimiento de oligonucleótido se determinaron tal como se describe en el ejemplo 8. El rendimiento de proteína a lo largo de todo el proceso fue del 75%. El rendimiento de oligonucleótido a lo largo de todo el proceso fue del 75%.

10 Ejemplo 11

Impacto del estado de agregación de G10 en el proceso de ensamblaje

Cuando se utilizó G10 con un tiempo de inicio del pico relativo del 139% en el proceso de ensamblaje tal como se

describe en el ejemplo 8, solamente se formaron cantidades despreciables de GbG10 y no se pudo aislar el producto de VLP.

Ejemplo 12

Empaquetamiento de las VLP de AP205 y GA355 con G10 mediante desensamblaje/reensamblaje

Desensamblaje: Se incubaron 50-100 mg de VLP de AP205 o GA355 (determinada según el análisis de Bradford) en tampón A (NaPO_4 5 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, MgCl_2 2 mM) a 30°C durante 16 horas con ARNasa A (Sigma) y Benzonasa (Novagen) a 1 mg/ml y 5 U/ml, respectivamente. En el caso de la VLP de AP205, la desoxidación de los puentes disulfuro internos se realizó antes de la adición de ARNasa A y Benzonasa mediante la adición de DTT 20 mM, seguido de una incubación de 30 minutos a 37°C. Después de la adición de NaCl 1M, se indujo la precipitación de proteínas de cubierta viral mediante una incubación de 15 minutos a 70°C. Las proteínas de cubierta precipitadas se sedimentaron mediante centrifugación durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante que contenía ARNasaA, Benzonasa y ácidos nucleicos degradados. Se resuspendieron los restos celulares en tampón B (NaPO_4 20 mM pH 7,2, urea 6 M) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Purificación de proteínas de cubierta mediante cromatografía de intercambio catiónico: Se depuraron las soluciones mediante centrifugación durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descartó el resto celular despreciable y el sobrenadante que contenía las proteínas de cubierta desensambladas se aplicó en una columna SP SepharoseTM FF (16/20, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón B (NaPO_4 20 mM pH 7,2, urea 6 M). Se descartó el flujo que pasó. Después de un lavado intenso con tampón B (15 CV), la columna se ajustó con un gradiente lineal de tampón B a tampón C (NaPO_4 20 mM pH 7,2, urea 1 M) con una longitud de gradiente de 37,5 CV. Durante la carga, el lavado y la elución, se monitorizaron la absorbancia a 254 nm y 280 nm. Se eluyeron las proteínas de cubierta como una fracción con tampón D (NaPO_4 20 mM pH 6,5, urea 1 M, NaCl 300 mM) y se analizaron mediante LDS-PAGE, seguido de tinción de Coomassie. Las fracciones de proteína eluida se almacenaron a 4°C como "proteína de cubierta desensamblada". Las concentraciones de proteína se determinaron mediante análisis de Bradford.

Reensamblaje: Se utilizó proteína de cubierta purificada de AP205 o GA355 en un exceso de cinco veces (p/p) con respecto al oligonucleótido G10. Se mezclaron las proteínas de cubierta con el oligonucleótido G10 en un tampón de reensamblaje que contenía urea 1 M y DTT 2,5 mM y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla de reensamblaje se dializó durante 24 horas contra 5 litros de PBS. La suspensión resultante se centrifugó durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descartó un sedimento despreciable. El sobrenadante contenía las VLP reensambladas y empaquetadas. Se determinó la concentración de proteína mediante el análisis de Bradford y se concentraron las VLP reensambladas y empaquetadas con dispositivos de filtración centrífuga (Amicon Ultra 15, 10K MWCO).

Purificación de VLP reensambladas y empaquetadas: Se cargaron hasta 25 mg de proteína total en una CL-4B SepharoseTM (26/60, Amersham Biosciences) equilibrada con PBS. Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño con tampón de equilibrio a temperatura ambiente con un caudal de 1,25 ml/min. Durante la elución, se monitorizó la absorbancia a 254 nm y 260 nm. Se aislaron dos picos. Un pico principal de peso molecular elevado precedía a un pico pequeño de peso molecular aparente inferior. El pico principal reveló un peso molecular aparente consistente con las VLP purificadas tal como se muestra mediante SE-HPLC. El análisis de las VLP de AP205 o GA355 empaquetadas con oligonucleótido G10 se realizó, de manera esencial, tal como se muestra en el ejemplo 16 del documento WO03/024481 (pág. 131 y las siguientes).

Ejemplo 13

Empaquetamiento de VLP de FR con G10 mediante desensamblaje/reensamblaje

Desensamblaje: Se incuban 50-100 mg de VLP de FR (determinada mediante el análisis de Bradford) en tampón A (NaPO_4 5 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, MgCl_2 2 mM) a 30°C durante 16 horas con ARNasa A (Sigma) y Benzonasa (Novagen) a 1 mg/ml y 5 U/ml, respectivamente. Después de la adición de NaCl 1M, se induce la precipitación de las proteínas de cubierta de FR mediante una incubación de 15 minutos a 70°C. Las proteínas de cubierta precipitadas se sedimentaron mediante centrifugación durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante que contenía ARNasaA, Benzonasa y ácidos nucleicos degradados. Se resuspendieron los restos celulares en tampón B (NaPO_4 20 mM pH 7,2, urea 6 M) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Purificación de proteínas de cubierta de FR mediante cromatografía de intercambio catiónico: Se depura la solución mediante centrifugación durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descarta un resto celular despreciable y el sobrenadante que contiene las proteínas de cubierta desensambladas se aplica en una columna SP FF SepharoseTM (16/20, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón B. Se descarta el flujo que pasa. Después de un lavado intenso con tampón B (15 CV), la columna se ajusta con un gradiente lineal de tampón B a tampón C (NaPO_4 20 mM pH 7,2, urea 1 M) con una longitud de gradiente de 37,5 CV. Durante la carga, el lavado y la elución, se monitoriza la absorbancia a 254 nm y 280 nm. Se eluyen las proteínas de cubierta de FR como una fracción con

tampón D (NaPO₄ 20 mM pH 6,5, urea 1 M, NaCl 300 mM) y se analizan mediante LDS-PAGE, seguido de tinción de Coomassie. Las fracciones de proteína eluida se almacenan a 4°C como “proteína de cubierta desensamblada”. La concentración de proteína se determina mediante análisis de Bradford.

- 5 **Reensamblaje:** Se utiliza proteína de cubierta purificada de FR en un exceso de cinco veces (p/p) con respecto al oligonucleótido G10. Se mezclan las proteínas de cubierta de FR con el oligonucleótido G10 en un tampón de reensamblaje que contiene urea 1 M y DTT 2,5 mM y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, la mezcla de reensamblaje se dializa durante 24 horas contra 5 litros de PBS. La suspensión resultante se centrifuga durante 10 minutos, 27.000 g a 4°C. Se descarta el sedimento despreciable. El sobrenadante contiene las VLP de FR reensambladas y empaquetadas. Se determina la concentración de proteína mediante el análisis de Bradford y se concentran las VLP de FR reensambladas y empaquetadas con dispositivos de filtración centrífuga (Amicon Ultra 15, 10K MWCO).

- 15 **Purificación de VLP de FR reensambladas y empaquetadas:** Se cargan hasta 25 mg de proteína total en una CL-4B Sepharose™ (26/60, Amersham Biosciences) equilibrada con PBS. Se realiza una cromatografía de exclusión por tamaño con tampón de equilibrio a temperatura ambiente con un caudal de 1,25 ml/min. Durante la elución, se monitoriza la absorbancia a 254 nm y 260 nm. Se aíslan dos picos. Un pico principal de peso molecular elevado precede a un pico pequeño de peso molecular aparente inferior. El pico principal revela un peso molecular aparente consistente con las VLP de FR purificadas tal como se muestra mediante SE-HPLC. El análisis de las VLP de FR empaquetadas con oligonucleótido G10 se realiza, de manera esencial, tal como se muestra en el ejemplo 16 del documento WO03/024481 (pág. 131 y las siguientes).

Ejemplo 14

25 **Ensamblaje de QβG8 mediante diafiltración y determinación del rendimiento**

- Se obtiene la proteína de cubierta de Qβ purificada, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 8. Se mezcla la proteína de cubierta en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2, NaCl 250 mM, con agua y soluciones madre de urea, NaCl, DTT y oligonucleótido G8 agregado (preparado, de manera esencial, tal como se describe en el ejemplo 3; tiempo de inicio del pico relativo de G8 disgregado es del 113%, el tiempo de inicio del pico relativo del G8 agregado fue del 88%). El volumen de la mezcla es de 1,6 l y las concentraciones finales de los componentes son 1 mg/ml de proteína de cubierta, urea 1,0 M, NaCl 250 mM, DTT 2,5 mM y G8 0,24 mg/ml. A continuación, la solución se diafiltra a temperatura ambiente contra 9,6 l de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 250 mM, pH 7,2, utilizando un cartucho de corte de 30 kDa (Pellicon Mini2, área de filtración de 0,1 m², Millipore) y un caudal transversal de 384 l/(h·m²) y un caudal de permeado de 96 l/(h·m²). Se añade H₂O₂ hasta una concentración final de 2 mM y la solución se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente a efectos de inducir la formación de enlaces disulfuro. A continuación, la solución se diafiltra contra 16 l de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, utilizando un cartucho de corte de 300 kDa (Pellicon Mini2, área de filtración de 0,1 m², Millipore) y un caudal transversal de 300 l/(h·m²) y un caudal de permeado de 100 l/(h·m²), a efectos de eliminar el exceso de H₂O₂ y los oligonucleótidos G8 no empaquetados del producto QβG8 ensamblado. El producto se concentra hasta 2,5 mg/ml mediante una filtración de flujo tangencial y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Cytos Biotechnology AG Kinzler, Matthias Proba, Karl
 <120> PROCESOS PARA EL EMPAQUETAMIENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EN PARTÍCULAS DE TIPO VIRAL DE BACTERIOFAGOS DE ARN
 <130> P1070PC00
 <150> US 60/812,592
 50 <151> 2006-06-12
 <150> PCT/EP2006/069734
 <151> 2006-12-14
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.3
 55 <210> 1
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 60 <223> sintetizada químicamente
 <400> 1
 gacgatcgtc 10
 <210> 2
 <211> 18
 65 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 2
 gggggacgat cgtcggg 18
 5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 10 <223> sintetizada químicamente
 <400> 3
 ggggggacga tcgtcgggg 20
 <210> 4
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 4
 20 gggggggacg atcgtcggg gg 22
 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 5
 ggggggggac gatcgtcggg gggg 24
 30 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 35 <223> sintetizada químicamente
 <400> 6
 ggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26
 <210> 7
 <211> 28
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 7
 45 gggggggggg acgatcgtcg gggggggg 28
 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 8
 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30
 <210> 9
 55 <211> 32
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 60 <400> 9
 gggggggggg ggacgatcgt cggggggggg gg 32
 <210> 10
 <211> 132
 <212> PRT
 65 <213> bacteriófago Qb
 <400> 10

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15
Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
5 20 25 30
Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45
Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60
Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
10 65 70 75 80
Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95
Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110
15 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125
Asn Pro Ala Tyr
130
20
<210> 11
<211> 329
<212> PRT
<213> bacteriófago Qb
25 <400> 11
Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
1 5 10 15
Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
30 20 25 30
Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 35 40 45
Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60
Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
65 70 75 80
Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95
Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
100 105 110
40 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
115 120 125
Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Ser Gly
130 135 140
45 Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
145 150 155 160
Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
165 170 175
Val Tyr Glu Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
180 185 190
50 Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
195 200 205
Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
210 215 220
55 Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
225 230 235 240
Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
245 250 255
60 Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
260 265 270
Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Tyr His
275 280 285
Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
290 295 300
65 Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
305 310 315 320
Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 12
 <211> 129
 <212> PRT
 5 <213> bacteriófago R17
 <400> 12

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 10 Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20
 Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 35 40 45
 Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 55 60
 15 Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95
 20 Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 105 110
 Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125
 Tyr

25
 <210> 13
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> bacteriófago fr
 30 <400> 13

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 35 Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30
 Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45
 Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
 50 55 60
 40 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
 85 90 95
 45 Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
 100 105 110
 Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125
 Ile Tyr
 130

50
 <210> 14
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> bacteriófago GA
 55 <400> 14

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 60 Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30
 Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
 35 40 45
 Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
 50 55 60
 65 Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
 65 70 75 80
 Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala

ES 2 427 994 T3

	Ala	Thr	Asp	Asp	Val	Thr	Val	Ile	Ser	Lys	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Phe	
				100					105					110			
5	Lys	Val	Gly	Asn	Pro	Ile	Ala	Glu	Ala	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Phe	
			115					120					125				
	Tyr	Ala															
		130															
10	<210> 15 <211> 132 <212> PRT <213> bacteriófago SP <400> 15																
15	Met	Ala	Lys	Leu	Asn	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	
					5					10					15		
	Asp	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	
				20					25					30			
20	Val	Ala	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	
			35					40					45				
	Val	Thr	Val	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Phe	Lys	
		50				55						60					
	Val	Gln	Ile	Lys	Leu	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Arg	Asp	Ala	Cys	
	65					70					75					80	
25	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Ser	Ala	Phe	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ser	Phe	
					85					90					95		
	Thr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Glu	Leu	
				100					105					110			
	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	
			115					120					125				
30	Asn	Pro	Ala	Tyr													
		130															
35	<210> 16 <211> 329 <212> PRT <213> bacteriófago SP <400> 16																
40	Ala	Lys	Leu	Asn	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Asp	
					5					10					15		
	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	Val	
				20					25					30			
45	Ala	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	Val	
			35					40					45				
	Thr	Val	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Phe	Lys	Val	
		50				55						60					
	Gln	Ile	Lys	Leu	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Arg	Asp	Ala	Cys	Asp	
	65					70					75						
50	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Ser	Ala	Phe	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ser	Phe	Thr	
					85					90					95		
	Ser	Tyr	Ser	Thr	Asp	Glu	Glu										

ES 2 427 994 T3

225 Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
 245 Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
 260 Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
 275 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 290 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
 305 Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
 325

15 <210> 17
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> bacteriófago MS2
 <400> 17

20 Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30

25 Trp Ile Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45
 Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
 50 55 60

30 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
 85 90 95

35 Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
 100 105 110
 Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125
 Ile Tyr
 130

40 <210> 18
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> bacteriófago M11
 <400> 18

45 Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly
 1 5 10 15
 Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

50 Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45
 Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60

55 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
 65 70 75 80
 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95
 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
 100 105 110

60 Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn
 115 120 125
 Leu Asn Pro Ala Tyr
 130

65 <210> 19
 <211> 133
 <212> PRT

ES 2 427 994 T3

<213> bacteriófago MX1
<400> 19

```

5  Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
   1      5      10      15
   Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
      20      25      30
   Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
      35      40      45
10  Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
   50      55      60
   Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
   65      70      75      80
   Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
      85      90      95
15  Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
      100      105      110
   Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
      115      120      125
20  Leu Asn Pro Ala Tyr
   130

```

<210> 20
<211> 330
<212> PRT
<213> bacteriófago NL95
<400> 20

```

30  Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly
   1      5      10      15
   Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
      20      25      30
   Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
      35      40      45
35  Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
   50      55      60
   Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys
   65      70      75      80
   Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe
      85      90      95
40  Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
      100      105      110
   Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
      115      120      125
45  Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly
      130      135      140
   Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
   145      150      155      160
   Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
      165      170      175
50  Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
      180      185      190
   Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
      195      200      205
55  Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
      210      215      220
   Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
      225      230      235      240
   Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
      245      250      255
60  Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
      260      265      270
   Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
      275      280      285
65  Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
      290      295      300
   Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
      305      310      315      320

```

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
325 330

5 <210> 21
<211> 129
<212> PRT
<213> bacteriófago f2
<400> 21

10 Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15
Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20
Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
15 35 40
Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60
Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80
20 Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95
Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110
Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
25 115 120 125
Tyr

30 <210> 22
<211> 128
<212> PRT
<213> bacteriófago PP7
<400> 22

35 Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
1 5 10 15
Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30
Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
35 40 45
40 Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60
Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
65 70 75 80
Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
45 85 90 95
Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
100 105 110
Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

50 <210> 23
<211> 131
<212> PRT
<213> bacteriófago AP205
55 <400> 23

60 Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15
Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
20 25 30
Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
35 40 45
Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60
65 Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80
Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu

ES 2 427 994 T3

5 Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
 100 85 90 95
 Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
 115 105 110
 Thr Thr Ala 125 130

10

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

(a) disponer un oligonucleótido en la solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino, en el que, de manera preferente, dicho pH es de 8 a 13, de manera más preferente dicho pH es 12;

(b) disgregar dicho oligonucleótido, en el que dicha disgregación comprende las etapas de:

(i) ajustar la temperatura de la solución I a la temperatura I, en la que dicha temperatura I es de 4 a 70°C, de manera preferente, de 45 a 70°C, de manera más preferente, aproximadamente 50°C, y de la manera más preferente, 50°C;

(ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo por encima del 110%; y

(iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a la temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70°C, en la que, de manera preferente, dicha temperatura II es inferior a la temperatura I, y en la que, de manera más preferente, la temperatura II es de 0 a 25°C, de la manera más preferente, de 0 a 2°C,

(c) ajustar el pH de dicha solución I al pH de 5 a 8, en el que, de manera preferente, dicho ajuste de dicho pH de dicha solución I se realiza hasta que dicho pH es de 6 a 7; y

(d) agregar dicho oligonucleótido, en el que dicha agregación comprende las etapas de:

(i) disponer dicho oligonucleótido en la solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y, como mínimo, 20 mM de un catión, en la que dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , y en la que, de manera preferente, dicha solución II comprende de 200 a 275 mM de dicho catión, de manera preferente, 250mM;

(ii) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura III, en la que dicha temperatura III es de 50 a 99°C, de manera preferente, de 80 a 90°C, de manera más preferente, aproximadamente 85°C, y, de la manera más preferente, 85°C;

(iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%; y

(iv) ajustar la temperatura de la solución II a la temperatura IV, en la que dicha temperatura IV es inferior a 50°C, en la que, de manera preferente, dicha temperatura IV es de 0 a 25°C, de manera más preferente, de 0 a 2°C.

2. Proceso, según la reivindicación anterior, en el que dicho ajuste de la temperatura de dicha solución I a la temperatura II se realiza con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6°C/min, y/o, en el que dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura IV se realiza con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6°C/min.

3. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha solución I comprende un hidróxido de un metal alcalino, de manera preferente, hidróxido de potasio o hidróxido de sodio, de la manera más preferente, hidróxido de sodio, en el que la concentración de dicho hidróxido es de 10 mM a 200 mM, de manera preferente, aproximadamente 25 mM, de la manera más preferente, 25 mM.

4. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho catión es Na^+ o K^+ , en el que, de manera preferente, dicho catión es Na^+ .

5. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución I es de 50 μM a 2 mM, de la manera más preferente, 260 μM y/o en el que la concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución II es de 50 μM a 2 mM, de manera preferente, de 100 a 300 μM , de la manera más preferente, 175 μM .

6. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha incubación de dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III se realiza hasta que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 80 al 95%, de manera preferente, del 80 al 90%, de manera aún más preferente, del 83 al 90%, de manera aún más preferente, del 85 al 90% y, de la manera más preferente, del 88%.

7. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido comprende en su extremo 5', como mínimo, 3 y, como máximo, 15 grupos guanosina y en su extremo 3', como mínimo, 3 y, como máximo, 15 grupos guanosina, y en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende una secuencia palindrómica, en el que de manera más preferente, dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1), y en el que de manera aún más preferente, dicho oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) "G4-4" GGGGGACGATCGTCGGGG (SEC ID NO:2);
 (b) "G5-5" GGGGGGACGATCGTCGGGGG (SEC ID NO:3);
 (c) "G6-6" GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEC ID NO:4);
 (d) "G7-7" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEC ID NO:5);
 5 (e) "G8-8" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEC ID NO:6);
 (f) "G9-9" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEC ID NO:7);
 (g) "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8);
 (h) "G11" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:9).
- 10 8. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8).
9. Proceso para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en la que dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral de un bacteriófago de ARN, y (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
- 15 (a) disponer una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN;
 (b) disponer de un oligonucleótido,
- 20 (i) en el que dicho oligonucleótido comprende, como mínimo, un tramo de poli G; y
 (ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110%,
- (c) generar una mezcla, en la que dicha mezcla comprende:
- 25 (i) dicha proteína de cubierta,
 en la que, de manera preferente, la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, de manera más preferente, 2,5 mg/ml, y/o, en la que, de manera más preferente, la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es de 25 a 100 μ M, de manera más preferente, 62,5 μ M;
- 30 (ii) un agente capaz de evitar el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta,
 en el que, de manera preferente, dicho agente comprende un compuesto desnaturalizante seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en el que, de manera más preferente, dicho agente desnaturalizante es urea, y en el que, de manera aún más preferente, la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, de manera preferente, 1 M;
- 35 (iii) dicho oligonucleótido;
- (d) extraer dicho agente de dicha mezcla, en el que, de manera preferente, dicha extracción de dicho agente de dicha mezcla se realiza mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en el que, dicho primer tampón comprende cloruro de sodio, en el que, de manera preferente, la concentración de dicho cloruro de sodio en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, de manera preferente, de 0 a 550 mM, de manera más preferente de 0 a 350 mM, de manera aún más preferente, de 50 a 350 mM, y de la manera más preferente, 250 mM; y
- 40 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.
10. Proceso, según la reivindicación 9, en el que dicha proteína de cubierta comprende, o de manera alternativa, consiste esencialmente, de manera alternativa, consiste en proteínas recombinantes, o fragmentos de las mismas,
- 45 de un bacteriófago de ARN, en el que, de manera preferente, dicho bacteriófago de ARN se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) bacteriófago Q β ;
 (b) bacteriófago R17;
 50 (c) bacteriófago fr;
 (d) bacteriófago GA;
 (d) bacteriófago SP;
 (e) bacteriófago MS2;
 (f) bacteriófago M11;
 55 (g) bacteriófago MX1;
 (h) bacteriófago NL95;
 (i) bacteriófago f2;
 (j) bacteriófago PP7; y
 (k) bacteriófago AP205.
- 60 11. Proceso, según la reivindicación 9, en el que dicho bacteriófago de ARN es Q β .
12. Proceso, según la reivindicación 11, en el que la proporción molar de dicho oligonucleótido y dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 0,5 a 1,2, de la manera más preferente, 0,7.
- 65 13. Proceso, según la reivindicación 9, en el que dicha proteína de cubierta comprende o, de manera preferente,

consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (a) SEC ID NO:10 (Q β CP);
- (b) una mezcla de SEC ID NO:10 y SEC ID NO:11 (proteína Q β A1);
- (c) SEC ID NO:12 (proteína de cubierta de R17);
- (d) SEC ID NO:13 (proteína de cubierta de fr);
- (e) SEC ID NO:14 (proteína de cubierta de GA);
- (f) SEC ID NO:15 (proteína de cubierta de SP);
- 10 (g) una mezcla de SEC ID NO:15 y SEC ID NO:16;
- (h) SEC ID NO: 17 (proteína de cubierta de MS2);
- (i) SEC ID NO:18 (proteína de cubierta de M11);
- (j) SEC ID NO:19 (proteína de cubierta de MX1);
- (k) SEC ID NO:20 (proteína de cubierta de NL95);
- (l) SEC ID NO:21 (proteína de cubierta de f2);
- 15 (m) SEC ID NO:22 (proteína de cubierta de PP7); y
- (n) SEC ID NO:23 (proteína de cubierta de AP205).

14. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicho oligonucleótido comprende una secuencia palindrómica, en el que dicha secuencia palindrómica es GACGATCGTC (SEC ID NO:1), y en el que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 5', como mínimo, por 3 y, como máximo, 15 grupos guanosina y en el que dicha secuencia palindrómica está flanqueada en su extremo 3', como mínimo, por 3 y, como máximo, 15 grupos guanosina, y en el que, de manera preferente, dicho oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 (a) "G4-4" GGGGGACGATCGTCGGGG (SEC ID NO:2);
- (b) "G5-5" GGGGGGACGATCGTCGGGGG (SEC ID NO:3);
- (c) "G6-6" GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEC ID NO:4);
- (d) "G7-7" GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEC ID NO:5);
- (e) "G8-8" GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEC ID NO:6);
- 30 (f) "G9-9" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEC ID NO:7);
- (g) "G10" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEC ID NO:8);
- (h) "G11" GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG (SEC ID NO:9).

15. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el rendimiento de proteína es, como mínimo, del 75% y/o, en el que el rendimiento de oligonucleótido es, como mínimo, del 75%.

Figura 1

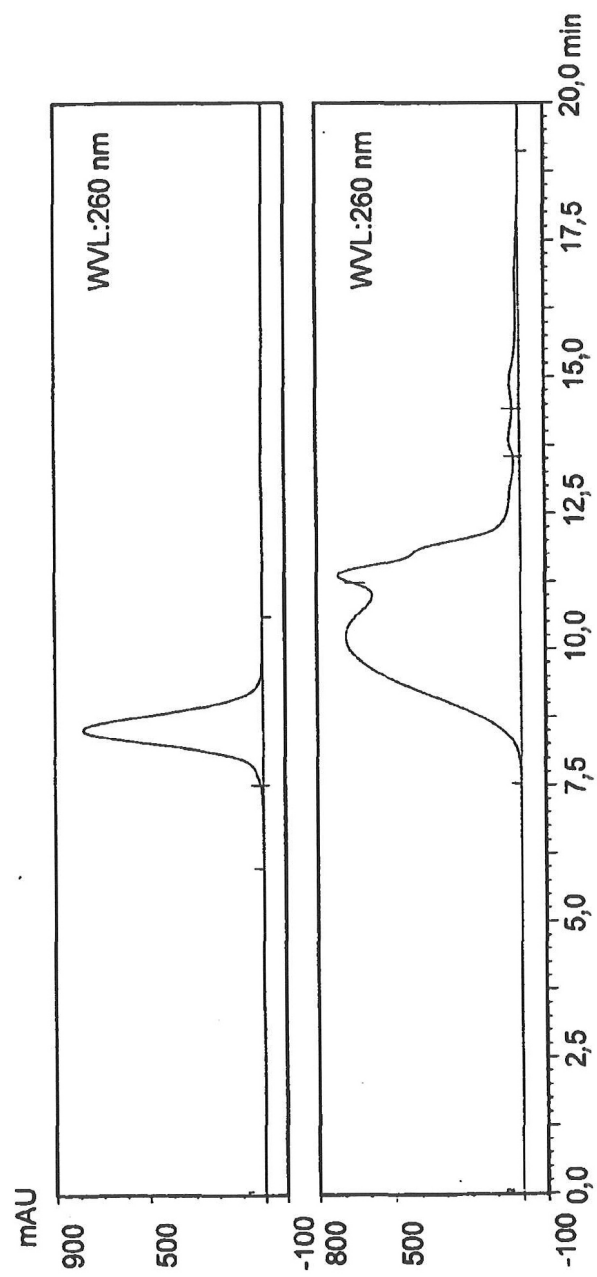


Figura 2

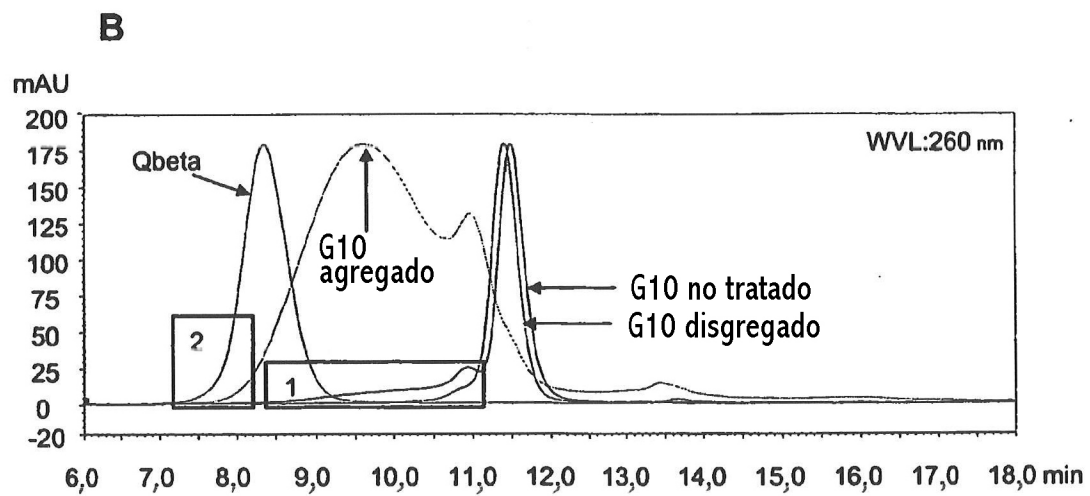
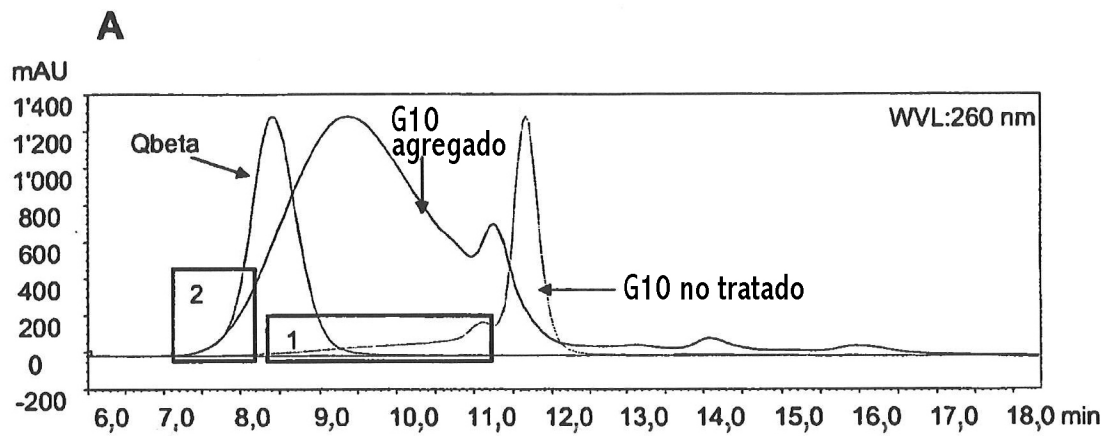


Figura 3

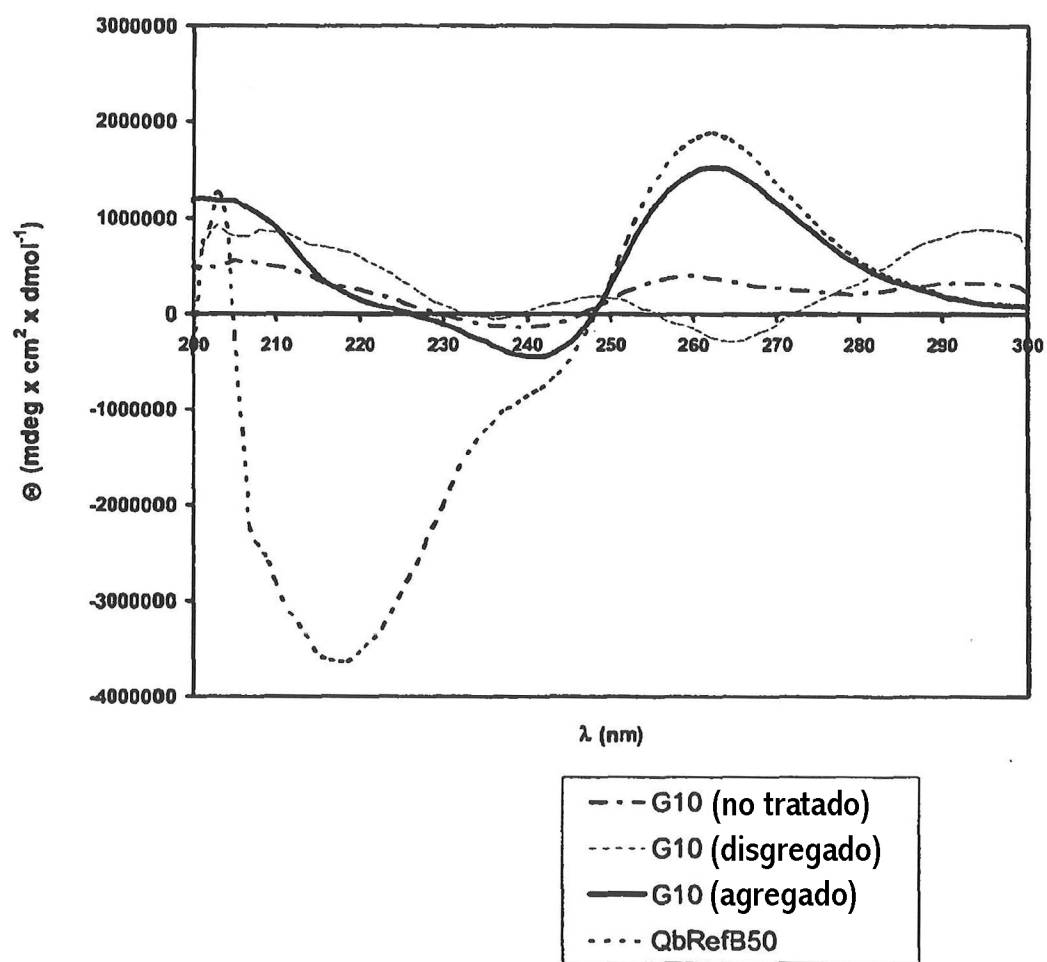


Figura 4

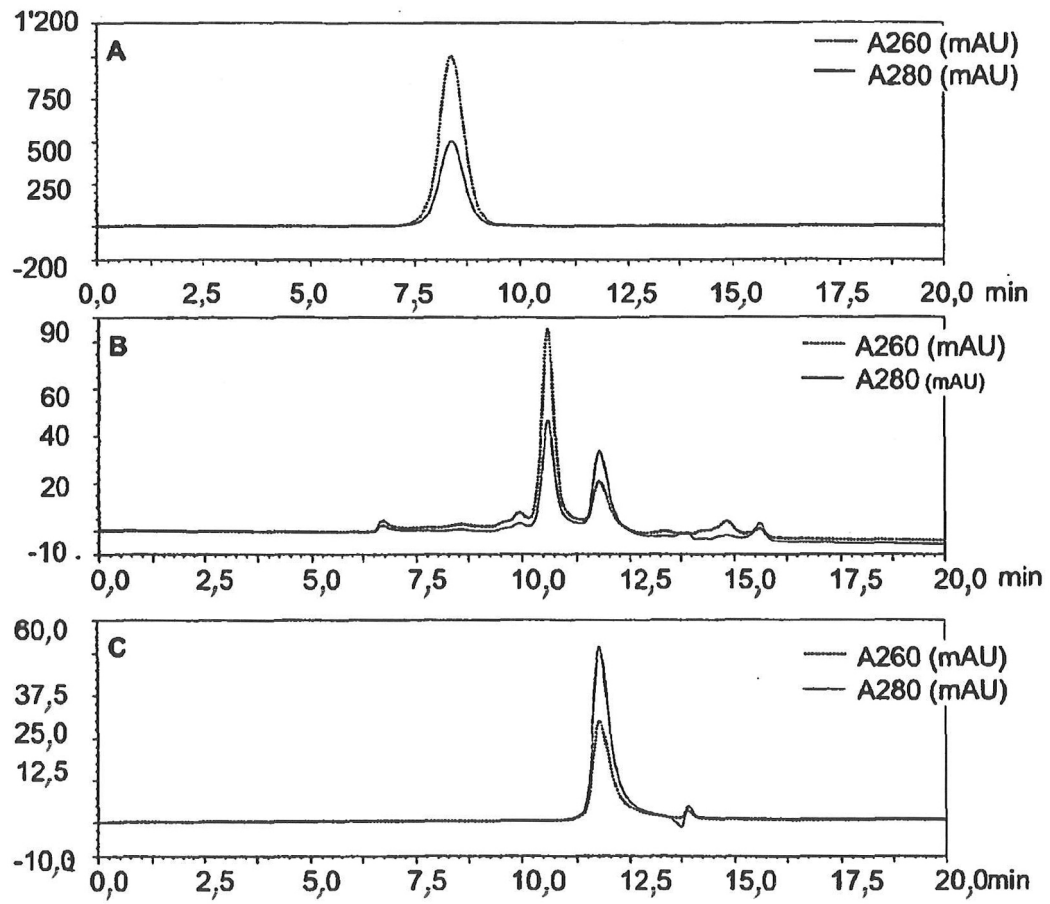


Figura 5

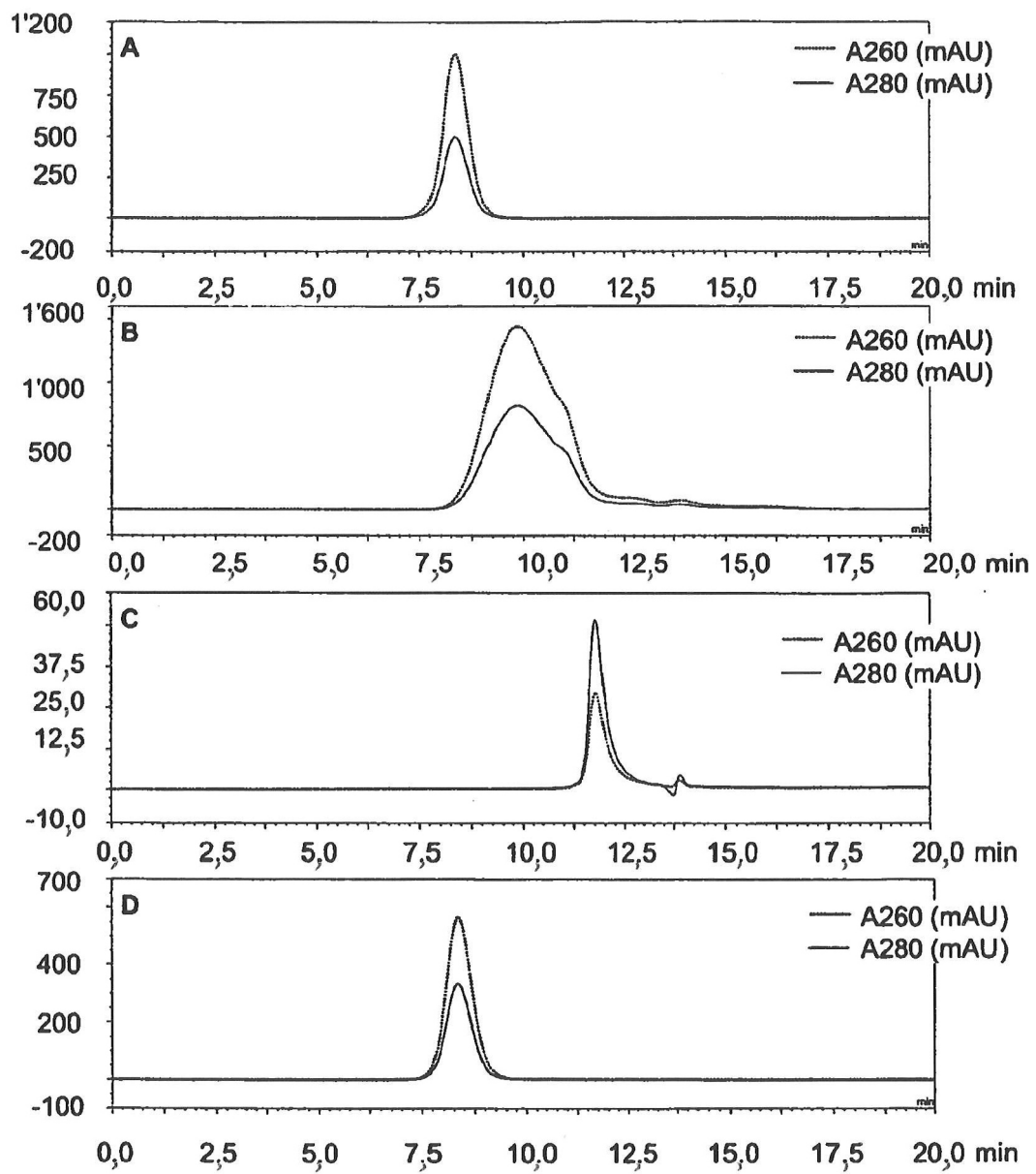


Figura 6

