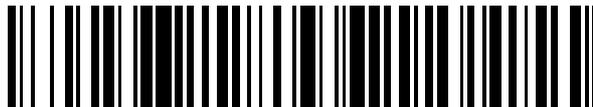


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 986**

51 Int. Cl.:

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 12167784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2530086**

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:

28.01.2020

73 Titular/es:

KUROS BIOSCIENCES AG (100.0%)

Wagistrasse 25

8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

KINZLER, MATTHIAS y

PROBA, KARL

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 738 986 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 se refiere a 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 y procesos para producir composiciones de nucleótidos que comprenden oligonucleótidos adecuados para utilizar en los procesos mencionados anteriormente. La invención 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 %.

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 tratamiento de vacunación. Se han dado a conocer, por ejemplo, en los documentos WO2003/024481A2, WO2004/000351A1, WO2004/084940A1, WO2004/007538A2, y WO2007/068747. Kerkmann *et al.* describen que la formación espontánea de nanopartículas basadas en ácidos nucleicos es responsable de una alta inducción de interferón-alfa por parte de CpG-A en células dendríticas plasmacitoides (Journal of Biological Chemistry, (2005), vol. 280, n.º 9, páginas 8086-8093. Los 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

La invención proporciona composiciones que comprenden (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 las que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral, en las que dichas composiciones son obtenibles mediante los procesos de la invención. La invención se refiere además 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 una composición que comprende

- 5 (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 Q β , y
 (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;

10 en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- 15 (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , en el que dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;
 (b) proporcionar un oligonucleótido,

- 20 (i) en el que dicho oligonucleótido comprende al menos un tramo de poli G; y
 (ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón;

- 25 (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende

- (i) dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, más preferentemente 2,5 mg/ml, y/o en la que más preferentemente la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es de 25 a 100 μ M, más preferentemente 62,5 μ M;
 30 (ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;
 35 (iii) dicho oligonucleótido;

- (d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en la que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en la que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y
 40 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

0005_ Un segundo aspecto de la invención es una composición que comprende

- 45 (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 Q β , y
 (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;

50 en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de

- 55 (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;
 (b) proporcionar una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, preferentemente de un 80 a un 95 %, más preferentemente de un 80 a un 90 %, aún más preferentemente de un 83 a un 90 %, aún más preferentemente de un 85 a un 90 %, y lo más preferentemente un 88 %, en el que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón, y en el que dicha composición de nucleótidos se puede obtener mediante un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, comprendiendo dicho proceso para producir una composición de nucleótidos las etapas de:

- 65 (w) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende al menos

un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino, en la que preferentemente dicho pH es de 8 a 13, más preferentemente dicho pH es 12;

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

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

10 (ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo superior a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina por HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; y

15 (iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a una temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70 °C, en la que preferentemente dicha temperatura II es inferior a la temperatura I, y en la que más preferentemente la temperatura II es de 0 a 25 °C, lo más preferentemente de 0 a 2 °C.

(y) ajustar el pH de dicha solución I a pH de 5 a 8, en el que preferentemente dicho ajuste de dicho pH de dicha solución I se lleva a cabo hasta que dicho pH sea de 6 a 7; y

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

20 (i) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y al menos 20 mM de un catión, en la que dicho catión se selecciona entre el grupo que consiste en Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺, y Mg²⁺; y en la que preferentemente dicha solución II comprende de 200 a 275 mM de dicho catión, preferentemente 250 mM;

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

30 (iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo de 50 a 110, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; 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 preferentemente dicha temperatura IV es de 0 a 25 °C, más preferentemente de 0 a 2 °C.

35 (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende:

(i) dicha proteína de cubierta, en la que la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, preferentemente 2,5 mg/ml;

40 (ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;

(iii) dicho oligonucleótido;

45 (d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en la que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en la que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y

50 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

De ese modo, parte de la invención es un proceso para producir una composición proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido comprende preferentemente un tiempo de inicio del pico relativo del 50 al 110 %, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

55 (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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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 comprenda 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.

65 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, otra parte de la presente invención es un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que preferentemente 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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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.

Una parte adicional de la 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 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.

Otra parte 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.

Una parte adicional más 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 preferentemente 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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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.

De nuevo una parte adicional 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 preferentemente 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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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 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.

De ese modo, la invención es una composición obtenible mediante procesos que se definen de acuerdo con las reivindicaciones anexas de la 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 dicho bacteriófago de ARN es Q β , y en la que dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO: 8), y en la que preferentemente la pureza de dicha composición es al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 %, y lo más preferentemente al menos un 99,2 %.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Cromatograma de HPLC de exclusión por tamaño del patrón de la cápside de Q (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. 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 elipicidadades según $\Theta = 100 \times \text{señal de CD [mdeg]/L [cm] \times c [mM]}$.

Figura 4: Caracterización de proteína de cubierta de Q 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 y Q 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 utilidades 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 o 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 o 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-dihidroxidesoxitimidina. 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 o 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, en el que preferentemente dicha HPLC se lleva a cabo esencialmente con, preferentemente exactamente 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 Q β 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 detergentes 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.

De ese modo, un primer aspecto de la presente invención es 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 Q β , y
 - (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;
- en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , en el que dicha proteína de

cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;
(b) proporcionar un oligonucleótido,

5 (i) en el que dicho oligonucleótido comprende al menos un tramo de poli G; y
(ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón;

10 (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende

(i) dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, más preferentemente 2,5 mg/ml, y/o en la que más preferentemente la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es de 25 a 100 μ M, más preferentemente 62,5 μ M;

15 (ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;
20 (iii) dicho oligonucleótido;

(d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en la que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en la que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y
25 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

30 Un segundo aspecto de la invención es 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 Q β , y

35 (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;

en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de

40 (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;

45 (b) proporcionar una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, preferentemente de un 80 a un 95 %, más preferentemente de un 80 a un 90 %, aún más preferentemente de un 83 a un 90 %, aún más preferentemente de un 85 a un 90 %, y lo más preferentemente un 88 %, en el que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón, y en el que dicha composición de nucleótidos se puede obtener mediante un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, comprendiendo dicho proceso para producir una composición de nucleótidos las etapas de:

50 (w) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende al menos un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino, en la que preferentemente dicho pH es de 8 a 13, más preferentemente dicho pH es 12;

55 (x) disgregar dicho oligonucleótido, en el que dicha disgregación comprende las etapas de

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

60 (ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo superior a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina por HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; y

65 (iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a una temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70 °C, en la que preferentemente dicha temperatura II es inferior a la temperatura I, y en la que más

preferentemente la temperatura II es de 0 a 25 °C, lo más preferentemente de 0 a 2 °C.

(y) ajustar el pH de dicha solución I a pH de 5 a 8, en el que preferentemente dicho ajuste de dicho pH de dicha solución I se lleva a cabo hasta que dicho pH sea de 6 a 7; y

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

(i) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y al menos 20 mM de un catión, en la que dicho catión se selecciona entre el grupo que consiste en Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺, y Mg²⁺; y en la que preferentemente dicha solución II comprende de 200 a 275 mM de dicho catión, preferentemente 250 mM;

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

(iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo de 50 a 110, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; 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 preferentemente dicha temperatura IV es de 0 a 25 °C, más preferentemente de 0 a 2 °C.

(c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende:

(i) dicha proteína de cubierta, en la que la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, preferentemente 2,5 mg/ml;

(ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;

(iii) dicho oligonucleótido;

(d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en la que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en la que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y

(e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

Como parte de la invención, se proporcionan 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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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 comprenda 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, como parte de la presente invención se proporciona 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⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺; (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 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.

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 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 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 μM a 2 mM, de manera preferente, de 50 a 500 μM, de manera más preferente, de 200 a 300 μM, y de la manera más preferente, 260 μM.

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 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 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, 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 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⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Li⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ y Mg²⁺. En una realización preferente, dicho catión se selecciona del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺, y Mg²⁺, de manera más preferente, dicho catión es Na⁺ o K⁺, de la manera más preferente, dicho catión es Na⁺.

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.

5 En una realización adicional, dicha solución II es una mezcla de cualquier catión seleccionado del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, Rb⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Li⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ y Mg²⁺. En una realización adicional, dicha solución II es una mezcla de cualquier catión seleccionado del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺. En una realización muy preferente, dicha mezcla comprende o, de manera preferente, consiste en Na⁺ y K⁺.

10 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
15 comprende 250 mM de cloruro de sodio o cloruro de potasio, de la manera más preferente, 250 mM de cloruro de 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 µM a 2 mM, de manera preferente, de 100 a 300 µM, de la manera más preferente, 175 µM.

20 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.

25 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
30 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 %.

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 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.

40 El proceso de agregación se detiene mediante el enfriamiento de la solución II por debajo de 50 °C. En una 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.

45 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 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
50 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 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
55 temperatura IV, se realizan con una rampa de temperaturas, como mínimo, de 3,6 °C/min. En una realización más 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
60 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 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

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 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 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),

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, 15 grupos 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" GGGGGACGA TCGTCGGGG (SEC ID NO: 3) ; (c) "G6-6"GGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEC ID NO: 4) ; (d) "G7-7" GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEC ID NO: 5) ; (e) "G8-8" GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGG (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" GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (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 se puede obtener mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente, implementado cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, solas o en cualquier combinación. En particular, la presente divulgación se refiere a una composición de nucleótidos que comprende un oligonucleótido, en la que dicha composición de nucleótidos se puede obtener 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 la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), en la que preferentemente dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos con enlace fosfodiéster. En una realización muy preferente, dicha composición de nucleótidos comprende un oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido consiste en la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), en la que dicho oligonucleótido consiste completamente en nucleótidos con enlace 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 de la invención 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, una parte de 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, una parte adicional de la presente invención da a conocer 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. Dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago Q β . Los procesos y métodos para expresar y purificar partículas de tipo viral de bacteriófagos de ARN, en particular del bacteriófago Q β , se desvelan en los documentos de Patente WO2006/125821A2 y WO2007/039552A1. La proteína de cubierta del bacteriófago de ARN se puede obtener mediante el desensamblaje de partículas de tipo viral, por ejemplo como se describe en los Ejemplos en el presente documento.

En una realización preferente, dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10 (Q β CP); y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11 (proteína Q β A1).

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 -mecaptoetanol, 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 $^{\circ}$ C, de manera más preferente, a una temperatura de 19 a 25 $^{\circ}$ C, y, de la manera más preferente, a 22 $^{\circ}$ 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.

5 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

10 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

15 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/(m²h).

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

20 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,

25 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,

30 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

35 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) Cu²⁺; y (f) Fe³⁺. En una realización muy preferente, dicho bacteriófago de ARN es el bacteriófago Q β , y dicho proceso comprende además la etapa de poner en contacto dicha

40 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) Cu²⁺; y (e) Fe³⁺, 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

45 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 , 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

50 de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, de manera preferente, 2 mM; (b) oxígeno; (c) glutatión; (d) Cu²⁺; y (e) Fe³⁺, 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,

60 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

65 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

5 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/(m²h).

10 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.

20 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

25 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 %.

30 En una realización preferente adicional, el proceso de acuerdo con la invención para producir una composición que comprende (i) una partícula de tipo viral, en el 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, comprende un rendimiento de oligonucleótido, en el que dicho rendimiento de oligonucleótido es al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, aún más preferentemente al menos un 75 %, y lo más preferentemente al menos un 80 %.

35 En una realización preferente adicional, dicha composición que comprende dicha partícula de tipo viral comprende una pureza de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, aún más preferentemente al menos un 98 %, y lo más preferentemente al menos un 99 %.

40 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 %.

45 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 %.

50 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 dicha partícula de tipo viral es una partícula de tipo viral del bacteriófago Qβ, y, en el que 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 Q β , 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 Q β , y en el que, de manera más preferente, dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO: 8).

La invención 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 dicho bacteriófago de ARN es Q β , y en el que dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO: 8), y, en el que preferentemente, 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 μ g, de manera preferente, de 20 a 25 μ g, y, de la manera más preferente, aproximadamente 20 μ g de dicho oligonucleótido por 100 μ g de proteína de cubierta.

La invención 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 dicho bacteriófago de ARN es Q β , y en el que dicho oligonucleótido es G10 (SEC ID NO: 8), en el que preferentemente, 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)

Quantificación de G10: Se cuantificó G10 mediante absorción UV a 260 nm corregida por la absorción a 340 nm, en la que 1 A₂₆₀₋₃₄₀ corresponde a una concentración de 27,8 μ g/ml a 1 cm de longitud de paso.

Disgregación (escala de 10,0 ml, G10 260 μ M, 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 μ M, determinada mediante espectrometría). Se mezclaron 8,0 ml de la solución de oligonucleótido con 250 μ l de NaOH 1 M y 1,75 ml de agua purificada en un tubo de 15 ml (G10 260 μ M, 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 μ l de HCl 0,5 M y 5 μ l de NaOH 1 M.

Agregación (escala de 10,0 ml, G10 175 μ M, 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 μ l de NaCl 3 M en un tubo de 15 ml (oligonucleótido 175 μ M, 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**

5 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.

10 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.

15 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

20 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:

| | | |
|----|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 40 | 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) |
| 45 | 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 |
| 50 | Temperatura del horno de la columna: | 25 °C |
| | Temperatura de automuestreo: | 8 °C |

Como patrón se utilizó la cápside del bacteriófago Q β .

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

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

60 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 Q β 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 Q β 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 μ M, Na⁺ 250 mM (mediante la adición de NaCl 3 M), 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 Q β 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 Q β (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 Q β (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

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, aun 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

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.

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 Sephacr I 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.

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).

Ensamblaje de QPG10 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 H₂O₂ y los oligonucleótidos G10 no empaquetados del producto Q β G10 ensamblado.

Ejemplo 9

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

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.

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.

Caracterización de VLP de Q β G10 empaquetado mediante análisis por SDS-PAGE: Se analizó una muestra de

QβG10 empaquetado mediante SDS-PAGE no reductor (figura 6) y se comparó con VLP de Qβ 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 Qβ intactas, indicando la disposición estructural correcta de las unidades de proteína de cubierta en la VLP de QβG10 ensamblada *in vitro*.

Quantificación de oligonucleótido G10 empaquetado: Se trataron muestras de VLP de QβG10 (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:

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

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 Qβ.

Contenido de G10 de VLP de QβG10 y cálculo del rendimiento para la reacción de empaquetamiento: El G10 agregado se empaquetó en VLP de Qβ 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 Qβ purificado. La reacción produjo QβG10 que comprendía 20 µg de oligonucleótido G10 por 100 µg 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

Ensamblaje de Q G10 mediante diafiltración y determinación del rendimiento

Se obtuvo, de manera esencial, la proteína de cubierta de Qβ 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 QβG10 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 µm. Las etapas principales del proceso se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de las etapas del proceso para el ensamblaje y purificación de QβG10

| Etapas del proceso | Parámetros | Resultado de la etapa del proceso |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Disgregación de G10 | Concentración de G10: 260 µM Concentración de NaOH: 25 mM Temperatura: 50 °C Tiempo de calentamiento: 70 minutos Escala: 1,1 o 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 | Acido utilizado: H ₃ PO ₄ 0,5 M | pH 7,2 |
| Re-agregación de la solución | Concentración de G10: 175 µM Concentración de Na ⁺ : 250 mM | tiempo de inicio del |

| | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| de G10 | Temperatura: 85 °C de calentamiento: 10 minutos Escala: 1,1 o G10, V = 654 ml (en alícuotas de 10 ml) | pico relativo de G10: 88 % |
| Descongelación del material de partida | Temperatura: 22 °C | Solución de dímero Qbeta |
| 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 µM Tiempo de mezclado: 60 ± 10 minutos | Solución para la diafiltración 1 |
| | Temperatura: 22 ± 3 °C Escala: 4 o dímero QB, 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 forma VLP alrededor del material central de G10 debido a la eliminación de urea y OTT |
| Oxidación con peróxido de hidrógeno | Concentración de H ₂ O ₂ : 2 mM Temperatura: 22 °C Tiempo de reacción: 60 ± 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 ± 3 °C Flujo: 100 l/(h*m ²) V = 1,61 | Eliminación de peróxido de hidrógeno residual y G10 no empaquetado residual |
| Concentración de QbG10 | Membrana: 300 kDa MWCO Área: 0,1 m ² Temperatura: 22 ± 3 °C Flujo de permeado: < 100 l/(h*m ²) V = 1,21 | Concentración = 2,5 mg/ml |
| Filtración de QbG10 | Filtro de membrana PES de 0,22 µm | 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 QbG10 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 %.

Ejemplo 11

10 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

20 Desensamblaje: Se incubaron 50-100 mg de VLP de AP205 o GA355 (determinada según el análisis de Bradford) en tampón A (NaPO₄ 5 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 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 1 M, 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 (NaPO₄ 20 mM pH 7,2, urea 6 M) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5 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 Sepharose™ FF (16/20, Amersham Biosciences) equilibrada con tampón B (NaPO₄ 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
10 tampón B a tampón C (NaPO₄ 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 (NaPO₄ 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.

15 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
20 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).

25 Purificación de VLP reensambladas y empaquetadas: Se cargaron hasta 25 mg de proteína total en una CL-4B Sepharose™ (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
30 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

35

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 (NaPO₄ 5 mM pH 6,8, NaCl 100 mM, MgCl₂ 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 1 M, 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 (NaPO₄ 20 mM pH 7,2, urea 6 M) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.
45

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 Sepharose™ (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 (NaPO₄ 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
50 concentración de proteína se determina mediante análisis de Bradford.

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).
60

65 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

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

<110> Cytos Biotechnology AG
Kinzler, Matthias
Proba, Karl

<120> PROCESOS PARA EL EMPAQUETAMIENTO DE OLIGONUCLEÓTIDOS EN PARTÍCULAS DE TIPO VIRAL DE BACTERIÓFAGOS DE ARN

<130> P1070PC00

<150> US 60/812.592
<151> 2006-06-12

<150> PCT/EP2006/069734
<151> 2006-12-14

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 10
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sintetizada químicamente

<400> 1
gacgatcgtc 10

<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente
 <400> 2
 gggggacgat cgtcgggg 18
 5
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 3
 ggggggacga tcgtcggggg 20
 15
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 4
 gggggggacg atcgtcgggg gg 22
 25
 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 5
 ggggggggac gatcgtcggg gggg 24
 35
 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 6
 ggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26
 45
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> sintetizada químicamente
 <400> 7
 gggggggggg acgatcgtcg gggggggg 28
 60
 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65
 <220>

ES 2 738 986 T3

<223> sintetizada químicamente

<400> 8
gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30

5

<210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10

<220>
<223> sintetizada químicamente

<400> 9
gggggggggg ggacgatcgt cggggggggg gg 32

15

<210> 10
<211> 132
<212> PRT 65
<213> bacteriófago Qb

20

<400> 10

ES 2 738 986 T3

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15
 5 Gln Thr Leu Val 20 Leu Asn Pro Arg Gly 25 Val Asn Pro Thr 30 Asn Gly Val
 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
 10 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95
 15 Thr Gln Tyr Ser 100 Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 105 110
 Ala Ala Leu 115 Leu Ala Ser Pro Leu 120 Ile Asp Ala Ile 125 Asp Gln Leu
 130
 20 Asn Pro Ala Tyr
 130
 <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
 30 Lys Gln Thr Leu 20 Val Leu Asn Pro Arg Gly 25 Val Asn Pro Thr 30 Asn Gly
 Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45
 Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60
 35 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
 40 Phe Thr Gln Tyr 100 Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 105 110
 Leu Ala Ala 115 Leu Leu Ala Ser Pro 120 Leu Leu Ile Asp Ala 125 Ile Asp Gln
 130 140
 45 Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 135 140 145
 Ser Lys Pro Asp Pro Val 150 Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Thr Gly Lys Tyr 165 Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
 165 170 175
 50 Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
 180 185 190
 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 260 Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
 265 270
 Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala 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 310 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
 15 Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 60
 65 Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 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 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 2 738 986 T3

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
 100 85 90
 Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
 115 120 125
 5 Tyr Ala
 130
 <210> 15
 10 <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
 1 5 10
 Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 20 25 30
 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
 30 Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
 115 120 125
 Asn Pro Ala Tyr
 130
 <210> 16
 35 <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
 1 5 10
 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 50 55 60
 Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
 65 70 75 80
 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 Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
 100 105 110
 55 Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
 115 120 125
 Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
 130 135 140
 Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
 145 150 155 160
 60 Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
 165 170 175
 Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
 180 185 190
 65 Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
 195 200 205
 Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
 210 215 220
 Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp

ES 2 738 986 T3

225 Ala Thr Ala Met Gln 230 Ser Asp Asp Phe Val 235 Leu Ser Gly Arg Tyr 240 Gly
 Val Arg Lys Val Lys 245 Phe Pro Gly Ala Phe 250 Gly Ser Ile Lys Tyr 255 Leu
 5 Leu Asn Ile 260 Gln Gly Asp Ala Trp 265 Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 10 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro 300
 305 Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser 315 320

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 Gly Asp Val Thr 5 Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val 15 Ala Glu
 25 Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
 50 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 30 65 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
 85 Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
 100 110
 35 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 Asp Val Thr Leu 5 Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 30
 50 Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 60
 55 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
 65 70 80
 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
 85 95
 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
 100 110
 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 2 738 986 T3

<213> bacteriófago MX1
<400> 19

5 Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
1 Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35
10 Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85
15 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
115
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 Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys
65 Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe
85
40 Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
100 Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
115
45 Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly
130 Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
145 Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
165
50 Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
180 Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195
55 Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
210 Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
225 Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
245 Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
260 Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala 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 Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
305 310 315 320

ES 2 738 986 T3

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 25 30
 Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 15 35 40 45
 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
 Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 110
 Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125
 25 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
 85 90
 45 Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
 100 110
 Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
 115 120 125
 50

55 <210> 23
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> bacteriófago AP205
 <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 2 738 986 T3

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

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

- 5 (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 Q β , y
 (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;

10 en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

- 15 (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , en el que dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;
 (b) proporcionar un oligonucleótido,

- 20 (i) en el que dicho oligonucleótido comprende al menos un tramo de poli G; y
 (ii) en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón;

- 25 (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende

- (i) dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, más preferentemente 2,5 mg/ml, y/o en la que más preferentemente la concentración de dicho oligonucleótido en dicha mezcla es de 25 a 100 μ M, más preferentemente 62,5 μ M;
 30 (ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;
 35 (iii) dicho oligonucleótido;

- (d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en el que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en el que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y
 40 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

2. Una composición que comprende

- 45 (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 Q β , y
 (ii) un oligonucleótido, en la que dicho oligonucleótido tiene la secuencia de ácidos nucleicos "G10" GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEC ID NO: 8), y en la que dicho oligonucleótido está empaquetado en dicha partícula de tipo viral;

50 en la que dicha composición se puede obtener mediante un proceso para producir dicha composición, comprendiendo dicho proceso las etapas de

- 55 (a) proporcionar una proteína de cubierta de dicho bacteriófago de ARN Q β , dicha proteína de cubierta consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID NO: 10; y (b) una mezcla de SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11;
 (b) proporcionar una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, en el que dicho oligonucleótido comprende un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, preferentemente de un 80 a un 95 %, más preferentemente de un 80 a un 90 %, aún más preferentemente de un 83 a un 90 %, aún más preferentemente de un 85 a un 90 %, y lo más preferentemente un 88 %, en el que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón, y en el que dicha composición de nucleótidos se puede obtener mediante un proceso para producir una composición de nucleótidos que comprende dicho oligonucleótido, comprendiendo dicho proceso para producir una composición de nucleótidos las etapas de:

- 65 (w) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución I, en el que dicho oligonucleótido comprende al menos

un tramo de poli G; y en el que dicha solución I comprende un pH alcalino, en la que preferentemente dicho pH es de 8 a 13, más preferentemente dicho pH es 12;

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

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

10 (ii) incubar dicho oligonucleótido en dicha solución I a dicha temperatura I, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo superior a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina por HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; y

15 (iii) ajustar la temperatura de dicha solución I a una temperatura II, en la que dicha temperatura II es de 0 a 70 °C, en la que preferentemente dicha temperatura II es inferior a la temperatura I, y en la que más preferentemente la temperatura II es de 0 a 25 °C, lo más preferentemente de 0 a 2 °C.

(y) ajustar el pH de dicha solución I a pH de 5 a 8, en el que preferentemente dicho ajuste de dicho pH de dicha solución I se lleva a cabo hasta que dicho pH sea de 6 a 7; y

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

20 (i) proporcionar dicho oligonucleótido en una solución II, en la que dicha solución II comprende un pH de 5 a 8 y al menos 20 mM de un catión, en la que dicho catión se selecciona entre el grupo que consiste en Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Li⁺, Ca²⁺, y Mg²⁺; y en la que preferentemente dicha solución II comprende de 200 a 275 mM de dicho catión, preferentemente 250 mM;

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

30 (iii) incubar dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III, en la que dicha incubación se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo de un 50 a un 110 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón; 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 preferentemente dicha temperatura IV es de 0 a 25 °C, más preferentemente de 0 a 2 °C.

35 (c) generar una mezcla, en el que dicha mezcla comprende:

(i) dicha proteína de cubierta, en la que la concentración de dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 1 a 4 mg/ml, preferentemente 2,5 mg/ml;

40 (ii) un agente capaz de prevenir el autoensamblaje de dicha proteína de cubierta, en la que preferentemente dicho agente comprende un compuesto de desnaturalización seleccionado entre urea y clorhidrato de guanidinio, en la que más preferentemente dicho compuesto de desnaturalización es urea, y en la que aún más preferentemente la concentración de dicha urea en dicha mezcla es de 0,25 a 7,2 M, preferentemente 1 M;

(iii) dicho oligonucleótido;

45 (d) retirar dicho agente de dicha mezcla, en el que preferentemente dicha retirada de dicho agente de dicha mezcla se lleva a cabo mediante un primer intercambio de tampón con un primer tampón, en la que dicho primer tampón comprende cloruro sódico, en la que preferentemente la concentración de dicho cloruro sódico en dicho primer tampón es de 0 a 1 M, preferentemente de 0 a 550 mM, más preferentemente de 0 a 350 mM, aún más preferentemente de 50 a 350 mM, y lo más preferentemente 250 mM; y

50 (e) permitir que dicha proteína de cubierta se autoensamble en una partícula de tipo viral.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que dicho ajuste de la temperatura de dicha solución I a la temperatura II se lleva a cabo con una rampa de temperatura de al menos 3,6 °C/min, y/o, en la que dicho ajuste de la temperatura de la solución II a la temperatura IV se lleva a cabo con una rampa de temperatura de al menos 55 3,6 °C/min.

4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en la que dicha solución I comprende un hidróxido de un metal alcalino, preferentemente hidróxido potásico o hidróxido sódico, lo más preferentemente hidróxido sódico, en la que la concentración de dicho hidróxido es de 10 mM a 200 mM, preferentemente aproximadamente 25 mM, lo más 60 preferentemente 25 mM.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que dicho catión es Na⁺ o K⁺, en la que preferentemente dicho catión es Na⁺.

65 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución I es de 50 μ M a 2 mM, lo más preferentemente 260 μ M y/o en la que la

concentración de dicho oligonucleótido en dicha solución II es de 50 μ M a 2 mM, preferentemente de 100 a 300 μ M lo más preferentemente 175 μ M.

- 5 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que dicha incubación de dicho oligonucleótido en la solución II a la temperatura III se lleva a cabo hasta que dicho oligonucleótido comprenda un tiempo de inicio de pico relativo de un 80 a un 95 %, preferentemente de un 80 a un 90 %, aún más preferentemente de un 83 a un 90 %, aún más preferentemente de un 85 a un 90 %, y lo más preferentemente un 88 %, en la que dicho tiempo de inicio de pico relativo se determina mediante HPLC de exclusión por tamaño con la cápside de dicho bacteriófago de ARN Q β como patrón.
- 10 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proporción molar de dicho oligonucleótido y dicha proteína de cubierta en dicha mezcla es de 0,5 a 1,2, preferentemente 0,7.
- 15 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente comprende además un agente reductor, en la que preferentemente dicho agente reductor es DTT, en la que más preferentemente la concentración de dicho DTT en dicha mezcla es de 1 a 25 mM, de nuevo más preferentemente 2,5 mM.
- 20 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína de cubierta comprende restos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro intermoleculares en dicha partícula de tipo viral, y en la que dicho agente comprende además un agente reductor, en la que preferentemente dicho agente reductor es DTT, en la que más preferentemente la concentración de dicho DTT en dicha mezcla es de 1 a 25 mM, de nuevo más preferentemente 2,5 mM.
- 25 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho primer intercambio de tampón se lleva a cabo a través de una membrana, en la que dicha membrana comprende un corte de peso molecular de 1 a 50 kD, preferentemente de 5 a 30 kD, lo más preferentemente de 30 kD.
- 30 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho proceso comprende además la etapa de poner en contacto dicha partícula de tipo viral con un agente oxidante, en la que preferentemente dicho agente oxidante se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 35 (a) peróxido de hidrógeno, en la que preferentemente la concentración de dicho peróxido de hidrógeno es 0,25-50 mM, preferentemente 2 mM;
- (b) oxígeno;
- (c) glutatión;
- (d) Cu²⁺; y
- (e) Fe³⁺.
- 40 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho proceso para producir dicha composición comprende además la etapa de purificar dicha partícula de tipo viral, y en el que preferentemente dicha purificación comprende un segundo intercambio de tampón con un segundo tampón, en el que dicho segundo tampón es un tampón farmacéuticamente aceptable, y en el que más preferentemente dicho segundo intercambio de tampón se lleva a cabo usando una membrana, en el que dicha membrana comprende un corte de peso molecular
- 45 de 100 a 1000 kD, preferentemente de 300 kD.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el rendimiento de proteína es al menos un 75 % y/o en la que el rendimiento de oligonucleótido es al menos un 75 %, y en la que más preferentemente la pureza de dicha composición es al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, de nuevo más preferentemente al menos un 95 %, aún más preferentemente al menos un 98 %, y lo más preferentemente al menos un 99 %.
- 50 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho oligonucleótido no es accesible a hidrólisis de ADNasa.
- 55

Figura 1/6

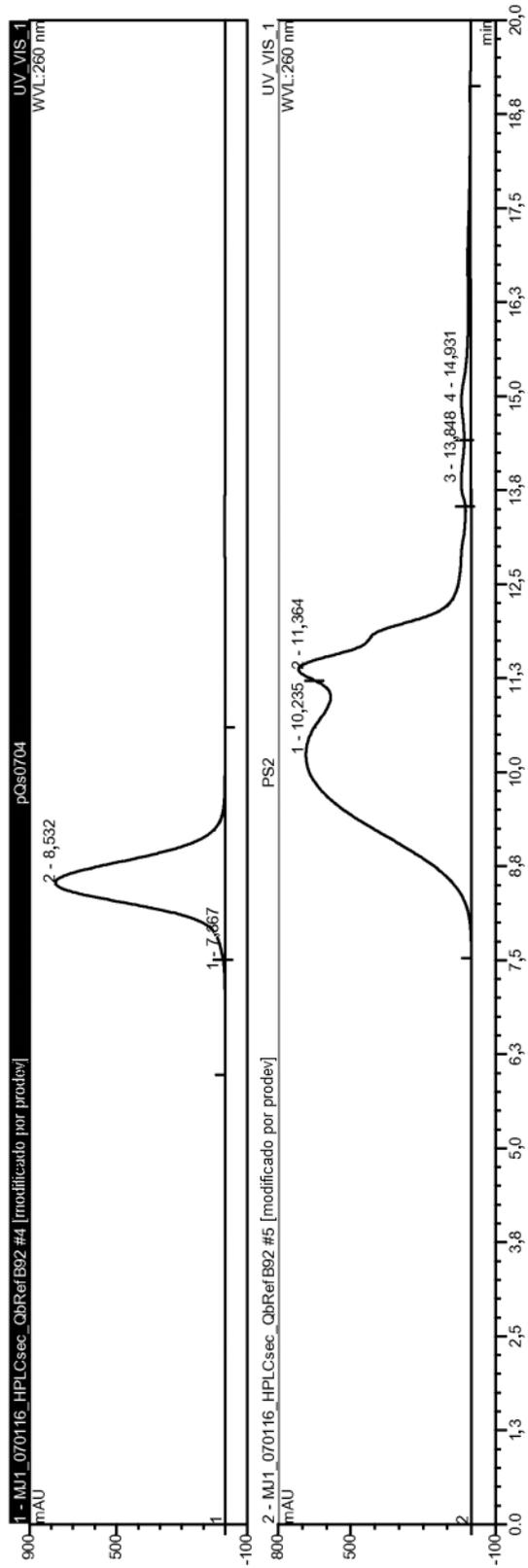


Figura 2/6

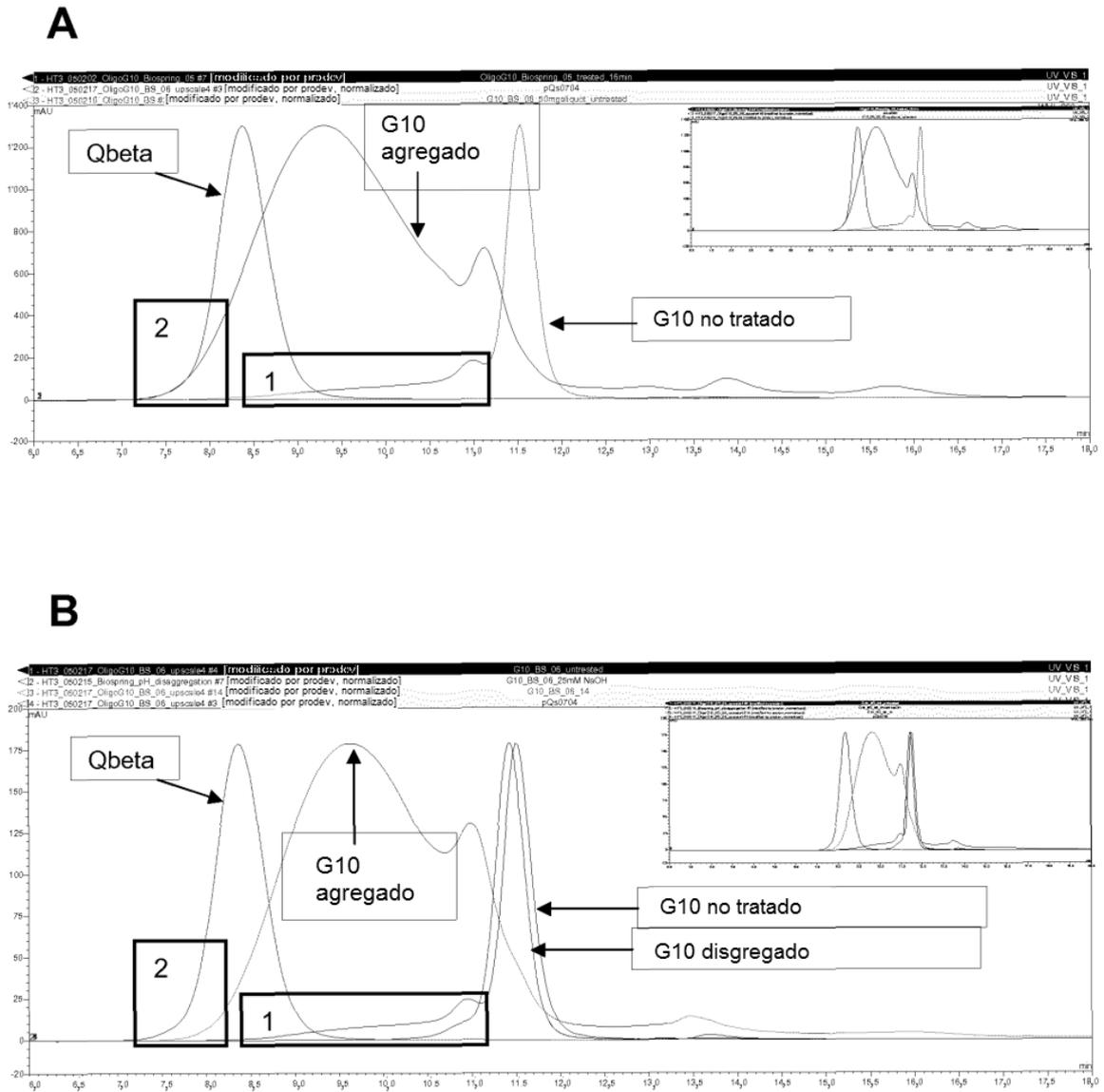


Figura 3/6

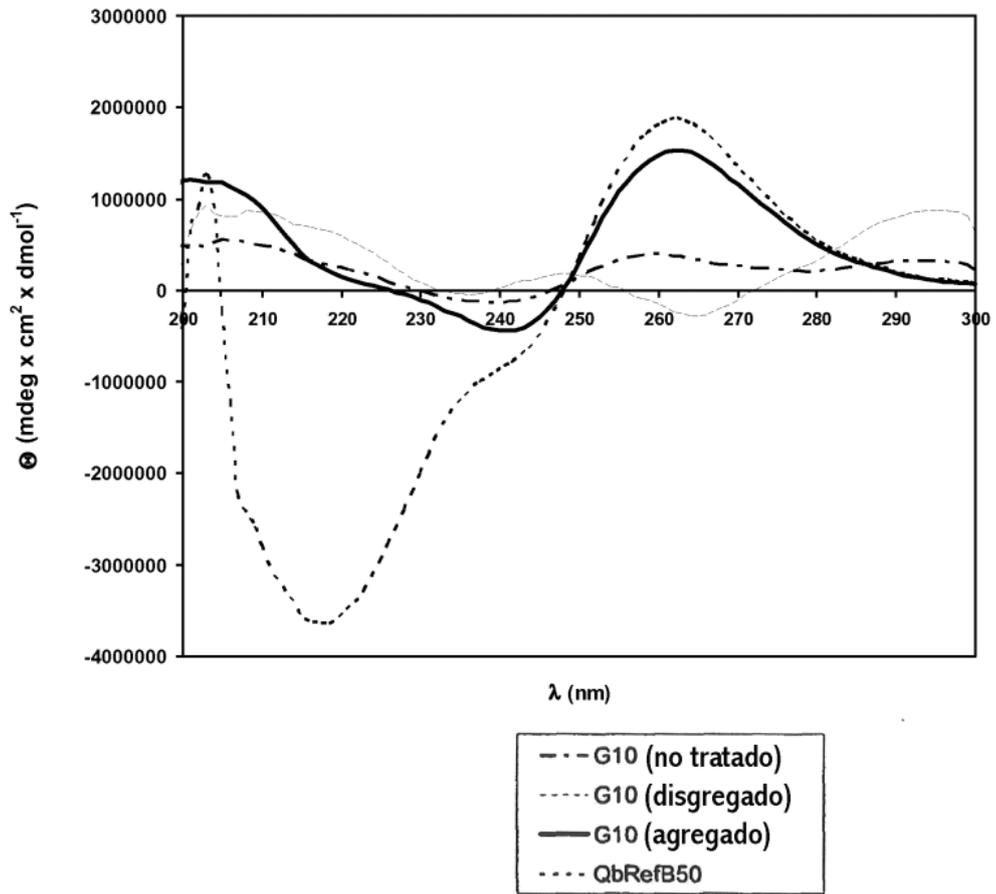


Figura 4/6

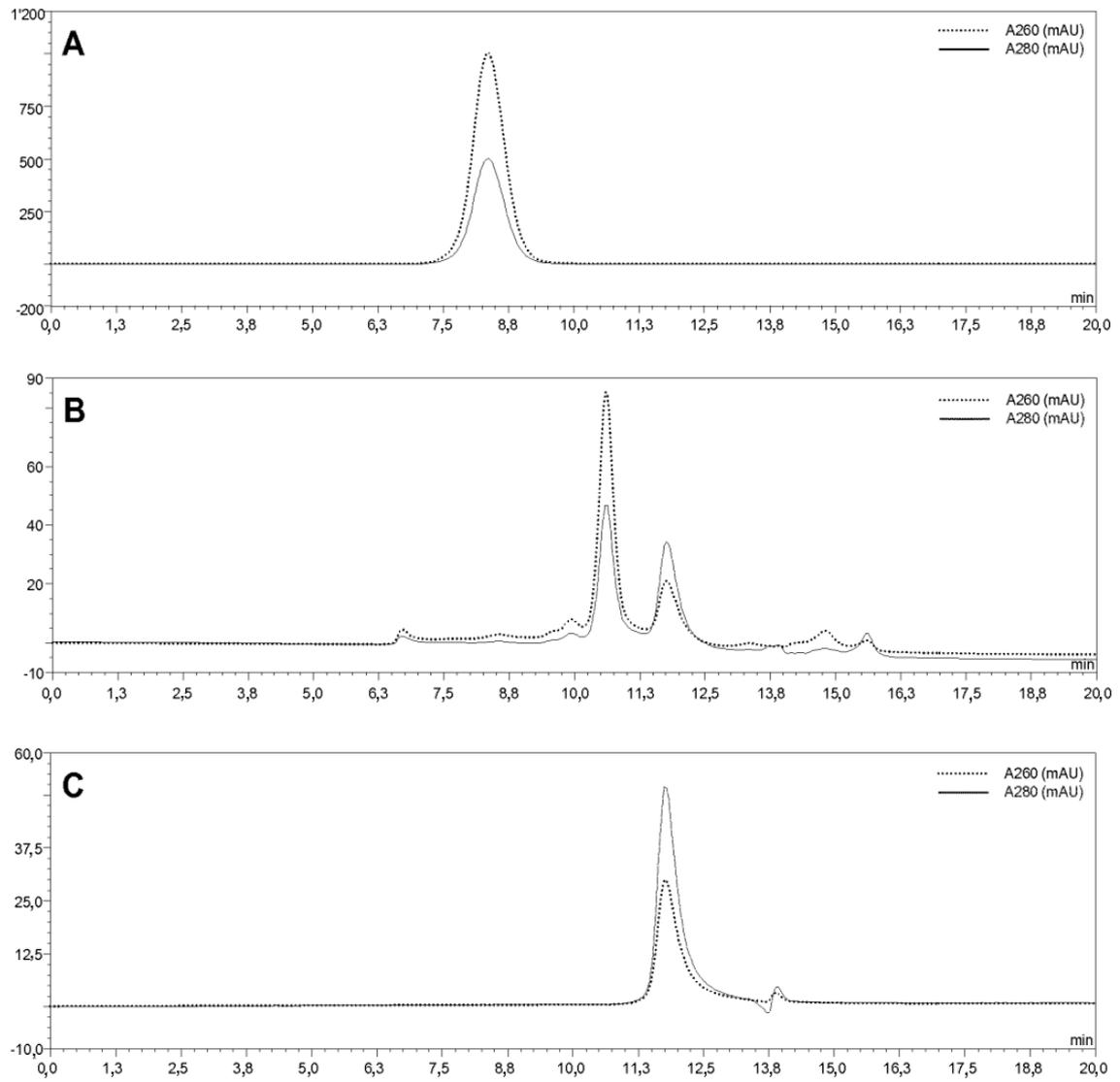


Figura 5/6

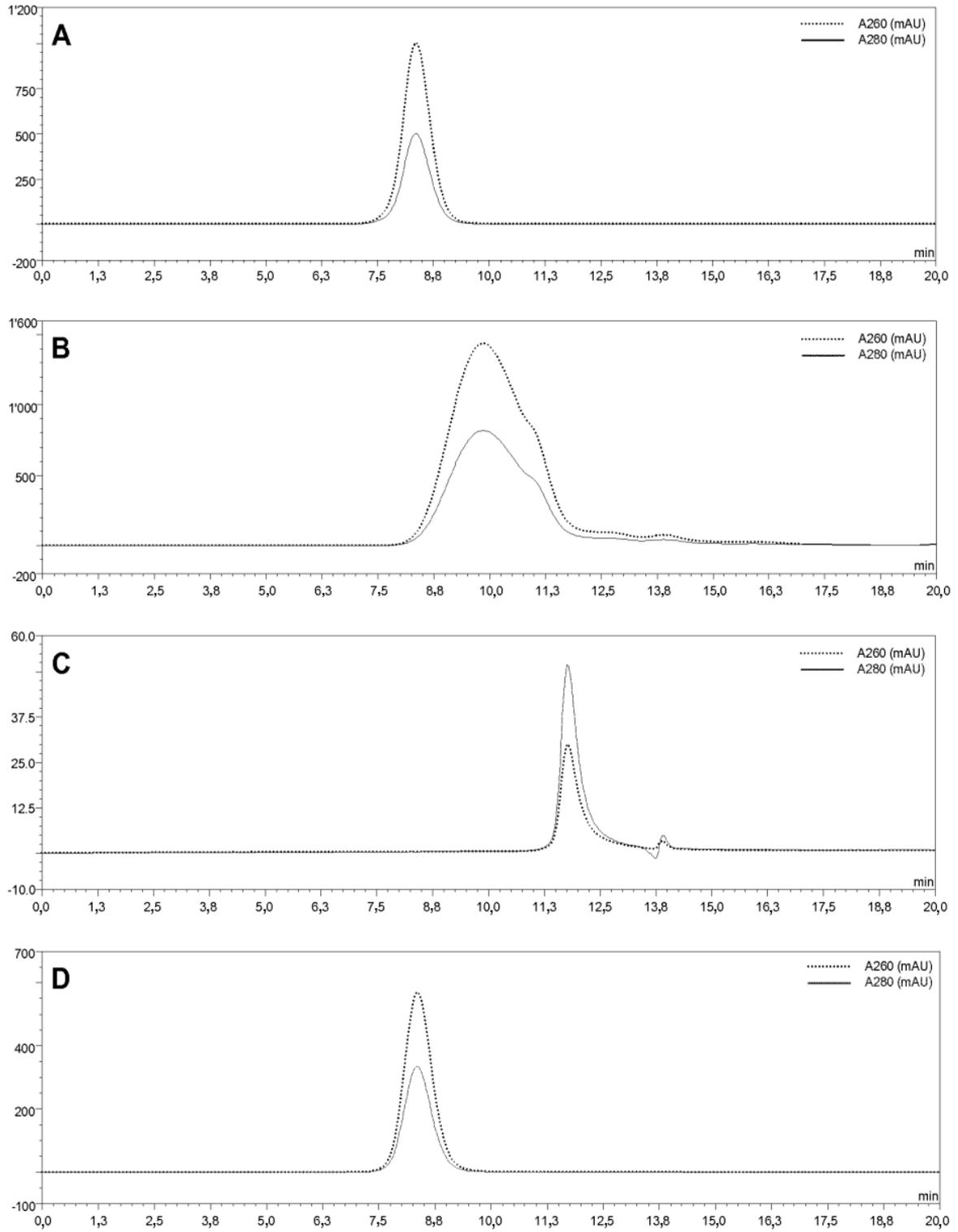


Figura 6/6

